

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und
Endodontologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang H.-M. Raab

**Isolierung und Detektion von Bakterien und Pilzen aus
wurzelgefüllten Zähnen bei Vorliegen einer postendodontischen
apikalen Parodontitis**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Hannah Al-Sakati

2019

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang H.-M. Raab

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. Majeed Rana

Für meine Familie

Um den Lesefluss zu erleichtern, wurde in dieser Arbeit auf eine geschlechtergerechte Sprache verzichtet. Personenbezeichnungen gelten daher gleichermaßen für beiderlei Geschlecht.

Zusammenfassung

Die Versagensrate endodontischer Behandlung wirft die Frage nach der mikrobiellen Besiedlung im therapierten Wurzelkanal auf. In den bisherigen Studien erfolgten die Probennahmen meist mittels steriler Papierspitzen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass weitere Mikroorganismen teilweise nur im entfernten Guttapercha nachzuweisen sind. Ziel der vorliegenden Studie war die Isolierung und Detektion von Bakterien und Pilzen aus wurzelgefüllten Zähnen bei Vorliegen einer postendodontischen apikalen Parodontitis mithilfe eines molekulargenetischen Ansatzes im Vergleich zur Kultur.

Im Zuge einer Revisionsbehandlung wurden an 42 Zähnen mit röntgenologisch sichtbarer apikaler Parodontitis jeweils drei Proben entnommen: (1) subgingivale Plaque, (2) Abstrich der präparierten Kavität nach Desinfektion (Desinfektionskontrolle) und (3) entferntes Wurzelfüllmaterial/Guttapercha. Die molekulargenetische Analyse erfolgte mittels Real-Time Pan-PCRs für Bakterien (16S rDNA als Zielsequenz) und Pilze (ITS 1+2 Regionen als Zielsequenzen). Anschließend wurden die PCR-Produkte Sanger-sequenziert und in einer BLAST-Analyse der jeweils erhaltenen Sequenz das dominante Pathogen identifiziert. Für den vergleichenden kulturellen Nachweis dienten Kochblut-, Schaedler- und Sabouraud-Festnährmedien.

Die Kultur lieferte in 42/42 **Plaque**-Proben einen bakteriellen Nachweis. *Streptococcus spp.* (41/42 Proben) und *Actinomyces spp.* (38/42 Proben) wurden am häufigsten identifiziert. Nur in einer Probe konnte ein Pilz (*Candida albicans*) kulturell nachgewiesen werden.

Mittels Pan-PCR konnte in 38/42 Plaqueproben ein dominantes Bakterium identifiziert werden, vor allem *Streptococcus spp.* (22/42 Proben). In 3/42 Proben wurden Pilze (*Candida albicans*) nachgewiesen.

In 28/42 **Wurzelfüllmaterial**-Proben konnte mittels Kultur ein Keimnachweis erfolgen. Durchschnittlich ein bis zwei Bakterienspezies pro Wurzelfüllung wurden kulturell detektiert. *Streptococcus spp.* (10/42 Proben) und *Enterococcus faecalis* (9/42 Proben) traten am häufigsten auf. In der Wurzelfüllung konnten Pilze kulturell nicht nachgewiesen werden. Mittels Pan-16S PCR konnte im Wurzelfüllmaterial in 30/42 Proben ein dominantes Bakterium detektiert werden. *Streptococcus spp.* und *E. faecalis* (jeweils 4/42 Proben) wurden am häufigsten identifiziert. Nur mittels PCR war es möglich, in 5/42 Guttapercha-Proben Pilze nachzuweisen, in 4/5 Fällen *Candida albicans*. In 8/42 Wurzelfüllungen wurden schwer kultivierbare Bakterien (*Synergistes*, *Acinetobacter*, *Atopobium*, *Pyramidobacter*, *Ruminococcus*, *Pseudoramibacter* und *Bacteroidetes*) mittels Pan-16S PCR detektiert, die kulturell nicht nachgewiesen werden konnten.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die Kultur ein geeignetes Verfahren zur Analyse der subgingivalen Plaque als polymikrobielles Gemisch darstellt, da es eine Detektion mehrerer Keime gleichzeitig ermöglicht. Im Gegenzug zeigt sich der Einsatz der PCR bei Vorhandensein eines dominanten, schwer anzüchtbaren Keims von deutlichem Vorteil und ist ebenfalls zur Pilzdiagnostik der Kultur überlegen.

Die vorliegende Studie bestätigt, dass neben schwer kultivierbaren Bakterien insbesondere *E. faecalis*, *C. albicans* und *Streptococcus spp.* Leitkeime in reinfizierten wurzelgefüllten Zähnen darstellen.

Summary

The large number of endodontic treatment failures raises the question of the microbial flora in reinfected root canals. In most previous studies root canal samples were collected using sterile paper points. However, it has been shown that some microorganisms can only be found on removed root filling material. The aim of the present study was to isolate and detect bacteria and fungi in reinfected root-filled teeth with secondary apical periodontitis using culture-dependent and culture-independent approaches.

During each retreatment of 42 endodontically treated teeth with periapical lucency three samples were collected: (1) subgingival plaque, (2) swab sample of the prepared disinfected cavity (disinfection control) and (3) removed root filling material/Guttapercha. Real-Time Pan-PCRs were conducted for diagnosis of bacteria (16S rDNA as the target sequence) and fungi (ITS 1+2 regions as the target sequences). Afterwards, PCR products were sequenced through the Sanger method and with the sequence similarity tool BLAST the dominant pathogen of the sample was identified. Swab cultures were made on blood agar, Schaedler agar and Sabouraud dextrose agar plates.

42/42 **plaque** samples showed bacterial growth in culture. Among these, *Streptococcus spp.* (41/42 samples) and *Actinomyces spp.* (38/42 samples) prevailed. Cultivated fungi (*Candida albicans*) were only found in one plaque sample.

By the use of Pan-PCR 38/42 plaque samples each revealed a predominant microorganism, primarily *Streptococcus spp.* (22/42 samples). Fungal infection (*Candida albicans*) was found in 3/42 samples.

28/42 **root filling materials** showed bacterial growth in culture. The average number of bacterial species cultured ranged from one to two species within a single sample. *Streptococcus spp.* (10/42 samples) and *Enterococcus faecalis* (9/42 samples) were detected in most cases. Fungi could not be detected in root canal fillings by culture methods.

By Pan-16S PCR it was possible to identify predominant bacteria in 30/42 samples obtained after the removal of Guttapercha. *Streptococcus spp.* and *E. faecalis* (4/42 samples each) were most prevalent. It was only possible to detect fungi in Guttapercha by PCR analysis (5/42 samples), 4 out of 5 cases were positive for *Candida albicans*. 8/42 root canal samples showed colonization of difficult-to-cultivate bacteria (*Synergistes*, *Acinetobacter*, *Atopobium*, *Pyramidobacter*, *Ruminococcus*, *Pseudoramibacter* and *Bacteroidetes*) only by Pan-16S PCR and not by culture methods.

These findings indicate that culture techniques are appropriate to analyze the polymicrobial composition of subgingival plaque as they allow the detection of a greater number of microorganisms simultaneously. In contrast, PCR analysis is significantly more effective than culture for the detection of dominant as well as difficult-to-cultivate pathogens and proved to be a more sensitive diagnostic method for fungal infection.

This study confirms that besides difficult-to-cultivate bacteria primarily *E. faecalis*, *C. albicans* and *Streptococcus spp.* are the most prevalent pathogens in reinfected root-filled teeth.

Abkürzungsverzeichnis

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
Ca(OH)₂	Calciumhydroxid
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CHX	Chlorhexidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
IL 1/6	Interleukin 1/6
NaOCl	Natriumhypochlorit
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Anatomie des Endodonts und dessen Infektion.....	1
1.2	Desinfektionsmaßnahmen während der Wurzelkanalbehandlung	4
1.3	Ätiologie der Reinfektion des Wurzelkanals.....	6
1.4	Diagnostikverfahren zum Pathogennachweis.....	7
1.4	Zielsetzung.....	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	15
2.1.2	Primer und Sonden	16
2.1.3	Kits.....	17
2.1.4	PCR Mastermixe.....	17
2.1.5	Geräte.....	17
2.1.6	Software.....	18
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Kautelen der Arbeitsabläufe	19
2.2.2	Patientenkollektiv	19
2.2.3	Proben.....	21
2.2.4	Kultivierung.....	23
2.2.5	Präparation genomischer DNA mittels DNeasy Blood & Tissue Kit	25
2.2.6	Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	26
2.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.2.8	Aufreinigung von PCR-Produkten	31
2.2.9	Sanger-Sequenzierung	31
2.2.10	BLAST-Analyse	32
2.2.11	Statistische Auswertung.....	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Charakteristika des Patientenkollektivs und ihrer Proben.....	34
3.2	Kultureller Nachweis von polymikrobiellen Infektionen.....	37
3.2.1	Semiquantifizierung des Kulturwachstums	37
3.2.2	Dominanz der Gram-positiven Anaerobier	40
3.3	Molekulargenetische Analyse.....	45
3.3.1	Schmelzkurvenanalyse	45
3.3.2	Validität der BLAST-Analyse.....	47
3.3.3	Risiken bei der Verwendung der Pan-PCR zur Identifizierung von Mikroorganismen in der medizinischen Mikrobiologie	49
3.3.4	Pilznachweise mittels Pan-Pilz PCR: Auf dem Weg zum phylogenetischen Stammbaum	55
3.4	Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse	58

3.5	PCR und Kultur im Vergleich	64
3.6	Korrelation zwischen Anamnese und mikrobiellen Befunden	68
4	Diskussion.....	71
4.1	Methodik.....	71
4.1.1	Probanden und Probennahmen	71
4.1.2	Mikrobielle Analyse – Ist die Pan-PCR der neue Goldstandard?	73
4.2	Mikrobiologische Ergebnisse	78
4.2.1	Keimlast der Proben	78
4.2.2	<i>Enterococcus faecalis</i> und <i>Streptococcus spp.</i> als bakterielle Hauptakteure	79
4.2.3	Bedeutung von schwer kultivierbaren Mikroorganismen im reinfizierten Wurzelkanal.....	82
4.2.4	<i>Candida albicans</i> als dominante Pilzspezies.....	84
4.2.5	Ausblick.....	86
4.3	Schlussfolgerung	87
5	Literaturverzeichnis.....	89

1 Einleitung

1.1 Anatomie des Endodonts und dessen Infektion

Im Zuge des medizinischen Fortschritts wird der Wunsch nach einer erhaltenden Zahnmedizin zunehmend realisiert. Ein nachhaltiges Prophylaxeprogramm verfolgt langfristig das Ziel der oralen Gesundheit, das durch Mundhygieneinstruktion, -motivation und Ernährungsberatung den Patienten in die Mundgesundheit leitet, Schäden frühzeitig erkennt und bei Bedarf angemessen therapiert.

Als wissenschaftlicher Teilbereich der Zahnerhaltungskunde beschäftigt sich die Endodontologie mit der Anatomie, Physiologie, Histologie sowie Pathologie der Pulpa und der angrenzenden Hart- und Weichgewebe, insbesondere der inter- und periradikulären Gewebe. Die Diagnostik, Prävention und Therapie der Erkrankung dieser Gewebe stehen im Mittelpunkt der endodontologischen Disziplin. Ziel ist es, den erkrankten Zahn zu erhalten und die von ihm ausgehenden möglichen Schäden auf den Körper zu unterbinden [1].

Der Begriff Endodont bezieht sich auf den ektomesenchymalen Gewebeverband, bestehend aus der Pulpa als weichgeweblichem Kern und dem mineralisierten Hartschubstanzmantel, dem Dentin. Sie bilden zusammen eine anatomisch-funktionelle Einheit, dessen enge Beziehung sich auf die Entwicklungsgeschichte zurückführen lässt [2]. Die Pulpa ist der Weichgewebeskern des Zahns und enthält in Bindegewebe eingebettete Gefäß- und Nervenstränge. Das lockere Bindegewebe besteht aus kollagenen, oxytalanartigen und retikulären Fasern sowie einer interzellulären, gelartigen Grundsubstanz mit Fibroblasten als stärkste Zellpopulation. Das Pulpagewebe übernimmt sensorische, trophische, dentinbildende, nutritive und defensive Funktionen [3]. Mit ihrem Zellkörper bilden für die Pulpa charakteristische Odontoblasten einen dicht gepackten Saum zum Prädentin hin und sind für eine lebenslange Dentinproduktion verantwortlich. Neben dem Dentin, besteht eine enge Kommunikation zwischen Pulpagewebe und Parodontium, bestehend aus Wurzelzement, Desmodont, Alveolarknochen und Gingiva propria. Sie erfolgt über das apikale Foramen, die lateralen und akzessorischen Kanäle sowie über Pulpaparodontalkanäle [4].

Außer Fibroblasten und Ersatzzellen, finden sich in der Pulpa Zellpopulationen des Immunsystems. T- und B-Lymphozyten, Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen werden in einer Abwehrreaktion nach Kontakt mit einem fremden Antigen aktiv. Ein

vitaler Zahn ist grundsätzlich resistent gegen eine mikrobielle Invasion der gesunden Pulpa, da sie durch die mineralisierten Kristalle der sie umgebenden Zahnhartsubstanzen und Abwehrzellen geschützt wird [5]. Chemische, osmotische, thermische, mechanische und mikrobielle Reize stellen eine Gefahr für die Gesundheit der Pulpa dar, weil sie direkt oder indirekt Wirkung auf die Pulpa-Dentin-Einheit entfalten können. Eine ausgedehnte Karies ist dabei die häufigste Ursache für Pulpaerkrankungen, indem sie aufgrund des Integritätsverlusts den Eintritt für Bakterien und ihre Metabolite in die Pulpakammer ermöglicht [6]. Es kann für eine pulpale Infektion ausreichend sein, dass nach kariöser Destruktion des Schmelzmantels Antigene und bakterielle Toxine durch die Dentinkanälchen der Odontoblastenfortsätze diffundieren. In einer Studie zeigten Hoshino et al. an extrahierten Zähnen die mehrheitliche Übereinstimmung zwischen dem Keimspektrum der Dentinkaries und der in der Pulpa detektierten Keimflora [7]. Demzufolge kann eine Pulpitis immunologisch indirekt ausgelöst werden ohne direkte Exposition der Pulpa zur kariösen Kavität [8, 9].

Die Pulpaphysiologie wird insofern beeinflusst, als bei überschwelligem Reizen zunächst eine reaktive Hyperämie durch Proliferation subodontoblastischer Blutgefäße, Vasodilatation und Freisetzung inflammatorischer Zytokine (z.B. IL 1, IL 6, TNF α), insbesondere nach Erkennung *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) durch Toll-like Rezeptoren (TLR), ausgelöst wird [10]. Entzündungsreaktionen stellen somit eine Abwehrreaktion der Pulpa auf das infektiöse Agens dar, sind im Anfangsstadium reversibel und führen bei frühzeitiger Entfernung der schädigenden Noxe zur kompletten Heilung, der *restitutio ad integrum* [11]. Persistiert der Reiz und ist das Immunsystem nicht in der Lage die Infektion zu bekämpfen, kommt es zur Kolonialisierung der Mikroorganismen, die im Milieu des Wurzelkanalsystems überleben können. Obwohl alle der über 500 bekannten Bakterienarten der oralen Mundflora imstande sind, die Pulpa-Dentin Einheit zu penetrieren, ist nur ein Teil des Mikrobioms für pulpale Infektionen verantwortlich [12]. Die Penetration der Dentintubuli hängt von der Größe der Mikroorganismen und der Morphologie der Tubuli ab [13]. Wachstumslimitierende Faktoren innerhalb des Pulpenkavums sind einerseits der eng begrenzte Lebensraum und andererseits das endodontische Milieu mit eingeschränktem Nährstoffangebot.

Eine Entzündung der Pulpa bedeutet die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, unter anderem von Histamin, Prostaglandinen und Bradykinin. Diese führen zu einer

Vasodilatation und Plasmaextravasation. Indirekt führen aber auch Neuropeptide wie Substanz P und *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) über eine Histaminausschüttung zur Plasmaextravasation. Das Phänomen, dass Neuropeptide als Entzündungsmediatoren wirken, wird als „neurogene Entzündung“ bezeichnet. Folgen der Plasmaextravasation sind der Druckanstieg in der Pulpa sowie die pH-Absenkung. Unterbleibt eine Chronifizierung des Prozesses, ist letztendlich der hämorrhagische Infarkt für die spätere Nekrose der Pulpa verantwortlich [14].

Durch die zunehmend nekrotischen Prozesse wird eine immunologische Bekämpfung der Mikroorganismen unmöglich. Unterbleibt ein zahnärztlicher Eingriff, schreitet der Prozess nach apikal fort und das Wachstum der Mikroorganismen wird durch nekrotisches Gewebe weiterhin begünstigt. Erreicht der Entzündungsprozess das Foramen apikale, dehnt es sich auf periapikale und interradiäre Strukturen aus und eine apikale Parodontitis liegt vor, sobald die Entzündung die Markräume des umliegenden Alveolarknochens erreicht hat [15]. Bereits 1965 konnte an Ratten nachgewiesen werden, dass die entscheidende Ursache einer apikalen Parodontitis die bakterielle Infektion der Pulpa darstellt [16]. Kommt es zum Gleichgewicht zwischen Körperabwehr und bakteriellem Reiz, handelt es sich um einen chronischen Krankheitszustand, der in der Regel klinisch symptomlos verläuft. Wenn die Knochendestruktion weiter zunimmt, manifestiert sich die chronische apikale Parodontitis nach ca. drei bis vier Wochen im Röntgenbild als apikale Transluzenz [17].

2008 untersuchten Rocas und Siqueira in einer Studie 43 Zähne mit chronisch apikaler Parodontitis und stellten dabei einen Zusammenhang zwischen Größe der apikalen Knochendestruktion und Anzahl daran beteiligter Mikroorganismen fest [18].

Bei primären endodontischen Infektionen dominieren anaerobe, Gram-negative Bakterien. Spezies der Gattungen *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Synergistes*, *Proteobacteria*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga* und *Spirochaetes* lassen sich vermehrt in infizierten Wurzelkanälen nachweisen [19-22]. Auf Gattungsebene der Gram-positiven Bakterien werden vor allem *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, und *Lactobacillus* beschrieben.

1.2 Desinfektionsmaßnahmen während der Wurzelkanalbehandlung

Um den Funktionserhalt des Zahns im Kauorgan zu gewährleisten, bleibt oftmals nur die endodontische Behandlung als Therapiemöglichkeit einer Primärinfektion. Dabei wird infiziertes Pulpagewebe entfernt, das Wurzelkanalsystem manuell/maschinell aufbereitet, chemisch mit Spüllösungen desinfiziert und mit einem Wurzelfüllmaterial, in der Regel Guttapercha, möglichst bakteriendicht verschlossen. Ziel der chemomechanischen Aufbereitung mit anschließender Wurzelfüllung ist es, die Lebensbedingungen für Keime soweit zu reduzieren, dass ein mögliches apikales Entzündungsgeschehen mit Unterstützung des intakten körpereigenen Immunsystems erfolgreich bekämpft werden kann.

Die mechanische Aufbereitung der Wurzelkanäle unter aseptischen Kautelen (Kofferdam) soll vitales und nekrotisches Gewebematerial sowie infiziertes Wurzelkanalentin entfernen, um eine intensive Desinfektion durch Spülung und die spätere Aufnahme des Füllmaterials zu gewährleisten [23].

Die chemische Desinfektion mittels antimikrobieller Spüllösungen und medikamentösen Einlagen ist von großer Bedeutung. Sie dient primär dem Ausschwemmen organischen Debris und der Reduktion vorhandener Mikroorganismen und ihrer Toxine, um eine Reinfektion zu verhindern. Studien belegen, dass die desinfizierende Wirkung einer Substanz insbesondere von ihrer Konzentration, der Einwirkzeit und der verwendeten Menge abhängt [17, 24, 25].

Natriumhypochlorit (NaOCl) stellt die am häufigsten verwendete Spülflüssigkeit dar, da es eine gute antibakterielle Wirkung auf die Mehrheit der endodontischen Pathogene hat und es als einzige Spüllösung in der Lage ist, sowohl vitales als auch nekrotisches Gewebe aufzulösen. In der Literatur werden Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0,5% und 5,25% (w/v) bevorzugt. Um eine größtmögliche Desinfektion bei gleichzeitig geringer Zytotoxizität zu erreichen, wird überwiegend die Verwendung von 1-3%-iger NaOCl-Spüllösung empfohlen [4, 17]. NaOCl zeigt unterschiedliche Wirkungen auf endodontische Mikroorganismen. 2010 fanden Retamozo et al. heraus, dass der stark pathogene Keim *Enterococcus faecalis* gegen 1,3%- und 2,5%-ige NaOCl-Lösung weitestgehend resistent war und sich nur mittels 40-minütiger 5,25%-iger NaOCl-Spülung im Dentin abtöten ließ [24]. In neueren Studien konnte jedoch auch für 1-2,5%-iges NaOCl eine erfolgreiche Bekämpfung von *E. faecalis* nachgewiesen werden [26, 27].

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) bindet als Chelator selektiv Kalziumionen des Dentins und besitzt somit gegenüber NaOCl den Vorteil, dass es die präparationsbedingte Schmierschicht, den *smear layer*, entfernen kann. Somit werden die Eingänge der Dentintubuli freigelegt, um anschließend einen bakteriendichten Verschluss durch das Füllmaterial zu ermöglichen. In der Regel wird es als 17%-ige (w/v) Lösung verwendet. Da es nur eine geringe antibakterielle Wirkung besitzt und NaOCl inaktiviert, wird EDTA vorrangig als Abschlussspülung empfohlen [28].

Zwar ist Zitronensäure ebenfalls in der Lage, die während der endodontischen Behandlung entstehende Schmierschicht zu entfernen, jedoch findet EDTA bevorzugt Anwendung [4].

Chlorhexidin (CHX) ist als Desinfektionsmittel mit hoher Substantivität gegen ein breites mikrobielles Spektrum wirksam bei gleichzeitig geringer Toxizität. Im Gegensatz zu Natriumhypochlorit fehlt CHX die wichtige gewebeauflösende Eigenschaft. Auch ist CHX (in 0,2%- bis 2%-iger (w/v) Konzentration) in seiner antimikrobiellen Wirkung NaOCl in der Regel unterlegen, jedoch zeigte es sich als Desinfektionsmittel in einigen Studien gegen *E. faecalis* und *Candida albicans* geeigneter als NaOCl und Kalziumhydroxid [4, 29, 30]. Eine Kombination aus 2%-iger CHX- und NaOCl-Lösung erwies sich als effektive Spülmethode gegen *E. faecalis* [31]. Aufgrund seiner hohen Substantivität und Interaktion mit NaOCl durch Präzipitation wird CHX oftmals als Abschlussspülung empfohlen [3].

Zusätzliche Maßnahmen, wie eine Erwärmung der Spüllösung, eine Schall- oder Ultraschallaktivierung, werden in der Literatur diskutiert, um die desinfizierende Wirkung von Spülflüssigkeiten zu erhöhen [4, 32].

Neben der Spülung während der Wurzelkanalbehandlung wird die temporäre Einlage von Medikamenten zwischen den Behandlungssitzungen empfohlen. Hauptziele sind ebenfalls die Reduktion von Keimen und Inaktivierung ihrer Toxine, die Auflösung verbliebener Gewebsreste und der temporäre Verschluss des Wurzelkanals zur Vermeidung einer Reinfektion. Bei Bedarf kann die medikamentöse Einlage ebenfalls zur Schmerzlinderung eingesetzt werden. Gängige Medikamente sind Kalziumhydroxid (Ca(OH)_2) und CHX. Kalziumhydroxid hat eine gewebeauflösende Wirkung, wirkt antimikrobiell (pH-Wert: 12,5) und induziert die Neubildung von Hartgewebe [33]. Einigen Studien zufolge sind *E. faecalis* und *C. albicans* jedoch gegen Ca(OH)_2 weitestgehend resistent [4, 34, 35]. Zwar wurde in vergangenen Untersuchungen bei Revisionsbehandlungen, die im Zusammenhang mit diesen Keimen diskutiert wurden, eine medikamentöse Einlage mit CHX befürwortet [34, 36], jedoch zeigt sich CHX bezüglich der gewebeauflösenden Eigenschaft gegenüber Ca(OH)_2

unterlegen [4]. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass *E. faecalis* und *C. albicans* nicht alleinige Leitkeime in reinfizierten Wurzelkanälen darstellen, sodass CHX als medikamentöse Einlage kritisch zu beurteilen ist.

Daher ist die Kenntnis über gehäuft vorkommende Keime im Wurzelkanal bei Reinfektion notwendig, um gezielt diese Pathogene mittels wirksamer Desinfektionsmaßnahmen während der Wurzelkanalbehandlung bekämpfen zu können.

1.3 Ätiologie der Reinfektion des Wurzelkanals

Trotz der Desinfektionsmaßnahmen während der endodontischen Primärbehandlung ist der langfristige Erfolg dieser Therapie nur bedingt vorhersagbar. Der Literaturlage nach bewegen sich die Erfolgsraten einer primären Wurzelkanalbehandlung (i. d. R. mit Beobachtungszeiten von 1-5 Jahren) für Zähne mit Pulpanekrose oder irreversibler Pulpitis ohne periapikale Läsion zwischen 85% und 95% [37]. Die Erfolgsquoten für endodontisch infizierte Zähne mit periapikaler Läsion liegen mehrheitlich zwischen 70% und 85% [37]. Mithilfe einer röntgenologischen Kontrolle unmittelbar nach der Wurzelkanalbehandlung können Homogenität, Randständigkeit, Konizität und Länge der Wurzelfüllung beurteilt werden. Die Gründe für eine Reinfektion liegen unter anderem in der Komplexität des Wurzelkanalsystems durch beispielsweise nicht aufzubereitende Kanalabzweigungen mit persistierendem Keimspektrum, unzulängliche Desinfektion vor Obturation oder Verschleppung intrakanalärer Mikroorganismen über den Apex hinaus in apikales Gewebe bei Kanalaufbereitung. Letztlich kann auch eine insuffiziente endorestaurative Versorgung für den Misserfolg der Behandlung verantwortlich sein [38]. Es verhindert einen ausreichend dichten Verschluss, sodass Nischen die Kolonialisierung von Bakterien und Pilzen zulassen und eine Sekundärinfektion begünstigen. Auch bei Ausbleiben klinischer Symptomatik manifestiert sich der Misserfolg einer endodontischen Behandlung in der apikalen und/oder lateralen Transluzenz des wurzelkanalbehandelten Zahns im Röntgenbild [37]. Das Vorliegen einer apikalen Parodontitis bestätigt somit die Insuffizienz der Wurzelkanalfüllung, deren Therapie, neben der Zahnextraktion oder Wurzelspitzenresektion mit retrograder Füllung, in der Revision und erneuter Obturation liegt [39].

In ihrer Studie befassten sich Gomes et al. mit der kulturellen Analyse des Endodonts von Zähnen mit primärer und sekundärer apikaler Parodontitis. Es zeigte sich, dass die

Mikroflora im Wurzelkanal unbehandelter Zähne aus überwiegend Gram-negativen und Gram-positiven Anaerobiern bestand und durchschnittlich mehr als drei Spezies pro Kanal isoliert werden konnten. Im Gegensatz dominierten Gram-positive, fakultative Anaerobier in Kanälen von bereits endodontisch behandelten Zähnen. Die Anzahl der Spezies pro Kanal reduzierte sich auf ein bis maximal drei Spezies [40].

Gajan et al. untersuchten 150 einwurzelige Zähne (101 Zähne mit primärer, 49 mit sekundärer Infektion), indem sie sterile Papierspitzen zur Probennahme in die Wurzelkanäle einführten. Die Arbeitsgruppe detektierte *Peptostreptococcus* und *Streptococcus spp.* als dominante Pathogene in primär infizierten Zähnen. In sekundär infizierten Wurzelkanälen dominierten mit 77% Gram-positive Bakterien. Es wurden *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Porphyromonas* und *E. faecalis* nachgewiesen, letzterer Keim mit höchster Prävalenz [41].

1.4 Diagnostikverfahren zum Pathogennachweis

In bisherigen Studien überwog die Methode, dass Papierspitzen zur Probennahme in den Wurzelkanal eingebracht wurden. Dennoch wirft dieses weit verbreitete Verfahren die Frage auf, ob die Papierspitze als Trägermedium Auswirkung auf die Nachweisbarkeit von Bakterien hat. 2015 publizierten Karygianni et al. ihre Studie, die sich dieser Fragestellung widmete. Sie verglichen die Mikroorganismen der sekundären apikalen Parodontitis im Hinblick auf die angewandte Technik der Probennahme. Die Papierspitze als Entnahmeanstrument wurde der Untersuchung des Wurzelfüllmaterials auf adhärente Bakterien gegenübergestellt. Dabei zeigte sich, dass neun Bakterienspezies nur im Wurzelfüllmaterial und nicht mittels Papierspitze detektiert werden konnten. Die Analyse der entnommenen Proben erfolgte dabei mittels molekulargenetischer Methode und Kultur [42].

Die kulturelle Anzucht zum Nachweis pathogener Mikroorganismen stellte lange Zeit die einzige Methode zur Identifizierung dar [43]. Die Isolierung der Mikroorganismen in Reinkultur und eine daran anschließende Diagnostik ermöglichen die Keimidentifikation. Die in unserer Studie durchgeführte MALDI-TOF Massenspektrometrie ist eine verbreitete Methode der Keimidentifikation. Weitere Diagnostikverfahren sind die Gram-Färbung zur

Differenzierung in Gram-positive und Gram-negative Bakterien sowie der Nachweis der Indolproduktion und der Katalaseaktivität [44].

Spezifische Erreger können durch Spezialnährböden in ihrem Wachstum gefördert, aber auch gezielt unterdrückt werden [44]. Die Ansprüche, die Mikroorganismen für ihr Wachstum und ihre Lebensfähigkeit stellen, können daher sehr unterschiedlich sein. Neben der Auswahl des Nährmediums spielen die Temperatur, der pH-Wert und der Sauerstoffgehalt der Atmosphäre eine wichtige Rolle.

Vorteil der Kultur ist, dass diese Umgebungsfaktoren genau eingestellt und standardisiert werden können. Aber auch charakteristische Fähigkeiten einzelner Spezies können *in vitro* untersucht werden, zum Beispiel mittels Resistenzbestimmung. Dabei wird die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber Antibiotika getestet, um deren Wirkstärke zu bestimmen. Insbesondere bei einer adjuvanten Antibiotikagabe in der Parodontitistherapie hat sich die Resistenzbestimmung der patientenspezifischen Parodontalpathogene gegenüber Antibiotika etabliert [45].

Dem stehen jedoch erhebliche Nachteile gegenüber. Die kulturelle Anzucht und anschließende Nachweisverfahren sind sehr zeit- und kostenintensiv. Zudem lassen sich nach heutigem Forschungsstand nur ca. 50% der oralen Mikroorganismen kulturell nachweisen, sodass viele Spezies bei dieser Methode unentdeckt bleiben. Anaerobier sterben häufig während der Probennahme schon ab, sodass diese ebenfalls nicht detektiert werden. Außerdem müssen kultivierbare Keime in ausreichender Menge vorliegen, um nachgewiesen werden zu können [1, 12].

Es stellt sich daher die Frage, inwieweit mittels Kultur nachgewiesene dominante Mikroorganismen tatsächlich auch im reinfizierten Wurzelkanal dominant sind oder ob es noch weitere Leitkeime gibt, die aufgrund schwieriger Kultivierbarkeit mit dieser Methode nicht identifiziert werden können.

Enterokokken beispielsweise stellen nur geringe Ansprüche an ihre Umwelt, sodass sie leicht zu kultivieren sind. Viele Studien, die *E. faecalis* als dominantes Pathogen im Endodont nachwiesen, wählten die Kultur als Nachweisverfahren [41, 46-49]. Es ist daher zu klären, inwieweit *E. faecalis* tatsächlich eine dominante Spezies im reinfizierten Wurzelkanal darstellt oder ob seine Rolle durch seine leichte Kultivierbarkeit überbewertet wird.

E. faecalis ist ein Gram-positives, fakultativ anaerobes Bakterium und gehört zur Gattung der Enterokokken. Während es normalerweise nicht oder nur in geringen Mengen im

Endodont unbehandelter Zähne zu finden ist, konnte es vermehrt in Wurzelkanälen von Zähnen mit postendodontischer Parodontitis diagnostiziert werden [47, 50-52]. Seine Fähigkeiten, Dentintubuli zu penetrieren und unter extremen Umweltbedingungen zu überleben, sowie seine Resistenz gegen das intrakanaläre Medikament $\text{Ca}(\text{OH})_2$, erhöhen die Pathogenität von *E. faecalis* und sind mögliche Gründe für die Reinfektion wurzelgefüllter Zähne [46, 53-55]. Teilweise zeigten sich die periapikalen Läsionen mit Beteiligung des Keims größer als bei Infektionen mit fehlendem Nachweis von *E. faecalis* [48, 56].

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Prävalenz von *E. faecalis* im Wurzelkanal bei Reinfektion. Zwar beschreiben viele Untersuchungen sein Vorkommen zwischen 10% und 77% [40, 47-50, 52, 57], die Studienergebnisse von Kaufman et al. und Zoletti et al. zeigen aber, dass die Rolle von *E. faecalis* als Hauptauslöser einer Reinfektion infrage zu stellen ist [58, 59]. Ihren Erkenntnissen nach, steht *E. faecalis* eher im Zusammenhang mit wurzelgefüllten Zähnen ohne apikale Läsion. Folglich ist seine Rolle nicht eindeutig geklärt. Kaufman et al. fokussierten sich in ihrer Studie unter anderem auf die Detektion des Problemkeims, indem sie für *E. faecalis* speziesspezifische Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) durchführten und somit die Proben gezielt auf eine Infektion mit diesem Pathogen untersuchen konnten [59].

Die Forschung erhielt Anfang der 1990er Jahre durch Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) einen enormen Aufschwung. An die konventionelle Polymerase-Kettenreaktion schließt sich in der Regel eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte zu deren Detektion an. Zwar ist die konventionelle PCR mit einem höheren Arbeits- und Zeitaufwand verbunden, aber sie ermöglicht es, auch bei Probennahme bereits abgestorbene Mikroorganismen, wie beispielsweise obligate Anaerobier nach Sauerstoffkontakt, nachzuweisen. Selbst bei geringen DNA-Konzentrationen ist eine Keimidentifikation möglich [60].

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion beruht auf der Vervielfältigung eines bestimmten Genbereichs, der durch mindestens zwei sequenzspezifische Oligodesoxyribonukleotide (einen Forward- und einen Reversprimer) begrenzt wird. Durch den Einsatz eines Primerpaars kann die PCR als Monoplex-, durch den Einsatz mehrerer Primerpaare auch als Multiplex-Reaktion ablaufen. Die Größe des PCR-Produkts (Amplikon) ist von den Bindungspositionen der Primer an die Zielregion der genomischen DNA (Template) abhängig. Die Vervielfältigung (Amplifikation) des Primer-flankierten Genomabschnitts wird durch eine hitzestabile Polymerase in ca. 20-40 Zyklen durchgeführt.

Ein Zyklus setzt sich in der Regel aus drei Schritten zusammen: Die Trennung des DNA-Doppelstrangs in ihre zwei Einzelstränge (Denaturierung) erfolgt im ersten Schritt bei 95°C. Durch eine 2-5-minütige Erhitzungszeit zu Beginn wird sichergestellt, dass alle DNA-Moleküle vollständig getrennt voneinander vorliegen. Die Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge (Primerannealing) wird als zweiter Schritt beschrieben. Hierfür muss die Temperatur, je nach Primer, soweit abgesenkt werden, dass eine Primerbindung möglich wird. Davon ausgehend synthetisiert die DNA-Polymerase im dritten Schritt (Elongationsschritt) unter den für sie optimalen Temperaturbedingungen von 68-72°C den Komplementärstrang in 3'-Richtung. Die synthetisierten PCR-Produkte dienen ihrerseits ebenfalls als Matrize im nächsten Zyklus, sodass die Amplifikation exponentiell (2^x) verläuft [61].

Die Pan-PCR (griech. *pãn*: gesamt, umfassend) ist durch den Einsatz von Primern, die in konservierten DNA-Bereichen von Bakterien bzw. Pilzen binden, gering sensitiv und in der Regel bei Vorliegen eines dominanten Keims universell einsetzbar. Je nach Spezifität der Primer können beispielsweise auf Phylums- oder Gattungsebene spezifische PCRs durchgeführt werden. Als hochvariable Region innerhalb der bakteriellen ribosomalen DNA stellt der 16S rDNA-Bereich seit Entdeckung der PCR den Fokus der phylogenetischen Analyse dar und bildet zusammen mit den 23S und 5S rDNA-Regionen eine funktionelle Einheit [62, 63]. In ihrer Studie konnten Schirrmeister et al. mittels Pan-PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung bereits bekannte Keime des reinfizierten Endodonts wie *E. faecalis*, *Streptococcus spp.* und *Fusobacterium nucleatum* nachweisen [64].

Die Pan-Reaktion zum Pilznachweis erfolgt durch Detektion des intergenischen Bereichs der rDNA-Operonstruktur [65]. Jede Transkriptionseinheit bei eukaryotischen Organellen ist aus drei Genen (18S, 5.8S und 28S rDNA) zusammengesetzt, die durch zwei Regionen, die sogenannten *internal transcribed spacer* (ITS 1+2), räumlich voneinander getrennt werden. An die konservierten Genbereiche 18S rDNA und 28S rDNA binden universelle Pilz-Primer [66]. Die die 5.8S rDNA flankierenden ITS-Bereiche 1 und 2 unterliegen häufig Mutationen und stellen somit Pilz-spezifische Genmarker dar [67].

Zwar ließen sich Pilzspezies auch bei primären Wurzelkanalinfektionen nachweisen, wurden aber häufiger mit sekundärer apikaler Parodontitis assoziiert [48, 49, 52, 68]. Im Gegensatz zu anderen *Candida*spezies, besitzt *Candida albicans* die Eigenschaft Dentintubuli zu penetrieren und ist gegen intrakanaläre Medikamente wie Ca(OH)_2 weitestgehend resistent [35, 69]. Weitere Pilzspezies wie *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. parapsilosis* und *Geotrichum candidum* wurden ebenfalls im Zusammenhang mit

therapieresistenter apikaler Parodontitis mittels Kultur und Pan-PCR beschrieben [57, 70, 71]. Es konnte gezeigt werden, dass *Candida* im Wurzelkanal vermehrt zusammen mit Gram-positiven Bakterien, vor allem mit alpha- und nicht-hämolyisierenden Streptokokken, auftritt und in Biofilmen aggregiert [70].

In ihrer Studie untersuchten 2012 Anderson et al. 21 wurzelgefüllte Zähne mit apikaler Parodontitis mittels konventioneller 16S und 18S Pan-PCR mit anschließender Gelelektrophorese zur Analyse der PCR-Produkte [57]. Während sie mittels der Pan-Bakterien PCR *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* und *Bacteroidetes* nachweisen konnten, lieferte die Pan-Pilz PCR keine Ergebnisse. Im Gegensatz wurde *Candida* nur mittels der 16S PCR in einer Probe identifiziert [57]. Dadurch wird deutlich, dass die Sensitivität der Pan-PCR gering ist, sodass anstelle universeller auch speziesspezifische Primer eingesetzt werden können, die an einen für die Spezies charakteristischen Genbereich binden. Je nach Primerspezifität wird die Amplifikation innerhalb einer taxonomischen Ebene (z.B. gattungsspezifisch, artspezifisch) ermöglicht [72].

Neben Bakterien und Pilzen konnten in vereinzelt Studien mittels speziesspezifischen PCRs auch Viren im apikalen Gewebe von Zähnen mit primärer/sekundärer apikaler Parodontitis detektiert werden: Epstein-Barr- [73], humane-Zytomegalie- [74] und Varizella Zoster-Viren [75].

Die konventionelle PCR mit anschließender Gelelektrophorese ist eine rein qualitative Endpunktanalyse. Eine weitere Entwicklung ist die Real-Time PCR (=quantitative PCR bzw. **qPCR**), die zusätzlich eine Quantifizierung der DNA in einem kombinierten Amplifikations-Detektions-Ansatz ermöglicht. Mithilfe eines Thermocyclers ist es möglich, unter gleichen Reaktionsbedingungen simultan multiple PCRs einer Mikrotiterplatte durchzuführen, die computergestützt analysiert werden [76]. In Echtzeit (engl. *Real-Time*) wird während der Zyklen die Fluoreszenz der PCR-Produkte gemessen, die proportional zur DNA-Menge zunimmt. Dies kann entweder durch einen Fluoreszenzfarbstoff (z.B. SYBR-Green I) oder aber durch den Einsatz amplikonspezifischer fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide, sogenannter Sonden (TaqMan-PCR), erfolgen. SYBR-Green I als unsymmetrischer Cyaninfarbstoff bindet relativ sequenzunspezifisch in der kleinen Furche des DNA-Doppelstrangs und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht, sodass ausgehend von einer basalen Fluoreszenz aufgrund anfänglich vorliegender Doppelstrang-Templates die Zunahme der Fluoreszenz der Menge an neu synthetisiertem PCR-Produkt entspricht [77, 78]. Im Gegensatz zur Fluoreszenzfarbstoff-basierten PCR läuft die TaqMan-PCR als 2-

Schritt-PCR mit einem kombinierten Annealing/Elongationsschritt, da beide Schritte unter derselben Temperatureinstellung durchgeführt werden können. Die TaqMan-PCR kann durch den Einsatz von fluoreszenzmarkierten Sonden zum speziesspezifischen Nachweis von verschiedenen Spezies oder verschiedenen Merkmalen eines Keims herangezogen werden.

In ihrer Studie untersuchten Rocas et al. 42 reinfizierte, wurzelgefüllte Zähne mittels qPCR und anschließender Analyse über DNA-DNA Hybridisierung mit bakteriellen DNA-Fragmenten bekannter Sequenzen [79]. Durch diese Methode konnten sie *Propionibacterium spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus spp.* und *Pseudoramibacter alactolyticus* nachweisen. Letztere Spezies gehört zur Ordnung *Clostridiales* und lässt sich als obligater Anaerobier nur schwer kultivieren. Zur spezifischen Detektion von *E. faecalis* und *Streptococcus spp.* führte die Arbeitsgruppe qPCRs mit speziesspezifischen Primern und simultaner Färbung mit SYBR-Green durch. So konnten in einer nachfolgenden Schmelzkurvenanalyse die PCR-Produkte identifiziert und mit den für die jeweiligen Spezies bekannten Schmelzpunkten verglichen werden. Mittels dieser Methode war es möglich, in 38% der Proben *E. faecalis* und in 41% der Proben *Streptococcus spp.* nachzuweisen [79]. *Streptococcus spp.* zählen zu den Gram-positiven Laktobazillen, sind fakultativ anaerob und lassen sich leicht kultivieren. Sie werden mittels Kultur und molekulargenetischer Analyse sowohl in der oralen Mikroflora [12, 80], als auch im Endodont von Zähnen mit primärer und sekundärer apikaler Parodontitis nachgewiesen, letzterer Fall mit einer durchschnittlichen Prävalenz von ca. 20% [7, 22, 41, 48, 49, 81, 82].

Neben *Streptococcus spp.* wurden *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Propionibacterium spp.*, *Fusobacterium nucleatum* und *Actinomyces spp.* mittels speziesspezifischer und 16S Pan-PCRs sowie im Kulturverfahren vermehrt in Wurzelkanälen von Zähnen mit postendodontischer apikaler Parodontitis beschrieben [22, 47, 49-51, 79, 83]. Resistenzen gegenüber Desinfektionsmittel und die Fähigkeiten, Dentintubuli zu penetrieren, an extreme Umweltbedingungen zu adaptieren und Toxine zu produzieren, sind Beispiele, die die Virulenz dieser Keime ausmacht und ihr Überleben im gefüllten Wurzelkanal erklären [84].

Die Wahl des Diagnostikverfahren beeinflusst den Pathogennachweis insofern, als mittels molekulargenetischen Methoden beispielsweise auch nicht oder schwer kultivierbare Keime nachgewiesen werden können.

In ihrer Studie untersuchten Fernandes et al. mittels Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung und Epifluoreszenzmikroskopie die Prävalenz von schwer kultivierbaren Gram-negativen, anaeroben Bakterien des Stamms *Synergistetes* im infizierten Endodont und fanden sie zwar insbesondere in wurzelgefüllten Zähnen, jedoch seltener als die dominanten *Fusobacteria* und *Actinomyces* [85]. Auch Vengerfeldt et al. konnten dies in ihrer Untersuchung bestätigen und detektierten darüber hinaus mittels Hochdurchsatz-Sequenzierungen (sog. *Next Generation Sequencing*) schwer kultivierbare Vertreter der Stämme *Spirochaetes* und *Bacteroidetes* [86]. 2005 beschrieben Siqueira und Rocas *Synergistes* als dominanteste Gattung des *Synergistetes*-Stamms, indem sie speziesspezifische Primer zur Amplifikation in die Polymerase-Kettenreaktion einsetzten, um somit auf Gattungsebene gezielte Sequenzen zu amplifizieren. Die Prävalenz der *Synergistes*-Spezies sank von maximal 33% bei primären Infektionen auf ca. 4,5% bei sekundären Infektionen [87]. Die schwer kultivierbaren *Synergistes* sind demzufolge in infizierten wurzelgefüllten Zähnen zu finden, jedoch insgesamt mit geringer Prävalenz.

Häufig beschriebene Spezies-Vertreter der schwer kultivierbaren *Bacteroidetes* sind *Tannerella forsythia* [82, 88, 89] und *Prevotella spp.* [88, 90]. Die Gattungen *Treponema* (Stamm: *Spirochaetae*), *Haemophilus* (Stamm: *Proteobacteria*) und *Atopobium* (Stamm: *Actinobacteria*) konnten ebenfalls erst durch molekulargenetische Analysen in infizierten Wurzelkanälen nachgewiesen werden [51, 88-92].

Vor allem *Treponema* wurde im Zusammenhang mit endodontischen Infektionen beschrieben. Nóbrega et al. untersuchten 39 reinfizierte wurzelgefüllte Zähne und konnten mittels speziesspezifischen PCRs in 22/39 Wurzelfüllmaterial-Proben *Treponema* nachweisen, vor allem die bereits bei Parodontitis-Patienten nachgewiesenen Spezies *T. denticola* und *T. maltophilum* [93, 94]. Ebenfalls mithilfe speziesspezifischer Primer konnten Baumgartner et al. *Treponema spp.* auch in Proben aus apikalen Abszessen (in 51/84 Fällen) und primär infizierten Wurzelkanälen (in 20/54 Fällen) nachweisen [95].

Gerade für zahnmedizinische Studien ist eine molekulargenetische Analyse von Bedeutung, da ungefähr 50% der oralen Mikroorganismen nicht kultivierbar sind [12]. Munson et al. konnten in ihrer Untersuchung zeigen, dass mittels Pan-PCR ein größeres Keimspektrum im Wurzelkanal nachgewiesen werden konnte, als es bislang im Kulturverfahren möglich war [92].

1.4 Zielsetzung

Ziel der prospektiven Studie war es, durch Isolierung und Detektion von Bakterien und Pilzen aus wurzelgefüllten Zähnen bei Vorliegen einer postendodontischen apikalen Parodontitis ein detailliertes Verständnis der Mikroflora im reinfizierten Wurzelkanal zu gewinnen. Insbesondere soll die umstrittene Rolle von *E. faecalis* als Leitkeim im Wurzelkanal bei Vorliegen einer postendodontischen apikalen Parodontitis geklärt werden.

Die Besonderheit der Studie lag unter anderem in der Probennahme, indem (neben der subgingivalen Plaque und einer Desinfektionskontrolle) die entfernte Guttapercha als Probenmaterial diente, die in einem molekulargenetischen Ansatz im Vergleich zur Kultur analysiert werden sollte. Mittels der Studienergebnisse sollte erörtert werden, inwiefern sich das Kulturverfahren auch für Proben mit geringer Anzahl an Bakterien und Pilzen eignet, oder ob die PCR als Standardmethode zu befürworten ist. Somit stand die Gegenüberstellung beider Nachweisverfahren im zweiten Fokus der vorliegenden Arbeit.

Für unsere Studie konnten daher folgende Nullhypothesen formuliert werden:

1. Der Keimnachweis mittels Kultur stellt den Goldstandard dar.
2. *E. faecalis* ist der Leitkeim im Wurzelkanal bei Vorliegen einer sekundären apikalen Parodontitis.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in vorliegender Studie verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

0,9% (w/v) NaCl	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
3% (w/v) NaOCl	Heidinger, Stuttgart, Deutschland
30% (w/v) H ₂ O ₂	Heidinger, Stuttgart, Deutschland
5% (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃	Apotheke des Universitätsklinikums Düsseldorf
96-Well-Platte mit Deckelstreifen	4titude, Surrey, England
96% (v/v) Ethanol	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Einmal-Impföse	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
eSwap Transportsystem	Hain Lifescience, Nehren, Deutschland
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hedström Feilen (21/25/31mm, ISO 15-60)	VDW, München, Deutschland
Invitrogen destilliertes Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kochblut-Zellkulturplatte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
OpalDam	Ultradent Products, South Jordan, UT, USA
Präzisions-Wischtuch	Kimberly-Clark, Koblenz, Deutschland
Primer (s. Kap. 2.1.2)	metabion, Planegg, Deutschland
Sabouraud-Dextrose-Zellkulturplatte	Mast Diagnostica, Bootle, UK
Safe Lock Tubes (1,5ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schaedler-Zellkulturplatte	bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich
Tris	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Primer und Sonden

Folgende Primer und Sonden der Firma metabion (Planegg, Deutschland) wurden für die Real-Time PCRs verwendet.

Primer	Sequenz 5'-3'	Größe (nt)
16S F [96]	AGA GTT TGA TCN TGG YTC AG	20
16S F11 ¹	AGA GTT TGA TCN TGG YTC AGW H	22
16S F12 ¹	AGT TTG ATC NTG GYT CAG SH	20
16S F2 ²	GTG CCA GCA GCT GCG GTA AT	20
16S F22 ¹	CAG CCG CGG TAA TAC RB	17
16S R1 [96]	GWA TTA CCG CRG CKG CTG	18
16S R2 [97]	CCG TGA ATT CHT TTR AGT TT	20
16S R22 ¹	CCC CAG GCG GDN ARY TT	17
338 R ²	TGC TGC CTC CCG TAG GAG T	19
5.8 S [98]	CGC TGC GTT CTT CAT CG	17
Can F [99]	CCT GTT TGA GCG TCR TTT	18
hgap F [100]	CCA CCC ATG GCA AAT TCC	18
hgap R [100]	ATG GGA TTT CCA TTG ATG ACA AG	23
hgap S [100]	FAM ^a - TGG CAC CGT CAA GGC TGA GAA CG -BHQ1 ^b	23
ITS1 [66]	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	19
ITS4 [99]	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	20
Uni [101]	TCT TTG AAC GCA CAT TGC GCC	21

Tabelle 1: Primer- und Sondensequenzen

¹ Im Rahmen dieser Studie neu designte Primer, ² Von der Arbeitsgruppe Henrich designte Primer,

^a 6-Carboxyfluorescein (Reporter-Farbstoff), ^b "Black Hole Quencher"

2.1.3 Kits

DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

2.1.4 PCR Mastermixe

2 x MESA Green qPCR Mastermix Plus for SYBR Assay with fluorescein	Eurogentec, Lüttich, Belgien
2 x qPCR Mastermix - No ROX	Eurogentec, Lüttich, Belgien

2.1.5 Geräte

Anoxomat Mark	Advanced Instruments, Norwood, MA, USA
Anoxomat Mark Anaerobiertopf	Advanced Instruments, Norwood, MA, USA
CO ₂ -Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MiniSpin Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 1000 Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Thermocycler CFX 96 Touch	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex-Schüttler	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.6 Software

Die selbst designten Primer wurden mithilfe der Software *DNASTAR* synthetisiert.

Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio-Rad, Hercules CA, USA
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) http://www.ncbi.nih.gov/blast.cgi	NCBI, Bethesda, MD, USA
Chromas Lite 2.1	Technolysium Pty. Ltd., Brisbane, Australien
DNASTAR Lasergene 6.0	DNASTAR, Madison, WI, USA
GraphPad Prism 5	Graphpad Software, La Jolla, CA, USA
NanoDrop 1000 3.8	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Kautelen der Arbeitsabläufe

Die einzelnen Arbeitsschritte der Studie unterlagen steriler Kautelen (Sicherheitsmaßnahmen). Während der zahnärztlichen Behandlung wurde stets steriles Instrumentarium verwendet, der zu behandelnde Zahn mittels Kofferdam und OpalDam isoliert und anschließend mit 30%-igem (w/v) H₂O₂ und 3%-igem (w/v) NaOCl desinfiziert (s. Kap. 2.2.3). Nach Überführung der Proben in die eSwab-Transportröhrchen wurden diese direkt verschlossen und die Proben innerhalb von vier Stunden aufbereitet. Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte im mikrobiologischen Labor wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dabei erfolgten die Sedimenterstellung, der Plattenausstrich und die DNA-Aufreinigung aus dem Primärmaterial unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II. Die Herstellung der PCR-Mixe wurde unter einer PCR-Werkbank mit UV-Bestrahlung durchgeführt. Die Testung jedes neu hergestellten PCR-Mixes sowie das gelegentliche Mitführen von Elutionspuffer und verwendetem Verdünnungsmittel im PCR-Lauf dienten als Negativkontrolle und stellten sicher, dass unter sterilen Kautelen gearbeitet wurde. Verwendete Materialien (PCR Mastermix, Primer, etc.) wurden nach Herstellerangaben gelagert.

2.2.2 Patientenkollektiv

Insgesamt 17 weibliche und 25 männliche Probanden mit einem durchschnittlichen Alter von 52 Jahren (Median: 50,5 Jahre) nahmen an der Studie teil. Davon waren sechs männliche Patienten Raucher.

Das Untersuchungsgut bestand aus 42 Proben von endodontisch behandelten Zähnen, deren Wurzelfüllungen infolge einer apikalen Parodontitis revidiert werden mussten.

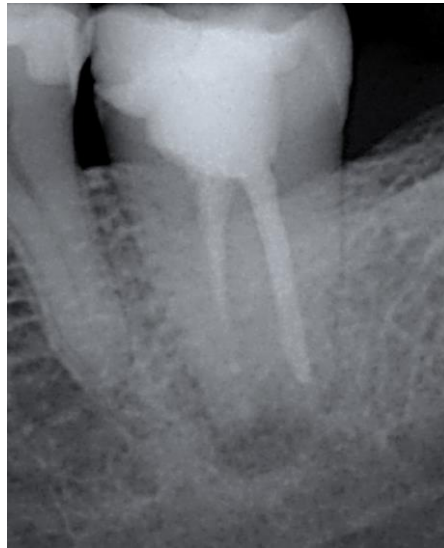


Abb. 1: Wurzelgefüllter Zahn 37 mit einer postendodontischen apikalen Parodontitis

17 einwurzelige und 25 mehrwurzelige Zähne wurden untersucht. 39 von 42 Patienten waren klinisch symptomfrei und nur 3 Patienten gaben anamnestisch Zahnschmerzen mittlerer Intensität an und wurden daher in folgender Arbeit nicht gesondert betrachtet. Anhand von röntgenologischen Befunden wurde die Diagnose einer postendodontischen apikalen Parodontitis gestellt und entsprechend wurden die Patienten in der Poliklinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Endodontologie des Universitätsklinikums Düsseldorf behandelt. Dabei unterschied die Studie nicht speziell nach Alter und Geschlecht des Patienten, jedoch unterlag die Auswahl der Probanden folgenden Einschlusskriterien:

- wurzelkanalbehandelter Zahn mit röntgenologischen Zeichen einer postendodontischen apikalen Parodontitis
- Distanz zwischen radiologischem Apex und Wurzelfüllung ≤ 5 mm
- parodontale Sondierungstiefen ≤ 5 mm
- keine Antibiotikaeinnahme in den letzten drei Monaten
- abgeschlossenes Wurzelwachstum
- kein Vorliegen einer andersartigen Infektion

Die Patienten wurden im Vorfeld sowohl mündlich als auch schriftlich über die Studie aufgeklärt und mussten in schriftlicher Form ihre Zustimmung bestätigen. Von der

Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf wurde die klinische Studie genehmigt (Ref. Nr.: 5010).

2.2.3 Proben

Erfüllte ein Proband die zuvor genannten Einschlusskriterien und stimmte der Teilnahme an vorliegender Studie zu, fand zu Beginn der Behandlung die klinische Inspektion des Zahns und die Erhebung der Sondierungstiefen statt, sodass der zuvor erhobene röntgenologische Befund um den klinischen ergänzt werden konnte. Jeweils drei Proben wurden pro Patient entnommen, die auf mögliche mikrobielle Korrelation untereinander untersucht werden sollten (siehe Abb. 2).

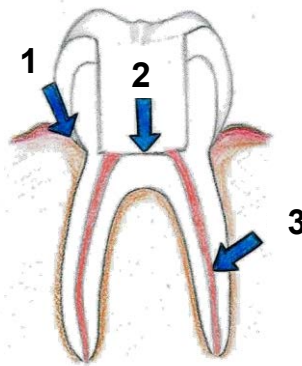


Abb. 2: Schematische Darstellung der Probennahme

1: subgingivale Plaqueprobe; 2: Desinfektionskontrolle; 3: entferntes Wurzelfüllmaterial

Probe 1 war eine subgingivale Plaqueprobe, die das probandenspezifische polymikrobielle Gemisch in Zahnnähe widerspiegelte. Nach Präparation der Pulpakammerkavität wurde nach Desinfektion die zweite Probe entnommen, die, sofern es in der unsterilen Mundhöhle möglich war, als Desinfektionskontrolle des Pulpakammerbodens galt. Das entfernte Wurzelfüllmaterial stellte die dritte Probe dar (s. Abb. 2).

Das für den Transport der Proben verwendete Medium war das eSwab-System, welches sowohl für aerobe, anaerobe und anspruchsvolle Bakterien als auch Pilze geeignet ist. Das eSwab-System besteht aus einem Plastikröhrchen gefüllt mit 1 ml modifiziertem flüssigem

Amies-Medium und einem Nylon-Flockfaser-Abstrichtupfer. Auch wenn letzterer nicht als Hilfsmittel zur Probennahme diente, wurde er dem Transportmedium mit der Probe zugefügt, da er als Bestandteil des 2-Komponenten-Systems für die validiert gesteigerte Ausbeute des Probenmaterials sorgte und zusammen mit dem Amies-Medium eine bessere Suspension der Probe ermöglichte. Mit Hilfe des Abstrichtupfers erfolgte zudem das Beimpfen der Platten zur Kultivierung von Bakterien und Pilzen.

Vor Anlegen des Kofferdams erfolgte die erste Probennahme, um in der späteren Analyse die orale Mikroflora des jeweiligen Patienten beurteilen zu können. Mit Hilfe eines dem wurzelgefüllten Zahn entsprechenden Handscalers wurde ein Abstrich von subgingivaler Plaque zirkulär entnommen und in das erste eSwab-System gegeben. Zusätzlich diente eine sterile Papierspitze zur Probennahme, die mit Hilfe einer zahnärztlichen Pinzette in den Sulkus des Zahns geführt, dort einige Sekunden belassen und anschließend in dasselbe eSwab-Transportmedium gegeben wurde. Der Nylon-Flockfaser-Abstrichtupfer wurde in das Röhrchen eingeführt, an der Einkerbung abgeknickt und das Röhrchen mit dem Schraubverschluss verschlossen. Die Beschriftung der Probe erfolgte auf dem dafür vorgesehenen Etikett des eSwabs.

Nach Anlegen und Abdichten des Kofferdams mit OpalDam erfolgte die Desinfektion des Zahns und umliegender Bereiche mit 30%-igem (w/v) H_2O_2 und anschließend 3%-igem (w/v) NaOCl für jeweils ca. 10 Sekunden. Im Anschluss daran diente 5%-iges (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zu deren Inaktivierung. Zur Applikation der Lösungen wurden jeweils sterile Wattepellets und eine zahnärztliche Sonde verwendet. Auf die Trepanation des Zahns mit einem der Zahnmorphologie entsprechend gewählten zylindrischen Diamantbohrer folgte die Desinfektion der Zugangskavität erneut mit 30%-igem H_2O_2 , 3%-igem NaOCl und schließlich 5%-igem $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Die Kavität wurde mit einem sterilen Wattepellet getrocknet und als finaler Schritt vor Entfernung des Wurzelfüllmaterials erfolgte die zweite Probennahme, indem mit einem sterilen Wattepellet, das zuvor mit steriler 0,9%-iger (w/v) NaCl -Lösung angefeuchtet worden war, über den Kavitätenboden gestrichen wurde. Diese als Desinfektionskontrolle dienende Probe 2 wurde ebenfalls ins eSwab-System überführt.

Um das intrakanaläre Keimspektrum untersuchen zu können, begann die Revision mit der koronalen Entfernung des Wurzelfüllmaterials mittels Gates-Glidden Bohrer. Die geöffnete Pulpakammer mit Blick auf die noch mit Guttapercha gefüllten Wurzelkanäle ist in Abbildung 3 dargestellt.



Abb. 3: Eröffnete Pulpakammer (Abdichtung des blauen Kofferdams mit Opaldam)

Die Guttapercha des mittleren bzw. apikalen Wurzelkanaldrittels wurde mit einer der Kanalmorphologie entsprechenden Hedström-Feile entfernt. Vorsichtig wurde die Feile bis zur Verankerung in der Wurzelfüllung in den Kanal unter Drehbewegung eingeführt und dann herausgezogen. Die dadurch entfernten Späne des Wurzelfüllmaterials wurden sofort in dem Proberöhrchen 3 gesammelt und die letzten Späne gemeinsam mit der Hedström-Feile ins eSwab-System überführt.

Nach Entnahme der dritten Probe erfolgte die reguläre Weiterbehandlung der Kanalaufbereitung und Obturation.

2.2.4 Kultivierung

Maximal vier Stunden nach Probennahme erfolgte die Aufarbeitung der Proben im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Düsseldorf. Der Ausstrich auf Festnährböden verfolgte das Ziel der Gewinnung von Einzelkolonien zur Detektion kultivierbarer Bakterien und Pilze. Eingesetzter Verdünnungsausstrich war der fraktionierte Dreiösenausstrich. Zunächst wurden die Abstrichröhrchen für 10 Sekunden mit dem Vortex-Schüttler vorbehandelt, um eine gleichmäßige Durchmischung des Amies-Mediums zu erreichen. Der eSwab-Abstrichtupfer wurde dem Transportröhrchen entnommen und am Rand der jeweiligen Nährplatte abgestrichen, sodass die anhaftende Suspension auf die Platte lief. Mit einer sterilen Einmal-Impföse aus Kunststoff wurde die Suspension im 1. Sektor der Platte ausgestrichen, indem

diese mit leichtem Druck in einer Zick-Zack Bewegung von Rand zu Rand bis zur Hälfte der Platte geführt wurde. Die Platte wurde um ca. 70° gedreht und mit einer neuen Impföse der zweite Sektor beimpft. Der Ausstrich begann dabei hinter dem ersten, sodass bereits ausgestrichenes Material aufgenommen und verteilt wurde. Die Beimpfung des dritten Sektors erfolgte analog. Die Dichte der Zick-Zack-Linien nahm jedoch zum jeweils darauffolgenden Sektor ab, was somit die Gewinnung von Einzelkolonien ermöglichte (s. Abb. 4).

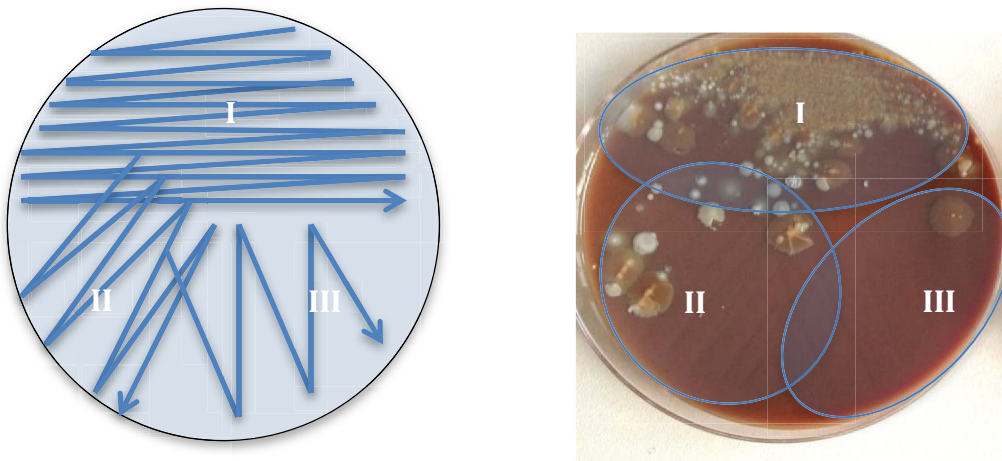


Abb. 4: Schematische Impfstrichführung des Dreiösenausstrichs (links) und beimpfte sowie bebrütete Kochblutplatte mit der Plaqueprobe von Patient 4 (rechts)
Sektoren I-III nummeriert bzw. mit blauer Schattierung markiert (rechts).

Mit den drei Proben eines Patienten wurden drei Festnährböden beimpft:

- Zur Anzucht von **Aerobiern** wurden Kochblutplatten verwendet, die bei 5-10%-iger CO₂-Atmosphäre und 37°C für zwei Tage bebrütet wurden.
- Die Kultivierung von **Anaerobiern** erfolgte auf Schaedler-Nährböden für vier Tage bei 37°C in Anoxomat Mark Anaerobiertöpfen, die unter Zugabe eines Katalysators mit einem Gasmisch aus 85%-igem Stickstoff, 10%-igem Wasserstoff und 5%-igem Kohlenstoffdioxid befüllt wurden. Die Entfernung des Restsauerstoffs erfolgte automatisch durch Anschließen des Anaerobiertopfes an den Anoxomat und wurde durch vorheriges Einlegen eines Anaeroteststreifens dokumentiert.
- Zur Anzucht von **Pilzen** wurden Sabouraud-Dextrose-Platten als Selektivnährböden gewählt, die für sieben Tage bei 30°C unter aeroben Bedingungen inkubiert wurden.

Nach den jeweils angegebenen Zeiten wurde das Wachstum von Mikroorganismen auf den Platten begutachtet, die Keime identifiziert und tabellarisch erfasst.

Zur Identifizierung der Spezies wurde die MALDI-TOF Massenspektrometrie genutzt, die eine Kombination von Matrix-Assistierter Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) und Flugzeitanalyse (TOF, engl. *time of flight*) aufgetrennter Ionen darstellt. Die Bakterien mussten hierzu in frischer Reinkultur vorliegen und in der Regel war eine Kolonie für eine Analyse ausreichend. Die Kolonie wurde in der MALDI-TOF Matrix auf einem Objektträger resuspendiert und getrocknet. Nach Einführung in das zugehörige Gerät erfolgte die Ablation durch einen gepulsten Laserstrahl, der Moleküle aus der Probe herauslöste. Durch die Aufspaltung der Pilz- und Bakterienbestandteile hinterließ jede Spezies ein individuelles Massenmuster, das durch den Abgleich mit Datensätzen den Keimnachweis lieferte [102]. In vorliegender Studie wurde die MALDI-TOF Analyse federführend durch Dr. Adriana Balasiu aus der Diagnostikabteilung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene durchgeführt.

2.2.5 Präparation genomischer DNA mittels DNeasy Blood & Tissue Kit

Die Aufarbeitung der genomischen DNA aus den Patientenproben erfolgte im Anschluss an die Beimpfung der Nährmedien (s. Kap. 2.2.4). 800µl des resuspendierten Primärmaterials wurden aus dem Amies-Medium des eSwab-Transportsystems in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert und die enthaltenen Zellen (humane Zellen, Bakterien, Pilze) für 10 Minuten bei 13.400 x g sedimentiert. Der klare Überstand wurde anschließend entfernt und verworfen, wobei darauf zu achten war, dass das Sediment nicht berührt wurde. Bis zur DNA-Aufreinigung aller 126 Proben (42 Probanden à 3 Proben) wurden die Sedimente bei -20°C gelagert.

Für die DNA-Aufreinigung wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit verwendet und nach dem Herstellerprotokoll für Gram-positive Bakterien verfahren. (Lediglich die Inkubationszeit mit Proteinase K wurde von 30 auf 60 Minuten erhöht.) Dieses Verfahren ermöglichte eine einfache und schnelle DNA-Isolation, indem die gereinigte DNA an der Silika-Membran haftete und anschließend in 50-100µl Elutionspuffer von der Säulenmatrix eluiert wurde.

2.2.6 Spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der genomischen DNA-Präparation erfolgte durch photometrische Messungen im UV-Bereich. Hierzu wurde das NanoDrop-1000 Spektrophotometer genutzt, das die Absorption der Probe bei 260nm (für DNA) und 280nm (für Proteine) maß. Die Höhe der Extinktion bei 260nm (= optische Dichte OD_{260nm}) korrelierte dabei mit der Konzentration an Nukleotiden. Verantwortlich hierfür waren die Absorptionseigenschaften der aromatischen Ringe der Basen. 50µg/ml doppelsträngige DNA entsprachen bei dieser Wellenlänge einer optischen Dichte von 1.

Zu Grunde lag folgende Formel:

$$c [\mu\text{g dsDNA /ml}] \approx OD_{260nm} \times 50$$

Für die Konzentrationsbestimmung wurde die zum Spektrophotometer gehörige Software *NanoDrop 1000 3.8* unter dem Profil „Nukleinsäure“ gestartet. Zur Kalibrierung des Spektrophotometers wurde 1µl des Elutionspuffers des DNeasy Blood & Tissue Kits verwendet, auf den Probeneller pipettiert, der Arm des Sensors aufgelegt und die Messung des reinen Puffers als „Blank“ gemessen. Anschließend wurde der Puffer mit einem Präzisions-Wischtuch abgewischt und durch 1µl der Probe ersetzt, vermessen und hinterher der Probeneller wieder gereinigt. Regelmäßige "Reblanks" mit Elutionspuffer zwischen den Patientenproben minimierten dabei mögliche Messfehler. Mit der Software wurde eine tabellarische Darstellung der gemessenen OD-Werte bei 230nm, 260nm und 280nm, wie auch die Konzentration der Probe in ng/µl geliefert und eine grafische Darstellung des Wellenlängenbereichs von 220nm bis 350nm ermöglicht, um die Reinheit der DNA bei 260nm und verunreinigende Substanzen wie Lösungsmittel bei 230nm oder Proteine bei 280nm beurteilen zu können.

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die in vorliegender Studie durchgeführte TaqMan-PCR zum Nachweis des humanen GAPDH-Gens (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) wurde unter Verwendung des Thermocyclers CFX 96 Touch durchgeführt. Die Dehydrogenase katalysiert die Umwandlung von D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat in 1,3-Diphospho-D-Glycerat. Als sogenanntes *single copy* Gen, d.h. es kommt nur einmal im gesamten Genom vor,

entsprachen die nachgewiesenen Kopien des GAPDH-Gens der Anzahl nachgewiesener humaner Zellen. Bei fehlendem Nachweis des humanen GAPDH-Gens in einer Patientenprobe 1 (und 3) mussten mögliche Inhibitoren der PCR angenommen werden [76]. Konnte eine Inhibition ausgeschlossen werden, war in der Regel die DNA-Güte der Probe für einen Keimnachweis nicht ausreichend.

Die Herstellung des PCR-Mixes für die GAPDH-PCR sowie seine Verteilung auf die Wells einer 96-Well-Platte (je 22,5µl/Well) wurden im Mastermix-Raum durchgeführt. Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung des PCR-Mixes mit 2x qPCR Mastermix - No ROX.

Bestandteil	Volumen	Endkonzentration
DNA-Template	2,5 µl	1/10
2x Mastermix	12,5 µl	1x
hgap F (100µM)	0,075 µl	0,3 µM
hgap R (100µM)	0,075 µl	0,3 µM
hgap S (100µM)	0,05 µl	0,2 µM
Aqua dest.	10,0 µl	-

Tabelle 2: Zusammensetzung des PCR-Mixes für die GAPDH-PCR

Um die Kontamination der PCR-Mixe und des Arbeitsplatzes zu vermeiden, erfolgte die Zugabe der DNA der Patientenproben und Quantifizierungsstandards in einem separaten Raum. Hier wurden je 2,5µl der DNA-Proben zum PCR-Mix pipettiert. Nach DNA-Zugabe enthielt der fertige PCR-Mix in seiner Endkonzentration 1x Mastermix (bestehend aus Reaktionspuffer, dNTPs (inklusive dUTP), HotGoldStar DNA Polymerase, AmpErase, 5mM MgCl₂ und Stabilisatoren), das Primerpaar hgap F und -R (je 0,3µM) und die mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM (6-Carboxyfluorescein) markierte Sonde hgap S (0,2µM). Um die Kontaminationsfreiheit des PCR-Mixes zu bestätigen, enthielt ein Well nur den PCR-Mix ohne Patientenprobe bzw. Standard (Negativkontrolle).

Zur simultanen Amplifikation von Quantifizierungsstandards wurden zusätzlich plasmidklonierte GAPDH-PCR-Produkte in Konzentrationen von 2,5E+02, 2,5E+03 und 2,5E+05 pipettiert [103]. Die Wells wurden mit Achter-Deckelstreifen pro Spalte verschlossen und die Plattenbelegung der PCR entsprechend tabellarisch notiert.

Die GAPDH-PCR lief unter dem PCR-Protokoll 1 mit folgenden Bedingungen:

Schritt	Dauer	Temperatur
Aktivierung AmpErase	10:00 min	50°C
Denaturierung genomischer DNA	10:00 min	95°C
+Inaktivierung AmpErase		
Denaturierung	40x {	95°C
Primerannealing+Elongation		60°C

Tabelle 3: PCR-Protokoll 1

Um falsch positive Ergebnisse durch Verschleppung von PCR-Produkten zu vermeiden, enthielt der PCR-Mastermix AmpErase Uracil N-Glycosylase (UNG) [104], die bei 50°C Uracil aus einzel- und doppelsträngiger DNA entfernt, das in vorangegangenen Amplifikationen in die PCR-Produkte eingebaut worden war [105]. So wurden eingeschleppte PCR-Produkte im zehnmütigen 50°C-Schritt zu Beginn der PCR abgebaut und standen in der nachfolgenden PCR somit als Template nicht mehr zur Verfügung. Die AmpErase wurde dann im nächsten Schritt durch den Temperaturanstieg auf 95°C inaktiviert, sodass als Template für die GAPDH-PCR nur noch die genomische DNA der Patientenprobe dienen konnte.

In der vorliegenden Studie wurden zum mikrobiellen Nachweis Real-Time PCR-Assays verwendet, bei denen außer dem Primerpaar SYBR-Green I als Fluoreszenzfarbstoff verwendet wurde. Die in die jeweilige PCR eingesetzten Primerpaare, die Amplikongröße der PCR-Produkte, das verwendete PCR-Protokoll sowie der PCR-Mix sind in Tabelle 4 aufgelistet.

PCR	Primerpaar ^{a,b}	Amplikongröße (bp)	Protokoll	Mix
16S 500	16S F, 16S R1	500	2	1
16S 900	16S F, 16S R2	900	2	1
16S_N1	16S F11, 16S F12, 16S R1	529, 534	2	1
16S_N1-11	16S F11, 16S R1	529	2	1
16S_N1-12	16S F12, 16S R1	534	2	1
16S_N2	16S F2, 16S R22	374	2	1
16S_N3	16S F22, 16S R2	405	2	1
Pan-Pilz	ITS1, ITS4	660	2	1
Pan-Pilz_2	Pan-Pilz_2.1+_2.2		3	1
Pan-Pilz_2.1	ITS1, 5.8S	250-300	3	2
Pan-Pilz_2.2	Uni, ITS4	280-300	3	2
Candida	Can F, ITS4	230-310	3	1

Tabelle 4: Übersicht über die verschiedenen PCR-Assays

^a Primersequenzen sind in Tabelle 1 aufgeführt, ^b in den PCR-Mix eingesetzt mit einer Molarität von jeweils 100µM

Die Ansätze für die PCR wurden mit MESA Green qPCR Mastermix Plus for SYBR Assay with fluorescein hergestellt, bestehend aus Reaktionspuffer, dNTPs (inklusive dUTP), MeteorTaq DNA Polymerase, MgCl₂ (4mM Endkonzentration), SYBR-Green I, Stabilisatoren und Fluorescein. In Tabelle 5 ist die Zusammensetzung der PCR-Mixe der in Tabelle 4 gelisteten PCRs dargestellt:

Bestandteil	Mix 1	Mix 2
	Volumen/ Endkonzentration	Volumen/ Endkonzentration
DNA-Template	2,5 µl/ -	2,5 µl/ -
2x Mastermix	12,5 µl/ 1x	12,5 µl/ 1x
Primer Forward (100µM)	0,2 µl/ 0,8 µM	0,1 µl/ 0,4 µM
Primer Revers (100µM)	0,2 µl/ 0,8 µM	0,1 µl/ 0,4 µM
Aqua dest.	9,6 µl/ -	9,8 µl/ -

Tabelle 5: Zusammensetzung der PCR-Mixe

Die Candida-PCR, Pan-Pilz_2, sowie Pan-Pilz_2.1 und _2.2 liefen unter folgendem PCR-Amplifikationsprofil:

Schritt	Dauer	Temperatur
Start	10:00 min	95°C
Denaturierung	40x {	95°C
Primerannealing+Elongation		60°C
Schmelzkurvenanalyse	0:15 min	95°C
	1:00 min	60°C
	0:15 min	65°C
Starttemperatur		65°C
Endtemperatur		95°C
Temperaturinkrement	0:15 min	0,5°C

Tabelle 6: PCR-Protokoll 3

Zur Charakterisierung der entstandenen PCR-Produkte im SYBR-Green-Assay diente die Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an die Amplifikation. Das Temperaturprofil begann mit der Einstellung auf 65°C, gefolgt von einer schrittweisen Temperaturerhöhung um je 0,5°C bis auf 95°C (s. Tabelle 6). Jeder Temperaturschritt wurde 15 Sekunden gehalten und anschließend das Fluoreszenzsignal der Probe gemessen.

Tabelle 7 zeigt das Amplifikationsprofil für 16S 500/900, Pan-Pilz, 16S_N1, _N1-11, _N1-12, _N2 und _N3*:

Schritt	Dauer	Temperatur
Start	2:00 min	95°C
Denaturierung	40x {	0:30 min
Primerannealing		0:30 min
Elongation		1:00 min
Schmelzkurvenanalyse	siehe Tabelle 6	

Tabelle 7: PCR-Protokoll 2

Mittels der Software *Bio-Rad CFX Managers 3.1* erfolgte in vorliegender Studie die Datenanalyse der PCR (s. Kap. 3.3.1).

2.2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte mit einem Schmelzpunkt $>79^{\circ}\text{C}$ (s. Kap 3.3.1) wurden mithilfe des NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Um die Produktausbeute zu erhöhen, wurde das Protokoll insofern verändert, als alle Zeitangaben zur Zentrifugation verdoppelt wurden. Die PCR-Produkte wurde von der Silika-Säule in 27 μl Puffer NE des Kits eluiert und ihre Konzentration und Reinheit mittels NanoDrop-Messung bestimmt (s. Kap. 2.2.6).

2.2.9 Sanger-Sequenzierung

Für die Sanger-Sequenzierung war eine DNA-Konzentration des PCR-Produkts von 15ng/ μl erforderlich, sodass bei Bedarf das Eluat mit Elutionspuffer NE entsprechend verdünnt

wurde. Anschließend erfolgte die fluoreszenzbasierte Sanger-Sequenzierung durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Dazu wurden zusammen mit den PCR-Produkten Sequenzierungsprimer an das BMFZ geliefert, die mindestens einen der im jeweiligen PCR-Mix enthaltenen Primer darstellten (s. Tabelle 1+4). So wurde sichergestellt, dass der Sequenzierungsprimer komplett identisch mit der Zielsequenz war und eine Sequenzierung durchgeführt werden konnte. Optional konnte auch ein Sequenzierungsprimer verwendet werden, dessen Zielsequenz innerhalb des von beiden PCR-Primern begrenzten DNA-Bereichs lag und typisch für die bakterielle Domäne war. Für die 16S 500/900 PCR konnte optional der innenliegende Primer 338 R, für die 16S 900 PCR zusätzlich noch der Primer 16 R1 verwendet werden (s. Tabelle 1 und Abb. 14).

2.2.10 BLAST-Analyse

Nach durchgeführter Sanger-Sequenzierung konnten die Datensätze auf dem Server des BMFZ unter dem Login des *Genomics&Transcriptomics Labor[s]* (GTL) heruntergeladen werden. Mithilfe des Programms *Chromas Lite 2.1* ließ sich der *.abi*-Datei als Sequenzabfolge der Sanger-Sequenzierung farblich darstellen. Mithilfe der BLAST-Analyse (*Basic Local Alignment Search Tool*) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nih.gov/blast.cgi>) wurde einer auswertbaren Sequenz (s. Kap. 3.3.2) durch ein duales Alignment max. 100 homologe Sequenzen in absteigender Homologie zugeordnet. Dazu wurde auf der NCBI-Website das „Nukleotid BLAST“ ausgewählt und das Chromatogramm aus *Chromas Lite 2.1* im textbasierten FASTA-Format in die BLAST-Suchmaschine kopiert. DNA-Sequenzen unkultivierter Umweltproben wurden aus der Datenanalyse exkludiert und „megablast“ als BLAST-Algorithmus gewählt, um Sequenzen mit hoher Identität zu finden. Schließlich wurde die Nummer der Patientenprobe als Titel eingetragen und die BLAST-Analyse gestartet. Das Programm lieferte eine Auflistung lokaler Alignments, also eine Gegenüberstellung der gesuchten Sequenz mit hinterlegten Sequenzen aus der Datenbank, deren Auswertung nach unterschiedlichen Kriterien erfolgte (s. Kap. 3.3.2).

2.2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung erfolgte mittels der Statistik-Software *GraphPad Prism 5*. Dabei wurden der DNA-Gehalt, die Anzahl humaner Zellen (d.h. GAPDH-Genomäquivalente) und die Anzahl kultivierter Bakterienspezies jeder entnommenen Probe analysiert. Um Unterschiede der erhobenen Daten zwischen den Proben 1 (Plaque), 2 (K-) und 3 (WF) aller Probanden oder nur innerhalb einer Gruppe (z.B. Nichtraucher) feststellen zu können, wurde eine ANOVA mit Messwiederholung (engl. *repeated measures ANOVA*) durchgeführt.

Um Ergebnisse der gleichen Probe (z.B. Plaque) zwischen den Gruppen (z.B. weiblich vs. männlich, Raucher vs. Nichtraucher) zu vergleichen, wurde der t-Test für unabhängige Stichproben angewandt.

Mittels des McNemar-Tests konnten anhand von Vierfeldertafeln für verbundene Stichproben die Erfolgsraten der Nachweisverfahren (Kultur vs. PCR) für Probe 3 (WF) auf statistische Signifikanz untersucht werden.

Mit $p < 0.05$ wurde das Signifikanzniveau für die statistische Auswertung festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika des Patientenkollektivs und ihrer Proben

Die in die Studie eingeschlossenen 42 Probanden mit einem Durchschnittsalter von 52 Jahren (28-77 Jahre) ließen sich anhand folgender Kriterien charakterisieren:

Geschlecht	Alter	Raucher	Wurzel	Krone
w: 17/42	<50 J: 18/42	ja: 6/42	1: 17/42	ja: 10/42
m: 25/42	>50 J: 24/42	nein: 36/42	>1: 25/42	nein: 32/42

Tabelle 8: Charakterisierung des Patientenkollektivs nach den Kriterien Geschlecht, Alter, Raucher, Wurzelanzahl und Krone

Angabe der Probandenanzahl (n=42), w: weiblich, m: männlich, J: Jahre

Aufgrund der geringen Patientenzahl mit Schmerzsymptomatik in der Anamnese oder insuffizienten (Aufbau-)Füllungen (je 3/42 Fälle) wurde auf ihre gesonderte Betrachtung verzichtet. Die insuffizienten Füllungen wurden im ersten Behandlungsschritt ausgetauscht und anschließend gemäß Behandlungsprotokoll (s. Kap. 2.2.3) verfahren. 10 der 42 untersuchten Zähne waren prothetisch mit Kronen versorgt, die sich alle klinisch suffizient zeigten. Da der jeweilige Zeitpunkt der primären endodontischen Behandlung nicht immer eindeutig bestimmt werden konnte, wurde eine Unterscheidung hinsichtlich des Alters der Wurzelfüllung nicht vorgenommen.

Wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, wurden pro Zahn drei Proben entnommen. Die subgingivale Plaqueprobe (**Plaque**) als polymikrobielles Gemisch diente zur Bestimmung der patientenspezifischen oralen Mikroflora. Als Desinfektionskontrolle (**K-**) wurde Probe 2 nach Kavitätenpräparation und Desinfektion entnommen. Der Fokus der Studie stellte Probe 3 (**WF**) dar, die als entferntes apikales Wurzelfüllmaterial die Pathogene enthielt, die im Zusammenhang mit einer postendodontischen apikalen Parodontitis untersucht werden sollten.

Die sondenbasierte GAPDH-TaqMan-PCR diente als Positivkontrolle (s. Kap. 2.2.7). Aufgrund des Nachweises dieses *single copy* Gens konnte die Quantität der GAPDH-

Genomäquivalente (GE) einer Probe mit der Anzahl an humanen Zellen gleichgesetzt werden. Erfolgte in einer Probe kein GAPDH-Nachweis, musste entweder von einer Inhibition der PCR oder von unzureichender DNA-Güte der Probe ausgegangen werden. In der Plaqueprobe kam es nur einmal, in der Desinfektionskontrolle 22-mal und in dem Wurzelfüllmaterial achtmal zum Fehlen einer GAPDH-Amplifikation.

Wie Abbildung 5A verdeutlicht, wurde in der subgingivalen Plaqueprobe eine größere Menge humaner Zellen detektiert als in der Desinfektionskontrolle; der Unterschied war hoch signifikant ($p=0.001-0.01$). Dabei lag die mittlere Konzentration bei ca. 4×10^5 humanen Zellen/Probe 1. Im Vergleich enthielt das entfernte Wurzelfüllmaterial, das nicht zwingend humanes Zellmaterial enthalten musste, im Mittel nur $4,5 \times 10^4$ humane Zellen/Probe 3. Zwischen Proben 1 und 3 zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0.01-0.05$, s. Abb. 5A).

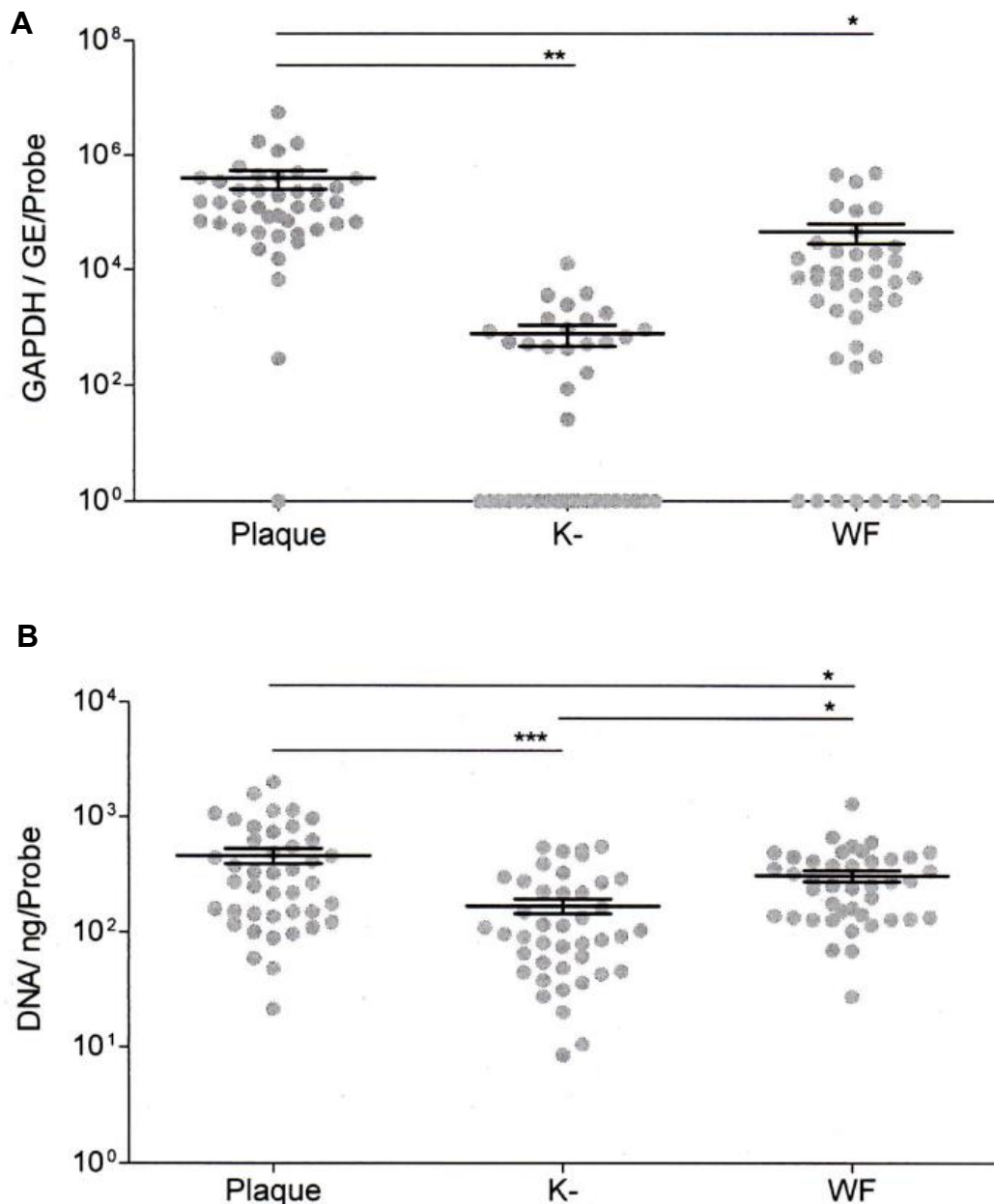


Abb. 5: Streudiagramm der Menge humaner Zellen pro Probe (A) und DNA-Gehalt pro Probe (B)

Signifikanzlevel mit *** $p < 0.001$, ** $p = 0.001-0.01$, * $p = 0.01-0.05$ und eingezeichnetem Standardfehler. **A** GAPDH-Genomäquivalente (GE), **B** DNA-Gehalt (ng) der Proben 1 (subgingivale Plaqueprobe: **Plaque**), 2 (Desinfektionskontrolle: **K-**) und 3 (Wurzelfüllmaterial: **WF**).

Diese Tendenz spiegelte sich auch in dem DNA-Gehalt der Proben wieder (s. Abb. 5B). Mit einem höchst signifikanten Unterschied enthielten die 42 Plaqueproben mit einem durchschnittlichen DNA-Gehalt von ca. 454 (+/-68) ng/Probe 1 mehr DNA als die jeweiligen Desinfektionskontrollen mit 167 (+/-24) ng/Probe 2. Auch der Vergleich zwischen der Plaqueprobe und dem entfernten Wurzelfüllmaterial ließ eine statistische

Signifikanz feststellen, da im Wurzelfüllmaterial im Mittel ein geringerer DNA-Gehalt gemessen wurde (306 (+/-35) ng /Probe 3). Zwischen der Desinfektionskontrolle und der Guttapercha wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied beobachtet (s. Abb. 5B).

Somit zeigte die mikrobielle Plaque (Plaque) die höchsten Werte an DNA und humanen Zellen, der desinfizierte Kavitätenboden (K-) die geringsten, während sich die Werte des Wurzelfüllmaterials (WF) dazwischen bewegten.

3.2 Kultureller Nachweis von polymikrobiellen Infektionen

3.2.1 Semiquantifizierung des Kulturwachstums

Bis heute noch zählt die Kultivierung als Goldstandard zur polymikrobiellen Diagnostik. Der Plattenbeimpfung folgte die Semiquantifizierung und Keimidentifizierung (s. Abb. 4, Kap. 2.2.4). Abbildung 6 zeigt beispielhaft den kulturellen Nachweis von Mikroorganismen der drei resuspendierten Proben eines Probanden auf Kochblut-Nährmedien.

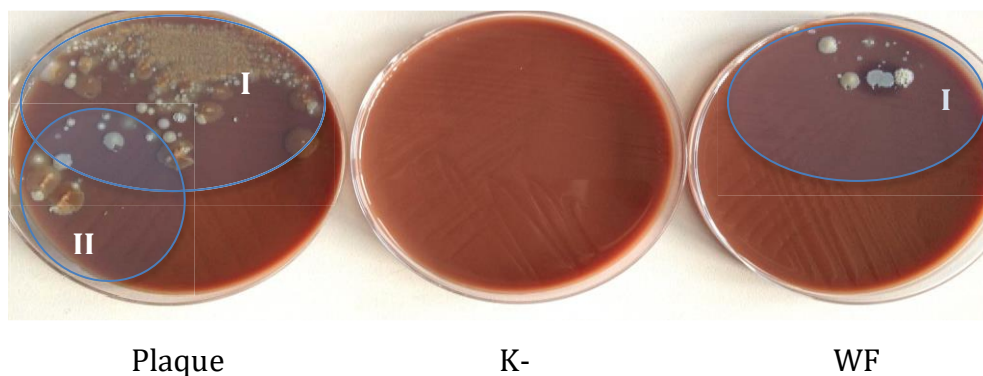


Abb. 6: Beispiel der kulturellen Anzucht von Mikroorganismen aus Proben von Patient 4

Subgingivale Plaqueprobe: **Plaque**, Desinfektionskontrolle: **K-** und Wurzelfüllmaterial: **WF** von Proband 4 wurden auf Kochblut-Nährmedien im Dreiösenausstrich ausplattiert und gemäß Kap. 2.2.4 bebrütet. Kulturelles Wachstum in den Sektoren wurde mit blauer Schattierung markiert.

Das Wachstum auf den Kulturplatten der Proben von Patient 4 bestätigte die zuvor in Kapitel 3.1 beschriebene Tendenz des größten DNA-Gehalts in der subgingivalen Plaqueprobe und der geringsten Last in der Desinfektionskontrolle. Während die

Desinfektionskontrolle kein mikrobielles Wachstum zeigte (s. Abb. 6), ließ sich im ersten Sektor der mit Probe 3 (WF) beimpften Platte bakterielles Wachstum nachweisen. Als polymikrobielles Gemisch zeigte die Plaqueprobe in den ersten beiden Sektoren deutliches Wachstum.

Um die Keimlast der drei Probeentnahmestellen miteinander vergleichen zu können, wurde folgendes Schema zur Semiquantifizierung des kulturellen Wachstums gewählt:

+	ganz vereinzelt Wachstum	≤ 10-20 Kolonien im ersten Sektor
++	vereinzelt Wachstum	≥ 20 Kolonien im ersten Sektor
+++	mäßiges Wachstum	Kolonien im ersten und zweiten Sektor
++++	reichliches Wachstum	Kolonien in allen drei Sektoren

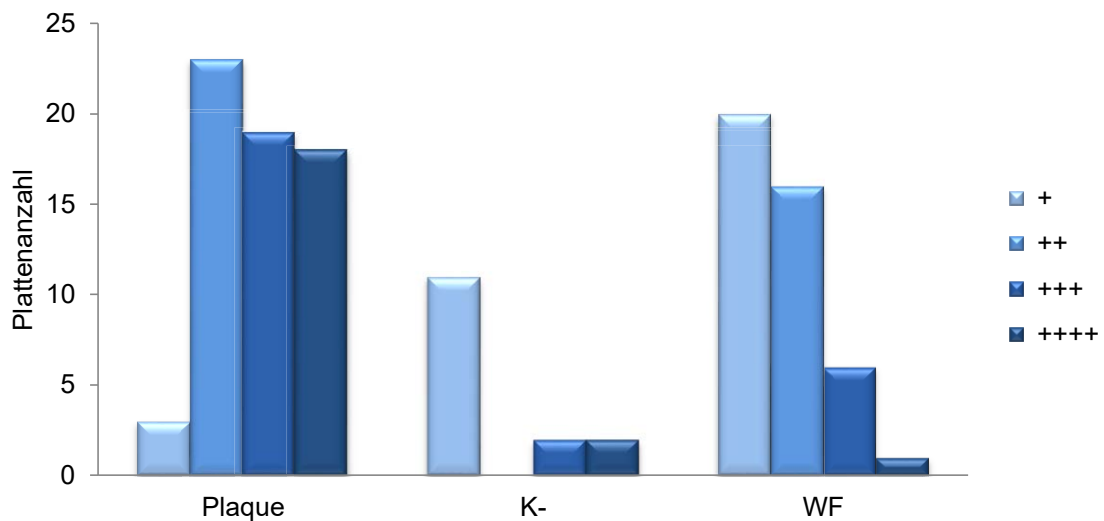


Abb. 7: Semiquantifizierung des kulturellen Wachstums der drei Proben

Kulturelles Wachstum aller drei Nährmedien wurde wie folgt semiquantifiziert:

+: ganz vereinzelt Wachstum, ++: vereinzelt Wachstum, +++: mäßiges Wachstum, ++++: reichliches Wachstum

Aus Abbildung 7 wird ersichtlich, dass sich in den Plaqueproben im Vergleich zu den anderen beiden Proben (K- und WF) höhere Wachstumsraten feststellen ließen. War die Kultur nach Beimpfen mit der resuspendierten Probe aus dem Wurzelfüllmaterial positiv, so zeigte sich in der Regel ganz vereinzelt bzw. vereinzelt Wachstum. Somit konnte an

dieser Stelle die subgingivale Plaqueprobe (Plaque) als polymikrobielles Gemisch mit hoher Keimlast, das Wurzelfüllmaterial (WF) als Probe mit mäßiger Keimbesiedlung und der desinfizierte Kavitätenboden (K-) mit geringster mikrobieller Beladung beschrieben werden.

Um eine Aussage über die mikrobielle Diversität machen zu können, wurde die Anzahl kultivierter Bakterienspezies in den Proben bestimmt und in Abbildung 8 grafisch dargestellt.

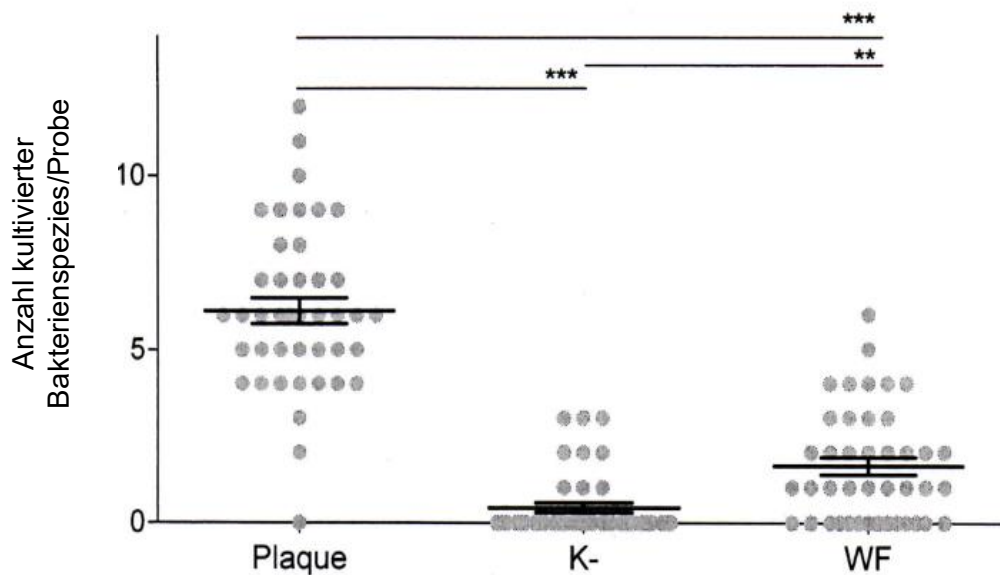


Abb. 8: Streudiagramm der Anzahl kultivierter Bakterienspezies pro Probe

Signifikanzlevel mit *** $p < 0.001$, ** $p = 0.001-0.01$ und eingezeichnetem Standardfehler. Anzahl kultivierter Bakterienspezies der Proben 1 (subgingivale Plaqueprobe: **Plaque**), 2 (Desinfektionskontrolle: **K-**) und 3 (Wurzelfüllmaterial: **WF**).

Die zuvor beschriebene mittlere Keimlast der drei Proben (s. Abb. 5, 6 und 7) korrelierte mit der Anzahl kultivierter Bakterienspezies pro Probe (s. Abb. 8). So ließen sich in der subgingivalen Plaque in der Regel nicht nur die höchsten Werte an DNA und humanen Zellen sowie die größte Keimzahl feststellen, sondern auch mit durchschnittlich ca. 6 verschiedenen Bakterienspezies/Probe die höchste mikrobielle Diversität. Der Unterschied zur Desinfektionskontrolle als auch zum entfernten Wurzelfüllmaterial war statistisch höchst signifikant ($p < 0.001$). Die durchschnittliche Anzahl kultivierter Bakterienspezies im Wurzelfüllmaterial lag mit 1,6 Spezies/Probe statistisch hoch signifikant über den Werten der Desinfektionskontrolle ($p = 0.001-0.01$).

Es war daher festzuhalten, dass im Vergleich zur Plaqueprobe im Wurzelfüllmaterial nicht nur die Menge an kulturell nachweisbaren Mikroorganismen, sondern auch deren Vielfalt abnahm.

3.2.2 Dominanz der Gram-positiven Anaerobier

Die Speziesidentifizierung der kultivierten Bakterien wurde mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie durchgeführt (s. Kap. 2.2.4) und anschließend den 3 Gruppen:

(I) aerobe/aerotolerante Bakterien, (II) anaerobe/fakultativ anaerobe Bakterien und (III) Pilze zugeordnet.

Wie aus Abbildung 9 ersichtlich, zeigte die Plaqueprobe als polymikrobielles Gemisch in allen Fällen kulturelles Wachstum aerober/aerotoleranter Bakterien und bis auf eine Ausnahme auch Wachstum anaerober/fakultativ anaerober Bakterien. Nur 1/42 Plaqueproben lieferte in der Kultur einen Pilznachweis.

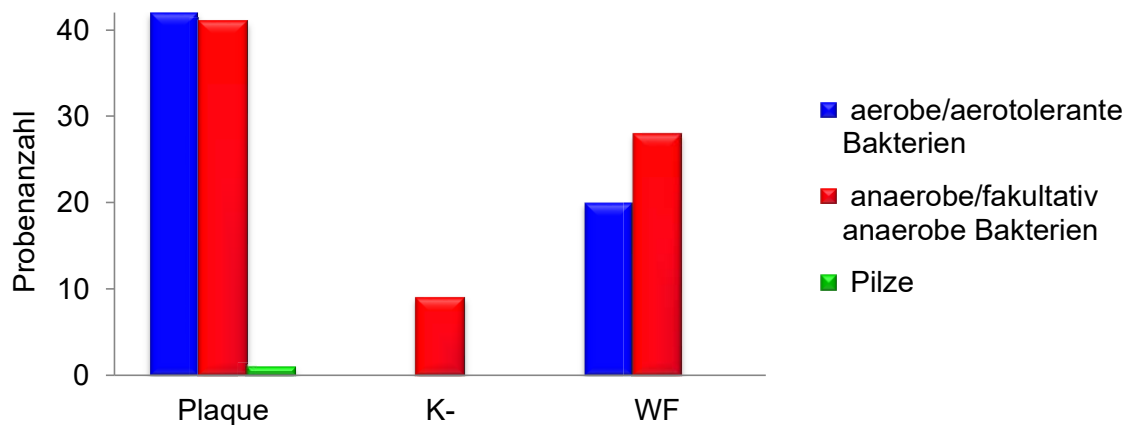


Abb. 9: Übersicht über die Anzahl der Proben mit kulturellem Nachweis von Bakterien und Pilzen

Nach der Speziesidentifizierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie erfolgte die Einteilung in aerobe/aerotolerante, anaerobe/fakultativ anaerobe Bakterien und Pilze in der subgingivalen Plaque (**Plaque**), der Desinfektionskontrolle (**K-**) und dem Wurzelfüllmaterial (**WF**).

Im entfernten Wurzelfüllmaterial erfolgte in 28/42 Fällen ein kultureller Nachweis von Mikroorganismen. Es dominierten Anaerobier/fakultative Anaerobier (28/42) gegenüber den

aeroben/aerotoleranten Keimen (20/42), während Pilze in keiner Probe nachgewiesen werden konnten.

Zeigte der desinfizierte Kavitätenboden (K-) kulturelles Wachstum, so handelte es sich in allen Fällen (9/42) um Anaerobier/fakultative Anaerobier. In ca. 22% der Fälle wurde die Bakteriengattung der Desinfektionskontrolle auch in der Plaqueprobe gefunden (*Streptococcus*, *Actinomyces* und *Fusobacterium*) und zu ca. 44% fand sich die Gattung der Desinfektionskontrolle auch im Wurzelfüllmaterial wieder (*Streptococcus*, *Actinomyces*, *E. faecalis*, *Propionibacterium* und *Lactobacillales*). In keinem Fall wurde in allen drei Proben (Plaque, K-, WF) die gleiche Bakterienspezies nachgewiesen, sodass an dieser Stelle eine Verschleppung der Keime aus der Plaque in den Wurzelkanal während der Probennahme ausgeschlossen werden konnte.

Im nächsten Schritt wurden die detektierten Mikroorganismen nach ihrem Sauerstoffbedarf und Färbeverhalten in der Gram-Färbung charakterisiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt.

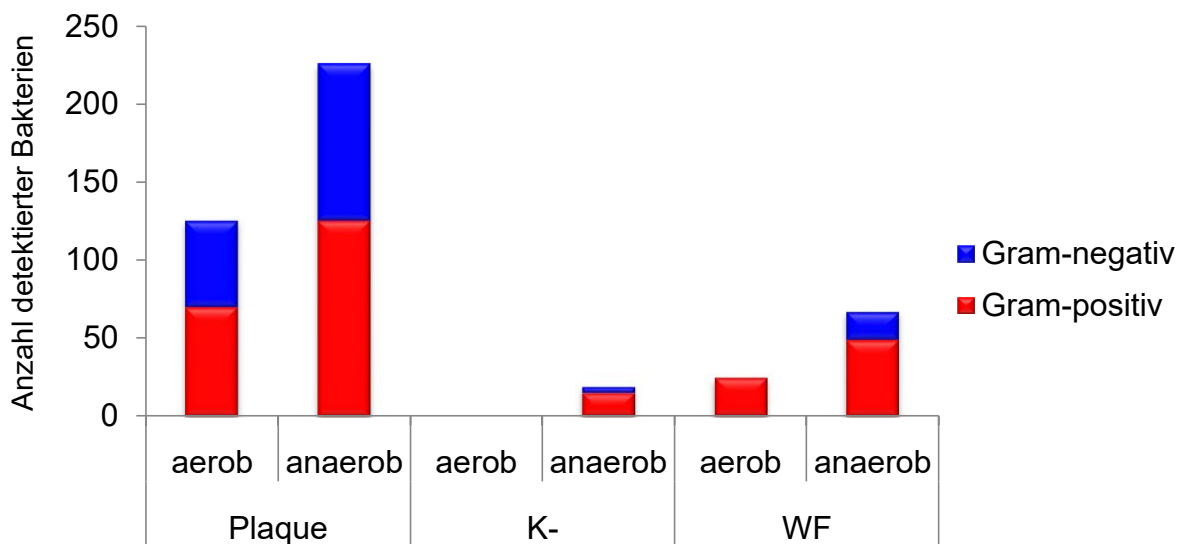


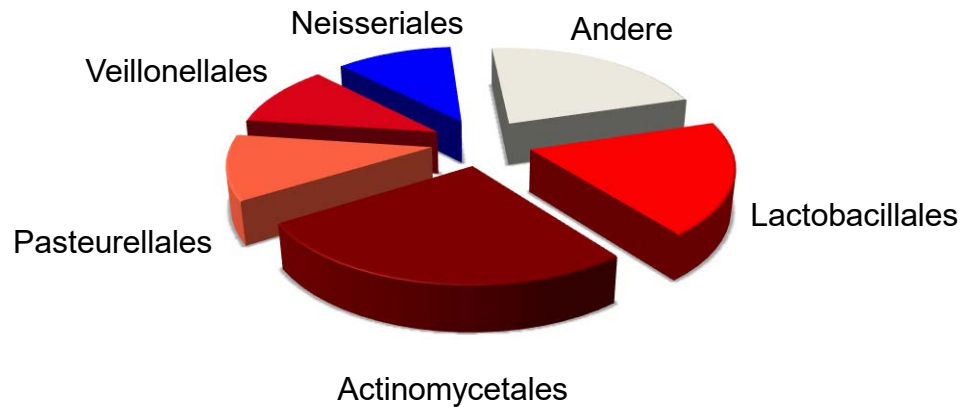
Abb. 10: Einteilung der mittels Kultur detektierten Bakterien in den drei Proben nach Gram-Färbung und Sauerstoffbedarf

Einteilung in **aerobe** (=aerobe und aerotolerante) und **anaerobe** (=anaerobe und fakultativ anaerobe) Bakterien. Subgingivale Plaqueprobe (**Plaque**), Desinfektionskontrolle (**K-**), Wurzelfüllmaterial (**WF**).

In der Plaque ließ sich mit insgesamt 56% eine Dominanz von Gram-positiven Bakterien nachweisen. Den größten Anteil bildeten hier die Gram-positiven Anaerobier mit 36%. Diese Verteilung zeigte sich auch im Wurzelfüllmaterial: es dominierten ebenfalls die Gram-positiven, anaeroben Keime und machten hier sogar einen Anteil von insgesamt 53% aus. Der alleinige Vergleich zwischen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien in der Guttapercha zeigte mit 80% eine deutliche Dominanz der Gram-positiven Pathogene.

Die mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie in der Plaque und im Wurzelfüllmaterial detektierten Mikroorganismen wurden anschließend auf Ordnungsebene zusammengefasst und in Abbildung 11 dargestellt.

Plaque



WF

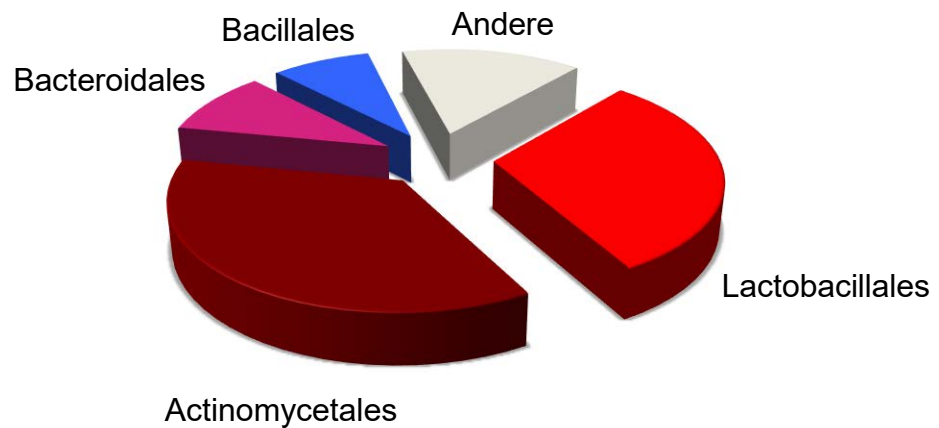


Abb. 11: Ordnungen der kulturell detektierten Mikroorganismen in subgingivaler Plaque (Plaque) und im Wurzelfüllmaterial (WF)

Taxonomische Ebene: Ordnung. Ordnungen mit überwiegend Gram-positiven Bakterien sind in rötlichen Farbtönen, Ordnungen mit überwiegend Gram-negativen Bakterien in Blautönen dargestellt. Unter **Andere** wurden Ordnungen mit einem geringen Anteil zusammengefasst.

Mit einem Anteil von insgesamt 46% der Bakterien wurden die Ordnungen *Lactobacillales* und *Actinomycetales* am häufigsten in der Plaque detektiert. Hauptvertreter dieser beiden Ordnungen bildeten die Arten *Streptococcus* (Ordnung: *Lactobacillales*), *Actinomyces* und *Rothia* (*Actinomycetales*). *Aggregatibacter* und *Haemophilus* (*Pasteurellales*), *Neisseria*

(*Neisseriales*), *Veillonella* (*Veillonellales*) und *Fusobacterium* (in Abb. 11 unter „Andere“ (*Fusobacteriales*)) wurden mit geringerer Häufigkeit detektiert. Dabei war es möglich, in der Sanger-Sequenzierung folgende dominante Bakteriengattungen bis auf Speziesebene zu identifizieren:

<i>Streptococcus</i> (16%):	<i>S. mutans</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. sanguinis</i> , <i>S. parasanguinis</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. gordonii</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>S. thermophilus</i>
<i>Actinomyces</i> (15%):	<i>A. viscosus</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>A. meyeri</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. denticolens</i>
<i>Veillonella</i> (11%):	<i>V. parvula</i>
<i>Rothia</i> (10%):	<i>R. dentocariosa</i> , <i>R. mucilaginosa</i>
<i>Neisseria</i> (9%):	<i>N. flava</i> , <i>N. subflava</i> , <i>N. perflava mucosae</i> , <i>N. elongata</i> , <i>N. sicca</i>
<i>Fusobacterium</i> (8%):	<i>F. nucleatum</i>
<i>Haemophilus</i> (7%):	<i>H. parainfluenzae</i>

Im Wurzelfüllmaterial stieg der Anteil an *Lactobacillales* und *Actinomycetales* auf 67% an. Häufigste Gattung stellte *Streptococcus* (*Lactobacillales*) dar, gefolgt von *Enterococcus*, *Propionibacterium* und *Actinomyces* (*Actinomycetales*) sowie *Staphylococcus* (*Bacillales*). Folgende Spezies wurden als dominante Vertreter identifiziert:

<i>Streptococcus</i> (15%):	<i>S. mutans</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. oralis</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. sanguinis</i>
<i>Enterococcus</i> (13%):	<i>E. faecalis</i>
<i>Propionibacterium</i> (13%):	<i>P. acnes</i> , <i>P. granulosum</i>
<i>Actinomyces</i> (9%):	<i>A. viscosus</i>
<i>Staphylococcus</i> (7%):	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i>

Streptococcus war die dominanteste Gattung, die sowohl in der Plaque (16%) als auch im Wurzelfüllmaterial (15%) nachgewiesen wurde. Im Vergleich zur subgingivalen Plaque nahmen die Anteile an *Enterococcus* (von <1% auf 13%) und *Propionibacterium* (von 1% auf 13%) im Wurzelfüllmaterial deutlich zu. Bakterien der Ordnungen *Bacteroidales* und

Bacillales wurden in der Guttapercha häufiger detektiert, als es in der Plaqueprobe der Fall war. Während der Anteil von *Bacteroidales* von 3% (Plaque, unter „Andere“) auf 10% (WF) anstieg, stieg der Anteil von *Bacillales* von <1% (Plaque) auf 8% im Wurzelfüllmaterial an. Eine geringere Prävalenz in der Guttapercha als in der subgingivalen Plaque zeigten *Veillonellales* (von 11% auf 4%). Bakterien der Ordnungen *Neisseriales* und *Pasteurellales* ließen sich hingegen ausschließlich in der Plaque und nicht im Wurzelfüllmaterial nachweisen.

3.3 Molekulargenetische Analyse

3.3.1 Schmelzkurvenanalyse

In vorliegender Studie wurde die Kultur als Standarddiagnostik dem Nachweis dominanter Bakterien und Pilze mittels Pan-Bakterien und Pan-Pilz PCR (Polymerase-Kettenreaktion) gegenübergestellt. Hierzu wurden Primer eingesetzt, die an eine Region des rDNA-Operons binden, die in allen Bakterien (Pan-16S) oder allen Pilzen (Pan-18S) hochkonserviert ist und eine speziesspezifische Region flankieren, deren Sanger-Sequenzierung die anschließende BLAST-gestützte Identifizierung der Spezies ermöglicht [61].

Die Real-Time PCRs wurden unter Zugabe des DNA- (und PCR-Produkt-) interkalierenden SYBR-Green I Fluorophors durchgeführt, sodass die Messung der relativen Fluoreszenzintensität (engl. *relative fluorescence units* (RFU)) von Zyklus zu Zyklus die Zunahme synthetisierter PCR-Produkte anzeigte, die mittels der Software *Bio-Rad CFX Manager 3.1* ausgewertet wurde (s. Abb. 12).

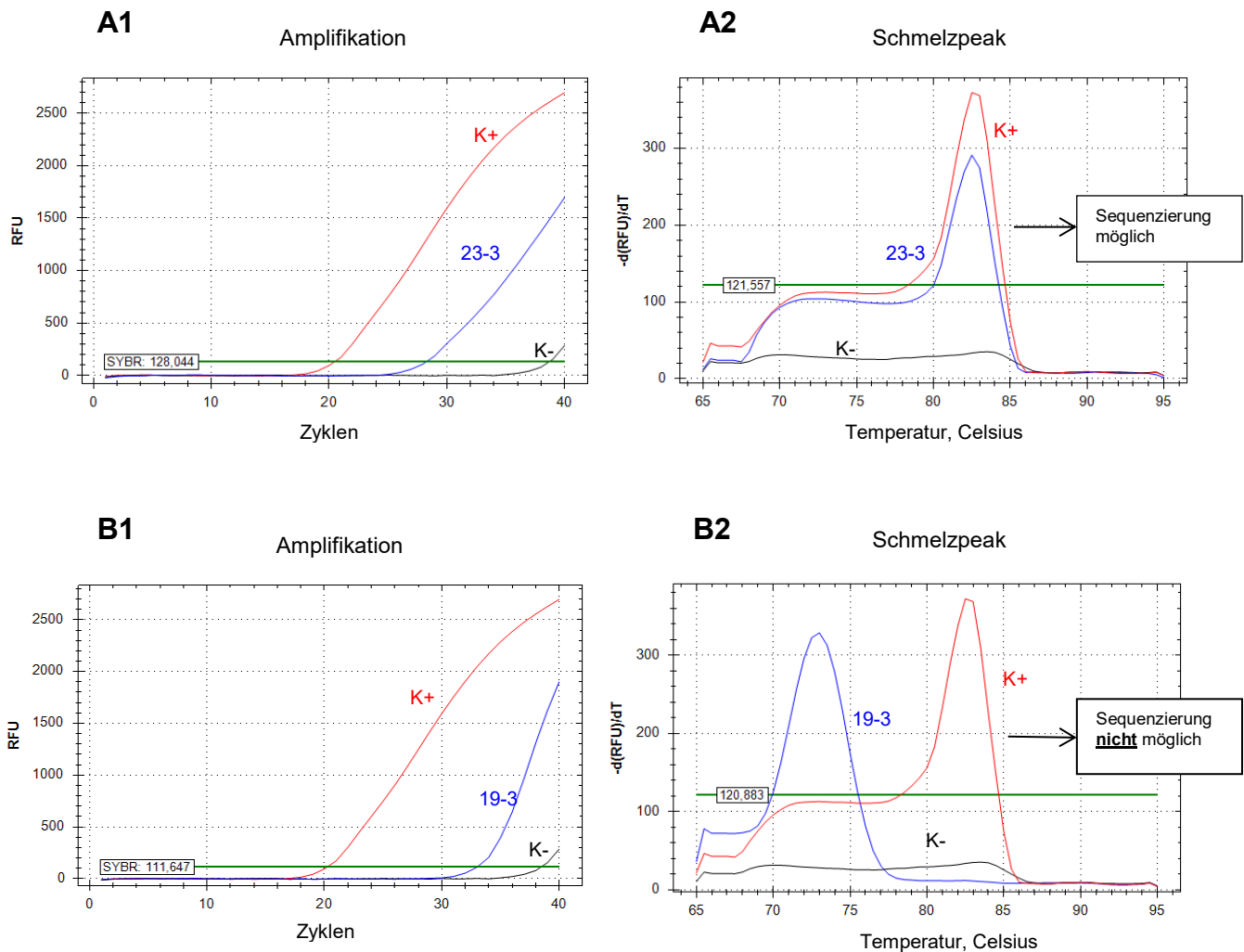


Abb. 12: Exemplarische Darstellung der Amplifikationskurve mit Schmelzkurvenanalyse einer sequenzierbaren im Vergleich zu einer nicht sequenzierbaren Probe mit Primerdimeren
 Amplifikationskurve (A1) der für *Candida albicans* positiven Probe 3 (WF) des Probanden 23 (23-3) in der Candida-PCR mit zugehöriger Schmelzkurvenanalyse (A2). Amplifikationskurve (B1) der nicht sequenzierbaren Probe 19-3 (Probe 3 (WF) des Probanden 19) in der Candida-PCR mit zugehöriger Schmelzkurvenanalyse (B2).

rot: Positivkontrolle (K+), schwarz: Negativkontrolle (K-), blau: Patientenprobe, grün: *threshold*. RFU: relative Fluoreszenzintensität; SYBR: Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I; $-d(RFU)/dT$: negative Änderungsrate der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zeit (*Bio-Rad CFX Manager 3.1*).

Wie exemplarisch für Probe 23-3 in Abbildung 12A gezeigt, wurden die Amplifikationskurven der meisten PCRs vor dem 30. Zyklus positiv (A1) und ihre PCR-Produkte wiesen für sie charakteristische Schmelzpunkte (M_p -Wert, engl. *melting peak*) von $>80^\circ\text{C}$ auf (A2). Eine Amplifikationskurve wurde dann als positiv definiert, sobald das Fluoreszenzsignal der entstehenden PCR-Produkte einen softwareermittelten Schwellenwert

(engl. *threshold*) überschritt. Dieser Zeitpunkt (Ct-Wert, engl. *threshold cycle*) konnte als theoretische Größe einerseits zwischen Patientenprobe und jeweiliger Positivkontrolle (s. Abb. 12A1) und andererseits zwischen unterschiedlichen Patientenproben verglichen werden.

Proben, wie Probe 19-3 in Abbildung 12B, deren Amplifikationskurven nach dem 30. Zyklus positiv wurden (B1) lieferten oft PCR-Produkte, die Schmelzpeaks von $<75^{\circ}\text{C}$ aufwiesen (B2) und somit reine Primerdimere darstellten. Primerdimere schmolzen aufgrund ihrer geringen Größe (18-30 bp) bei niedrigeren Temperaturen als PCR-Produkte (>75 bp). Für Probe 19-3 ließ sich in der nachfolgenden Sanger-Sequenzierung somit auch keine Sequenz ermitteln, sodass diese PCR als negativ zu beurteilen war.

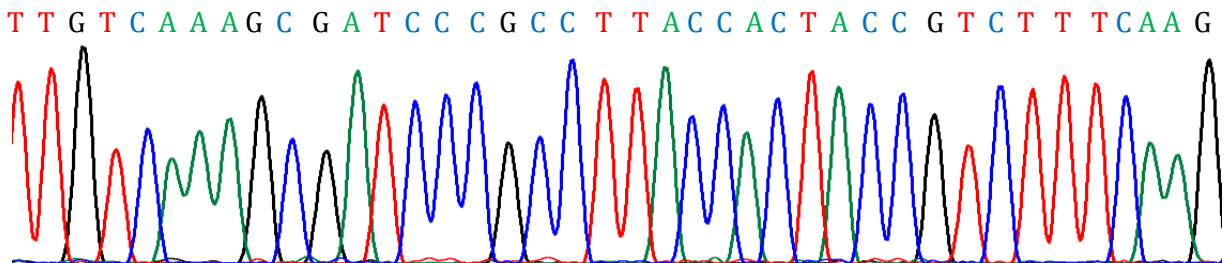
Der Vergleich der Amplifikationskurven von Positivkontrolle K⁺ (d.h. einer Probe, die einen nachzuweisenden Keim sicher enthielt) und Patientenprobe ließ Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt der Probe und mögliche Inhibitionsfaktoren zu. War der DNA-Gehalt einer Probe zu gering, konnte in der PCR nicht die Menge an Produkten amplifiziert werden, die für ein detektierbares Fluoreszenzsignal nötig gewesen wäre (Ct >30 . Zyklus, s. Abb. 12B1).

Verlief die Amplifikationskurve in der exponentiellen Phase deutlich flacher als die Kurve der Positivkontrolle, so mussten mögliche Inhibitionsfaktoren (z.B. Blut) vermutet werden, die die Reaktion verlangsamten. Bei Verdacht auf Inhibition wurde in vorliegender Studie die Probe im Verhältnis 1:3 mit 10mM Tris-Puffer (pH-Wert: 8.0) verdünnt (s. Tabelle 9, Kap. 3.4).

3.3.2 Validität der BLAST-Analyse

Die zuvor in der Schmelzkurvenanalyse identifizierten PCR-Produkte wurden anschließend Sanger-sequenziert und die Sequenz farblich codiert. Die vier Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin wurden in grün, blau, schwarz bzw. rot dargestellt. Aus scharf definierten, hohen Nukleotidpeaks konnte in vielen Fällen eine eindeutige Sequenz (eines dominanten Keims) abgeleitet werden (s. Abb. 13A). Mischsequenzen, bestehend aus PCR-Produkten von >2 Arten von Mikroorganismen, waren aufgrund überlagerter Sequenzen nicht auswertbar.

A



B

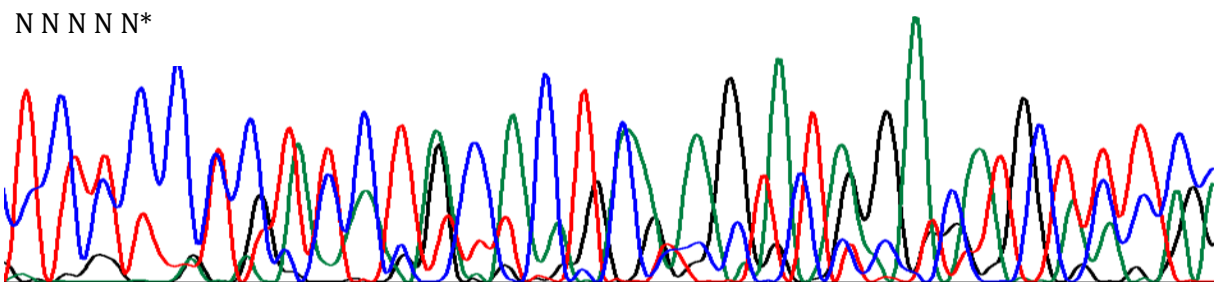


Abb. 13: Chromatogramme einer eindeutigen Sequenz und einer Mischsequenz

A eindeutige Sequenz, **B** nicht auswertbare Mischsequenz; in grün: Adenin, blau: Cytosin, schwarz: Guanin, rot: Thymin; *nicht auswertbar (dargestellt in *Chromas Lite 2.1*).

Um die in der Pan-PCR amplifizierte Spezies identifizieren zu können, wurde die ermittelte Sanger-Sequenz mittels BLAST-Analyse auf hochhomologe Sequenzen aus Gendatenbanken hin untersucht.

Beim Auswertungsalgorithmus der BLAST-Analyse wurden folgende Faktoren berücksichtigt. Die Auflistung lokaler Alignments erfolgte nach dem *Max[imum] Score* als numerischem Maß für das Verhältnis von übereinstimmenden und nicht übereinstimmenden Nukleotiden. Je höher der Score, desto höher die Homologie zwischen der Suchsequenz und einer der Datenbank bekannten Sequenz. Hierbei spielten die Länge der homologen Sequenzabschnitte und die Identitäten in diesem Sequenzabschnitt eine Rolle. Die Länge der Sequenz, die in das Alignment eingeschlossen wurde, wurde hierbei als *Query Cover[age]* in Prozent angegeben. Die *Identity* (in %) gab Aufschluss darüber, mit wie vielen Nukleotiden die in das Alignment eingeschlossene Probensequenz mit der Sequenz des identifizierten Keims übereinstimmte. Werte $\geq 90\%$ konnten dabei als eindeutiger Nachweis des Pathogens identifiziert werden, $\leq 75\%$ mussten kritisch betrachtet werden. Lag zwar eine hohe Übereinstimmung (*Identity*) vor, dies jedoch in nur einem kurzen Abschnitt der

Sequenz (*Query cover*), blieb das Ergebnis diskutabel. Die Fragmentlänge, für die Homologien ausgewiesen wurden, musste in Relation zur ursprünglichen Amplikonlänge des PCR-Produkts gesetzt werden (s. Tabelle 4). Homologien >75% der Länge des Fragments konnten als starker Hinweis, Homologien >85% als sicherer Beleg für den Keimnachweis interpretiert werden.

Die BLAST-Analyse konnte mit mehreren Analysealgorithmen durchgeführt werden. Die *Megablast*-Analyse wurde anfangs bei allen Proben durchgeführt und war für die Identifizierung von Spezies mit $\geq 95\%$ Übereinstimmung zwischen Proben- und Zielsequenz geeignet. Lieferte diese Analyse kein Ergebnis, so wurde der *Discontiguous Megablast*- bzw. bei erneutem Misserfolg der *Blastn*-Algorithmus gewählt, die auch bei geringerer Sequenzhomologie, jedoch über einen Großteil der Suchsequenz verteilt, sequenzverwandte Keime identifizieren konnten. Blieben auch diese Analysen erfolglos, wurde die jeweilige Probe als „Mischsequenz“ interpretiert, da es nicht möglich war, die homologe Sequenz eines bestimmten Mikroorganismus zu identifizieren.

3.3.3 Risiken bei der Verwendung der Pan-PCR zur Identifizierung von Mikroorganismen in der medizinischen Mikrobiologie

In vorliegender Studie wurde zunächst mittels 16S 500 bzw. 900 PCR die Amplifikation eines 500 bp bzw. 900 bp langen 16S rDNA Bereichs durchgeführt (s. Tabelle 4). In beiden PCRs diente der 16S F als Forwardprimer (Primersequenz: s. Tabelle 1). Zusammen mit dem Reversprimer 16S R1 wurde in Anwesenheit bakterieller DNA ein 500 bp langes PCR-Produkt, mit 16S R2 ein 900 bp langes PCR-Produkt generiert. Abbildung 14 zeigt eine Übersicht über die Bindungsstellen der verwendeten Primer an die 16S rDNA.

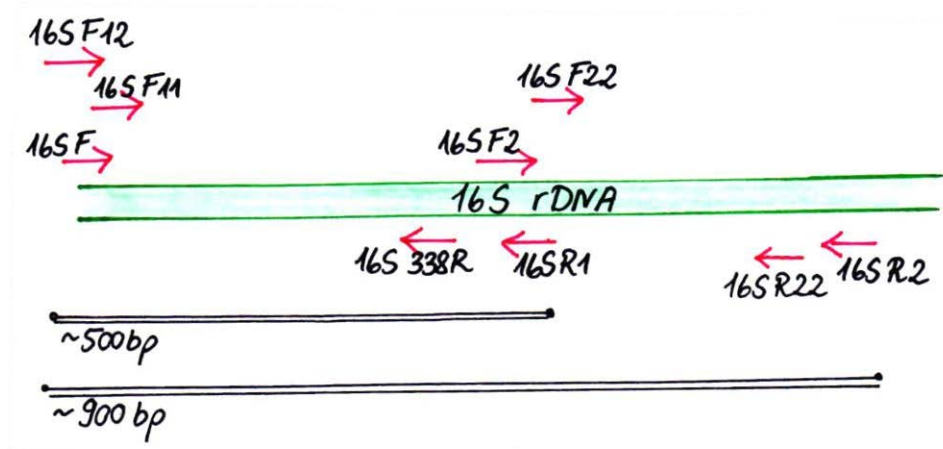


Abb. 14: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der Primer an die 16S rDNA

Zur vereinfachten Darstellung wurde nur die Amplikonlänge in Basenpaaren (bp) der 16S 500 und 16S 900 PCR abgebildet. Der rote Pfeil kennzeichnet die jeweilige Primerlokalisierung mit Wanderungsrichtung der DNA-Polymerase (Primersequenzen: s. Tabelle 1).

In der vorliegenden Studie zeigte die Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte aus der Pan-PCR, dass vermehrt die Desinfektionskontrollen (K-) und Proben des Wurzelfüllmaterials (WF) die zur Sequenzierung erforderlichen Kriterien, gemäß Kapitel 3.3.1, nicht erfüllten. Anschließende Analysen zeigten dann, dass eine Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:3 mit 10mM Tris-Puffer (pH-Wert: 8.0) sequenzierbare PCR-Produkte lieferte. Eine Verdünnung von Proben erhöhte jedoch die Gefahr der DNA-Amplifikation unerwünschter Kontaminanten aus dem Verdünnungspuffer [106].

So wurde in der Desinfektionskontrolle (K-) und im entfernten Wurzelfüllmaterial (WF) gehäuft die Gattung *Methylobacterium*, vorrangig die Spezies *Methylobacterium radiotolerans*, nachgewiesen. Als aerobes, Gram-negatives Bakterium zählt diese Spezies zu den Proteobakterien und findet sich vor allem im wässrigen (Umwelt-)Milieu. Methylobakterien sind Hauptbesiedler von kontaminiertem Wasser und beispielsweise bei Vorkommen im Leitungswasser von Krankenhäusern Auslöser von therapieassoziierten Infektionen immunkomprimierter Patienten [107]. Während des experimentellen Arbeitens wurden in der Literatur Methylobakterien insbesondere dann beschrieben, wenn 16S rRNA Gensequenzierungen von Proben mit geringer Bakterienlast durchgeführt wurden [108].

In unserer Studie waren Methylobakterien ausschließlich in Proben nachweisbar, die aufgrund nicht sequenzierbarer PCR-Produkte verdünnt wurden. Es lag also die Vermutung

nahe, dass die Kontaminate durch den Verdünnungspuffer eingeschleppt wurde. Wiesen die Proben per se eine geringe Keimlast auf, waren nur geringe Mengen an Methylobakterien ausreichend, um in der PCR als dominanter Keim identifiziert zu werden. War die ursprüngliche Keimlast der Probe hoch genug, konnte trotz Verdünnung das eigentliche Pathogen der Probe und nicht das Methylobakterium des Tris-Puffers nachgewiesen werden, da in der PCR nur die DNA des jeweils dominantesten Keims amplifiziert wurde.

Zur Bestätigung des Verdachts auf Kontamination wurde der Tris-Puffer als Template in die 16S 500 PCR eingesetzt, das PCR-Produkt aufgereinigt und Sanger-sequenziert. Die BLAST-Analyse identifizierte schließlich Methylobakterium als dominantes Pathogen im Tris-Puffer und bestätigte damit unsere Hypothese. Als weitergehende Untersuchung wurde das zur Tris-Herstellung verwendete entmineralisierte Wasser aus der Millipore-Anlage getestet. Der positive Nachweis von Methylobakterien im Wasser der Millipore-Anlage erklärte die eingeschleppte Kontamination.

Als bakterielle Pan-PCR dient die 16S 500/900 PCR zur Detektion jedweder Bakterien-DNA, da die verwendeten Primer in konservierten DNA-Bereichen binden. Dies macht die PCR anfällig für den Nachweis von bakteriellen (Umwelt-)Kontaminationen während der Probenaufbereitung. Die zur Laborwasseraufbereitung genutzte Millipore-Anlage ist dabei eine in der Literatur bereits bekannte Kontaminationsquelle [109]. Des Weiteren werden PCR-Reagenzien und DNA-Aufbereitungskits als Quellen für Kontaminationen beschrieben [108, 109]. Ist die Keimlast der eigentlich zu untersuchenden Probe sehr gering, fällt eine mögliche Kontamination mit bakterieller DNA stärker ins Gewicht und die Pan-PCR identifiziert und amplifiziert die Kontaminante als dominanten Keim. Dieser Gefahr ist das experimentelle Arbeiten trotz Einhaltung strenger Kautelen ausgesetzt [108].

Aufgrund der Tatsache, dass in vorliegender Studie zum Zeitpunkt der Kontamination die DNA aller Proben bereits präpariert wurde, stellte sich die Frage, inwieweit sich neben Methylobakterien niedrig konzentrierte Pathogene in den kontaminierten Proben nachweisen ließen. Die relativ unspezifische 16S Pan-PCR musste also durch neu entwickelte Primer dahingehend modifiziert werden, dass sie in Proben mit geringer Bakterienladung ausreichend sensitiv war, trotz Kontamination den dominanten Keim der Probe zu identifizieren.

Die neu synthetisierten Primer mussten in der Lage sein, an einen konservierten Bereich der bakteriellen 16S rDNA zu binden, jedoch nicht an die rDNA-Sequenzen des Methylobakteriums. Um diese Voraussetzungen zu erfüllen, wurde mithilfe des Programms

MegAlign der Software DNASTAR Lasergene 6.0 in einem multiplen Sequenzalignment *Methylobacterium radiotolerans* bekannten oralen Bakterien gegenübergestellt (s. Abb. 15). Berücksichtigung fanden dabei sowohl in der Studie bereits detektierte Bakterien als auch weitere Vertreter der Mundflora, sodass ein repräsentatives, breitgefächertes Spektrum gewählt wurde.

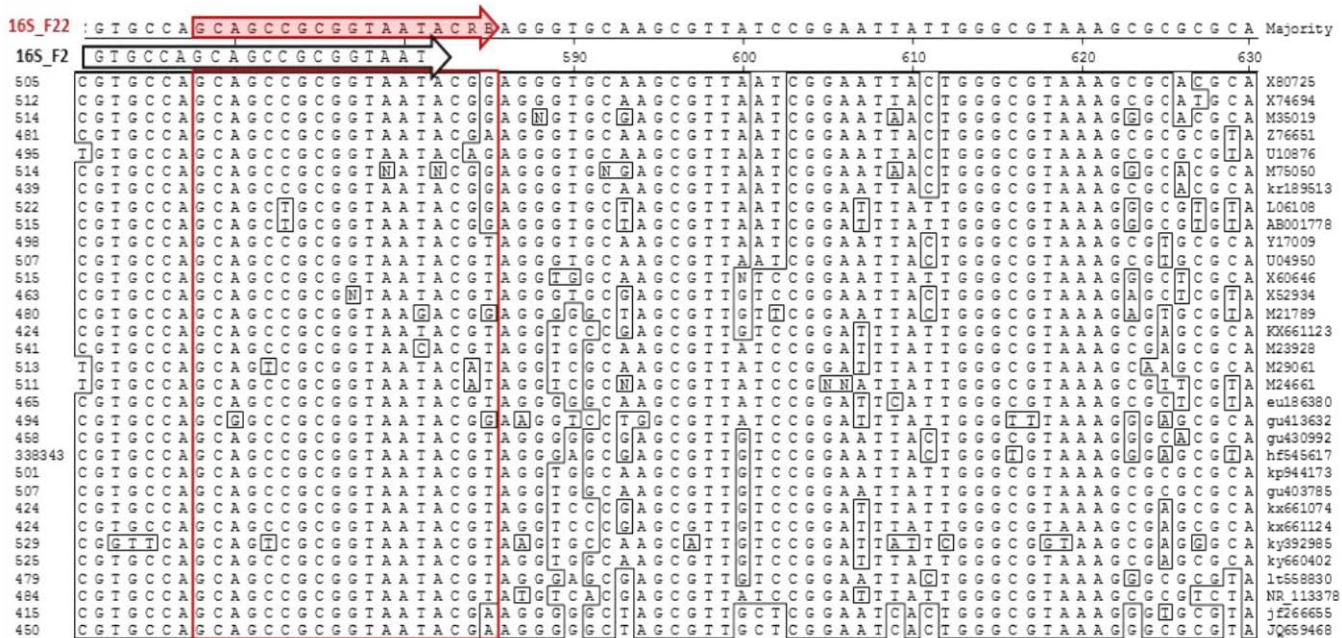


Abb. 15: Beispielhafte Darstellung eines multiplen Sequenzalignments zur Entwicklung des Forwardprimers 16S F22

Sequenzen bekannter oraler Pathogene (GenBank Accession Number (Acc-Nr.) rechts neben der Sequenz, Spezieszuordnung s.u.) wurden in einem multiplen Alignment mittels MegAlign (DNASTAR Lasergene 6.0) mit der Sequenz des *Methylobacterium radiotolerans* (Acc-Nr.: JQ659468) verglichen. Die Nummerierung (links neben der Sequenz) gibt die Basenlokalisierung innerhalb der Sequenz an. Roter Kasten stellt die Primerbindungsstelle des neuen Forwardprimers 16S F22 dar. Die Sequenz des 16S F22 ist als roter Pfeil, die Sequenz des ursprünglichen 16S F2 als schwarzer Pfeil dargestellt. **R=** A oder G; **B=** G,C, oder T; **N=** G,A,C, oder T (mit A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin).

E. coli (X80725), *V. cholerae* (X74694), *H. influenzae* (M35019), *P. aeruginosa* (Z76651), *M. catarrhalis* (U10876), *P. stomatis* (M75050), *Enterobacter sp.* (kr189513), *C. pneumoniae* (L06108), *C. psittaci* (AB001778), *B. caribiensis* (Y17009), *B. pertussis* (U04950), *B. subtilis* (X60646), *M. paratuberculosis* (X52934), *R. prowazekii* (M21789), *S. intermedius* (KX661123), *L. casei* (M23928), *M. pneumoniae* (M29061), *M. salivarium* (M24661), *Atopobium sp.* (eu186380), *Prevotella sp.* (gu413632), *Synergistetes bacterium* (gu430992), *R. bicirculans* (hf545617), *V. parvula* (kp944173), *V. dispar* (gu403785), *S. anginosus* (kx661074), *S. salivarius* (kx661124), *E. faecalis* (ky392985), *E. faecalis* (ky660402), *P. piscicola* (lt558830), *F. nucleatum* (NR_113378), *Bradyrhizobium genosp.* (jf266655).

Da nach Bindung eines Primers an seine Zielsequenz die Taq Polymerase den zweiten Strang in 3'-Richtung vervollständigt, stellt das 3'-Ende des Primers die wichtigste Stelle für die erfolgreiche Amplifikation in einer PCR dar. DNA-Bereiche mit einer Länge von 17-22 Basenpaaren, die innerhalb des Alignments eine hohe Homologie aufwiesen, sich aber am

3'-Ende von der Sequenz des Methylobakteriums unterschieden, wurden für die Lokalisation neuer Primer ausgewählt. So wurde die Amplifikation von Methylobakterien verhindert, während alle anderen Bakterien weiterhin detektierbar blieben. Im vorliegenden Beispiel (s. Abb. 15) enthielt der neue Primer 16S F22 an seinem 3'-Ende die Basenabfolge *-R-B*, sodass mit *R* Adenin und Guanin und mit *B* alle Basen außer Adenin, das nämlich in der Sequenz des Methylobakteriums an dieser Stelle auftritt, gebunden werden. Demzufolge konnte der Primer nicht an die DNA-Sequenz des Methylobakteriums binden und eine Amplifikation von Methylobakterien-DNA wurde so verhindert. Es war jedoch zu beachten, dass neben Methylobakterien im vorliegenden Alignment beispielsweise *Bradyrhizobium* (Accession-Nr.: jf266655) ebenfalls ein Adenin an dieser Stelle besitzt, sodass auch dieses Bakterium durch den Primer nicht detektiert wurde und seine Präsenz in den entsprechenden Patientenproben nicht auszuschließen war. In der Literatur wurde diese Gattung sowohl als Kontaminante, aber auch als Pathogen bei sekundärer apikaler Parodontitis diskutiert, sodass dessen pathogene Rolle noch nicht schlussendlich geklärt ist [88, 110].

Mittels *PrimerSelect* der Software *DNASTAR Lasergene 6.0* wurden mit gleicher Strategie die Forwardprimer 16S F11 und F12 sowie der Reversprimer 16S R22 entwickelt und neue Mastermixe hergestellt (s. Tabelle 4+5).

Um die optimale Annealing-Temperatur der neuen Primerpaare zu testen, wurde eine Temperaturgradienten-PCR (s. Abb. 16) mit anschließender Analyse der Amplifikations- und Schmelzkurve (s. Kap. 3.3.1) durchgeführt. Dabei wurden ausgehend von der in den 16S 500/900 PCR-Läufen üblichen Annealing-Temperatur von 55°C (s. Tabelle 7) Werte ober- und unterhalb dieser Temperatur gewählt. Der PCR-Mix enthielt jeweils die gleiche für *Streptococcus mutans* positive Patientenprobe, sodass die Ergebnisse untereinander verglichen und die optimalen Annealing-Temperaturen für die Primerpaare bestimmt werden konnten. Anhand der jeweiligen Ct-Werte der Amplifikationsreaktionen konnte die optimale Annealing-Temperatur für jedes Primerpaar bestimmt werden. Niedrige Ct-Werte wiesen dabei auf eine schnelle und erfolgreiche Synthese von PCR-Produkten hin (s. Kap. 3.3.1). Bis auf das Primerpaar 16S F22/ 16S R2 der 16S_N3 PCR mit einer optimalen Annealing-Temperatur von ca. 58°C, zeigte sich für die übrigen Primerpaare weiterhin 55°C als Optimum.

T/°C*	16S_N1/ Ct	16S_N1-11/ Ct	16S_N1-12/ Ct	16S_N2/ Ct	16S_N3/ Ct
58,6 °C	29,5	31	29	28	27
58,3 °C	29,2	30	27,5	27	26,9
57,6 °C	29,1	28,8	27,3	26,7	26,9
56,4 °C	29,1	28,5	27	26,6	28
55,0 °C	29	27,2	26,4	26,5	29,5
53,8 °C	31	28	27,2	27,2	31
53,0 °C	32,8	30,1	27,9	27,5	31,3
52,6 °C	33	32	28	28	31,6

Abb. 16: Temperaturgradienten-PCR zur Bestimmung der optimalen Primerannealing-Temperatur

*T/°C: Annealing-Temperaturen. Die Überschriften der Spalten bezeichnen die jeweilige PCR mit den gemäß Tabelle 4 (s. Kap. 2.2.7) verwendeten Primerpaaren. Der jeweilige Ct-Wert der Amplifikationsreaktion wurde bestimmt und der niedrigste Wert für jedes Primerpaar in rot markiert.

Die PCR-Läufe mit den neu hergestellten PCR-Mixen (s. Tabelle 4) wurden nacheinander für die Patientenproben durchgeführt, in denen in der 16S Pan-PCR bislang *Methylobacterium* als Hauptkeim nachgewiesen wurde. Nur das neu entwickelte Primerpaar mit dem Forwardprimer 16S F22 und 16S R2 als Reversprimer lieferte in der 16S_N3 PCR eine sequenzierbare Menge an PCR-Produkten, die nicht *Methylobacterien* aufzeigten.

Im Wurzelfüllmaterial konnten dank der neu entwickelten Primer in 7/11 Fällen Bakterienspezies identifiziert werden. Die übrigen vier Proben lieferten aufgrund zu geringen DNA-Gehalts keine eindeutig sequenzierbaren Produkte.

Im Vergleich zur subgingivalen Plaqueprobe enthielt das Wurzelfüllmaterial oftmals nur eine geringe Menge an DNA (s. Kap. 3.1). Zeigte sich in der Schmelzkurvenanalyse ein zu geringer Schmelzpeak, sodass eine Sequenzierung nicht möglich war, konnte die Sensitivität der PCR durch Reamplifikation des PCR-Produkts gesteigert werden. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, pur sowie in den Verdünnungen 1:100, 1:1000, 1:10000 und 1:100000 in einem erneuten PCR-Lauf reamplifiziert. Voraussetzung hierfür war, dass in der

Schmelzkurvenanalyse keine Primerdimere nachgewiesen wurden, sonst hätte eine erneute PCR auch diese reamplifiziert und eine Sequenzierung unmöglich gemacht.

Lieferten PCR-Produkte aus DNA-Verdünnungen einer Probe in der Schmelzkurvenanalyse qualitativ gleiche Ergebnisse (s. Kap. 3.3.1), wurden diese PCR-Ansätze zur Erhöhung der Produktmenge vereinigt, gemeinsam aufgereinigt und Sanger-sequenziert. Die PCR-Produkte von 5 aus insgesamt 126 entnommenen Proben (Plaque, K-, WF) wurden in einer zweiten PCR reamplifiziert. In 4/5 Fällen konnte dank dieses Verfahrens anschließend ein Pathogen eindeutig identifiziert werden: in der Plaqueprobe *Veillonella dispar* (Patient 17) und *Pasteurellaceae* (Patient 18), im Wurzelfüllmaterial *Escherichia coli* (Patient 17) und *Acinetobacter* (Patient 19).

3.3.4 Pilznachweise mittels Pan-Pilz PCR: Auf dem Weg zum phylogenetischen Stammbaum

In der Pan-Pilz PCR erfassen die Primer ITS1 (Forwardprimer) und ITS4 (Reversprimer) eine Nukleotidsequenz von insgesamt ca. 660 Basenpaaren (bp) und binden im Bereich der 18S rDNA- bzw. 28S rDNA-Sequenz (Primersequenzen: s. Tabelle 1).

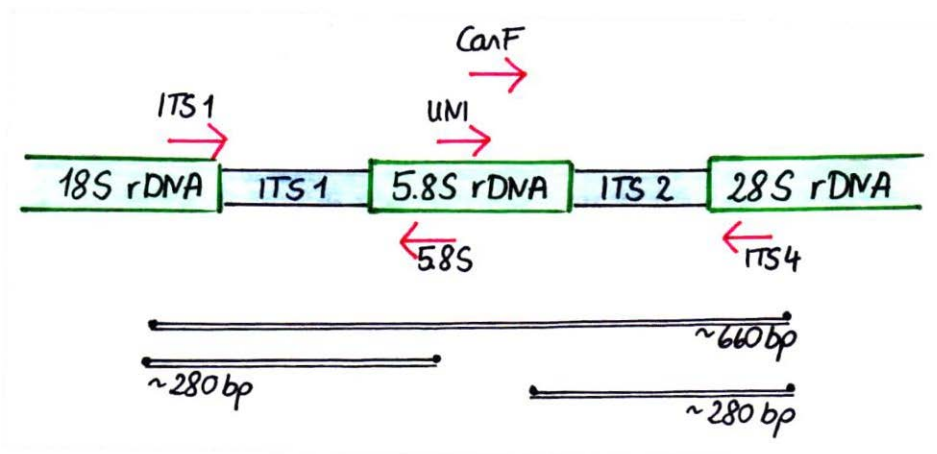


Abb. 17: Schematische Darstellung der Bindungsstellen der Primerpaare an die Pilz-rDNA

Roter Pfeil kennzeichnet die jeweilige Primerlokalisation mit Wanderungsrichtung der DNA-Polymerase (Primersequenzen: s. Tabelle 1). Amplikonlängen in Basenpaaren (bp) angegeben. Die in der jeweiligen PCR eingesetzten Primerpaare sind Tabelle 4 (s. Kap. 2.2.7) zu entnehmen.

Ähnlich den bakteriellen Pan-PCRs 16S 500/900 zeigte sich auch die Pan-Pilz PCR als Breitspektrum-PCR sehr unsensitiv. Während mit der Pan-Pilz PCR im Wurzelfüllmaterial in nur einer Probe *Candida albicans* identifiziert wurde (32-3), konnten in der subgingivalen Plaqueprobe in keiner Probe Pilze nachgewiesen werden. Die Desinfektionskontrolle zeigte ebenfalls keinen Nachweis.

Um die Sensitivität der Pan-Pilz PCR zu erhöhen, wurden Primer entwickelt, die innerhalb der durch ITS1 und ITS4 begrenzten Sequenz binden konnten. Das PCR-Produkt wurde durch zwei PCRs nahezu halbiert und sollte somit die Sensitivität jeder Einzelreaktion erhöhen. Die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Pan-Pilz_2 PCR erfasste als Duplex-PCR zwei DNA-Bereiche. Das vordere Amplikon (2.1) mit einer Länge von ca. 280 Basenpaaren wurde durch ITS1 als Forwardprimer und den 5.8S als Reverseprimer definiert. Uni (Forwardprimer) und ITS4 (Reversprimer) begrenzten das hintere Amplikon (2.2), ebenfalls mit einer Länge von ca. 280 Basenpaaren (s. Abb. 17). (Da die ITS-Bereiche mutationsanfällig sind, können innerhalb der Pilzgattungen/-arten Nukleotidinsertionen/-deletionen zu unterschiedlichen PCR-Produktlängen führen.)

Die Pan-Pilz_2 PCR lieferte jedoch bis auf Probe 32-3 aus dem Wurzelfüllmaterial, die bereits durch die Pan-Pilz PCR identifiziert worden war, keinen weiteren Pilznachweis.

In weiterführenden Analysen unserer Arbeitsgruppe hat sich gezeigt, dass die Trennung der Duplex Pan-Pilz_2 PCR in zwei getrennte Monoplex PCRs (2.1 und 2.2) die Sensitivität des Pilznachweises erhöhte (s. Abb. 17). In beiden Monoplex-Reaktionen wurde erneut in Probe 32-3 *Candida albicans* amplifiziert und mittels Sanger-Sequenzierung nachgewiesen. Während die Pan-Pilz_2.2 PCR für alle weiteren Proben negativ blieb, konnten in der subgingivalen Plaqueprobe mittels der Pan-Pilz_2.1 PCR in drei weiteren Fällen *Candida albicans* amplifiziert und anschließend mittels Sequenzierung identifiziert werden.

Als Duplex-PCR lieferte die Pan-Pilz_2 PCR gegenüber der Breitspektrum-PCR Pan-Pilz also keinen Vorteil. Aufgeteilt in zwei Monoplex-Reaktionen aber, konnten dank der Pan-Pilz_2.1 PCR drei zusätzliche Pilznachweise erfolgen.

Die bisherigen Ergebnisse hatten ausschließlich *Candida albicans* als Pilzspezies nachgewiesen. Ob sich weitere Candidaarten in den Proben detektieren ließen, sollte mittels einer Candida-spezifischen PCR im nächsten Schritt untersucht werden. Dabei wurden die Primer CanF als Forward- und ITS4 als Reversprimer in die PCR eingesetzt, die im Zweig

der *Candida* einen Sequenzbereich von ca. 280 Basenpaaren begrenzten (s. Tabelle 4, Abb. 17). Der Forwardprimer sicherte die Spezifität der Reaktion auf den Pilzzweig von *Candida* und ermöglichte dadurch eine Sensitivitätssteigerung der PCR. So konnte in einer weiteren subgingivalen Plaqueprobe *Candida albicans* nachgewiesen werden, in der Desinfektionskontrolle wurde in einer Probe *Cladosporium* detektiert und im Wurzelfüllmaterial zeigten sogar fünf Proben einen Candidanachweis. Davon waren vier Proben positiv für *Candida albicans* und eine Probe für *Candida utilis* (s. Tabelle 9, Kap. 3.4).

Um die Phylogenie der mittels PCR detektierten Pilze zu untersuchen, wurden die Sanger-Sequenzen in einem Multisequenzalignment mittels der Software *MegAlign* analysiert. Da in Probe 32-3 mithilfe jeder Pilz-PCR (Pan-Pilz, _2, _2.1, _2.2 und *Candida* PCR) *Candida albicans* nachgewiesen wurde (s. Tabelle 9), wurden die ermittelten Sanger-Sequenzen vorher durch die Software *SeqMan (DNASTAR Lasergene 6.0)* in einer Konsensussequenz zusammengefasst. Abbildung 18A zeigt das Sequenzalignment der mittels PCR detektierten Pilze in absteigender Homologie zur ersten Sequenz (Pilz 15-3). So war ein direkter Vergleich der Nukleotidabfolge (218 bp) zwischen den Pilzarten möglich. Der Verwandtschaftsgrad der Pilze wurde in einem phylogenetischen Stammbaum schematisch dargestellt (s. Abb. 18B).

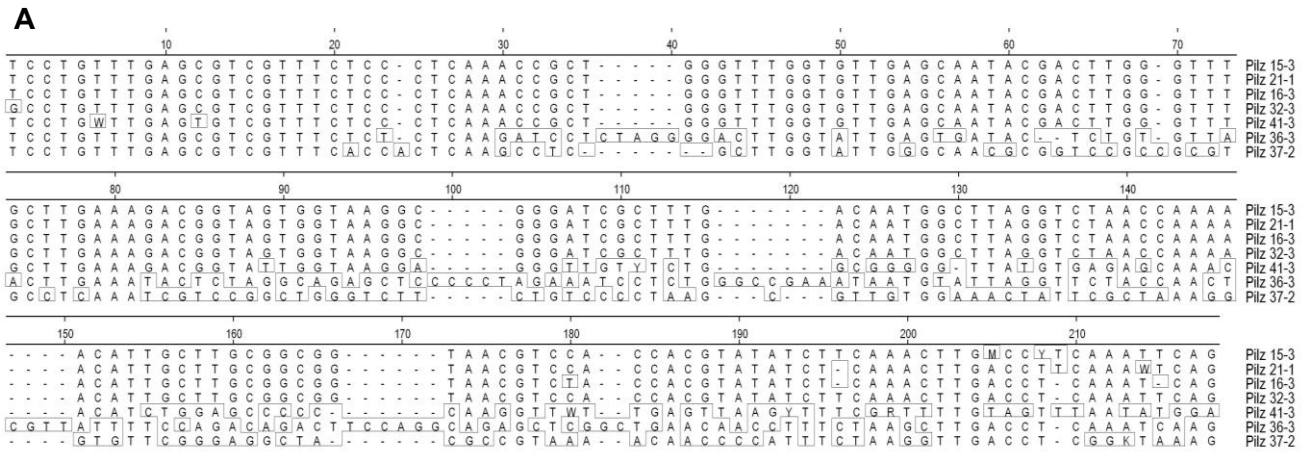


Abb. 18: Verwandtschaft der mittels PCR detektierten Pilze

A Multiples Sequenzalignment von Pilz-Sequenzen mit Probenbezeichnung rechts (*Pilz x-y* mit x: Probandennummer, y: Probe 1 (Plaue), 2 (K-), 3 (WF)). Nukleotidunterschiede gerahmt; W: Adenin oder Thymin, K: Guanin oder Thymin, M: Adenin oder Cytosin. **B** Phylogenetischer Stammbaum in Abhängigkeit von der Anzahl an Nukleotidsubstitutionen (x100).

3.4 Ergebnisse der molekulargenetischen Analyse

Fokus der Studie lag auf der Detektion von Bakterien und Pilzen im Wurzelfüllmaterial bei Vorliegen einer postendodontischen apikalen Parodontitis. Die identifizierten Pathogene und die PCR, mittels derer sie nachgewiesen wurden, sind als Übersichtstabelle 9 gelistet. Dieser ist zu entnehmen, dass im Wurzelfüllmaterial mittels PCR in 30/42 Proben dominante Bakterien und in 5/42 Proben Pilze detektiert werden konnten.

Probe	Keim	PCR ^a
1	Synergistetes bac. oral taxon D48	16S 500
2	Streptococcus anginosus	16S 900
3	Mischsequenz	16S 900
4	Mischsequenz	16S 900
5	Fusobacterium nucleatum	16S 500
6	negativ	16S 500
7	Pyramidobacter piscolens	16S 500
8	Streptococcus salivarius	16S 900
9	Streptococcus intermedius	16S 500
10	Mischsequenz	16S 500
11 ^b	Enterococcus faecalis	16S 500
12	Enterococcus faecalis	16S 500
13	Mischsequenz	16S 900
14 ^b	negativ	16S_N3 ^c
15	Veillonella parvula Candida albicans	16S 500 Candida
16 ^b	Pyramidobacter piscolens Candida albicans	16S 500 Candida
17 ^b	Escherichia coli	16S_N3 ^c
18 ^b	Enterobacter asburiae	16S 900
19 ^b	Acinetobacter sp.	16S_N3 ^c
20 ^b	Bacillus licheniformis	16S_N3
21	Atopobium sp.	16S 500
22	Prevotella sp. oral taxon	16S 500
23 ^b	Pseudomonas sp.	16S_N3
24	Enterobacter sp.	16S 500
25	Mischsequenz	16S 500
26	Bacteroidetes bac. oral taxon 272	16S_N3
27 ^b	Bradyrhizobium	16S 500
28	negativ	16S 500
29	Pseudoramibacter alactolyticus	16S 500
30	Enterococcus faecalis	16S 500
31	Lactobacillus cateniformis	16S 500
32	Candida albicans	Candida, Pan-Pilz, Pan-Pilz 2, 2.1, 2.2
33	Ruminococcus bicirculans	16S 500
34	Veillonella sp.	16S 500
35	negativ	16S_N3
36 ^b	Streptococcus mutans Candida utilis	16S_N3 Candida
37	Mischsequenz	16S_N3
38	Veillonella parvula	16S 500
39	Erythrobacteraceae	16S_N3
40 ^b	Enterococcus faecalis	16S 900
41 ^b	Fusobacterium nucleatum Candida albicans	16S 900 Candida
42	Mischsequenz	16S_N3

Tabelle 9: Detektierte Bakterien und Pilze im Wurzelfüllmaterial mittels PCR

Zeigte sich in der Schmelzkurvenanalyse gemäß Kapitel 3.3.1 kein sequenzierbares PCR-Produkt, wurde die Probe als **negativ**, bei erfolgloser BLAST-Analyse nach Sanger-Sequenzierung (s. Kap. 3.3.2) als **Mischsequenz** interpretiert. ^a Pan-PCRs gemäß Tabelle 4, ^b Verdünnung der Probe mit 10mM Tris-Puffer (pH-Wert: 8.0) im Verhältnis 1:3, ^c Reamplifikation des PCR-Produkts, um eine sequenzierbare Produktmenge zu erhalten.

Für die Proben 6, 14, 28 und 35 zeigten sich in den Schmelzkurvenanalysen (s. Kap. 3.3.1) keine sequenzierbaren PCR-Produkte, sodass die PCRs als negativ beurteilt wurden. Da für jene WF-Proben auch der Kulturnachweis negativ blieb, musste an dieser Stelle von einer unzureichenden mikrobiellen Beladung der Proben ausgegangen werden.

Der Anteil an aeroben/aerotoleranten Bakterien lag im Wurzelfüllmaterial bei 3/42 Proben, während 27 Proben Anaerobier/fakultative Anaerobier als Leitkeime enthielten. Abbildung 19 spiegelt das Verhältnis von Pilzen und aeroben bzw. anaeroben Bakterien zwischen den drei verschiedenen Proben (Plaque, K-, WF) wieder.

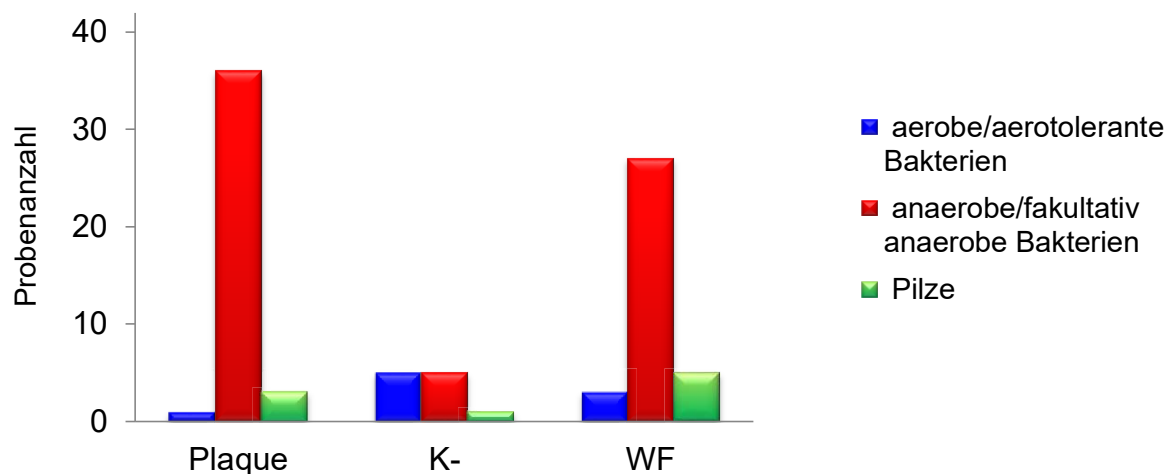


Abb. 19: Übersicht über die Anzahl der Proben mit Nachweis von Bakterien und Pilzen mittels PCR

Die Einteilung in aerobe/aerotolerante, anaerobe/fakultativ anaerobe Bakterien und Pilze in der subgingivalen Plaque (**Plaque**), der Desinfektionskontrolle (**K-**) und dem Wurzelfüllmaterial (**WF**).

Nicht nur im Wurzelfüllmaterial, sondern auch in der Plaqueprobe zeichnete sich eine deutliche Dominanz der anaeroben/fakultativ anaeroben Bakterien ab, die mittels PCR als Leitkeime identifiziert wurden. Verglichen mit der Plaqueprobe und der Desinfektionskontrolle, wurden Pilze am häufigsten im Wurzelfüllmaterial (5/42 Proben) nachgewiesen.

Im nächsten Schritt wurden die mittels PCR detektierten Mikroorganismen bezüglich ihrer Gram-Färbung charakterisiert und in Abbildung 20 dargestellt.

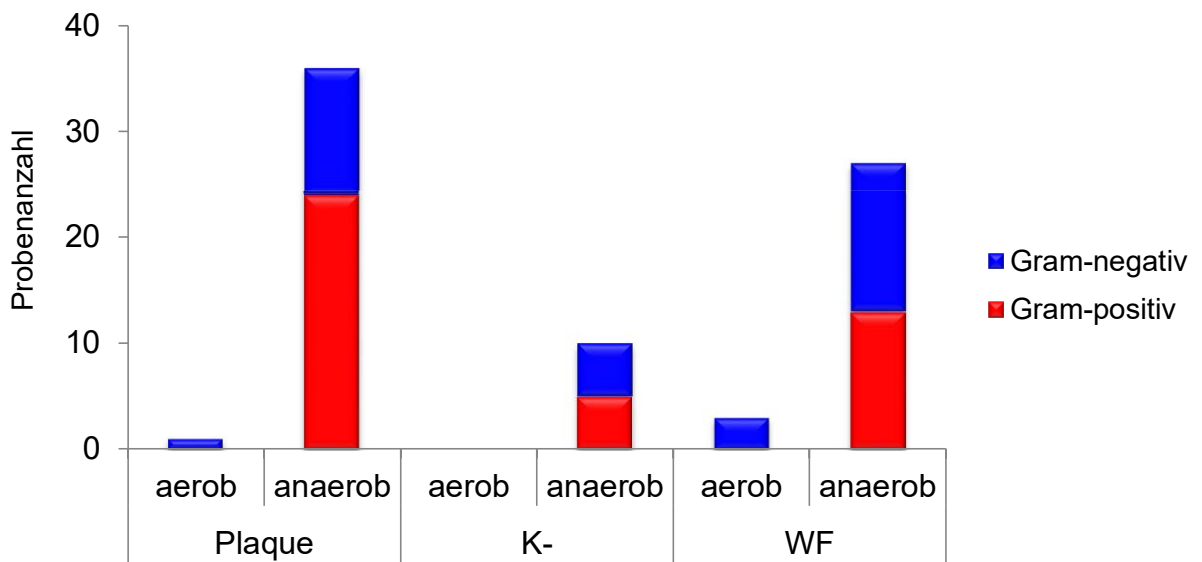
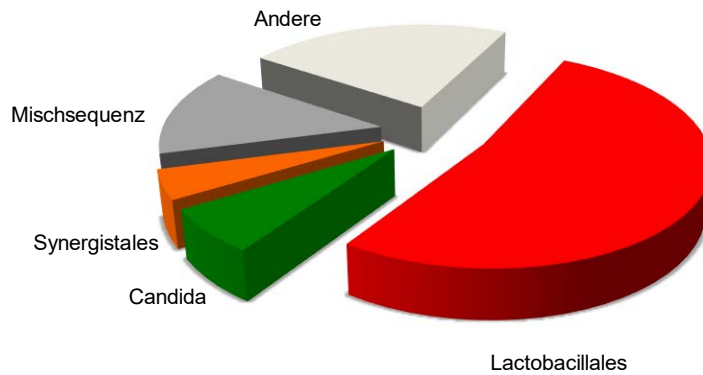


Abb. 20: Einteilung der mittels PCR detektierten Bakterien in den drei Proben nach Gram-Färbung und Stoffwechselverhalten

Einteilung in **aerobe** (=aerobe und aerotolerante) und **anaerobe** (=anaerobe und fakultativ anaerobe) Bakterien. Subgingivale Plaqueprobe (**Plaque**), Desinfektionskontrolle (**K-**) und Wurzelfüllmaterial (**WF**).

Dabei überwogen in Probe 1 (Plaque) mit einem Gesamtanteil von 65% die Gram-positiven Anaerobier, während in Probe 3 (WF) die Gram-negativen Anaerobier mit insgesamt 47% den größten Anteil ausmachten. Die Dominanz der Gram-positiven Anaerobier in der Plaque kam dadurch zustande, dass insbesondere *Lactobacillales* (52%) als Hauptordnung vertreten war. Neben *Candida* (7%) ließen sich *Synergistales* (4%) als weitere dominante Gruppen identifizieren (s. Abb. 21).

Plaque



WF

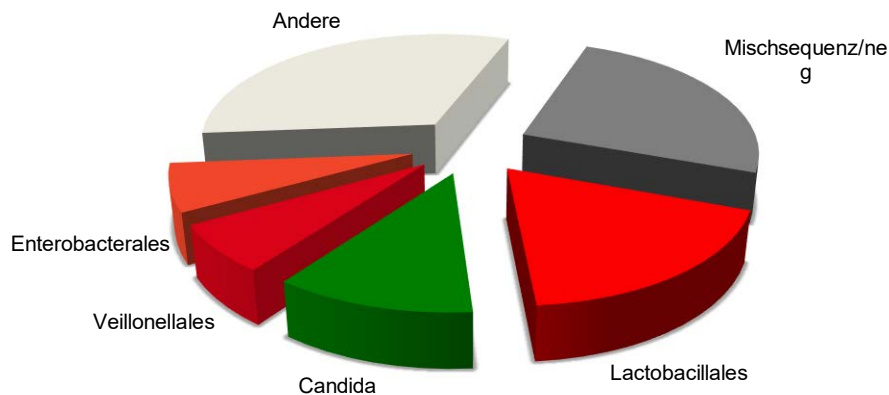


Abb. 21: Mittels Pan-PCR detektierte Mikroorganismen in subgingivaler Plaque und im Wurzelfüllmaterial

Untersuchte Proben der subgingivalen Plaque (Plaque) und des Wurzelfüllmaterials (WF). Taxonomische Ebenen: Bakterien in Ordnungen, Pilze in Gattungen gruppiert. Ordnungen mit überwiegend Gram-positiven Bakterien sind in rötlichen Farbtönen und Pilze in grün dargestellt. Unter **Andere** wurden Ordnungen mit geringem prozentualen Anteil zusammengefasst, darunter fallen Ordnungen mit überwiegend Gram-negativen Bakterien. Unter **Mischsequenz[en]/neg[ativ]** fallen Proben, die in der PCR kein PCR-Produkt lieferten oder deren PCR-Produkten in der BLAST-Analyse kein dominanter Keim zugeordnet werden konnte (s. Kap. 3.3.2).

In der Plaqueprobe wurden aus der Ordnung *Lactobacillales* nur *Streptococcus*-Spezies identifiziert (22/42 Proben), überwiegend *Streptococcus mitis/oralis*. Die Ordnung *Synergistales* konnte mittels BLAST-Analyse nicht auf Speziesebene differenziert werden.

Candida albicans wurde in allen Pilz-positiven Plaqueproben (3/42 Proben) als Spezies nachgewiesen. Der Anteil an *Candida* stieg im Wurzelfüllmaterial auf 5/42 Proben an. Neben *Candida albicans* (4/5 Proben) wurde *Candida utilis* (1/5 Proben) identifiziert.

In 30/42 Guttapercha-Proben konnte ein dominantes Pathogen nachgewiesen werden. Zwar wurden *Lactobacillales* noch am häufigsten detektiert, jedoch ging insgesamt der Anteil von 52% auf 24% zurück. Auf Speziesebene konnte aber gezeigt werden, dass anders als in der Plaqueprobe nicht nur *Streptococcus spp.*, sondern in 4/42 Proben auch *Enterococcus faecalis* detektiert wurde.

In jeweils 3/42 WF-Proben ließen sich Bakterienspezies der Ordnungen *Enterobacterales* und *Veillonellales* als Leitkeime nachweisen, wovon nur letztere auch in einer Plaqueprobe detektiert wurde.

Schwer kultivierbare Spezies der Ordnung *Synergistales* wurden sowohl in der Plaque als auch im Wurzelfüllmaterial (2/42 Proben, s. Abb. 21 unter „Andere“) nachgewiesen. Neben den Spezies *Synergistes* und *Pyramidobacter* (Ordnung: *Synergistales*) wurden weitere schwer oder nicht kultivierbare Bakterienarten in insgesamt 8/42 Wurzelfüllungen mittels PCR identifiziert (die Ordnung jeweils in Klammern): *Acinetobacter* (*Pseudomonales*), *Atopobium* (*Coriobacterales*), *Ruminococcus* und *Pseudoramibacter* (*Clostridiales*) und das Phylum *Bacteroidetes*. Nur *Pyramidobacter* konnte in zwei Proben detektiert werden, die sechs anderen schwer kultivierbaren Bakterien in jeweils nur einer Probe. Aufgrund der geringen Prävalenz der jeweiligen Spezies im Wurzelkanal, wurden die schwer kultivierbaren Bakterien unter „Andere“ zusammengefasst (s. Abb. 21).

Ausschließlich *Bacteroidetes*, *Synergistales* und *Coriobacterales* wurden ebenfalls in jeweils einer Plaqueprobe nachgewiesen (s. Abb. 21 unter „Andere“).

Die Analyse des Zusammenhangs zwischen den im Wurzelfüllmaterial detektierten Keimen und der oralen Mikroflora eines Patienten ergab folgende Ergebnisse:

In nur vier Proben konnte der mittels PCR identifizierte Leitkeim aus dem Wurzelfüllmaterial auch in der subgingivalen Plaqueprobe als dominanter Keim mittels PCR nachgewiesen werden. In je zwei Fällen handelte es sich um *Streptococcus spp.* bzw. *Candida albicans*.

Betrachtete man sowohl die PCR- als auch die Kultur-Ergebnisse der Proben 1 (Plaque) und 3 (WF), so konnten in 11 Fällen *Streptococcus spp.* in beiden Proben nachgewiesen werden und in sechs Fällen *Actinomyces spp.*. In Einzelfällen wurden auch *Veillonella*,

Fusobacterium, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* und *Rothia* in der Plaqueprobe und im Wurzelfüllmaterial eines Zahns nachgewiesen.

An dieser Stelle lässt sich also festhalten, dass vermehrt *Streptococcus spp.* und *Actinomyces spp.* gleichzeitig sowohl in der Plaque als auch im Wurzelfüllmaterial eines Zahns vorkommen, sich darüber hinaus aber das bakterielle Spektrum im Wurzelfüllmaterial von dem polymikrobiellen Gemisch in der subgingivalen Plaque unterscheidet.

3.5 PCR und Kultur im Vergleich

Stellt man die PCR-Ergebnisse den Nachweisen aus der Kultur gegenüber, können Gemeinsamkeiten und Unterschiede festgestellt werden.

Abbildung 22 zeigt den Vergleich der in den drei Proben detektierten Pilze und aeroben/aerotoleranten bzw. anaeroben/fakultativ anaeroben Bakterien.

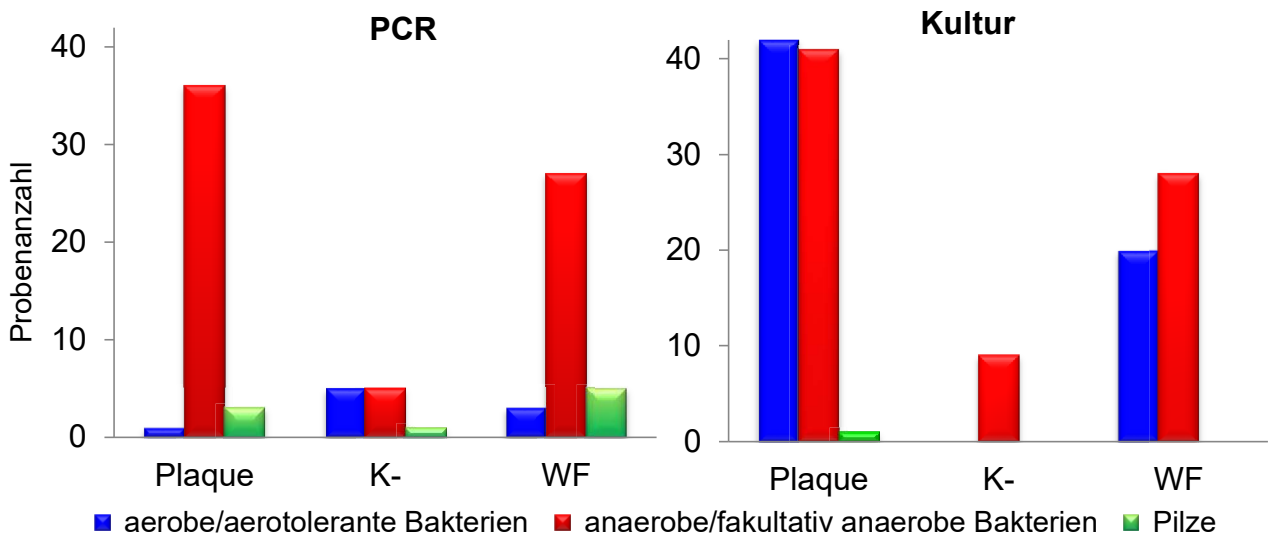


Abb. 22: Übersicht über die Anzahl der Proben mit PCR-Nachweis von Bakterien und Pilzen im Vergleich zum kulturellen Nachweis

Anteil aerober/aerotoleranter bzw. anaerober/fakultativ anaerober Bakterien und Pilze in der subgingivalen Plaque (**Plaque**), der Desinfektionskontrolle (**K-**) und dem Wurzelfüllmaterial (**WF**).

Obwohl in fast allen Plaqueproben kulturell sowohl Aerobier als auch Anaerobier nachgewiesen wurden, wurden in nahezu allen Fällen letztere auch als Leitkeime in der PCR identifiziert. Diese deutliche Dominanz der Anaerobier im Vergleich zu aeroben/aerotoleranten Bakterien zeigte sich ebenfalls im Wurzelfüllmaterial mittels PCR. In Kultur war das Verhältnis nicht so stark ausgeprägt. Abbildung 22 macht zudem deutlich, dass mittels PCR Pilze nachgewiesen wurden, die im Kulturverfahren nicht detektiert werden konnten.

Dieser Unterschied wird ebenfalls durch Abbildung 23 deutlich. Sie zeigt abermals, dass es nur mittels PCR möglich war, *Candida* als prominente Pilzgattung in den Proben zu detektieren, da kulturell in allen drei Proben in nur 1/126 Proben (Plaque) ein Pilz nachgewiesen wurde.

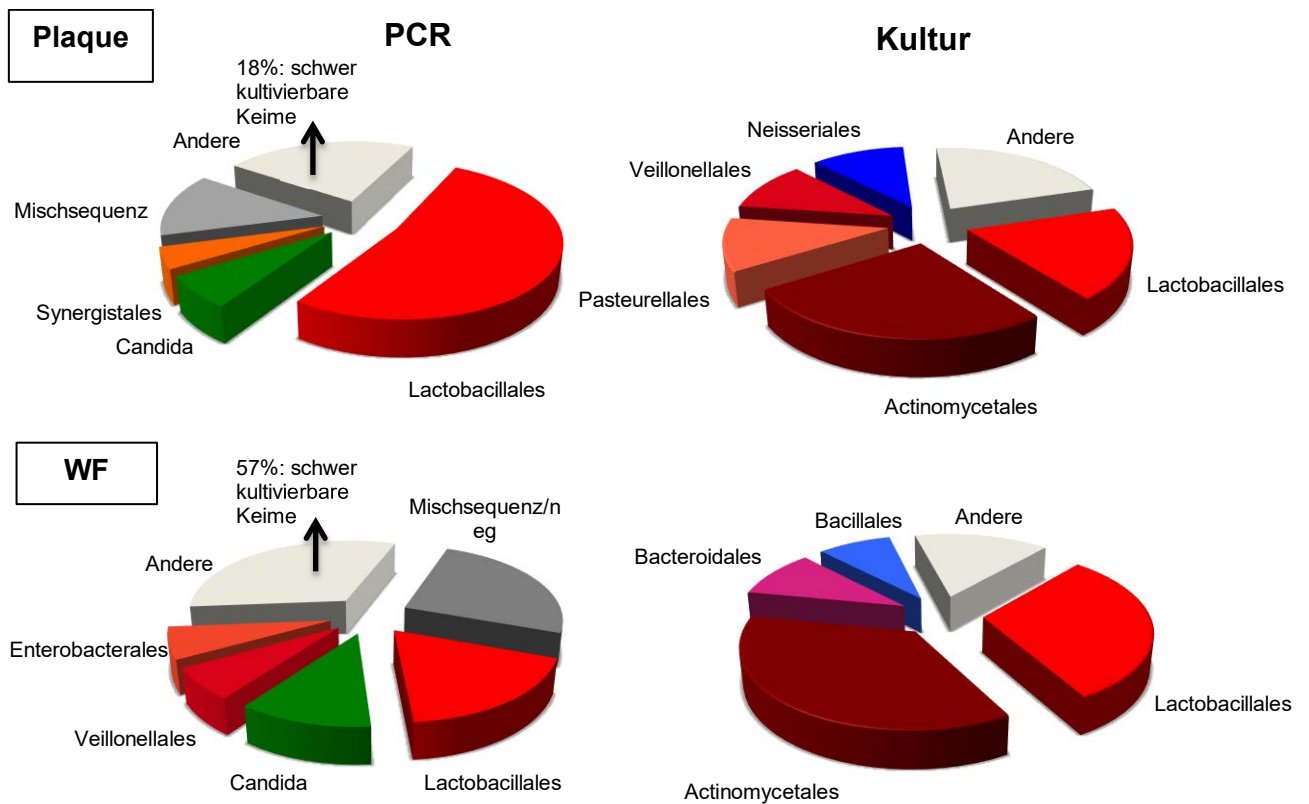


Abb. 23: Mittels PCR und Kultur detektierte Mikroorganismen in subgingivaler Plaque und im Wurzelfüllmaterial

Untersuchte Proben der subgingivalen Plaque (Plaque) und des Wurzelfüllmaterials (WF). Taxonomische Ebenen: Bakterien in Ordnungen, Pilze in Gattungen gruppiert. Ordnungen mit überwiegend Gram-positiven Bakterien sind in rötlichen Farbtönen, Ordnungen mit überwiegend Gram-negativen Bakterien in Blautönen und Pilze in grün dargestellt. Unter **Andere** wurden Ordnungen mit geringem prozentualen Anteil zusammengefasst, davon machten die schwer kultivierbaren Keime 18% (Plaque) bzw. 57% (WF) aus. Unter **Mischsequenz[en]/neg[ativ]** fallen Proben, die in der PCR kein PCR-Produkt lieferten oder deren PCR-Produkten in der BLAST-Analyse kein dominanter Keim zugeordnet werden konnte (s. Kap. 3.3.2).

Sowohl mittels PCR als auch Kultur konnten in der Plaque und im Wurzelfüllmaterial *Lactobacillales* als eine der Hauptbesiedler identifiziert werden. Im Gegensatz zur PCR ließen sich jedoch kulturell in beiden Proben (Plaque, WF) *Actinomycetales* als dominanteste Ordnung nachweisen. Wie bereits in Abbildung 22 gezeigt, macht Abbildung 23 durch die farbliche Codierung der Gram-positiven (rot) und Gram-negativen (blau) Keime ebenfalls deutlich, dass zwar kulturell in der Plaque und im Wurzelfüllmaterial Gram-positive und Gram-negative Bakterien nachgewiesen wurden, die PCR aber fast ausschließlich Gram-positive Bakterien als Leitkeime in den Proben identifizierte.

Mittels PCR konnte im Vergleich zur Kultur gehäuft *Candida* in der Plaque und in der Guttapercha nachgewiesen werden. Abbildung 23 zeigt außerdem den Anteil an nicht oder nur schwer kultivierbaren Bakterien, die kulturell nicht erfasst wurden. In der Plaque wurden in 5/42 Proben schwer kultivierbare Bakterien mittels PCR nachgewiesen (*Synergistes*, *Acinetobacter* und *Bacteroidetes*). Der Anteil stieg in der Wurzelfüllung auf 8/42 Proben an (*Synergistes*, *Acinetobacter*, *Bacteroidetes*, *Atopobium*, *Pyramidobacter*, *Ruminococcus* und *Pseudoramibacter*).

Die mikrobiellen Nachweise unterschieden sich also je nach gewähltem diagnostischen Verfahren. In Abbildung 24 sind die Kultur-Ergebnisse den PCR-Ergebnissen für Probe 1 (Plaque) und 3 (WF) in Vierfeldertafeln gegenübergestellt.

Bakterien				Pilze			
Plaque	Kultur +	Kultur -	Σ	Plaque	Kultur +	Kultur -	Σ
PCR +	37	-	37	PCR +	1	2	3
PCR -	5	-	5	PCR -	-	39	39
Σ	42	-	42	Σ	1	41	42

WF	Kultur +	Kultur -	Σ	WF	Kultur +	Kultur -	Σ
PCR +	22	8	30	PCR +	-	5	5
PCR -	6	6	12	PCR -	-	37	37
Σ	28	14	42	Σ	-	42	42

Abb. 24: Vierfeldertafeln der Kultur- und PCR-Ergebnisse

Positive Ergebnisse für Bakterien und Pilze in den Proben aus subgingivaler Plaque (Plaque) und Wurzelfüllmaterial (WF) je nach Nachweisverfahren dargestellt (n=42).

Es ist festzustellen, dass die Kultur zum Nachweis von Bakterien in polymikrobiellen Gemischen (Plaqueprobe) ein geeignetes Verfahren darstellt, da alle 42 Proben kulturelles Wachstum zeigten, aber mittels PCR in 5/42 Proben aufgrund von Mischsequenzen kein dominantes Pathogen identifiziert werden konnte. Im Gegensatz dazu, konnte in der Plaque kulturell nur in einer Probe ein Pilz nachgewiesen werden, während die durchgeführten molekulargenetischen Analysen in drei Plaqueproben Pilznachweise lieferten.

Zur Diagnostik von Pathogenen im Wurzelfüllmaterial zeigte sich die PCR der Kultur überlegen, da die PCR auch nicht kultivierbare Pathogene nachweisen konnte. Mittels Kultur wurden im Wurzelfüllmaterial durchschnittlich 1-2 Spezies/Probe nachgewiesen, sodass an dieser Stelle die Kultur mit der PCR (d.h. Nachweis von jeweils 1 Spezies/Probe) leichter verglichen werden konnte (s. Kap. 3.2.1). In 30/42 Proben konnte mittels PCR ein dominantes Pathogen nachgewiesen werden. Davon konnten in acht Fällen schwer kultivierbare Keime kulturell nicht nachgewiesen werden (*Pyramidobacter* (2/42 Proben), *Synergistes*, *Acinetobacter*, *Atopobium*, *Ruminococcus*, *Pseudoramibacter* und *Bacteroidetes* (jeweils 1/42 Proben)).

Insgesamt zeigten sich 28/42 WF-Proben in Bakterienkultur positiv. Während die Kultur für keine WF-Probe einen Pilznachweis liefern konnte, wurden mittels PCR in 5/42 Proben Pilze identifiziert.

Eine statistische Signifikanz zwischen den Nachweisraten (d.h. Anzahl positiver Ergebnisse, s. Abb. 24) von Kultur und PCR für Probe 3 (WF) konnte mittels des McNemar-Tests allerdings nicht gezeigt werden.

3.6 Korrelation zwischen Anamnese und mikrobiellen Befunden

Die in die Studie eingeschlossenen Probanden ließen sich nach Geschlecht (*w/m*), Raucherstatus (*ja/nein*) und Alter (\leq / $>$ 50 Jahre) in Gruppen einteilen. Der endodontisch behandelte Zahn wurde nach der Wurzelanzahl (*ein-/mehrwurzelig*) und der prothetischen Versorgung (*ja/nein*) charakterisiert (s. Tabelle 8). Die Proben der Patientengruppen wurden daraufhin bezüglich DNA-Gehalt, Anzahl humaner Zellen (d.h. GAPDH-GE) und Anzahl kultivierter Bakterienspezies miteinander verglichen. Ferner sollte untersucht werden, ob sich die mittels Kultur und PCR identifizierten Mikroorganismen zwischen den Gruppen signifikant unterscheiden. Während letztere Analyse rein qualitativ erfolgte, wurden die restlichen Betrachtungen einer statistischen Auswertung mithilfe der Software *GraphPad Prism 5* unterzogen. Die Probeentnahmestellen wurden separat betrachtet und zur Analyse zwischen den Patientengruppen der t-Test für unabhängige Stichproben angewandt.

Die Gruppen *Geschlecht*, *Alter* und *Wurzelanzahl* zeigten in der Auswertung keine signifikanten Unterschiede bezüglich des DNA-Gehalts, der Anzahl humaner Zellen und kultivierter Bakterienspezies.

Anders verhielt es sich in den Gruppen *Raucherstatus* und *prothetische Versorgung*:

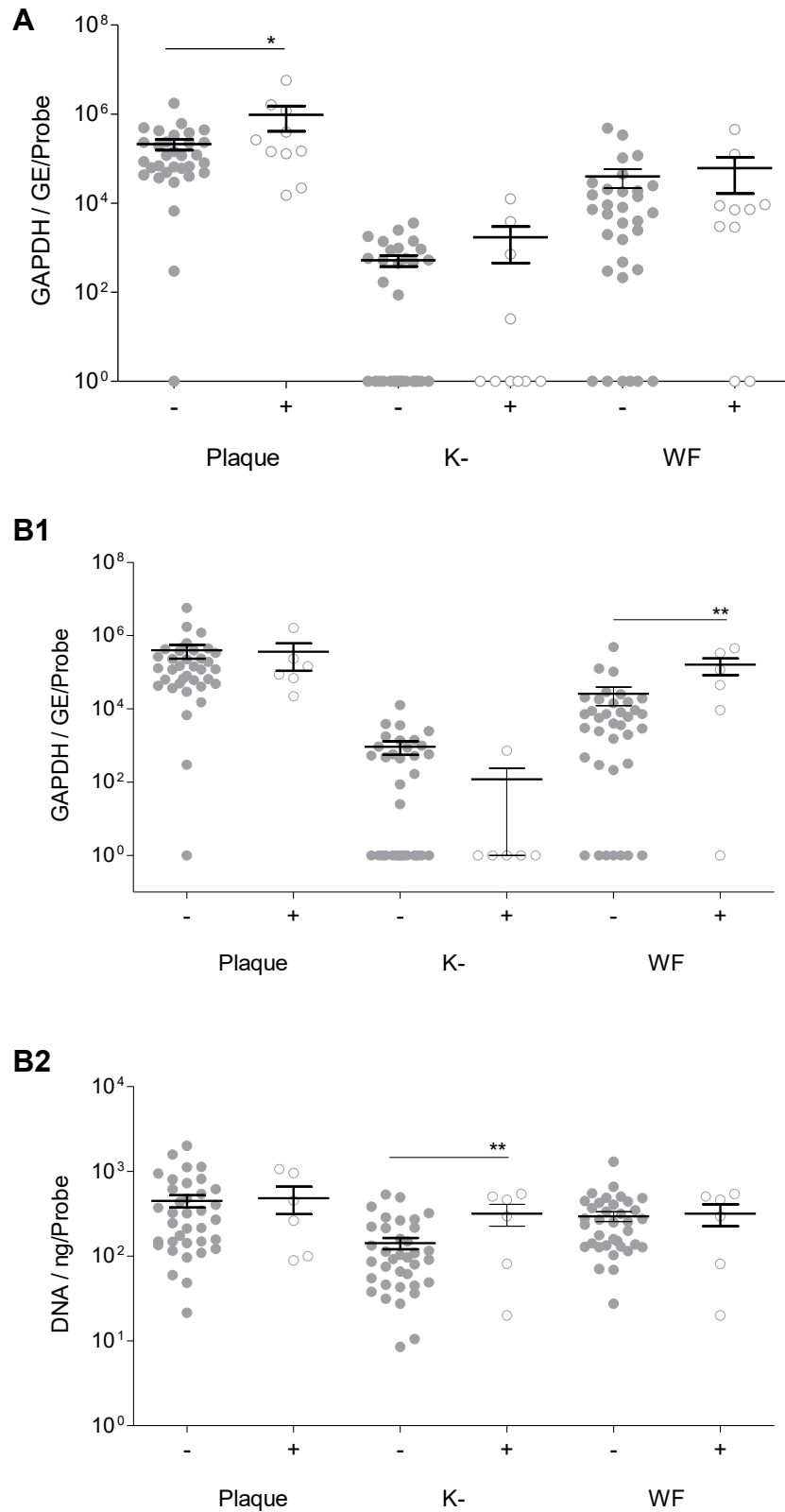


Abb. 25: Streudiagramme der Anzahl humaner Zellen pro Probe und DNA-Gehalt pro Probe in den Patientengruppen Raucherstatus und prothetische Versorgung

Signifikanzlevel mit ** $p=0.001-0.01$, * $p=0.01-0.05$ und eingezeichnetem Standardfehler. Proben aus **Plaque**, Desinfektionskontrolle (**K-**) und Wurzelfüllung (**WF**). **A** GAPDH-Genomäquivalente (GE) der Proben von überkronten (+) und nicht überkronten (-) Zähnen. **B1** GE der Proben und **B2** DNA-Gehalt (ng) der Proben von Rauchern (+) und Nichtrauchern (-).

Aus Abbildung 25A geht hervor, dass in Probe 1 (Plaque) für überkronte Zähne eine signifikant höhere Anzahl humaner Zellen pro Probe gemessen wurde als für nicht überkronte Zähne. Raucher zeigten in Probe 3 (WF) ebenfalls eine höhere Anzahl humaner Zellen und in der Desinfektionskontrolle einen höheren DNA-Gehalt pro Probe als Nichtraucher. Beide Unterschiede waren hoch signifikant ($p=0.001-0.01$, s. Abb. 25B1+B2), wobei die Probenanzahl in den verschiedenen Gruppen stark variierte: nur 6/42 Probanden waren Raucher und nur 10/42 Zähnen überkront (s. Tabelle 8). Die geringe Probenzahl lässt demzufolge keine aussagekräftige Beurteilung der Ergebnisse zu.

Anschließend erfolgte die Gegenüberstellung von den klinischen Befunden und den detektierten Keimen in der Plaqueprobe und dem Wurzelfüllmaterial.

10 von 42 untersuchten Zähnen wurden prothetisch mit einer Krone versorgt. Ihre Plaqueprobe verhielt sich insofern unauffällig, als keine Besonderheiten gegenüber den nicht überkronten, wurzelgefüllten Zähnen festgestellt werden konnten. Auch die Auswertung des Wurzelfüllmaterials zeigte für die Subpopulation der überkronten Zähne keine Auffälligkeiten.

In je drei Fällen lag eine insuffiziente (Aufbau-)Füllung bzw. eine positive Schmerzanamnese bei Befundaufnahme vor. Inwieweit dies Einfluss auf die mikrobielle Besiedlung in den Proben hatte, konnte aufgrund der geringen Probenzahl nicht beantwortet werden.

Allerdings fiel für die Subpopulation der Raucher auf, dass in 4/6 Fällen *Veillonella* im Wurzelfüllmaterial nachgewiesen wurde, davon in drei Fällen mittels PCR. In zwei Fällen wurde *Veillonella* nur im Wurzelfüllmaterial nachgewiesen und nicht in der subgingivalen Plaque. Bei den Nichtrauchern wurde die Bakteriengattung in keiner Wurzelfüllung mittels PCR und nur in einer WF-Probe mittels Kultur nachgewiesen. In der subgingivalen Plaque hingegen war *Veillonella* sowohl bei den Rauchern als auch bei den Nichtrauchern zu finden. Bei 4/6 Rauchern wurde das Bakterium in der Plaqueprobe nachgewiesen. Bei 25/36 Nichtrauchern konnte es mittels Kultur und davon in zwei Proben auch mittels PCR detektiert werden.

Es fiel also auf, dass *Veillonella* sowohl bei Rauchern als auch bei Nichtrauchern in der subgingivalen Plaque zu finden war, jedoch im Wurzelfüllmaterial vermehrt bei Rauchern nachgewiesen wurde.

4 Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 Probanden und Probennahmen

Die Probengröße von 42 wurzelgefüllten Zähnen lag zwar teilweise höher als in vorherigen vergleichbaren Studien [51, 57, 111, 112], jedoch war die Anzahl zu gering, um beispielsweise eine Aussage über Subpopulationen (Raucher 6/42, überkronte Zähne 10/42, etc.) zu treffen. Die Probengröße von 42 Zähnen war dennoch insofern gerechtfertigt, da der Fokus der Studie auf der generellen Analyse von Pathogenen im Wurzelfüllmaterial lag. Die Altersspanne der Probanden (28-77 Jahre) stellte eine repräsentative Verteilung dar und entsprach der in vorangegangenen Studien beschriebenen [50, 51, 111, 113, 114]. Die Schmerzanamnese sowie die prothetische Versorgung des Studienzahns beeinflussten die Probandenwahl nicht. Sofern die (Aufbau-)Füllung bei Befundaufnahme als insuffizient (d.h. mit der Sonde deutlich tastbarer Füllungsrand) beurteilt wurde, wurde diese zu Behandlungsbeginn ausgetauscht (in 3 von 42 Fällen). 10 Zähne waren prothetisch mit suffizienten Kronen (d.h. kein mit der Sonde deutlich tastbarer Kronenrand) versorgt.

Um den endodontisch relevanten Mikroorganismus einer postendodontischen Parodontitis zu identifizieren und eine Paro-Endo-Läsion auszuschließen, wurden nur Zähne mit Taschensondierungstiefen ≤ 5 mm in der Studie berücksichtigt, da das Endodont durch eine fortgeschrittene Parodontitis maßgeblich beeinflusst wird [115]. Eine systemische Antibiotikagabe hätte ebenfalls Einfluss auf die mikrobielle Zusammensetzung der Mundflora gehabt, sodass Patienten mit Antibiotikaeinnahme innerhalb der letzten drei Monate oder andersartigen Infektionen aus der Untersuchung ausgeschlossen wurden [1]. Um in die Studie aufgenommen zu werden, mussten die Zähne ein abgeschlossenes Wurzelwachstum vorweisen und die Distanz zwischen radiologischem Apex und Wurzelfüllung durfte maximal 5mm betragen. Ähnliche Ausschlusskriterien wurden bereits in vergleichbaren Studien beschrieben [42, 50, 57, 114].

Aufgrund der in der Literatur kontrovers diskutierten Methoden zur Probennahme wurde die subgingivale Plaqueprobe mittels Handscaler und steriler Papierspitze entnommen. Während sich beispielsweise *Candida* an Epithelzellen heftet und sich daher ein Handscaler zur Probennahme besser eignet, liegt der Vorteil einer Probennahme mit steriler Papierspitze in der Standardisierbarkeit, da Handscaler beispielsweise je nach Behandler mit unterschiedlich großer Druckapplikation verwendet werden [116]. Obwohl die Plaqueprobe in ähnlichen Studien oftmals nicht entnommen wurde [51, 112, 114], entschieden wir uns für sie, um

eventuelle Rückschlüsse auf den Zusammenhang von Keimen im Wurzelkanal und der oralen Mikroflora ziehen zu können (s. Kap. 3.4).

Das Anlegen des Kofferdams und Abdichten mit OpalDam isolierte den wurzelgefüllten Zahn und reduzierte eine Kontamination aus umliegenden Bereichen. Die Desinfektion des Zahns und des Kofferdams mit 30%-igem (w/v) H_2O_2 , 3%-igem (w/v) NaOCl und anschließend 5%-igem (w/v) $Na_2S_2O_3$ hatte sich in zahlreichen Studien bewährt [42, 51, 57, 64], sodass diese ebenfalls in unser Behandlungsprotokoll integriert wurde.

Trotz sorgfältiger Desinfektion fiel die Desinfektionskontrolle in einigen Fällen schwach positiv aus (s. Kap. 3.2.1). Während experimenteller Arbeiten in der unsterilen Mundhöhle besteht immer die Gefahr einer Rekontamination oder einer unzureichenden Desinfektion des unsterilen Zahns und wurde bereits bei gleichem Desinfektionsprotokoll beschrieben [57, 64]. Im Falle positiver Desinfektionskontrollen müssen diese Zähne entweder aus der Studie ausgeschlossen werden oder die Ergebnisse in Relation zu den übrigen Untersuchungsergebnissen gesetzt werden. Zwar konnten in vorliegender Untersuchung in wenigen Fällen auf dem desinfizierten Kavitätenboden (K-) Bakterien nachgewiesen werden, aber im Falle eines Nachweises lag die mikrobielle Beladung signifikant unter den Werten der Plaqueprobe und des Wurzelfüllmaterials, sodass wir uns entschieden, jene Zähne in die Studie einzuschließen.

Zylindrische Diamant- und Gates-Glidden-Bohrer sowie Hedström-Feilen stellen Standardinstrumentarien zur Revision von Wurzelfüllungen dar und fanden demnach auch in unserer Studie Anwendung [4, 17]. Während in bisherigen Studien vorrangig Papierspitzen zur Probennahme benutzt wurden [41, 47, 49, 51, 57, 64, 117, 118], dienten in unserer Studie Hedström-Feilen zur Gewinnung der Guttapercha des mittleren bzw. apikalen Wurzelkanaldrittels, die daraufhin untersucht wurde. Eine Studie von Karygianni et al. hatte 2015 gezeigt, dass sich abhängig von der Probennahme das bakterielle Spektrum unterschied. So konnten Bakterienspezies teilweise nur im Wurzelfüllmaterial, nicht aber mittels Papierspitzen detektiert werden [42]. Demzufolge wurde in unserer Studie auf die Verwendung von Papierspitzen zur Probennahme aus dem Wurzelkanal verzichtet und stattdessen entferntes Guttapercha auf Mikroorganismen hin untersucht. In vier Wurzelfüllmaterial-Proben konnten mittels PCR keine sequenzierbaren PCR-Produkte synthetisiert werden, sodass diese als negativ zu beurteilen waren (s. Kap. 3.4). Aufgrund der Tatsache, dass für diese Proben auch der Kulturnachweis negativ ausfiel, musste an dieser Stelle von einer unzulänglichen mikrobiellen Beladung der Proben ausgegangen werden. Zwar sollte bei Probennahme darauf geachtet werden, eine ausreichende

Materialmenge in die eSwap-Transportröhrchen zu überführen, jedoch ist die zu entnehmende Guttapercha-Menge limitiert und daher bei einem DNA-Gehalt unter der Detektionsgrenze auch mit negativen Ergebnissen zu rechnen.

Als *ex vivo* Untersuchung war ein Nachteil unserer Studie, dass nur der/die wurzelgefüllte/n Hauptkanal/kanäle untersucht werden konnte/n. Denn ein nicht unerheblicher Anteil der Mikroorganismen ist im Isthmus, in lateralen Kanälen und in Ramifikationen lokalisiert und daher mit herkömmlichen Verfahren nicht zu erfassen [119-121]. Diese technische Limitation umgingen Studien, indem sie extrahierte Zähne verwendeten und Kanalsegmente pulverisierten [83, 122-126]. Zudem ist *ex vivo* keine strenge Differenzierung zwischen Wurzelkanalsegmenten möglich, die sich aber laut *in vitro* Studien hinsichtlich ihrer mikrobiellen Besiedlung unterscheiden [126, 127]. Dies wird insbesondere für die Analyse der Interaktion zwischen Bakterien und Pilzen interessant, die sich gegenseitig beeinflussen [123, 128]. Es wird angenommen, dass sich insbesondere im koronalen Wurzelkanalabschnitt Pilze isolieren lassen, aufgrund der höheren Prävalenz an sacharolytischen und azidogenen Bakterien bei kariösen Läsionen [123]. Zwar war diese Thematik keine zentrale Fragestellung unserer Untersuchung, sollte aber in zukünftigen Studien näher erörtert werden.

4.1.2 Mikrobielle Analyse – Ist die Pan-PCR der neue Goldstandard?

Fokus der Studie lag auf der Detektion von Bakterien und Pilzen im Wurzelfüllmaterial von Zähnen mit postendodontischer apikaler Parodontitis mithilfe eines molekulargenetischen Ansatzes im Vergleich zur Kultur.

Die Kultur galt bislang als Goldstandard zum polymikrobiellen Nachweis und stellte lange Zeit die einzige Methode zur Identifizierung von Mikroorganismen dar [43]. Ein Vorteil des kulturellen Nachweisverfahrens ist, dass die Umgebungsfaktoren (Nährmedium, Temperatur, Sauerstoffgehalt und pH-Wert) so gewählt werden können, dass das Wachstum bestimmter Mikroorganismen begünstigt wird.

Laut Literaturlage zählen folgende Stämme zu den Hauptvertretern infizierter Wurzelkanäle: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Synergistetes*, *Spirochaetes*, *Fusobacteria* und *Proteobacteria* [57, 88, 92, 112, 129, 130]. *Candida* gilt als Hauptvertreter der Pilze [38, 57, 70, 131, 132]. Für einen differenzierten kulturellen Ansatz wurden in der hiesigen Studie Schaedler-, Kochblut- und Sabouraud-Festnährmedien mit den im Amies-Medium

resuspendierten Proben beimpft, die in der zahnmedizinischen Forschung gängige Nährmedien darstellen [49, 114, 116, 132, 133]. Zur Speziesidentifizierung wurde anschließend eine MALDI-TOF Massenspektrometrie durchgeführt.

Ein weiterer Vorteil der Kultur ist der Nachweis von ausschließlich lebenden Bakterien und Pilzen, da die DNA alleine, anders als für die PCR, für einen kulturellen Nachweis nicht ausreichend ist. Tote Zellen werden kulturell also nicht detektiert und es wird verhindert, dass einzelne Spezies überproportional häufig erfasst werden, deren DNA beispielsweise den Wurzelkanal erreichen, aber dort nicht zwangsläufig lebensfähig sind oder bleiben [134, 135]. Die Kultur ermöglichte den gleichzeitigen Nachweis mehrerer Spezies, sodass sich die subgingivale Plaqueprobe als polymikrobielles Gemisch kulturell sehr gut analysieren ließ. Durch Beimpfen unterschiedlicher Nährmedien konnte die Ausbeute unterschiedlicher Mikroorganismen nochmals erhöht werden. So lieferten 42/42 Plaqueproben einen kulturellen Nachweis, jedoch konnte in nur 1/42 Fällen ein Pilzwachstum auf dem Sabouraud-Agar gezeigt werden. Demnach muss der Studie zufolge die durchgeführte Kultur zur Pilzdiagnostik in Frage gestellt werden.

Für die Proben aus dem Wurzelfüllmaterial zeigte die Kultur als Diagnostikverfahren Sensitivitätslücken, da in nur 28/42 Proben ein Bakteriennachweis erfolgen konnte. Pilze wurden in keiner Probe nachgewiesen. Demnach erwies sich die Kultur zur Diagnostik von Proben mit geringer Keimlast, wie es in Probe 3 (WF) größtenteils der Fall war, als nachteilig.

Größter Nachteil, der mit dem Kulturverfahren einhergeht, ist, dass viele Bakterien und Pilze nicht oder nur schwer kultivierbar sind. Auch langsam wachsende Keime werden von schnell wachsenden Spezies verdrängt und oftmals nicht detektiert. Die Tatsache, dass nach heutigem Forschungsstand nur etwa die Hälfte der oralen Mikroorganismen kultivierbar ist, legt eine deutliche Schwäche der Kultur offen [1, 12, 80]. Die Arbeitsgruppe Sakamoto et al. zeigte in ihren Studien 2006 und 2008, dass sowohl bei primären als auch bei sekundären apikalen Parodontitiden der Anteil unkultivierbarer Mikroorganismen bei 55% lag [136, 137]. In unserer Studie konnten im Wurzelfüllmaterial in 8/42 Fällen (19%) schwer kultivierbare Bakterien nur mittels PCR nachgewiesen werden. Die Tatsache also, dass sie in insgesamt 19% aller WF-Proben als Leitkeime identifiziert wurden, bestätigt einerseits ihre bedeutende Rolle bei apikalen Parodontitiden und zeigt andererseits, dass die PCR eine geeignete Methodik zur Analyse von reinfiziertem Wurzelfüllmaterial darstellt.

Zudem sterben Anaerobier häufig während der Probennahme ab, sodass diese ebenfalls kulturell nicht erfasst werden. Fakultativ und obligat anaerobe Bakterien sind jedoch insbesondere im apikalen Kanalabschnitt wurzelgefüllter Zähne zu finden, sodass ein Großteil der Mikroorganismen mittels Kultur nicht nachzuweisen ist [48, 49]. Auch in vorliegender Studie wurden im Vergleich zur Kultur mittels PCR öfters anaerobe Keime im Wurzelfüllmaterial nachgewiesen. Der Zeit- und Kostenfaktor für die Kultivierung darf ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden, wobei letzterer Faktor verglichen mit der molekulargenetischen Analyse geringer ist.

Seit Einführung der Real-Time PCR ist in einem kombinierten Amplifikations-Detektions-Ansatz auch die Quantifizierung der DNA möglich, was ein erhebliches Zeitersparnis mit sich bringt [76]. Im Gegensatz zur konventionellen PCR mit anschließender Gelelektrophorese erhält man für die speziesspezifische qPCR innerhalb weniger Stunden das Ergebnis, da der zeitaufwendige Schritt der Gel-Analyse entfallen kann. In unserer Studie ermöglichte die sondenbasierte TaqMan-PCR zum Nachweis des humanen GAPDH-Gens anhand klonierter Standards die Quantifizierung der Mikroorganismen in den Patientenproben.

Größter Vorteil der PCR gegenüber der Kultur ist die Detektion von obligat anaeroben Bakterien und schwer bzw. nicht kultivierbaren Keimen. Die gesteigerte Sensitivität des Verfahrens liefert in der Regel auch bei geringer Keimlast der Probe einen Nachweis, sodass sich die PCR unter anderem als Standardverfahren in der medizinischen Diagnostik etabliert hat [50, 72].

Für das Wissen über das mikrobielle Spektrum im Wurzelkanalsystem bedeutete die PCR einen enormen Zugewinn. Die Tatsache, dass anaerobe Bakterien in infizierten Wurzelkanälen dominieren, legt die PCR als Diagnostikverfahren nahe [40, 138]. Bislang nicht oder nur schwer kultivierbare Bakterien konnten mithilfe der PCR identifiziert werden [12, 57, 139]. Insgesamt umfasst das infizierte Endodont über 460 Bakterienklassen von 100 Gattungen und 9 Stämmen. Die Mehrheit der Spezies wurde dabei mittels molekulargenetischer Analyse und nicht mittels Kulturverfahren identifiziert [140]. Spirochäten und Synergistetes, die unter anderem an therapieresistenten apikalen Parodontitiden beteiligt sind, sind Beispiele für schwer kultivierbare Bakterien [80]. Die hohe Anzahl der bislang im reinfizierten Endodont nachgewiesenen Pathogene spricht für die Durchführung der Pan-PCR anstelle speziesspezifischer PCRs, um vorerst ein möglichst großes Keimpektrum erfassen zu können.

Auch zur Detektion unkultivierbarer Pilze hat sich die PCR bewährt. In einer Studie stellten Ghannoum et al. fest, dass das orale Mykobiom gesunder Patienten zu 36,1% nicht kultivierbar ist. Mithilfe einer ITS-spezifischen Pan-Pilz PCR identifizierte die Arbeitsgruppe in 20 Probanden 74 kultivierbare und 11 nicht kultivierbare Pilzgattungen [141].

Aufgrund der geringeren Konzentration von Pilzen im Vergleich zu Bakterien in der Mundhöhle zeigte sich auch in der vorliegenden Studie die PCR zur Pilzdiagnostik der Kultur überlegen. Während in 3/42 Plaqueproben mittels PCR und in 1/42 Plaqueproben mittels Kultur Pilze nachgewiesen wurden, konnten aus keiner Probe des Wurzelfüllmaterials Pilze kultiviert werden. Die PCR hingegen wies in 5/42 Proben Pilze im Wurzelfüllmaterial nach. Im Gegensatz zur anfangs durchgeführten Pan-Pilz PCR konnte die Sensitivität der Pan-PCR durch gattungsspezifische Primer soweit gesteigert werden, dass auch in Proben mit geringer Keimlast Pilze detektiert werden konnten. Anhand unserer positiven Ergebnisse der Candida-PCR konnte der Vorteil Pilzzweig-spezifischer Primersets bestätigt werden.

Im Gegensatz zur favorisierten Pan-PCR zur bakteriellen Analyse, wäre es folglich ratsam, anstelle der Pan-Pilz PCR familien- oder gattungsspezifische PCRs durchzuführen, da diese sensitiver sind, um auch für Proben mit geringer Keimlast positive Nachweise zu liefern.

Neben der geringeren Konzentration der Pilze erschwert ihr Zellaufschluss zur Präparation genomischer DNA die spätere Diagnostik. Möglicherweise konnte dadurch in unserer Studie die DNA einiger Mikroorganismen nicht extrahiert werden. Insbesondere die robuste Zellwandstruktur vieler Pilze behindert eine erfolgreiche DNA-Extraktion. Der mechanische Zellaufschluss mit Glas- oder Keramikkugeln, das sogenannte *Bead Beating*, stand daher im Fokus vieler Studien, die verschiedene DNA-Präparationsmethoden miteinander verglichen [142-144]. Die Methode des *Bead Beating[s]* wird jedoch kontrovers diskutiert, da es zwar den Zellaufschluss verbessert, aber einigen Studien zufolge gleichzeitig die DNA-Präparation anfällig für Kontaminationen macht und die Qualität der extrahierten DNA verschlechtert [142, 145]. Aus diesem Grund erfolgte der Zellaufschluss in unserer Studie mittels des DNeasy Blood & Tissue Kits enzymatisch.

Eine erfolgreiche Extraktion der Pilz-DNA bedeutet aber nicht automatisch auch eine erfolgreiche Identifikation des Pathogens, da die Entwicklung universeller Pilz-Primer durch die Längenvariation der ITS-Regionen und der sie flankierenden gering konservierten Bereiche erschwert wird. Im Vergleich zur 16S rDNA weist die ITS-Region der Pilze eine

höhere Variabilität auf [146, 147]. Dadurch wird eine Detektion und Amplifikation von Pilz-DNA während der PCR erschwert.

Im Gegensatz zur Kultur ist in der PCR die nackte DNA eines Pathogens für den Nachweis ausreichend. Die molekulargenetische Analyse lässt sich daher als sensitivere Diagnostik bewerten, birgt jedoch, wie bereits beschrieben, die Gefahr der Überbewertung von Mikroorganismen [111, 148]. Aus diesem Grund kann das Kulturverfahren zum Nachweis von lebenden Mikroorganismen als ergänzende Diagnostik sowie zur Resistenzbestimmung bei Therapiebedarf hinzugezogen werden [64]. Die höhere Sensitivität der PCR ist aber dann von Nutzen, wenn Proben mit geringer Keimlast analysiert werden sollen. In unserer Studie zeigte sich dieser Vorteil insofern, als im Wurzelfüllmaterial 30/42 Proben mittels PCR und nur 28/42 Proben mittels Kultur einen Keimnachweis lieferten.

Allerdings macht ihre hohe Sensitivität die PCR anfällig für Kontaminationen. Wie sich in unserer Studie zeigte, ließen sich bei geringer Keimlast kontaminierende DNA-Spuren im Wasser detektieren. Demzufolge ist die molekulargenetische Analyse mit größter Sorgfalt durchzuführen und ihre Ergebnisse kritisch zu betrachten, sodass letztere nicht fehlinterpretiert werden.

Durch verschiedene Primersets kann die Spezifität der PCR bestimmt werden [72]. In unserer Studie bedeutete dies, die Entwicklung von Primerpaaren und damit eine gezielte Detektion von Bakterienspezies, die nicht zur Gattung *Methylobacterium* gehörten.

Während je nach Nährmedium kulturell mehrere Spezies gleichzeitig nachgewiesen werden konnten, konnte mittels Pan-PCR nur der dominanteste Keim identifiziert werden [76]. Folglich zeigte sich in allen 42 Plaqueproben eine positive Bakterienkultur mit jeweils unterschiedlichen Bakterienspezies, während mittels PCR in nur 37/42 Plaqueproben ein dominanter Keim nachgewiesen werden konnte. In 5/42 Proben war die Keimlast der Plaque zu divers, sodass nur Mischsequenzen erfasst wurden, die sich in der Sanger-Sequenzierung nicht auflösen ließen.

Obwohl der Fokus unserer Studie auf der Detektion von Bakterien und Pilzen lag, kann an dieser Stelle der Vorteil der PCR durch den Einsatz von speziesspezifischen Primern und Sonden auch für den gezielten Nachweis von Viren betont werden. In einigen Studien, die das Vorkommen von Viren, insbesondere von *Herpes spp.*, im periapikalen Gewebe von Zähnen mit apikaler Parodontitis untersuchten, wurden speziesspezifische PCRs

durchgeführt [73, 74, 149-151]. Zwar besteht ebenfalls die Möglichkeit eines kulturellen Nachweises, jedoch konnte in medizinischen Studien gezeigt werden, dass die PCR der Kultur zum Nachweis viraler DNA überlegen war [152, 153]. Eine zahnmedizinische Studie, die sich dieser Frage widmete, wurde bislang noch nicht durchgeführt.

Zusammenfassend muss die Frage, ob die PCR als neuer Goldstandard zur mikrobiellen Diagnostik bezeichnet werden kann, differenziert beantwortet werden.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Kultur immer noch ein geeignetes Verfahren zur Analyse von polymikrobiellen Gemischen (Plaqueprobe) darstellt, in denen es nicht zwangsläufig einen dominanten Keim gibt, der in der PCR eindeutig identifiziert und amplifiziert werden kann.

Aufgrund der höheren Sensitivität ist der PCR bei monomikrobiellen Infektionen bzw. bei Infektionen mit einem schwer anzüchtbaren, dominanten Keim (WF-Probe) eindeutig den Vorzug zu geben. Aufgrund der bakteriellen Vielfalt im Wurzelkanal (460 Bakterienklassen von 100 Gattungen und 9 Stämmen [140]) ist für eine bakterielle Analyse in der Regel die Pan-PCR anstelle der speziesspezifischen PCR zu befürworten. Für die Detektion von Pilzen im Wurzelkanal hat sich jedoch die gattungsspezifische PCR bewährt.

Zwar ist der Kostenfaktor der qPCR im Vergleich zur Kultur höher, jedoch bedeutet die deutliche Zeitersparnis, die mittels PCR gewonnen werden kann, im Umkehrschluss langfristig gesehen eine Kostenreduktion. Die Kultur kann jedoch weiterhin als ergänzende Diagnostik (z.B. zum Nachweis lebender Mikroorganismen) hinzugezogen werden.

4.2 Mikrobiologische Ergebnisse

4.2.1 Keimlast der Proben

Die erste mikrobiologische Fragestellung unserer Studie beschäftigte sich mit der Keimlast der drei Proben. Sowohl der DNA-Gehalt/Probe, die Anzahl humaner Zellen/Probe (GAPDH-GE) als auch die Semiquantifizierung der Kultur-Ergebnisse bestätigten unsere Hypothese der größten Last in der subgingivalen Plaqueprobe und der geringsten in der Desinfektionskontrolle. Dass sich die Werte des Wurzelfüllmaterials dazwischen bewegten, lässt sich insofern erklären, als kulturell durchschnittlich 1,6 Bakterienspezies im Wurzelfüllmaterial isoliert wurden. Dieses Ergebnis korreliert mit gängiger Literatur, die im

apikalen Kanalabschnitt bei Vorliegen einer therapieresistenten, apikalen Parodontitis im Durchschnitt ein bis drei Spezies beschreibt [40, 48, 50].

4.2.2 *Enterococcus faecalis* und *Streptococcus spp.* als bakterielle Hauptakteure

Aufgrund der geforderten Taschensondierungstiefe $\leq 5\text{mm}$ wurden Patienten mit schwerwiegender Parodontitis von unserer Studie ausgeschlossen. Mittels Kultur und PCR konnte gezeigt werden, dass Gram-positive Anaerobier in der subgingivalen Plaque dominierten. Auch die Literatur beschreibt sie als Hauptgruppe im gesunden Parodont und benennt als häufigste aerobe und anaerobe Vertreter *Actinomyces*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Rothia*, *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* und *Clostridium* [45, 154, 155]. Bis auf letztere Gattung, konnten alle Bakterien kulturell auch in unserer Studie nachgewiesen werden. Davon wurden *Streptococcus*, *Neisseria*, *Fusobacterium* und *Veillonella* auch mittels PCR als Leitkeime in Plaqueproben identifiziert. Während Gram-positive Bakterien im gesunden Parodont dominieren, nimmt mit zunehmender parodontaler Sondierungstiefe der Anteil an Gram-negativen Bakterien zu [45]. Das reduzierte Sauerstoffangebot im Sulkus gingivalis erklärt die Mehrheit an Anaerobiern in der subgingivalen Plaque. Im Gegensatz zur PCR wiesen wir in Kultur größtenteils auch aerobe/aerotolerante Bakterien nach, da davon auszugehen ist, dass viele Anaerobier während der Probennahme abgestorben waren.

Während in unseren Untersuchungen kulturell keine Pilze im Wurzelfüllmaterial nachgewiesen werden konnten, ließen sich *Propionibacterium spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces spp.* und *Streptococcus spp.* als bakterielle Hauptbesiedler des Wurzelfüllmaterials mittels Kultur identifizieren. *Lactobacillales* und *Actinomycetales* waren die zwei dominantesten Gattungen.

Anderson et al. untersuchten die mikrobielle Besiedlung von 21 wurzelgefüllten Zähnen bei Reinfektion mittels Kultur und PCR. Im Kulturverfahren fanden sie ähnlich unseren Ergebnissen *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus spp.* und *Propionibacterium acnes* als dominante Keime vor. Auch sie konnten mittels Kultur in keiner Probe Pilze nachweisen, was die schwierige kulturelle Anzucht von Pilzen aus Wurzelfüllmaterialien bestätigte [57].

Actinomyces spp. sind ebenfalls ähnlich unseren Ergebnissen vermehrt in reinfizierten, wurzelgefüllten Zähnen kulturell nachgewiesen worden [48, 49, 64].

Insgesamt waren die mittels PCR und Kultur detektierten Bakterien im Wurzelfüllmaterial größtenteils Anaerobier bzw. fakultative Anaerobier. In der Literatur werden vor allem Gram-positive Anaerobier mit sekundärer apikaler Parodontitis assoziiert, was sich durch unsere Kultur-Ergebnisse bestätigen ließ [40, 41]. Zwar überwogen unseren PCR-Ergebnissen zufolge Gram-negative Anaerobier im Wurzelkanal, allerdings mit nur einer Probe.

Im Vergleich zur Plaqueprobe wiesen wir im Wurzelfüllmaterial mittels PCR vermehrt *Veillonella* nach. Karygianni et al. konnten in ihren Untersuchungen *Veillonella parvula* nur auf entferntem Wurzelfüllmaterial und nicht nach Probennahme mittels Papierspitze nachweisen [42]. Möglicherweise besitzt *Veillonella* eine hohe Affinität zum Wurzelfüllmaterial, was ihre und unsere Studienergebnisse erklären würde. In vorliegender Arbeit wurde in 3/42 Wurzelfüllmaterial-Proben *Veillonella* als Leitkeim mittels PCR identifiziert, alle drei Probanden waren Raucher. Bei einem weiteren Raucher konnte *Veillonella* mittels Kultur nachgewiesen werden. Bei den 36 Nichtrauchern wurde *Veillonella* in nur einer WF-Probe kulturell identifiziert. Das Bakterium zählt zu den Parodontitis-Keimen und Rauchen stellt einen Risikofaktor für Parodontitis dar [45, 156]. Die Frage, inwieweit Rauchen ebenfalls die Pathogenese einer apikalen Parodontitis begünstigt, konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden [157-160].

In 4/6 Fällen konnte *Veillonella* auch in der Plaqueprobe der Raucher nachgewiesen werden. Dass dieser Keim ebenso bei Nichtrauchern in der subgingivalen Plaque zu finden ist, zeigt die Tatsache, dass in 25/36 Proben der Nichtraucher *Veillonella* kulturell und davon in zwei Proben auch mittels PCR detektiert wurde. Doch nur bei Rauchern konnte *Veillonella* auch als Hauptpathogen mittels PCR im Wurzelfüllmaterial nachgewiesen werden. Ob Rauchen das Wachstum von *Veillonella* im Wurzelkanal begünstigt, kann aufgrund der geringen Anzahl an Rauchern in unserer Studie nicht eindeutig geklärt werden. Literatur, die sich explizit mit dieser Frage beschäftigt, fehlt bislang.

Unseren PCR-Ergebnissen zufolge sind jedoch nicht *Veillonella spp.*, sondern *Candida albicans*, *Streptococcus spp.* und *Enterococcus spp.* die dominantesten Pilze bzw. Bakterien im Wurzelfüllmaterial, was sich durch Literatur bestätigen lässt [48, 49, 79, 111, 118].

Auch die in Kultur häufig nachgewiesenen Propionibakterien wurden mittels PCR im Wurzelfüllmaterial nicht als dominante Pathogene nachgewiesen. Folglich scheint dieses Bakterium zwar vermehrt im Wurzelkanal aufzutreten, gehört aber nicht zu einer der dominanten Gattungen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Molander et al., die 100 wurzelgefüllte Zähne mit apikaler Parodontitis untersuchten. 69% der durchschnittlich pro Kanal gefundenen ein bis zwei Spezies waren fakultative Anaerobier, überwiegend der Gattung *Enterococcus*. Es erfolgte eine Einteilung des bakteriellen Wachstums in vier Klassen: sehr gering, gering, stark und sehr stark. Enterokokken zeigten zu 78% starkes bis sehr starkes Wachstum [48]. Diese Studie belegte die Dominanz und Aggressivität von Enterokokken bei sekundärer apikaler Parodontitis. Dabei wird *E. faecalis* häufig als einzige Spezies im Wurzelkanal detektiert [49, 56, 64].

Unsere Studie konnte ebenfalls die Vorreiterrolle dieser Gattung bestätigen. Mittels Kultur und PCR wurde *E. faecalis* in 9/42 Wurzelfüllungen detektiert, in Kultur größtenteils solitär oder neben maximal einer weiteren Spezies. Die Tatsache, dass in nur 1/9 Fällen *E. faecalis* auch in der Plaqueprobe gefunden wurde, zeigt, dass dieser Keim vorrangig im Wurzelkanal zu finden ist. Es ist daher anzunehmen, dass neben weiteren Pathogenen unter anderem *E. faecalis* für das Versagen einer endodontischen Behandlung mit Zeichen einer apikalen Läsion verantwortlich ist. Unsere Studienergebnisse widerlegen somit die Hypothese von Kaufman et al. und Zoletti et al., dass *E. faecalis* kein Hauptauslöser einer apikalen Läsion bei Reinfektion ist [58, 59]. Der seltene Nachweis von Enterokokken in primären endodontischen Infektionen und ihre bekannten Virulenzfaktoren (z.B. Penetration der Dentintubuli, Resistenz gegen $\text{Ca}(\text{OH})_2$) sind mögliche Gründe für eine Reinfektion wurzelgefüllter Zähne [46, 53-55]. Die Mehrheit der bisherigen Untersuchungen beschrieben das Vorkommen von *E. faecalis* zwischen 10% und 77% [40, 47-50, 52, 57]. Dass *E. faecalis* nicht nur ein Besiedler des Wurzelkanals, sondern auch ein krankheitsverursachender Keim ist, bewiesen Sundqvist et al. mit ihrer Studie, indem sie zeigten, dass die Erfolgsrate der Revisionsbehandlung von Zähnen mit positivem Nachweis für *E. faecalis* schlechter ausfiel [49].

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass immer eine Variation der Ergebnisse in Abhängigkeit der durchgeführten Untersuchungsmethoden besteht. Diese Limitation von *ex vivo* Studien sollte im Hinterkopf behalten werden. So wurde *E. faecalis* in unserer Studie kulturell im Wurzelfüllmaterial öfters detektiert (9/42 Proben) als mittels PCR (4/42

Proben). Aufgrund seiner leichten Kultivierbarkeit wird *E. faecalis* in seiner Rolle oftmals überschätzt, sodass in vorliegender Studie der Keimnachweis mittels Kultur und PCR durchgeführt wurde. Unsere PCR-Ergebnisse konnten jedoch zeigen, dass *E. faecalis* tatsächlich einen dominanten Keim im reinfizierten Wurzelkanal darstellt, wenn auch mit geringerer Dominanz als mittels Kultur zunächst angenommen. Dennoch muss betont werden, dass *E. faecalis* nicht alleiniger Leitkeim ist, sondern darüber hinaus auch *Streptococcus spp.*, *Candida albicans* und schwer kultivierbare Bakterien dominante Keime im Wurzelkanal darstellen.

Neben *E. faecalis* konnte in unserer Studie vermehrt *Streptococcus spp.* in der Guttapercha mittels Kultur (10/42 Proben) und PCR (4/42 Proben) nachgewiesen werden.

Rocas et al. beschrieben in ihrer molekulargenetischen Untersuchung von 17 Zähnen mit postendodontischer apikaler Parodontitis *Streptococcus* ebenfalls als dominantes Pathogen im Wurzelfüllmaterial mit einer Prävalenz von 47% [111]. Nicht nur mittels PCR, sondern auch im Kulturverfahren wurden unter anderem Streptokokken als dominanteste Gattung in reinfizierten Wurzelkanälen beschrieben [57, 81, 161]. Unsere kulturelle Analyse der Guttapercha detektierte *Streptococcus* ebenfalls als dominanteste Gattung (10/42 Proben). Mittels PCR wurden *Streptococcus spp.* und *E. faecalis* in jeweils 4/42 Proben nachgewiesen und stellten folglich die Bakterien mit den höchsten Prävalenzen dar.

Dass Streptokokken typische Vertreter der Mundflora darstellen [12, 80, 162], ließ sich durch unsere Studie insofern bestätigen, als in der subgingivalen Plaque *Streptococcus spp.* kulturell in 41/42 Proben und mittels Pan-PCR in 22/42 Proben nachgewiesen wurden. In 11/42 Fällen wurden mittels Kultur und PCR *Streptococcus spp.* sowohl in der subgingivalen Plaque als auch im Wurzelfüllmaterial eines Probanden nachgewiesen, gefolgt von *Actinomyces spp.* (6/42 Zähnen). Darüber hinaus konnten keine weiteren signifikanten Zusammenhänge zwischen Keimen im Wurzelkanal und der oralen Mikroflora hergestellt werden, sodass von unterschiedlichen Keimspektren ausgegangen werden kann.

4.2.3 Bedeutung von schwer kultivierbaren Mikroorganismen im reinfizierten Wurzelkanal

Während *E. faecalis* und *Streptococcus spp.* Paradebeispiele für leicht kultivierbare Bakterien darstellen, sind seit Einführung der molekulargenetischen Analyse nicht oder nur

schwer kultivierbare Mikroorganismen zunehmend ins Interesse der zahnmedizinischen Forschung getreten, als gezeigt wurde, dass ca. die Hälfte der oralen Mikroorganismen nicht kultivierbar ist [12, 57, 87, 163].

In unserer Studie konnten wir in 8/42 Guttapercha-Proben nicht oder nur schwer kultivierbare Bakterien (*Pyramidobacter* (2x), *Synergistes*, *Acinetobacter*, *Atopobium*, *Ruminococcus*, *Pseudoramibacter* und *Bacteroidetes* (je 1x)) mittels PCR und nicht in Kultur nachweisen. Zwar war die Prävalenz der jeweiligen Spezies mit $\leq 2/42$ Proben gering, fasste man die schwer kultivierbaren Bakterien aber als Gruppe zusammen, machten diese insgesamt betrachtet einen größeren Anteil (8/42 Proben) im reinfizierten Wurzelfüllmaterial aus als *Candida* (5/42 Proben), *E. faecalis* und *Streptococcus spp.* (jeweils 4/42 Proben).

Die in unserer Studie detektierten schwer kultivierbaren Bakterien wurden auch bereits in der Literatur beschrieben. In ihrer Studie führten Siqueira und Rocas speziesspezifische PCRs zum Nachweis von unkultivierbaren Mikroorganismen in primären und sekundären endodontischen Infektionen durch [87]. Ähnlich unseren Ergebnissen detektierten sie *Atopobium*, jedoch nur im Endodont eines primär infizierten Zahns. In den Wurzelfüllungen von 3/22 reinfizierten Zähnen wiesen sie die schwer kultivierbare Gattung *Dialister* und in je 1/22 Proben *Olsenella* und *Synergistes* nach [87]. Nur letzteres Bakterium wurde auch in unserer Studie detektiert.

Sakamoto et al. beschrieben in ihrer Studie die Prävalenz von unkultivierbaren Bakterien im Wurzelkanal reinfizierter Zähne mit insgesamt 55% (in 9 untersuchten Zähnen fanden sie 74 Bakterienklassen) [137]. In 2/9 Wurzelfüllungen wiesen sie *Synergistes* und in jeweils 1/9 Proben *Pseudoramibacter*, *Atopobium* und *Bacteroidetes* nach.

Antunes et al. untersuchten 21 wurzelgefüllte Zähne und wiesen *Pseudoramibacter* sogar als dritthäufigste Bakteriengattung nach (4/21 Proben) [83].

Der in unserer Studie in 2/42 Wurzelfüllungen detektierte *Pyramidobacter* wurde ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben. Siqueira et al. wiesen ihn als Leitkeim in 1/10 Wurzelfüllungen von Zähnen mit apikaler Parodontitis nach [124].

Sowohl die Literatur als auch unsere Studienergebnisse bestätigen, dass die Gruppe der schwer kultivierbaren Bakterien eine bedeutende Rolle bei Reinfektion endodontisch behandelter Zähne spielt.

Während in Studien die ebenfalls nur schwer kultivierbare Gattung *Treponema* (v.a. *T. denticola*) in sekundär infizierten Wurzelkanälen mittels speziesspezifischen PCRs mit Prävalenzen zwischen 24% und 56% nachgewiesen werden konnte [89, 93, 95, 111], wurde

in unserer Studie in keiner Probe des Wurzelfüllmaterials *Treponema* als dominanter Keim detektiert. Zwar bestätigten jene Studien ihr Vorkommen im reinfizierten Wurzelkanal, legen jedoch die Vermutung nahe, dass zu ihrer Detektion speziesspezifische PCRs nötig sind.

4.2.4 *Candida albicans* als dominante Pilzspezies

Molekulargenetische Verfahren eignen sich nicht nur zum Nachweis von schwer kultivierbaren Bakterien, sondern erweisen sich auch zur Pilzdiagnostik als vorteilhaft. Während in unserer Studie mittels PCR in drei Plaqueproben *Candida albicans* als dominantes Pathogen identifiziert wurde, konnte kulturell nur in einer Probe *C. albicans* nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe Ghannoum et al. beschäftigte sich mit der Charakterisierung des oralen Mykobioms in gesunden Patienten und detektierte neben *Candida* (75%) als dominanteste Gattung auch *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Saccharomycetales*, *Aspergillus*, *Fusarium* und *Cryptococcus* [141]. Während die Candidaspezies *C. tropicalis*, *C. krusei* und *C. glabrata* bei Immunkompetenten nur selten auftreten, wird *C. albicans* mit einer Prävalenz von ca. 20% zur physiologischen Mundflora gezählt [164].

Im Gegensatz dazu, ließen sich *Candida spp.* gehäuft bei apikaler Parodontitis isolieren, vorrangig bei therapieresistenten Infektionen [48, 49, 68]. Die *Candida*-spezifische PCR unserer Studie lieferte in 5/42 Wurzelfüllungen einen positiven Nachweis; neben ***Candida albicans*** wurde in einer Probe *Candida utilis* detektiert. Die dominante Rolle von Candidaspezies im Wurzelkanal bei Reinfektion konnte durch unsere Ergebnisse durchaus bestätigt werden.

Waltimo et al. untersuchten die Pilzbesiedlung in 967 Proben aus Wurzelkanälen von Zähnen mit postendodontischer apikaler Parodontitis. *C. albicans* trat dabei ebenfalls als häufigster Pilz auf. Sie fanden heraus, dass in Mehrheit der Fälle *Candida* zusammen mit Gram-positiven Bakterien, vor allem Streptokokken, auftrat [70]. Unsere Studie ließ diesbezüglich aufgrund der geringen Anzahl an *Candida*-positiven Proben (5/42) keine fundierte Analyse zu; neben *Candida* traten sowohl Gram-negative Bakterien (*Veillonella parvula*, *Pyramidobacter piscolens*, *Fusobacterium nucleatum*) als auch ein Gram-positives

Bakterium (*Streptococcus mutans*) auf. Um die Koinfektion von *Candida* und Gram-positiven Bakterien zu bestätigen, muss in zukünftigen Studien ein größeres Patientenkollektiv untersucht werden. Inwieweit die Koinfektion von Bakterien und Pilzen die Erfolgswahrscheinlichkeit einer Revisionsbehandlung reduziert, bleibt ebenfalls zu klären.

Persoon et al. beschäftigten sich in ihrer Studie explizit mit der Abhängigkeit zwischen Bakterien und Pilzen. In ca. 50% der untersuchten Zähne detektierten sie *Candida* und *Malassezia*. Die sie begleitende bakterielle Flora war im Gegensatz zu Pilz-negativen Zähnen weniger divers und setzte sich aus überwiegend azidogenen Bakterien, vor allem Laktobazillen, zusammen [123]. Vermutungen zufolge, begünstigt die erhöhte Dentindegredation durch ein azidogenes Bakterienspektrum eine vermehrte Pilzbesiedlung [123, 165]. In unserer Studie konnten wir in 1/5 *Candida*-positiven Proben *Streptococcus mutans* als äußerst azidogenen Keim nachweisen. Zwar untersuchten Persoon et al. Zähne mit primärer Infektion, jedoch ging es in der Studie vorrangig um den Wurzelkanal als Lebensraum und die Frage nach der Korrelation zwischen Bakterien und Pilzen, sodass eine analoge mikrobielle Abhängigkeit auch bei sekundärer Infektion anzunehmen ist. Diese Hypothese sollte jedoch in zukünftigen Studien verifiziert werden.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass auch im Speichel *Candida* gehäuft mit azidogenen Bakterien auftrat [166, 167]. Im Gegensatz dazu stehen Studienergebnisse, die eine antagonistische Beziehung zwischen azidogenem *Lactobacillus* und *Candida* zeigten [168]. Es wird deutlich, dass nach aktuellem Forschungsstand die Frage nach der Korrelation von Bakterien und Pilzen nicht eindeutig beantwortet werden kann.

In zwei Fällen unserer Studie wurde *C. albicans* sowohl in der Plaqueprobe als auch im Wurzelfüllmaterial gefunden. Die primäre Wurzelfüllung beider Zähne wurde koronal mit Komposit verschlossen, sodass die Möglichkeit eines koronalen Mikroleakage berücksichtigt werden sollte. Eine endodontische Reinfektion wird nämlich unter anderem mit der Insuffizienz des koronalen Verschlusses begründet [169]. Khayat et al. konnten an wurzelgefüllten Zähnen mit koronalem Leakage zeigen, dass nach Speichlexposition der komplette Wurzelkanal in weniger als 30 Tagen reinfiziert war [170]. Demzufolge ist neben einer suffizienten Wurzelfüllung ein dichter koronaler Verschluss von ebenso großer Bedeutung.

4.2.5 Ausblick

Im Falle einer Reinfektion des wurzelgefüllten Zahns ist die ausreichende chemische Desinfektion während der Revisionsbehandlung eine wichtige Voraussetzung für den Therapieerfolg.

Unsere Studienergebnisse haben gezeigt, dass sich neben der Gruppe der schwer kultivierbaren Bakterien die Pathogene *C. albicans*, *E. faecalis* und *Streptococcus spp.* in reinfizierten Wurzelkanälen nachweisen ließen.

Umso wichtiger ist es also, während der Revisionsbehandlung eine ausreichend chemische Desinfektion zur Elimination dieser Hauptakteure vorzunehmen. Einige Studien beispielsweise befürworten neben der gängigen Spülung mit Natriumhypochlorit (NaOCl) eine mindestens 30 Sekunden lange Zwischen- oder Abschlusspülung mit 2%-igem CHX, da dadurch eine Elimination von *E. faecalis* und *Streptococcus* sowie durch eine ausreichend lange Kontaktzeit auch von *C. albicans* erreicht werden kann [25, 31]. Auch EDTA als Chelatbildner sowie 5,25%-iges NaOCl können zur Desinfektion von *C. albicans* angewendet werden [171]. Die Aktivierung der Spülung mittels Schall oder Ultraschall ist für jede endodontische Behandlung zu befürworten, um die Desinfektionswirkung der Chemikalien zu erhöhen [32]. Auch die medikamentöse Einlage zur Desinfektion spielt für den Behandlungserfolg eine Rolle. Neben antimikrobiellen Substanzen mit alkalischem pH-Wert (z.B. Kalziumhydroxid) werden unter anderem Medikamente mit CHX zur effektiven Bekämpfung von *E. faecalis* empfohlen [34].

Es gibt jedoch Anlass, die Rolle von CHX als Spüllösung bzw. medikamentöse Einlage zu überdenken. Zwar besitzt CHX auch gute antimykotische Eigenschaften und weist bei geringer Toxizität eine hohe Substantivität auf, aber im Gegensatz zu NaOCl und $\text{Ca}(\text{OH})_2$ kann Chlorhexidin kein nekrotisches oder vitales Gewebe auflösen [4]. Zudem ist *E. faecalis* nicht alleiniger Leitkeim im reinfizierten Wurzelkanal, da unsere Studienergebnisse gezeigt haben, dass insbesondere auch schwer kultivierbare Bakterien im Wurzelkanal bei sekundärer apikaler Parodontitis vorkommen. Aktuelle Studien konnten nachweisen, dass NaOCl durchaus auch den antimikrobiellen Wirkungsbereich von CHX abdeckt. So wiesen beispielsweise Oliveira et al. in ihrer Studie für 1-2,5%-iges Natriumhypochlorit eine positive antibakterielle Wirkung gegen *E. faecalis* nach [26]. Pinheiro et al. zeigten in ihrer 2018 veröffentlichten Untersuchung eine vergleichbare hohe Effektivität von 2%-igem CHX und 2,5%-igem NaOCl gegen *E. faecalis*, *C. albicans* und *Streptococcus mutans* [27]. Sogar

für 1%-iges NaOCl konnte bereits eine mit 2%-igem CHX vergleichbare hohe Wirksamkeit gegen *E. faecalis* in reinifizierten Wurzelkanälen nachgewiesen werden [172].

Obwohl CHX aufgrund seiner Substantivität und seiner Interaktion mit NaOCl bislang als Abschlusspülung empfohlen wird, stellt die dargestellte aktuelle Literatur die Notwendigkeit der zusätzlichen Spülung mit Chlorhexidin infrage, da sein tatsächlicher Mehrwert umstritten ist [173]. Sofern hierzu jedoch keine allgemeingültige Empfehlung ausgesprochen werden kann, bestehen gegen 2%-iges CHX als Abschlusspülung keine Einwände.

Auf Basis unserer Untersuchungsergebnisse kann daher in Revisionsfällen die Anwendung von NaOCl und CHX, in Kombination mit EDTA zur Entfernung der Schmierschicht, als Spülungen und Ca(OH)₂ als medikamentöse Einlage zur maximalen Reduktion von endodontischen Pathogenen und Toxinen sowie zur Entfernung des Pulpagewebes und der Schmierschicht befürwortet werden. NaOCl besitzt bislang als einzige Spüllösung eine gewebeauflösende Eigenschaft, sodass sie als Hauptspülflüssigkeit in keinem endodontischen Desinfektionsprotokoll fehlen darf. Nur so können wichtige Voraussetzungen für den langfristigen Erfolg einer Wurzelfüllung erfüllt werden.

4.3 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Detektion von Bakterien und Pilzen im Wurzelfüllmaterial von Zähnen mit postendodontischer apikaler Parodontitis mithilfe eines molekulargenetischen Ansatzes im Vergleich zur Kultur.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die Kultur ein geeignetes Verfahren zur Analyse der subgingivalen Plaque als polymikrobielles Gemisch darstellt, da es eine Detektion mehrerer Keime gleichzeitig ermöglicht. Spezies der Ordnungen *Lactobacillales* und *Actinomycetales* waren in der Plaque dominant.

Die Anzahl kultivierter Bakterienspezies war im Wurzelfüllmaterial signifikant geringer als in der Plaqueprobe. Daher ist an dieser Stelle der Einsatz der PCR zur Identifikation eines Leitkeims zu befürworten. Nur mittels PCR war es möglich im Wurzelfüllmaterial Pilze nachzuweisen, wobei *Candida albicans* die dominante Pilzspezies darstellte. Schwer kultivierbare Bakterien (*Synergistes*, *Acinetobacter*, *Atopobium*, *Pyramidobacter*,

Ruminococcus, *Pseudoramibacter* und *Bacteroidetes*) wurden in insgesamt 8/42 Proben nur mittels PCR detektiert und konnten kulturell nicht nachgewiesen werden.

Die anfangs aufgestellte Nullhypothese, dass der Keimnachweis mittels Kultur den Goldstandard darstellt, muss insofern widerlegt werden, als die Pan-PCR als Nachweisverfahren bei Vorhandensein eines schwer anzüchtbaren, dominanten Keims im Wurzelfüllmaterial überlegen ist. Zur Pilzdiagnostik zeigte sich die gattungsspezifische PCR von Vorteil, da nur mittels PCR in 5/42 Proben Pilze im Wurzelfüllmaterial detektiert werden konnten. Lediglich für polymikrobielle Gemische (z.B. subgingivale Plaque) bleibt die Kultur zum Nachweis mehrerer Keime eine geeignete Untersuchungsmethode.

Um die in der Literatur umstrittene Frage nach der Abhängigkeit der bakteriellen Zusammensetzung vom Mykobiom ausreichend erörtern zu können, sollten zukünftige Studien mit entsprechend hoher Probenzahl durchgeführt werden.

Abgesehen von der Gruppe der schwer kultivierbaren Bakterien, ging aus unserer Analyse hervor, dass *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* und *Streptococcus spp.* die Hauptbesiedler des Wurzelkanals von Zähnen mit sekundärer apikaler Parodontitis waren. Mittels PCR wurde gezeigt, dass im Vergleich zur subgingivalen Plaqueprobe insbesondere der Anteil an *E. faecalis* und *C. albicans* im Wurzelfüllmaterial anstieg. Die zweite Nullhypothese, dass *E. faecalis* das Hauptpathogen im Wurzelfüllmaterial bei Vorliegen einer sekundären apikalen Parodontitis darstellt, muss differenziert beantwortet werden. Zwar wird seine Rolle aufgrund seiner einfachen Kultivierbarkeit oftmals überschätzt, jedoch bestätigten unsere Studienergebnisse die dominante Rolle des Keims nicht nur mittels Kultur, sondern auch mittels PCR, wenn auch mit geringerer Dominanz. Andererseits widerlegte vorliegende Arbeit die Nullhypothese insofern, als auch schwer kultivierbare Bakterien, *Candida albicans* und *Streptococcus spp.* als Leitkeime in reinfizierten Wurzelkanälen nachgewiesen wurden.

Basierend auf diesen Studienergebnissen muss während der Revisionsbehandlung durch Spülungen (z.B. NaOCl, EDTA, CHX) und medikamentösen Einlagen (z.B. Ca(OH)₂) eine ausreichende Desinfektion dieser Leitkeime erreicht werden, um den Zahnerhalt in der Mundhöhle langfristig sichern zu können.

5 Literaturverzeichnis

1. Hellwig, E., J. Klimek, and T. Attin, *Einführung in die Zahnerhaltung*. 2013, Köln: Deutscher Ärzte-Verlag.
2. Gängler, P., et al., *Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie: 66 Tabellen*. 2010, Stuttgart: Thieme.
3. Klimm, W., S. Gäbler, and G. Viergutz, *Endodontologie: Grundlagen und Praxis*. 2003: Dt. Zahnärzte-Verlag, DÄV.
4. Hülsmann, M., *Endodontie*. 2008, Stuttgart: Thieme.
5. Ingle, J.I., L.K. Bakland, and J.C. Baumgartner, *Ingle's Endodontics 6*. 2008: BC Decker.
6. Partsch, N., et al., *Handbuch der Zahnheilkunde: Die Chirurgischen Erkrankungen der Mundhöhle der Zähne und Kiefer*. 2013, München: Springer Berlin Heidelberg.
7. Hoshino, E., et al., *Bacterial invasion of non-exposed dental pulp*. *Int Endod J*, 1992. **25**(1): p. 2-5.
8. Bergenholtz, G. and J. Lindhe, *Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp*. *Scand J Dent Res*, 1975. **83**(0029-845X (Print)): p. 153.
9. Warfvinge, J. and G. Bergenholtz, *Healing capacity of human and monkey dental pulps following experimentally-induced pulpitis*. *Dental Traumatology*, 1986. **2**(6): p. 256-262.
10. Farges, J.C., et al., *Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries*. 2015(1466-1861 (Electronic)): p. 2-4.
11. Mjör, I.A. and L. Tronstad, *The healing of experimentally induced pulpitis*. *Oral Surg*, 1974. **38**(0030-4220 (Print)): p. 115.
12. Paster, B.J., et al., *Bacterial diversity in human subgingival plaque*. *J Bacteriol*, 2001. **183**(12): p. 3770-83.
13. Al-Nazhan, S., et al., *Microorganism penetration in dentinal tubules of instrumented and retreated root canal walls. In vitro SEM study*. *Restor Dent Endod*, 2014. **39**(4): p. 258-64.
14. Raab, W.H.-M., *Zur Theorie der Selbststrangulation der Pulpa*. *Endodontie* 1992. **1**: p. 99-108.
15. Love, R.M. and H.F. Jenkinson, *Invasion of dentinal tubules by oral bacteria*. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2002. **13**(1045-4411 (Print)): p. 171.
16. Kakehashi, S., H.R. Stanley, and R.J. Fitzgerald, *The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1965. **20**: p. 340-9.
17. Heidemann, D. and M.A. Baumann, *Endodontie. Struktur der Pulpa und ihre Erkrankungsformen*, ed. E. Schäfer. 2005: Elsevier, Urban und Fischer.
18. Rocas, I.N. and J.F. Siqueira, Jr., *Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis*. *J Clin Microbiol*, 2008. **46**(1098-660X (Electronic)): p. 3599-606.
19. Hsiao, W.W., et al., *Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections*. *BMC Genomics*, 2012. **13**: p. 345.
20. Siqueira, J.F., Jr., F.R. Alves, and I.N. Rocas, *Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota*. *J Endod*, 2011. **37**(11): p. 1499-503.
21. Sundqvist, G., *Associations between microbial species in dental root canal infections*. *Oral Microbiol Immunol*, 1992. **7**(5): p. 257-62.

22. George, M. and R. Ivancakova, *Root canal microflora*. 2007(1211-4286 (Print)): p. 7-15.
23. DGZMK-Stellungnahme, *Good clinical practice: Die Wurzelkanalbehandlung*, DGZMK and DGZ, Editors. 2005, Dt Zahnärztl Z.
24. Retamozo, B., et al., *Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate Enterococcus faecalis*. J Endod, 2010. **36**(3): p. 520-3.
25. Ghivari, S.B., et al., *Antimicrobial activity of root canal irrigants against biofilm forming pathogens- An in vitro study*. J Conserv Dent, 2017. **20**(3): p. 147-151.
26. Oliveira, J.C.M., Brito, L.R.O., Goncalves, L.S., *Effectiveness of chlorhexidine and sodium hypochlorite to reduce Enterococcus faecalis biofilm biomass*. Journal of Dentistry and Oral Hygiene, 2014. **6**(6): p. 64-69.
27. Pinheiro, S.L., et al., *Antimicrobial efficacy of 2.5% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine, and ozonated water as irrigants in mesiobuccal root canals with severe curvature of mandibular molars*. Eur J Dent, 2018. **12**(1): p. 94-9.
28. Zehnder, M., *Root canal irrigants*. J Endod, 2006. **32**(5): p. 389-98.
29. Mohammadi, Z. and P.V. Abbott, *The properties and applications of chlorhexidine in endodontics*. Int Endod J, 2009. **42**(4): p. 288-302.
30. Lin, Y.H., A.K. Mickel, and S. Chogle, *Effectiveness of selected materials against Enterococcus faecalis: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on Enterococcus faecalis*. J Endod, 2003. **29**(9): p. 565-6.
31. Stuart, C.H., et al., *Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment*. J Endod, 2006. **32**(2): p. 93-8.
32. Jiang, L.M., et al., *Comparison of the cleaning efficacy of different final irrigation techniques*. J Endod, 2012. **38**(6): p. 838-41.
33. Kawashima, N., et al., *Root canal medicaments*. Int Dent J, 2009. **59**(1): p. 5-11.
34. Atila-Pektas, B., et al., *Antimicrobial effects of root canal medicaments against Enterococcus faecalis and Streptococcus mutans*. Int Endod J, 2013. **46**(5): p. 413-8.
35. Waltimo, T.M., et al., *Susceptibility of oral Candida species to calcium hydroxide in vitro*. Int Endod J, 1999. **32**(2): p. 94-8.
36. Waltimo, T.M., et al., *In vitro susceptibility of Candida albicans to four disinfectants and their combinations*. Int Endod J, 1999. **32**(6): p. 421-9.
37. DGZMK-Stellungnahme, *Zur Prognose von Wurzelkanalbehandlungen*, DGZMK and DGZ, Editors. 2000, Dt Zahnärztl Z
38. Peciulienė, V., et al., *Apical periodontitis in root filled teeth associated with the quality of root fillings*. Stomatologija, 2006. **8**(4): p. 122-6.
39. DGZMK-Stellungnahme, *Revision einer Wurzelkanalbehandlung 2004*, DGZMK and DGZ, Editors. 2004, Dt Zahnärztl Z.
40. Gomes, B.P., et al., *Microbiological examination of infected dental root canals*. Oral Microbiol Immunol., 2004. **19**(2): p. 71-6.
41. Gajan, E.B., et al., *Microbial Flora of Root Canals of Pulpally-infected Teeth: Enterococcus faecalis a Prevalent Species*. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2009. **3**(1): p. 24-7.
42. Karygianni, L., et al., *Supplementary sampling of obturation materials enhances microbial analysis of endodontic treatment failures: a proof of principle study*. Clin Oral Investig, 2015. **19**(2): p. 319-27.
43. Sanderink, R.B.A., *Curriculum orale Mikrobiologie und Immunologie*. 2004: Quintessenz-Verlag.
44. Marsh, P., *Oral Microbiology*. 2013: Springer US.

45. Rateitschak, K.H., H.F. Wolf, and E.M. Rateitschak-Plüss, *Band 1: Parodontologie*. 2003: Thieme.
46. Kovac, J., et al., *Enterococcus faecalis and Candida albicans in the dental root canal and periapical infections*. Bratisl Lek Listy, 2013. **114**(12): p. 716-20.
47. Hancock, H.H., 3rd, et al., *Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2001. **91**(5): p. 579-86.
48. Molander, A., et al., *Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis*. Int Endod J, 1998. **31**(1): p. 1-7.
49. Sundqvist, G., et al., *Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1998. **85**(1): p. 86-93.
50. Siqueira, J.F. and I.N. Rôças, *Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2004. **97**(1): p. 85-94.
51. Tennert, C., et al., *New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings*. J Endod, 2014. **40**(5): p. 670-7.
52. Rocas, I.N., J.F. Siqueira, Jr., and K.R. Santos, *Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases*. J Endod, 2004. **30**(5): p. 315-20.
53. Haapasalo, M. and D. Orstavik, *In vitro infection and disinfection of dentinal tubules*. J Dent Res, 1987. **66**(8): p. 1375-9.
54. Siqueira, J.F., Jr., M. De Uzeda, and M.E. Fonseca, *A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria*. J Endod, 1996. **22**(6): p. 308-10.
55. Siqueira, J.F., Jr. and M. de Uzeda, *Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria*. J Endod, 1996. **22**(12): p. 674-6.
56. Peciuliene, V., et al., *Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis*. Int Endod J, 2001. **34**(6): p. 429-34.
57. Anderson, A.C., et al., *Comprehensive analysis of secondary dental root canal infections: a combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49576.
58. Zoletti, G.O., J.F. Siqueira, Jr., and K.R. Santos, *Identification of Enterococcus faecalis in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches*. J Endod, 2006. **32**(8): p. 722-6.
59. Kaufman, B., et al., *Enterococcus spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions*. J Endod, 2005. **31**(12): p. 851-6.
60. Thiemann, F., *Leitfaden molekulare Diagnostik: Grundlagen, Gesetze, Tipps und Tricks*. 2006: John Wiley & Sons Australia, Limited.
61. Müller, H.J. and D.R. Prange, *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. 2015: Springer Berlin Heidelberg.
62. Bottger, E.C., *Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA*. FEMS Microbiol Lett, 1989. **53**(1-2): p. 171-6.
63. Weisburg, W.G., et al., *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. J Bacteriol, 1991. **173**(2): p. 697-703.
64. Schirrmeister, J.F., et al., *New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions*. J Endod, 2009. **35**(2): p. 169-74.

65. Makimura, K., S.Y. Murayama, and H. Yamaguchi, *Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction*. J Med Microbiol, 1994. **40**(5): p. 358-64.
66. White, et al., *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics*. 1990. 315-322.
67. Schoch, C.L., et al., *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(16): p. 6241-6.
68. Nair, P.N., et al., *Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study*. J Endod, 1990. **16**(12): p. 580-8.
69. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Fungal infection of the radicular dentin*. J Endod, 2002. **28**(11): p. 770-3.
70. Waltimo, T.M., et al., *Fungi in therapy-resistant apical periodontitis*. Int Endod J, 1997. **30**(2): p. 96-101.
71. Peciuniene, V., I. Balciuniene, and M. Haapasalo, *Electrophoresis of Whole-cell Soluble Proteins of Enterococcus faecalis and Yeast Isolated in the Root Canals of Previously Root-filled Teeth*. Vol. 5. 2003.
72. Thiemann, F., P.M. Cullen, and H.G. Klein, *Molekulare Diagnostik: Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik*. 2014: Wiley.
73. Makino, K., et al., *Epstein-Barr Virus Infection in Chronically Inflamed Periapical Granulomas*. PLoS One, 2015. **10**(4).
74. Popovic, J., et al., *Prevalence of Human Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus in Chronic Periapical Lesions*. Intervirology, 2015. **58**(5): p. 271-7.
75. Patel, K., et al., *Multiple Apical Radiolucencies and External Cervical Resorption Associated with Varicella Zoster Virus: A Case Report*. J Endod, 2016. **42**(6): p. 978-83.
76. Schild, T., *Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie*. Applied Biosystems, 1999.
77. Zipper, H., et al., *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*. Nucleic Acids Research, 2004. **32**(12): p. e103-e103.
78. Dragan, A.I., et al., *SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA*. J Fluoresc, 2012. **22**(4): p. 1189-99.
79. Rocas, I.N. and J.F. Siqueira, Jr., *Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(5): p. 1721-4.
80. Dewhirst, F.E., et al., *The human oral microbiome*. J Bacteriol, 2010. **192**(19): p. 5002-17.
81. Cheung, G.S. and M.W. Ho, *Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions*. Oral Microbiol Immunol, 2001. **16**(6): p. 332-7.
82. Conrads, G., et al., *The use of a 16s rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria*. J Endod, 1997. **23**(7): p. 433-8.
83. Antunes, H.S., et al., *Total and Specific Bacterial Levels in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-treatment Apical Periodontitis*. J Endod, 2015. **41**(7): p. 1037-42.
84. Fouad, A.F., *Endodontic Microbiology*. 2017: Wiley.
85. Fernandes Cdo, C., et al., *Identification of Synergistetes in endodontic infections*. Microb Pathog, 2014. **73**: p. 1-6.

86. Vengerfeldt, V., et al., *Highly diverse microbiota in dental root canals in cases of apical periodontitis (data of illumina sequencing)*. J Endod, 2014. **40**(11): p. 1778-83.
87. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(7): p. 3314-9.
88. Handal, T., et al., *Bacterial diversity in persistent periapical lesions on root-filled teeth*. J Oral Microbiol, 2009. **1**.
89. Gomes, B.P., et al., *Molecular analysis of Filifactor alocis, Tannerella forsythia, and treponema denticola associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment*. J Endod, 2006. **32**(10): p. 937-40.
90. Gomes, B.P., et al., *Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction*. J Endod, 2008. **34**(5): p. 537-40.
91. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000. **89**(6): p. 744-8.
92. Munson, M.A., et al., *Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections*. J Dent Res, 2002. **81**(11): p. 761-6.
93. Nóbrega, L.M.M., et al., *Treponema diversity in root canals with endodontic failure*. Eur J Dent, 2013. **7**(1): p. 61-8.
94. Müller, H.P., *Parodontologie: 36 Tabellen*. 2006: Thieme.
95. Baumgartner, J.C., S.U. Khemaleelakul, and T. Xia, *Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections*. J Endod, 2003. **29**(12): p. 794-7.
96. MacKenzie, C.R., et al., *Fatal outcome of a disseminated dual infection with drug-resistant Mycoplasma hominis and Ureaplasma parvum originating from a septic arthritis in an immunocompromised patient*. Int J Infect Dis, 2010. **14 Suppl 3**: p. e307-9.
97. Harmsen, D., et al., *RIDOM: comprehensive and public sequence database for identification of Mycobacterium species*. BMC Infect Dis, 2003. **3**: p. 26.
98. Vilgalys, R. and M. Hester, *Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several Cryptococcus species*. J Bacteriol, 1990. **172**(8): p. 4238-46.
99. Rahn, S., et al., *A novel comprehensive set of fungal Real time PCR assays (fuPCR) for the detection of fungi in immunocompromised haematological patients-A pilot study*. Int J Med Microbiol, 2016. **306**(8): p. 611-623.
100. Mobius, N., et al., *Protocol for the rapid detection of the urogenital tract mollicutes and Chlamydia with concomitant LGV-(sub)typing*. Methods Mol Biol, 2012. **903**: p. 235-53.
101. Kobylak, N., et al., *Real-time PCR approach in dermatophyte detection and Trichophyton rubrum identification*. Acta Biochim Pol, 2015. **62**(1): p. 119-22.
102. Caprioli, R.M., T.B. Farmer, and J. Gile, *Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS*. Analytical Chemistry, 1997. **69**(23): p. 4751-4760.
103. Karatayli, E., et al., *Free circulating nucleic acids in plasma and serum as a novel approach to the use of internal controls in real time PCR based detection*. J Virol Methods, 2014. **207**: p. 133-7.
104. Lindahl, T., *Instability and decay of the primary structure of DNA*. Nature, 1993. **362**(6422): p. 709-15.
105. Savva, R., et al., *The structural basis of specific base-excision repair by uracil-DNA glycosylase*. Nature, 1995. **373**(6514): p. 487-93.

106. Weiss, S., et al., *Tracking down the sources of experimental contamination in microbiome studies*. Genome Biol, 2014. **15**(12).
107. Kovaleva, J., J.E. Degener, and H.C. van der Mei, *Methylobacterium and its role in health care-associated infection*. J Clin Microbiol, 2014. **52**(5): p. 1317-21.
108. Salter, S.J., et al., *Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses*. BMC Biology, 2014. **12**: p. 87.
109. McFeters, G.A., et al., *Distribution of bacteria within operating laboratory water purification systems*. Appl Environ Microbiol, 1993. **59**(5): p. 1410-5.
110. Kulakov, L.A., et al., *Analysis of Bacteria Contaminating Ultrapure Water in Industrial Systems*. Appl Environ Microbiol, 2002. **68**(4): p. 1548-55.
111. Rocas, I.N., M. Hulsmann, and J.F. Siqueira, Jr., *Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population*. J Endod, 2008. **34**(8): p. 926-31.
112. Saito, D., et al., *Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 1): p. 101-7.
113. Rocas, I.N. and J.F. Siqueira, Jr., *Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(11): p. 3599-606.
114. Sato, T., et al., *Cultivable anaerobic microbiota of infected root canals*. Int J Dent, 2012. **2012**: p. 609689.
115. Fujii, R., et al., *An endodontic-periodontal lesion with primary periodontal disease: a case report on its bacterial profile*. Bull Tokyo Dent Coll, 2014. **55**(1): p. 33-7.
116. Matic Petrovic, S., et al., *Detection and sampling methods for isolation of Candida spp. from oral cavities in diabetics and non-diabetics*. Braz Oral Res, 2015. **29**.
117. Vickerman, M.M., et al., *Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections*. J Med Microbiol, 2007. **56**(Pt 1): p. 110-8.
118. Poptani, B., et al., *Detection of Enterococcus faecalis and Candida albicans in previously root-filled teeth in a population of Gujarat with polymerase chain reaction*. Contemp Clin Dent, 2013. **4**(1): p. 62-6.
119. Ricucci, D., S. Loghin, and J.F. Siqueira, Jr., *Exuberant Biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case*. J Endod, 2013. **39**(5): p. 712-8.
120. Vieira, A.R., et al., *Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report*. J Endod, 2012. **38**(2): p. 250-4.
121. Arnold, M., D. Ricucci, and J.F. Siqueira, Jr., *Infection in a complex network of apical ramifications as the cause of persistent apical periodontitis: a case report*. J Endod, 2013. **39**(9): p. 1179-84.
122. Rocas, I.N., et al., *Apical root canal microbiota as determined by reverse-capture checkerboard analysis of cryogenically ground root samples from teeth with apical periodontitis*. J Endod, 2010. **36**(10): p. 1617-21.
123. Persoon, I.F., et al., *The mycobiome of root canal infections is correlated to the bacteriome*. Clin Oral Investig, 2017. **21**(5): p. 1871-1881.
124. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Microbiome in the Apical Root Canal System of Teeth with Post-Treatment Apical Periodontitis*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0162887.
125. Tran, K.T., et al., *Comparison of efficacy of pulverization and sterile paper point techniques for sampling root canals*. J Endod, 2013. **39**(8): p. 1057-9.
126. Ozok, A.R., et al., *Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments*. Int Endod J, 2012. **45**(6): p. 530-41.

127. Alves, F.R., et al., *Bacterial community profiling of cryogenically ground samples from the apical and coronal root segments of teeth with apical periodontitis*. J Endod, 2009. **35**(4): p. 486-92.
128. Xu, H., et al., *Streptococcal co-infection augments Candida pathogenicity by amplifying the mucosal inflammatory response*. Cell Microbiol, 2014. **16**(2): p. 214-31.
129. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing*. Oral Microbiol Immunol, 2007. **22**(4): p. 266-71.
130. Siqueira, J.F., Jr., A.F. Fouad, and I.N. Rocas, *Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes*. J Oral Microbiol, 2012. **4**.
131. Pourhajbagher, M., R. Ghorbanzadeh, and A. Bahador, *Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections*. Braz Oral Res, 2017. **31**: p. e108.
132. Bernal-Trevino, A., et al., *[Frequency of Candida in root canals of teeth with primary and persistent endodontic infections]*. Rev Iberoam Micol, 2018. **35**(2): p. 78-82.
133. Heyder, M., et al., *Antibacterial effect of different root canal sealers on three bacterial species*. Dent Mater, 2013. **29**(5): p. 542-9.
134. von Wintzingerode, F., U.B. Gobel, and E. Stackebrandt, *Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis*. FEMS Microbiol Rev, 1997. **21**(3): p. 213-29.
135. Young, G., et al., *Bacterial DNA persists for extended periods after cell death*. J Endod, 2007. **33**(12): p. 1417-20.
136. Sakamoto, M., et al., *Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections*. Oral Microbiol Immunol, 2006. **21**(2): p. 112-22.
137. Sakamoto, M., et al., *Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures*. Oral Microbiol Immunol, 2008. **23**(4): p. 275-81.
138. Fabricius, L., et al., *Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure*. Scand J Dent Res, 1982. **90**(2): p. 134-44.
139. Ward, D.M., R. Weller, and M.M. Bateson, *16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community*. Nature, 1990. **345**(6270): p. 63-5.
140. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Diversity of endodontic microbiota revisited*. J Dent Res, 2009. **88**(11): p. 969-81.
141. Ghannoum, M.A., et al., *Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals*. PLoS Pathog, 2010. **6**(1): p. e1000713.
142. Abusleme, L., et al., *Influence of DNA extraction on oral microbial profiles obtained via 16S rRNA gene sequencing*. J Oral Microbiol, 2014. **6**.
143. Yuan, S., et al., *Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33865.
144. Leite, G.M., N. Magan, and A. Medina, *Comparison of different bead-beating RNA extraction strategies: an optimized method for filamentous fungi*. J Microbiol Methods, 2012. **88**(3): p. 413-8.
145. Carbonero, F., et al., *Microbial DNA extraction from intestinal biopsies is improved by avoiding mechanical cell disruption*. J Microbiol Methods, 2011. **87**(1): p. 125-7.

146. Manter, D.K. and J.M. Vivanco, *Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis*. Journal of Microbiological Methods, 2007. **71**(1): p. 7-14.
147. Op De Beeck, M., et al., *Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies*. PLOS ONE, 2014. **9**(6): p. e97629.
148. Al-Ahmad, A., et al., *Overestimation of Streptococcus mutans prevalence by nested PCR detection of the 16S rRNA gene*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 1): p. 109-13.
149. Jakovljevic, A., et al., *Herpesviruses viral loads and levels of proinflammatory cytokines in apical periodontitis*. Oral Dis, 2018. **24**(5): p. 840-846.
150. Verdugo, F., et al., *Periodontopathogen and Epstein-Barr virus-associated periapical periodontitis may be the source of retrograde infectious peri-implantitis*. Clin Implant Dent Relat Res, 2015. **17**(1): p. 199-207.
151. Sabeti, M., J.H. Simon, and J. Slots, *Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus are associated with symptomatic periapical pathosis*. Oral Microbiol Immunol, 2003. **18**(5): p. 327-8.
152. Dominguez, S.R., et al., *Comparison of Herpes Simplex Virus PCR with Culture for Virus Detection in Multisource Surface Swab Specimens from Neonates*. J Clin Microbiol, 2018.
153. van Elden, L.J., et al., *Polymerase chain reaction is more sensitive than viral culture and antigen testing for the detection of respiratory viruses in adults with hematological cancer and pneumonia*. Clin Infect Dis, 2002. **34**(2): p. 177-83.
154. Hellwege, K.D., *Die Praxis der Zahnmedizinischen Prophylaxe: Ein Leitfaden f. d. Individual-, Gruppenprophylaxe u. initiale Parodontaltherapi*. 2003: Thieme.
155. Walker, C. and M.J. Sedlacek, *An in vitro biofilm model of subgingival plaque*. Oral Microbiol Immunol, 2007. **22**(3): p. 152-61.
156. Haber, J., *Smoking is a major risk factor for periodontitis*. Curr Opin Periodontol, 1994: p. 12-8.
157. Bergstrom, J., J. Babcan, and S. Eliasson, *Tobacco smoking and dental periapical condition*. Eur J Oral Sci, 2004. **112**(2): p. 115-20.
158. Kirkevang, L.L. and A. Wenzel, *Risk indicators for apical periodontitis*. Community Dent Oral Epidemiol, 2003. **31**(1): p. 59-67.
159. Krall, E.A., et al., *Cigarette Smoking Increases the Risk of Root Canal Treatment*. Journal of Dental Research, 2006. **85**(4): p. 313-317.
160. Persic Bukmir, R., et al., *Socio-economic and health status as a predictor of apical periodontitis in adult patients in Croatia*. Oral Dis, 2018.
161. Zandi, H., et al., *Microbial Analysis of Endodontic Infections in Root-filled Teeth with Apical Periodontitis before and after Irrigation Using Pyrosequencing*. J Endod, 2018. **44**(3): p. 372-378.
162. Zijngje, V., et al., *Oral biofilm architecture on natural teeth*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9321.
163. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *As-yet-uncultivated oral bacteria: breadth and association with oral and extra-oral diseases*. J Oral Microbiol, 2013. **5**.
164. Suttorp, N. and T. Berg, *Infektionskrankheiten : [verstehen, erkennen, behandeln]*. 2004: Thieme.
165. Waltimo, T.M., et al., *In vitro yeast infection of human dentin*. J Endod, 2000. **26**(4): p. 207-9.
166. Kraneveld, E.A., et al., *The relation between oral Candida load and bacterial microbiome profiles in Dutch older adults*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e42770.

167. O'Donnell, L.E., et al., *The Oral Microbiome of Denture Wearers Is Influenced by Levels of Natural Dentition*. PLoS One, 2015. **10**(9): p. e0137717.
168. Orsi, C.F., et al., *Inhibitory effects of different lactobacilli on Candida albicans hyphal formation and biofilm development*. J Biol Regul Homeost Agents, 2014. **28**(4): p. 743-52.
169. Ray, H.A. and M. Trope, *Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration*. Int Endod J, 1995. **28**(1): p. 12-8.
170. Khayat, A., S.J. Lee, and M. Torabinejad, *Human saliva penetration of coronally unsealed obturated root canals*. J Endod, 1993. **19**(9): p. 458-61.
171. Chandra, S.S., et al., *Antifungal efficacy of 5.25% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine gluconate, and 17% EDTA with and without an antifungal agent*. J Endod, 2010. **36**(4): p. 675-8.
172. Zandi, H., et al., *Antibacterial Effectiveness of 2 Root Canal Irrigants in Root-filled Teeth with Infection: A Randomized Clinical Trial*. J Endod, 2016. **42**(9): p. 1307-13.
173. Gernhardt, C., *Unklar oder klar? NaOCl und CHX im Desinfektionsprotokoll der Endodontie*. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift, 2018. **73**(5): p. 322-329.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mir die Erstellung vorliegender Arbeit ermöglicht haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. W. H.-M. Raab für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und für seine äußerst engagierte Betreuung.

Frau Dr. S. Kowollik und Frau Dr. S. Gabris danke ich sehr für ihre freundliche Unterstützung und Durchführung der zahnmedizinischen Behandlungen.

Ich bedanke mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. K. Pfeffer, Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, für die Möglichkeit, in seiner Abteilung die mikrobiologische Analyse meiner Arbeit durchzuführen.

Mein großer Dank gilt Frau Prof. Dr. B. Henrich für ihren unermüdlichen Einsatz, hervorragende fachliche und menschliche Unterstützung bei der Verwirklichung des mikrobiologischen Teils meiner Arbeit. Ihr Engagement hat einen entscheidenden Beitrag zum Gelingen dieser wissenschaftlichen Studie geleistet.

Für ihre Mithilfe bei der kulturellen Auswertung bedanke ich mich besonders bei Frau Dr. A. Balasiu. Ebenso möchte ich Frau D. Belik und Frau M. Rosenblatt danken für ihre herzliche Unterstützung und tolle Betreuung bei der Durchführung meiner praktischen Arbeiten im Labor.

Zuletzt bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie, die mir immer unterstützend zur Seite stand.