

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Präventive Zahnheilkunde

Westdeutsche Kieferklinik

Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor (komm.): Univ.-Prof. Dr. Dr. Thomas Beikler

**Untersuchung kariogener Mikroorganismen auf den freiliegenden
Wurzeloberflächen bei Patienten mit chronischer Parodontitis**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Bianca Ioana Ellerbrock

2010

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. S. Zimmer

Korreferentin: Prof. Dr. B. Henrich

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Literaturübersicht	7
2.1	Pathogenese der Wurzelkaries.....	7
2.2	Klinisches Erscheinungsbild der Wurzelkaries.....	9
2.3	Epidemiologie der Wurzelkaries	10
2.4	Mikrobiologie der Wurzelkaries.....	13
2.5	Nachweismethoden zur Identifizierung pathogener Mikroorganismen in der Zahnmedizin	21
2.6	Zusammenhang zwischen Parodontitis und Wurzelkaries.....	24
3	Zielsetzung	26
4	Material und Methoden	27
4.1	Untersuchungsaufbau.....	27
4.2	Material.....	29
4.3	Methoden.....	33
4.4	Real-Time PCR als Alternative zur kulturellen Diagnostik	42
4.5	Das humane <i>gapdh</i> -Gen als Positivkontrolle	47
4.6	Design der TaqMan PCRs zum Nachweis von: <i>Actinomyces spp.</i> , <i>Rothia dentocariosa</i> und <i>Neisseria mucosa</i>	47
4.7	Die Quantifizierung der PCR	49
4.8	Evaluierung der PCR.....	56
4.9	Evaluation verschiedener Probenaufschlussverfahren	57
4.10	Analyse der Patientenproben	59
5	Ergebnisse	60
5.1	Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen vor und nach parodontologischer Behandlung	60
5.2	Keimbesiedlung der Wurzeloberflächen vor und nach parodontologischer Behandlung abhängig von der Behandlungsmethode	70
6	Diskussion	79
6.1	Probanden und Methoden	79
6.2	Methoden zur Bestimmung der Mikroorganismenzahl.....	80
6.3	Ergebnisse.....	83
7	Schlussfolgerungen	90

8	Zusammenfassung	91
9	Literaturverzeichnis	94
10	Anhang	101
10.1	Instrumentarium	101
10.2	Verbrauchsmaterialien	101
10.3	Benutzte Chemikalien	102
10.4	Technische Geräte	102
10.5	Software	103
10.6	Abkürzungen	103
10.7	Danksagung	105

1 Einleitung

Epidemiologische Daten weisen auf einen stetigen Anstieg der älteren Bevölkerungsschichten hin. Die Gründe dafür sind die Fortschritte in der medizinischen Versorgung und die verbesserten allgemeinen Lebensbedingungen der Menschen [1].

Durch die zunehmende Lebenserwartung der Menschen gewinnt die Wurzelkaries immer mehr an Bedeutung, da mit steigendem Alter die Anzahl freiliegender Wurzeloberflächen zunimmt [2]. Wenn man sich die aktuellen Ergebnisse der im Jahre 2006 durchgeführten bevölkerungsrepräsentativen Deutschen Mundgesundheitsstudie IV (DMS IV) ansieht [3], ist eine deutliche Zunahme der Wurzelkaries und der Parodontitis, vor allem der fortgeschrittenen Formen, im Erwachsenen-(35- bis 44-Jährige) und Seniorenalter (65- bis 74-Jährige) zu erkennen. Mittelschwere und schwere Parodontalerkrankungen haben bei Erwachsenen und Senioren seit der letzten Erhebung 1997 (DMS III) um 26,9% bzw. 23,7% zugenommen [3]. Unter den Erwachsenen leiden 52,7% unter mittelschweren und 20,5% unter schweren Formen der Parodontitis. Bei den Senioren sind 48% von einer mittelschweren und 39,8% von einer schweren parodontalen Erkrankung betroffen [3].

Als besondere Erkrankungsform ist die Wurzelkaries bei Erwachsenen um 9,7 Prozentpunkte seit der letzten Erhebung (DMS III, 1997) angestiegen. 21,5 % der untersuchten Erwachsenen haben mindestens eine kariöse oder gefüllte Wurzeloberfläche. Bei den Senioren ist das Vorkommen von Wurzelkaries um 29 Prozentpunkte seit 1997 (DMS III) angestiegen [3]. Das heißt, dass 45 % der untersuchten Senioren mindestens eine kariöse oder gefüllte Wurzeloberfläche haben.

Die Rolle der Mikroorganismen bei der Kariogenese ist heute unbestritten, jedoch änderte sich die Bedeutung der einzelnen Mikroorganismen im Laufe der Zeit wesentlich. Unter den Plaquebakterien die an der Wurzelkaries beteiligt sind, kommt den Mikroorganismen wie *Actinomyces spp.* [4-8], *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus* [6, 9-11] und *Lactobacillus spp.* [9-13] eine besondere Rolle zu. Andere Mikroorganismen wie *Veillonella parvula* [14], *Rothia dentocariosa* [10], *Parvimonas micra* (nach alter Bezeichnung: *Peptostreptococcus micros*), *Propionibacterium acnes* und *Neisseria mucosa* [10, 15] wurden in einigen Studien, die mittels kulturellem Nachweis diese Spezies identifizierten, in Verbindung mit

Wurzelkaries gesetzt. Die Rolle dieser Mikroorganismen bei der Entstehung der Wurzelkaries ist jedoch nicht eindeutig geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, das Vorkommen dieser Mikroorganismen an kariösen wie gesunden Wurzeloberflächen zu untersuchen und deren Anzahl mittels einer kulturunabhängigen, molekulargenetischen Methode, der Real-Time PCR, zu quantifizieren. In Anlehnung an die Hypothese, dass es nach parodontaler Hauptbehandlung zu einer Verschiebung innerhalb der oralen Mikroflora, von parodontalpathogenen zu mehr kariogenen Keimen kommt, soll zusätzlich untersucht werden, ob die Anzahl kariogener Mikroorganismen nach parodontaler Hauptbehandlung zunimmt.

2 Literaturübersicht

2.1 Pathogenese der Wurzelkaries

Die Wurzelkaries ist das Ergebnis eines chemo-parasitären Prozesses, bei dem Mikroorganismen verschiedene Mono- und Disaccharide zu Säuren verstoffwechseln, die ihrerseits eine Demineralisierung der Zahnhartsubstanz bewirken [16].

Es gibt zahlreiche Theorien zur Ätiologie der Karies. Die von Miller erstmals vorgestellte und später verifizierte und erweiterte chemoparasitäre Theorie ist heute die allgemein akzeptierte Theorie der Kariesentstehung. Miller erkannte 1892 den Zusammenhang zwischen kariogenem Substrat, Mikroorganismen und der Entmineralisierung der Zahnhartsubstanzen durch die im Bakterienmetabolismus entstehenden Säuren und beschrieb, dass zuerst eine Entmineralisierung und danach ein Einwandern der Mikroorganismen in die Hartsubstanzen erfolgt [17]. Keyes hat im Jahr 1962 die Kariesätiologie in eine moderne Form gegossen und drei obligate ursächliche Komponenten postuliert, die sämtlich anwesend sein müssen, wenn Karies auftreten soll und zwar ein Wirtsorganismus, Mikroorganismen und Substrat für die Mikroorganismen [18]. Zu diesem Ursachenkomplex fügte König als einen weiteren obligaten Faktor, die Zeit hinzu [16].

Das Zusammenspiel dieser Grundvoraussetzungen wird dadurch erklärt, dass Mikroorganismen in der Lage sein müssen, sich im Verband eines Belags (Plaque) am Zahn anzuheften, und dass sie Substrat benötigen, um ihre kariesverursachenden StoffwechsellLeistungen in Gang zu halten. Die Mikroorganismen benötigen nicht nur einen geeigneten Platz zur Retention am Zahn, sondern müssen dort auch genügend lange verweilen können um eine Demineralisation der Zahnhartsubstanz zu bewirken [16].

Neben diesen Hauptfaktoren der Kariesentstehung gibt es zahlreiche sekundäre Faktoren, wie z.B. Speichelfluss und Speichelzusammensetzung, pH-Wert und Pufferkapazität des Speichels, Dauer und Häufigkeit der Substratzufuhr, Zahnfehlstellungen und Zahnfehlbildungen. Diese können die Entstehung und Progression einer kariösen Läsion beeinflussen [19].

Die Mikroorganismen aggregieren am erworbenen Zahnoberhäutchen, dem Pellikel, und vermehren sich dort. Dieses Häutchen besteht aus den Proteinen des Speichels (saure prolinreiche Proteine, Glykoproteine, Serumproteine, Enzyme, Immunglobuline). Daraus entwickelt sich bei unzureichender Mundhygiene und fehlendem mechanischem Abrieb ein weiches Aggregat aus Bakterien und deren Produkten, Speichelproteinen, Speichelglykoproteinen und anorganischen Salzen. Der resultierende strukturierte, zähe, verfilzte Zahnbelag wird als Plaque bezeichnet. Mit zunehmendem Alter gewinnt die Plaque eher anaeroben Charakter. In der reifen Plaque finden sich neben einem hohen Anteil an fakultativ-anaeroben Streptokokken eine Zunahme an obligat anaeroben Mikroorganismen wie Aktinomyzeten, Veillonellen und Fusobakterien. Als metabolische Leistung verstoffwechseln sie mit der Nahrung aufgenommene Kohlenhydrate wie Glucose und Saccharose durch enzymatischen Abbau zu organischen Säuren (Laktat, Propionat, Butyrat und Valerianat). Die Säuren zerstören das Kristallitengefüge der Zahnhartsubstanzen. [20]

Wurzelkaries wird zum Problem, sobald Wurzeloberflächen entblößt sind. Während der Anteil an verbleibenden Zähnen mit zunehmendem Alter sinkt, nimmt der Anteil an freiliegenden Wurzeloberflächen kontinuierlich zu, und zwar aufgrund von Parodontalerkrankungen und altersinvolutiven Veränderungen, die zu Gingivarezessionen führen [21].

Die freiliegende Wurzeloberfläche stellt eine Schwachstelle dar; sie ist als ein Locus minoris resistentiae definiert worden [2]. Einerseits können durch aggressive Mundhygienemaßnahmen keilförmige Defekte und bei zusätzlichem Säureangriff Erosionen entstehen. Andererseits wird aufgrund des niedrigeren Mineralgehalts das freiliegende Dentin der Wurzeloberfläche eher demineralisiert als der Schmelz.

Das Wurzelentin besitzt engere Dentinkanälchen als koronales Dentin, was zu unterschiedlichen Ausbreitungsrichtungen von Bakterien und unterschiedlichen histologischen Erscheinungsformen von Wurzelkaries führen kann [22]. Koronales Dentin ist außerdem normalerweise von Schmelz umgeben. Dieser reagiert weniger empfindlich auf Säureangriffe als Dentin und Zement, was sich im niedrigeren Anteil anorganischer Substanzen und dem höheren Karbonatgehalt des mineralischen Anteils von Dentin und Zement begründet. Der sogenannte „kritische pH-Bereich“ von Wurzelentin, bei dem es zur Entmineralisierung kommt, liegt nicht, wie im

Schmelz bei ca. 5,7, sondern zwischen 6,0 und 6,8 [23]. Diese Unterschiede führen dazu, dass sich das klinische Erscheinungsbild der Wurzelkaries von der koronalen Karies unterscheidet [24].

2.2 Klinisches Erscheinungsbild der Wurzelkaries

Erste Definitionen der Wurzelkaries orientierten sich fast ausschließlich am morphologischen Erscheinungsbild. Schon Miller beschrieb die „Cementcaries“ als „Rauhigkeit oder Weichheit der Cementoberfläche, welche sich leicht mit dem Excavator einstoßen oder abschaben lässt“ [17]. Andere Autoren definierten die Wurzelkaries als eine weiche, progressive Läsion, die an jeder Wurzeloberfläche, die bindegewebiges Attachment verloren hat und dem Mundmilieu ausgesetzt ist, angetroffen werden kann [24]. Auf die Problematik der klinischen Diagnostik weisen Banting et al. hin [25]. Diese Autoren beschreiben die Wurzelkaries als abgegrenzte und verfärbte Läsion auf der Wurzeloberfläche, in die die zahnärztliche Sonde eindringen kann und beim anschließenden Herausziehen ein gewisser Widerstand verspürt wird.

Die Variationsbreite der möglichen Erscheinungsformen der Wurzelkaries ist sehr groß. Man kann flächenhafte, stark erweichte Läsionen bis hin zu klar umschriebenen, dunkel verfärbten, harten Läsionen vorfinden [26]. Alle diese Erscheinungsformen treten einerseits an gut zugänglichen Stellen, wie den Vestibulärflächen, aber auch an unzugänglichen Stellen im Approximalbereich oder subgingival auf. Diese rein morphologische Betrachtungsweise lässt jedoch den dynamischen Charakter der Kariesentstehung außer acht, so dass andere Autoren auf die Idee kamen die Wurzelkaries in aktive und inaktive Läsionen zu unterteilen [26]. Als aktive Wurzelkaries werden gelb-hellbraune, weiche-lederartige, häufig mit Plaque bedeckte Läsionen bezeichnet. Inaktive Läsionen sind dunkelbraun bis schwarz und haben eine normalharte Dentinoberfläche. Abgesehen von der Beurteilung der Verfärbung bevorzugen andere Autoren eine Einteilung der Wurzelkaries nach ihrer Oberflächenbeschaffenheit in harte, lederne und weiche Läsionen [2].

2.3 Epidemiologie der Wurzelkaries

Wenn man sich epidemiologische Studien zur Wurzelkaries ansieht, kann man den Eindruck gewinnen, dass Wurzelkaries umso häufiger vorkommt, je älter die Patienten sind. Es ist jedoch fraglich, ob das Wurzelkariesrisiko tatsächlich mit steigendem Alter zunimmt oder ob nicht lediglich die Anzahl der Wurzeloberflächen, die unter Risiko stehen, größer wird [2]. Zur Beschreibung des Wurzelkariesrisikos eignet sich der von Katz (1980) vorgeschlagene „Root Caries Index“ (RCI) [27]. Dieser drückt das Verhältnis der kariösen oder gefüllten Wurzeloberflächen im Verhältnis zu allen freiliegenden Wurzeloberflächen aus.

$$\text{RCI} = \frac{(\text{RD} + \text{RF}) \times 100}{\text{RD} + \text{RF} + \text{RN}}$$

(RD= kariöse, RF= gefüllte und RN= kariesfreie Wurzelflächen)

Laut einer 5-Jahre-Studie aus Finnland an 71 Patienten zwischen 76-81 Jahren, erhöhte sich der RCI innerhalb der Untersuchungszeit um 25% [28]. Untersuchungen aus USA an 723 Patienten (Alter > 45 Jahre) zeigten, dass 36% der Probanden nach 2 Jahren mindestens eine neue kariöse Läsion auf der Wurzeloberfläche entwickelten [29]. Eine japanische Studie an 287 Patienten (Alter > 60 Jahre) zeigte ebenfalls ähnliche Ergebnisse: 39% der Probanden hatten eine oder mehr kariöse Wurzeloberflächen und 53% hatten mindestens eine kariöse oder gefüllte Wurzelfläche. Die Anzahl der kariösen oder gefüllten Wurzeloberflächen korrelierte mit der Anzahl der vorhandenen Zähne [30].

Untersuchungen von Heinrich et al. zeigten anhand des RCI, dass das Wurzelkariesrisiko, unabhängig vom Alter und Geschlecht konstant bei 10-12% der freiliegenden Wurzeloberflächen bleibt [31]. Im Gegensatz dazu zeigten die Ergebnisse von Splieth et al., dass sich die Anzahl der kariösen oder gefüllten Wurzeloberflächen mit dem Alter der untersuchten Patienten erhöht [32]. Untersucht wurden dabei 6267 Probanden im Alter zwischen 20-79 Jahre. Der RCI betrug in der Gruppe der 25-34-Jährigen 4,6%, dagegen in der Gruppe der 55-64-Jährigen 10,6%.

In weiteren Untersuchungen wurde der prozentuale Anteil an Probanden mit wenigstens einer kariösen oder gefüllten Wurzeloberflächen berechnet (engl. RDF= root decayed or filled). Tabelle 1 gibt die Anzahl der Probanden und den RDF-Wert in den verschiedenen Studien dar.

Patientengruppe	Untersucher/Jahr	Probanden	% RDF
Allgemeinbevölkerung ohne Trinkwasserfluoridierung	Hazen et al. 1973 [24]	500	39
	Banting und Stamm 1979 [33]	465	36
	Katz et al. 1982 [34]	473	42
	Vehkalahti et al. 1983 [35]	5028	17
	Stamm et al. 1990 [36]	967	22
	Heinrich et al. 1990 [31]	963	41
	Splieth et al. 2004 [32]	6267	69
Allgemeinbevölkerung mit Trinkwasserfluoridierung	Banting und Stamm 1979 [33]	502	21
	Stamm et al. 1990 [36]	967	35
Unbehandelte Parodontalpatienten	Hix und O'Leary 1976 [37]	124	58
	Ravald und Hamp 1981 [38]	35	87
Behandelte Parodontalpatienten	El-Hadary et al. 1975 [39]	220	42
	Hix und O'Leary 1976 [37]	120	45
	Ravald und Birkhed 1992 [11]	99	29
	Paraskevas et al. 2004 [40]	80	39
Ältere Patienten außerhalb von Heimen	Beck et al. 1985 [41]	520	63
	Locker et al. 1989 [21]	183	57
	Wallace et al. 1988 [42]	603	70
	Fure und Zickert 1990 [43]	463	89
	Hellyer et al. 1990 [44]	146	88
	Gilbert et al. 2001 [29]	723	36
	Imazato et al. 2006 [30]	287	53
Chronisch Kranke, Pflegefälle, Heimbewohner	Sumney et al. 1973 [45]	135	59
	Banting et al. 1980 [25]	59	83

Tab. 1: Epidemiologie der Wurzelkaries

Mit den Prädilektionsstellen der Wurzelkaries beschäftigte sich eine repräsentative Longitudinalstudie aus Finnland, bei der 8000 Patienten untersucht worden sind [46]. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Männer mit einem Anteil von 22% zwischen 1,6 und 2,2-mal mehr Wurzelkaries aufwiesen als Frauen (15%), wobei der Anteil proportional zum Alter war. Freiliegende Wurzeloberflächen waren im Unterkiefer signifikant häufiger anzutreffen als im Oberkiefer [46]. Insbesondere die Unterkiefer-Eckzähne und Prämolaren von Männern waren am häufigsten, Oberkiefer-Eckzähne und Unterkiefer-Molaren von Männern waren am zweithäufigsten von Wurzelkaries betroffen. Eine repräsentative Studie aus Deutschland an 6267 Probanden zeigte ebenfalls, dass die Unterkiefer-Prämolaren am häufigsten von Wurzelkaries betroffen waren [32].

Eine weitere Studie zu den Prädilektionsstellen der Wurzelkaries zeigte, dass vor allem an der Schmelz-Zement-Grenze sowie an Füllungs- und Kronenränder häufiger kariöse Läsionen entstehen. Außerdem wurden an vestibulären Flächen am häufigsten kariöse Läsionen festgestellt [42].

Um eine Aussage über die Risikofaktoren der Wurzelkaries zu machen, wurden klinische Langzeitstudien an parodontal behandelten Patienten durchgeführt. Ravald et al., die eine 12-jährige Longitudinalstudie an parodontal behandelten Patienten durchführten, konnten die Aussagekraft von möglichen Risikofaktoren über 12 Jahre verfolgen. 63% der untersuchten Patienten wiesen bis zu 46 neue kariöse Läsionen auf. Nach Ravald et al. waren folgende Risikofaktoren für die Wurzelkaries relevant: Laktobazillen $\geq 10^5$ Colony forming units (CFU)/ ml, Mutans-Streptokokken $\geq 5 \times 10^5$ CFU/ml, Plaque Index $\geq 50\%$, Blutung beim Sondieren, Speichelsekretionsrate $\leq 0,7$ ml/min, pH-Wert des Speichels bei 4,5, Diät-Index $\geq 42 \times$ Zuckerkonsum/Woche, Alter ≥ 65 Jahre und Rauchen [11]. Als sinnvolle Prädiktoren für die Wurzelkariesinzidenz konnten die Untersucher die Anzahl an Mutans-Streptokokken und Laktobazillen, den Plaqueindex und auch die Ernährung ermitteln [11]. Zusätzlich wurde bei Rauchern signifikant häufiger Wurzelkaries entdeckt als bei Nichtrauchern, was jedoch vermutlich auf das damit verbundene größere Parodontitisrisiko und den Anstieg der freiliegenden Wurzeloberflächen zurückzuführen ist [47].

Abgesehen von der Tatsache, dass Parodontitispatienten unter Risiko stehen, spielt für die Entstehung der Wurzelkaries die remineralisierende Wirkung des Speichels

eine entscheidende Rolle [48]. Wie anhand von Untersuchungen an älteren Patienten gezeigt werden konnte, beeinflussen viele in der Geriatrie eingesetzte Medikamente den Speichelfluss negativ, so dass sich sogar aus der Anzahl an Medikamenten das Wurzelkariesrisiko einschätzen lässt [30, 49].

2.4 Mikrobiologie der Wurzelkaries

2.4.1 Experimentelle Untersuchungen an Tieren

Die ersten direkten Hinweise auf die patho-physiologische Rolle der oralen Mikroorganismen bei der Entwicklung von Wurzelkaries lieferten die in den Sechzigerjahren durchgeführten Tierstudien, bei denen man herausfand, dass filamentöse Bakterien bei Hamstern in die Wurzeloberflächen eindringen und Karies hervorrufen können. Es wurde gezeigt, dass Isolate von *Actinomyces naeslundii* vom Menschen wie auch Reinkulturen von *Streptococcus mutans* und Bakterien der *Streptococcus mitis*- und *Streptococcus anginosus*-Gruppe bei Ratten und Hamstern Karies der Wurzeloberflächen und Parodontalerkrankungen verursachten [5].

2.4.2 Untersuchungen am Menschen

Die Planung der älteren Untersuchungen am Menschen erfolgte anhand der Ergebnisse aus den ersten Tierexperimenten. Diese konzentrierten sich auf die Rolle, die grampositive filamentöse Bakterien, vor allem *Actinomyces spp.* bei der Wurzelkaries spielen. Zu den Organismen, die aus den Läsionen isoliert wurden, gehörten *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus* und *Rothia dentocariosa*, *Neisseria spp.* und *Veillonella spp.* [4, 5, 7, 50]. Andere Studien zeigten aber auch, dass Plaque oberhalb kariöser Läsionen eine höhere Anzahl an *Actinomyces spp.* aufweist als die Plaque oberhalb nichtkariöser Wurzeloberflächen [10, 13, 51, 52]. In einigen Studien wurde berichtet, dass *Streptococcus mutans* zu den bedeutenden Bestandteilen der Mikroflora der Wurzelkaries gehört [52-54]. Nachfolgende Untersuchungen tendierten dazu, stärkere Assoziationen von *Streptococcus mutans* und Laktobazillen mit der Wurzeloberflächenkaries zu finden [6, 9, 10, 12, 52]. Eine umfangreiche

Längsschnittstudie in Kanada zeigte, dass obwohl keine direkte Korrelation zwischen speziellen Bakterien und Wurzelkaries gefunden wurde, an den Stellen wo sich *Streptococcus mutans* und Laktobazillen auf der Oberfläche befanden, sich später eine kariöse Läsion entwickelte [54] .

In anderen Untersuchungen hat man versucht, die kariösen Läsionen in weiche und harte Läsionen zu unterteilen, um somit herauszufinden, welche der Mikroorganismen an dem akuten Verlauf der Wurzelkaries beteiligt sind [6, 10, 12, 25, 54]. Es wurde berichtet, dass Mutans-Streptokokken oft um die 30% der gesamten kultivierbaren Mikroflora in der weichen Läsion ausmachten, aber im Gegensatz dazu nur wenig/gelegentlich in harten Läsionen zu finden waren [25].

Andere Studien beschäftigten sich mit der Entwicklung von Modellsystemen, bei denen man *In-situ*-Vorrichtungen verwendete, um die Mikroflora von aktiv fortschreitenden kariösen Läsionen der Wurzeloberfläche zu untersuchen [55]. Die Probanden trugen drei Monate lang an ihren Teilprothesen definierte Proben, die aus menschlichen Zähnen (dritte Molaren) angefertigt wurden. Nach diesem Zeitraum wurde die vorherrschende Mikroflora der Plaque bestimmt und die Intaktheit der experimentellen Wurzeloberflächen mittels quantitativer Mikroradiographie gemessen. Obwohl sich bei der Zusammensetzung der Plaquemikroflora deutliche individuelle Unterschiede zeigten, dominierten in den Plaqueproben, die sich auf den am stärksten demineralisierten Wurzeloberflächen befanden, entweder *Actinomyces naeslundii* oder eine Kombination aus *Streptococcus mutans* und *Lactobacillus spp.* Die Plaque, die von weniger stark demineralisierten Wurzeloberflächen stammte, beherbergte eine größere Anzahl an *Veillonella spp.* und anderen gramnegativen Stäbchen [55]. Das kann darauf beruhen, dass Veillonellen in ihrem Metabolismus Lactat verbrauchen und somit weniger Substrat für die Demineralisierung der Zahnhartsubstanz vorhanden ist [56].

In einer Studie von Van Houte et al. wurde sowohl Plaque als auch Speichel von Patienten mit und ohne Wurzelkaries untersucht [15] . Die Ergebnisse zeigten, dass die Plaque der Patienten mit Wurzelkaries eine höhere Anzahl und Prävalenz an Mutans-Streptokokken aufwies als die der Patienten ohne Wurzelkaries. Die Anzahl der Mutans-Streptokokken und der Laktobazillen war auch im Speichel der Patienten mit Wurzelkaries signifikant höher als im Speichel der Patienten ohne Wurzelkaries.

Neue Untersuchungen zur Mikrobiologie der Plaque oberhalb kariöser Läsionen oder des infizierten Dentins basieren auf kulturunabhängigen Methoden wie z.B. der Real-Time PCR [7, 8, 57-62]. Mittels dieser molekularbiologischen Technik ist sowohl eine genauere Bestimmung der Keimzahl einer Bakterienspezies möglich als auch der Nachweis solcher Bakterien die sich kulturell nicht bestimmen lassen [57].

Yoshida et al. bestimmten als erste in Plaque- und Speichelproben von 10 Patienten mit Hilfe von geeigneten Primerpaaren und Sonden die Anzahl von *S. mutans* und *S. sobrinus* mittels Real-Time PCR [60]. Die Plaqueproben wurden von der vestibulären Fläche der ersten Oberkiefer-Molaren entnommen und in PBS (Phosphate-buffered Salines) resuspendiert. Buyn et al. untersuchten mittels Real-Time PCR die Laktobazillenanzahl in fortgeschrittenen kariösen Läsionen [63]. Die Ergebnisse ihrer Studie zeigten, dass Laktobazillen-DNA in allen 65 Proben in verschiedenen Konzentrationen zu finden waren. Im direkten Vergleich zu der Laktobazillenkonzentration, die Martin et al. mittels Kultur bestimmten [62], war die Laktobazillenkonzentration die mittels Real-Time PCR von Buyn et al. ermittelt wurde, um das 34-fache höher.

Martin et. al untersuchten mittels Kultur und Real-Time PCR u.a das Vorkommen von *Parvimonas micra* im kariösen Dentin [62]. Das kariöse Dentin entstammte 65 kariösen vitalen Zähnen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass in den Proben, in denen sowohl mittels Kultur als auch Real-Time PCR *P. micra* identifiziert wurde, der quantitative Nachweis dieser Spezies mittels Real-Time PCR um ein 4-faches höher ausfiel als mittels Kulturdiagnostik.

2.4.3 Patho-physiologische Relevanz der an der Wurzelkaries beteiligten Mikroorganismen

2.4.3.1 Actinomyces spp.

Aktinomyzeten gehören zu der Familie der *Actinomycetaceae*. Nach traditioneller Definition sind Aktinomyzeten („Strahlenpilze“) Fadenbakterien, die dazu neigen, in verzweigten Geflechten zu wachsen. Ihre Ähnlichkeit mit echten Pilzen ist - sieht man von diesem myzelialen Wachstum ab – jedoch nur oberflächlich. Mikroskopisch stellen sie sich als grampositive, gerade oder leicht gebogene, 0,2-1,0 µm dicke unbewegliche Stäbchen oder schlanke, leicht gewellte, bis 1 µm dicke Fäden dar.

Hinsichtlich der Sauerstofftoleranz existiert eine beträchtliche Variationsbreite. Die Optimaltemperatur für die humanmedizinisch bedeutsamen Arten liegt bei 35-37°C. Pathogene Aktinomyzeten werden in zwei Gruppen unterteilt: Fadenbakterien mit fermentativem Kohlenhydratmetabolismus, welche ihren natürlichen Standort überwiegend auf den Schleimhautoberflächen und insbesondere in der Mundhöhle warmblütiger Wirtsorganismen haben und obligat aerobe Aktinomyzeten, welche überwiegend in der freien Natur, insbesondere im Erdboden, leben [64].

Aus der menschlichen Mundhöhle konnten bisher folgende Genospezies isoliert werden: *A. naeslundii* Genospezies-1 (frühere Bezeichnung: *A. naeslundii* Serotyp I), *A. naeslundii* Genospezies-2 (frühere Bezeichnung: *A. viscosus* Serotyp II und *A. naeslundii* Serotyp II, -III und IV), *A. naeslundii* Serovariation WVA 963 (frühere Bezeichnung: *A. naeslundii* Serotyp IV) sowie *A. israelii*, *A. georgiae*, *A. gerencseriae*, *A. odontolyticus*, *A. pyogenes* und *A. meyeri* [64].

Der primäre Lebensraum der humanen Arten ist die Mundhöhle, wo sie als Kommensale auf sämtlichen speichelbedeckten Oberflächen kolonisieren. Die Aktinomyzeten sind die Pionierkeime bei der Entstehung oraler Biofilme, sie können sich sehr gut an stark verändernde lokale Bedingungen anpassen [65]. Ihre Kolonisierung wird im Wesentlichen durch ihre Lipoteichonsäure und ihre Fimbrien vermittelt. Alle *Actinomyces spp.* vergären Glucose zu einem typischen Muster von Stoffwechselprodukten, nämlich Bernstein-, Essig- und Milchsäure. Zusätzlich bilden sie unlösliche extrazelluläre Polysaccharide und besitzen ein leistungsfähiges PTS-Zuckertransportsystem (Phosphotransferase-System), die zu ihrer Kariogenität beitragen [62].

Einige Stämme von *A. naeslundii* bilden einen extrazellulären Schleim und ein Fruktan aus Saccharose. Andere Stämme können wiederum während der Demineralisation bei niedrigem pH-Wert Urease bilden. Durch die Aktivität der Urease wird die Bildung von Ammoniak katalysiert, der den niedrigen pH-Wert wieder anheben kann [20]. Untersuchungen zur frühen Demineralisation von intakten Wurzeloberflächen zeigten, dass die Isolierungshäufigkeit von *A. naeslundii* nach zwei Wochen höher war als im Anfangsstadium. Dagegen wurden im Anfangsstadium vermehrt *A. odontolyticus* isoliert [56]. Diese Untersuchungen weisen auf eine potentielle Rolle von *Actinomyces spp.* bei der frühen Demineralisation der Wurzeloberfläche hin [56].

2.4.3.2 *Lactobacillus* spp.

Laktobazillen sind grampositive gerade Stäbchen, die in der Länge unterschiedlich sein können. Ihre Bezeichnung „Milchsäurebakterien“ weist auf die Bildung von Milchsäure als ihre charakteristische Eigenschaft hin. Laktobazillen gehören zur körpereigenen Mikroflora des Menschen. Die wichtigsten vorkommenden Arten sind: *L. acidophilus*, *L. gasseri* (vormals *L. acidophilus* Typ I), *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. johnsonii* (vormals *L. acidophilus* Typ II, III), *L. salivarius*, *L. reuterii* (früher *L. fermentum* II), *L. rhamnosus* und *L. paracasei*.

In der menschlichen Mundhöhle treten Laktobazillen im Speichel, auf der Zunge, den Schleimhäuten, am Gaumen und auf den Zahnoberflächen, insbesondere in fortgeschrittenen kariösen Läsionen sowohl im Schmelz als auch auf der Wurzeloberfläche auf. In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass die Laktobazillenzahl im Speichel nach der Exkavation der kariösen Läsionen drastisch zurückgeht [57].

Laktobazillen sind säuretolerant, sie tolerieren pH Werte die für andere Mikroorganismen letal sind [66]. Sie fermentieren Glucose entweder homofermentativ zu Lactat oder heterofermentativ zu Lactat und Acetat. Laktobazillen bewirken den größten Abfall des lokalen pH-Wertes. Azidogenität und Azidurie sind nicht die einzigen kariogenen Eigenschaften dieser Mikroorganismen, sie besitzen ähnlich wie die *Actinomyces* spp. und die *Streptococcus* spp. ein PTS-Zuckertransportsystem, welches als bedeutendstes Zuckertransportsystem bei den säurebildenden Bakterien gilt [64].

2.4.3.3 *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus*

Diese Mikroorganismen gehören zu der Gattung *Streptococcus* und zur Familie der *Streptococcaceae*. Streptokokken sind aerotolerante, unbewegliche und grampositive Mikroorganismen. Sowohl *S. mutans* als auch *S. sobrinus* gehören zu der Gruppe der Mutans-Streptokokken. In erster Linie ist die Gruppe der Mutans-Streptokokken, insbesondere die am häufigsten in der Mundhöhle vorkommenden *S. mutans* und *S. sobrinus*, für die Kariesätiologie bedeutsam. Mutans-Streptokokken, insbesondere *S. mutans*, sind im bezahnten Teil der Bevölkerung nahezu ubiquitär verbreitet. Während *S. sobrinus* häufig - und immer in Gesellschaft von *S. mutans* - bei kariesaktiven Personen angetroffen wird, ist *S. mutans* auch bei kariesinaktiven

Personen – in Abwesenheit von *S. sobrinus* – isolierbar. Dies hat folgenden Grund: *S. sobrinus* ist empfindlich gegen das im Speichel vorhandene N-Acetylglucosamin und kann selber keine intrazelluläre Polysaccharide bilden. Erst ein kariogenes Milieu mit niedrigem pH-Wert und großem Zuckerangebot ermöglicht das Überleben und Wachstum von *S. sobrinus* [64].

Die *S. mutans*- Keime verdanken ihren Namen der Tatsache, dass sie, je nach metabolischem Aktivierungsgrad, ihr Aussehen von der Kokkenform in die Stäbchenform ändern (mutieren) können [64].

Die besondere Kariogenität von *S. mutans* hängt mit folgenden Virulenzfaktoren zusammen: *S. mutans* sind in der Lage, mit Hilfe ihrer Glucosyltransferasen aus niedermolekularen Zuckern langkettige Polysaccharide aufzubauen. Diese unlöslichen extrazellulären Polysaccharide (Glukane, bzw. „Mutane“) erschweren das Abspülen von *S. mutans* von der Zahnoberfläche. Das führt dazu, dass sich *S. mutans* fester als die überwiegende Mehrzahl der konkurrierenden Mundhöhlenbakterien auf die Zahnoberfläche etablieren kann. Die Glukane verleihen die Klebrigkeit, das Volumen und die Beständigkeit der Plaque-Biofilme. Sie stellen innerhalb der Plaque-Biofilme den Hauptbestandteil dar und sind durch Dextranasen nicht abbaubar. Kein oraler Keim verfügt über ein Enzym und auch selbst *S. mutans* nicht, welches die Mutane hydrolisieren kann. Auch der Speichel enthält kein solches Enzym [64]. Die Bildung von Mutan erfordert nur einen geringen Anteil an den von den Mikroorganismen aufgenommenen Zuckern. Der überwiegende Anteil an Saccharose wird anderweitig metabolisiert und über den Invertase-Weg zu Glucose und Fructose hydrolisiert. Fructane können im Gegensatz zu Mutan durch bakterielle Enzyme wieder abgebaut werden und dienen als Energielieferant bzw. als Reservesubstrat in Zeiten der Nahrungskarenz [66].

S. mutans speichert einen Teil der synthetisierten langkettigen Polysaccharide intrazellulär in Glycogen-Form, als intrazelluläre Polysaccharide. Hierdurch werden sie in die Lage versetzt, längere Hungerphasen zu überstehen, indem sie in Zeiten geringen Nahrungsangebotes vorhandene Glukane teilweise als Nahrungsquelle nutzen. Saccharose wird durch *S. mutans* schneller als durch andere, teilweise auch als kariogen eingestufte Keime (*A. viscosus*, *A. naeslundii*, *L. casei*) umgesetzt. Innerhalb der Mutans-Gruppe ist *S. sobrinus* der stärkste Säurebildner [64]. Mutans-Streptokokken tolerieren Säuremengen, die zum Wachstumsstillstand vieler anderer

oralen Mikroorganismen führen. Während sich Mutans-Streptokokken noch bei pH-Werten < 4 teilen können, sind manche Stämme von *A. naeslundii* bei pH-Werten < 5 metabolisch nicht mehr aktiv [64]. *S. mutans* kann auch Zuckeralkohole wie Mannitol und Sorbitol geringfügig fermentieren, eine Eigenschaft, die er alleine unter den anderen oralen Streptokokken aufweist [64].

2.4.3.4 Parvimonas micra (ältere Bezeichnung: Micromonas micros, Peptostreptococcus micros)

P. micra gehört zu der Familie der *Peptostreptococcaceae*; es sind anaerobe grampositive Kokken. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Stoffwechselprodukte von den hauptsächlich milchsäurebildenden Streptokokken. Neben Bernsteinsäure werden Propionsäure und Buttersäure gebildet. *P. micra* wird sehr oft und in höheren Keimzahlen bei Parodontitispatienten isoliert. Auch weil *P. micra* ein potenter Produzent von flüchtigen Schwefelstoffverbindungen ist, wird er in Verbindung mit parodontalen Destruktionen gesetzt [67]. *P. micra* ist außerdem stark proteolytisch und kann somit seine Energie auch aus dem Abbau von Peptonen gewinnen. Diese Eigenschaft verleiht ihm die Fähigkeit die Kollagenmatrix des Wurzelzements zu hydrolysieren und somit zum Fortschreiten eines kariösen Prozesses beizutragen [66].

2.4.3.5 Propionibacterium acnes

P. acnes ist ein grampositives, anaerobes Stäbchen der Gattung *Propionibacterium*. *P. acnes* produziert Propionsäure aus Glucose. Stämme von *P. acnes* konnten aus der Plaque auf kariösen Läsionen der Wurzeloberfläche isoliert werden [66].

2.4.3.6 Veillonella parvula

Dieser Keim gehört zu der Familie der *Veillonellaceae*. Es gibt drei Arten von Veillonellen: *V. parvula*, *V. dispar* und *V. atypica*, wobei *V. parvula* die häufigste Art ist. Die Veillonellen sind anaerobe gramnegative Kokken, die zu zweit oder in Haufen auftreten und nur 0,3-0,5 μm groß sind. Veillonellen wurden von den meisten Oberflächen der Mundhöhle isoliert, sie kommen aber am häufigsten in der Plaque vor. Veillonellen fermentieren keine Kohlenhydrate, weil sie keine Glucokinase und Fructokinase besitzen. Sie bilden aus dem von *Streptococcus* und *Actinomyces* produzierten Lactat und Succinat, Acetat, Propionat, Kohlendioxid und Wasserstoff.

Da sie vor allem Lactat als Energiequelle verwenden, spielen sie eine wichtige Rolle bei der Ökologie von Plaque und Ätiologie von Karies, weil sie somit die für die Demineralisierung der Zahnhartsubstanz notwendigen Säuren in ihrem Stoffwechsel verbrauchen.

2.4.3.7 Neisseria mucosa

N. mucosa gehört zu der Familie der *Neisseriaceae*. Es sind gramnegative, obligat aerobe, paarig angeordnete Kokken (Diplokokken). Sie werden von den meisten Stellen in der Mundhöhle isoliert und gehören zu den Erstbesiedlern der sauberen Zahnoberfläche. *N. mucosa* ist saccharolytisch und kann Polysaccharide bilden. In den ganz frühen Stadien der Plaquebildung verbrauchen diese Mikroorganismen Sauerstoff und verschaffen somit atmosphärische Bedingungen, die für das Wachstum von fakultativ und obligat anaeroben Arten günstig sind [66]. Am meisten wurde diese Spezies zusammen mit *P. acnes* und *Rothia dentocariosa* von der Plaque oberhalb kariöser Wurzelläsionen isoliert [56].

2.4.3.8 Rothia dentocariosa

R. dentocariosa gehört zu der Familie der *Micrococcaceae* und der Gattung *Rothia* (früher *Stomatococcus*). Diese Mikroorganismen sind grampositiv, aerob, unbeweglich und weisen einen Durchmesser von 0,5-2,5 µm auf. Sie wurden in der Mundhöhle von der Zunge, aus der Plaque kariöser Wurzeloberflächen und aus Zahnfleischtaschen isoliert [66]. Einige Studien deuten auch darauf hin, dass *R. dentocariosa* nicht nur aus der Plaque, sondern auch gelegentlich bei Fällen von infektiöser Endokarditis aus dem Blut der Patienten isoliert wurde [68-70].

2.5 Nachweismethoden zur Identifizierung pathogener Mikroorganismen in der Zahnmedizin

2.5.1 Kultureller Nachweis

Die herkömmliche Identifizierung der an der Wurzelkaries beteiligten Mikroorganismen beschränkte sich bis vor kurzem auf die kulturelle Anzucht. Die Kultivierung von Mikroorganismen stellt das klassische Verfahren zum Erregernachweis dar [64]. Die mikrobiologische Diagnostik mittels Kulturmedien beinhaltet die Anzüchtung von Bakterien *in vitro* auf festen oder in flüssigen Kulturmedien, die Isolierung der gesuchten Erreger in Reinkultur und die Identifikation einer Spezies mit geeigneten Methoden. Üblicherweise nutzt man zur Anzucht von Mikroorganismen eine Kombination von Kulturmedien, um ihren zum Wachstum nötigen Grundbedarf (Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Vitamine) zu decken und daneben gleichzeitig mit Hilfe von Spezialnährböden einzelne Erreger im Wachstum zu unterdrücken bzw. zu fördern [66]. Für das Wachstum der Bakterien sind eine optimale Temperatur (37 °C), ein neutraler pH-Wert und ein entsprechender Sauerstoffgehalt notwendig. Aerobe Bakterien wachsen nur in Anwesenheit von Sauerstoff, im Gegensatz dazu können anaerobe Bakterien unter Sauerstoffzugabe nicht wachsen. Gerade die obligaten Anaerobier verlieren ihre Lebensfähigkeit bei zu langer Sauerstoffzufuhr [64]. Nach dem Anzüchten und der Isolierung gibt es weitere Möglichkeiten zur der Identifikation der Mikroorganismen. Mit Hilfe der Gram-Färbung und den Test über den Nachweis der Indolproduktion und der Katalasefähigkeit können die untersuchten Bakterien einer genauen Art zugeordnet werden [66].

Im Bereich der Kariesdiagnostik ist der sogenannte Snyder-Test von historischer Bedeutung. Er wurde besonders zum Nachweis von Laktobazillen angewendet. Hierzu wurde Abstrichmaterial auf Tomatensaftagar inkubiert, der mit Hilfe von Natronlauge oder Milchsäure auf einen pH-Wert von 4,5 eingestellt wurde. Bei Vorhandensein von Laktobazillen fand nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C ein Farbumschlag des Indikatorfarbstoffs (Bromkresolgrün) von grün nach gelb statt [71]. Dieser Test wurde durch die Entwicklung des Rogosa-Agars abgelöst, der ein selektives Anzüchten von Laktobazillen bei niedrigem pH ermöglicht [72]. Andere

Selektivmedien wurden für den Nachweis von Mutans-Streptokokken entwickelt, wie zum Beispiel die Verwendung von Mitis-Salivarius-Bouillon [73], der Bacitracin zugesetzt wird, um das Wachstum anderer Bakterien zu unterdrücken.

Um das Verfahren der mikrobiologischen Diagnostik mittels Kulturmedien abzukürzen und auch mögliche Fehlerquellen zu minimieren, wurden kommerziell erhältliche Testkits entwickelt, die mit einfachen Mitteln auf vorgefertigten Nährböden mit speziegerichteten Wachstumsbedingungen bestimmte kariogene Leitkeime nachweisen. Mitis-Salivarius-Bouillon mit Bacitracin und Rogosa-Agar stellen auch heute noch die geeigneten Medien für die Routinediagnostik von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen dar [66].

Auch wenn die klassische mikrobiologische Diagnostik mit Bakterienanzüchtung und folgender Differenzierung bis heute noch als „bakteriologischer Goldstandard“ gilt und den besonderen Vorteil von möglichen Resistenzprüfungen bietet, ist sie auch mit erheblichen Nachteilen behaftet [74, 75]. Vorwiegend anaerob wachsende Erreger sterben häufig bereits bei der Probenentnahme ab. Nur etwa 50% der oralen Mikroflora konnte bisher mit Standardverfahren kultiviert werden [57, 74]. Die Kultivierung und anschließend erforderliche Subkultivierung ist sehr zeitaufwendig und durch die vielen Arbeitsschritte ist die mikrobiologische Analyse meist sehr kostenintensiv [74]. Ein anderer wesentlicher Nachteil dieser Methode ist die Tatsache, dass in dem untersuchten Probenmaterial eine ausreichende Menge des Pathogens vorhanden sein muss, um einen diagnostischen Nachweis zu ermöglichen [57].

2.5.2 Molekulargenetische Methoden

Molekulargenetische Methoden werden seit Anfang der 1990er Jahre zum Nachweis von Leitkeimen der Karies und der Parodontitis mit Erfolg angewendet und geschätzt, da sie einerseits sehr empfindlich reagieren und andererseits auch bereits abgestorbene Mikroorganismen sicher nachweisen können. Dies ist von besonderer Bedeutung bei Mikroorganismen, die unter streng anaeroben Bedingungen leben und bei Kontakt mit Luftsauerstoff sofort absterben [76]. In den letzten Jahren hat vor allem die Untersuchung von biologischem Material mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) einen besonderen Aufschwung erfahren [77]. In der Literatur wurden sowohl

universelle als auch speziesspezifische Primer beschrieben, mit Hilfe deren Mikroorganismen wie *Actinomyces spp.*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus spp.*, *Parvimonas micra* und *Veillonella parvula* in der Plaque auf kariösen Läsionen nachgewiesen wurden [8, 78-81]. Speziell zum Nachweis von Streptokokken kann eine PCR verwendet werden, die die genspezifische Region des Glycosyltransferase-Gens nutzt [60]. Mit Hilfe speziesspezifischer Primer können *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. oralis* und *S. gordonii* voneinander unterschieden werden [59, 60].

Mit Hilfe der PCR können winzige DNA-Mengen durch Vervielfältigung nachgewiesen werden. Hierbei wird ein speziesspezifischer Genbereich zwischen zwei flankierende Primer-Moleküle eingeschlossen und mit Hilfe einer hitzestabilen Polymerase amplifiziert. Prinzipiell besteht eine PCR in der Regel aus einer Serie von 20-40 Zyklen. Jeder Zyklus wiederum besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt eines Zyklus wird die doppelsträngige DNA auf etwa 95 °C erhitzt, um den Doppelstrang in Einzelstränge zu trennen (Denaturierung). Vor dem ersten Zyklus wird die DNA oftmals längere Zeit erhitzt, damit sichergestellt ist, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und ausschließlich DNA-Einzelstränge vorliegen. In jedem Zyklus wird nach Trennung der Stränge die Temperatur so weit abgesenkt, dass die Primer sich an die DNA-Einzelstränge anlagern können (Annealing). Im letzten Schritt eines Zyklus synthetisiert die DNA-Polymerase mit Hilfe freier Nukleotide den neuen Strang. Die Synthese beginnt am angelagerten Primer und erfolgt dann entlang des DNA-Matrizenstranges, der als Vorlage für die Synthese des komplementären neuen Stranges dient. Dieser Schritt wird als Elongation bezeichnet. Die Primer sind nach der Synthese ein Teil des neu gebildeten Einzelstranges [77].

Die konventionelle PCR brachte für die Laborzeit zwar wesentliche Erleichterungen, zugleich war jedoch ein hoher Zeit- und Arbeitsaufwand für die Nachanalytik erforderlich, insbesondere wenn (semi)quantitative Angaben über die nachgewiesenen Keime erfolgen sollten. Um das Automatisierungsniveau zu erhöhen und eine Identifizierung der Pathogenlast in einer Probe zu ermöglichen, versuchte man deshalb, einen homogenen Assay zu entwickeln, bei dem Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß online verfolgt werden konnte. Der TaqMan PCR Assay, bei dem die

Zunahme des PCR-Produktes mit der Zunahme des freiwerdenden Fluorophors aus dem Sondenabbau einhergeht (s. Kapitel 4.4) erfüllt diese Anforderungen. Mit Hilfe simultan amplifizierter DNA-Standards lässt sich bei der Real-Time PCR eine Standardkurve erstellen, die eine akkurate Bestimmung der Konzentration einer unbekannt Probe in Echt-Zeit erlaubt.

Die weiteren Vorteile der Real-Time PCR gegenüber der konventionellen PCR sind, wie oben bereits erwähnt, neben der erheblichen Zeitersparnis und dem Wegfall der Nachanalytik (Gelelektrophorese), die Reduktion der Probenkontamination während der Vorbereitung durch lediglich einen Pipettierschritt, der spezie-spezifische Nachweis eines Erregers, eine Quantifizierung der nachgewiesenen Genomäquivalente und somit die Berechnung der Keimzahl in einer Patientenprobe.

Als einen limitierenden Faktor für den Einsatz einer Real-Time PCR ist der damit verbundene finanzielle Aufwand gegenüber traditioneller Nachweismethoden anzusehen [56].

2.6 Zusammenhang zwischen Parodontitis und Wurzelkaries

Aufgrund der im Alter auftretenden parodontalen Rezessionen werden die empfindlichen Zementoberflächen der Wurzeln freigelegt und somit der bakteriellen Besiedlung ausgesetzt. Zusätzlich können bei Parodontitispatienten nach parodontalchirurgischen Eingriffen, wie z.B. der Kürettage und Wurzelglättung, die Wurzeloberflächen freigelegt werden.

Der Zusammenhang zwischen Wurzelkaries und Parodontitis wurde schon seit Anfang der achtziger Jahre in mehreren Studien diskutiert [11, 13, 38, 47, 48, 84,85]. Es wurde behauptet, dass die Entstehung der Wurzelkaries auch als Komplikation einer Parodontalbehandlung zu sehen sei [84]. Eine Studie von Ravald und Birkhed zeigte eine Prävalenz der Wurzelkaries von 50% bei 99 Parodontitspatienten, die sich in der Recall-Phase befanden, im Vergleich zu Patienten, die noch unbehandelt waren [11]. Eine weitere Studie zeigte, dass in einer Gruppe von 45 Parodontitispatienten, deren Behandlung sich in der Recall-Phase befand, die Prävalenz der Wurzelkaries bei 82% lag [84]. In einer Studie die sich mit der Prävalenz der Mutans-Streptokokken in der Plaque von Parodontitispatienten beschäftigte, wurde gezeigt, dass die mittlere Prävalenz an *S. mutans* in der Gruppe

der Recallpatienten bei 6,65% lag, im Vergleich zu der Gruppe der unbehandelten Patienten, in welcher die Prävalenz bei 1,8% war [85].

Eine weitere Studie an zehn Parodontitispatienten zeigte, dass die Anzahl der Mutans-Streptokokken und der Laktobazillen acht Monate nach parodontaler Initialbehandlung signifikant angestiegen war [83]. Diese Ergebnisse stimmten mit denen einer Studie überein, die zehn Jahre später von einer belgischen Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. In dieser Studie wurden die Patienten je nach parodontaler Behandlungsmethode einer der drei verschiedenen Gruppen zugeteilt. In der ersten Gruppe wurden die Patienten konventionell behandelt, d.h., dass die Kürettage und Wurzelglättung (engl. Scaling and Root Planning-SRP) quadrantenweise, in einem einwöchigen Abstand durchgeführt wurde. In der zweiten Gruppe erfolgte das SRP innerhalb von 24 Stunden (Full-Mouth-Treatment=FMT). In der dritten Gruppe wurde zusätzlich zum FMT Chlorhexidindigluconat (CHX) als antibakterielle Substanz angewendet (Full-Mouth-Disinfection=FMD). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Prävalenz der Wurzelkaries sowie die Anzahl der Mutans-Streptokokken und der Laktobazillen zwei Monate nach parodontaler Hauptbehandlung in der Gruppe der Patienten, die kein Chlorhexidin benutzten, signifikant angestiegen waren. Aufgrund dieser Ergebnisse behaupteten die Untersucher, dass die Anzahl der kariogenen Mikroorganismen wie *S. mutans* und *Lactobacillus spp.* nach konventioneller parodontaler Behandlung zunimmt [86].

Im Gegensatz dazu zeigen die Daten einer Split-mouth-Studie zu der Mikroflora freiliegender Wurzeloberflächen, die an 33 Parodontitispatienten durchgeführt wurde, dass die Anzahl der untersuchten Mikroorganismen (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.* und *Actinomyces spp.*) sich nach dreijährigem Recallprogramm (professionelle Zahnreinigung, Mundhygieneinstruktion und –motivation) signifikant reduzierte. Die Untersucher konnten feststellen, dass die Anzahl der *S. mutans*, *Lactobacillus spp.* und *Actinomyces spp.* nach 1, 2 und 3 Jahren sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den Testgruppen (in denen 1% CHX, 40% CHX oder 2,26% Natriumfluorid verabreicht wurde) signifikant geringer war als zu Beginn der Studie. Zwischen den Gruppen wurde sowohl für die Anzahl von *S. mutans* als auch von *Lactobacillus spp.* kein signifikanter Unterschied beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde für *Actinomyces spp.* die signifikanteste Reduktion in der 40% CHX-Testgruppe festgestellt [82].

3 Zielsetzung

Wie in Kapitel 2.4 bereits erwähnt, ist die Zusammensetzung der Mikroflora, die an der Wurzelkariesentstehung beteiligt ist, noch nicht eindeutig geklärt, obwohl einige Spezies wie *Actinomyces spp.*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* und *Lactobacillus spp.* eng mit der Entstehung der Wurzelkaries in Zusammenhang gebracht wurden. Die Beteiligung anderer Spezies wie *Rothia dentocariosa*, *Parvimonas micra*, *Neisseria mucosa*, *Veillonella parvula* und *Propionibacterium acnes* wird in der Literatur jedoch noch kontrovers diskutiert. Ziel dieser Dissertation ist es das Vorkommen dieser Mikroorganismen an kariösen wie gesunden Wurzeloberflächen zu untersuchen und deren Anzahl mittels einer kulturunabhängigen, molekulargenetischen Methode, der Real-Time PCR, zu quantifizieren. Zusätzlich soll untersucht werden, ob die Anzahl der kariogenen Mikroorganismen nach parodontaler Hauptbehandlung zunimmt.

Dazu wurden die folgenden Arbeitshypothesen aufgestellt:

- Die o. g. Mikroorganismen sind an der Entstehung der Wurzelkaries beteiligt
- Die Anzahl der untersuchten Mikroorganismen nimmt nach konventioneller parodontaler Hauptbehandlung zu

4 Material und Methoden

4.1 Untersuchungsaufbau

4.1.1 Probanden

Aus einer Gruppe von Patienten mit fortgeschrittener chronischer Parodontitis aus der Ambulanz der Kieferklinik (Sektion für Parodontologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) wurden 54 Patienten ausgewählt: 31 männliche und 23 weibliche Patienten im Alter von 30 bis 74 Jahren (Mittelwert: $54,15 \pm 11,64$). Die Patienten wurden teilrandomisiert (Stratifizierung nach Geschlecht, Alter, Nikotinkonsum und Sondierungstiefe) einer der drei Behandlungsgruppen zugeteilt (18 Patienten pro Gruppe): Full-Mouth-Treatment-Gruppe (FMT), Full-Mouth-Disinfection-Gruppe (FMD) und konventionelle Gruppe. Dabei erfolgte beim „Full-Mouth-Treatment“ das subgingivale Scaling/Root Planning innerhalb von 24 Stunden ohne Chlorhexidinanwendung. Bei der „Full-Mouth-Disinfection“ erfolgte das subgingivale Scaling/Root Planning innerhalb von 24 Stunden mit Chlorhexidinanwendung. In der konventionellen Gruppe wurde das subgingivale Scaling/Root Planning an zwei Quadranten innerhalb einer Sitzung durchgeführt, mit einem Abstand von einer Woche zwischen den Behandlungen. In einer Screeninguntersuchung wurden alle in Frage kommenden Patienten auf ihre Eignung zur Teilnahme an der Studie getestet.

Einschlusskriterien bei der Probandenauswahl waren:

- Alter 30-75 Jahre
- mind. 18 Zähne (inkl. überkronte Zähne)
- mind. zwei freiliegende Wurzeloberflächen
- mind. zwei mehrwurzelige Zähne mit Sondierungstiefe ≥ 6 mm
- moderater Knochenabbau ($\geq 25\%$ und $\leq 75\%$ der Wurzellänge)

Ausschlusskriterien waren:

- Allgemeinerkrankungen mit Bezug zum Parodont
- Parodontitisbehandlung in den letzten 12 Monaten

- Einnahme von Antibiotika oder entzündungshemmenden Medikamenten in den letzten 4 Monaten vor Studienbeginn oder während der Dauer der Studie
- Orale Erkrankungen, wie z.B nekrotisierende ulzerierende Gingivitis (NUG), nekrotisierende ulzerierende Parodontitis (NUP), Erkrankungen des Immunsystems
- Bekannte Überempfindlichkeit gegen die in der Studie verwendeten Substanzen, z.B. Chlorhexidin
- Schwangerschaft und Stillzeit

Die Patienten wurden sowohl mündlich als auch schriftlich über die Art der Studie, ihren Nutzen und möglichen Risiken aufgeklärt und mussten jeweils schriftlich ihre Zustimmung geben.

Die klinische Studie erforderte die Genehmigung seitens der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät - Heinrich Heine Universität Düsseldorf, die für diese Untersuchung erteilt wurde.

4.1.2 Probenentnahme

Die Probenentnahme (Plaqueentnahme) erfolgte zu zwei verschiedenen Zeitpunkten: vor und zwei Monate nach parodontaler Behandlung der Patienten (Mittelwert: 67,6 Tage $\pm 5,13$). Bei jedem Patienten wurden jeweils zwei freiliegende Wurzeloberflächen untersucht: eine gesunde und eine Wurzeloberfläche mit einer kariösen Initialläsion. Die Plaqueentnahmen wurden unter relativer Trockenlegung mittels Watterollen um die zu untersuchenden freiliegende Wurzeloberfläche durchgeführt. Mit Hilfe einer Gracey-Kürette wurde von distal nach mesial Plaque entnommen und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße mit 400 μ l sterilem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Phosphat, pH 7,4) gebracht. Die Eppendorf-Gefäße waren vor und nach Plaquezugabe auf einer Feinwaage gewogen worden, so dass daraus das Gewicht des entnommenen Materials bestimmt werden konnte. Die gekennzeichneten Proben wurden im Gefrierschrank bei -20° C bis zur mikrobiologische Untersuchung gelagert (Lagerzeit max. 5 Monate).

4.2 Material

4.2.1 Benutzte Chemikalien

Die im Labor benutzten Chemikalien wurden bei den Firmen Gibco BRL (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie (München, Deutschland) und Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland) bestellt (s. Anhang).

4.2.2 Primer und Sonden

Für die Real-Time PCR wurden folgende Primer und Sonden der Literatur entnommen oder mit Hilfe des Programms „Primer Express“, Software der Firma DNASTAR (Madison, USA) selbst konfiguriert:

Spezies	Primer/Sonde	Sequenz (5'-3')	Größe	Literatur
P. acnes	PA-F	GCG TGA GTC ACG GTA ATG GGT A	22 nt	[87]
	PA-R	TTC CGA CGC GAT CAA CCA	18 nt	
	PA-S (TexRed-BHQ2)	AGC GTT GTC CGG ATT TAT TGG GCG	24 nt	
S. mutans	Smu-AJ243965-F	TGG GAC GCA AGG GAA CA	17 nt	[61]
	Smu-AJ243965-R	CCC GTT CGC GAC TCA AGA	18 nt	
	Smu-AJ243965-T(HEX-BHQ1)	CTT GCA CAC CGT GTT T	16 nt	
S. sobrinus	Sso-AJ243966-F	GGA CTT GCT CCA GTG TTA CTA ATG AG	26 nt	[61]
	Sso-AJ243966-R	CCG CTA TCA GGC AGG TTA CC	20 nt	
	Sso-AJ243966-T(TexRed-BHQ2)	CTC ACC CGT TCG CGA	15 nt	
Lactobacillus spp.	Lacto-F2	TGG AAA CAG ATG CTA ATA CCG	21 nt	[63]

	Lacto-R2	CGT CCA TTG TGG TAG ATT CCC T	22 nt	
	Lacto-S (FAM-BHQ1)	CTG AGA CAC GGC CCA WAC TCC TAC GG	26 nt	
P. micra	Pmi-D14143-F	TCG AAC GTG ATT TTT GTG GAA A	22 nt	[61]
	Pmi-14143-R	GGT AGG TTG CTC ACG TGT TAC TCA	24 nt	
	Pmi-14143-T (FAM-BHQ1)	CCC GTT CGC CAC TT	14 nt	
V. parvula	Vpa-X84005-F	TGC TAA TAC CGC ATA CGA TCT AAC C	25 nt	[61]
	Vpa-X84005-R	GCT TAT AAA TAG AGG CCA CCT TTC A	25 nt	
	Vpa-X84005-T (HEX-BHQ1)	CTA TCC TCG ATG CCG A	16 nt	
R. dentocariosa	Rden125-F	CTG GGA TAA GCC TGG GAA ACT	21 nt	selbst designt
	Rden205-R	CTC CAT AAC GCT TTC CAC CAA	21 nt	
	Rden153-T (TexRed-BHQ2)	ATA CCG GAT ACG ACC AAT CTC CGC ATG	27 nt	
N. mucosa	Nmuc42-F	GGG TGA GTA ACA TAT CGG AAC GTA	24 nt	selbst designt
	Nmuc151-R	CGC AAG GCC CGA AGG T	16 nt	
	Nmuc104-T (HEX-BHQ1)	TAC CGC ATA TTC TCT GAG GAG GAA AGC AGG	30 nt	
Actinomyces spp.	Act-174-F	GGT CTC TGG GCC GTT ACT GA	20 nt	selbst designt
	Act-281-R	GRC CCC CCA CAC CTA GTG	18 nt	
	Aodo-R	TGG CCC CCA CAC CTA GTG	18 nt	
	Act-237-T (FAM-BHQ1)	CTG GTA GTC CAC GCC GTA AAC GTT GG	26 nt	

Tab. 2: Primer und Sonden

Die Primer und Sonden wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

4.2.3 Master Mix

- qPCR Mastermix No ROX, Cat.-No: RT-QP2X-03NR (Eurogentec, Seraing, Belgien)

4.2.4 Kits

- Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
- QiAamp DNA-Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- Genra Puregene Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)

4.2.5 Enzyme

- Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemie, München, Deutschland),
- Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Restriktionsendonukleasen *Sph I* und *Sal I* (Amersham, Buckinghamshire, UK)

4.2.6 Bakterienstämme

Zur Etablierung der verschiedenen Real-Time PCRs und für die Generierung von PCR-Standards wurden folgende Bakterienspezies benutzt, die entweder bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH (Braunschweig, Deutschland) bestellt wurden oder von der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich Heine Universität Düsseldorf stammten.

Spezies	Bezeichnung
E. coli	DH5 α
Actinomyces viscosus	DSM 43329
Lactobacillus casei	Ringversuchskeim
Lactobacillus rhamnosus	Ringversuchskeim
Parvimonas micra	DSM 20468
Neisseria mucosa	DSM 4631
Propionibacterium acnes	VK 35128
Rothia dentocariosa	DSM 43762
Streptococcus sobrinus	DSM 20742
Streptococcus mutans	Ringversuchskeim
Veillonella parvula	DSM 2007

4.2.7 Klonierungsvektor

Plasmid	Größe (kb)	Resistenzgene	Charakteristika	Firma
pGEM-T	3	Amp	LacZ' Gen, SP6- und T7 Promotor, f1-ori	Promega

4.2.8 Geräte

- iCycler iQ5 (BioRad, München, Deutschland)
- T-Gradient PCR Gerät (Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland)
- BioRobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Deutschland)

4.3 Methoden

4.3.1 DNA-Isolierung

4.3.1.1 DNA-Präparation aus dem klinischen Material (Plaque)

Um die DNA aus dem Plaquematerial für eine PCR adäquat aufarbeiten zu können, wurden drei Methoden parallel getestet: die DNA-Aufreinigung mittels QIAamp DNA-Mini Kit, Gentra Puregene Kit und Benutzung des BioRobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Deutschland). Bei der DNA-Präparation mittels QIAamp DNA-Mini Kit und Gentra Puregene Kit wurde nach dem jeweiligen Protokoll für Bakterien aus dem Herstellerhandbuch gearbeitet.

Für die DNA-Aufreinigung mit Hilfe des BioRobot EZ1 wurde das Protokoll „Bact_200µl“ nach Herstellerangaben benutzt. In dem Display des EZ1 Roboters wurde das o. g. Protokoll selektiert, das Elutionsvolumen wurde bei 100 µl eingestellt und das Volumen der Plaqueprobe bei 200 µl. Pro Probe wurde ein Pufferstreifen in die dafür vorgesehene Halterung eingeschoben und ein 1,5 ml Elutionsgefäß in die Vertiefung der ersten Reihe eingesetzt. In die Vertiefung der zweiten Reihe wurde ein Pipettenhalter und eine Pipette und in die vierte Reihe ein 2 ml Gefäß eingesetzt. Anschließend wurde die Tür der Arbeitsstation geschlossen und die Aufarbeitung unter Betätigung des Start-Zeichens begonnen. Die Gesamtdauer der DNA-Extraktion aus den Plaqueproben betrug 20 min. Danach wurde das aufgereinigte DNA-Eluat bis zur Amplifikation bei -20 °C gelagert.

4.3.1.2 Präparation der genomischen DNA aus Reinkulturen

Für die Aufreinigung der DNA aus Reinkulturen (s. Kapitel 4.2.6) wurde das QiAamp DNA Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben benutzt.

Eine 0,2 ml Probe aus der jeweiligen Reinkultur wurde 10 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Danach wurde das Bakteriensediment in 200 µl PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 200 µl AL Puffer wurde die Probe für 15 sec gevortext und 10 min bei 56 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden dem Ansatz 200 µl Ethanol 96 (w/v) % zugesetzt. Das Lysat wurde für 15 sec gevortext, zum Sammeln der Flüssigkeit kurz zentrifugiert,

anschließend auf eine beschriftete QIAamp-Säule gegeben, die auf ein 2 ml Sammelgefäß gesteckt wurde, und 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Diese Säule enthält eine Silicamembran, die in der Lage ist, die während der Zentrifugation passierende DNA aus der Lösung zu binden. Die an der Silicamembran gebundene DNA wurde anschließend in zwei Schritten gewaschen. Verwendet wurden dabei zwei verschiedene Waschpuffer: 500 µl AW1 Puffer und 500 µl AW2 Puffer, die die Reinheit der zu eluierenden DNA signifikant verbessern sollten. Damit die DNA von der Silicamembran gelöst werden konnte, wurde auf die Silicamembran 200 µl AE Puffer pipettiert. Nach Positionierung der Säule in ein 1,5 ml Elutionsgefäß erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur und danach wurde 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Nach diesem Schritt konnte die eluierte DNA entweder direkt in die PCR eingesetzt werden oder wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.3.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

3 ml steriles LB-Amp-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 100 µg/µl Ampicillin, pH 7,5) wurden mit einer plasmidtragenden *E. coli* Kultur (s. Tabelle Kapitel 3.2.6) beimpft und über Nacht bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden 2 min bei Raumtemperatur und 13000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Bakteriensediment in 300 µl Lösung 1 (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und mit 12 µl RNase1-Lösung (400 µg/ml) versetzt. Um die Zellen zu lysieren, erfolgte die Zugabe von 300 µl Lösung 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS). Nach Mischen des Ansatzes, der viskös und klar wurde, sind 300 µl Lösung 3 (2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8) hinzugegeben worden und kräftig geschüttelt, wobei die chromosomale DNA und Proteine als weißes Präzipitat ausfielen. Um die Plasmid-DNA vom Präzipitat zu trennen, wurde erneut bei 13000 x g 20 min zentrifugiert. Anschließend wurden 800 µl des Plasmid-haltigen Überstandes abgenommen und mit 640 µl Isopropanol gemischt. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 13000 x g wurde das Plasmid-DNA-Präzipitat mit 500 µl eiskaltem 70 (w/v) %-igem Ethanol gewaschen und erneut bei 13000 x g pelletiert. Die luftgetrocknete DNA wurde in 30 µl 10mM Tris/HCl, pH 8,0 aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Zur Bestimmung der Ausbeute an Plasmid DNA wurde die Konzentration im Spektralphotometer bei 260 nm gemessen. Die gemessenen DNA-Konzentrationen lagen zwischen 6,5-14,5 ng/µl (s. Kapitel 4.3.5.1).

4.3.2 Klonierung

4.3.2.1 Ligation

Zu 0,5 µl (0,25 ng) pGEM-T Klonierungsvektor (s. Kapitel 3.2.7) wurde 3,5 µl aufgereinigtes Amplikon (ca. 2,5 ng DNA) gegeben. Aus dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) wurden 1 µl DNA Elutionspuffer 5X, 5 µl T4 DNA Ligationspuffer 2x und 0,5 µl T4 DNA Ligase (5 U/µl) hinzugefügt und vorsichtig mit der Pipette gemischt. Anschließend folgte eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

4.3.2.2 Transformation kompetenter *E. coli*- Bakterien

100 µl kompetente Bakterien des Stammes *E. coli*-DH5α wurden dem Ligationsansatz zugesetzt. Nach dem Mischen wurde der Ansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend 2 Minuten bei 42 °C im Wasserbad erhitzt, um danach wiederum für 1-2 Minuten auf Eis gestellt zu werden. Zu dem Transformationsansatz wurden 800 µl SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,0, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose) pipettiert. Nach 1-stündiger Inkubation unter Schütteln bei 37°C wurden 1/10 und 9/10 des Ansatzes auf LB-Amp-Platten (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 1,5% Agar, 100 µg Ampicillin, pH 7,5) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Von jeder Platte wurden jeweils 4 Klone gepickt und in 5 ml LB-Amp Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, 100 µg/µl Ampicillin, pH 7,5) kultiviert und die Plasmid-DNA wie unter Kapitel 4.3.1.3 beschrieben aufgereinigt.

4.3.2.3 DNA-Restriktion

Zur Restriktion des in den pGEM-T-Vektor klonierten Amplikons wurden 5 µl Plasmid-DNA (ca. 2,5 ng DNA) jeweils 4 µl (5 U/µl) Restriktionsenzyme *Sph* I und *Sal* I, 84 µl Wasser in 48 µl OPA-Puffer (one-phor-all) gegeben und bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Analyse (s. Kapitel 4.3.3).

Wie in Abb. 1 zu sehen ist, verfügt der pGEM-T-Vektor über eine Klonierungsstelle, die zur Insertion PCR- generierter Fragmente dient, da konventionelle Taq-Polymerasen an die 3`- Enden der Amplikons ein Adenyl anhängen.

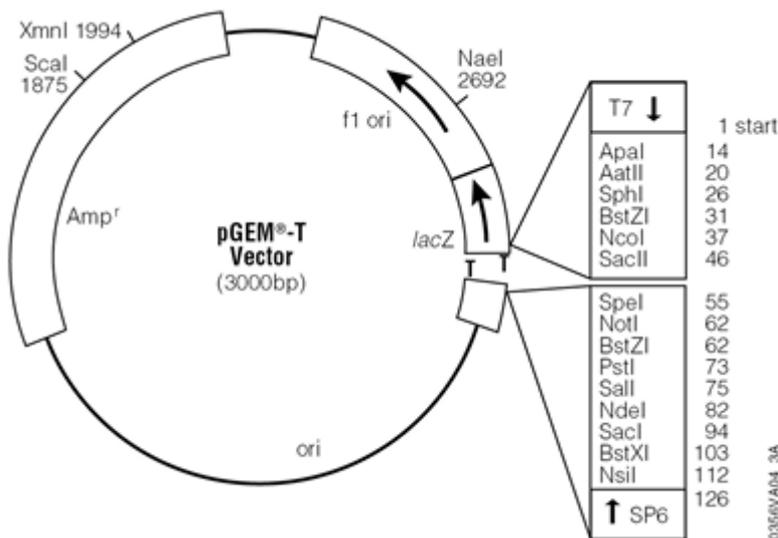


Abb. 1 : Schematische Darstellung des pGEM-T-Vektors

(<http://www.promega.com/vectors>)

Zu beiden Seiten der Einklonierungsstelle schneiden die Restriktionsendonukleasen *Sph* I und *Sal* I das einklonierte Insert heraus. Die Pfeile in Abb. 2 symbolisieren diese Schnittstellen.

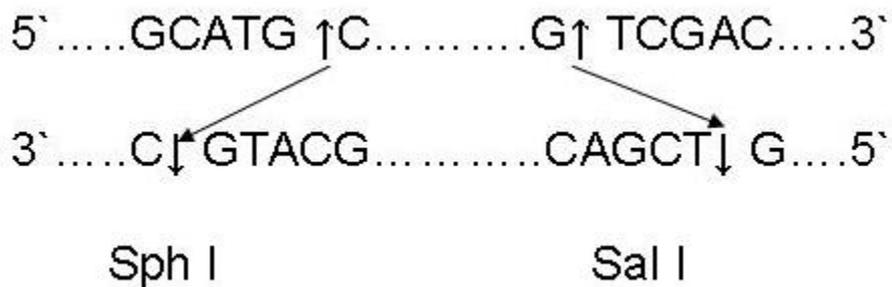


Abb. 2 : Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen

4.3.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Analyse restringierter Plasmide oder amplifizierter DNA wurden je nach Größe der DNA-Fragmente 1,5-3%-ige Agarosegele verwendet. Je kleiner das DNA-Fragment, desto höherprozentig sollte das Gel sein. Als Laufpuffer diente 0,5x TBE

(90 mM Tris, 90 mM Borat, 0,5 mM EDTA, pH 8,0). Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 Xylencyanol, 15% Ficoll) versetzt und bei 50 mA im Gel aufgetrennt. Als Längenstandard diente der 1-kb Mass Ruler DNA Ladder Marker (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland). Um die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel 10 min in 0,1(w/v)%-iger Ethidiumbromidlösung inkubiert. Nach zwei Waschschrinen in Wasser wurde das Bandenmuster unter UV-Licht photographisch dokumentiert.

4.3.4 Lagerung von Bakterien

Zur Herstellung eines Gefrierstocks wurden 800 µl einer Bakterienkultur in LB-Amp-Medium mit 200 µl Glycerin versetzt (Endkonzentration 20%). Diese Kulturen waren dann bei -20 °C gelagert mehrere Monate haltbar.

4.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

4.3.5.1 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Um den DNA-Gehalt einer Probe im Photometer bestimmen zu können, wurde in eine Quarzküvette zu 100 µl Wasser 5 µl der Probe gegeben. Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung bei 260 nm absorbiert wird, ist in ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Bei 260 nm entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg DNA/ml. Da das Verhältnis von Protein zu DNA etwas über die Reinheit der Nukleinsäureprobe aussagt, wurde der gemessene Wert bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA) durch den bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) geteilt und anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um so die DNA-Konzentration der Probe zu errechnen. Die gemessenen DNA-Konzentrationen lagen zwischen 61-167 ng/µl.

4.3.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.3.6.1 Konventionelle PCR

Für die konventionelle PCR wurde das PCR-Gerät T-Gradient der Firma Whatman Biometra (Göttingen, Deutschland) benutzt. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Template	0,5 µl DNA-Lösung (ca. 2,5 ng DNA)
Puffer	5 µl 10fach PE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl ₂)
Desoxyribonukleosidtriphosphate	8 µl NTP-Mix (je 1,3 mM GTP, CTP, ATP, TTP)
Primer	je 0,5 µl Primer (0,1mM)
Aqua dest.	34,5 µl
Taq DNA Polymerase	1 µl Taq Polymerase (5 Units/µl)

Die PCR wurde wie folgt durchgeführt:

PCR Schritt	Temperatur	Zeit
1. Erhitzen	95 °C	5 min
2. Denaturierung (Trennung der DNA-Stränge)	95 °C	1 min
3. Annealing (Hybridisierung der Primer an ihr Template)	52 °C	1 min
4. Elongation	72 °C	1 min

Die Schritte 2 bis 4 wurden 40-mal zyklisch wiederholt. Zur Analyse wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. Kapitel 4.3.3).

4.3.6.2 Real-Time PCR (TaqMan PCR)

Für die Real-Time PCR wurde der iCycler IQ5 der Firma BioRad (München, Deutschland) verwendet. Dabei wurde für die Mikrotiterplatte eine Vorlage entwickelt, um simultan 8 Patientenproben den 8 verschiedenen Real-Time PCRs unterziehen zu können (s. Abb. 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
P. micros/ R. dentocariosa	Std. 10 ⁵	Std. 10 ³	Std. 10 ²	H ₂ O								
S. mutans/ S. sobrinus	Std. 10 ⁵	Std. 10 ³	Std. 10 ²	H ₂ O								
Lactobacillus spp.	Std. 10 ⁵	Std. 10 ³	Std. 10 ²	H ₂ O	<i>Patienten-Proben</i>							
N. mucosa	Std. 10 ⁵	Std. 10 ³	Std. 10 ²	H ₂ O								
Actinomyces spp.	Std. 10 ⁵	Std. 10 ³	Std. 10 ²	H ₂ O								
V. parvula	Std. 10 ⁵	Std. 10 ³	Std. 10 ²	H ₂ O								
GAPDH	Std. 10 ⁵	Std. 10 ³	Std. 10 ²	H ₂ O								
P. acnes	Std. 10 ⁵	Std. 10 ³	Std. 10 ²	H ₂ O								

Abb. 3: Vorlage der Mikrotiterplatte für die Real-Time PCR

Die PCR-Mixe setzten sich wie folgt zusammen:

	1xMono-/Du-plex	13X Monoplex	13x Act. *	13X Duplex
2 x MM	12,5 µl	162,5 µl	162,5 µl	162,5 µl
Forward Primer (3 µM)	2,5 µl/2x1,25	32,5 µl	32,5 µl	32,5 µl
Reverse Primer (3 µM)	2,5 µl/2x1,25	32,5 µl	2x16,25 µl	32,5 µl
Sonde (2 µM)	2,5 µl/2x1,25	32,5 µl	32,5 µl	32,5 µl
Aqua dest.	2,5 µl	32,5 µl	32,5 µl	32,5 µl

Folgende Real-Time PCRs wurden als Monoplex- PCR durchgeführt: *Lactobacillus*-PCR, *N. mucosa*- PCR, *V. parvula*- PCR, *Actinomyces*- PCR, GAPDH- PCR und *P. acnes*- PCR. Als Duplex- PCR wurden die *P. micra*/*R. dentocariosa*- PCR und *S. mutans*/*S. sobrinus*- PCR durchgeführt.

* Bei der *Actinomyces*- PCR wurde noch ein zweiter Reverse Primer verwendet, um die Genospezies *Actinomyces odontolyticus* in der PCR zu identifizieren.

Bis auf das Template wurden alle Bestandteile des PCR-Ansatzes in dem MasterMix-Raum zusammengegeben und dort je 22,5 µl in die entsprechende Vertiefung der 96 Well Platte pipettiert. Die Zugabe des Templates (2,5 µl DNA der Standards und Patientenproben) erfolgte in einem separaten Raum. Nach

Verschließen der Wells mit 8er Deckelstreifen wurde die Amplifikation wie folgt durchgeführt:

Zyklus	Schritt	Temperatur	Zeit
1	1	50 °C	10 min
2	1	95 °C	10 min
3-47	1	95 °C	15 sec
	2	60 °C	1 min

4.3.7 Verwendete Analyseprogramme

- Primer Express (Software der Firma Applied Biosystems, Foster City/USA)
- Lasergene (Software der Firma DNASTAR, Madison/USA)
- Blast (Basic Local Alignment Search Tool) <http://www.ncbi.nih.gov/blast>

4.3.8 Datenverarbeitung und Statistik

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit SPSS für Windows, Version 15.0. Um zu überprüfen, ob die erhobenen Daten normalverteilt waren, wurde der Kolmogorov-Smirnov Test angewendet. Dieser Test gab an, dass die Daten nicht normalverteilt waren. Um feststellen zu können, inwieweit sich die Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen bei einem Patienten unterscheidet, wurde der Wilcoxon Test für zwei abhängige Parameter eingesetzt. Um die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen hinsichtlich der Keimbesiedlung festzustellen, wurde der Kruskal-Wallis Test angewendet. Anschließend wurde zum Vergleich der Keimbesiedlung zweier Gruppen miteinander der U-Test nach Mann-Whitney für zwei unabhängige Parameter angewendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p und damit das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

4.4 Real-Time PCR als Alternative zur kulturellen Diagnostik

Die herkömmliche Identifizierung der an der Wurzelkaries beteiligten Mikroorganismen beschränkte sich bis vor kurzem auf die kulturelle Anzucht. Es ist bekannt, dass mittels Kulturnachweis nur ungefähr 50% der oralen Mikroflora zu identifizieren ist, weil die meisten Mikroorganismen der Mundhöhle nicht auf konventionellen Kulturmedien wachsen [88]. Außerdem hatte sich gezeigt, dass die Untersuchung mittels Kulturverfahren von obligat anaeroben Mikroorganismenkomplexen (wie sie im Mundhöhlenmilieu anzutreffen sind) mit systematischen Fehlern einhergeht [75, 89]. Zur alternativen Diagnostik kariogener Mikroorganismen sollte aus diesem Grund die Real-Time PCR herangezogen werden, deren Verwendbarkeit in letzter Zeit mehrfach unter Beweis gestellt worden war [8, 57, 59-63, 78, 90].

Zur Untersuchung der neun ausgewählten kariogenen Mikroorganismen (*Actinomyces spp.*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus spp.*, *Rothia dentocariosa*, *Parvimonas micra*, *Neisseria mucosa*, *Veillonella parvula* und *Propionibacterium acnes*) waren zu Beginn der experimentellen Arbeiten bereits Publikationen für den Nachweis von sechs Spezies (*Propionibacterium acnes*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus spp.*, *Parvimonas micra* und *Veillonella parvula*) erschienen, in denen TaqMan PCR Assays beschrieben wurden, die als Zielgen die 16S rDNA hatten [61, 63, 87]. So mussten nur noch für den Nachweis der *Actinomyces spp.*, *Neisseria mucosa* und *Rothia dentocariosa* TaqMan PCRs entwickelt werden. Dies erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms „Primer Express“ (Applied Biosystems, Foster City/USA), wobei auch hier die 16S rDNA der jeweiligen Spezies als Template für Primer- und Sondenbindungsstellen ausgewählt wurde.

Abb. 4 zeigt die Positionen und die Größen (bp) der 16S Amplikons der verschiedenen Spezies in Bezug auf die 16S rRNA von *E. coli* (Acc.-No. E05005); an den verschiedenen Amplikons grenzen die jeweiligen Primerpaare; *S. mutans* und *S. sobrinus* sowie auch *P. micra* (*M. micros*) und *R. dentocariosa* wurden als Duplex-PCR konzipiert.

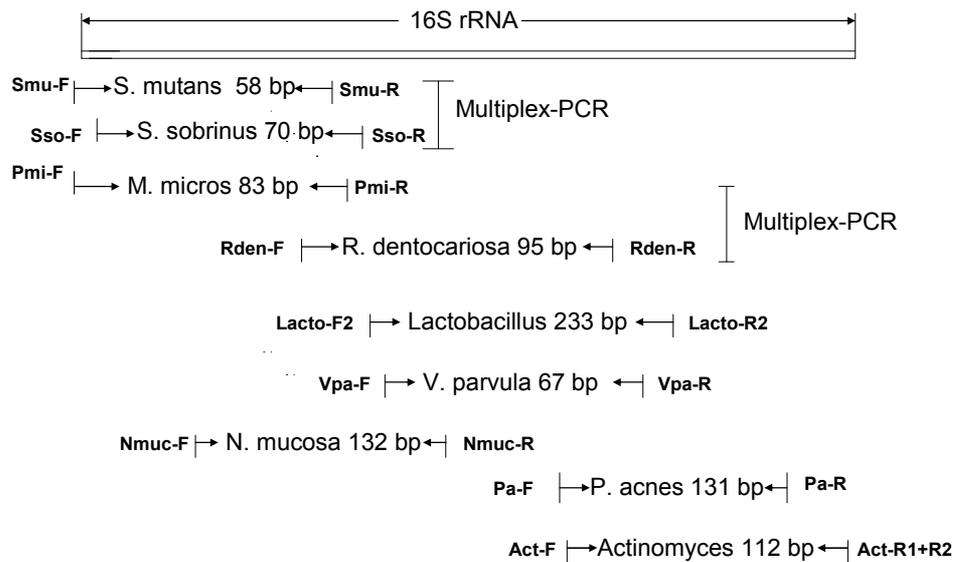


Abb. 4 : Position der 16S Amplikons bzgl. der *E. coli* 16S rRNA(Acc.-No. E05005)

Die PCR ist ein molekulargenetisches Verfahren, bei dem *in vitro* hochsensitiv spezifische Nukleinsäureabschnitte nachgewiesen werden. Bei der PCR erfolgt eine zyklische DNA-Neusynthese der Zielsequenzen mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase), eines die Zielsequenz einrahmenden Primerpaars und der vier Desoxyribonukleotide in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen. Um eine Bindung der Primer zu ermöglichen, erfolgt als erster Schritt die Trennung der in der Probe vorhandenen Nukleinsäure-Doppelstränge in Einzelstränge durch thermische Denaturierung. Anschließendes Abkühlen des Ansatzes erlaubt eine Anlagerung der Primer und die nachfolgende Synthese des zweiten DNA-Stranges. Die Abfolge dieser zwei Schritte wird in der PCR zyklisch wiederholt (40x), wobei bei jedem PCR-Zyklus im Idealfall eine Verdoppelung der Zielsequenz erfolgt. Da die Syntheseprodukte ihrerseits als Zielsequenz nachfolgender Synthesen dienen, kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung dieser.

Bei der Real-Time PCR wird während der Amplifikation ein Fluoreszenzsignal erzeugt, das proportional zur Zunahme des PCR-Produktes ist. Die bei der TaqMan PCR (Real-Time PCR mittels 5'-Nuclease Assay) verwendete Sonde ist ein

Oligodesoxyribonukleotid, das an dem Bereich, der von den Primerpaaren flankiert wird, bindet (s. Abb. 5). Die Sonde trägt am 5'-Ende einen Reporterfarbstoff (z. B. Fluoreszein-Derivat) und am 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (z.B. Rhodaminderivat). Liegt die intakte Sonde frei in Lösung vor, wird bei Anregung der Fluoreszenz des Reportermoleküls (R) die freiwerdende Energie durch das benachbarte Quenchemolekül (Q) unterdrückt. Da die Sondensequenz der Region des Amplikons zwischen den Primern entspricht, hybridisieren Sonde und Primer während der PCR an die Template-DNA. In der Elongationsphase trifft die Taq-Polymerase auf die gebundene Sonde und beginnt diese vom Strang zu verdrängen. Die entstehende Y-förmige Sekundärstruktur der Sonde aktiviert die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase, was zum Abbau der Sonde führt. Die Fluoreszenz des nun freigesetzten Reporters wird nicht länger durch den Quencher unterdrückt und steigt mit jedem Zyklus proportional zur Anzahl der synthetisierten PCR-Produkte.

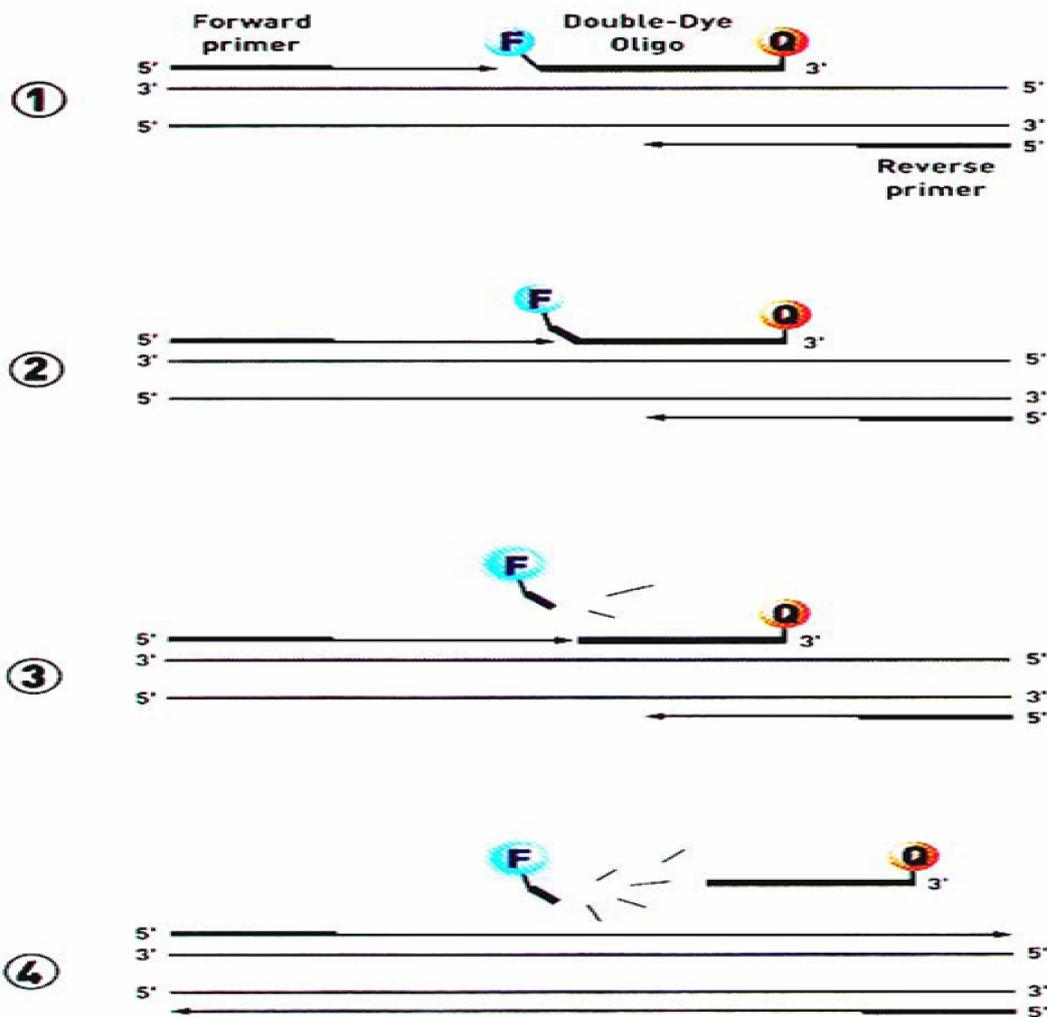


Abb. 5 : Prinzip der TaqMan PCR (<http://www.roche.com/pcr>)

1. Sonde bindet an DNA; 2. Quencher unterdrückt die Fluoreszenz des Reporters; 3. Während der Elongation wird mit Hilfe der 5'-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase der Reporter abgespalten; 4. Fluoreszenz kann gemessen werden, wobei diese direkt proportional zur DNA-Menge ist

Mittels der IQ5 Computersoftware (BioRad, München, Deutschland) wird im Bereich der linearen Änderung mittels einer Geraden (Threshold) auf der Amplifikationskurve ein Punkt markiert (s. Abb. 6).

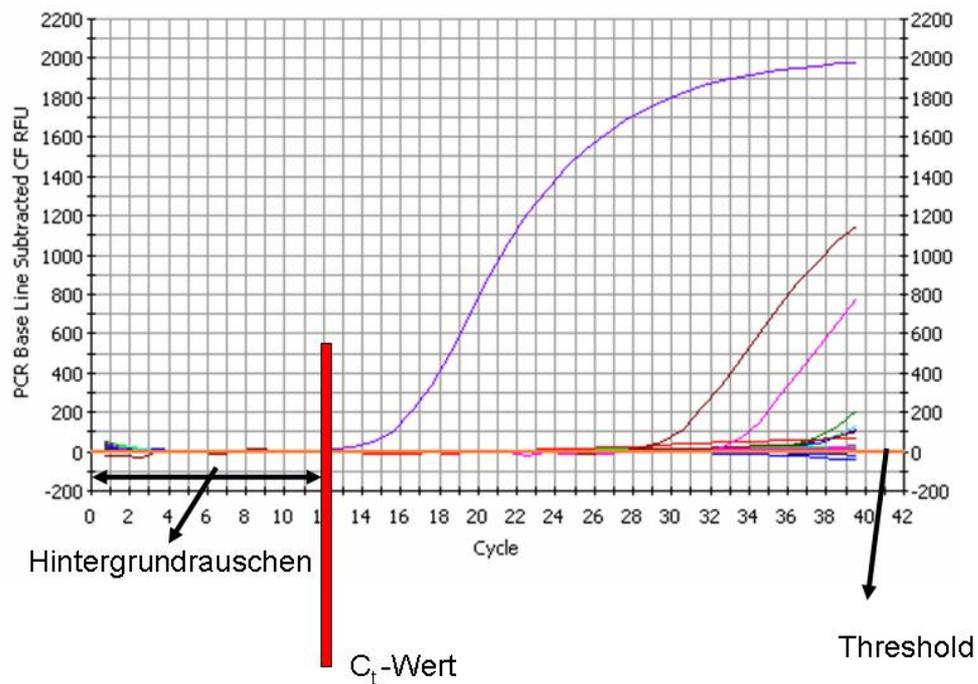


Abb. 6: Amplifikationskurve mit Threshold

Der C_t (Threshold-Cycle)-Wert gibt die Zyklenzahl an, bei der zum ersten Mal ein statistisch signifikanter Anstieg des Fluoreszenzsignals des gesuchten Amplikons gegenüber des Grundrauschens (auch Hintergrundrauschen genannt) zu verzeichnen ist. Je höher die Kopienzahl der eingesetzten Probe (Template-DNA) war, desto kleiner ist der C_t -Wert. Um eine Aussage über die DNA-Menge, die in der Patientenprobe enthalten ist, zu bekommen, wurde ein Plasmid (Standard) eingesetzt, das die zu amplifizierende Sequenz enthält. Da die DNA-Menge des Plasmids bekannt ist, kann anhand der Fluoreszenzmessung die DNA-Menge der unbekannt Probe errechnet werden (s. Kapitel 4.7).

Für eine quantitative Real-Time-Multiplex PCR, bei der mehrere Zielsequenzen in einer einzelnen PCR-Reaktion nachgewiesen werden, können Farbstoffe mit unterschiedlichen Extinktions- und Emissionswellenlängen als Reporter für die nachzuweisenden Sequenzen hinzugenommen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Reporter-Quencher Kombinationen für die Real-Time PCRs ausgewählt: Texas Red-BHQ₂, HEX-BHQ₁ und FAM-BHQ₁.

Der größte Vorteil dieser Methode liegt in der Möglichkeit der Quantifizierung nachgewiesener Genomäquivalenten und somit der exakten Bestimmung der Keimzahl des Bakteriums in einer Patientenprobe.

Des Weiteren bietet die Real-Time PCR den Vorteil mittels Mikrotiterplatten simultan 96 Amplifikationsreaktionen durchführen und computergestützt quantifizieren zu können. Mit der Verwendung von Mikrotiterplatten, in denen die Patientenproben unter gleichen Reaktionsbedingungen simultan den verschiedenen PCRs unterzogen werden können, ist auch das Problem der Kontamination als auch der Inhibierung der DNA-Neusynthese durch zuviel Primerpaare vermeidbar. In dieser Arbeit wurde eine Vorlage für die Mikrotiterplatte entwickelt, um simultan 8 Patientenproben den 8 verschiedenen Real-Time PCRs unterziehen zu können (s. Kapitel 4.3.6.2).

4.5 Das humane *gapdh*-Gen als Positivkontrolle

Das humane *gapdh*-Gen (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen) wurde in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle bei den Patientenproben nachgewiesen, um eine Inhibition der PCR ausschließen zu können. Das Enzym *gapdh* kommt in jeder humanen Zelle vor, wo es in der Glykolyse und Glukoneogenese die Umwandlung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat in 1,3-Diphospho-D-Glycerat katalysiert. Wenn das humane *gapdh*-Gen in einer Patientenprobe nicht detektiert wurde, war dies entweder ein Hinweis darauf, dass die Güte der Probeentnahme nicht ausreichend für einen Erregernachweis war, oder dass Inhibitoren die PCR negativ beeinflussten (wie sie in blutigen Proben vorkommen). Die Real-Time PCR zum Nachweis des humanen *gapdh*-Gens als Positivkontrolle war von der Mykoplasmenarbeitsgruppe (Leitung Frau Prof. B. Henrich) des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der HHU Düsseldorf entwickelt worden. Bei der Analyse von vier Patientenproben kam es zwei Mal zum Fehlen einer Amplifikation.

4.6 Design der TaqMan PCRs zum Nachweis von: *Actinomyces spp.*, *Rothia dentocariosa* und *Neisseria mucosa*

Unter Zuhilfenahme des Computerprogramms „Primer Express“ wurden geeignete Primer und Sonden für *Actinomyces spp.*, *Rothia dentocariosa* und *Neisseria*

mucosa ermittelt. Das Softwareprogramm „Primer Express“ sucht nach thermodynamischen Bedingungen, die die TaqMan 1.2 Amplifikation ermöglicht. Es wurden Primer und Sonden vorgeschlagen, die bei einer konstanten Annealingtemperatur von 60 °C optimal binden und keine Sekundärstrukturen wie intra- oder intermolekulare Haarnadelstrukturen („Hairpinloops“) aufweisen. Die Primersequenzen waren in der Regel 15-30 Nukleotide lang, um eine ausreichende Spezifität gewährleisten zu können. Gemäß den Vorgaben des Programms wurden keine Primer mit vier aufeinander folgenden gleichen Basen vorgeschlagen, da dies Leserahmenverschiebungen begünstigt hätte. Die Güte der ermittelten Primerpaare konnte man sich aus dem jeweiligen Score (Penalty) ableiten, der einen Wert unter 100 haben sollte.

Innerhalb der 16S rDNA Gensequenz wurde von „Primer Express“ unter Berücksichtigung der oben genannten Bedingungen geeignete Primer- und SONDENSEQUENZEN mit Penalty-Werten von 8 für *Actinomyces spp.*, 24 für *Neisseria mucosa* und 7 für *Rothia dentocariosa* vorgeschlagen.

In einem Vergleich der zu amplifizierenden Genregion mit den Sequenzen der EMBL-Datenbank wurde anschließend ermittelt, in welchem Maße die Primer an andere homologe Bakteriengene binden können. Es war zum einen entscheidend, welche anderen Spezies Homologien aufwiesen, denn nahezu identische Gensequenzen bei einem humanbesiedelnden Erreger wären weitaus kritischer zu bewerten als die eines Mikroorganismus, das nur Tiere besiedelt. Zum anderen musste auf den Grad der Homologien geachtet werden, da mit größer werdender Anzahl von Punktmutationen, speziell im 3`-Bereich der Primerbindungsstellen, eine Fehl-amplifizierung unwahrscheinlicher wird.

Bei diesem Datenbankabgleich ergab sich für die ausgewählten Primer- und SONDENSEQUENZEN der *Actinomyces spp.* PCR eine Homologie von 100% für *A. naeslundii*, *A. viscosus*, *A. israelii*, *A. meyerii*., sowie für einige weitere Spezies die jedoch nur bei Tieren vorkommen, wie *A. catuli* (Hund), *A. bovis* und *A. slackii* (Rind). Für *A. odontolyticus* mussten im 3`-Bereich des ausgesuchten Revers-Primer zwei Nukleotide ausgetauscht werden, um eine fehlende Amplifikation nicht befürchten zu müssen, sodass diese TaqMan PCR zwei Reverseprimer enthielt (s. Kapitel 4.3.6.2).

Für eine *Rothia dentocariosa* spezifische TaqMan PCR wurde anfangs von der Software „Primer Express“ ein Forward-Primer vorgeschlagen, der nach dem Vergleich der zu amplifizierenden Genregion mit den Sequenzen der EMBL-Datenbank eine Kreuzreaktivität mit Aktinomyzeten anzeigte. Durch Veränderung der Amplikonlänge konnte ein Primerpaar gefunden werden, das keine Kreuzreaktivitäten aufwies und einen Penalty-Wert von 7 hatte.

Das Design einer *Neisseria mucosa* spezifischen PCR wurde durch die hohe Homologie zu *Neisseria meningitidis* erschwert. Auch wenn man davon ausgehen konnte, dass alle Patienten gesund waren und somit keine *N. meningitidis* oral zu diagnostizieren wären, wurde durch Modifizierung der zu amplifizierenden 16S rDNA-Region als auch Variation der Amplikonlänge nach einem Primer-/Sondenpaar gesucht, das keine Kreuzreaktion zeigte (Primer- und SONDENSEQUENZEN siehe Tab. 3).

4.7 Die Quantifizierung der PCR

Um eine quantitative Aussage über die in der Real-Time PCR nachgewiesenen Bakterien-DNA treffen zu können, wurde eine in der Kopienzahl standardisierte Probe des nachzuweisenden DNA-Abschnittes benötigt. Dazu wurden PCR-Standards generiert. Für die Standardherstellung wurden positive Proben der jeweiligen Real-Time PCR 1/100 in 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 verdünnt und davon 2 µl als Templates in eine konventionelle PCR eingesetzt. Die Spezies-spezifischen Amplifikate (s. Abb. 7) wurden in den Vektor pGEM-T kloniert und *E. coli*-DH5α mit dem resultierenden Plasmid transformiert. Nach Transformation kompetenter *E. coli* DH5α, Klonierung und Anzucht einzelner plasmidtragenden *E. coli*-Bakterien wurde die Plasmid-DNA aufgereinigt und zur Identifizierung der Insert-tragenden Klone mit *Sall*/*SphI* restringiert.

10 µl von jedem Amplikon-Eluat und 2 µl Probenauftragspuffer wurden anschließend auf 2% Agarosegel aufgetragen und nach gelelektrophoretischer Auftrennung die Insertgröße bestimmt (s. Abb. 7).

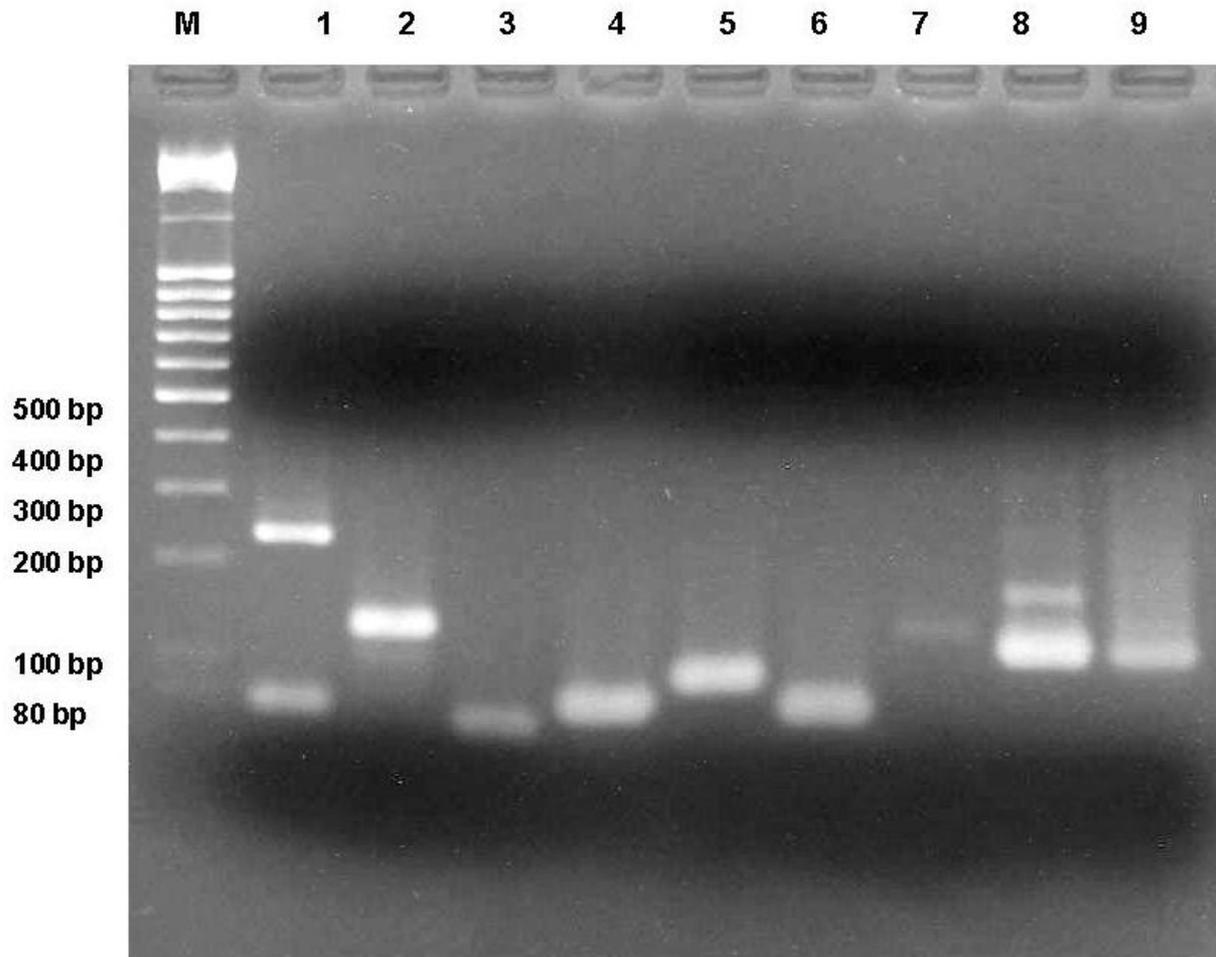


Abb. 7 : Gelelektrophoretische Auftrennung der jeweiligen PCR-Produkte

1: *Lactobacillus* (233 bp Amplikon); 2: *P. acnes* (131 bp Amplikon); 3: *S. mutans* (58 bp Amplikon); 4: *S. sobrinus* (70 bp Amplikon); 5: *P. micra* (83 bp Amplikon); 6: *V. parvula* (67 bp Amplikon); 7: *R. dentocariosa* (95 bp Amplikon); 8: *N. mucosa* (132 bp Amplikon); 9: *Actinomyces* (112 bp Amplikon)

M: Molekulargewichtsmarker: 1kb DNA Ladder Mix (Firma: Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

Die Inserts der Klone, die die zu erwartende Größe (s. Abb. 7) nach *Sal* I- und *Sph* I-Restriktion zeigten wurden anschließend sequenziert, um eine Übereinstimmung mit der in der Datenbank abgelegten Sequenz sicherzustellen. Exemplarisch ist in Abb. 8 das Sequenzierungschromatogramm des klonierten *S. mutans*-Amplikons dargestellt:

Sequenzierungen der pGemT Klone S238/239 vom 27.02.08

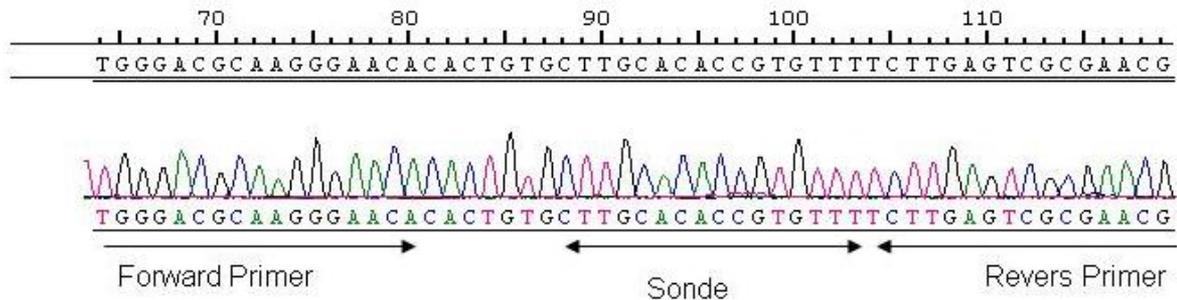


Abb. 8 : Sequenzierungschromatogramm der S. mutans Klone S238

Die Konzentration der präparierten Plasmid-DNA wurde photometrisch bestimmt. Abhängig von der Plasmidgröße und –konzentration wurde die Molekülanzahl in den einzelnen Plasmidpräparationen errechnet. Folgende Tabelle gibt die Plasmidkonzentration und die Molekülanzahl der jeweiligen Plasmidpräparationen dar:

Plasmid	C (ng/μl)	Moleküle/μl
Lactobacillus spp.	80	2,26x10 ¹⁰
P. acnes	94	2,73x10 ¹⁰
S. mutans	74	2,2x10 ¹⁰
S. sobrinus	61	1,81x10 ¹⁰
P. micra	157	4,64x10 ¹⁰
V. parvula	167	4,97x10 ¹⁰
R. dentocariosa	93	2,74x10 ¹⁰
N. mucosa	147	4,28x10 ¹⁰
Actinomyces spp.	122	3,57x10 ¹⁰

Anschließend wurden Verdünnungen erzeugt, die 10⁵, 10⁴, 10³, 10², 10 Kopien des jeweiligen Plasmids pro μl enthielten, und als Quantifizierungs-Standard in die Real-

Time PCR eingesetzt, um die Kopienzahl des jeweilig nachzuweisenden Bakteriums in der unbekannt Patientprobe errechnen zu können.

Abb. 9 zeigt die Verdünnungsreihe der eingesetzten Standards in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Kopien bzw. $2,5 \times 10^4$ Kopien, $2,5 \times 10^3$ Kopien, $2,5 \times 10^2$ Kopien und $2,5 \times 10^1$ Kopien.

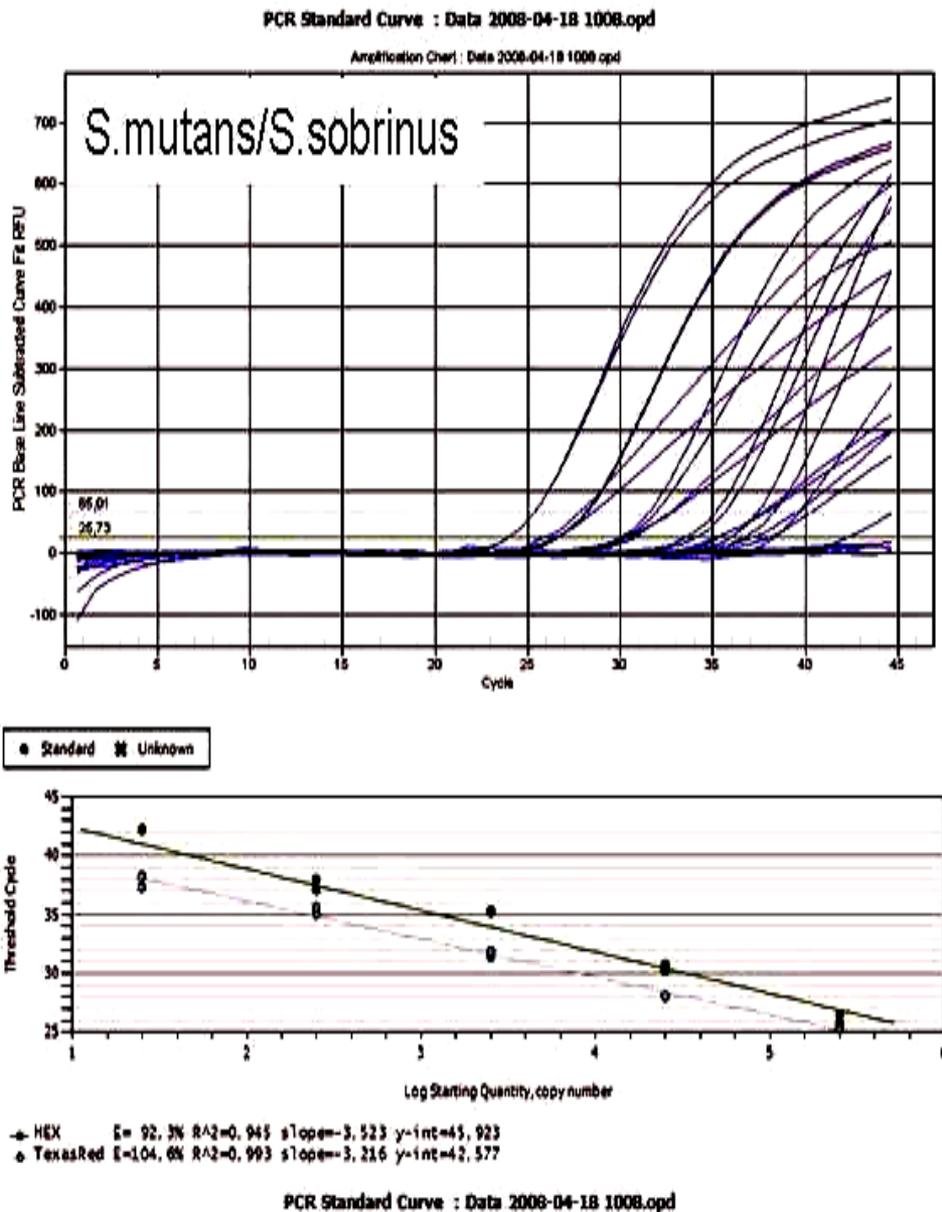


Abb. 9: Linearität der Real-Time PCRs

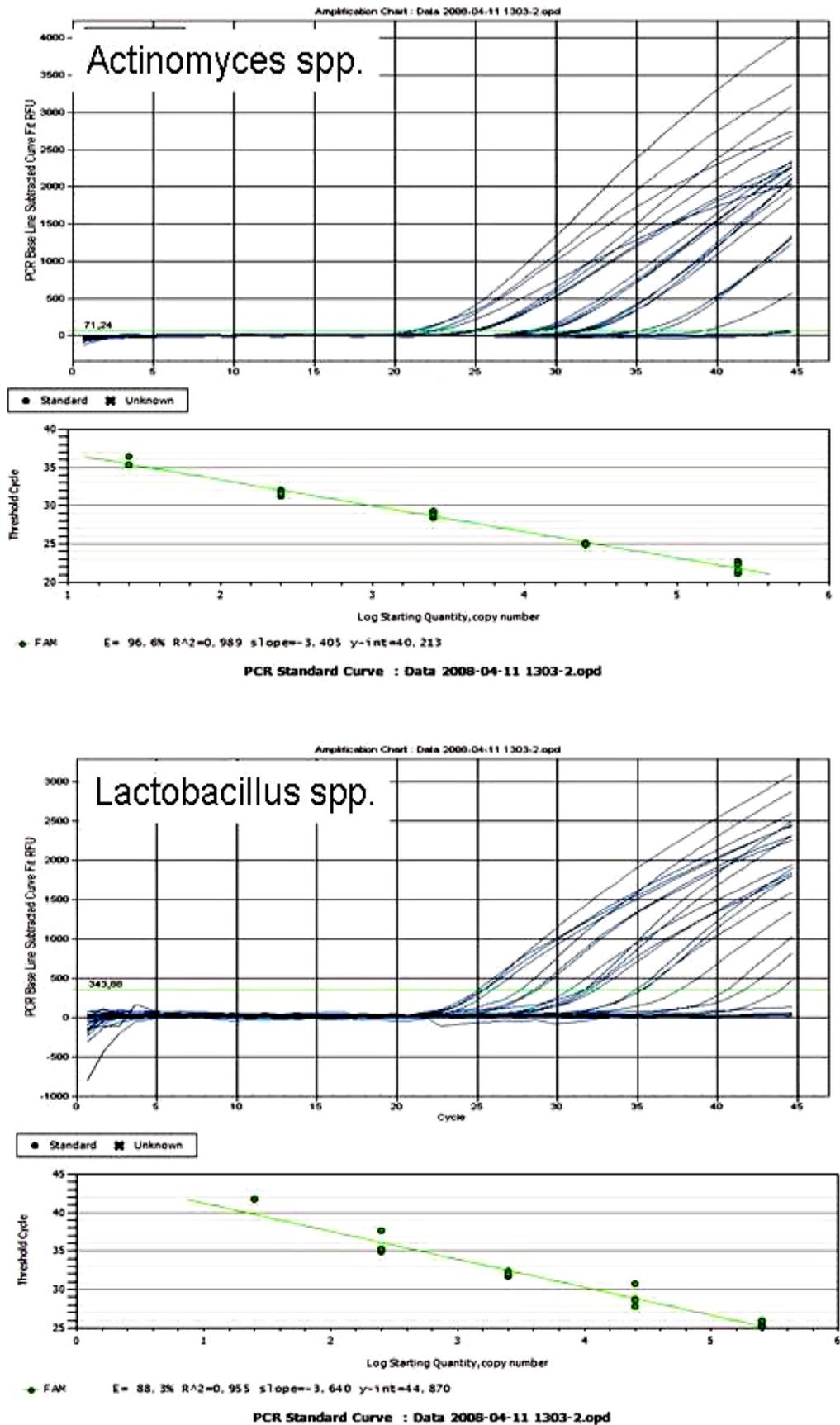
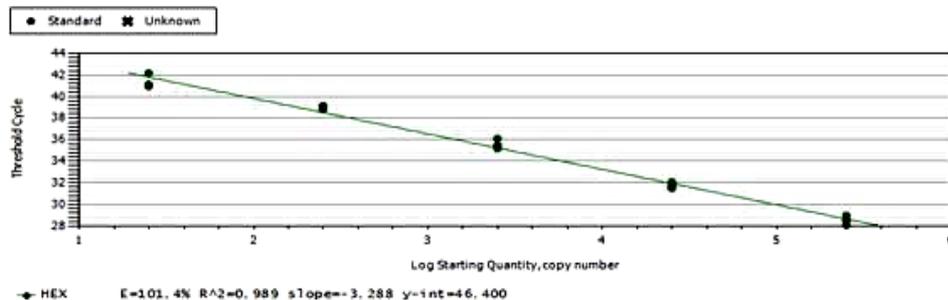
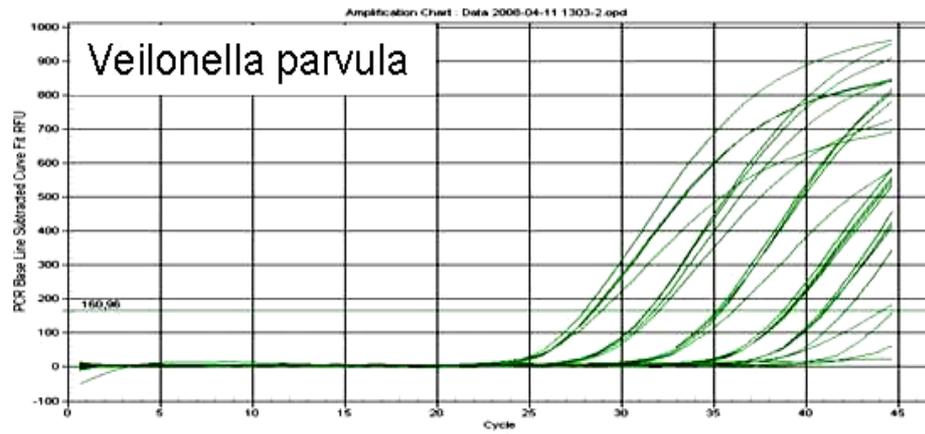
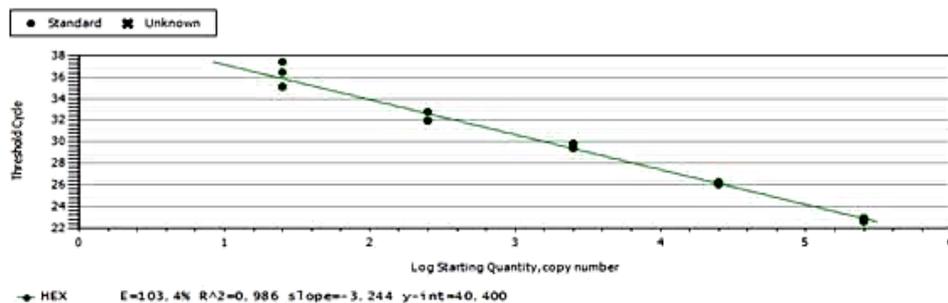
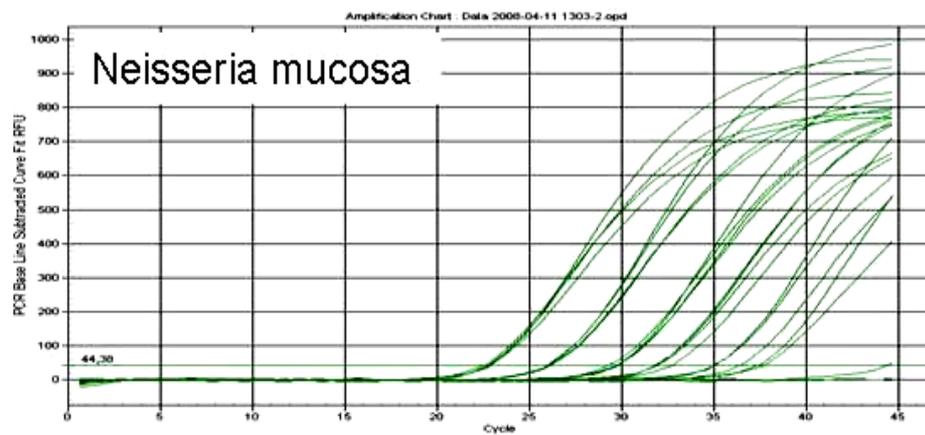


Abb. 9: Linearität der Real-Time PCRs



PCR Standard Curve : Data 2008-04-11 1303-2.opd



PCR Standard Curve : Data 2008-04-11 1303-2.opd

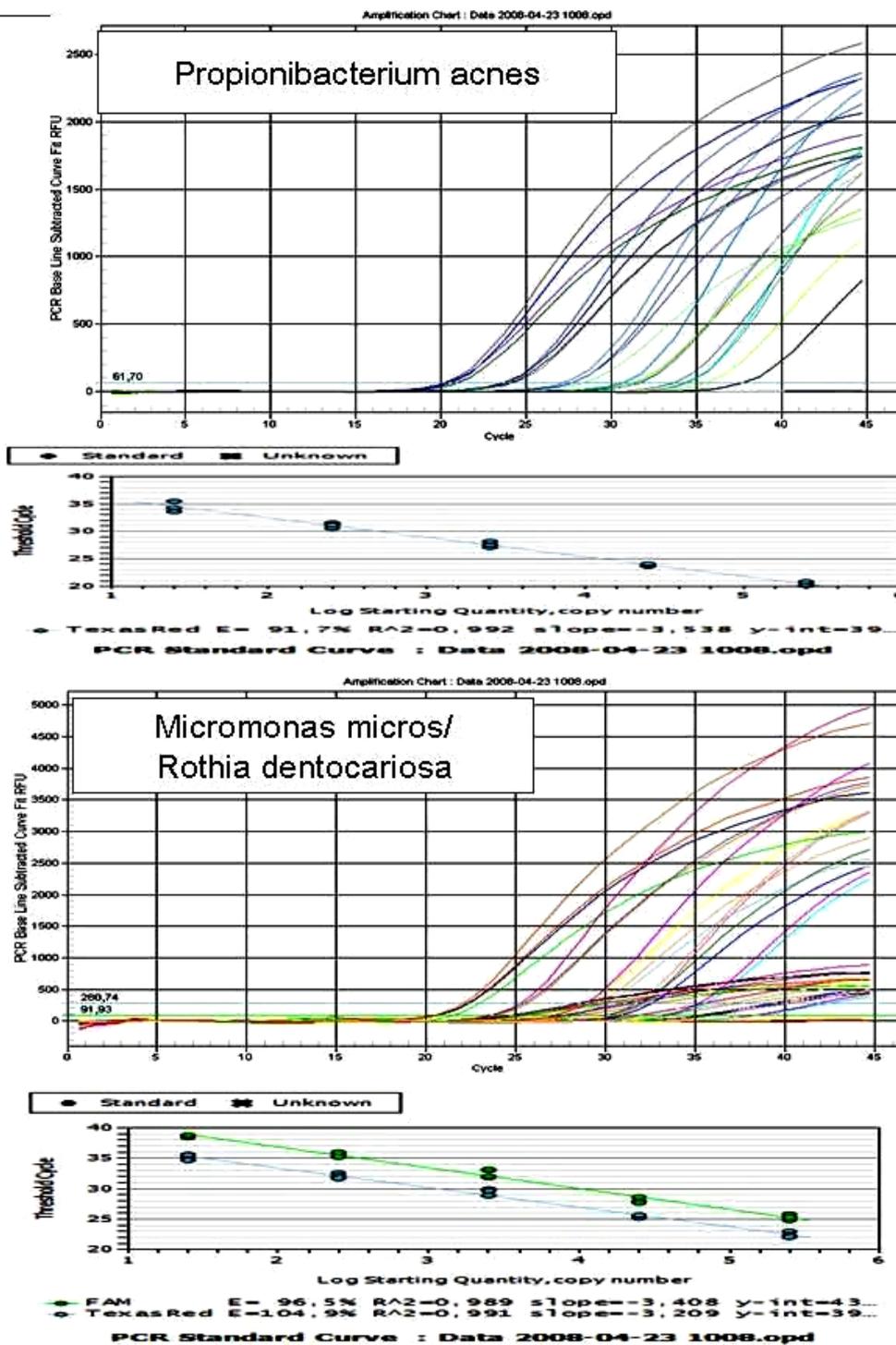


Abb. 9: Linearität der Real-Time PCRs

Unter Einsatz von 2,5 Kopien des jeweiligen Standards ($2,5 \times 10^5$ Kopien bzw. $2,5 \times 10^4$ Kopien, $2,5 \times 10^3$ Kopien, $2,5 \times 10^2$ Kopien und $2,5 \times 10^1$ Kopien) wurde die Linearität der einzelnen Real-Time PCRs ermittelt.

Mit „E“ wird die Effizienz der PCR bezeichnet. Die Effizienz wird als Maß für eine optimale PCR herangezogen. Im Falle einer 100%-igen Effizienz verdoppelt sich in jedem Zyklus die DNA-Produktmenge und analog dazu das Fluoreszenzsignal. Die Neigung der Standardkurve (slope) korreliert mit der Effizienz der PCR und wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Effizienz} = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$$

Wenn die Effizienz der PCR bei 100% liegt, beträgt die Neigung der Standardkurve -3,32 [91].

Das Bestimmtheitsmaß - R^2 , ausgedrückt als eine Zahl zwischen 0 und 1, gibt Auskunft, wie nah einzelne Komponenten einer PCR in einem mehrfachen Ansatz dem Mittelwert sind. Eine PCR wird als gut bezeichnet, wenn R^2 nahezu 1 ist und die Nachweisgrenze bis fast 25 Kopien im linearen Bereich beträgt. Anhand dieser Kriterien werden die einzelnen PCRs beurteilt und ggf. optimiert [92].

Wie aus den Linearitäten unserer Real-Time PCRs ersichtlich ist (s. Abb. 9), war R^2 nahezu 1 in jeder einzelnen und Duplex-PCR und es konnten bis fast 25 Kopien im linearen Bereich nachgewiesen werden.

Als Reporterfarbstoffe für die Monoplex- und Duplex-PCRs wurden FAM (3',6'-Dipivaloylfluoresceinyl)-6-carboxamidohexyl)-1-O-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)phosphoramidit, HEX (6-carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein) und Texas Red (Sulforhodamin 101 Sulfonylchlorid) ausgesucht. Bei den Monoplex-PCRs war die Standardkombination Reporter-Quencher: FAM-BHQ₁, HEX-BHQ₁ oder Texas Red-BHQ₂. Bei den Duplex-PCRs war es sehr wichtig Farbstoffe mit unterschiedlichen Extinktions- und Emissionswellenlängen auszusuchen, um eine Überlappung der Fluoreszenzsignale zu vermeiden. In dem Sinne wurden bei den Duplex-PCRs die Kombinationen FAM-BHQ₁/ Texas Red-BHQ₂ (*P. micra*/*R. dentocariosa*-PCR) und HEX- BHQ₁/ Texas Red-BHQ₂ (*S. mutans*/*S. sobrinus*-PCR) ausgewählt.

4.8 Evaluierung der PCR

Um die Speziespezifität und –sensitivität der sieben PCRs sicherzustellen, wurden alle neun Spezies jeweils in den verschiedenen TaqMan PCRs auf Kreuzreaktivität getestet.

Dafür wurden in jeder PCR die neun verschiedenen DNAs als Templates eingesetzt. In jeder PCR wurde die entsprechende DNA amplifiziert. Eine Kreuzreaktivität wurde nur im Falle von *Actinomyces spp.* DNA in der *R. dentocariosa*-PCR beobachtet. Bei Vergleich der entsprechenden Ct-Werte zwischen gewünschter Reaktivität (Ct=24) und Kreuzreaktivität (Ct=38) zeigte sich, dass die Actinomyceten-DNA die *R. dentocariosa*-PCR um weniger als 0,1% verfälschte und somit zu vernachlässigen war.

Zusätzlich wurde ein Vergleich der zu amplifizierenden Genregion mit allen Sequenzen der EMBL-Datenbank durchgeführt. Dabei konnte man ermitteln, ob und in welchem Maße die ausgesuchten Primer und Sonden an andere homologe Bakteriengene anbinden können. Bei diesem Datenbankabgleich ergab sich für alle ausgesuchten Primer- und SONDENSEQUENZEN eine 100%-ige Homologie nur zu den entsprechenden Spezies. Die Homologie zu den anderen Spezies lagen bei <80%.

4.9 Evaluation verschiedener Probenaufschlussverfahren

Um möglichst viel DNA aus dem Probenmaterial für die anschließende PCR aufarbeiten zu können, wurden zuerst parallel mehrere DNA-Aufreinigungsmethoden getestet:

- mittels des QIAamp DNA-Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland),
- des Genra Puregene-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) und
- des EZ1 BioRobots (Qiagen, Hilden, Deutschland).

In dem direkten Vergleich zwischen QIAamp DNA-Mini Kit und Genra Puregene-Kit, erwies sich das Puregen-Kit viel zeitintensiver. Das Protokoll des QIAamp DNA-Mini Kits war hierzu sehr viel einfacher und übersichtlicher, und die DNA Ausbeute höher als bei der Aufreinigung mittels Puregene-Kit. Wie Abb. 10 verdeutlicht, wurden die höchsten DNA-Ausbeuten jedoch bei Verwendung des EZ1 BioRobots erzielt.

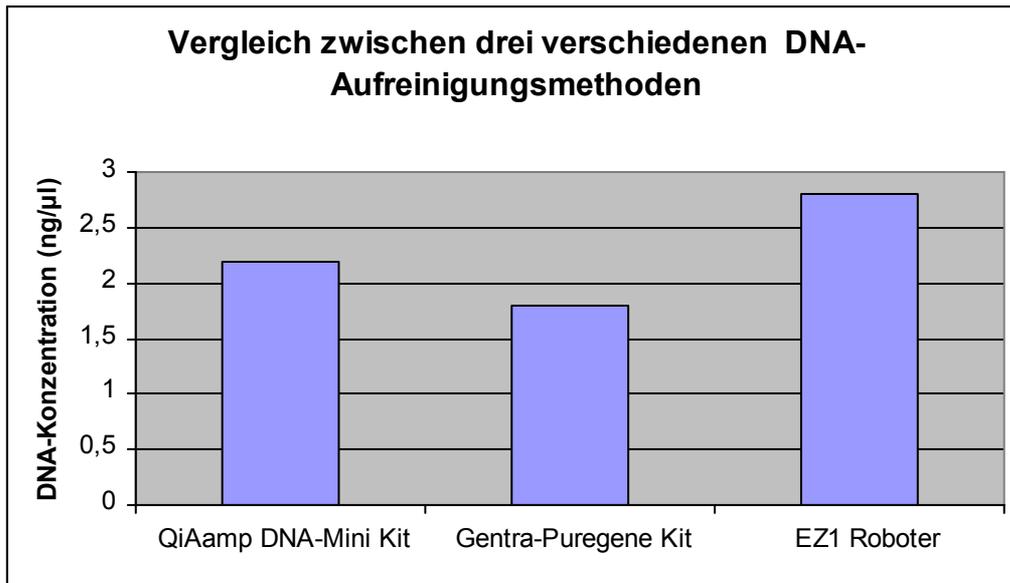


Abb. 10 : Graphische Darstellung des DNA-Ausbeuten aus $\frac{1}{2}$ Plaque/100µl DNA-Eluat in Abhängigkeit von der Aufreinigungsmethode

Das EZ1 Robot-Gerät erwies sich somit als beste Methode für die Aufreinigung der DNA aus den Patientenproben. Mit Hilfe dieses automatisierten Nukleinsäureisolierungssystems konnten auf den vorhandenen zwei Biorobotoren max. 12 Proben in 20 min aufbereitet werden. Die Geräte waren einfach zu bedienen und wurden außerdem aufgrund des hohen Probendurchsatzes aus Zeitgründen favorisiert. Fehler beim manuellen Handling, Kontaminationen gerade beim Vorhandensein hochtitriger Proben und ähnliche potentielle Fehlerquellen waren bekanntermaßen durch Automation stark reduziert [77]. Es bleibt anzumerken, dass es sich bei dieser Präparationsmethode jedoch auch um die kostenintensivste handelte. Wie in Abb. 11 deutlich zu sehen ist, korrespondierte die höhere DNA-Konzentration mit einem höheren Nachweis an humanen (GAPDH) und bakteriellen (Laktobazillen) Genomabschnitten.

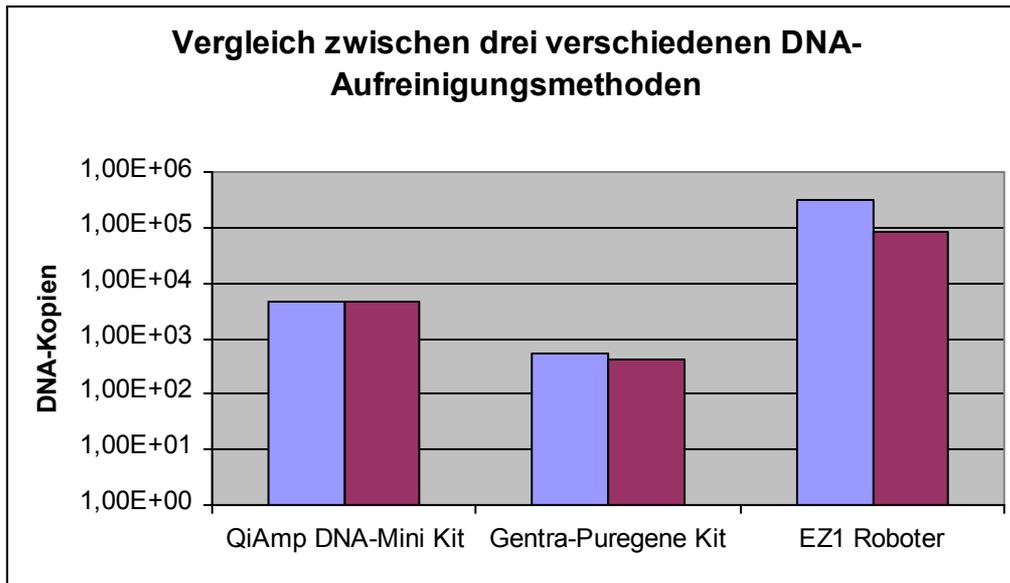


Abb. 11: Vergleich zwischen drei DNA-Aufreinigerungsverfahren

DNA-Kopienzahlen der humanen GAPDH (blaue Balken) und Laktobazillen (rote Balken) in 2,5 µl/100 µl DNA-Lösung in Abhängigkeit von der Aufreinigungsmethode

4.10 Analyse der Patientenproben

Nach den oben beschriebenen Vorversuchen wurden die Patientenproben mittels EZ1-Aufarbeitung aufgeschlossen. Da von jedem der 54 Patienten zwei Plaqueproben (gesunde und kariöse Wurzeloberflächen) vor und zwei Monate nach der Behandlung entnommen worden waren, sind insgesamt 216 Proben untersucht worden. Die Plaqueproben befanden sich bis zur Aufbereitung bei -20°C. Zur DNA-Präparation wurden die Plaqueproben erst im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und anschließend in den vorliegenden 400µl PBS resuspendiert. Aus 200 µl Resuspension wurde dann mit Hilfe des EZ1 Roboters die DNA aufgereinigt (100 µl DNA-Eluat) und bis zur Amplifikation bei -20°C gelagert (s. Kapitel 4.3.1.1).

Die DNA-Proben wurden simultan in acht TaqMan PCR Assays amplifiziert, wobei der Nachweis von *S. mutans* und *S. sobrinus* sowie *P. micra* (*M. micros*) und *R. dentocariosa* jeweils als Duplex-PCRs etabliert worden waren (s. Kapitel 3.3.6.2). Um alle 216 Proben neben Positiv- und Negativkontrollen quantitativ analysieren zu können, wurden insgesamt 47 PCR-Läufe im 96 Well Mikrotiterplattenformat durchgeführt und anschließend ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen vor und nach parodontologischer Behandlung

Als erstes sollte die Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen vor und nach parodontologischer Behandlung bei allen 54 Patienten vergleichend untersucht werden. Die folgenden Abbildungen zeigen den Vergleich zwischen kariösen und gesunden Wurzeloberflächen; die Normierung erfolgte in DNA-Kopienzahlen der jeweiligen Spezies pro mg Plaque.

Die blauen Box-Plots entsprechen den kariösen und die roten Box-Plots den gesunden Wurzeloberflächen.

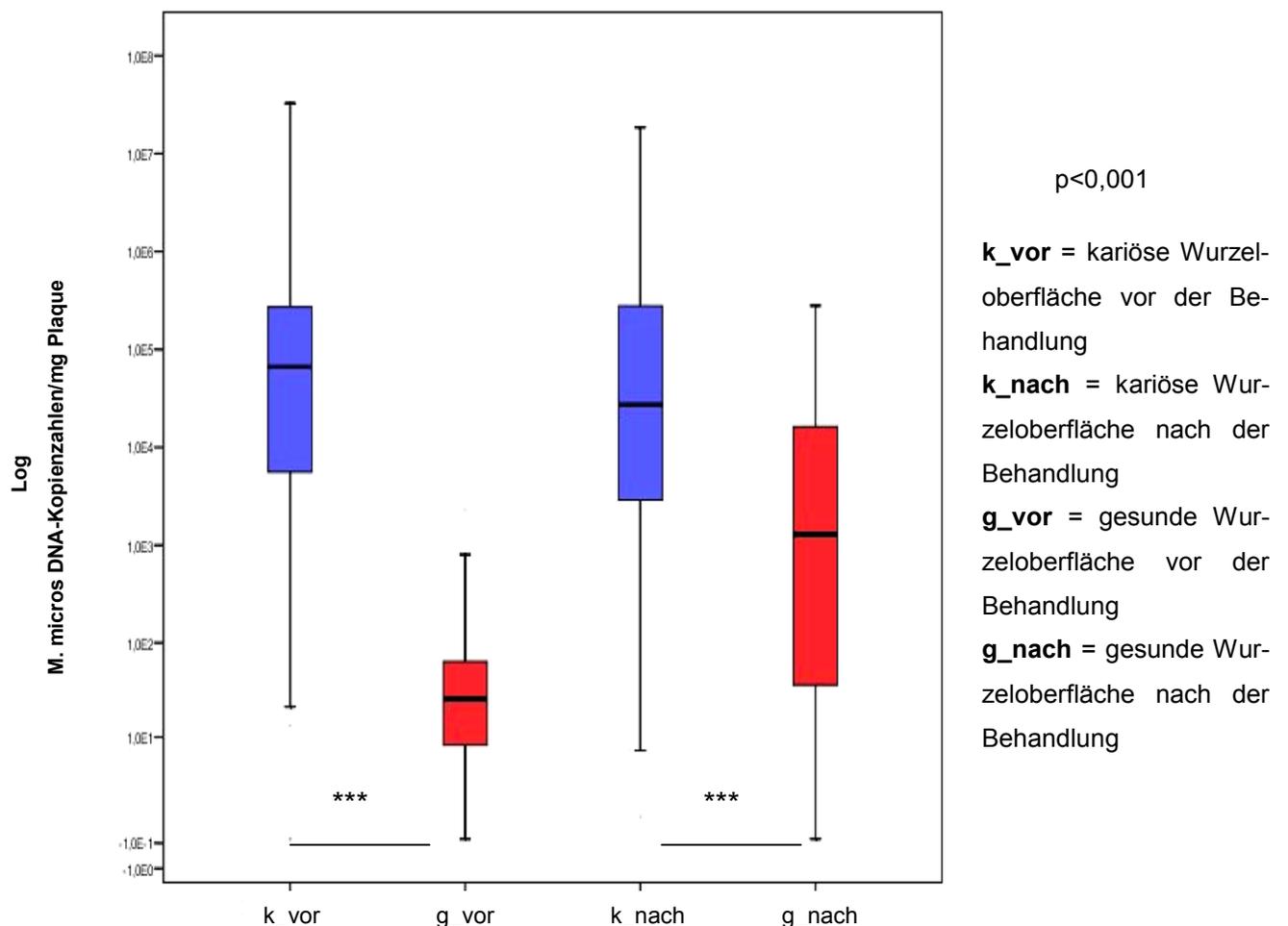


Abb. 12: *Parvimonas micra* Kopienzahlen/mg Plaque

Wie aus der Abb. 12 ersichtlich wird, ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Keimbesiedlung der kariösen (k/blau Box-Plots) und der gesunden (g/rote Box-Plots) Wurzeloberflächen sowohl vor als auch nach parodontologischer Hauptbehandlung zu sehen. Nach statistischer Auswertung erwies sich dieser Unterschied als statistisch signifikant ($p < 0,001$).

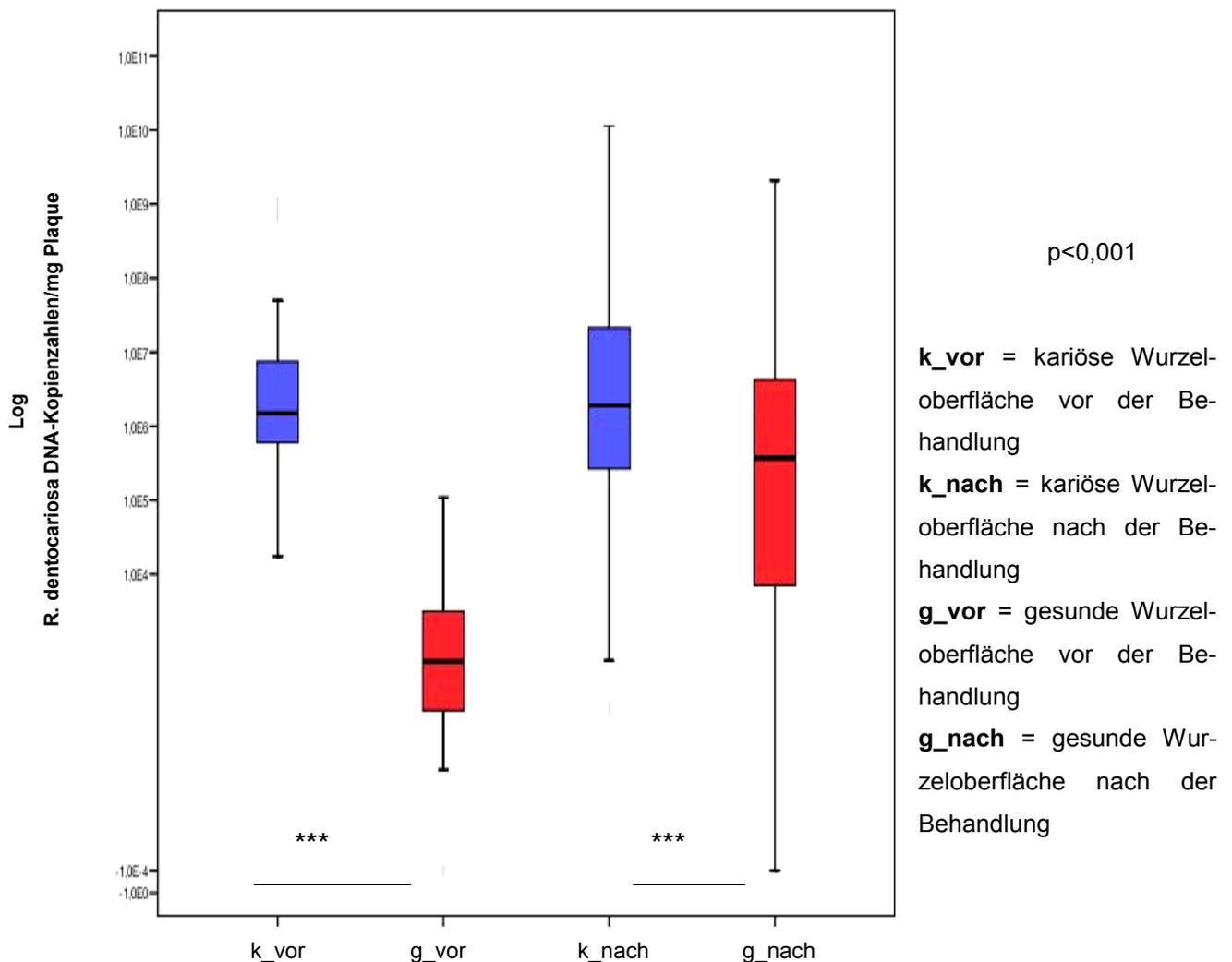


Abb. 13: *Rothia dentocariosa* Kopienzahlen/mg Plaque

Aus Abb. 13 wird erkennbar, dass auch für *R. dentocariosa* die Kopienzahlen/mg Plaque deutlich höher auf den kariösen Wurzeloberflächen als auf den gesunden Wurzeloberflächen waren. Der Unterschied zwischen der Keimbesiedlung der kariösen (k/blau Box-Plots) und der gesunden (g/rote Box-Plots) Wurzeloberflächen

war auch im Falle von *R. dentocariosa* sowohl vor als auch nach parodontologischer Behandlung statistisch signifikant ($p < 0,001$).

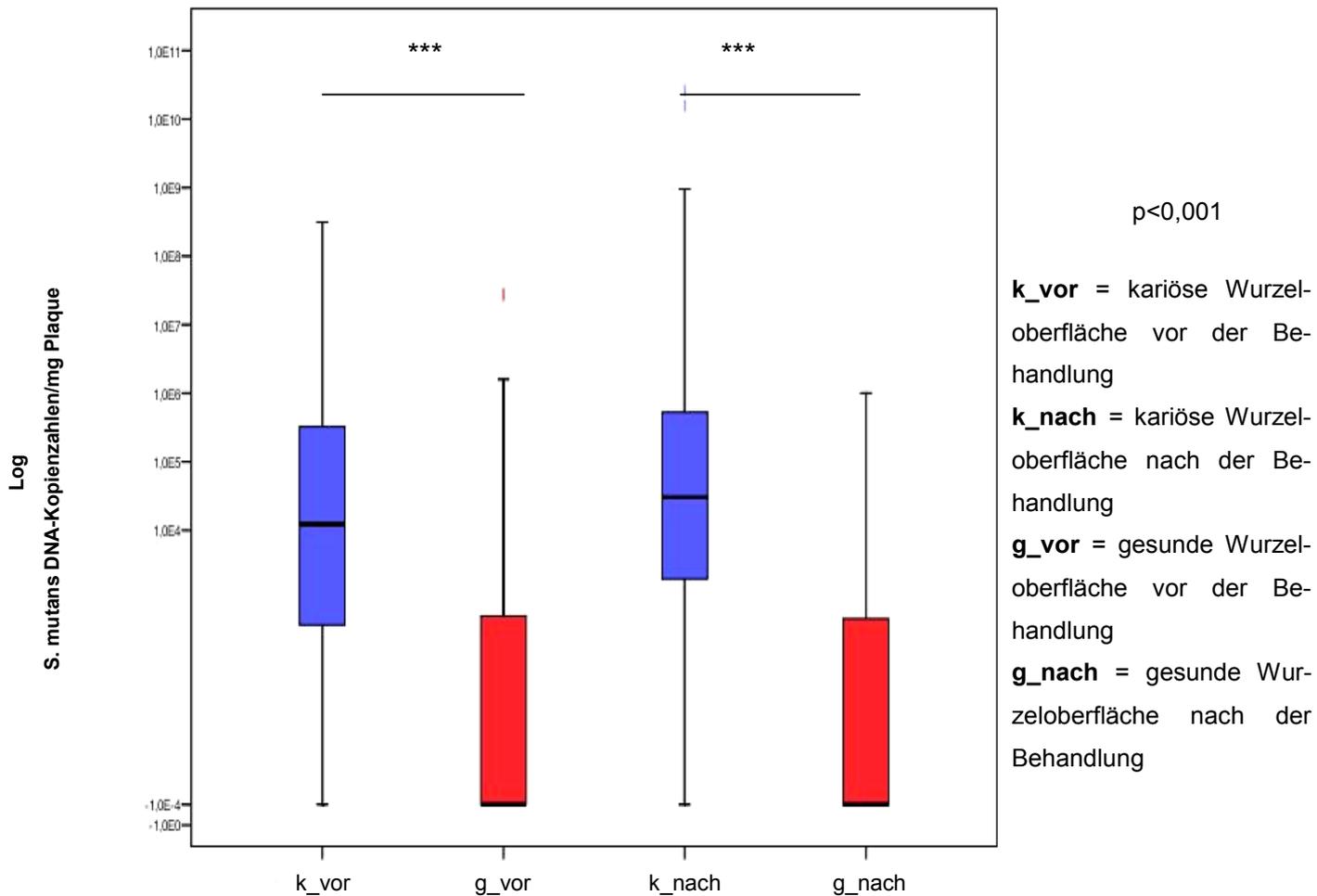


Abb. 14: *S. mutans* Kopienzahlen/mg Plaque

Ähnlich wie bei den anderen o. g. Spezies, war die *S. mutans*-Keimzahl höher auf den kariösen Wurzeloberflächen als auf den gesunden Wurzeloberflächen. Der Unterschied zwischen der Keimzahlen auf den kariösen Wurzeloberflächen und der

auf den gesunden Wurzeloberflächen war auch für *S. mutans* sowohl vor als auch nach parodontologischer Behandlung statistisch signifikant ($p < 0,001$).

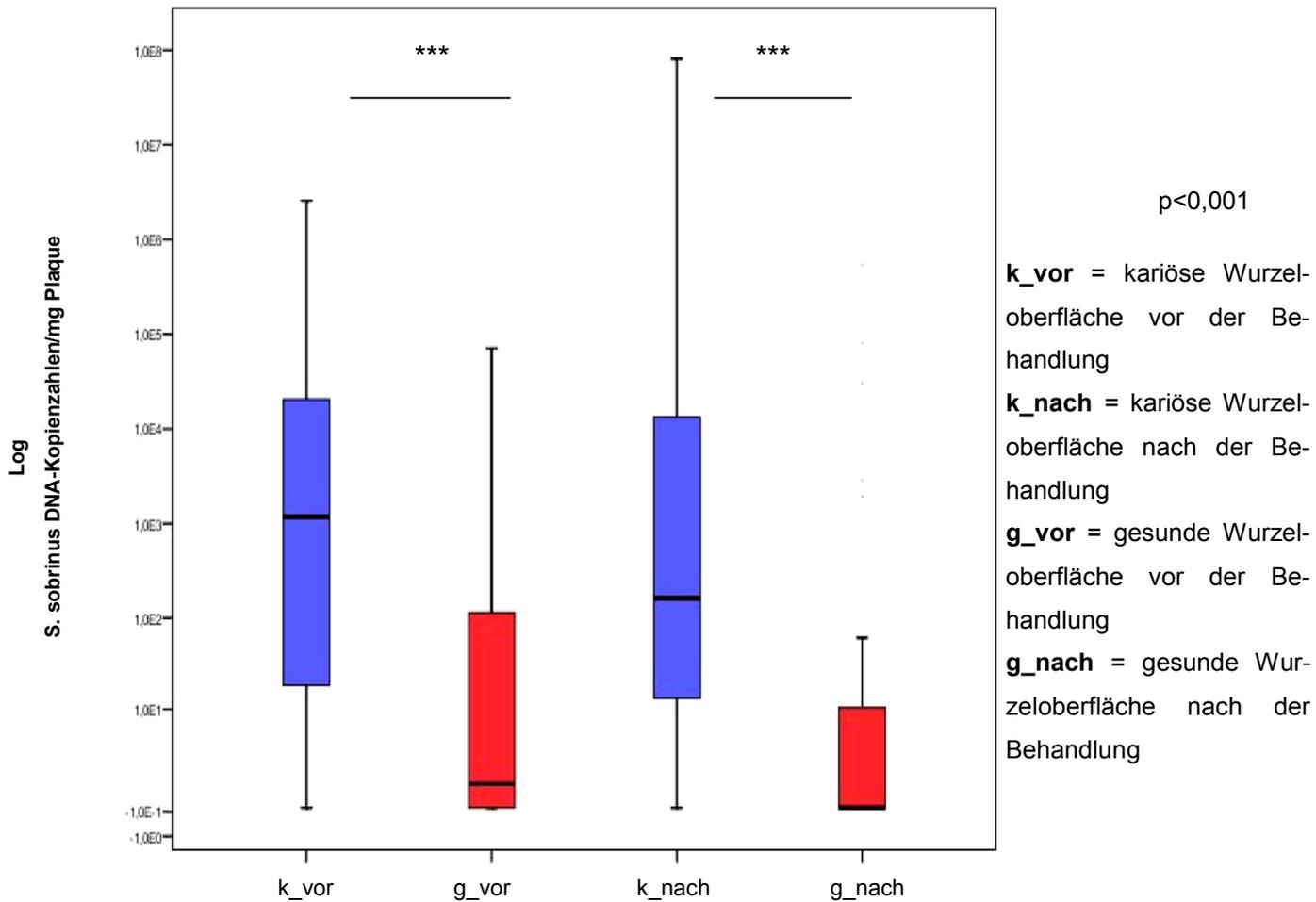


Abb. 15: *S. sobrinus* Kopienzahlen/mg Plaque

Ähnlich wie bei den anderen o. g. Spezies wurde auch im Falle von *S. sobrinus* festgestellt, dass die Keimzahlen auf den kariösen Wurzeloberflächen höher als auf

den gesunden Wurzeloberflächen waren. Dieser Unterschied zeigte sich sowohl vor als auch nach parodontologischer Behandlung als statistisch signifikant ($p < 0,001$).

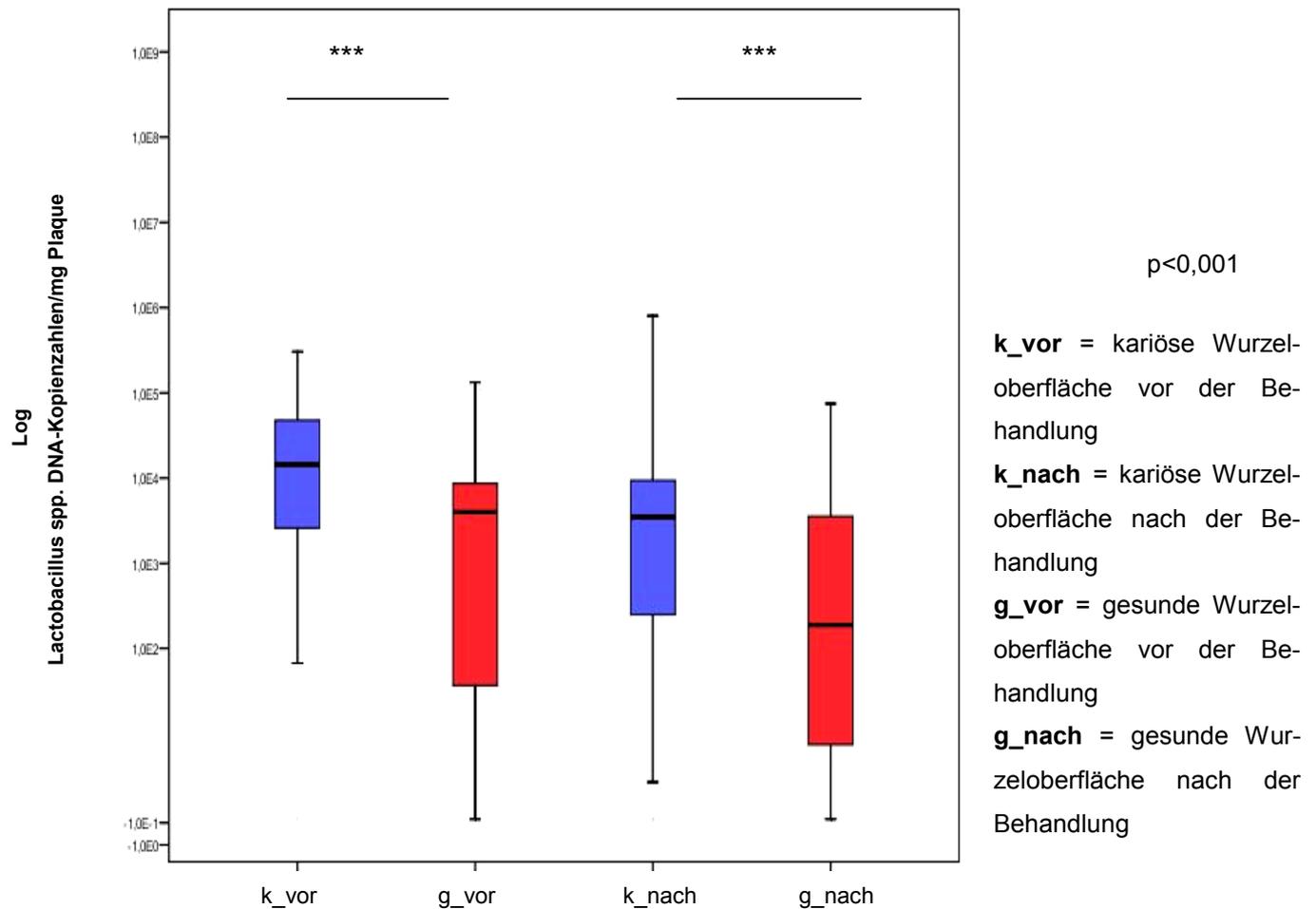


Abb. 16: *Lactobacillus* spp. Kopienzahlen/mg Plaque

Bei der Betrachtung der Abb. 16 kann man feststellen, dass auch für Laktobazillen höhere Keimzahlen/mg Plaque auf kariösen als auf gesunden Wurzeloberflächen nachgewiesen wurden. Der Unterschied zwischen der Keimzahl der kariösen und der

gesunden Wurzeloberflächen war sowohl vor als auch nach parodontologischer Behandlung statistisch signifikant ($p < 0,001$).

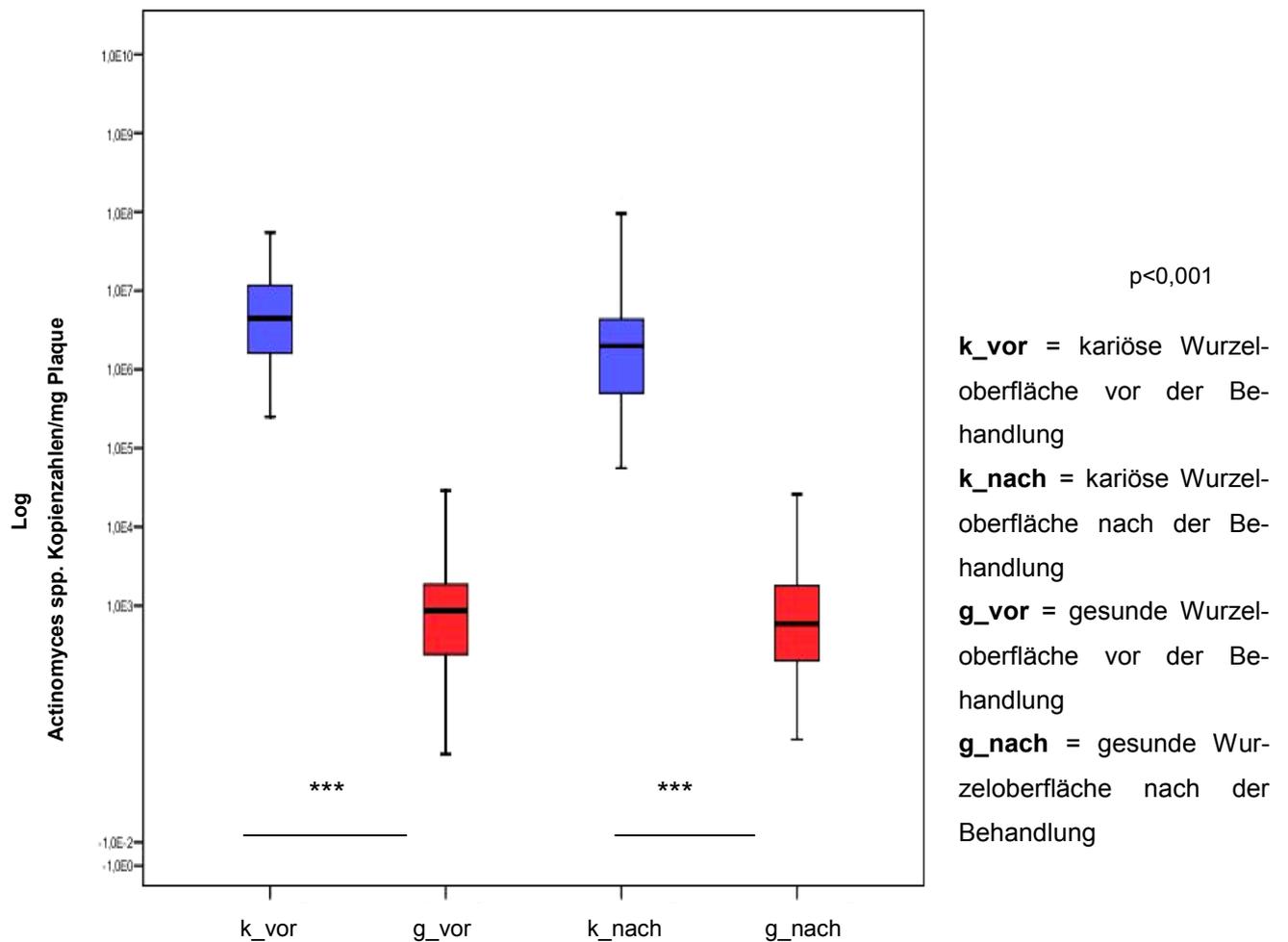


Abb. 17: *Actinomyces spp.* Kopienzahlen/mg Plaque

Auf den kariösen Wurzeloberflächen wurden auch im Falle von *Actinomyces spp.* höhere Keimzahlen als auf den gesunden Wurzeloberflächen nachgewiesen. Der Unterschied zwischen den Keimzahlen auf den kariösen und der auf den gesunden

Wurzeloberflächen war auch für *Actinomyces spp.* sowohl vor als auch nach parodontologischer Behandlung statistisch signifikant ($p < 0,001$).

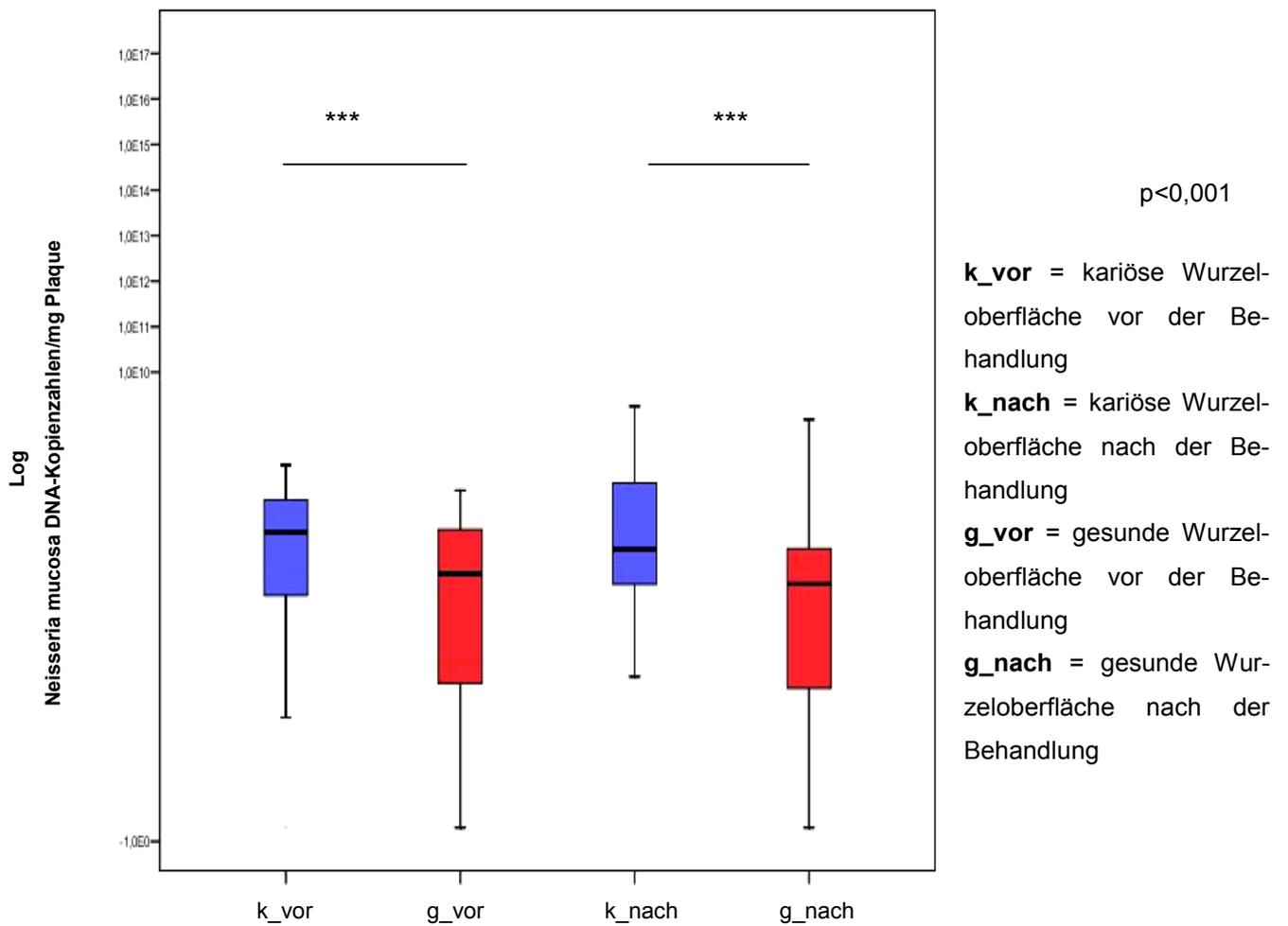


Abb. 18: *Neisseria mucosa* Kopienzahlen/mg Plaque

Auf den kariösen Wurzeloberflächen wurden auch im Falle von *N. mucosa* sowohl vor als auch nach parodontologischer Behandlung signifikant höhere Keimzahlen/mg Plaque als auf den gesunden Wurzeloberflächen festgestellt ($p < 0,001$).

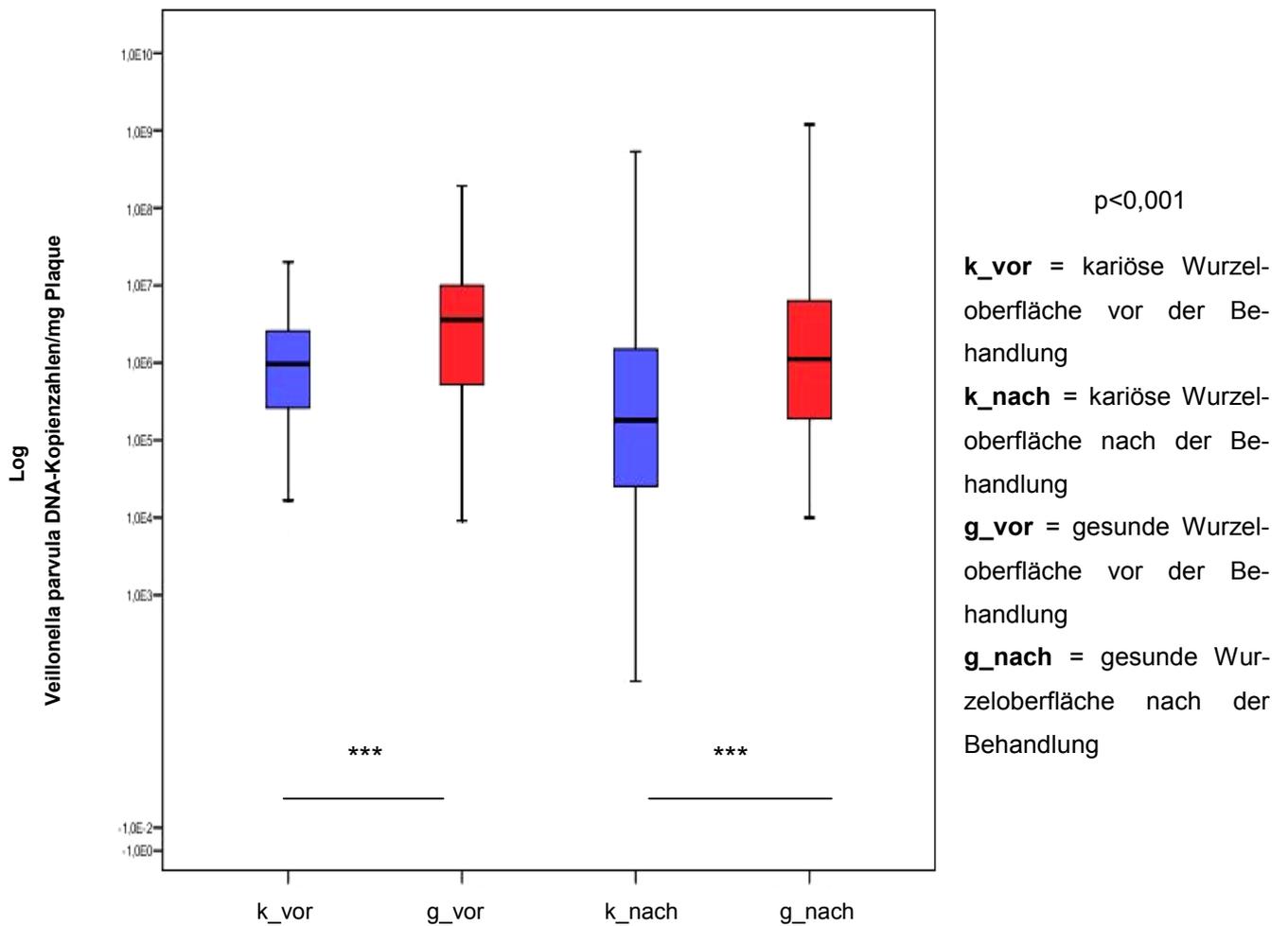


Abb. 19: *Veillonella parvula* Kopienzahlen/mg Plaque

Wie aus der Abb. 19 ersichtlich wird, wurden auf den gesunden Wurzeloberflächen (rote Box-Plots) höhere *V. parvula*-Kopienzahlen/mg Plaque als auf den kariösen Wurzeloberflächen nachgewiesen (blaue Box-Plots). Dieser Unterschied war sowohl vor als auch nach parodontologischer Behandlung statistisch signifikant ($p < 0,001$).

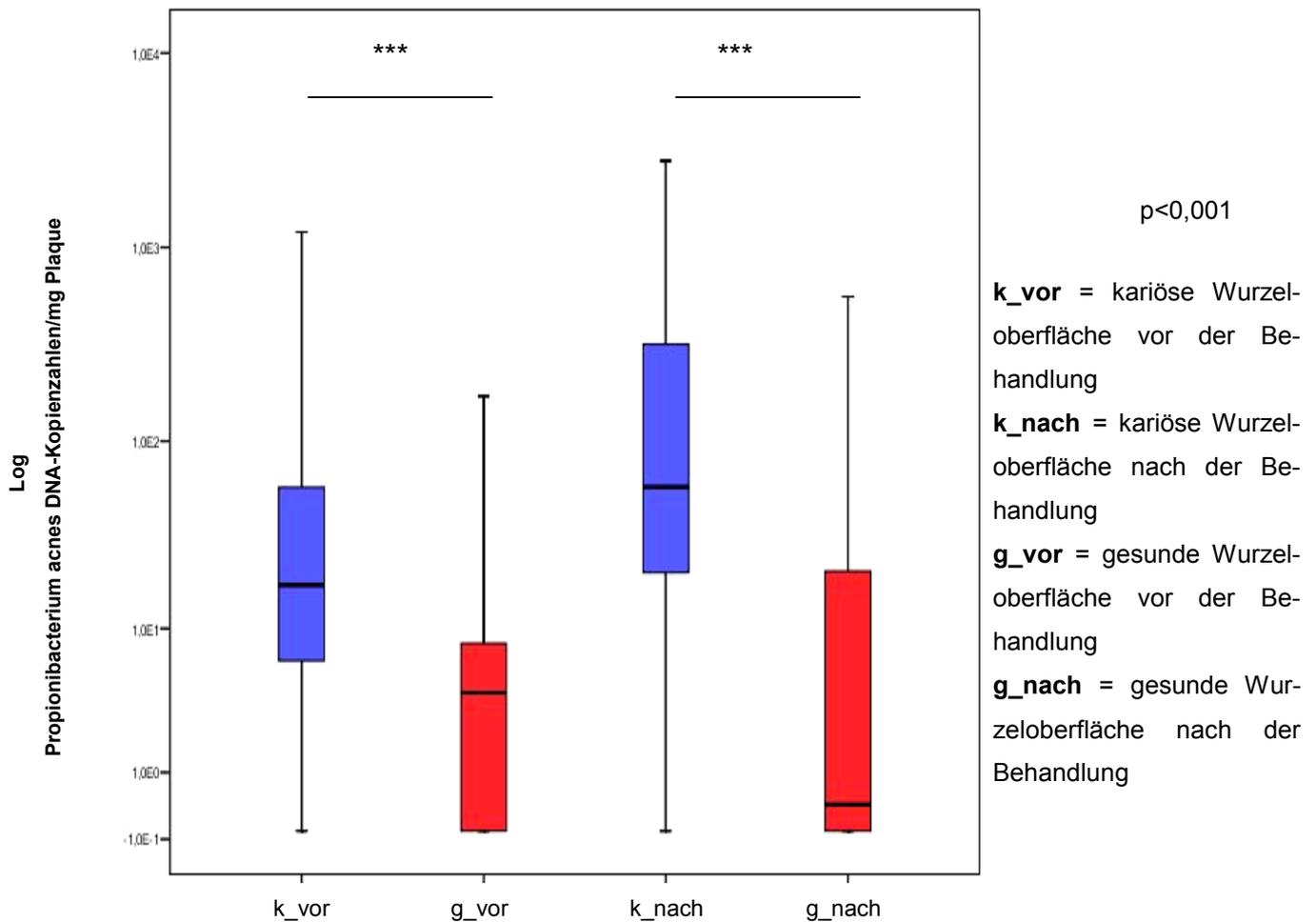


Abb. 20: *Propionibacterium acnes* Kopienzahlen/mg Plaque

Auf den kariösen Wurzeloberflächen wurden auch im Falle von *P. acnes* sowohl vor als auch nach parodontologischer Behandlung signifikant höhere Keimzahlen/mg Plaque als auf den gesunden Wurzeloberflächen festgestellt ($p < 0,001$).

Wie aus allen Abbildungen ersichtlich wird, ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Keimbesiedlung der kariösen (k/blaue Box-Plots) und der gesunden (g/rote Box-Plots) Wurzeloberflächen zu sehen, der sich als statistisch signifikant erwies ($p < 0,001$). Alle untersuchten Mikroorganismen, mit Ausnahme von *Veillonella parvula* wurden in größerer Anzahl (Kopienzahl DNA/mg Plaque) von den kariösen Wurzeloberflächen isoliert. *Veillonella parvula* wurde in größerer Anzahl (Kopienzahlen DNA/mg Plaque) auf gesunden Wurzeloberflächen gefunden.

5.2 Keimbesiedlung der Wurzeloberflächen vor und nach parodontologischer Behandlung abhängig von der Behandlungsmethode

Zuletzt sollte untersucht werden, inwieweit ein Unterschied in der Keimbesiedlung vor und zwei Monate nach parodontologischer Hauptbehandlung abhängig von der Behandlungsmethode besteht. Folgende Abbildungen zeigen den Vergleich (Differenz abgebildet als Box-Plot) zwischen der Mikroorganismenanzahl (Kopienzahl DNA/mg Plaque) vor und 2 Monate nach der Behandlung in Abhängigkeit von der Behandlungsmethode: Full-Mouth-Treatment (FMT), Full-Mouth-Disinfection (FMD) und konventionelle Therapie (Konv).

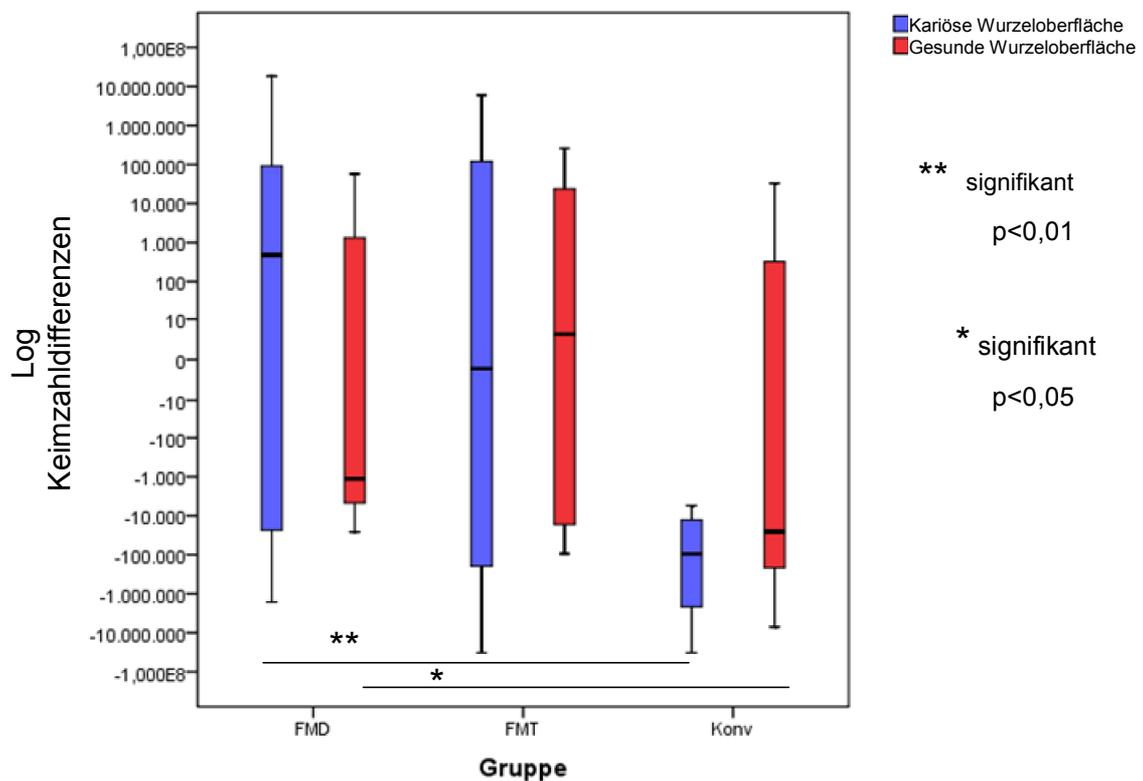


Abb. 21: Differenz vor und zwei Monate nach der Behandlung für *Parvimonas micra*

Die Graphik zeigt einen deutlichen Unterschied der Keimbesiedlungsdifferenzen zwischen der FMT- / FMD-Gruppe und der konventionellen Gruppe für *P. micra*. In der konventionellen Gruppe wurde eine generelle Keimreduzierung für *P. micra* beobachtet. Nach Durchführung des nichtparametrischen Tests nach Mann-Whitney

stellte sich dieser Unterschied als statistisch signifikant ($*p < 0,05$) für gesunde Wurzeloberflächen und ($**p < 0,01$) für kariöse Wurzeloberflächen heraus.

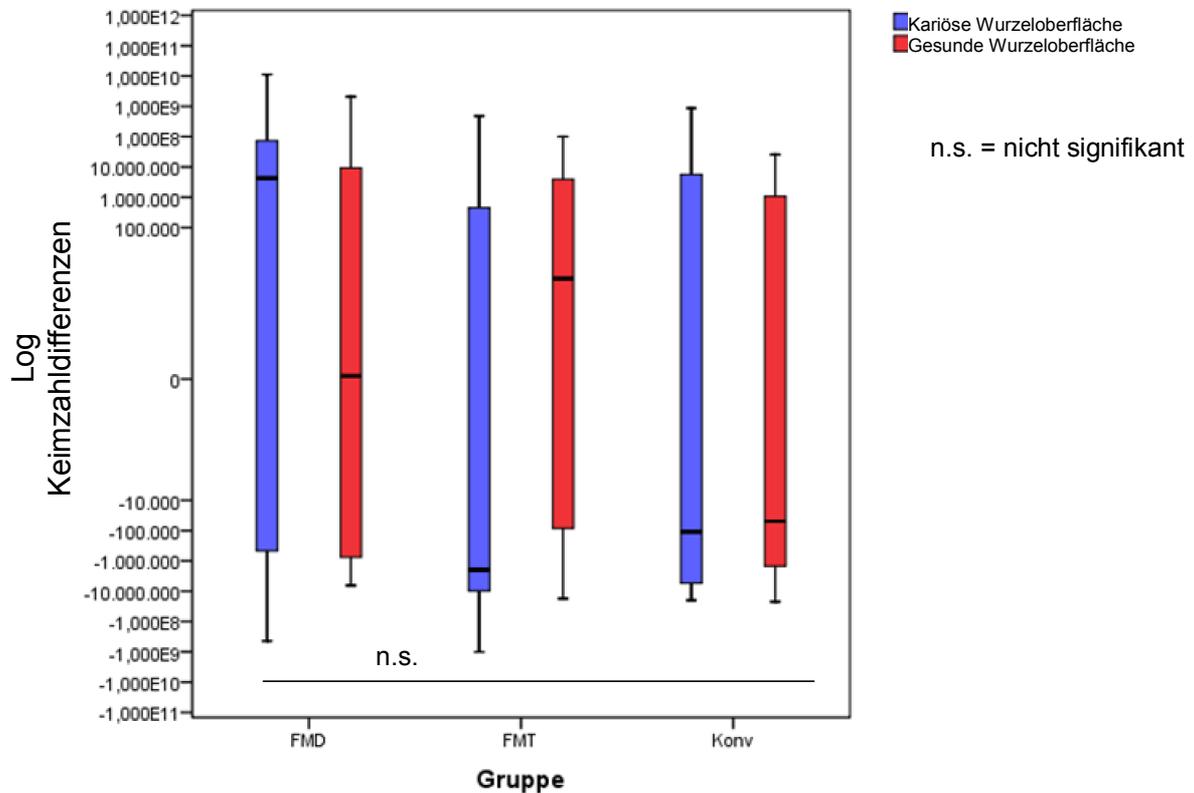


Abb. 22: Differenz vor und zwei Monate nach der Behandlung für *R. dentocariosa*

Im Gegensatz zu *P. micra* zeigte sich im Falle von *R. dentocariosa* kein signifikanter Unterschied in der Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen vor und zwei Monate nach der Behandlung, wenn man die drei verschiedenen Behandlungsmethoden miteinander verglichen hat (s. Abb. 22).

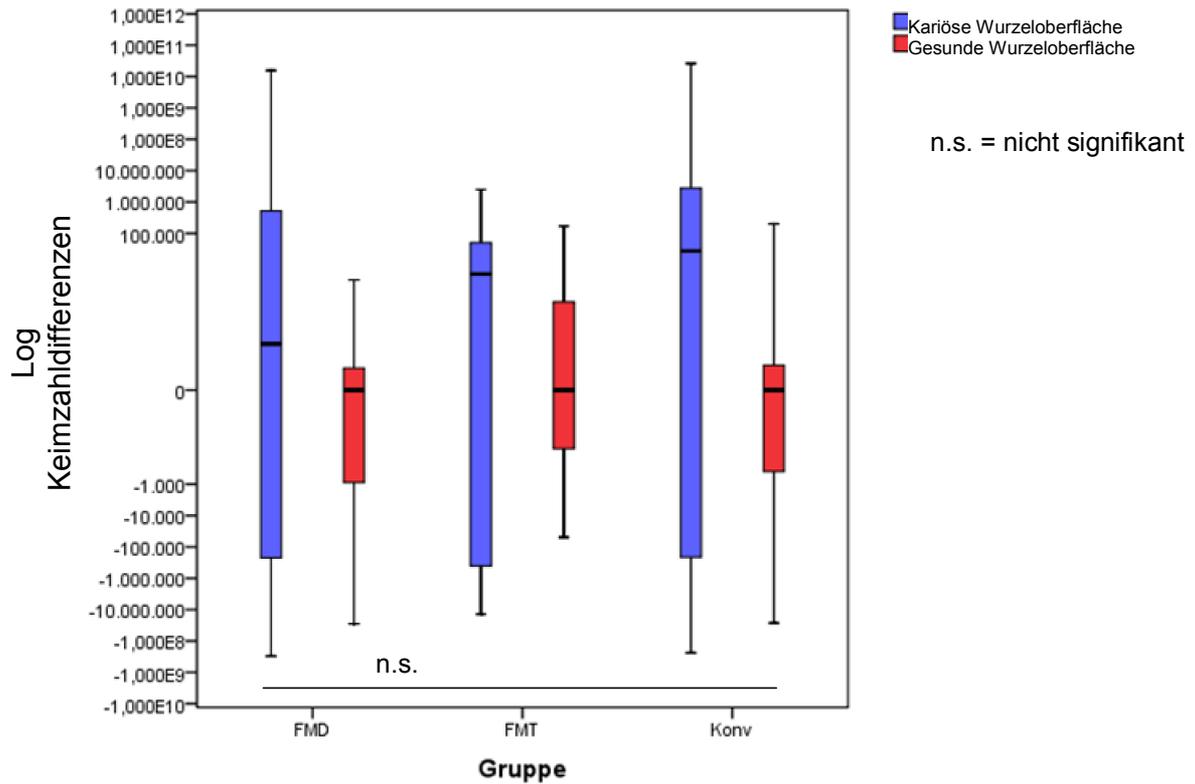


Abb. 23: Differenz vor und zwei Monate nach der Behandlung für *S. mutans*

Für *S. mutans* zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen vor und zwei Monate nach der Behandlung, wenn man die drei verschiedenen Behandlungsmethoden miteinander verglichen hat (s. Abb. 23).

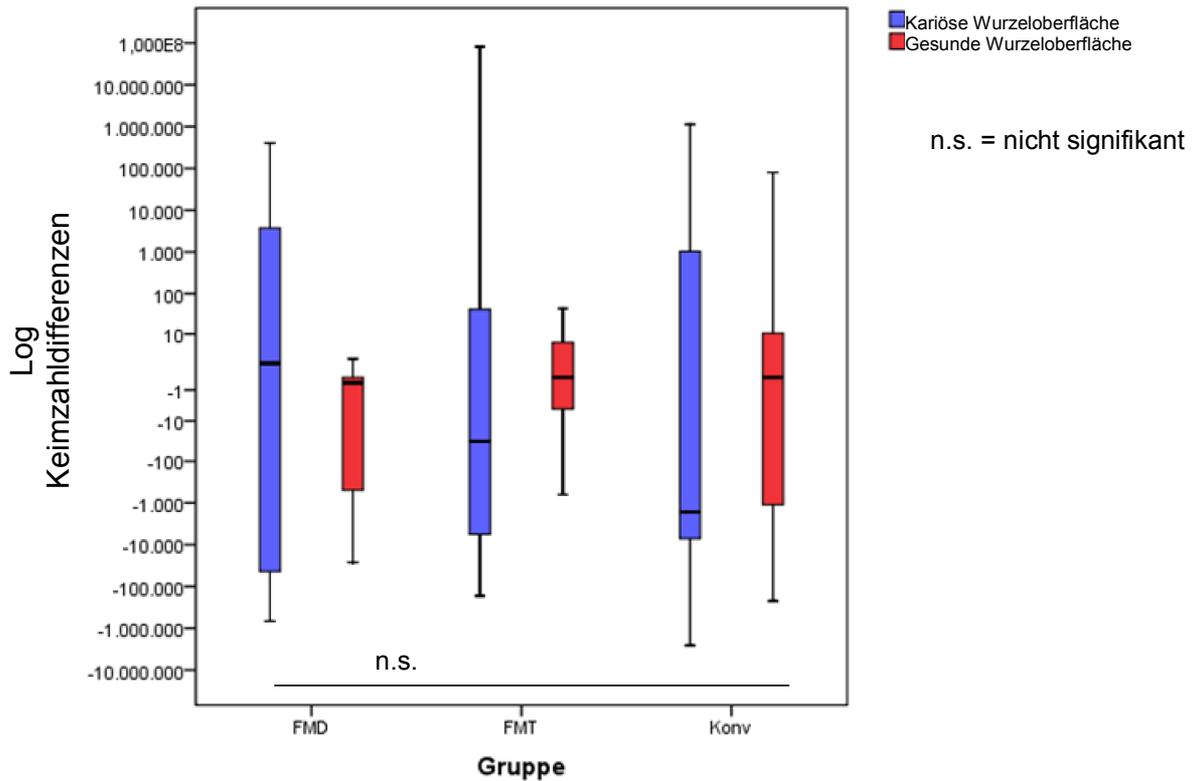


Abb. 24: Differenz vor und zwei Monate nach der Behandlung für *S. sobrinus*

Aus Abb. 24 wird ersichtlich, dass auch für *S. sobrinus* kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen in der Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen vor und zwei Monate nach der Behandlung besteht.

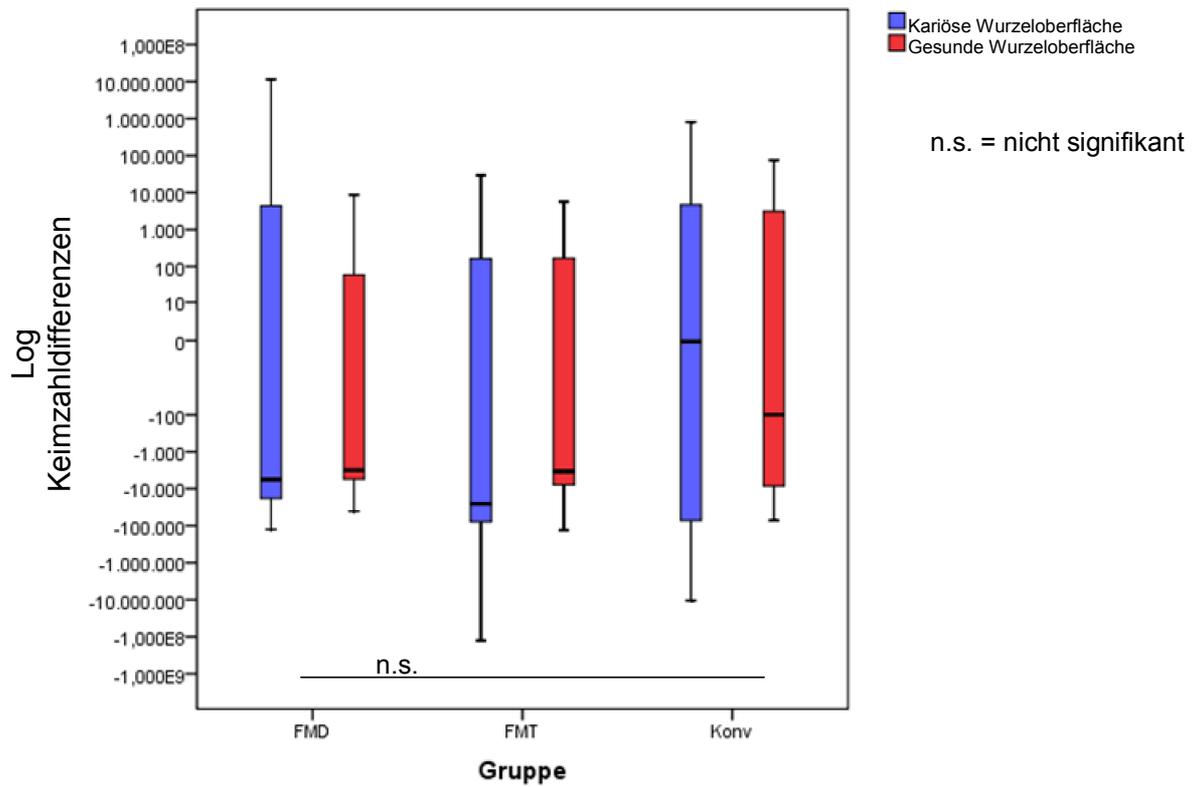


Abb. 25: Differenz vor und zwei Monate nach der Behandlung für *Lactobacillus spp.*

Im Vergleich der drei verschiedenen Behandlungsmethoden miteinander zeigte sich für *Lactobacillus spp.* ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen vor und zwei Monate nach der Behandlung.

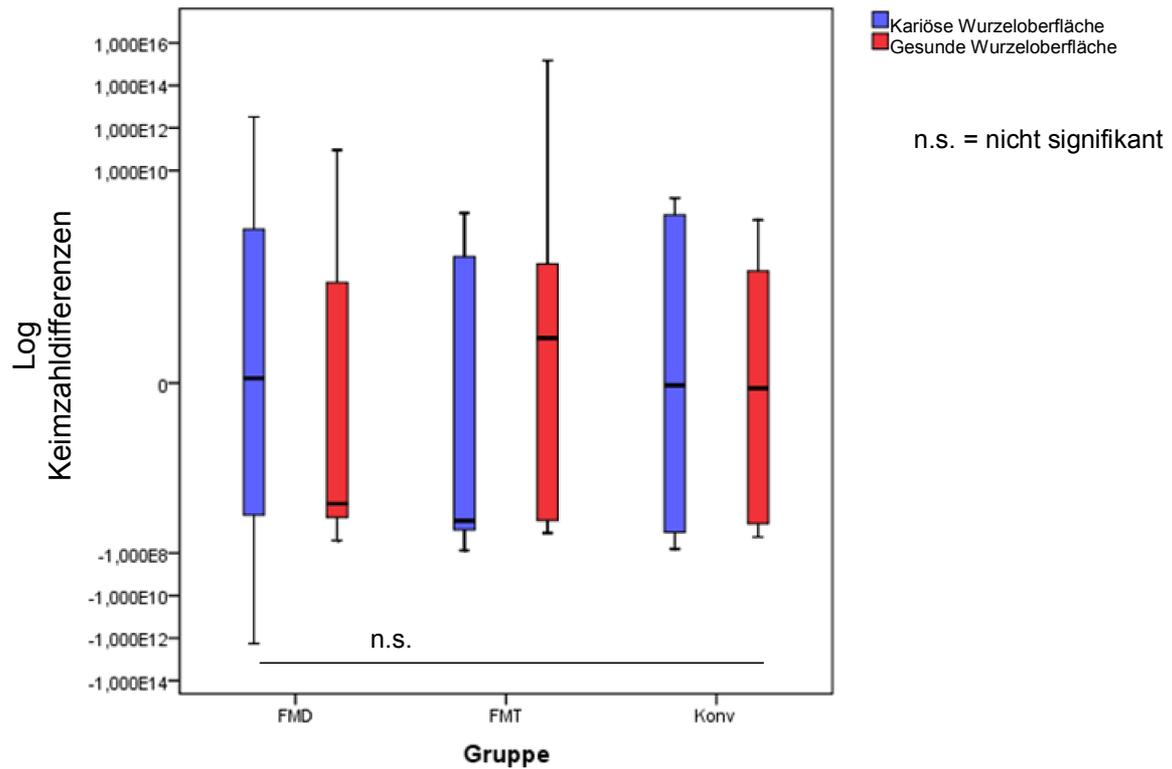


Abb. 26: Differenz vor und zwei Monate nach der Behandlung für *Neisseria mucosa*

Im Falle von *Neisseria mucosa* zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Keimbefestigung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen vor und zwei Monate nach der Behandlung, wenn man die drei verschiedenen Behandlungsmethoden miteinander verglichen hat (s. Abb. 26).

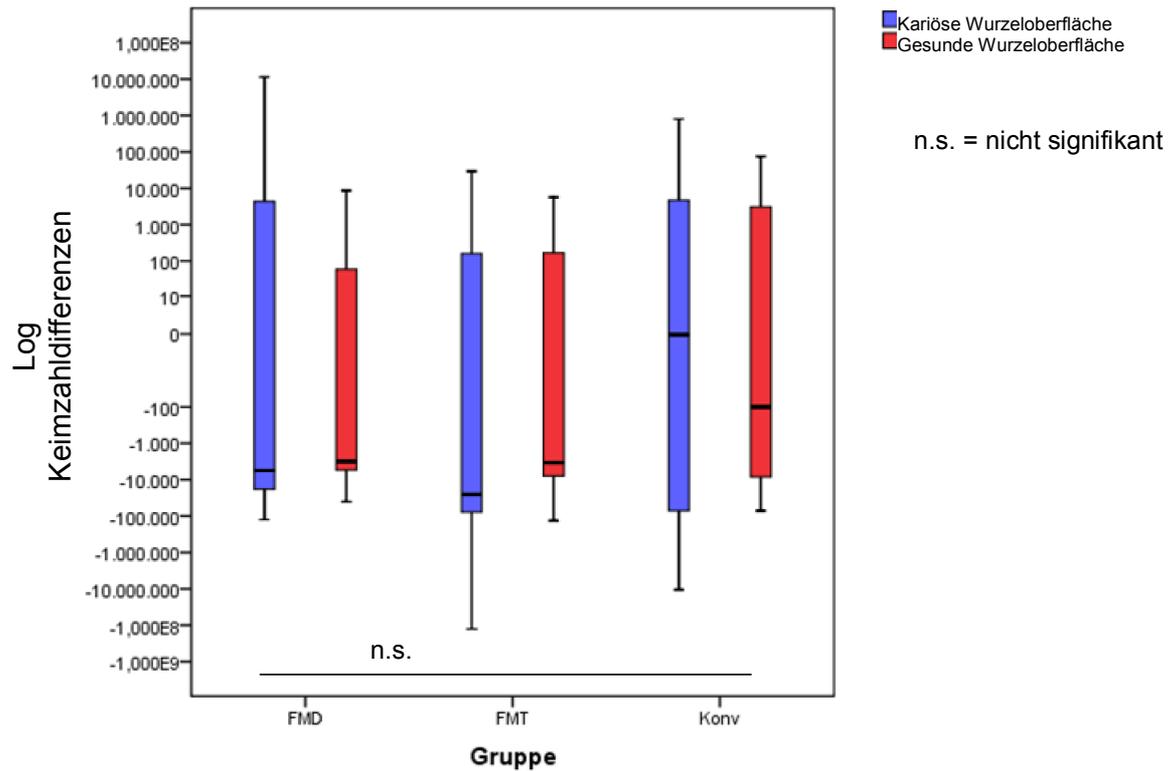


Abb. 27: Differenz vor und zwei Monate nach der Behandlung für *Actinomyces spp.*

Aus Abb. 27 wird ersichtlich, dass sich auch im Falle von *Actinomyces spp.* kein signifikanter Unterschied in der Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen vor und zwei Monate nach der Behandlung zeigte, wenn man die drei verschiedenen Behandlungsmethoden miteinander verglichen hat.

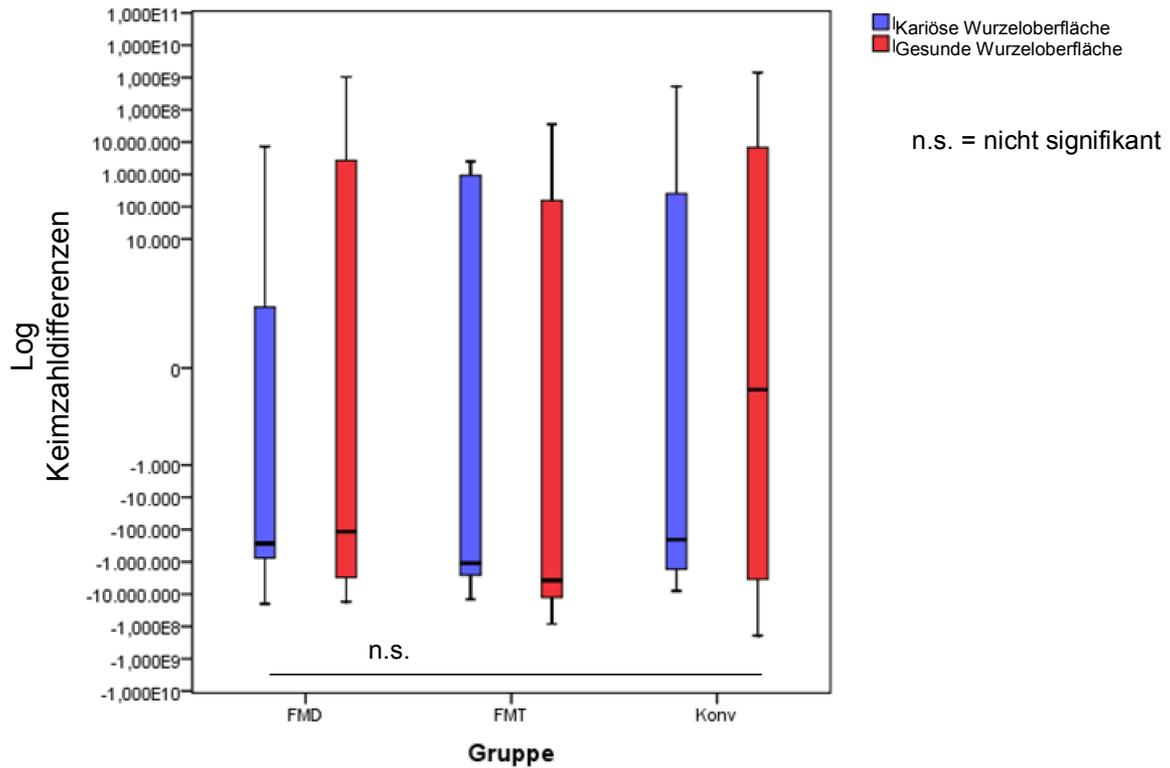


Abb. 28: Differenz vor und zwei Monate nach der Behandlung für *Veillonella parvula*

Für *Veillonella parvula* zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen vor und zwei Monate nach der Behandlung, wenn man die drei verschiedenen Behandlungsmethoden miteinander verglichen hat (s. Abb. 28).

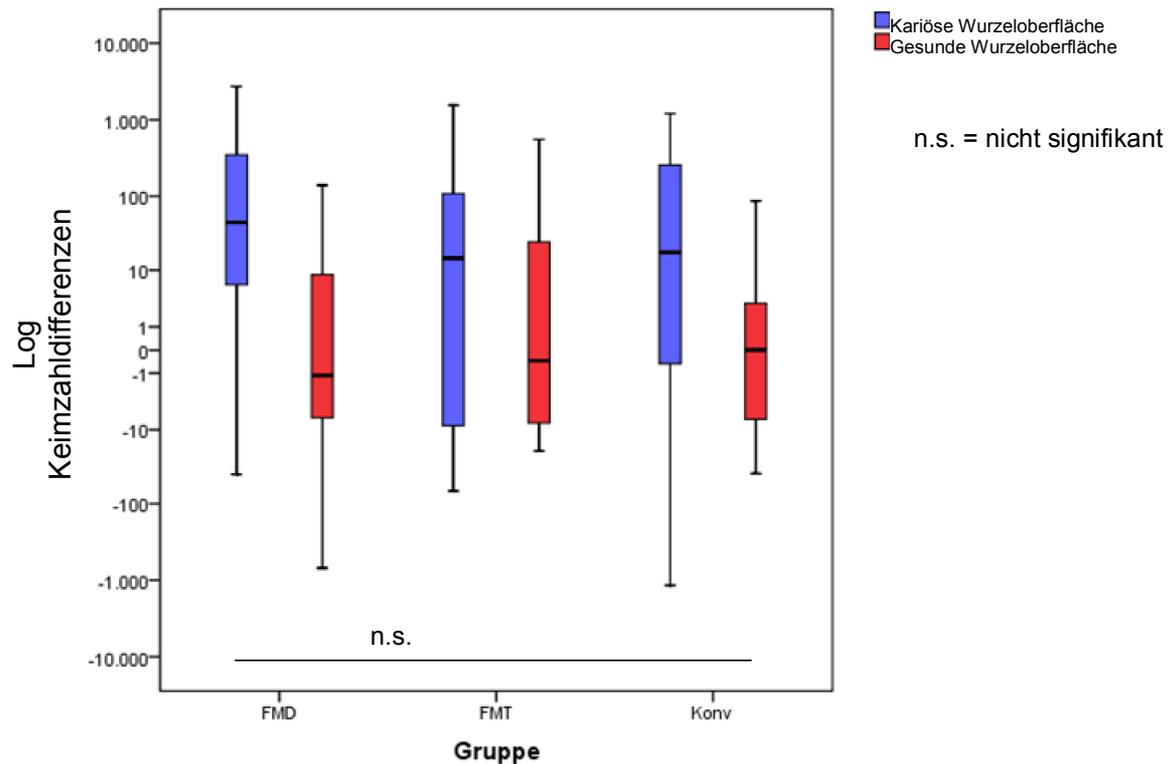


Abb. 29: Differenz vor und zwei Monate nach der Behandlung für *Propionibacterium acnes*

Auch im Falle von *Propionibacterium acnes* zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen vor und zwei Monate nach der Behandlung, wenn man die drei verschiedenen Behandlungsmethoden miteinander verglichen hat (s. Abb. 29).

6 Diskussion

6.1 Probanden und Methoden

Bei der Auswahl der 54 Probanden wurde auf eine ausgewogene Beteiligung von männlichen und weiblichen Teilnehmern in jeder Gruppe Wert gelegt. Außerdem wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der Raucher in die drei verschiedenen Behandlungsgruppen geachtet.

Das Alter der Teilnehmer umfasste einen Bereich von 30 bis 74 Jahre. Ähnliche Altersverteilungen wurden auch in anderen Untersuchungen zur Wurzelkaries beschrieben [12, 56, 82, 83, 86, 93, 94].

Die Studienteilnehmer stammten aus einem Patientenpool mit fortgeschrittener chronischer Parodontitis, ähnlich wie in anderen Studien zur Wurzelkaries, die auch Parodontitispatienten untersuchten [11, 13, 38, 47, 79, 82, 84-86, 95].

In dieser Arbeit wurde als Studienaufbau das Split-mouth-Design gewählt. Das Vorkommen paariger oder multipler Organe (Kiefer, Quadranten, Zähne) und der chronische Verlauf vieler Erkrankungen im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich legt die Anwendung von Split-mouth-Versuchsanlagen in der Zahnmedizin nahe. Mit dem Split-mouth-Design wird ein Versuchsmodell beschrieben, in dem bei jedem Probanden zwei oder mehrere Untersuchungen/Behandlungen vorgenommen werden, die jeweils gesonderte Teilabschnitte der Mundhöhle in Anspruch nehmen. Dadurch ermöglicht ein Split-mouth-Design den Vergleich verschiedener Therapieformen, wobei die durch Versuchspersonen bedingten Unterschiede eliminiert werden. Durch vergleichende Studien am selben Patienten kann die Irrtumsvarianz im Gegensatz zu Studien, die verschiedene Versuchspersonen miteinander vergleichen, reduziert werden. Dies resultiert in einer Erhöhung der statistischen Trennschärfe und führt damit zu einer geringeren Anzahl an benötigten Probanden. Als Nachteil dieses Studiendesigns kann die gegenseitige Beeinflussung der Stichproben angesehen werden, die bei einem Paralleldesign nicht der Fall wäre. [96]

Somit wurden bei jedem Probanden unserer Studie eine kariöse (Initialläsion) und eine gesunde freiliegende Wurzeloberflächen untersucht. Der Vorteil dieses Versuchsaufbaus in Untersuchungen zur Karies besteht darin, dass jeder Patient auch

als eigene Kontrolle dient und dass Faktoren wie Speichel, Mundhygiene und Ernährung, die bei der Kariesentstehung eine bedeutende Rolle spielen, gleich bleiben.

Die Plaqueproben wurden von den freiliegenden Wurzeloberflächen mittels einer Gracey-Kürette entnommen. In anderen Untersuchungen konnte man sowohl gleiche Verfahren der Plaqueentnahme [7, 59, 63, 82] als auch andere Methoden wie z. B. die Plaqueentnahme mittels Holzkeilen [83, 86, 93, 94] oder Papierspitzen [7, 8, 78, 79] feststellen. Wir entschieden uns für die Plaqueentnahme mittels Gracey-Küretten, weil wir in den Ausgangsuntersuchungen beobachtet haben, dass man damit die Plaque viel kontrollierter und gezielter entnehmen kann als mittels Keilen oder Papierspitzen.

Von jedem Patienten wurden sowohl zur Baseline als auch zwei Monate nach parodontaler Hauptbehandlung zwei Plaqueproben untersucht, ähnlich wie in anderen Untersuchungen, die sich mit den Mikroorganismen, die an der Wurzelkaries beteiligt sind, beschäftigt haben [15, 22, 83, 94].

Die parodontale Hauptbehandlung wurde abhängig von der Patientengruppe folgendermaßen durchgeführt: FMT (Full-Mouth-Therapie), also Scaling und Root-Planning (SRP) innerhalb von 24 Stunden ohne Chlorhexidinanwendung (CHX), FMD (Full-Mouth-Disinfection) mit SRP innerhalb von 24 Stunden mit CHX-Anwendung und konventionelle Therapie im Sinne von Scaling und Root-Planning zweier Quadranten in einer Sitzung, in einem einwöchigen Abstand.

In anderen Untersuchungen erfolgte die Hauptbehandlung ähnlich wie in unserer Studie, mit einigen Ausnahmen bezüglich der konventionellen Behandlung, die quadrantenweise in einem einwöchigen Abstand durchgeführt wurde und der FMD-Gruppe, in der die verwendeten CHX-Präparate verschiedene Konzentrationen aufwiesen [83, 86, 93, 94].

6.2 Methoden zur Bestimmung der Mikroorganismenzahl

Die meisten mikrobiologischen Untersuchungen der Wurzelkaries basierten bis vor kurzer Zeit auf kulturellem Nachweis der beteiligten Mikroorganismen. Die Anfang der sechziger Jahre durchgeführten Studien konzentrierten sich auf die Rolle, die grampositive filamentöse Bakterien, vor allem *Actinomyces spp.* bei der Wurzelkaries spielen. Aktinomyzeten wurden als erste Mikroorganismen mit der Entstehung der Wurzelkaries in Verbindung gebracht, so dass die in den Untersuchungen

verwendeten Kulturmedien auf das Wachstum von Aktinomyzeten ausgerichtet wurden [4-6]. In nachfolgenden Studien wurde jedoch berichtet, dass *Streptococcus mutans* und *Lactobacillus spp.* zu den bedeutenden Bestandteilen der Mikroflora der Wurzelkaries gehören [52-54]. Somit wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen ausschließlich Nährmedien für *S. mutans* und Laktobazillen benutzt wurden [6, 9, 10, 12, 52]. Eine umfangreiche Längsschnittstudie in Kanada zeigte, dass, obwohl keine direkte Korrelation zwischen speziellen Bakterien und Wurzelkaries gefunden wurde, an den Stellen, wo sich *Streptococcus mutans* und Laktobazillen auf der Oberfläche befanden, sich später eine kariöse Läsion entwickelte [54].

Erstmals gelang es Brown et al. 1986 mit Hilfe von Selektivmedien nachzuweisen, dass die Mikroflora der Wurzelkaries komplexer ist als bis dahin berichtet. Sie bezogen die Spezies *Rothia spp.*, *Neisseria spp.* und *Propionibacterium* in ihre Betrachtung und Beurteilung als Keime der Mikroflora der Wurzelkaries mit ein, eine exakte Quantifizierung dieser Spezies gelang ihnen jedoch nicht [10].

Einer der wichtigsten Nachteile der Identifizierungsmethode von Mikroorganismen mittels Kulturverfahren ist die Tatsache, dass sie mit systematischen Fehlern einhergeht wie z. B. dem ungenauen Nachweis oder sogar der Nichtidentifizierung von schwer kultivierbaren Mikroorganismen, wie obligat anaeroben Bakterien oder solchen, die komplizierte Selektivmedien brauchen um zu wachsen. Ein anderer wesentlicher Nachteil der kulturellen Diagnostik ist die Zeit, die für die Kultivierung benötigt wird, und die ausreichende Menge eines Pathogens, um einen diagnostischen Nachweis zu ermöglichen [57].

Neuere Diagnostikmethoden basieren meist auf dem kulturunabhängigen Nachweis von Bakterien. Eine der molekularbiologischen Methoden, die einen besonderen Aufschwung erfahren hat, ist die PCR [77]. Die wichtigsten Anwendungen der PCR liegen in der medizinischen Diagnostik. Mit Hilfe weniger Tropfen Blut, einer Gewebeprobe oder weniger Zellen einer Bakterienkolonie, lässt sich nachweisen, ob eine bestimmte, krankheitsassoziierte DNA-Sequenz vorhanden ist. So stellt die PCR auch beim Nachweis von Krankheitserregern eine Alternative zur kulturellen Anzucht dar [91].

Die konventionelle PCR brachte für die Laborzeit zwar wesentliche Erleichterungen, zugleich war jedoch ein hoher Zeit- und Arbeitsaufwand für die Nachanalytik erforderlich, insbesondere wenn (semi)quantitative Angaben über die

nachgewiesenen Keime erfolgen sollten. Um das Automatisierungsniveau zu erhöhen und eine Identifizierung der Pathogenlast in einer Probe zu ermöglichen, versuchte man deshalb, einen homogenen Assay zu entwickeln, bei dem Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß online verfolgt werden konnte. Der TaqMan PCR Assay, bei dem die Zunahme des PCR-Produktes mit der Zunahme des freierwerdenden Fluorophors aus dem Sondenabbau einhergeht, erfüllt diese Anforderungen. Mit Hilfe simultan amplifizierter DNA-Standards lässt sich bei der Real-Time PCR eine Standardkurve erstellen, die eine akkurate Bestimmung der Konzentration einer unbekannt Probe in Echt-Zeit erlaubt. Die Real-Time PCR hat sich somit in wenigen Jahren zu einer der wichtigsten Analysetechniken von biologischem Material entwickelt. Mittlerweile bildet sie den Standard in der molekularbiologischen Forschung, bei angewandten Testverfahren und in der molekularen Diagnostik [91]. Die weiteren Vorteile der Real-Time PCR gegenüber der konventionellen PCR sind, wie oben bereits erwähnt, neben der erheblichen Zeitersparnis und dem Wegfall der Nachanalytik, die Reduktion der Probenkontamination während der Vorbereitung durch lediglich einen Pipettierschritt, der speziesspezifische Nachweis eines Erregers, eine Quantifizierung der nachgewiesenen Genomäquivalente und somit die Berechnung der Keimzahl in einer Patientenprobe.

In der Zahnmedizin wird die Real-Time PCR zum Nachweis der Karies- und Parodontitisleitkeime erfolgreich angewendet [59]. In der Fachliteratur wurden sowohl universelle als auch speziesspezifische Primer beschrieben, mit Hilfe derer einige Mikroorganismen wie *Actinomyces spp.*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus spp.*, *Parvimonas micra* und *Veillonella parvula* in der Plaque auf kariösen Läsionen nachgewiesen wurden [8, 78-81].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Real-Time PCRs entwickelt, die die Möglichkeit bieten *Actinomyces spp.*, *Rothia dentocariosa* und *Neisseria mucosa* sowohl zu detektieren als auch zu quantifizieren.

Die Herausforderung bei der Entwicklung dieser Real-Time PCRs bestanden zunächst darin, geeignete Primer und Sonden zu finden, die speziesspezifisch an die jeweilige DNA hybridisierten. Als Zielgen für den Nachweis der o. g. Mikroorganismen wurde die 16S rDNA benutzt. Mit Hilfe des Computerprogramms „Primer Express“ wurden Primer und Sonden ermittelt. Diese zeigten sich in

multiplen Tests auf Kreuzreaktivität und Homologien mit anderen Spezies für die Real-Time PCRs als geeignet, da sie jeweils spezifisch für den entsprechenden Erreger waren. Der Nachweis des humanen *gapdh*-Gens wurde als Positivkontrolle für die Güte von Probenmaterialien und die Abwesenheit von Inhibitoren eingesetzt. Mit Hilfe klonierter Amplifikate als Standards war die Quantifizierung der untersuchten Mikroorganismen in dem Patientenmaterial möglich. Da bei der Real-Time PCR zur Detektion keine Nachanalyse mit Hilfe der Gelelektrophorese benötigt wird, war es möglich, die Ergebnisse innerhalb weniger Stunden zu erhalten.

Somit lässt sich sagen, dass es sich durchaus lohnt, eine Real-Time PCR als Alternative zur kulturellen Anzucht im Nachweis oraler Mikroorganismen einzusetzen. Diese noch oft als „bakteriologischer Goldstandard“ beschriebene Methode der Diagnostik mittels Kulturmedien ist jedoch sehr arbeits- und zeitaufwendig. Zudem zeigen Studien, die kulturelle und PCR-gestützte Nachweise von oralen Mikroorganismen aus Patientenmaterial vergleichen, dass die PCR der Kultur im Hinblick auf die Sensitivität meist überlegen ist [62, 63].

Ein limitierender Faktor für den Einsatz einer Real-Time PCR könnte jedoch der höhere finanzielle Aufwand gegenüber dem kulturellen Nachweis sein. Betrachtet man allerdings den großen zeitlichen Vorsprung, den man mit der Real-Time PCR in der Diagnostik gewinnt, könnten somit in Laboratorien an anderen Stellen Kosten gespart werden.

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen

Die erste Fragestellung dieser Arbeit war es, die an der Wurzelkaries beteiligten Mikroorganismen wie *Actinomyces spp.*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* und *Lactobacillus spp.* sowie andere Mikroorganismen, deren Beteiligung an der Wurzelkaries noch nicht eindeutig sichergestellt wurde, wie *Rothia dentocariosa*, *Neisseria mucosa*, *Veillonella parvula*, *Parvimonas micra* und

Propionibacterium acnes mittels einer kulturunabhängigen, molekulargenetischen Technik, der Real-Time PCR, zu identifizieren und in ihrer Anzahl zu quantifizieren.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass Mikroorganismen wie *Actinomyces spp.*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* und *Lactobacillus spp.* in signifikant höherer Anzahl von kariösen freiliegenden Wurzeloberflächen isoliert werden als von gesunden Wurzeloberflächen. Viele vorausgegangene Studien, die mittels traditionellen Nachweismethoden diese Bakterien untersuchten, setzten die Beteiligung dieser Spezies eng mit der Entstehung der Wurzelkaries in Verbindung [4, 5, 7-9, 12-14, 18, 22, 26, 49, 52, 54, 55, 65, 97, 98]. Außerdem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit auch, dass Spezies wie *Rothia dentocariosa*, *Parvimonas micra*, *Neisseria mucosa* und *Propionibacterium acnes* von kariösen Wurzeloberflächen häufiger und in signifikant höherer Anzahl isoliert werden als von gesunden Wurzeloberflächen. Diese Mikroorganismen wurden in vorausgegangenen Studien, die sich auf dem kulturellen Nachweis beschränkten, nicht eindeutig mit der Entstehung oder dem Vorhandensein einer Wurzelkaries in Verbindung gesetzt, weil ihre Nachweishäufigkeit und Anzahl mittels dieser Verfahren gering waren [10, 15, 99].

Im Gegensatz zu der eher geringen Nachweishäufigkeit der o. g. Spezies auf intakten Wurzeloberflächen wurde die Spezies *Veillonella parvula* in signifikant höherer Anzahl von gesunden Wurzeloberflächen isoliert. Dies bestätigt die Ergebnisse vorausgegangener Arbeiten, welche die Besiedlung gesunder Wurzel- und Zahnoberflächen mit *Veillonella spp.* kulturell untersuchten und diese Tatsache auf die Eigenschaft dieser Spezies Lactat zu verstoffwechseln und somit den Säureangriff auf die Zahnhartsubstanz zu reduzieren, zurückführten [14, 55, 56].

In der Fachliteratur sind nur wenige Studien beschrieben, die mit Hilfe der Real-Time PCR kariogene Mikroorganismen untersuchten. Einige dieser Mikroorganismen (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus spp.* und *Actinomyces spp.*) wurden mittels Real-Time PCR aus kariösen Läsionen im Bereich der Zahnkronen isoliert und quantifiziert [57-60, 62, 63, 78, 90, 97]. Yoshida et al. [60] konnten in der Plaque von 10 Patienten mit kariösen Läsionen im Bereich der Zahnkronen mittels Nachweis der *S. mutans*- und *S. sobrinus*-spezifischen Glucosyltransferasegene wie *gtfB* und *gtfT* in der Real-Time PCR jeweils Kopienzahlen von $0-4,82 \times 10^6$ Kopien/mg Plaque für *S. mutans* und von $0-4,76 \times 10^6$ Kopien/mg Plaque für *S. sobrinus* finden. In der

vorliegenden Arbeit wurden in der Plaque auf kariösen Wurzeloberflächen für *S. mutans* zwischen $0-3 \times 10^8$ Kopienzahlen/mg Plaque und für *S. sobrinus* zwischen $0-2,6 \times 10^6$ Kopienzahlen/mg Plaque gefunden. Wenn man die Ergebnisse miteinander vergleicht, ist festzustellen, dass *S. sobrinus* in ähnlicher Kopienzahl/mg Plaque zu finden war, bei *S. mutans* jedoch 100x mehr Keime in den Proben der vorliegenden Studie detektiert wurden. Dieser Unterschied mag zum einen darin begründet liegen, dass die Plaqueentnahmestellen (Krone vs. Wurzel) verschieden waren, regionale/kulturelle Unterschiede (asiatische vs. europäische Bevölkerung) bestehen mögen und dass die Patientenzahl in der vorliegenden Arbeit deutlich größer war (54 vs. 10 Patienten).

Buyn et al. [63] untersuchten 65 Zähne mit fortgeschrittenen kariösen Läsionen im Bereich der Kronen. Das untersuchte Material war jedoch nicht Plaque, sondern kariöses Dentin und die zu untersuchende Mikroflora beschränkte sich auf *Lactobacillus spp.* Die Quantifizierung erfolgte in Kopienzahlen/mg kariösem Dentin. Es wurden dort zwischen $10^4-1,4 \times 10^8$ Kopien an Laktobazillen/mg kariösem Dentin gefunden. Unter Einsatz der gleichen Primer und Sonden konnten wir in den Plaqueproben von kariösen Wurzeloberflächen ähnliche Werte finden und zwar zwischen $0-10^8$ Laktobazillen-Kopienzahlen/mg Plaque.

Martin et al. [62] untersuchten an 65 kariösen vitalen Zähnen die anaerobe Mikroflora inklusive *Parvimonas micra*. Das untersuchte Material war auch hier kariöses Dentin. Für *P. micra* wurden Kopienzahlen zwischen $0-1,6 \times 10^7$ /mg kariösem Dentin gefunden. Unsere Untersuchung zeigte ähnliche Ergebnisse und zwar zwischen $0-3,2 \times 10^7$ Kopienzahlen/mg Plaque, obwohl wir eine andere Region der 16S rDNA amplifiziert, und die bakterielle DNA nicht aus kariösem Dentin sondern aus Plaque extrahiert haben.

Suzuki et al. [59] untersuchten in der supragingivalen Plaque von 5 Patienten u. a. die Anzahl von *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Actinomyces naeslundii* und *viscosus*. Die Plaqueproben wurden von fünf gesunden Oberkiefermolaren entnommen und ähnlich wie in unserer Studie in PBS suspendiert. Aus den Plaqueproben wurde keine DNA extrahiert, sondern es wurde direkt die Plaqueprobe als Template in die TaqMan PCR eingesetzt. Es wurden folgende Kopienzahlen/mg Plaque beobachtet: für *S. mutans* zwischen $0-1,25 \times 10^4$, für *S. sobrinus* zwischen $2,02 \times 10-1,08 \times 10^5$, für *Actinomyces naeslundii* zwischen $0-5,27 \times 10^5$ und für *Actinomyces viscosus* zwischen

0-1,45x10⁷. In unseren Untersuchungen waren die Kopienzahlen/mg Plaque die von gesunden Wurzeloberflächen isoliert wurden um das 1000fache höher für *S. mutans* (0-2,86x10⁷), wohingegen für *S. sobrinus* geringfügig niedrigere Werte gemessen wurden (0-7,14x10⁴Kopienzahlen/mg Plaque). Bei den Aktinomyzeten fanden wir bis zu 2,89x10⁴ Kopienzahlen/mg Plaque, wobei man berücksichtigen muss, dass wir eine genus- und nicht spezies-spezifische Real-Time PCR benutzt haben.

Wie schon eingangs erwähnt, existierten vor Beginn dieser Studie keine publizierten Untersuchungen, die mittels Real-Time PCR speziell die Mikroflora der Wurzelkaries analysiert hätten. Eine einzige Studie ist bis de dato publiziert worden, die mittels konventioneller PCR die Zusammensetzung der Mikroflora aus der Plaque von kariösen und gesunden Wurzeloberflächen untersuchte. In dieser Studie wurden insgesamt 21 ältere Heimbewohner (Alter ≥ 82 Jahre) mit Wurzelkaries untersucht [100]. Die untersuchten kariösen Wurzeloberflächen wurden als „weich“ oder „lederartig“ definiert. Es wurden also keine freiliegende Wurzeloberflächen untersucht, die so gesehen „nur“ Initialläsionen aufwiesen. Die Plaqueproben wurden, wie in der vorliegenden Arbeit, mit Hilfe von sterilen Gracey-Küretten aus dem supragingivalen Bereich von gesunden und kariösen freiliegenden Wurzeloberflächen entnommen. Bis zu der mikrobiologischen Aufbereitung wurden auch hier die Proben bei -80 °C eingefroren. Obwohl die molekularbiologische Untersuchung mittels konventioneller PCR nicht quantifizierbar war, zeigte diese Studie ähnliche Ergebnisse wie die im Rahmen unserer Arbeit erhobenen Befunde: es bestand eine signifikant höhere Nachweishäufigkeit von *Actinomyces spp.*, *Lactobacillus spp.*, *S. mutans* und *Propionibacterium spp.* in der Plaque auf den kariösen Wurzeloberflächen im Vergleich zu den gesunden Wurzeloberflächen. Andere Mikroorganismen, die in dieser Studie nachgewiesen wurden, wie *Olsenella spp.*, *Prevotella multisaccharivorax* und *Selenomonas spp.* kamen nur in sehr geringen Anteilen auf den kariösen Wurzeloberflächen vor [100].

Ein wichtiger Aspekt bei der Quantifizierung mittels Nachweis der 16S rDNA ist die Tatsache, dass man nicht davon ausgehen kann, dass jede Spezies die gleiche Anzahl an 16S rDNA Kopien pro Genom hat, obwohl einige Autoren wie Lyons et al. [101] diese Tatsache in ihren Untersuchungen nicht berücksichtigt haben. In unserer Recherche zu den 16S rDNA Kopien pro Genom, haben wir feststellen können, dass die meisten der untersuchten Spezies (*P. micra*, *S. mutans*, *Lactobacillus spp.*,

Actinomyces spp., *N. mucosa* und *P. acnes*) zwischen 3-5 16S rDNA Kopien pro Genom besitzen. Für *R. dentocariosa*, *S. sobrinus* und *V. parvula* konnte dies nicht ermittelt werden, da deren Genomsequenzen noch nicht komplett entschlüsselt wurden und der Literatur keine experimentellen (Southernblot)-Analysen zur Bestimmung der Kopienzahl pro Genom zu entnehmen waren. Vor dem Hintergrund, dass sich die Anzahl der 16S rDNA Kopien maximal um den Faktor 2-3 zwischen den Spezies unterscheidet, in der vorliegenden Studie jedoch Keimzahlachweise, die um mehrere 10er Potenzen variierten, ermittelt wurden, hat die Varianz der 16S Kopien einen vernachlässigbaren Einfluss.

6.3.2 Keimbesiedlung der kariösen und gesunden Wurzeloberflächen vor und nach parodontologischer Behandlung abhängig von der Behandlungsmethode

Als zweite Fragestellung dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich die Anzahl der kariogenen Mikroorganismen nach konventioneller parodontaler Behandlung erhöht.

De Soete et al. [86] beobachteten in ihren Untersuchungen, dass die Anzahl von *S. mutans* und *Lactobacillus spp.* zwei Monate nach parodontologischer Behandlung in der konventionellen und in der FMT Gruppe (in beiden Gruppen wurde kein Chlorhexidin oder Fluorid angewendet) signifikant angestiegen war, im Vergleich zu der Gruppe, in der Chlorhexidin und Fluorid (CHX+F-Gruppe) verabreicht wurde. Die Patienten dieser Gruppe erhielten zusätzlich zur FMD-Therapie eine 0,2%-ige CHX-Mundspülung sowie eine Amin-/Zinnfluorid-Mundspülung (125 ppm Aminfluorid und 125 ppm Zinnfluorid) zur häuslichen Anwendung. Die Plaqueproben wurden aus den Approximalräumen mit Hilfe von Holzkeilen entnommen und mikrobiologisch mittels Kulturmedien untersucht.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten außerdem, dass der deutlichste Anstieg von *S. mutans*-Keimen in der konventionellen Gruppe festgestellt wurde. In der CHX+F-Gruppe konnten nach zwei und vier Monaten keine *S. mutans*-Keime mehr nachgewiesen werden.

Unsere Ergebnisse zeigten hingegen keinen signifikanten Unterschied zwei Monate nach parodontaler Behandlung in der Keimzahl der oben genannten Mikroorganismen zwischen den drei Behandlungsgruppen (FMD, FMT und konventionell). Diese unterschiedlichen Ergebnisse können auf mehreren Tatsachen beruhen:

- in unserer Studie wurde die konventionelle Therapie anders durchgeführt als in der Studie von De Soete et al. und zwar Scaling und Root-Planing zweier Quadranten in einer Sitzung mit einem Abstand von einer Woche zwischen den Behandlungen
- die verabreichte Konzentration des CHX-Gels war geringer als in der Studie von De Soete et al. (0,5% vs. 1%)
- es wurden zwei verschiedene Methoden der Plaqueentnahme benutzt: in unserer Studie wurden Gracey-Küretten und in der Studie von De Soete et al. wurden Holzkeile verwendet
- die Plaqueentnahmestellen waren verschieden (Approximalräume vs. freiliegende Wurzeloberflächen)
- in unserer Studie wurden keine Fluoridpräparate verwendet
- die Keimzahl der Mikroorganismen wurde verschieden bestimmt: Kulturmedium in der Studie von De Soete et al. vs. Real-Time PCR in unserer Studie.

In der Untersuchung von De Soete et al. wurde keine quantitative Aussage über die Plaquemenge gemacht, wie in unserer Studie, wo das Plaquegewicht mittels Laborwaage genau gemessen wurde. Zu den Entnahmestellen (Approximalräumen) wurde in der Studie von De Soete et al. auch keine Angabe bezüglich ihres klinischen Zustandes (gesunde oder kariöse Approximalräume) gemacht.

Im Hinblick auf die Unterschiede in der Konzentration der verabreichten antibakteriellen Substanzen muss auch erwähnt werden, dass die Patienten der FMD-Gruppe unserer Studie ein niedriger dosiertes CHX-Präparat erhalten haben und dass wir vielleicht deswegen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen beobachten konnten.

Der Unterschied in der Keimbestimmung hat allerdings den höchsten Rang in dem Vergleich der Ergebnisse miteinander. Wie mehrfach in dieser Arbeit erwähnt, ist die Sensitivität des kulturellen Nachweises weiterhin unklar. So können sich beispielsweise in Kulturmedien fälschlicherweise andere mikrobiologische Spezies (z. B. Hefen) ansiedeln, die das Ergebnis beeinflussen. Studien, die kulturelle und PCR-gestützte Nachweise der oralen Mikroorganismen aus Patientenmaterial (sei es Plaque, kariöses Dentin oder Speichel) verglichen, konnten zeigen, dass die Real-Time PCR der Kultur in Hinblick auf die Sensitivität deutlich überlegen ist [62, 63, 75, 89]. Somit ließ sich die zweite Arbeitshypothese nicht verifizieren.

7 Schlussfolgerungen

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte somit ein Zusammenhang zwischen der Besiedlung freiliegender Wurzeloberflächen mit *Actinomyces spp.*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* und *Lactobacillus spp.* und Wurzelkaries bestätigt werden. Die Resultate vieler vorausgegangener Untersuchungen zeigten, dass das Vorkommen dieser Mikroorganismen eng an das Vorhandensein von kariösen Wurzelläsionen gekoppelt ist [4, 5, 7-9, 12-14, 18, 22, 26, 49, 52, 54, 55, 65, 97, 98]. Durch den Einsatz der Real-Time PCR konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Spezies wie *Rothia dentocariosa*, *Parvimonas micra*, *Neisseria mucosa* und *Propionibacterium acnes* von kariösen Wurzeloberflächen in signifikant höherer Anzahl isoliert werden als von gesunden Wurzeloberflächen. Diese Mikroorganismen wurden in vorausgegangenen Studien, die sich auf den kulturellen Nachweis beschränkten, nicht eindeutig mit der Entstehung oder dem Vorhandensein einer Wurzelkaries in Verbindung gebracht, weil ihre Nachweishäufigkeit und Anzahl mittels dieser Verfahren gering waren [10, 15, 99].

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit erneut verdeutlichen, dass die bakterielle Mikroflora der Wurzelkaries viel komplexer ist als bisher angenommen wurde, und dass sich die Einschätzung der Bedeutung der einzelnen Mikroorganismen, die sich an der Wurzelkaries beteiligen, durch den Einsatz von kulturunabhängigen, molekulargenetischen Methoden, wie der Real-Time PCR, verändern wird. Um die Beteiligung weiterer Mikroorganismen an der Entstehung der Wurzelkaries festzustellen, sind nachfolgende klinische und mikrobiologische Studien notwendig.

8 Zusammenfassung

Hauptziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen von *Actinomyces spp.*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus spp.*, *Rothia dentocariosa*, *Parvimonas micra*, *Neisseria mucosa*, *Veillonella parvula* und *Propionibacterium acnes* an kariösen wie gesunden Wurzeloberflächen zu untersuchen und deren Anzahl mittels der Real-Time PCR, einer kulturunabhängigen, molekulargenetischen Methode, zu quantifizieren. Die Beteiligung von *Actinomyces spp.*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* und *Lactobacillus spp.* an der Wurzelkaries wurde in vielen vorausgegangenen Studien, die auf kulturellem Nachweis basierten, bereits gezeigt. Andere Mikroorganismen wie *Rothia dentocariosa*, *Parvimonas micra*, *Neisseria mucosa*, *Veillonella parvula* und *Propionibacterium acnes* wurden mittels kulturellem Nachweis nur gelegentlich oder gar nicht identifiziert, so dass deren Beteiligung an der Wurzelkaries bislang nicht sicher gestellt werden konnte.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Anzahl kariogener Mikroorganismen nach konventioneller parodontaler Hauptbehandlung zunimmt.

Hierzu wurde bei 54 Patienten mit chronischer fortgeschrittener Parodontitis untersucht, inwieweit sich eine freiliegende Wurzeloberfläche mit einer kariösen Initialläsion hinsichtlich der Keimbesiedlung von einer gesunden Wurzeloberfläche unterscheidet. Von jedem Patienten wurden insgesamt vier Plaqueproben untersucht. Eine Plaqueprobe entstammte von oberhalb einer Wurzeloberfläche mit einer kariösen Initialläsion und die andere Plaqueprobe von einer gesunden Wurzeloberfläche. Diese zwei Proben wurden zu Baseline und zwei Monate nach parodontaler Hauptbehandlung entnommen. Die parodontale Hauptbehandlung wurde abhängig von der Patientengruppe folgendermaßen durchgeführt: FMT (Full-Mouth-Therapie), also Scaling und Root-Planing (SRP) innerhalb von 24 Stunden ohne Chlorhexidin (CHX)-anwendung, FMD (Full-Mouth-Disinfection) mit SRP innerhalb von 24 Stunden mit CHX-Anwendung und konventionelle Therapie im Sinne von SRP in zwei Quadranten pro Sitzung in einem einwöchigen Abstand zwischen den Behandlungen.

Die molekularbiologischen Untersuchungen wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für *Actinomyces spp.*, *Rothia dentocariosa* und *Neisseria mucosa* neue Real-Time PCRs entwickelt. Vorteile gegenüber herkömmlichen Kultivierungsverfahren bietet die Real-Time PCR, da sie den speziesspezifischen Nachweis, eine Quantifizierung der nachgewiesenen Genomäquivalente und somit die Berechnung der Keimzahl in einer Patientenprobe ermöglicht. Mit Hilfe des Computerprogramms „Primer Express“ wurden geeignete Primer und Sonden, die als Zielgen die 16S rDNA hatten, für die o. g. Mikroorganismen ermittelt. Für *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus spp.*, *Parvimonas micra*, *Veillonella parvula* und *Propionibacterium acnes* waren bereits Primer- und SONDENSEQUENZEN der Fachliteratur zu entnehmen. Die ausgewählten Primer und Sonden erwiesen sich sowohl theoretisch (durch Datenbankabgleich) wie auch praktisch (durch Tests auf Kreuzreaktivität) als speziesspezifisch. Um die in der TaqMan PCR amplifizierte Bakterien-DNA quantifizieren zu können, wurde durch Klonierung des jeweiligen Amplikons in ein Plasmid für jede der neun Spezies eine standardisierte Probe erzeugt, deren DNA-Menge spektralphotometrisch zu ermitteln war, und unter deren Einsatz in verschiedenen Konzentrationen computergestützt die DNA-Menge in jeder unbekanntem Probe errechnet werden konnte. Als Positivkontrolle wurde das humane GAPDH-Gen verwendet, da sich in jeder Plaqueprobe auch humane Zellen befanden.

Für die Aufreinigung der DNA aus den Patientenproben wurden anfangs mehrere Extraktionsmethoden miteinander verglichen. Die DNA Präparation über den EZ1 BioRobot von Qiagen erwies sich als beste Methode für die Aufreinigung der DNA aus den Patientenproben. Mit Hilfe dieses automatisierten Nukleinsäureisolierungssystems konnten auf den vorhandenen zwei Geräten max. 12 Proben innerhalb von 20 min aufbereitet werden. Die aufgereinigten DNA-Proben wurden anschließend simultan in acht TaqMan PCR Assays amplifiziert, wobei der Nachweis von *S. mutans* und *S. sobrinus* und *P. micra* und *R. dentocariosa* jeweils als Duplex-PCRs etabliert wurden. Um alle 216 Proben neben Positiv- und Negativkontrollen quantitativ analysieren zu können, wurden insgesamt 47 PCR-Läufe im 96 Well Mikrotiterplattenformat durchgeführt und anschließend ausgewertet.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die Anzahl von *Actinomyces spp.*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacillus spp.*, *Neisseria mucosa*, *Rothia dentocariosa*, *Parvimonas micra* und *Propionibacterium acnes* signifikant höher in der Plaque

oberhalb kariöser Läsionen war als auf gesunden Wurzeloberflächen. Im Gegensatz dazu war die Keimzahl von *Veillonella parvula* auf den gesunden Wurzeloberflächen höher als auf kariösen. Diese Ergebnisse konnten sowohl zur Baseline als auch zwei Monate nach parodontaler Behandlung festgestellt werden. In dem direkten Vergleich der drei verschiedenen Behandlungsgruppen miteinander (FMD, FMT und konventionell) fand sich kein signifikanter Unterschied in der Keimzahl der o. g. Mikroorganismen, so dass die Hypothese, laut der die Anzahl kariogener Mikroorganismen nach parodontaler Behandlung zunimmt, von diesen Ergebnissen entkräftet wurde.

So lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen ableiten, dass neben den kariogen bekannten Mikroorganismen wie *Actinomyces spp.*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* oder *Lactobacillus spp.* auch andere Spezies wie *Rothia dentocariosa*, *Parvimonas micra*, *Neisseria mucosa*, *Veillonella parvula* und *Propionibacterium acnes* eine Rolle bei der Entstehung der Wurzelkaries spielen können.

Um die Beteiligung weiterer Mikroorganismen an der Entstehung der Wurzelkaries festzustellen, sollten nachfolgende klinische und mikrobiologische Studien durchgeführt werden.

9 Literaturverzeichnis

1. Matear, D., *Why do we need education in geriatric dentistry?* J Can Dent Assoc, 1998. **64**(10): p. 736-8.
2. Noack, M.J., Fritz, U., Seemann, R., *Wurzelkaries-Ein Prophylaxe-und Behandlungskonzept*, in *Deutscher Zahnärztekalender 1997*. 1997. p. 43-78.
3. Micheelis, W., Schiffer, U., *Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DSM IV)*. 2006, Köln: Deutscher Zahnärzte Verlag.
4. Jordan, H.V. and B.F. Hammond, *Filamentous bacteria isolated from human root surface caries*. Arch Oral Biol, 1972. **17**(9): p. 1333-42.
5. Jordan, H.V. and D.L. Sumney, *Root surface caries: review of the literature and significance of the problem*. J Periodontol, 1973. **44**(3): p. 158-63.
6. Syed, S.A., et al., *Predominant cultivable flora isolated from human root surface caries plaque*. Infect Immun, 1975. **11**(4): p. 727-31.
7. Brailsford, S.R., E. Lynch, and D. Beighton, *The isolation of Actinomyces naeslundii from sound root surfaces and root carious lesions*. Caries Res, 1998. **32**(2): p. 100-6.
8. Brailsford, S.R., et al., *The predominant Actinomyces spp. isolated from infected dentin of active root caries lesions*. J Dent Res, 1999. **78**(9): p. 1525-34.
9. Ellen, R.P., D. W. Banting, and E. D. Fillery, *Streptococcus mutans and Lactobacillus detection in the assessment of dental root surface caries risk*. J Dent Res, 1985. **64**: p. 1245-1249.
10. Brown, L.R., R. J. Billings, A. G. Kaster, *Quantitative comparisons of potentially cariogenic microorganism cultured from noncarious and carious root and coronal tooth surfaces*. Infect. Immun., 1986. **51**: p. 765-770.
11. Ravald, N. and D. Birkhed, *Prediction of root caries in periodontally treated patients maintained with different fluoride programmes*. Caries Res, 1992. **26**(6): p. 450-8.
12. Keltjens, H.M., et al., *Microflora of plaque from sound and carious root surfaces*. Caries Res, 1987. **21**(3): p. 193-9.
13. Emilson, C.G., B. Klock, and C. B. Sanford, *Microbial flora associated with presence of root surface caries in periodontally treated patients*. Scand J Dent Res, 1988. **96**: p. 40-49.

14. Nyvad, B. and M. Kilian, *Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals*. Caries Res, 1990. **24**(4): p. 267-72.
15. Van Houte, J., et al., *Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries*. J Dent Res, 1990. **69**(8): p. 1463-8.
16. König, K., *Karies und Kariesprophylaxe*. 1971, München: Goldmann.
17. Miller, W., *Die Mikroorganismen der Mundhöhle*. 1889, Leipzig.
18. Keyes, P.H., *Research in dental caries*. J Am Dent Assoc, 1968. **76**(6): p. 1357-73.
19. Hellwig, E., Klimek, J., Attin, T., *Einführung in die Zahnerhaltung, 3. Auflage*. 2003, München-Jena: Urban und Fischer.
20. Budecke, E., *Biomedizinische Grundlagen der Zahnmedizin*. 1981, Berlin: W. de Gruyter.
21. Locker, D., G.D. Slade, and J.L. Leake, *Prevalence of and factors associated with root decay in older adults in Canada*. J Dent Res, 1989. **68**(5): p. 768-72.
22. Schubach, P., V. Osterwalder, and B. Guggenheim, *Human root caries: microbiota in plaque covering sound, carious and arrested carious root surfaces*. Caries Res, 1995. **29**(5): p. 382-95.
23. Hoppenbrouwers, P.M., F.C. Driessens, and J.M. Borggreven, *The mineral solubility of human tooth roots*. Arch Oral Biol, 1987. **32**(5): p. 319-22.
24. Hazen, S.P., N.W. Chilton, and R.D. Mumma, Jr., *The problem of root caries. I. Literature review and clinical description*. J Am Dent Assoc, 1973. **86**(1): p. 137-44.
25. Banting, D.W., R.P. Ellen, and E.D. Fillery, *Prevalence of root surface caries among institutionalized older persons*. Community Dent Oral Epidemiol, 1980. **8**(2): p. 84-8.
26. Nyvad, B. and O. Fejerskov, *Root surface caries: clinical, histopathological and microbiological features and clinical implications*. Int Dent J, 1982. **32**(4): p. 311-26.
27. Katz, R.V., *Assessing root caries in populations: the evolution of the root caries index*. J Public Health Dent, 1980. **40**(1): p. 7-16.
28. Siukosaari, P., A. Ainamo, and T.O. Narhi, *Level of education and incidence of caries in the elderly: a 5-year follow-up study*. Gerodontology, 2005. **22**(3): p. 130-6.

29. Gilbert, G.H., et al., *Twenty-four month incidence of root caries among a diverse group of adults*. Caries Res, 2001. **35**(5): p. 366-75.
30. Imazato, S., et al., *Prevalence of root caries in a selected population of older adults in Japan*. J Oral Rehabil, 2006. **33**(2): p. 137-43.
31. Heinrich, R., W. Kunzel, and J. Heinrich, [*Prevalence of root caries in a healthy adult population*]. Dtsch Zahnärztl Z, 1990. **45**(6): p. 363-6.
32. Splieth, C., et al., *Prevalence and distribution of root caries in Pomerania, North-East Germany*. Caries Res, 2004. **38**(4): p. 333-40.
33. Banting, D.W. and J.W. Stamm, *Effect of age and length of residence in a fluoridated area on root surface fluoride concentration*. Clin Prev Dent, 1979. **1**(5): p. 7-10.
34. Katz, R.V., et al., *Prevalence and intraoral distribution of root caries in an adult population*. Caries Res, 1982. **16**(3): p. 265-71.
35. Vehkalahti, M., et al., *Prevalence of root caries in the adult Finnish population*. Community Dent Oral Epidemiol, 1983. **11**(3): p. 188-90.
36. Stamm, J.W., D.W. Banting, and P.B. Imrey, *Adult root caries survey of two similar communities with contrasting natural water fluoride levels*. J Am Dent Assoc, 1990. **120**(2): p. 143-9.
37. Hix, J.O. and T.J. O'Leary, *The relationship between cemental caries, oral hygiene status and fermentable carbohydrate intake*. J Periodontol, 1976. **47**(7): p. 398-404.
38. Raval, N. and S.E. Hamp, *Prediction of root surface caries in patients treated for advanced periodontal disease*. J Clin Periodontol, 1981. **8**(5): p. 400-14.
39. el-Hadary, M.E., et al., *A study of the incidence and distribution of root surface caries and its relation to periodontal disease*. Egypt Dent J, 1975. **21**(2): p. 43-52.
40. Paraskevas, S., et al., *Amine fluoride/stannous fluoride and incidence of root caries in periodontal maintenance patients. A 2 year evaluation*. J Clin Periodontol, 2004. **31**(11): p. 965-71.
41. Beck, J.D., et al., *Prevalence of root and coronal caries in a noninstitutionalized older population*. J Am Dent Assoc, 1985. **111**(6): p. 964-7.
42. Wallace, M.C., D.H. Retief, and E.L. Bradley, *Incidence of root caries in older adults*. Hawaii Dent J, 1988. **19**(8): p. 8.
43. Fure, S. and I. Zickert, *Prevalence of root surface caries in 55, 65, and 75-year-old Swedish individuals*. Community Dent Oral Epidemiol, 1990. **18**(2): p. 100-5.

44. Hellyer, P.H., et al., *Root caries in older people attending a general dental practice in East Sussex*. Br Dent J, 1990. **169**(7): p. 201-6.
45. Sumney, D.L., H.V. Jordan, and H.R. Englander, *The prevalence of root surface caries in selected populations*. J Periodontol, 1973. **44**(8): p. 500-4.
46. Vehkalahti, V., *Occurrence of root caries and factors related to it*. Proc Finn Dent Soc, 1987. **83 Suppl 4-5**: p. 1-99.
47. Ravald, N., S.E. Hamp, and D. Birkhed, *Long-term evaluation of root surface caries in periodontally treated patients*. J Clin Periodontol, 1986. **13**(8): p. 758-67.
48. Keltjens, H., et al., *Epidemiology of root surface caries in patients treated for periodontal diseases*. Community Dent Oral Epidemiol, 1988. **16**(3): p. 171-4.
49. Kitamura, M., H.A. Kiyak, and K. Mulligan, *Predictors of root caries in the elderly*. Community Dent Oral Epidemiol, 1986. **14**(1): p. 34-8.
50. Sumney, D.L., and H. V. Jordan, *Characterisation of bacteria isolated from human root surface carious lesions*. J Dent Res, 1974. **53**: p. 343-351.
51. Billings, R.J., L. R. Brown, *Contemporary treatment strategies for root dental caries*. Gerodontology, 1985. **1**: p. 20-27.
52. Fure, S., et al., *Proportions of Streptococcus mutans, lactobacilli and Actinomyces spp in root surface plaque*. Scand J Dent Res, 1987. **95**(2): p. 119-23.
53. Ellen, R.P., D. W. Banting, and E. D. Fillery, *Comparison of a selective broth and plating methods for isolation of Streptococcus mutans from root surface dental plaques*. J Clin Microbiol, 1980. **11**: p. 205-208.
54. Ellen, R.P., D. W. Banting, and E. D. Fillery, *Longitudinal microbiological investigation of a hospitalized population of older adults with a high root surface caries risk*. J Dent Res, 1985. **64**: p. 1377-1381.
55. Nyvad, B. and M. Kilian, *Microflora associated with experimental root surface caries in humans*. Infect Immun, 1990. **58**(6): p. 1628-33.
56. Marsh, P.D., *Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease*. BMC Oral Health, 2006. **6 Suppl 1**: p. S14.
57. Munson, M.A., et al., *Molecular analysis of the microflora associated with dental caries*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(7): p. 3023-9.
58. Nadkarni, M.A., et al., *Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 1): p. 257-66.

59. Suzuki, N., et al., *Real-time TaqMan PCR for quantifying oral bacteria during biofilm formation*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(8): p. 3827-30.
60. Yoshida, A., et al., *Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(9): p. 4438-41.
61. Price, R.R., et al., *Targeted profiling of oral bacteria in human saliva and in vitro biofilms with quantitative real-time PCR*. Biofouling, 2007. **23**(3-4): p. 203-13.
62. Martin, F.E., et al., *Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(5): p. 1698-704.
63. Byun, R., et al., *Quantitative analysis of diverse Lactobacillus species present in advanced dental caries*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(7): p. 3128-36.
64. Sanderink, R.B.A., et al., *Orale Mikrobiologie und Immunologie*. 2004, Berlin: Quintessenz.
65. Nyvad, B. and M. Kilian, *Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo*. Scand J Dent Res, 1987. **95**(5): p. 369-80.
66. Marsh, P. and V.M. Martin, *Oral Microbiology*. 1999, Stuttgart: Thieme Verlag.
67. Riggio, M.P., A. Lennon, and A. Smith, *Detection of peptostreptococcus micros DNA in clinical samples by PCR*. J Med Microbiol, 2001. **50**(3): p. 249-54.
68. Almuzara, M.N., et al., *[Endocarditis due to Rothia dentocariosa complicated by septic cerebral embolism]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2004. **22**(4): p. 255-6.
69. Boudewijns, M., et al., *Rothia dentocariosa, endocarditis and mycotic aneurysms: case report and review of the literature*. Clin Microbiol Infect, 2003. **9**(3): p. 222-9.
70. Sadhu, A., R. Loewenstein, and S.A. Klotz, *Rothia dentocariosa endocarditis complicated by multiple cerebellar hemorrhages*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005. **53**(3): p. 239-40.
71. Snyder, M.L., *Laboratory methods in the clinical evaluation of caries activity*. J Am Dent Assoc, 1951. **42**(4): p. 400-13.
72. Rogosa, M., J.A. Mitchell, and R.F. Wiseman, *A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli*. J Dent Res, 1951. **30**(5): p. 682-9.
73. Gold, O.G., H.V. Jordan, and J. Van Houte, *A selective medium for Streptococcus mutans*. Arch Oral Biol, 1973. **18**(11): p. 1357-64.

74. Paster, B.J., et al., *Bacterial diversity in human subgingival plaque*. J Bacteriol, 2001. **183**(12): p. 3770-83.
75. Kroes, I., P.W. Lepp, and D.A. Relman, *Bacterial diversity within the human subgingival crevice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14547-52.
76. Beikler, T., et al., *Sequence variations in rgpA and rgpB of Porphyromonas gingivalis in periodontitis*. J Periodontal Res, 2005. **40**(3): p. 193-8.
77. Cullen, P.M., F. Thielmann, and H.-G. Klein, *Leitfaden Molekulare Diagnostik*. 2006, Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
78. Yoo, S.Y., et al., *Isolation and characterization of the mutans streptococci from the dental plaques in Koreans*. J Microbiol, 2007. **45**(3): p. 246-55.
79. Ximenez-Fyvie, L.A., A.D. Haffajee, and S.S. Socransky, *Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis*. J Clin Periodontol, 2000. **27**(10): p. 722-32.
80. Igarashi, T., A. Yamamoto, and N. Goto, *PCR for detection and identification of Streptococcus sobrinus*. J Med Microbiol, 2000. **49**(12): p. 1069-74.
81. Song, Y., et al., *Rapid identification of Gram-positive anaerobic coccal species originally classified in the genus Peptostreptococcus by multiplex PCR assays using genus- and species-specific primers*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 7): p. 1719-27.
82. Bizhang, M., et al., *Microbiota of exposed root surfaces after fluoride, chlorhexidine, and periodontal maintenance therapy: a 3-year evaluation*. J Periodontol, 2007. **78**(8): p. 1580-9.
83. Quirynen, M., et al., *The effect of periodontal therapy on the number of cariogenic bacteria in different intra-oral niches*. J Clin Periodontol, 1999. **26**(5): p. 322-7.
84. Reiker, J., et al., *A cross-sectional study into the prevalence of root caries in periodontal maintenance patients*. J Clin Periodontol, 1999. **26**(1): p. 26-32.
85. Van der Reijden, W.A., et al., *Mutans streptococci in subgingival plaque of treated and untreated patients with periodontitis*. J Clin Periodontol, 2001. **28**(7): p. 686-91.
86. De Soete, M., et al., *Increase in cariogenic bacteria after initial periodontal therapy*. J Dent Res, 2005. **84**(1): p. 48-53.
87. Eishi, Y., et al., *Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(1): p. 198-204.

88. Wade, W.G., M.J. Wilson, and A.J. Weightman, *Applications of molecular ecology in the characterisation of uncultured microorganism associated with human disease*. Rev. Med. Microbiol., 1997. **8**: p. 91-101.
89. Dymock, D., et al., *Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(3): p. 537-42.
90. Tang, G., et al., *Actinomyces spp. in supragingival plaque of ethnic Chinese preschool children with and without active dental caries*. Caries Res, 2003. **37**(5): p. 381-90.
91. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*. J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
92. Schild, T.A., *Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie*.
93. Quirynen, M., et al., *Benefit of "one-stage full-mouth disinfection" is explained by disinfection and root planing within 24 hours: a randomized controlled trial*. J Clin Periodontol, 2006. **33**(9): p. 639-47.
94. Quirynen, M., W. Teughels, and D. van Steenberghe, *Impact of antiseptics on one-stage, full-mouth disinfection*. J Clin Periodontol, 2006. **33**(1): p. 49-52.
95. Ravald, N., D. Birkhed, and S.E. Hamp, *Root caries susceptibility in periodontally treated patients. Results after 12 years*. J Clin Periodontol, 1993. **20**(2): p. 124-9.
96. Hujoel, P.P. and T.A. DeRouen, *Validity issues in split-mouth trials*. J Clin Periodontol, 1992. **19**(9 Pt 1): p. 625-7.
97. Marchant, S., et al., *The predominant microflora of nursing caries lesions*. Caries Res, 2001. **35**(6): p. 397-406.
98. Papas, A., A. Joshi, and J. Giunta, *Prevalence and intraoral distribution of coronal and root caries in middle-aged and older adults*. Caries Res, 1992. **26**(6): p. 459-65.
99. Bowden, G.H., J. M. Hardie, A. S. McKee, P. D. Marsh, E. D. Fillery and G. L. Slack, *The microflora associated with developing carious lesions of the distal surface on the upper first premolars in 13-14-year-old children*. Microbial Aspects of dental caries, 1976. **1**.
100. Preza, D., et al., *Bacterial profiles of root caries in elderly patients*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(6): p. 2015-21.
101. Lyons, S.R., A.L. Griffen, and E.J. Leys, *Quantitative real-time PCR for Porphyromonas gingivalis and total bacteria*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(6): p. 2362-5.

10 Anhang

10.1 Instrumentarium

Zahnärztlicher Mundspiegel	Aesculap AG & Co. KG, Tutlingen, Deutschland
Zahnärztliche Pinzette	Aesculap AG & Co. KG, Tutlingen, Deutschland
Zahnärztliche Sonde	Aesculap AG & Co. KG, Tutlingen, Deutschland
Parodontalsonde PCP10	Hu-Friedy, Leimen, Deutschland
Gracey-Kürette 7/8	Hu-Friedy, Leimen, Deutschland
Universalscaler M23	Hu-Friedy, Leimen, Deutschland

10.2 Verbrauchsmaterialien

Polierkelch	Hawe Neos Dental SA, Bioggio, Schweiz
Zahnseide ungewachst	Gaba GmbH-elmex®-Forschung, Lörrach, Deutschland
Wattepellets	Roeko Coltene/Whaledent, Langenau, Deutschland
Curaprox-Interdentalraumbürstchen	Curaden, Kriens, Schweiz
Curasept-Chlorhexidin-Spray 0,5%	Curaden, Kriens, Schweiz
Curasept-Chlorhexidin-Mundspülung 0,2%	Curaden, Kriens, Schweiz
Curasept-Chlorhexidin-Gel 0,5%	

10.3 Benutzte Chemikalien

Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Bromphebolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Glukose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS (Phosphate Buffered Salines)	Gibco BRL, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris (hydroxymethylaminomethan)	Merck, Darmstadt, Deutschland
TSB (Tryptic Soy Broth)	Difco Laboratories GmbH, Augsburg, Deutschland

10.4 Technische Geräte

Cavitron FSI Slimline™	Dentsply DETREY GmbH, Konstanz, Deutschland
------------------------	---

iCycler iQ5	BioRad, München, Deutschland
T-Gradient	Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland
BioRobot EZ1	Qiagen, Hilden, Deutschland

10.5 Software

Primer Express
Lasergene
Blast (Basic Local Alignment Search Tool)
Microsoft® Office Word 2003
Microsoft® Office Excel 2003
Microsoft® Office PowerPoint 2003
SPSS Version 15.0 for Windows

10.6 Abkürzungen

ATP	Adenintriphosphat
CHX	Chlorhexidin
CTP	Cytosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FMD	Full-Mouth-Disinfection
FMT	Full-Mouth-Therapy
	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-
GAPDH	Dehydrogenase
GTP	Guanintriphosphat
kb	Kilobasen

Konv	Konventionell
Lacto	<i>Lactobacillus spp.</i>
M	Marker
<i>P. micra</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>N. mucosa</i>	<i>Neisseria mucosa</i>
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
<i>P. acnes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>R. dentocariosa</i>	<i>Rothia dentocariosa</i>
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
<i>V. parvula</i>	<i>Veillonella parvula</i>

10.7 Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei denen bedanken, durch die mir die Erstellung dieser Arbeit möglich wurde.

Dieser Dank gilt besonders Herrn Professor Dr. Stefan Zimmer für die freundliche Überlassung des Themas für diese Dissertation.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Mentorin Frau OÄ Dr. Mozhgan Bizhang, die mir freundschaftlich mit Rat und Tat bei der Verwirklichung dieser Arbeit zur Seite gestanden hat, für die Motivation und Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Professor Dr. Birgit Henrich für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten auf dem Gebiet der Mikrobiologie und ihre unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen.

Dana Belik aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie danke ich für ihre Unterstützung bei meiner praktischen Arbeit im Labor.

Ich bedanke mich bei meiner Familie, insbesondere bei meiner Mutter Dr. med.

Ioana Moldovan, für die Geduld, das Verständnis und die grenzlose Unterstützung in meiner gesamten medizinischen Ausbildung.

Zuallerletzt und besonders herzlich möchte ich meinem Mann Hartwig danken, der mich mit seinem Vertrauen und Optimismus immer wieder überrascht hat und mich über die ganze Zeit meines Studiums und Assistenzzeit mit einer unerschütterlichen Geduld begleitet hat.

Abstract

Untersuchung kariogener Mikroorganismen auf den freiliegenden Wurzeloberflächen bei Patienten mit chronischer Parodontitis

vorgelegt von Bianca Ioana Ellerbrock

Durch die zunehmende Lebenserwartung der Menschen gewinnt die Wurzelkaries immer mehr an Bedeutung, da mit steigendem Alter die Anzahl freiliegender Wurzeloberflächen zunimmt.

Die Rolle der Mikroorganismen bei der Kariogenese ist heute unbestritten, jedoch änderte sich die Bedeutung der einzelnen Mikroorganismen im Laufe der Zeit wesentlich. Unter den Plaquebakterien, die an der Wurzelkaries beteiligt sind, kommt den Mikroorganismen wie *Actinomyces spp.*, *Streptococcus mutans* und *Streptococcus sobrinus* und *Lactobacillus spp.* eine besondere Rolle zu. Andere Mikroorganismen wie *Veillonella parvula*, *Rothia dentocariosa*, *Parvimonas micra*, *Propionibacterium acnes* und *Neisseria mucosa* wurden bereits in Studien, die mittels kulturellem Nachweis diese Spezies identifizierten, in Verbindung mit Wurzelkaries gesetzt. Die Rolle dieser Mikroorganismen bei der Entstehung der Wurzelkaries ist jedoch nicht eindeutig geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist, das Vorkommen dieser Mikroorganismen an kariösen wie gesunden Wurzeloberflächen zu untersuchen und deren Anzahl mittels einer kulturunabhängigen, molekulargenetischen Methode, der Real-Time PCR, zu quantifizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für *Actinomyces spp.*, *Rothia dentocariosa* und *Neisseria mucosa* neue Real-Time PCRs entwickelt. Vorteile der Real-Time PCR gegenüber herkömmlichen Kultivierungsverfahren sind, dass sie den speziesspezifischen Nachweis bietet sowie eine Quantifizierung der nachgewiesenen Genomäquivalente ermöglicht und somit die Grundlage für die Berechnung der Keimzahl in einer Patientenprobe schafft.

In Anlehnung an die Hypothese, dass es nach konventioneller parodontaler Hauptbehandlung zu einer Verschiebung innerhalb der oralen Mikroflora von parodontalpathogenen zu mehr kariogenen Keimen kommt, sollte zusätzlich untersucht werden, ob die Anzahl kariogener Mikroorganismen nach konventioneller parodontaler Hauptbehandlung zunimmt. Hierzu wurden die Plaqueproben von 54 Patienten mit chronischer fortgeschrittener Parodontitis untersucht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass mit Ausnahme von *Veillonella parvula* die Anzahl der oben genannten Mikroorganismen signifikant höher in der Plaque auf kariösen Wurzeloberflächen ist als auf gesunden Wurzeloberflächen.

Im direkten Vergleich drei verschiedener Behandlungsgruppen miteinander (Full-Mouth-Disinfection, Full-Mouth-Therapy und konventionelle parodontale Hauptbehandlung) fand sich bezüglich der Keimzahl der untersuchten Mikroorganismen sowohl zwischen den Behandlungsmethoden als auch zwischen den Messungen vor und nach der Behandlung kein signifikanter Unterschied.