

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Philipps-Universität
(komm. Leiter Prof. Dr. M. Lohoff) in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinikum
Giessen und Marburg GmbH Standort Marburg

**Vergleichende Untersuchung zum Nachweis von
ausgewählten parodontalpathogenen Mikroorganismen
mittels konventioneller Kultur versus
DNA-Chip bei Patienten mit Arteriosklerose-Verdacht**

Inaugural Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Claudia Bonn-Spitzhüttl aus Frankenberg

Marburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am 22.03.2007.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. R. Mutters

Koreferentin: Prof. Dr. L. Flores-de-Jacoby

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	7
1.1 Der Zahnhalteapparat (Parodont)	8
1.2 Reaktionen des Parodontalen Gewebes durch Bakterieninvasion	9
1.3 Die Taschenbildung	10
1.4 Mikroorganismen	11
1.4.1 <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans (Aa)</i>	12
1.4.2 <i>Porphyromonas gingivalis (Pg)</i>	12
1.4.3 <i>Prevotella intermedia (Pi)</i>	13
1.4.4 <i>Peptostreptococcus micros (Pm)</i>	14
1.5 Bakterielle Infektionserreger und Allgemeine Erkrankungen	15
1.5.1 Herzerkrankungen	15
1.5.2 Allgemeine Gesundheit	17
1.6 Nachweismethoden zur Identifizierung pathogener Mikroorganismen	18
1.6.1 Kultureller Nachweis	19
1.6.2 Alternative Nachweismethoden	20
1.6.3 DNA-Chip	21
1.7 Ziel der Untersuchung	22
2 MATERIAL UND METHODE	23
2.1 Studiendesign	23
2.2 Patientengruppe	23
2.3 Ethische Grundlage	23
2.4 Mikrobiologische Parameter	24
2.5 Probenentnahme	24

2.6	Mikrobiologische Verfahren	25
2.6.1	Kultur.....	25
2.6.1.1	Materialien.....	25
2.6.1.2	Identifikation der Mikroorganismen.....	27
2.6.2	DNA-Chip (Microarray).....	28
2.6.2.1	Konzept und Konfiguration des DNA-Chips.....	28
2.6.2.2	Arbeiten mit dem DNA-Chip	29
2.6.2.3	Auswertung des DNA-Chips.....	30
2.7	Statistische Auswertung	31
3	ERGEBNISSE.....	32
3.1	Eigenschaften der Patientengruppe	32
3.2	Mikrobiologische Ergebnisse	32
3.2.1	Kultur.....	33
3.2.1.1	Ergebnisse bei Gesamtzahl der Proben mit Kulturen	33
3.2.2	DNA-Chip.....	33
3.2.2.1	Ergebnisse bei Gesamtzahl der Proben mit dem DNA-Chip	34
3.3	Vergleich der Ergebnisse von Kultur und DNA-Chip	34
3.3.1	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans (Aa)</i>	34
3.3.2	<i>Porphyromonas gingivalis (Pg)</i>	35
3.3.3	<i>Prevotella intermedia (Pi)</i>	35
3.3.4	<i>Peptostreptococcus micros (Pm)</i>	35
3.4	Vergleich der Ergebnisse in Bezug zu KHK positiv/ negativ, Geschlecht und Alter	36
3.4.1	Herzerkrankungen.....	36
3.4.1.1	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> versus KHK	36
3.4.1.2	<i>Porphyromonas gingivalis</i> versus KHK.....	37
3.4.1.3	<i>Prevotella intermedia</i> versus KHK.....	37
3.4.1.4	<i>Peptostreptococcus micros</i> versus KHK.....	37
3.4.1.5	Vergleich Vorkommen pathogene Mikroorganismen versus KHK	38
3.4.2	Alter der Patienten versus Bakterienvorkommen	38
3.4.3	Geschlecht versus Bakterienvorkommen.....	38

3.5	Untersuchung zum Nachweis von Mikroorganismen mit Hilfe des Microarray .	39
3.5.1	Vorkommen Mikroorganismen versus KHK positiv bzw. negativ	39
3.5.2	Vorkommen Mikroorganismen versus Alter der Patienten	40
3.5.3	Vorkommen Mikroorganismen versus Geschlecht der Patienten.....	40
4	DISKUSSION	41
4.1	Diskussion der Methode	41
4.2	Mikrobiologische Techniken	41
4.3	Diskussion der Ergebnisse	44
5	SCHLUSSFOLGERUNG.....	48
6	ZUSAMMENFASSUNG	49
7	SUMMARY	51
8	ABBILDUNGEN, TABELLEN UND FIGUREN	52
A)	Abbildungen.....	52
B)	Tabellen	60
C)	Figuren.....	62
9	LITERATURVERZEICHNIS	69
10	ANHANG.....	84
11	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	86

1 Einleitung

Die pathogenen Mikroorganismen in der subgingivalen Plaque werden als Hauptursache von Parodontalerkrankungen angesehen (FLORES-DE-JACOBY ET AL., 1996). Mikroorganismen wie z.B. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros* verursachen hartnäckige parodontale Erkrankungen, die sich in verschiedenen Formen je nach Bakterienzusammensetzung unterscheiden (NAKAWAGA ET AL., 1994). Diese Erkrankungen sind oftmals nur mit Hilfe von mechanischer Reinigung der Zahnfleischtaschen, d.h. der Entfernung der subgingivalen Plaque und ihrem Nährboden zu bekämpfen (MOMBELLI ET AL., 2000). Bei aggressiveren Krankheitsformen, die mit einer Vielzahl an pathogenen Mikroorganismen einhergehen (DOUNG-UDOMACHA ET AL., 2000), kann neben der mechanischen Bearbeitung der Wurzeloberfläche, eine gezielte Antibiotika-Therapie (lokal oder systemisch) erforderlich und sinnvoll sein, um diese Mikroorganismen zu bekämpfen (PLAGMANN 1998). Als Standard für den Nachweis von Mikroorganismen gilt die Kultur, was bei den hier zu erwartenden anaeroben und mikroaerophilen Organismen sehr zeitaufwendig ist und eine gewisse Erfahrung voraussetzt (MÜLLER 2001). Ergänzt, aber nicht ersetzt wird dieses Verfahren heute durch die Analyse bakterieller DNA aus klinischen Proben (CONRADS 1994). Auch diese Nachweismethoden sind oft sehr zeit- und kostenintensiv, bieten aber im Gegensatz zur Kultur einen exakten Nachweis der Mikroorganismen. Da jeder bakterielle Mikroorganismus eine Art genetischen Fingerabdruck hinterlässt, kann er mit Hilfe seiner DNA und über eine PCR nachgewiesen werden (ASHIMOTO ET AL., 1996). Anhand dieses Ergebnisses kann dann eine gezielte bzw. rationale Antibiotika-Therapie erfolgen. In dieser Untersuchung wird die Nachweismethode mit Hilfe eines DNA-Chips angewendet, der die Analyse der vorhandenen Mikroorganismen vereinfachen und die gesamte Analyse schneller und günstiger machen soll.

1.1 Der Zahnhalteapparat (Parodont)

Zum Parodont gehören das Wurzelzement, der Alveolarknochen, das Desmodont und die Gingiva, die man auch als marginales Parodont bezeichnet. Diese vier Bauelemente verankern den einzelnen Zahn in seinem Knochenfach, der Alveole. Durch das Parodont sind die Zähne in die Kontinuität der anderen Gewebe der Mundhöhle eingegliedert, die Zähne stehen zueinander in Korrelation und die Gingiva ist als eine Art Barriere gegen schädliche Metabolite aus der Mundhöhle zu verstehen. Das marginale Parodont ist der am meisten peripher gelegene Anteil des Zahnhalteapparates. Es bedeckt den Alveolarknochen, die Interdentalsepten und umschließt den Zahn in einer Art Manschette, die man Saumepithel nennt. Das Saumepithel sitzt fest an der Zahnoberfläche und sorgt so für die Kontinuität der epithelialen Auskleidung der Mundhöhle. Außerdem sorgen die Epithelansätze des Saumepithels für einen Haftmechanismus an der Zahnoberfläche, die epitheliale Haftung. Diese Haftung erstreckt sich vom apikalen Rand des Saumepithels, die der Schmelz-Zement-Grenze entspricht, bis hin zum Boden des Sulcus gingivae. Der Sulcus gingivae ist eine schmale, bis zu 0,5 mm tiefe, rinnenartige Vertiefung zwischen Gingivalsaum und Zahnoberfläche. Zum Zahnhalteapparat gehört als weiterer Bestandteil der Alveolarknochen, in dem die Zähne in so genannten Alveolen fest verankert sind und so die Innenseite des Knochens zugewendet bekommen. Diese Alveoleninnenseite wird auch als Lamina cribriformis bezeichnet. Sie ist an den Spongiosabälkchen des Knochens befestigt und verbindet so das Desmodont und das Knochenmark. Das Desmodont ist ein derbes Bindegewebe, das am Alveolarkamm in das Bindegewebe der angewachsenen Gingiva kontinuierlich übergeht und sich im so genannten Periodontalspalt, der zwischen dem Wurzelzement und dem Alveolarknochen liegt, befindet. Die desmodontalen Fasern, auch Sharpey'sche Fasern genannt, sitzen sowohl im Wurzelzement als auch im Alveolarknochen und halten den Zahn beweglich in seinem Knochenfach fest. Das Wurzelzement ist Bestandteil des Zahnes, gehört funktionell jedoch zum Zahnhalteapparat. Es überzieht in einer variablen dicken Schicht das Wurzelzement und verankert die kollagenen Fasern des Desmodonts (SCHRÖDER 1992).

1.2 Reaktionen des parodontalen Gewebes auf Bakterieninvasion

Das marginale Parodont, das sowohl Teil der Mundschleimhaut als auch der am meisten peripher gelegene Abschnitt des Zahnhalteapparates ist, umschließt den Zahnhals eines Zahnes ringförmig mit dem Saumepithel (SCHRÖDER 1992). Dieser Ring erstreckt sich bei einem parodontal gesunden Menschen von der Schmelz-Zement-Grenze bis hin zum Boden des gingivalen Sulkus.

Parodontale Veränderungen sind in den meisten Fällen die Folge von Reaktionen des Körpers, um auf traumatische oder lokal infektiöse Ereignisse zu reagieren (SCHRÖDER 1997). Jedoch sind die meisten parodontalen Veränderungen als Folge von bakteriellen Invasionen zu sehen (LOE ET AL. 1965). Die bakterielle Invasion ist vermutlich für den Abbau der epithelialen Gewebe, der Bindegewebe und sogar des Alveolarknochens verantwortlich (FLORES DE JACOBY ET AL., 1996). In der Mundhöhle eines parodontal gesunden Menschen gibt es ein ausgeglichenes Verhältnis von pathogenen und apathogenen Mikroorganismen. Dieses Verhältnis wird gestört, wenn es zur Ansammlung von Mikroorganismen entlang des Gingivalrandes kommt. Eine Anhäufung von pathogenen Mikroorganismen löst Entzündungsreaktionen im Gewebe aus, die zu einer massiven Störung der gingivalen Strukturen führen können. Solange die destruktiven Schädigungen mit den reparativen Gewebevorgängen im Einklang bleiben, gibt es keine Veränderung der Haftung des Saumepithels am Zahn. Wird aber das Verhältnis massiv gestört, z.B. durch eine qualitative oder quantitative Veränderung der Mikroflora bzw. wenn die Mikroorganismen die polymorphkernigen Zellenbarrieren des Saumepithels überschreiten (FLORES-DE-JACOBY ET AL., 1996), kommt es zu einer bakteriellen Entzündung des parodontalen Stützgewebes, was zu einer Gewebsdestruktion führen kann (LINDHE 1986). Der Hauptanteil der parodontalen Destruktion erfolgt allerdings durch entzündliche Reaktionen und Immunreaktionen des Wirts, dem Menschen (MÜLLER 2001). Ob sich eine destruktive, entzündliche Parodontalerkrankung entwickelt, hängt von der Immunstärke des Organismus ab. Das bedeutet, dass nur in Zusammenarbeit von körpereigenen neutrophilen Leukozyten, Antikörpern und Komplement eine Entzündung des parodontalen

Bindegewebes mit dentogingivalen Plaquebakterien und ihrer Stoffwechselprodukte verhindert werden kann. In diesem Fall kommt es nur zu einer leichten Form der Erkrankung. Es gibt Patienten, bei denen die Anlagerung der dentogingivalen Plaque und der bakteriell neuen Gegebenheiten eine allgemein oder lokal überschießende, verminderte oder inadäquate Reaktion des Körpers hervorruft. Vermutlich gibt es für diese Reaktionen eine genetische Determinante (MÜLLER 2001). Bei Anwesenheit von pathogenen Mikroorganismen wie *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* reagiert der Körper mit der Bildung von Antikörpern, die auf die Antigene der gramnegativen Mikroorganismen des Biofilms reagieren (MÜLLER 2001). Die Pathogenität der Mikroorganismen beschreibt sich über deren Virulenzfaktoren, z.B. Adhäsion an den Geweben des Wirtsorganismus, Umgehung der wirtseigenen Abwehrmechanismen und der aktiven Destruktion des besiedelten Gewebes (MÜLLER 2001). Die zerstörerischen Effekte dieser Faktoren addieren sich innerhalb der Zahnfleischtasche und durch Abwesenheit von nützlichen Mikroorganismen in derselben kommt es dann zur multifaktoriellen Erkrankung, der Parodontitis in ihren unterschiedlichen Krankheitsformen (NONNENMACHER ET AL., 2001). Jede Form der Parodontitis erfolgt aus den Folgen der körpereigenen Reaktion (lokal und systemisch) auf den lokal subgingival erfolgenden bakteriellen Infekt (SCHROEDER 1997).

1.3 Die Taschenbildung

Bei einer klinisch und histologisch gesunden Gingiva endet diese marginal flach auslaufend und scharfkantig an der Zahnoberfläche. Das Saumepithel erstreckt sich ohne einen Sulcus gingivae zu bilden (SCHRÖDER 1992). Die Anlagerung von Mikroorganismen an den Zahn und die daraus folgende Schwellung der Gingiva (Gingivitis) als Reaktion auf die supragingivale Plaque, die sich im Laufe weiterer Anlagerungen von Mikroorganismen verdickt und von supragingival nach subgingival wandert, leitet eine Vertiefung des Sulcus gingivae und damit die Taschenbildung ein (MÜLLER 2001). So erzeugt die Plaque eine Gingivitis und der Entzündungsprozess fördert die Taschenbildung (SCHRÖDER 1997). Es hat sich so eine ökologische Nische gebildet, in der sich nun die pathogenen Mikroorganismen vermehren können und es

entsteht eine Mischinfektion (MÜLLER ET AL., 1997). In dieser Mischflora bildet sich ein entzündliches Exsudat, welches in direkter Wirkung den Knochen, das Bindegewebe und die Epithelzellen schädigt. Die Taschenbildung ist das Resultat von Zusammenwirken von bakterieller Proliferation, subgingival gerichteter Ausdehnung der bakteriellen Plaque und der entzündlichen Exsudation (SCHRÖDER 1997).

1.4 Mikroorganismen

Parodontale Erkrankungen werden durch Bakterien bzw. Mikroorganismen verursacht. Der Entstehung der oralen Mikroflora zwischen Geburt und dem ersten gefundenen Bakterium im Mund eines Kindes leitet sich von der Mutter ab. Der Beweis für die Transaktion zwischen Eltern und Kindern lieferte eine Studie aus dem Jahre 1997 (GREENSTEIN ET AL., 1997). Dabei konnten 200 bis 500 morphologisch und biochemisch verschiedene Spezies in der Mundhöhle bzw. in den subgingivalen Bereichen nachgewiesen werden (LINDHE 1986; MÜLLER 2001). Nur ein kleiner Anteil der Bakterien, die den Zahnsaum und den Biofilm belagern, ist in der Lage, das parodontale Gewebe schwerwiegend zu schädigen. Die meisten dieser parodontalpathogenen Bakterien sind gramnegativ und obligat anaerob. Sie sind in den Taschen vor Entfernung durch Mundhygienemaßnahmen geschützt, erhalten aber Wachstumsfaktoren aus dem Entzündungsexsudat (MÜLLER 2001) und die Kolonisierung des subgingivalen Bereiches kann ohne Behinderung erfolgen. Als besonders pathogen gelten *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis*, aber auch *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros* sind signifikante Marker für eine destruktive parodontale Erkrankung (VAN WINKELHOFF ET AL., 2002). In einer Studie über die Verteilung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia* in einer australischen Patientengruppe wurde demonstriert, dass die genannten Parodontalpathogene ein Teil der Flora der subgingivalen Plaque sind (HAMLET ET AL., 2001). Nachfolgende Studien sind nötig, um mit Hilfe von Angaben über Taschentiefe und über die Präsenz der Pathogene eine Aussage über den Beginn und/oder den Verlauf einer Parodontalerkrankung treffen zu können (HAMLET ET AL., 2001). Keiner dieser Bakterien alleine vermag eine Destruktion des parodontalen

Gewebes hervorzurufen, aber in Kombination und im Zusammenschluss ihrer virulenten Faktoren, sind sie pathogen und verursachen je nach Zusammensetzung der Taschenmikroflora eine bestimmte Parodontitiserkrankung (NONNENMACHER 2003).

1.4.1 *Actinobacillus actinomycescomitans* (Aa)

Actinobacillus actinomycescomitans ist ein kleines, unbewegliches, gramnegatives, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium (HOFFMANN 2000).

Die Kolonien können auf Agar eine sternförmige Struktur aufweisen (GRAEVENITZ ET AL., 2003). Er bildet eine Vielzahl von Virulenzfaktoren z.B. ein wirkungsvolles Leukotoxin, Kollegenase, immunsupprimierende Faktoren und Proteasen (MARSH ET AL., 2003). *Actinobacillus actinomycescomitans* kommt sowohl in der supragingivalen wie auch in der subgingivalen Plaque bei parodontal gesunden Patienten und bei parodontal erkrankten Patienten vor (XIMENEZ- FYVIE ET AL., 2000). Bei parodontal erkrankten Patienten lag ein höherer Prozentsatz an *Actinobacillus actinomycescomitans* in subgingivaler Plaque vor (XIMENEZ- FYVIE ET AL., 2000), aber nur das hartnäckige Vorkommen von *Actinobacillus actinomycescomitans* allein ist kein diagnostischer Parameter für eine parodontale Erkrankung (BUCHMANN 2000).

Actinobacillus actinomycescomitans ist ein entscheidender Faktor bei der juvenilen Parodontitis (SUMMANEN ET AL., 1993; CONRADS 1994). Eine der engsten Verbindungen zwischen anscheinend pathogenen Mikroorganismen und destruktiven Parodontalerkrankungen wird mit dem Vorkommen von *Actinobacillus actinomycescomitans* beschrieben (MÜLLER ET AL., 1997). Bei gesunden parodontalen Verhältnissen sind besonders die virulenten Varianten von *Actinobacillus actinomycescomitans* nicht zu finden (MÜLLER 2001).

1.4.2 *Porphyromonas gingivalis* (Pg)

Porphyromonas gingivalis ist ein gramnegatives, asaccharolytisches, obligat anaerobes Stäbchen (HOFFMAN 2000), dass beim Wachstum auf Blutagar schwarz-

grüne Kolonien bildet. *Porphyromonas gingivalis* überlebt ausschließlich an Orten mit eingeschränktem Sauerstoffgehalt (LAMONT ET AL., 2000) und findet sich so fast ausschließlich an subgingivalen Stellen bevorzugt bei fortgeschrittenen Parodontalläsionen. *Porphyromonas gingivalis* ist hochvirulent und bildet eine Reihe von mutmaßlichen Virulenzfaktoren, die mit der Zerstörung des Gewebes und der Umgebung der Wirtsabwehr in Verbindung gebracht werden. So hat *Porphyromonas gingivalis* die Schlüsselrolle für den so genannten „parodontalen Gewebs-Breakdown“ inne (GHARBIA ET AL., 1994). Zu den zerstörenden Faktoren gehören hoch aktive Proteasen, die die Immunantwort und die Regulierung der Entzündung durch wirtseigene Moleküle zerstören bzw. abbauen (MARSH ET AL., 2003). *Porphyromonas gingivalis* ist gut ausgestattet mit strukturellen und funktionellen Charakteristiken, die es *Porphyromonas gingivalis* ermöglichen, sowohl den gingivalen Sulcus als auch die parodontale Tasche zu besiedeln (TRAVIS ET AL., 1997). Des Weiteren kann *Porphyromonas gingivalis* dank seiner Fimbrien auf der Zahnoberfläche und Epithelzellen haften (MARSH ET AL., 2003). *Porphyromonas gingivalis* scheint aufgrund seiner leichten Anpassungsfähigkeit an sich verändernde Umstände der Mikroorganismus zu sein, der den größten Beitrag zu einer parodontalen Erkrankung, besonders der Zerstörung der weichen Gewebe, beisteuert (KESAVALU ET AL., 2003). Zusätzlich zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der Menge der assoziierten Bakterienzellen und lebenden und abgestorbenen Epithelzellen. Die rasche morphologische Wandelbarkeit von *Porphyromonas gingivalis* und der damit hohen Virulenz ist eng verbunden mit dem Absterben der Epithelzellen (DIERICKX ET AL., 2002).

1.4.3 *Prevotella intermedia* (Pi)

Prevotella intermedia ist ein gramnegatives, obligat anaerobes Stäbchen. Es bildet beim Wachstum auf Blutagar dunkle Kolonien, die aber im Gegensatz zu *Porphyromonas gingivalis* eher braun als schwarz sind (MARSH ET AL., 2003). *Prevotella intermedia* bildet Essigsäure, Bernsteinsäure und andere Säuren aus Glucose und besitzt eine hohe Peptidase-Aktivität. Es deutet sich an, dass *Prevotella intermedia* als wichtiger pathogener Mikroorganismus an der Entstehung von Parodontalerkrankungen (CONRADS ET AL., 1997), wie der Gingivitis (LIE ET AL., 2001),

der akuten, nekrotisierenden, ulzerierenden Gingivitis (ANUG), der Schwangerschaftsgingivitis und besonders der Erwachsenenparodontitis beteiligt ist. Mit Hilfe einer PCR wies die Gruppe um Riggio 1998 *Prevotella intermedia* in subgingivaler Plaque von Erwachsenen mit einer Parodontalerkrankung nach (RIGGIO ET AL., 1998). Bei parodontal gesunden Patienten ist *Prevotella intermedia* selten nachweisbar (MARSH ET AL., 2003), aber als opportunistischer Keim der Mundhöhle ist er auch in geringen Mengen in dieser Patientengruppe vorhanden. Allerdings variiert der Mengenanteil im Bereich der subgingivalen Plaque zwischen gesunden und erkrankten Parodontien erheblich (BECK 1997).

1.4.4 *Peptostreptococcus micros* (Pm)

Peptostreptococcus micros ist eine grampositive, anaerobe, asaccharolytische Kokke, die stark proteolytisch ist (MARSH ET AL., 2003) und bildet beim Wachstum auf Blutagar-Platten üblicherweise glatte Kolonien (VAN DALEN ET AL., 1998). *Peptostreptococcus micros* ist als ein Pathogen in der Ätiologie einer anaeroben Mischinfektion wie der Parodontitis anzusehen (VAN DALEN ET AL., 1998). In verschiedenen Studien wird sein Vorkommen mit einer aktiven fortschreitenden Parodontalerkrankung in Zusammenhang gebracht (KREMER ET AL., 2000). Eine Studiengruppe belegte, dass *Peptostreptococcus micros* eine höhere Prävalenz bei Patienten mit einer aktiven Parodontalerkrankung als bei Patienten mit einer inaktiven Parodontalerkrankung besitzt (RAMS ET AL., 1992). *Peptostreptococcus micros* findet man in Kombination mit anderen Organismen, d.h. in einer Mischkultur (MARSH 2003). Neben den Zahn bezogenen Fundorten, wie der parodontalen Tasche, dem Wurzelkanal oder bei Dentalabszessen, kann man ihn auch bei tief sitzenden Abszessen in anderen Körperregionen finden. Nach neuer Nomenklatur trägt er nun den Namen *Micromonas micros* (MARSH ET AL., 2003).

1.5 Bakterielle Infektionserreger und Allgemeine Erkrankungen

Parodontale Erkrankungen, hervorgerufen durch bakterielle Infektionserreger, stehen im Vordergrund vieler Untersuchungen. Ein besonderes Augenmerk der Untersuchungen gilt einem eventuellen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der parodontalpathogenen Bakterien und allgemeinen Erkrankungen.

Es gibt Hinweise, dass es eine Verbindung zwischen einer Parodontalerkrankung und dem allgemeinen Gesundheitszustand, besonders im Hinblick auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen (NONNENMACHER 2003), Diabetes mellitus (MARSH ET AL., 2003) und das Risiko für frühzeitige Wehen und die Geburt von Kindern mit niedrigem Geburtsgewicht (MITCHELL-LEWIS ET AL., 2001) geben könnte. So wurde schon im Jahr 2000 festgestellt, dass parodontale Infektionen einen starken Einfluss auf Diabetes mellitus, Schwangerschaft und kardiovaskuläre Erkrankungen haben (SUPPLEMENTJOURNAL PERIODONTAL 2000). Erklärend zu diesen Zusammenhängen gibt es eine Hypothese: Die Parodontalerkrankung ist eine Entzündungsreaktion des Wirts auf die Ansammlung der Plaque und über die große Oberfläche des Parodontiums kommen der Wirt und die Mikroorganismen miteinander in Kontakt. Durch die starke Durchblutung des Parodontiums ist es möglich, dass dieser Bereich als Quelle für die Entzündungsmediatoren gilt und es so zu einer Überschwemmung des Blutes mit Mikroorganismen kommt (Bakteriämie), die an anderer Stelle des Körpers Reaktionen hervorrufen können (MARSH ET AL., 2003).

1.5.1 Herzerkrankungen

Die Arteriosklerose ist eine sich chronisch entwickelnde Erkrankung mit einer Vielzahl von Risikofaktoren, von denen die meisten mit den Risikofaktoren der marginalen Parodontitis identisch sind (LÖSCHE ET AL., 2002). Da arteriosklerotische Veränderungen zu den häufigsten Todesursachen der westlichen Welt gehören und die parodontale Veränderung als Risikofaktor in der Diskussion steht (DORN ET AL., 1999), gibt es viele Studien zu diesem Thema.

Zwischen der Schwere der Parodontalerkrankungen und dem Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Schlaganfällen gibt es eine Korrelation (MARSH 2003). In der vorliegenden Studie wurden Patienten untersucht, die durch eine koronarangiographische Untersuchung als Patienten mit einem positiven Befund bzw. einem negativem Befund in Bezug zu einer koronaren Herzerkrankung unterschieden wurden. Mehrere Studien bestätigten das gemeinsame Vorkommen von Parodontitis und Myokard-Infarkten (MATTILA ET AL., 1989; DORN ET AL., 1999). Die Gruppe um Loos versuchte 2000 einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von systemischen Markern (CRP), einer Parodontiserkrankung und einer Herzerkrankung darzustellen (LOOS ET AL., 2000). Vorhergegangene Studien haben einen Zusammenhang zwischen verschiedenen parodontalen Entzündungsparametern und dem Vorkommen von koronaren Herzerkrankungen erkannt (LOPEZ ET AL., 2002) und festgestellt, dass auch ein Zusammenhang zwischen oraler Gesundheit und koronaren Herzerkrankungen besteht (BUHLIN ET AL., 2002). Die Erreger aus den parodontalen Taschen gelangen durch die tägliche Zahnpflege oder durch Taschensondierung bei Patienten mit einer parodontalen Erkrankung (Gingivitis bzw. Parodontitis) in den Blutkreislauf und können so zu einer Bakteriämie des Blutes führen (STELZEL ET AL., 2002). In einer Untersuchung wurde versucht mittels klinischer Ergebnisse (Taschentiefe, Bluten auf Sondierung, Attachmentverlust), die eine parodontale Erkrankung bestätigten, einen Beweis für den Zusammenhang zu erbringen (LOPEZ ET AL., 2002). In einer anderen Studie sind Patienten einer Befragung über ihre Mundgesundheit und einer Herzerkrankung unterzogen worden (BUHLIN ET AL., 2002). Bei allen dieser Studien wurden aber nie die pathogenen Erreger ermittelt. Mit endothelialen und glatten Muskelzellen aus menschlichen Koronararterien testete die Gruppe um Dorn mit Hilfe von Kulturen die Fähigkeit der parodontalpathogenen Mikroorganismen *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia*, die oben genannten Zellen zu infizieren (DORN ET AL., 1999). Mittels Kulturen und PCR mit Probenmaterial aus den subgingivalen Taschen koronar erkrankter Patienten bzw. gesunder Patienten zum Nachweis von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Porphyromonas gingivalis* beschäftigt sich eine weitere Studie (NONNENMACHER 2003). Mit Gewebsstücken aus der Aorta und einer anschließende PCR konnte bakterielle DNA in Aortenwänden nachgewiesen werden, die nach der klinischen Beurteilung nicht sklerotisch verändert waren (STELZEL ET AL., 2002). Bei allen Untersuchungen konnte kein signifikanter

Zusammenhang zwischen koronaren Herzerkrankungen und parodontalen Erkrankungen gefunden werden. Dennoch besteht weiterhin der Verdacht und es sind weitere Untersuchungen mit neueren und fortschrittlicheren Untersuchungsmethoden nötig, um die bisherigen Untersuchungsergebnisse zu untermauern.

1.5.2 Allgemeine Gesundheit

Es ist bekannt, dass eine parodontale Erkrankung bei einer Schwangeren gewisse Risiken mit sich bringt. Durch die hormonelle Umstellung kommt es gelegentlich zu der so genannten Schwangerschaftgingivitis, die aber nach der Niederkunft mit Umstellung zum normalen hormonellen Haushalt wieder abklingt. In einer sorgfältig kontrollierten Studie an 124 Müttern fand man heraus, dass schwere Parodontalerkrankungen das Risiko für die Frühgeburt von Kindern mit niedrigem Geburtsgewicht erhöhen (MARSH ET AL., 2003). Ein regelmäßiger Recall von Schwangeren senkt das Risiko eines niedrigen Geburtsgewichts und das Vorkommen parodontal pathogener Keime bei Müttern, deren Kinder zu früh und mit zu wenig Gewicht geboren worden, war erhöht (MITCHELL-LEWIS ET AL., 2001). In einer anderen Studie bestätigten sich die Ergebnisse aus amerikanischen und englischen Studien über den Zusammenhang einer tiefen generalisierten Parodontitis marginalis und Frühgeburtlichkeit, so dass dort eine Aufklärung der Schwangeren über die Zusammenhänge von Frühgeburten bei einer generalisierten Parodontitis gefordert wird (BERKENHAGEN-HAPKE 2002).

Diabetes mellitus gehört zu den systemischen Bedingungen, die ein relatives Risiko für eine Parodontalerkrankung beeinflussen. Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass nicht nur eine Parodontitis selbst eine Komplikation für Diabetes mellitus darstellt, sondern sie die Ausprägung der Diabetes mellitus verstärkt bzw. dessen Kontrolle erschwert (SCULEAN ET AL., 2002). Patienten mit Diabetes mellitus haben so einen eigenständigen Parodontitis-Risikofaktor und die Parodontitis gilt als diabetische Komplikation (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY 2000).

Schon 1947 wurde über den Zusammenhang zwischen nekrotisierenden Formen von Parodontalerkrankungen und Tabakkonsum (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY 2000) berichtet. Heutzutage ist es realistischer bei Rauchern von

einem 2,5 bis 6 fach höherem Risiko für Parodontalerkrankungen auszugehen als bei Nichtrauchern (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY 1999). Es bestätigt sich die Annahme, dass Raucher eine veränderte Wirtsantwort haben und die der neutrophilen Funktion im Besonderen. Rauchen beeinflusst die orale neutrophile Chemotaxis und Phagozytose. Zur Zeit wird Rauchen als Risikofaktor, um an einer destruktiven Parodontalerkrankung zu erkranken, angesehen (KREMER ET AL., 2000). Auch der Faktor Stress scheint einen Einfluss auf die Entwicklung parodontaler Erkrankungen zu haben. Noch sind aber die Vorgänge dazu weitgehend ungeklärt. Ebenso soll zwischen dem Alter der Patienten und dem Risiko, an einer Parodontalerkrankung zu erkranken, ein Zusammenhang bestehen (OGAWA ET AL., 2002).

1.6 Nachweismethoden zur Identifizierung pathogener

Mikroorganismen

Der Nachweis von vier pathogenen Mikroorganismen (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros*) stand im Mittelpunkt dieser Studie. Viele Nachweismethoden stehen heute der mikrobiologischen Diagnostik zur Verfügung. Nach wie vor gelten die Nachweise der Mikroorganismen über die Nachweismethoden der Kulturen als „goldener“ Standard (ZAMBON ET AL., 1996) in der Mikrobiologie und werden nach wie vor bei jeder alternativen Nachweismethode als Vergleich oder bei der Erprobung neuer Nachweistechiken (z.B. PCR) angewendet. Die Nachweismethode mit Hilfe der Mikroskopie und Dunkelfeldmikroskopie beschränkt sich auf den Nachweis morphologischer Merkmale. Zu den neueren Methoden gehören Nachweismethoden, die mikrobielle Antigene mit bekannten Antikörpern nachweisen (z.B. ELISA) oder über den Nachweis der mikrobiellen Nukleinsäuren (z.B. Sonden, PCR). Mit diesen Methoden glaubt man schneller und genauer die einzelnen Bakterienarten bestimmen zu können, doch auch hier gibt es die ein oder anderen Probleme (MARSH ET AL., 2003).

1.6.1 Kultureller Nachweis

Die Kochschen Postulate fordern für den exakten Beweis einer kausalen Verknüpfung zwischen Krankheit und Erreger eine Anzüchtung (HOF ET AL., 2002). Somit ist die Kultivierung das klassische Verfahren zum Erregernachweis speziell von Bakterien in der Anzüchtung *in vitro* auf festen oder in flüssigen Kulturenmedien, der Isolierung der gesuchten Erreger in Reinkultur und der folgenden Identifikation mit geeigneten Methoden (MIKITS ET AL., 1999). Üblicherweise nutzt man zur Anzucht von Bakterien ein Set von Anzuchtmedien (hier: Columbia Agar, Schädler Agar, Schädler KV Agar, Chocolate Agar und TSBV Agar), um ihren zum Wachstum nötigen Grundbedarf (z.B. Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Vitamine) zu decken und gleichzeitig mit Hilfe von Spezialnährböden (hier: Schädler KV Agar und TSBV Agar) einzelne Erreger im Wachstum zu unterdrücken bzw. zu fördern (HOF ET AL., 2002). Mit Hilfe dieser Selektivmedien kann die antibiotische Sensibilität und Resistenz der Mikroorganismen getestet werden (ZAMBON ET AL., 1996). Des Weiteren benötigen die Bakterien eine optimale Wachstumstemperatur (37°C), einen neutralen pH-Wert und den entsprechenden Sauerstoffgehalt, d.h. dass die aeroben Bakterien nur bei Anwesenheit von Sauerstoff wachsen, da sie ihn als essentiellen Protonenakzeptor verwenden, und dass anaerobe Bakterien unter Sauerstoffzugabe nicht wachsen können (HOF ET AL., 2002). Gerade die obligaten Anaerobier verlieren ihre Lebensfähigkeit bei zu langer Sauerstoffzufuhr (MARSH ET AL., 2003) und das muss besonders bei der Probenentnahme beachtet werden (MÜLLER 2001). Auf die besondere Aufmerksamkeit bei der Probenentnahme und die nachfolgende Sorgfalt in der Aufbewahrung und Verwendung des Probenmaterials wird hingewiesen (GÖBEL ET AL., 1992). Nur bei sorgfältiger Beachtung im Umgang mit dem Probenmaterial kann ein Erfolg in der Diagnose erfolgen (GÖBEL ET AL., 1992). Nach dem Anzüchten und der Isolierung gibt es weitere Möglichkeiten, die Mikroorganismen zu identifizieren (HAHN ET AL., 1999). Mit Hilfe der Gramfärbung (MARSH ET AL., 2003) und den Tests über den Nachweis der Indolproduktion und der Katalasefähigkeit, können dann gezieltere Tests (z.B. BBL Crystal) erfolgen, um das Bakterium einer genauen Art zuordnen zu können. Alles in allem sind bis zur eindeutigen Identifizierung eines Mikroorganismus langwierige Schritte notwendig,

die auch sehr kostenintensiv sein können. Erschwerend kommt hinzu, dass die orale Mikroflora aus vielen verschiedenen Mikroorganismen besteht, von denen viele in nur geringfügigen Mengen vorhanden sind (MARSH ET AL., 2003) und teilweise nicht kultivierbar sind (ZAMBON ET AL., 1996). Ein großer Vorteil der Kulturen ist allerdings die gleichzeitige Anzucht aller kultivierbaren Mikroorganismen einer Probe (ZAMBON ET AL., 1996).

1.6.2 Alternative Nachweismethoden

Es gibt viele Studien, die sich mit dem Nachweis von Mikroorganismen mittels alternativer Nachweismethoden beschäftigen. Mit der Dunkelfeld- und Phasenkontrastmikroskopie konnte die Form der Mikroorganismen (z.B. Kokken, Stäbchen) identifiziert werden (FLORES-DE-JACOBY ET AL., 1996). Allerdings ist die Mikroskopie nicht in der Lage, Artdifferenzierungen vorzunehmen, wie es beispielsweise mit der Weiterentwicklung der Anaerobierkulturtechniken möglich ist (Conrads 1994). Mit dem Nachweis von IgG-Antikörpern gegen *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und *P. intermedia* mittels ELISA (Enzyme Linked Immun Sorbet Assay) -Technik versuchte eine Studiengruppe einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von Antikörpern bei gesunden bzw. an Parodontitisformen erkrankten Patienten zu belegen (ZAFIROPOULUS ET AL., 1992). Sie konnten eine verstärkte Reaktion von IgG-Antikörpern auf gramnegative Bakterien nachweisen. Die ELISA-Technik wird zwar angewandt, ist aber sehr aufwendig. Für diese Art des indirekten Mikroorganismus-Nachweises wird Serum benötigt und dessen Verarbeitung ist sehr zeitaufwendig. Da die Verschiedenheit der Organismen auf Unterschieden der DNA- bzw. RNA-Sequenzen beruht, basiert der molekularbiologische Nachweis von Mikroorganismen auf der Kenntnis von erregerspezifischen Nukleotidsequenzen. Die DNA ist relativ unempfindlich gegen äußere Einflüsse und die Nachweismethoden sind unabhängig von der Vermehrungsfähigkeit des gesuchten Mikroorganismus (MIKITS ET AL., 1999). DNA-Sonden, PCR und Microarrays bzw. DNA-Chips werden heute in der Diagnostik eingesetzt. Mit DNA-Sonden werden durch spezielle mikrobiologische Verfahren bestimmte spezifische Nucleotidsequenzen in einer Bakterien-DNA nachgewiesen und es wird ein passendes radioaktiv markiertes (NONNENMACHER 2003) oder

passendes nicht radioaktiv markiertes (CONRADS ET AL., 1992) Gegenstück entworfen. Dafür ist eine Sammlung an Referenzstämmen der Parodontitis assoziierten Keime für eine verlässliche Diagnostik, d.h. für das Finden des passenden Gegenstücks nötig (MUTTERS 1990). Dieses Gegenstück lagert sich nach Aufspaltung der Doppelhelix an und der Erregernachweis erfolgt entweder über Messung der Radioaktivität oder über eine Enzymreaktion (NONNENMACHER ET AL., 2003). Im Vergleich von mikrobiologischer Kultivierung und einem kommerziellen auf Nukleinsäuren basierendem Test zum Nachweis von parodontalpathogenen Keimen (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia*) mit Hilfe von DNA-Sonden wird gefordert, dass die Methoden der Kultivierung als Goldstandard durch diese Methode ersetzt wird (EICK ET AL., 2002). Im Vergleich DNA-Sonde versus Kultur fand man heraus, dass bei der DNA-Sonde eine bessere Korrelation im Nachweis von *Porphyromonas gingivalis* besteht (TSAI ET AL., 2003). Mit Hilfe einer PCR (Polymerase chain reaction = Polymerase Kettenreaktion) ist durch die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten eine Identifizierung der Bakterien möglich (NONNENMACHER 2003). *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* und *Porphyromonas gingivalis* wurden mit Hilfe einer multiplex PCR nachgewiesen, die einen schnellen, einfachen und gleichzeitigen Nachweis aller drei Mikroorganismen ermöglichte (GARCIA ET AL., 1998). Im Vergleich von Kulturen und einer PCR wird es als sinnvoll erachtet, eine Kombination beider Nachweismethoden anzuwenden, um eine möglichst geringe unbekannte Komponente in den Untersuchungsergebnissen vorzufinden (PRATTEN ET AL., 2003). Abschließend lässt sich sagen, dass auch die mit DNA der Bakterien arbeitenden Methoden nicht zeitsparend sind, aber dank des „genetischen Fingerabdruckes“ jedes einzelnen Bakteriums ist es möglich, eine exakte und direkte Identifizierung zu erreichen.

1.6.3 DNA-Chip

Die nach einer PCR erfolgte Hybridisierung an mikroskopisch kleinen Punkten eines DNA-Chips ermöglicht eine zeitgleiche Analyse von zwanzig Mikroorganismen. Gemessen wird mit einem speziellen Lesegerät die Fluoreszenzaktivität der zuvor markierten Amplifikate, die sich an die DNA-spezifischen Punkte angelagert

(hybridisiert) haben. Dieses Verfahren beinhaltet die Vorteile der PCR und ermöglicht zusätzlich einen gleichzeitigen Nachweis von zwanzig verschiedenen Mikroorganismen.

1.7 Ziel der Untersuchung

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die vier Mikroorganismen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros* mit Hilfe von Kulturen und mit Hilfe eines Microarrays bzw. DNA- Chip aus den vorliegenden Proben zu identifizieren.

Der Vergleich der beiden Untersuchungsmethoden mit Hilfe der nachgewiesenen Mikroorganismen stand bei dieser Untersuchung im Vordergrund. Auf diesem Weg sollte herausgefunden werden, ob der Chip im Vergleich zur Kultur eindeutige Vorteile im Nachweis der Mikroorganismen aufweisen kann. Die Proben stammten von 112 Patienten, die in der Klinik für Innere Medizin-Kardiologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg behandelt worden sind. Als Randbetrachtung kam es zum Vergleich zwischen dem Vorkommen der oben genannten Mikroorganismen und dem Vorhandensein einer koronaren Herzerkrankung bzw. dem Fehlen einer koronaren Herzerkrankung sowie zur Gegenüberstellung vom Alter der Patienten bzw. dem Geschlecht der Patienten und dem Vorkommen der vier Mikroorganismen.

2 Material und Methode

2.1 Studiendesign

In dieser Studie sollten vier Mikroorganismen (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros*), die maßgeblich an der Entstehung einer Parodontalerkrankung beteiligt sind, über die Methoden der Kultur und über eine alternative Nachweismethode, einem Microarray, aus Patientenproben nachgewiesen werden.

2.2 Patientengruppe

An dieser Untersuchung nahmen insgesamt 112 Patienten teil, die in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Parodontologie des medizinischen Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Philipps-Universität Marburg, der Klinik für Innere Medizin-Kardiologie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg und des Instituts für Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg untersucht wurden.

Die Anzahl von 112 Patienten teilte sich in 2 Gruppen auf. Bei 83 der Patienten lag eine koronare Herzerkrankung vor (KHK+) und bei 29 Patienten lag keine Herzerkrankung vor (KHK-). Die Kontrollgruppe bestand aus Patienten, bei denen sich der Verdacht auf eine koronare Herzerkrankung nicht bestätigt hatte oder Patienten ohne Verdacht oder Hinweis auf eine koronare Herzerkrankung.

2.3 Ethische Grundlage

Die Patienten dieser Studie wurden ursprünglich für eine Querschnittsstudie über die parodontale Erkrankung als Risikofaktor der koronaren Herzerkrankung ausgewählt.

Diese Studie wurde der Ethikkommission des Fachbereiches Humanmedizin vorgelegt und befürwortet.

Die Patienten wurden über den Inhalt dieser ursprünglichen Studie informiert und gaben ihre schriftliche Einverständniserklärung, dass ihre Daten und die Ergebnisse der Untersuchung für weitere Untersuchungen zugänglich sein dürfen. Außerdem stand es jedem Patienten frei, jederzeit ohne Angaben von Gründen und ohne jegliche Konsequenz für seine weitere Behandlung aus der Studie auszusteigen.

2.4 Mikrobiologische Parameter

Die Isolierung und qualitative Bestimmung der Mikroorganismen, die sich in der Sulcusflüssigkeit fanden, wurde mit den Methoden der Kulturen und mit dem DNA-Chip durchgeführt. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros* wurden untersucht. Diese vier Mikroorganismen sind mitverantwortlich für die Entstehung und den Verlauf von Parodontalerkrankungen. Neben dem Nachweis der vier oben genannten Mikroorganismen wird auch noch kurz auf den mit dem Chip möglichen Nachweis von insgesamt 20 Mikroorganismen und deren Vorkommen in Bezug zu einer Herzerkrankung eingegangen.

2.5 Probenentnahme

Die Probenentnahme erfolgte, nachdem die Zahnoberfläche mit Wattekügelchen gereinigt wurde. Bei den Patienten wurde aus den vier tiefsten Zahnfleischtaschen Sulcusflüssigkeit mit Hilfe von sterilen Filterpapierspitzen (Antaeos, München) entnommen. Die Papierspitzen wurden zur Aufnahme der Sulcusflüssigkeit 20 Sekunden in der Tasche belassen. Sofort nach Entnahme der Proben wurden diese Papierspitzen in sterile Eppendorfröhrchen mit RTF-Medium (reduced transport fluid mit 25% Glucose) (SYED ET AL., 1972) gegeben. Die Röhrchen wurden dann an das Institut für Medizinische Mikrobiologie weitergegeben und bei -80°C bis zur mikrobiologischen Analyse tiefgefroren. Dieses speziell für den Transport von

Mikroorganismen entwickelte Medium enthält Reduktionsmittel zur Aufrechterhaltung eines niedrigen Redoxpotentials, so dass die Lebensfähigkeit der anspruchsvollen anaeroben und aeroben Mikroorganismen während der Aufbewahrung erhalten bleibt (MARSH ET AL., 2003). Außerdem ermöglicht das RTF Medium ein Einfrieren der Proben ohne Veränderung der Lebensfähigkeit der Mikroorganismen, was entscheidend ist für spätere Untersuchungen.

2.6 Mikrobiologische Verfahren

2.6.1 Kultur

2.6.1.1 Materialien

- Schädler Blutagar Platten werden für den Nachweis von Anaerobiern genutzt:

Aufschlussprodukt von dem Casein USP

aus dem Pankreas 10,0 g

Verdauungsförderndes Aufschlussprodukt

aus tierischem Gewebe 10,0 g

Hefeextrakt 2,0 g

Glukose 1,0 g

Sodium chlorid 5,0 g

Sodium bisulfit 0,1 g

Agar 15,0 g

Destilliertes Wasser 1,0 liter

ph Wert 7,0

- Schädler KV (Kanamycin-Vancomycin) Agar ist speziell für den Nachweis von obligat anaeroben gram-negativen Mikroorganismen entwickelt worden.

- Kocblut- oder Schokoladenagar wurde für die Kultivierung von aeroben/mikroaerophilen Mikroorganismen benutzt:

Aufschlussprodukt von dem Casein USP

aus dem Pankreas 7,5 g

Verdauungsförderndes Aufschlussprodukt

aus tierischem Gewebe 7,5 g

Stärke 1,0 g

Dipotassium phosphat 4,0 g

Monopotassium phosphat 1,0 g

Sodium chlorid 5,0 g

Agar 10,0 g

Destilliertes Wasser 1,0 liter

- TSBV (Trypticase-Bacitracin-Vancomycin) Agar ist für die spezielle Identifikation von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, der sich idealerweise sternförmig zeigt, entwickelt worden (SLOTS 1982):

Trypticase Soja Agar 40,0 g

Bacitracin 75 mg

Hefeextract 1,0 g

Glukose 2,0 g

Vancomycin 5 mg

Destilliertes Wasser 1,0 liter

- Columbia Agar wird für die Kultivierung von aeroben/mikroaerophilen und von anaeroben Mikroorganismen genutzt:

Spezialpepton 10,0 g

Biosat oder Biton 10,0 g

Myosatisches Aufschlussprodukt

aus Rinderherz 3,0 g

Stärke 1,0 g

Sodium chlorid 5,0 g

Agar	13,5 g
Destilliertes Water	1,0 liter
ph-Wert 7,3	

2.6.1.2 Identifikation der Mikroorganismen

Die Probenflüssigkeit mit den Papierspitzen wurde aufgetaut und auf dem Vortexer 20-30 Sekunden geschüttelt. Für die Analyse der Zahntaschenmaterialien bzw. die Identifikation der Mikroorganismen wurden jeweils 0,05 ml Medium auf Kulturen (Agarplatten) ausgestrichen; für die Analyse der Aerobier jeweils 0,05 ml auf Columbia Blutagar, Chocolate Agar und TSBV Selektivagar, für den Nachweis der Anaerobier jeweils 0,05 ml Medium auf Schädler Blutagar, Schädler KV Agar sowie Columbia Agar. Die Schädler Blutagar-, Schädler KV- und Columbia Agar-Platten wurden für 7 Tage bei 36°C bei anaeroben Bedingungen (BBL GasPack System von Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) inkubiert. Für die Analyse der mikroaerophilen Mikroorganismen wurden die Columbia Blutagar-, die Chocolate Agar- sowie die TSBV Agar-Platten für 3 Tage unter mikroaerophilen Bedingungen (BBL Campypack plus von Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) bei 36°C inkubiert worden. Nach 3 bzw. 7 Tagen wurden die Platten begutachtet. Um eine genaue Aussage über eine Bakterienkolonie treffen zu können, isolierte man eine oder mehrere Bakterien eines Typs und inkubierte sie erneut. Nach dem isolierten Wachstum der einzelnen Mikroorganismen identifizierte man jedes einzelne mit Hilfe von Nachweisen auf Ihre Zellmorphologie; dazu gehörten die Gram-Färbung, die Indol-Produktion sowie durch Auftropfen von H₂O₂ auf isolierte Bakterienstämme, was die Katalase Aktivität der einzelnen Bakterienarten darstellen sollte. Zusätzliche Nachweismethoden, die auf enzymatische Reaktionen zur Identifikation von *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros* beruhen, wurden zur genaueren Identifizierung hinzugezogen. In dieser Studie ist BBL Crystal ANR ID Kit (Becton Dickinson Microbiology Systemy, Conckeyville, Md) zur Anwendung gekommen. Unter dem Mikroskop findet man bei dem TSBV Agar sternförmige Kolonien, die man als *Actinobacillus actinomycetemcomitans* identifizieren kann; sie sind Katalase, Galactose, Maltose und Xylose positiv (MUTTERS 1999).

2.6.2 DNA-Chip (Microarray)

2.6.2.1 Konzept und Konfiguration des DNA-Chips

Greiner-Bio-One produziert mit dem ParoCheck I Chip den zur Zeit einzigen, kommerziell erhältlichen Bio Chip in der zahnmedizinischen Diagnostik. Dieser DNA-Chip ist der erste Chip, der für den semi-quantitativen Nachweis von Parodontitis assoziierten Keimen anwendbar ist. Der DNA-Chip erlaubt eine schnelle und zuverlässige Bestimmung von 10 bzw. 20 verschiedenen Keimen. In dieser Studie wurden Chips genutzt, welche 20 Keime analysieren können. Somit können bei allen Parodontopathien wie z.B. chronischer Erwachsenenparodontitis die verursachenden Mikroorganismen bestimmt werden. Der Nachweis der Mikroorganismen erfolgt mit Hilfe von molekularbiologischer Technik und basiert auf dem Nachweis des 16S rRna Gens, das für jedes Bakterium spezifisch ist. Nach der Probenentnahme bei dem Patienten extrahiert man die bakterielle DNA und führt eine Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) durch, bei der Teile des 16S rRna codierenden Gens in Gegenwart von fluoreszenzmarkierten Primern amplifiziert werden. Danach erfolgt die Hybridisierung der markierten Amplifikate an keimspezifischen DNA-Oligomeren aus dem Bereich des 16S rRna Gens, die auf dem DNA-Chip fixiert sind. Die Detektion gebundener DNA erfolgt mit Microarray Scannern. Der DNA-Chip ist ein beschichteter Glasobjektträger (25mmx75mm) mit insgesamt 96 DNA Messpunkten. Dieses Chip Design ermöglicht neben dem Nachweis der pathogenen Mikroorganismen auch eine Kontrolle über alle mikrobiologischen Arbeitsschritte (PCR, Hybridisierung) sowie eine Aussage über die Qualität des Chips (Spot-Homogenität, Printing). Eine Kombination von fünf internen Kontrollsystemen schließt falsch positive und falsch negative Ergebnisse aus.

2.6.2.2 Arbeiten mit dem DNA-Chip

Bei den Analysen mit Hilfe des DNA-Chips wurde zuerst die bakterielle DNA aus den in den Proben vorhandenen Mikroorganismen mit Hilfe des Sigma's GenElute Mammalian Genomic DNA Kit der Fa. Sigma (St. Louis, MS, USA) extrahiert. Dieser Kit ermöglicht einen einfachen und komfortablen Weg, die pure DNA aus einer großen Variation von Zellen und Geweben zu isolieren (SIGMA ALDRICH 2000). Der Ablauf der DNA-Isolation aus grampositiven und gramnegativen Bakterien verlief wie folgt: In 200 µl Zuchtmedium wurden zuerst mit 180 µl Lysis Solution B 6678 und 20 µl Proteinase K pipettiert. Die Lysis Solution soll das Auflösen von Gewebe z.B. der Bakterienzellwände ermöglichen und die Proteinase K „knackt“ die Basenverbindungen in der DNA. Nach kurzem Vortexen wurde diese Lösung für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Danach wurde 200 µl Lysis Solution B 8803, die ein chaotropisches Salz enthält, hinzugegeben. Dieses Salz ermöglicht die Denaturierung der Makromoleküle (SIGMA ALDRICH 2000). Die daraus entstandene Lösung wurde dann nach kurzem Vortexen für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Nachfolgend kamen 200 µl Ethanol absolut in das Probengefäß hinzu. Ethanol sorgt später bei den Zentrifugationen für ein Anhaften der DNA an der Silica Membran des Column Binding Tube (SIGMA ALDRICH 2000). Nach erneutem Vortexen wurde die Lösung in ein „binding column tube“ pipettiert und für 1 Minute bei 8.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Reinigungssäule musste dann in ein neues Gefäß überführt werden. Die nun folgenden Zentrifugationen mit Wash Solution haben die Aufgabe, die für die Analyse überflüssigen Lysis Solutions auszuspülen. Nach dem Zufügen von 500 µl Wash Solution wurde für 1 Minute bei 8.000 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem die Reinigungssäule in ein neues Gefäß überführt worden ist, kamen 500 µl Wash Solution hinzu und es folgte eine Zentrifugation für 3 Minuten bei 13.000 rpm und Raumtemperatur. Danach musste die Reinigungssäule in ein DNase freies Gefäß überführt werden, um alle Fremdstoffe, die zu einer Verunreinigung der Lösung und letztlich der DNA führen würden, zu entfernen. Nach Zugabe von 150 µl Elution Solution wurde ein letztes Mal für 1 Minute bei 8.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das die DNA enthaltene Eluat wurde in ein 1,5 ml Gefäß pipettiert (s. Tab. 1). Mit Hilfe von hoch konservierten Primern, die in dem mitgeliefertem speziellem Master Mix enthalten

waren, wurde die extrahierte bakterielle DNA bzw. das 16 S rRNA Gen aller vorhandenen Bakterien der Probe einer PCR unterzogen. Dabei kam es zur Amplifikation der Bakterien-DNA mit den fluoreszenz-markierten Primern. Das Design der PCR wurde so gewählt, dass einzelsträngige DNA-Fragmente entstehen, die dann mit Cy5 Fluorophor Molekülen markiert sind. Zuerst wurde für jede Reaktion 19,3 µl Master Mix mit 0,5 µl DNA-Template des DNA-Isolats (Eluat) jeder Probe und 0,2 µl Taq DNA-Polymerase gemischt (Gesamtvolumen 20 µl) (s. Tab. 2). Die PCR Gefäße wurden im Thermal Cycler (Heizrampe 1°C/Sek.) platziert und das Reaktionsvolumen auf 20 µl gesetzt. Dann erfolgte die PCR laut Protokoll (s. Tab. 3). Nach erfolgter PCR konnten die Amplifikate entweder sofort oder nach Lagerung im Dunkeln für einige Tage bei 4°C hybridisiert werden. Die Chips wurden für die Hybridisierung in gesättigter Luftfeuchte für mindestens 5 Minuten bei 60°C vorgewärmt. Die Chips mussten während der gesamten Hybridisierung bei 60°C erwärmt bleiben. 15 µl Hybridisierungspuffer und 5 µl Amplifikats wurden bei Raumtemperatur gemischt. Von dieser Mischung sind 15 µl auf den Chip an die so genannte Hybridisierungszone, an der sich die 96 DNA-Messpunkte befinden, transferiert worden. Die Zone wurde mit einem Deckglas überlagert und der Chip für 15 Minuten in gesättigter Luftfeuchte bei 60°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Waschung des Chips mit Hilfe der verdünnten Pufferlösungen I-III, die im Gesamtpaket des Chips mitgesendet wurden (s. Fig. 1). Dann ist der Chip bereit zum Einlesen bzw. zum Scannen der Hybridisierungszone. Nach Hybridisierung und Einlesung erfolgt die semi-automatische Analyse mit der mitgelieferten Software. Im Fall dieser Untersuchung wurden die Aufreinigung der DNA, die PCR und die Hybridisierung im Institut für Mikrobiologie durchgeführt und die hybridisierten DNA-Chips zur Auswertung nach Österreich zum Hersteller geschickt.

2.6.2.3 Auswertung des DNA-Chips

Die hybridisierten bzw. „beladenen“ Chips wurden zur Erzeugung eines Ergebnis-Reports gescannt und danach mit der GenePix Software aufgearbeitet. Bei diesem Verfahren sind die einzelnen Spots der Hybridisierungszone mit einem dazu passenden Raster eingelesen worden (s. Fig. 2). Das Computerprogramm GenePix erkannte anhand der Kontrollspots, ob die mikrobiologischen Arbeitsschritte

(Hybridisierung und PCR) korrekt durchgeführt worden sind (s. Fig. 3 und s. Fig. 4). Wenn nicht konnte keine Aussage über das Vorkommen der Mikroorganismen erfolgen und die gesamten Arbeitsschritte mussten wiederholt werden. Bestätigten die Kontrollspots allerdings die korrekte Arbeitsweise, konnte die Auswertung der markierten Amplifikate, die sich an die keimspezifischen DNA-Oligomere angelagert hatten, erfolgen. Dieses „Anheften“ und die damit positive bzw. negative Aussage über den Spot, zeigte die vorhandenen bzw. nicht vorhandenen Mikroorganismen in der Probe an und es könnten sogar zusätzlich noch semi-quantitative Aussagen erfolgen (s. Fig. 5).

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des SPSS (Statistical Package of Social Science) im Hochschulrechenzentrum der Philipps-Universität Marburg ermittelt. Von den 112 Patienten hatte man das Geburtsdatum, das Geschlecht der Patienten sowie eine Zugehörigkeit zur Gruppe der Patienten mit einem KHK positiven Befund bzw. zur Gruppe der Patienten mit einem KHK negativen Befund. Diese Daten wurden in einer Standardabweichung miteinander verglichen. Nach dem gleichen Verfahren wurden die Mikroorganismen mit ihrem Vorkommen in einer der Untersuchungsmethoden abgeglichen. Der Chi-Quadrat-Test nach Paerson wurde angewendet, um die Signifikanz im Vorkommen der vier untersuchten Mikroorganismen in der Gruppe der KHK+ - bzw. KHK- -Proben und deren Nachweis in den beiden Untersuchungsmethoden darzustellen. Mit Hilfe der Spearman-Rho nichtparametrischen Korrelation wurde versucht, zwischen den beiden Untersuchungsmethoden und den Ergebnissen eine Relation zu finden.

Im Falle der 20 Mikroorganismen wurde das Spearman-Rho Ranking zum Vergleich von Anzahl der Mikroorganismen zu KHK, Geschlecht und Alter angewendet, um eine eindeutige Signifikanz nachzuweisen.

3 Ergebnisse

3.1 Eigenschaften der Patientengruppe

An der Untersuchung nahmen 81 männliche und 31 weibliche Patienten teil, so dass sich eine Gesamtzahl von 112 Proben ergab. Von den 81 männlichen Patienten hatten 65 einen positiven KHK-Befund (KHK+) und 16 Patienten einen negativen KHK-Befund (KHK-). Bei den weiblichen Patienten lag die Verteilung bei 18 KHK positiv zu 13 KHK negativ (s. Abb. 1.1). Bezogen auf das Durchschnittsalter aller Patienten versus KHK positiv bzw. KHK negativ ergab sich bei den Patienten mit einem KHK positiven Befund ein durchschnittliches Alter von 63,85 Jahren und bei den Patienten, bei denen ein negativer KHK Befund vorlag, stellte sich ein Durchschnittsalter von 55,7 Jahren dar (s. Abb. 1.2). Das Alter der Patienten lag zwischen 32 und 81 Jahren. Bei den KHK+ Patienten lag der Altersdurchschnitt bei den Männern bei 63,5 Jahren und bei den Frauen bei 62,2 Jahren. In der KHK-Gruppe lag der Altersdurchschnitt bei den Männern bei 54,4 Jahren und bei den Frauen bei 57 Jahren (s. Abb. 1.3).

3.2 Mikrobiologische Ergebnisse

Zwei Methoden sind zum Nachweis der pathogenen Bakterien *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros* mit unseren Patientenproben angewendet worden. Zum einen kam als Standardtechnik zur Identifizierung von Bakterien, die Kultur, zum Einsatz. Des Weiteren wurden die Proben dem Nachweisverfahren eines DNA-Chips oder Microarray unterzogen, bei der es nach einer PCR zum Nachweis der Bakterien über die 16 S rRna kommt. In dieser Studie wird das Vorkommen von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und

Peptostreptococcus micros mit beiden Verfahren geprüft und die Verfahrensweisen beider Verfahren miteinander verglichen.

3.2.1 Kultur

Kulturen gelten nach wie vor als „goldener Standard“ in der Charakterisierung der Bakterien in der dentalen Plaque und gehören zur Routine an den mikrobiologischen Instituten (TSAI ET AL., 2003). Die Identifikation der pathogenen Bakterien mit Hilfe von Kulturen ist unumstritten und wird nach wie vor als Standard für die Entwicklung neuer Nachweismethoden bei den komplexen, parodontalen Erkrankungen genutzt. Mit Hilfe der Kulturen kann der am stärksten vorkommende Organismus erkannt werden. Des Weiteren ist es mit verschiedenen Zusammensetzungen des Agars möglich, Eigenschaften des Bakteriums zu ermitteln (z.B. antibiotische Anfälligkeit oder Resistenz). Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass auf diese Weise alle vier Mikroorganismen ermittelt werden konnten.

3.2.1.1 Ergebnisse bei Gesamtzahl der Proben mit Kulturen

Bezogen auf die Gesamtzahl von 112 untersuchten Proben ergeben sich folgende Ergebnisse:

Actinobacillus actinomycetemcomitans kam bei 9 Proben (8%) vor und bei 103 (92%) konnte er nicht nachgewiesen werden. *Porphyromonas gingivalis* ergab bei 9 (8%) Proben ein positives Ergebnis und bei 103 (92%) Proben war das Ergebnis negativ. *Prevotella intermedia* war bei 16 (14,3%) Proben positiv nachweisbar und bei 96 (85,7%) Proben nicht nachzuweisen. *Peptostreptococcus micros* fand sich bei 50 (44,6%) Proben, bei 62 (55,4%) Proben war er nicht vorhanden (s. Abb. 2.1).

3.2.2 DNA-Chip

Der in dieser Untersuchung angewendete DNA-Chip erbringt den qualitativen Nachweis der vier Mikroorganismen, ist aber darüber hinaus in der Lage, 20

verschiedene Mikroorganismen zu analysieren und eine semiquantitative Aussage zu treffen.

3.2.2.1 Ergebnisse bei Gesamtzahl der Proben mit dem DNA-Chip

Von 112 Proben war *Actinobacillus actinomycetemcomitans* bei 73 (65,2%) Proben nachzuweisen und bei 39 (34,8%) Proben konnte man ihn nicht nachweisen. *Porphyromonas gingivalis* fand sich in den Proben von 72 Patienten (64,3%) und in den Proben von 40 Patienten (35,7%) war er nicht auffindbar. *Prevotella intermedia* war nachweislich bei 22 (19,6%) Proben ein positiver und bei 90 (80,4%) Proben ein negativer Befund. Bei den Proben von 82 (73,2%) Patienten zeigte sich bei *Peptostreptococcus micros* ein positives Ergebnis und bei 30 Patienten Proben (26,8%) ein negatives Ergebnis (s. Abb. 2.2).

3.3 Vergleich der Ergebnisse von Kultur und DNA-Chip

3.3.1 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa)

In dem Nachweis der Mikroorganismen mit Hilfe der Kultur war *Actinobacillus actinomycetemcomitans* bei 9 Proben (8%) positiv nachzuweisen. Bei Nachweis von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* über den DNA-Chip kam er in 73 (65,2%) Proben vor. In 103 (92%) Fällen war *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in der Kultur ein negativer Befund; dies traf auch für 39 (34,8%) Proben, die mit Hilfe des Microarrays bearbeitet worden sind, zu (s. Abb. 2.3). Im Vergleich von Kultur und Chip zeigte sich, dass eine Übereinstimmung der Ergebnisse bei positiv *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in 4 Fällen und bei negativ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in 34 Fällen bestand. Keine Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen Kultur und Chip gab es bei 74 Proben (s. Abb. 2.4).

3.3.2 *Porphyromonas gingivalis* (Pg)

In den Untersuchungsergebnissen der Kultur waren 9 (8%) Proben und bei den Untersuchungsergebnissen mit dem Chip 72 (64,3%) Proben *Porphyromonas gingivalis* positiv. Bei 103 (92%) der Proben der Patienten war *Porphyromonas gingivalis* in den Ergebnissen der Kultur als negatives Ergebnis zu verzeichnen und bei 40 (35,7%) Patientenproben des Chips ebenso (s. Abb. 2.5). Übereinstimmung in einem positiven *Porphyromonas gingivalis* Befund gab es bei 8 Proben. Negative Übereinstimmung gab es sogar in 39 Fällen. Dem gegenüber stand eine Differenz der Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden in Höhe von 65 Proben (s. Abb. 2.6).

3.3.3 *Prevotella intermedia* (Pi)

Prevotella intermedia fand sich in 16 (14,3%) Patientenproben, die der Untersuchungsmethode der Kultur unterlagen. Bei 22 (19,6%) der Proben, die mit Hilfe des Microarray untersucht worden sind, war *Prevotella intermedia* zu finden. Nicht nachzuweisen war *Prevotella intermedia* in 96 (85,7%) Proben mit Methode der Kultur. *Prevotella intermedia* war auch nicht nachweisbar bei 90 (80,4%) Proben, die der Chip-Untersuchung unterzogen worden sind (s. Abb. 2.7). Übereinstimmende Ergebnisse gab es im positiven Nachweis von *Prevotella intermedia* bei 4 Proben. Im negativen Nachweis waren es sogar 78 Proben. Unterschiede zwischen den Untersuchungsergebnissen bestanden bei 30 Proben (s. Abb. 2.8).

3.3.4 *Peptostreptococcus micros* (Pm)

Im Nachweisverfahren über die Kultur sind 50 (44,6%) Proben *Peptostreptococcus micros* positiv getestet worden; beim Nachweisverfahren über den Chip waren 82 (73,2%) Proben positiv getestet. Dem gegenüber stand ein Fehlen von *Peptostreptococcus micros* in 62 (55,4%) Proben, die mit Hilfe der Kultur untersucht

worden sind, und das Fehlen von *Peptostreptococcus micros* in 30 (26,8%) Proben, die die Untersuchung mit dem Chip durchlaufen haben (s. Abb. 2.9). Der Vergleich beider Verfahren zeigte Übereinstimmung in einem positiven *Peptostreptococcus micros* Befund in 39 Proben und in einem negativen *Peptostreptococcus micros* Befund in 19 Proben. Differenzen gab es dagegen in den Befunden von 54 Proben (s. Abb. 2.10).

3.4 Vergleich der Ergebnisse in Bezug zu KHK positiv/ negativ,

Geschlecht und Alter

Als Betrachtung am Rande wurde in dieser Untersuchung über einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der pathogenen Bakterien und Herzerkrankungen nachgedacht. Außerdem sollte untersucht werden, ob ein Bezug zum Alter und zum Geschlecht der Patienten hergestellt werden konnte.

3.4.1 Herzerkrankungen

Bei allen 112 Patienten, von denen 83 einen positiven KHK-Befund und 29 einen negativen KHK-Befund vorwiesen, wurde das Vorkommen der pathogenen Bakterien in Bezug zu KHK positiv bzw. KHK negativ sowohl mit Hilfe Kultur als auch mit Hilfe des DNA-Chips getestet. Gezeigt werden sollte auch der Vergleich der beiden Nachweismethoden.

3.4.1.1 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* versus KHK

Bei den Patienten, bei denen ein positiver KHK-Befund vorlag, sind 8 (9,6%) Proben mit Hilfe der Kultur *Actinobacillus actinomycetemcomitans* positiv getestet worden. Mit Hilfe Chips sind es 56 (67,5%) Proben mit positivem *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Befund gewesen. Von insgesamt 29 KHK negativ getesteten Patienten war nur eine Probe (3,4%) in der Kultur *Actinobacillus*

actinomycescomitans positiv aufgefallen. Mit Hilfe des Chips konnte in dieser Patientengruppe ein *Actinobacillus actinomycescomitans* positives Ergebnis von 17 (58,6%) Proben erreicht werden (s. Abb. 2.11).

3.4.1.2 *Porphyromonas gingivalis* versus KHK

In der KHK positiv nachgewiesenen Patientengruppe ist *Porphyromonas gingivalis* im Nachweis über die Kultur in 6 (7,2%) Proben nachgewiesen worden. Die gleiche Gruppe über den Chip getestet, ergab ein Ergebnis von 58 (69,9%) positiven *Porphyromonas gingivalis* Proben.

Bei der Patientengruppe, die keine KHK Erkrankung vorwies, waren im Verfahren der Kultur 3 (10,3%) Proben und im Verfahren des Chips 14 (48,3%) Proben mit *Porphyromonas gingivalis* aufgefallen (s. Abb. 2.11).

3.4.1.3 *Prevotella intermedia* versus KHK

In der Untersuchungsgruppe der positiv KHK Patienten war im Nachweisverfahren der Kultur ein Ergebnis von 12 (14,5%) positiv *Prevotella intermedia* Proben und im Nachweisverfahren des Chips ein Ergebnis von 16 (19,3%) positiv *Prevotella intermedia* Proben ermittelt worden. Die Untersuchungsgruppe der negativ KHK Patienten hatten einen *Prevotella intermedia* positiv Befund in der Untersuchung mit Hilfe der Kultur von 4 (13,8%) Proben und mit Hilfe des Chips von 6 (20,7%) Proben (s. Abb. 2.11).

3.4.1.4 *Peptostreptococcus micros* versus KHK

Bei der Anzahl von 83 KHK positiven Patientenproben zeigten 41 (49,9%) einen *Peptostreptococcus micros* positiven bei der Kulturmethode auf. Die gleiche Gruppe zeigte über die Methode des Chips 61 (73,3%) *Peptostreptococcus micros* positive Proben auf. Bei den 29 KHK negativen Patientenproben sind über das Verfahren der

Kultur 9 (31%) und im Verfahren des Chips 21 (72,4%) als positiver *Peptostreptococcus micros* Befund zu finden gewesen (s. Abb. 2.11).

3.4.1.5 Vergleich Vorkommen pathogene Mikroorganismen versus KHK

Bei allen Untersuchungsmethoden kam es nur bei der Untersuchung KHK versus Chip bei dem Mikroorganismus *Porphyromonas gingivalis* und bei KHK versus Kultur bei dem Mikroorganismus *Peptostreptococcus micros* zu einem signifikanten Unterschied zwischen KHK positiv und KHK negativ. Weiterhin ließ sich ein signifikanter Nachweis über den eventuellen Zusammenhang von koronaren Herzerkrankungen und dem Vorkommen parodontalpathogener Mikroorganismen nicht erbringen.

3.4.2 Alter der Patienten versus Bakterienvorkommen

Das Alter der Patienten in dieser Untersuchung lag zwischen 32 und 81 Jahren, der Altersdurchschnitt der gesamten Patienten von 60,8 Jahren. Sowohl bei den KHK positiven Patienten als auch bei den KHK negativen Patienten konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Alter und Bakterienvorkommen ermittelt werden.

3.4.3 Geschlecht versus Bakterienvorkommen

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Mikroorganismen und dem Geschlecht der untersuchten Patienten gefunden werden.

3.5 Untersuchung zum Nachweis von Mikroorganismen mit Hilfe des Microarray

Der DNA-Chip bot die Möglichkeit, 20 verschiedene Mikroorganismen nachweisen zu können. In dieser Untersuchung sollte nur kurz darauf eingegangen werden, ob es einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Vorkommen von Mikroorganismen und dem Vorkommen einer Herzerkrankung gibt. Außerdem wurde untersucht, ob zwischen dem vermehrten Vorkommen von Mikroorganismen und dem Alter bzw. dem Geschlecht der Patienten ein Zusammenhang bestand. Bei der Gesamtzahl von 112 Patientenproben waren 2 Proben ohne Nachweis von Mikroorganismen. Bei 19 Proben ließen sich 1 bis 5 Mikroorganismen nachweisen. 6 bis 10 Mikroorganismen fanden sich in 17 Proben. Die meisten Proben in der Untersuchung (53) ergaben einen Nachweis von 11 bis 15 Mikroorganismen. In 21 Proben fanden sich 16 bis 20 Mikroorganismen (s. Abb. 2.12).

3.5.1 Vorkommen Mikroorganismen versus KHK positiv bzw. negativ

Bezogen auf die Patientengruppe mit insgesamt 112 Proben fanden sich 83 Proben mit einer nachgewiesenen Herzerkrankung (KHK+) und bei 29 Proben war nachweislich keine Herzerkrankung vorhanden (KHK-). Bezogen auf die Gesamtzahl von 20 Mikroorganismen bestand somit kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Proben, die einen KHK positiven Befund und den Proben, die einen KHK negativen Befund aufwiesen und dem Vorkommen von Mikroorganismen. Darüber hinaus war die Menge der vorkommenden Mikroorganismen nicht in Bezug zu den KHK positiv und den KHK negativ Proben zu bringen.

3.5.2 Vorkommen Mikroorganismen versus Alter der Patienten

Das Alter der Patienten stand in keinem signifikanten Zusammenhang mit dem Vorkommen der Mikroorganismen. Es konnte keine Aussage darüber erfolgen, dass Patienten mit höherem Alter mehr Mikroorganismen aufweisen.

3.5.3 Vorkommen Mikroorganismen versus Geschlecht der Patienten

Es konnte anhand dieser Untersuchung keine signifikante Aussage getroffen werden, die eine geschlechterspezifische Erkrankung mit den untersuchten Mikroorganismen bestätigte.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methode

Die Patienten, die an dieser Studie teilnahmen, waren in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Parodontologie des medizinischen Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, der Klinik für Innere Medizin-Kardiologie des Klinikums der Philipps-Universität und dem Institut für Mikrobiologie der Philipps-Universität ausgewählt worden. Es handelte sich um eine Fall-Kontrollstudie, an der insgesamt 112 Patienten teilnahmen. Bei 83 Patienten lag eine koronarangiographisch gesicherte Herzerkrankung vor, bei 29 Patienten lag keine Herzerkrankung vor. Diese so genannte Kontrollgruppe bestand aus Patienten, bei denen sich keine koronare Herzerkrankung nachweisen ließ oder aus Patienten, bei denen kein Hinweis oder Verdacht auf eine koronare Herzerkrankung bestand.

Die Studie war als Blindstudie ausgerichtet, so dass bei den Untersuchungen nicht bekannt war, ob es sich um einen Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung oder um einen Patienten ohne eine nachgewiesene Herzerkrankung handelte.

4.2 Mikrobiologische Techniken

Schon 1965 zeigte eine Untersuchung bei Männern, die an einer Gingivitis erkrankt waren, dass die Hauptursache für parodontale Erkrankungen im Zusammenhang mit dem Vorkommen von Bakterien in der Zahnplaque steht (LOE ET AL., 1965). Ein Hauptaugenmerk ging besonders auf das Vorkommen der pathogenen Mikroorganismen *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans* und den verschiedenen parodontalen Erkrankungen (SLOTS ET AL., 1988). Allerdings wird hervorgehoben, dass eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Wirt und der Mikroflora innerhalb einer Zahnfleischtasche erst zu einer Erkrankung in welchem Ausmaß auch immer führe (LISTGARTEN 1988),

denn die parodontale Plaque gilt als komplexes, bakterielles Ökosystem, das eine angeborene Art und Weise in Bezug zur Kolonisation, Selektion und Reife innehat (OFFENBACHER ET AL., 1988). Nach dem nun mehr eindeutigen Beweis, dass pathogene Mikroorganismen wie z.B. *Porphyromonas gingivalis* oder *Actinobacillus actinomycescomitans*, die als besonders aggressiv hervorzuheben sind (SLOTS ET AL., 1999), verantwortlich sind für aggressive Parodontalerkrankungen, beschäftigen sich einige Studien zum einen mit dem Vorkommen der verschiedenen pathogenen Mikroorganismen und zweitens mit ihrer Bekämpfung mit Hilfe von mechanischen und/oder medikamentösen Hilfsmitteln. Untersuchungen, bei denen die Verbesserung der Mundpflege und das Vorkommen der Mikroorganismen untersucht wurden, waren die ersten Schritte in dieser Richtung. Mit verbesserter Mundpflege alleine seien mäßige klinische Verbesserungen erreicht worden, den subgingivalen Mikroorganismen sei auf diese Weise aber nicht nachzukommen (LOOS ET AL., 1988). Viel Wert wird bei allen Studien auf einen vollständigen klinischen und mikrobiologischen Befund gelegt, denn nur so ist eine sinnvolle Therapie einer Parodontalerkrankung und den daraus folgenden Schritten einer Regeneration des Knochengewebes z.B. mit Gore-Tex Membranen möglich (MACHTEI ET AL., 1994). Andere Studien haben zum Ziel herauszufinden, ob es neben der Erkrankung des Zahnbettes noch weitere Erkrankungen gibt, die einer Parodontitis ausgelöst durch pathogene Mikroorganismen folgen bzw. mit ihr einhergehen und ob diese Pathogene in anderen Bereichen nachweisbar sind. Ein Zusammenhang wird zwischen dem Vorkommen von parodontalpathogenen Bakterien bzw. an Parodontitis erkrankten Patienten und einer Herzerkrankung vermutet (NONNENMACHER 2003). Schon 1999 zeigte die Gruppe um Progulske-Fox, dass z.B. *Porphyromonas gingivalis* in der Lage ist, die endothelialen Zellen der Koronararterien zu durchdringen (PROGULSKE-FOX ET AL., 1999). Auch wurde Zellmaterial aus der Aorta mit Hilfe einer PCR untersucht, ob *Porphyromonas gingivalis* in der Aortenwand nachzuweisen ist (STELZEL ET AL., 2002). In der vorliegenden Arbeit handelte es sich um 112 Proben von Patienten, bei denen eine gesicherte Herzerkrankung vorlag oder ausgeschlossen werden konnte. Bei diesen Patienten wurde Sulcusflüssigkeit zur Analyse und eventuellem Nachweis von Mikroorganismen mit Schwerpunkt auf *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros* entnommen. Auch allgemeine Erkrankungen wie z.B. der Diabetes Typ 1 und auch

die Lebensumstände der Patienten (Rauchen, schlechte Zahnpflege) gelten als Risikofaktoren für eine Parodontalerkrankung (PIHLSTROM 2001). In der Studie von Philstrom sind als hervorzuhebende Risikofaktoren für eine Parodontalerkrankung Rauchen, Diabetes und das Vorkommen von *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia* angegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurde nicht untersucht, ob die Probanden Raucher oder Nichtraucher waren. Durch Rauchen wird die mikrobiologische Flora beeinflusst und es benötigt weitere Studien, um einen signifikanten Zusammenhang zu den parodontalen Erkrankungen herzustellen (RIVERA-HIDALGO 2003).

Mit dem Nachweis der Mikroorganismen beschäftigt sich eine weitere Gruppe von Studien. Sinnvolle mikrobiologische Diagnostik muss folgenden Anforderungen gerecht werden. Die Testergebnisse müssen reproduzierbar sein, die Genauigkeit und Präzision des Testverfahrens müssen bekannt sein und die Empfindlichkeit und Spezifität des Testverfahrens sollte zuverlässig im Vergleich zu einem Referenz-Test sein (CHEN ET AL., 1999). Das klassische Nachweisverfahren, der Nachweis von Mikroorganismen über ein Kulturmedium, wurde in letzter Zeit zunehmend durch die Nachweismethoden, die auf dem Nachweis der jeweiligen Bakterien-DNA basieren, in den Hintergrund gedrängt. Dennoch gelten die Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen nach wie vor als Standard und wurden schließlich mit Erfolg angewendet (SLOTS 1976; SLOTS 1977). Die Kulturen haben Vorteile gegenüber den Methoden, bei denen die extrahierte Bakterien-DNA den Nachweis erbringt. Besonders hervorzuheben ist die Anwendung von Antibiotika in den Agarplatten. Dadurch kann direkt eine vorhandene Resistenz ermittelt werden (MASHIMO ET AL., 1983). Außerdem können die vorherrschenden Mikroorganismen einer Patientenprobe über eine Kultur sehr gut gefunden und isoliert werden (ZEE ET AL., 1996). Zusätzlich kann festgestellt werden, ob gewisse Mikroorganismen zusammen bestehen können oder sogar Gruppen bilden (SOCRANSKY ET AL., 1988). In unterschiedlichen Studien wurde im Vergleich PCR gegenüber der Kulturen immer die PCR als die bevorzugte Methode hervorgehoben. Dem liegt zugrunde, dass die PCR für genauer und durch ihre Technik als sensibler bewertet wird (RIGGIO ET AL., 1996). Dies fällt im Nachweis des pathogenen Mikroorganismus *Prevotella intermedia* auf. *Prevotella intermedia* spielt eine wesentliche Rolle bei den parodontalen Erkrankungen, aber *Prevotella nigrescens*, welcher *Prevotella intermedia* nah verwandt ist und von ihm phänotypisch nicht zu unterscheiden ist, ist

ein natürlicher Mikroorganismus in einem gesunden Zahnsulcus, wo eine Symbiose zwischen den Mikroorganismen und den körpereigenen Zellen besteht. Eine Unterscheidung beider Mikroorganismen ist also wichtig und nur über eine PCR möglich (CONRADTS ET AL., 1997). Die PCR gilt als „Mittel der Wahl“, wenn man eine exakte, schnelle Nachweismethode benötigt wird. Dank bereits vorhandener Primer der nachzuweisenden Mikroorganismen bekommt man dann eine genaue Zusammensetzung der Mikroflora und kann die entsprechende Therapie einleiten oder Vergleiche über z.B. Untersuchungsarten treffen (APATZIDOU ET AL., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde noch einen Schritt weiter gegangen. Der Nachweis der pathogenen Mikroorganismen erfolgte hier nicht nur mit Hilfe von Kulturen, sondern auch mit Hilfe eines Microarrays. Nach durchgeführter und überprüfter erfolgreicher PCR wurde die extrahierte Bakterien-DNA auf einen DNA-Chip aufgelagert (hybridisiert), der mit Hilfe eines speziell konzipierten Computerprogrammes ausgewertet wurde. Das Vorkommen der Pathogene konnte so direkt in einem Diagramm abgelesen werden. Des Weiteren bot dieser Microarray die Möglichkeit, 20 verschiedene Mikroorganismen gleichzeitig zu identifizieren, was nicht nur Zeit sparend, sondern auch sehr wirtschaftlich ist. Von den 20 nachweisbaren Mikroorganismen sind 15 direkt oder indirekt relevant für das pathologische Geschehen einer Parodontalerkrankung und bei den anderen 5 ist ein Zusammenwirken mit den anderen Mikroorganismen denkbar. Bei diesem Verfahren des Chips entfällt ein Anzüchten, ein Isolieren und ein zeitaufwendiges Überprüfen der Mikroorganismen, da man durch Einlesen des Chips direkt den Nachweis, wenn erwünscht, auch den semiquantitativen Nachweis der einzelnen Mikroorganismen erhält.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte ein Vergleich von zwei unterschiedlichen Nachweismethoden erfolgen, die in ihrer Art und Weise völlig verschieden sind. Beide haben dem Nachweis von pathogenen Mikroorganismen gedient. Des Weiteren sollte auch darauf eingegangen werden, ob sich ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Komponenten, die diese Patientengruppe bot, darstellt. Die

diagnostischen Merkmale einer Parodontalerkrankung weisen direkt auf die verschiedenen charakteristischen Merkmale dieser Krankheit hin. Dazu gehören die gingivale Entzündung, die Zerstörung der verbindenden Gewebe und des zervikalen Sulcus Fluids und dessen Zusammensetzung, sowie die Antwort des Wirts und die mikrobiologische Plaque. Seit langem gilt es als akzeptiert, dass die Plaque und die darin enthaltenen Mikroorganismen die Auslöser der Parodontalerkrankungen sind (POLSON ET AL., 1985). Eine andere Studie beschäftigt sich mit dem Thema, ob es einen Zusammenhang zwischen den mit *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infizierten Bakteriophagen und der raschen Destruktion von parodontalem Gewebe gibt (PREUS ET AL., 1987). Die Untersuchung zeigte, dass durch Neuinfektion einer gesunden Zahn- bzw. Wurzeloberfläche mit nichtaktivem *Actinobacillus actinomycetemcomitans* durch Hinzufügen einer mit *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infizierten Bakteriophage es zu einer „Aktivierung“ des nichtaktiven *Actinobacillus actinomycetemcomitans* kommt.

In dieser Untersuchung wurden die 112 Patientenproben mit den kulturellen Untersuchungsmethoden und mit der des Microarrays bzw. Chip untersucht. Mit Hilfe des Chips konnten in mehr Patientenproben die vier pathogenen Mikroorganismen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros* nachgewiesen werden. Die vorliegende Untersuchung ist eine der ersten, die diesen Chip vergleichend mit Kulturen angewendet hat. Es sind keine Vergleichsstudien vorhanden.

Bezug nehmend auf diese Ergebnisse kann die Aussage getroffen werden, dass im kulturellem Nachweis mehr Fehlerquellen stecken könnten. Dies betrifft besonders den Nachweis von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, da dieser nur in seiner sternförmigen Ausbildungsform per Mikroskop gesucht wurde und so selten zu finden war. Eine Fehlerquelle dieser Untersuchung könnte also im Fall von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* darin liegen, dass hier nur die Routine-Labor Diagnostik bei *Actinobacillus actinomycetemcomitans* angewendet wurde. Für *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia*, die anaerob wachsen, galt es, sie möglichst sauerstoffarm zu kultivieren. Dies könnte sich als eine weitere Fehlerquelle erweisen. Die geringste Differenz zwischen den Ergebnissen zeigt sich bei *Peptostreptococcus micros*. Bei dem Nachweis über den Chip erfolgte nicht nur ein Nachweis über die Mikroorganismen, sondern gleichzeitig auch eine PCR-Kontrolle. Zusätzlich wurde

mit einem Photometer das Vorhandensein und die Menge der extrahierten Bakterien-DNA bestimmt.

Zusätzlich sollte auch ein eventueller Zusammenhang zwischen Herz- und Parodontalerkrankungen überprüft werden. In einer Untersuchung von 2001 wurde festgestellt, dass es einen Zusammenhang zwischen Parodontitis und der Dicke der Arteria carotis gibt. Dabei können die Stoffwechselprodukte der parodontalpathogenen Bakterien die Ausbildung von arterieller Plaque auslösen (BECK 1997). Des Weiteren sind Antikörper gegen die parodontalen Leitkeime im Blut nachweisbar (HETZ 2004). So soll eine enge Zusammenarbeit zwischen Allgemeinärzten und Zahnärzten stattfinden und die Wichtigkeit der Zahnheilkunde in diesem Fall der parodontalen Zahnheilkunde hervorgehoben werden (HETZ 2004).

Es fanden sich in den Patientenproben teilweise diese Leitkeime, aber es ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zu Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung bzw. zu Patienten ohne eine koronare Herzerkrankung feststellen.

Das Alter und das Geschlecht der Patienten sollte ebenfalls in dieser Untersuchung Beachtung finden. In dieser Arbeit lag der Altersdurchschnitt in der Gruppe der KHK positiven Patienten bei den Männern bei 63,5 Jahren und bei den Frauen bei 62,2 Jahren. In der Gruppe der Patienten, die eine negativ KHK aufwiesen, lag der Altersdurchschnitt bei den Männern bei 54,4 Jahren und bei den Frauen bei 57 Jahren. Es wurde schon nachgewiesen, dass ältere Patienten mehr gingivale Rezessionen aufwiesen und mehr Zahnplaque hatten (HOLM-PEDERSEN ET AL., 1975 ; HOLM-PEDERSEN ET AL., 1980). Allerdings ist sowohl die Menge der Plaqueanlagerung als auch die Entstehung einer parodontalen Entzündung nicht altersabhängig (WINKEL ET AL., 1987). Dies zeigte sich auch in dieser Arbeit. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Alter und erhöhtem Vorkommen von Mikroorganismen festgestellt werden.

Epidemiologische Untersuchungen zeigten übereinstimmend, dass parodontale Erkrankungen und parodontaler Gewebeverlust bei Männern häufiger vorkommen als bei Frauen (ALBANDAR 2002). Da sich die meisten Untersuchungen zur Frage Geschlecht und Parodontalerkrankungen nur auf die klinischen Ergebnisse beziehen, lässt sich schwerlich eine Aussage über das Vorkommen von parodontalpathogenen Leitkeimen treffen. Im Fall dieser Untersuchung kann kein signifikanter Unterschied zwischen Männern und Frauen und dem Vorkommen von *Actinobacillus*

actinomycetemcomitans, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros* festgestellt werden.

Mit dem Chip ist der Nachweis von 20 Mikroorganismen möglich. Bezug nehmend auf das Vorkommen der Mikroorganismen zeigte sich, dass der Schwerpunkt im Bereich von 11 bis 15 vorhanden Mikroorganismen lag. Bei 53 Patienten lag eine solch hohe Bakterienanzahl vor. In 21 Proben fanden sich 16 bis 20 Mikroorganismen. Da in der Studie weder ein Zusammenhang zu KHK positiv oder negativ bzw. zum Geschlecht oder Alter der Patienten getroffen wurde, kann man dazu keine Aussagen treffen.

Die Gesamtzahl der nachgewiesenen Mikroorganismen war in dieser Patientengruppe hoch.

5 Schlussfolgerung

Diese Studie wurde durchgeführt, um einen Vergleich der Nachweismethoden bei den vier parodontalpathogenen Mikroorganismen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros* mit Hilfe von Kulturen und mit Hilfe eines Microarrays zu untersuchen. Außerdem galt es herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der vier pathogenen Mikroorganismen und einer koronaren Herzerkrankung gibt. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob es eine Korrelation zwischen dem Vorkommen der vier Mikroorganismen und dem Alter bzw. dem Geschlecht der Patienten gibt.

Es zeigte sich, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der vier Mikroorganismen und einer koronaren Herzerkrankung gab. Es gab auch keine Signifikanz im Vergleich Mikroorganismen und Alter der Patienten bzw. dem Geschlecht der Patienten. Allerdings ließen sich Unterschiede in den Ergebnissen der verschiedenen Untersuchungsmethoden nachweisen.

Mit der Untersuchungsmethode über den Chip konnten in einer höheren Anzahl von Proben die vier Mikroorganismen positiv nachgewiesen werden als mit Hilfe der Kultur.

Der Nachweis über den geprüften Chip scheint nach den hier vorliegenden Ergebnissen sicherer zu sein. Unzulänglichkeiten in der kulturellen Nachweismethode können bei dieser Technik nicht auftreten. Da zudem eine semiquantitative Bestimmung erreicht wird und damit ein pathogenes Potential nachweisbar wäre, bietet der Chip möglicherweise eine Alternative, wenigstens aber eine wertvolle Ergänzung in der Diagnostik.

6 Zusammenfassung

In die vorliegende Studie wurden 112 Patienten einbezogen. Bei 83 von diesen lag eine koronare Herzerkrankung (KHK+) und bei 29 Patienten keine koronare Herzerkrankung (KHK-) vor. Den Patienten wurde Sulkusflüssigkeit mit Hilfe von Papierspitzen entnommen, die im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene mit Hilfe von Nachweismethoden auf die Mikroorganismen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Peptostreptococcus micros* untersucht wurden. Diese vier Mikroorganismen gelten als ursächliche Erreger für parodontale Erkrankungen. Bei den beiden Nachweismethoden handelt es sich zum einen um das Kulturverfahren und zum anderen um den Nachweis über einen DNA-Chip bzw. Microarray. Bei diesem Verfahren erfolgt die Hybridisierung der aus den Mikroorganismen extrahierten DNA an mikroskopisch kleinen Punkten, den Hybridisierungszonen, auf einem Objektträger, dem Chip. Es ließ sich nachweisen, dass mit Hilfe des Chips in den Patientenproben eine höhere Anzahl von Mikroorganismen nachgewiesen werden konnte, als über die Kulturen. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von Mikroorganismen in Bezug zu einer vorhandenen bzw. auszuschließenden Herzerkrankung konnte nicht erbracht werden. Auch ist kein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen der Mikroorganismen und dem Alter bzw. dem Geschlecht der Patienten zu sehen. Der Microarray bietet die Möglichkeit 20 verschiedene Mikroorganismen semiquantitativ nachzuweisen. Die Mehrzahl der Proben (53) wies 11 bis 15 Mikroorganismen auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mehr Untersuchungen nötig sind, um den wirklichen Vorteil der Nachweismethode mit Hilfe des Microarrays im Vergleich zu den Nachweismethoden mit Kulturen zu bestätigen. Der Nachweis über den hier angewendeten Chip scheint sicherer im Vergleich zu den kulturellen Nachweismethoden zu sein, da weniger Fehlerquellen existieren. Zusätzlich gibt es eventuell durch eine semiquantitative Bestimmung der Mikroorganismen die Möglichkeit, eine verlässlichere Aussage zum eigentlichen Krankheitsgeschehen zu treffen und daraus abgeleitet, eine adäquate Therapie durchzuführen.

Es sind weitere Untersuchungen nötig, um den Microarray oder Chip in seiner Qualität zu bestätigen. Des Weiteren muss die Frage geklärt werden, ob der Chip wirtschaftlicher ist als die Methoden der Kultur. Der Chip könnte eine Alternative zur Kultur darstellen, sie aber wenigstens in der Diagnostik unterstützen bzw. ergänzen.

7 Summary

In this study 112 patients, 83 with a coronary heart disease (CHD +) and 29 without a coronary heart disease (CHD -), were investigated. Sulcus fluid was taken from all patients with sterile paper points. These subgingival microbial samples were analyzed in the Institute of Medical Microbiology and Hygiene to prove the occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Peptostreptococcus micros*. These four microorganisms are responsible for parodontal diseases. The microorganisms were proven with two techniques, microbiological culture and a new DNA-Chip. The microorganisms were hybridised at microscopic small points, the zone of hybridisation, on the slide, named chip. As a result, a higher number of microorganisms could be shown with the chip. A significant correlation between coronary heart disease and the presence of the microorganisms could not be shown. Between the occurrence of the microorganisms and the age or the sex of the patients no correlation has been found.

The DNA chip exhibits the possibility to analyze 20 different microorganisms at once; it was here just a marginal release, but the most probes have shown 11 to 15 microorganisms. The results of this study show the necessity of further examinations to consider the advantages of the chip. The chip seems to be safer in pointing out the microorganisms than the cultures because of less sources of error. It is also possible to find a reliable conclusion to the real contract of the disease with a semiquantitative determination. The results show, that more examinations are necessary to validate the chips quality. It is also important to proof the chips efficiency. The chip could be an alternative method, at least it could be a support or supplement for the clinical diagnostics.

8 Abbildungen, Tabellen und Figuren

A) Abbildungen

1. Eigenschaften der Patientengruppe

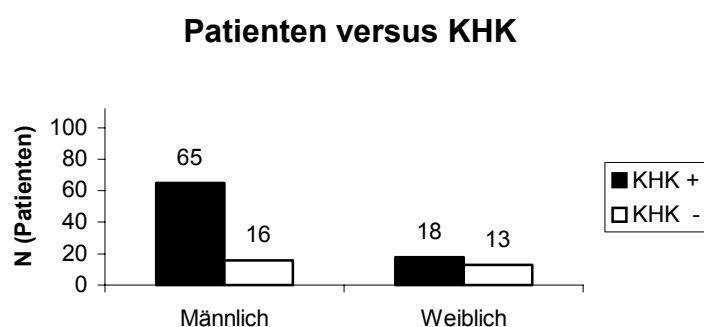


Abb. 1.1

Verteilung der 112 Patienten in Bezug zu koronaren Herzerkrankungen

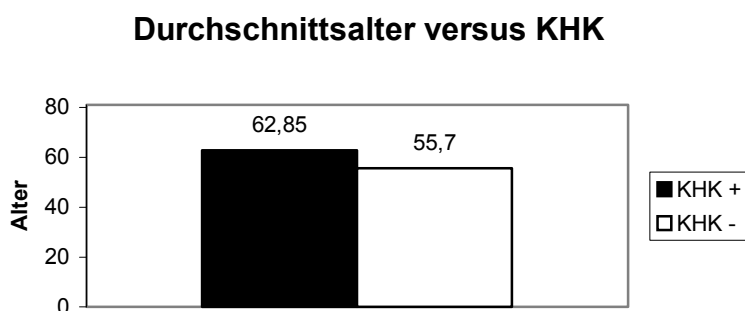


Abb. 1.2

Durchschnittsalter aller Patienten bezogen auf KHK

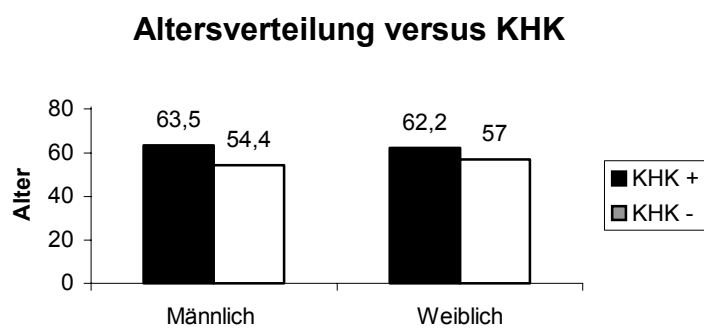


Abb. 1.3

Verteilung von KHK auf das Alter und das Geschlecht der Patienten

2. Mikrobiologische Ergebnisse

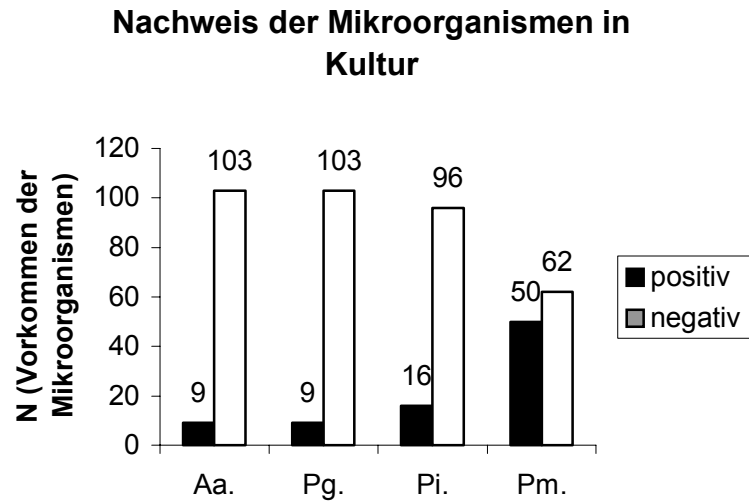


Abb. 2.1

Vorkommen der Mikroorganismen in der Kultur

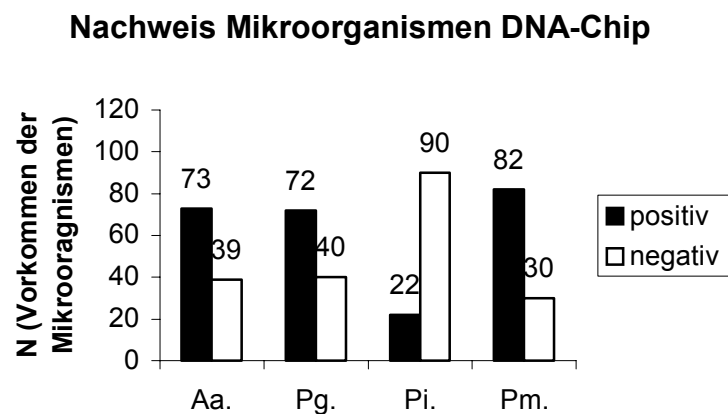


Abb. 2.2

Vorkommen der Mikroorganismen im DNA-Chip

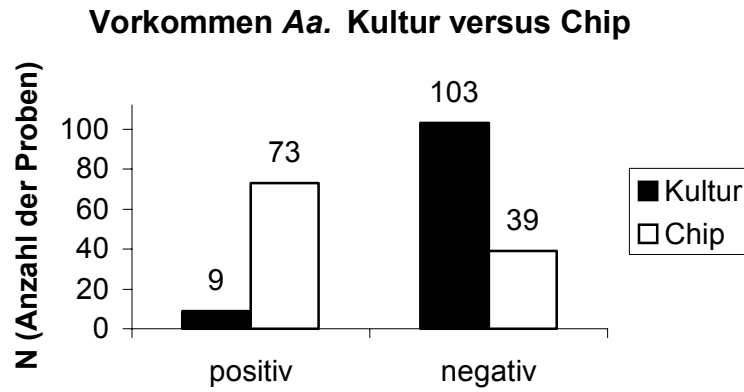


Abb. 2.3

Vergleich Vorkommen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in den Proben nachgewiesen über Kultur und Chip

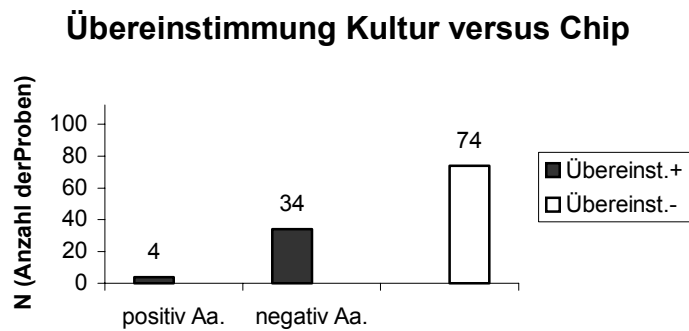


Abb. 2.4

Übereinstimmen der Ergebnisse bezogen auf die Anzahl der Proben bei *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

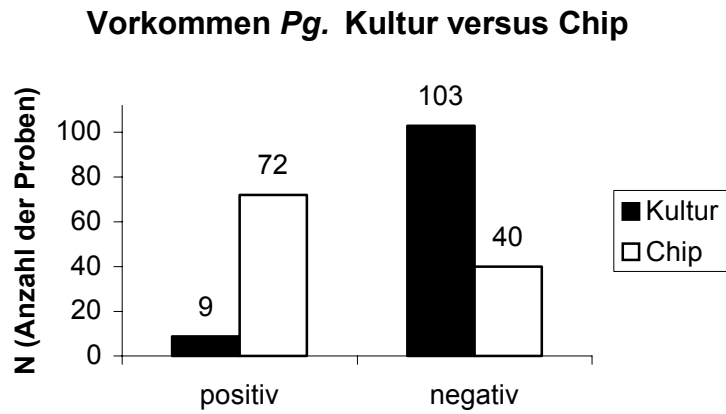


Abb. 2.5

Vergleich Vorkommen *Porphyromonas gingivalis* in den Proben nachgewiesen über Kultur und Chip

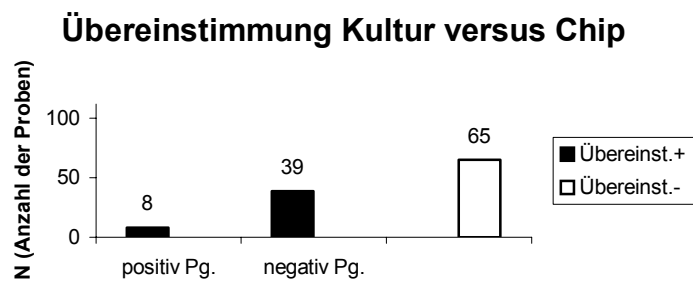


Abb. 2.6

Übereinstimmung der Ergebnisse bezogen auf *Porphyromonas gingivalis* bei allen Patienten

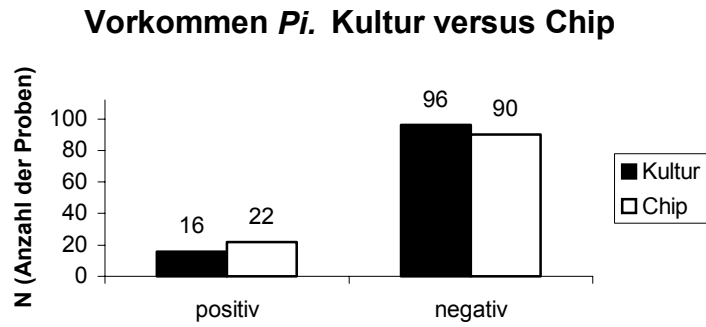


Abb. 2.7

Vorkommen von *Prevotella intermedia*
in den Proben nachgewiesen über Kultur und Chip

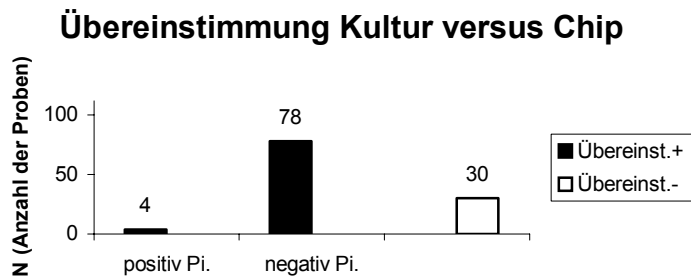


Abb. 2.8

Übereinstimmung Vorkommen *Prevotella intermedia* in Kultur
und Chip bezogen auf Gesamtzahl der Proben

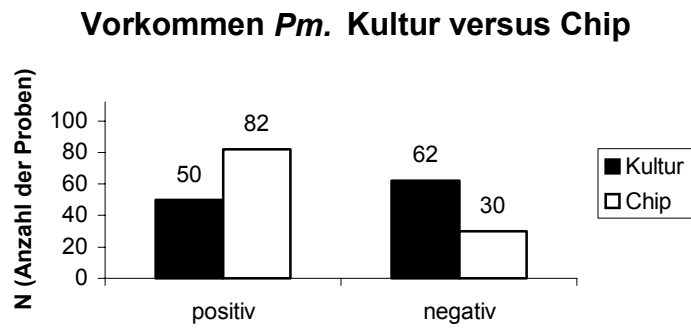


Abb. 2.9

Vorkommen von *Peptostreptococcus micros* in 112 Proben nachgewiesen über Kultur und Chip

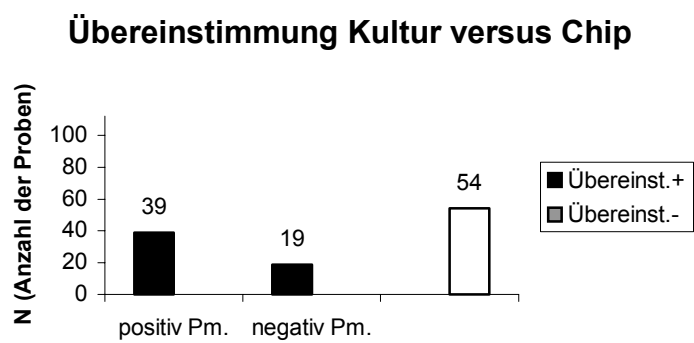


Abb. 2.10

Übereinstimmungen in Kultur und Chip bei *Peptostreptococcus micros* bezogen auf alle Proben

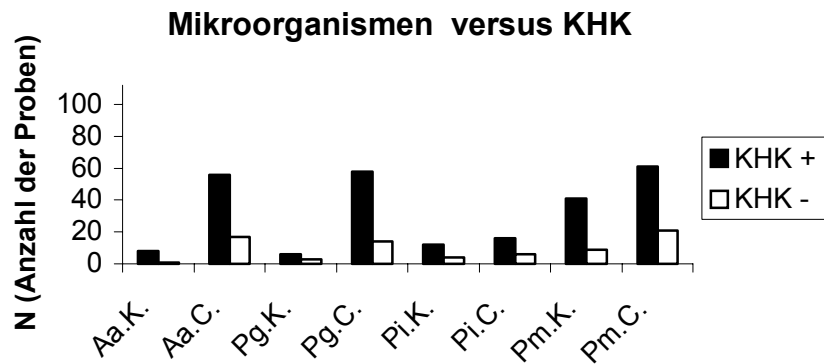


Abb. 2.11

Verteilung der Mikroorganismen auf alle Proben in Bezug zu KHK (K = Kultur; C = Chip)

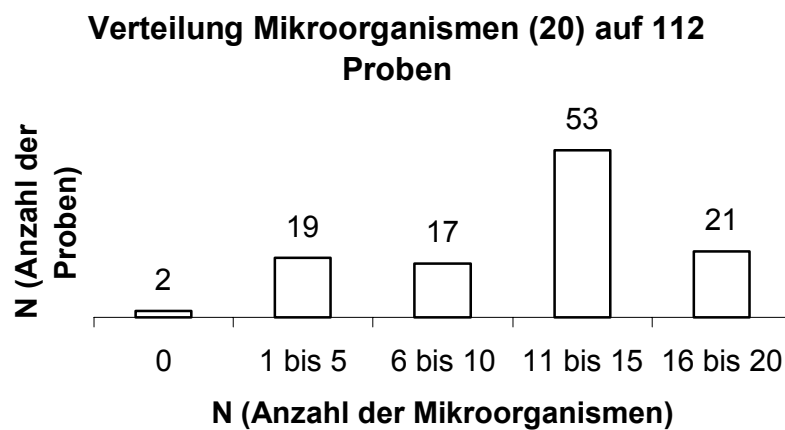


Abb. 2.12

Verteilung der 20 Mikroorganismen auf 112 Proben

B) Tabellen

Tab. 1

Protokoll zur DNA Isolation aus grampositiven und gramnegativen Bakterien mit Hilfe des Gen Elute Mammalian Genomic DNA Kit der Fa. Sigma

Bearbeiten von 200 µl Zuchtmedium

1. 180 µl Lysis Solution (B 6678) und 20 µl Proteinase K in das Probengefäß pipettieren; kurz vortexen.
2. 10 Min. bei 55°C und 500 rpm inkubieren.
3. 200 µl Lysis Solution (B8803) in das Gefäß pipettieren; kurz vortexen.
4. 5 Min. bei 95°C und 500 rpm inkubieren.
5. 200 µl Ethanol (absolut) in das Probengefäß pipettieren; kurz vortexen.
6. Die Lösung wird in ein „binding colume tube“ pipettiert.
7. 1 Min. bei 8.000 rpm und RT zentrifugieren.
8. Nach dem Zentrifugieren muss die Reinigungssäule in ein neues Gefäß überführt werden.
9. 500 µl Wash Solution in das Gefäß pipettieren.
10. 1 Min. bei 8.000 und RT zentrifugieren.
11. Wiederholung von Schritt 8.
12. Wiederholung von Schritt 9.
13. 3 Min. bei 13.000 rpm und RT zentrifugieren.
14. Die Reinigungssäule muss in ein DNase freies Gefäß überführt werden.
15. 150 µl Elution Solution in das Gefäß pipettieren.
16. 1 Min. bei 8.000 rpm und RT zentrifugieren.
17. Das Eluat in ein 1,5 ml Gefäß pipettieren. Das Eluat kann bei -20°C gelagert werden.

Tab. 2

Polymerase Ketten Reaktion (PCR) Ansatz für das Arbeiten mit dem DNA-Chip

Master Mix	19,3 µl
DNA Template des DNA Isolats	0,5 µl
Taq DNA Polymerase 1u (0,2 µl zu 0,5u/µl)	0,2 µl
Totales Volumen	20 µl

Tab. 3

Protokoll der PCR für den DNA-Chip

Zeiten	Temp. °C	Zyklenzahl
1 Min.	94	1
20 Sek.	95	45
20 Sek.	60	
30 Sek.	72	
1 Min.	72	1
Hold	22	

C) Figuren

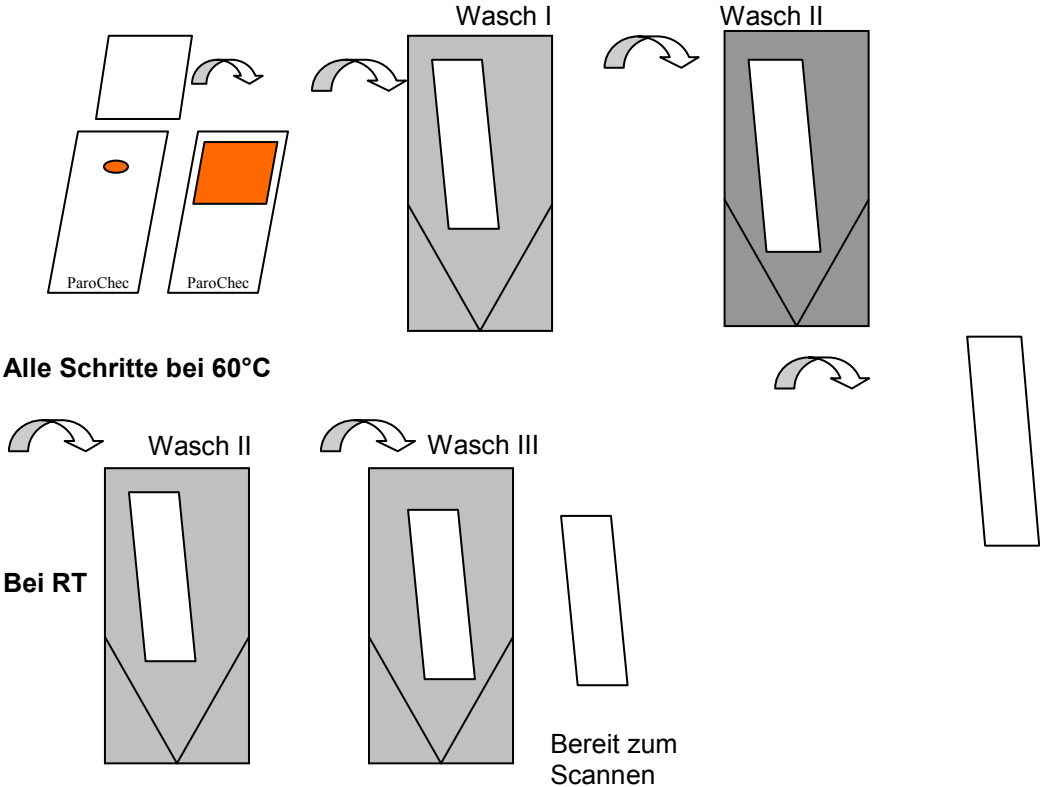
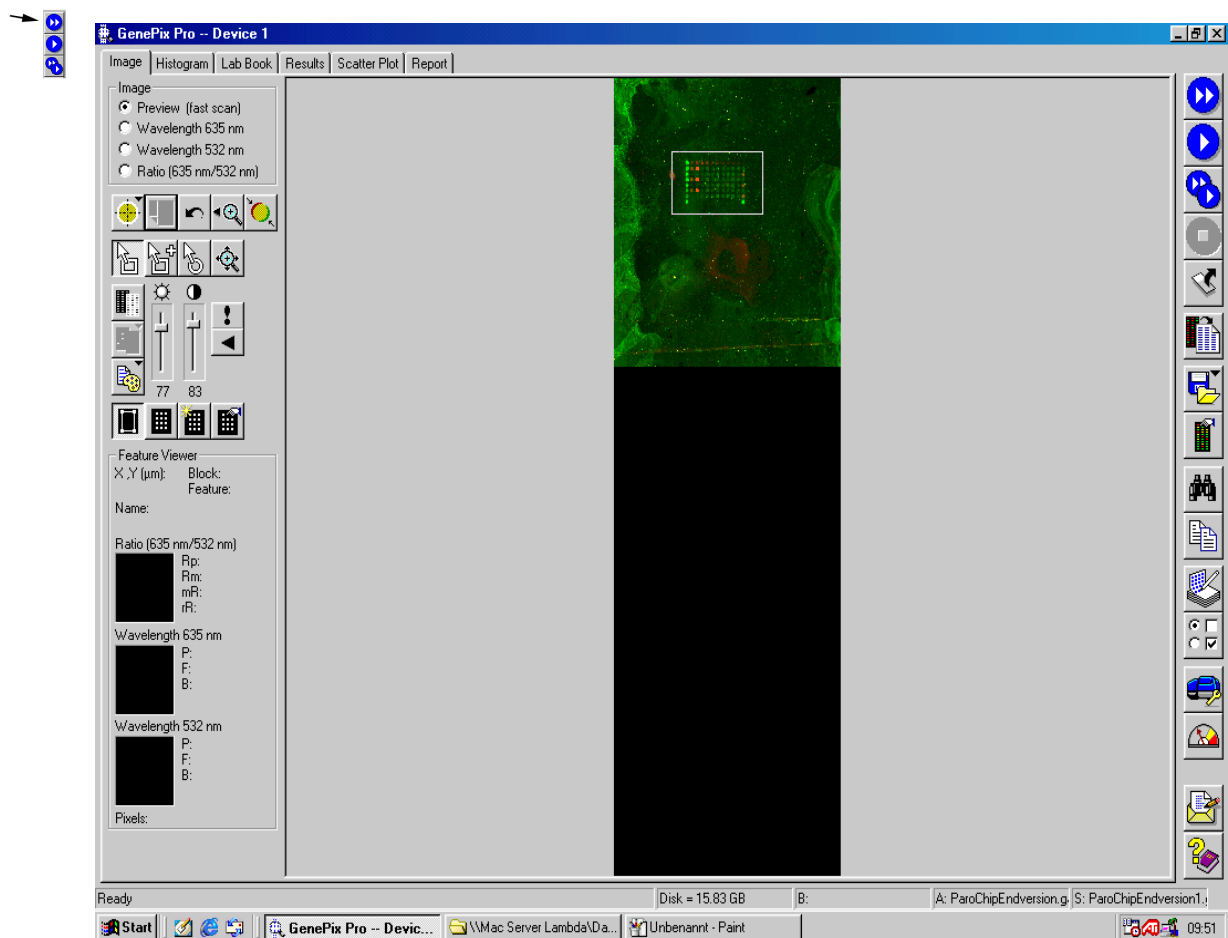


Fig. 1

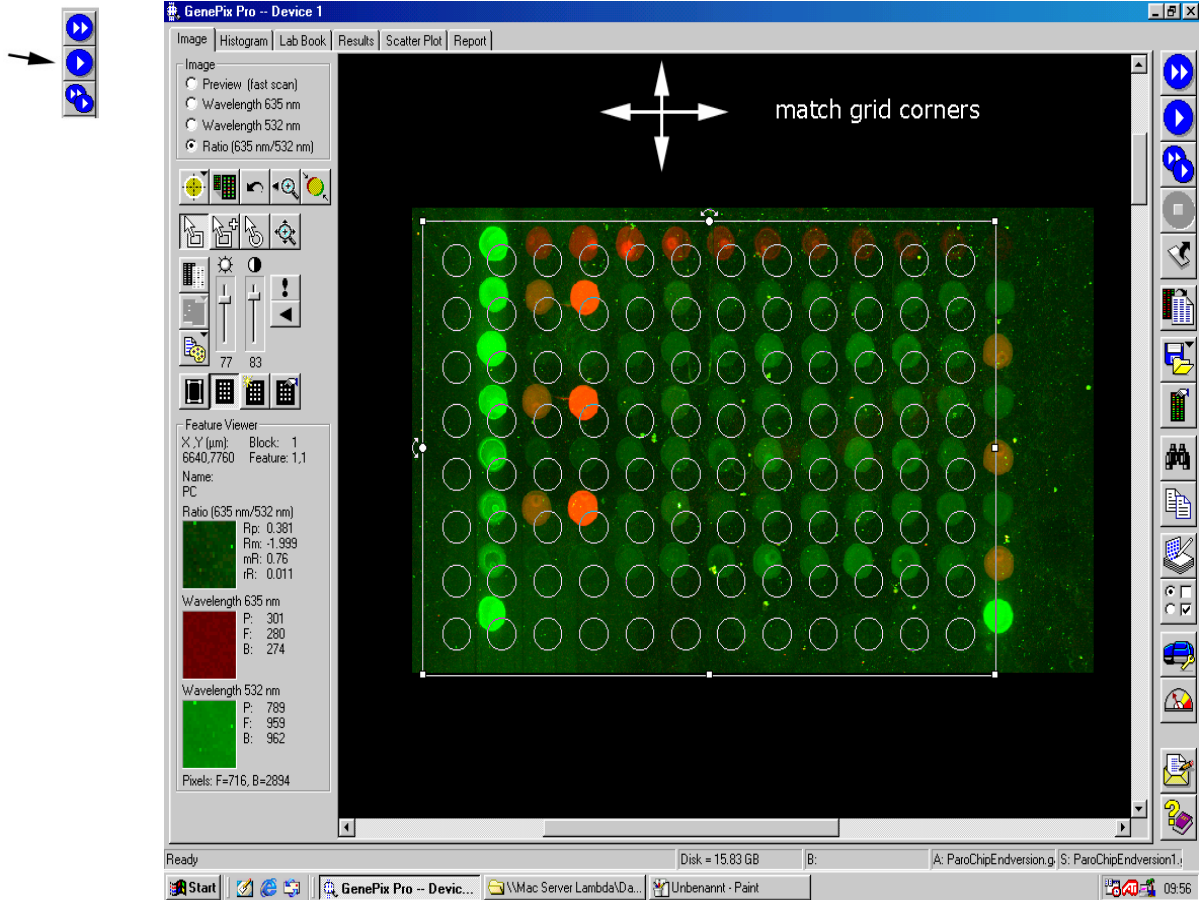
Hybridisierungsvorgang des DNA-Chips
(Quelle: Manual Lambda ParoCheck I)

Analyse des hybridisierten DNA-Chips

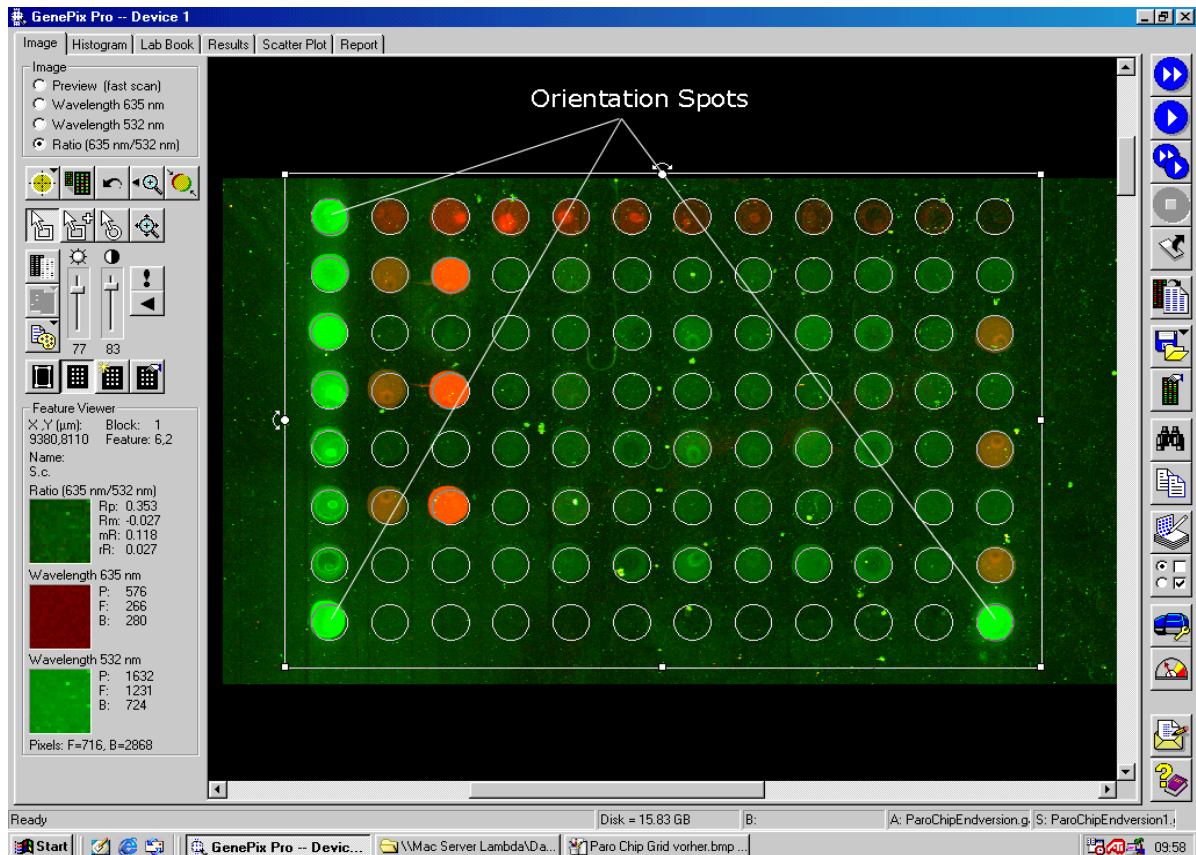
Prescan (Erstes Einlesen des Chips mit Hilfe des Computerprogramms)



Scan (genaues Positionieren des Chips mit Hilfe der Eckpunkte)



Positionierung (punktgenaues Positionieren der Orientation Spots über den Chip)



Eine korrekte Positionierung erfolgte, wenn alle drei Orientierungspots in den Eckpositionen wie abgebildet überlagert wurden.

Fig. 2

Einscannen des Chips mit Hilfe der speziellen Software in drei Schritten

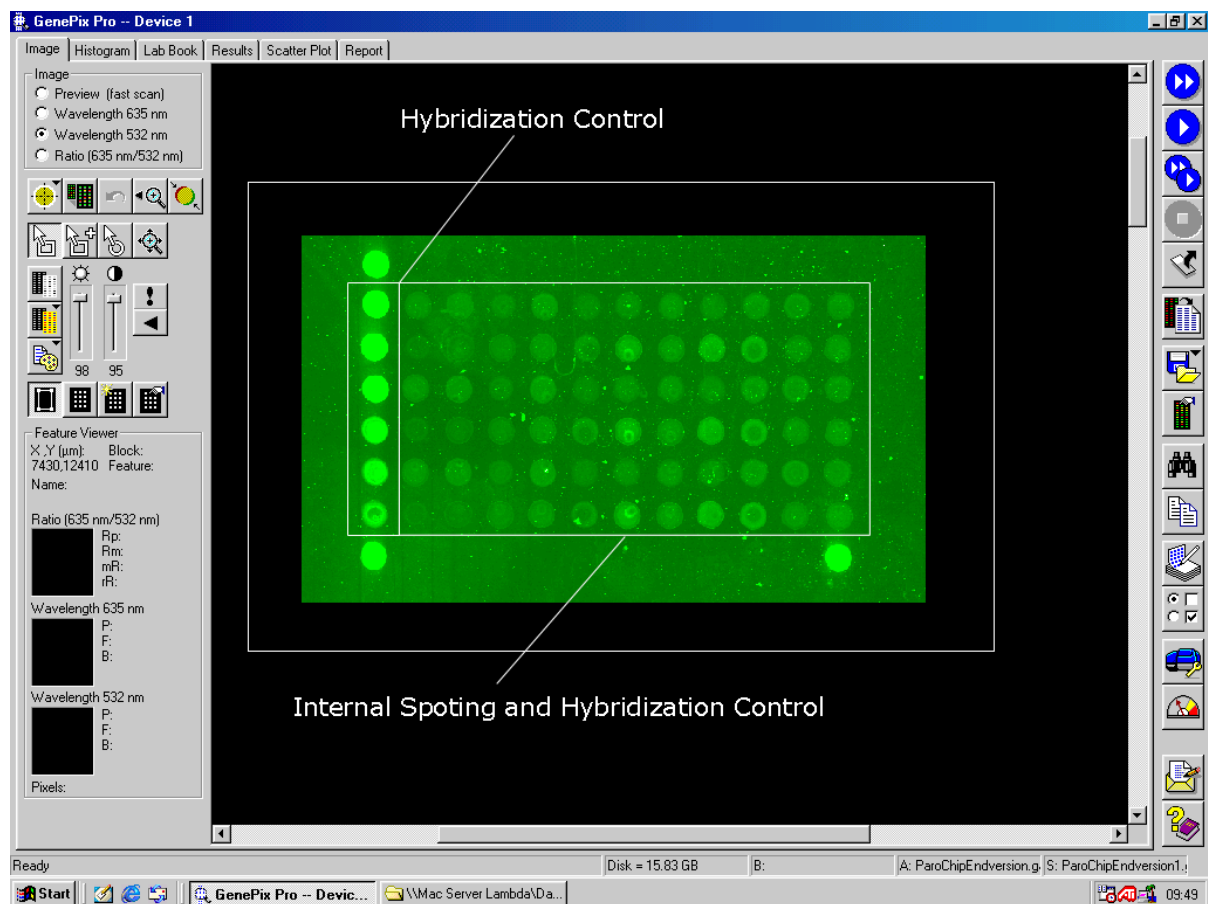


Fig. 3

Hybridisierungs Kontrollen und Interne Spotting Kontrollen

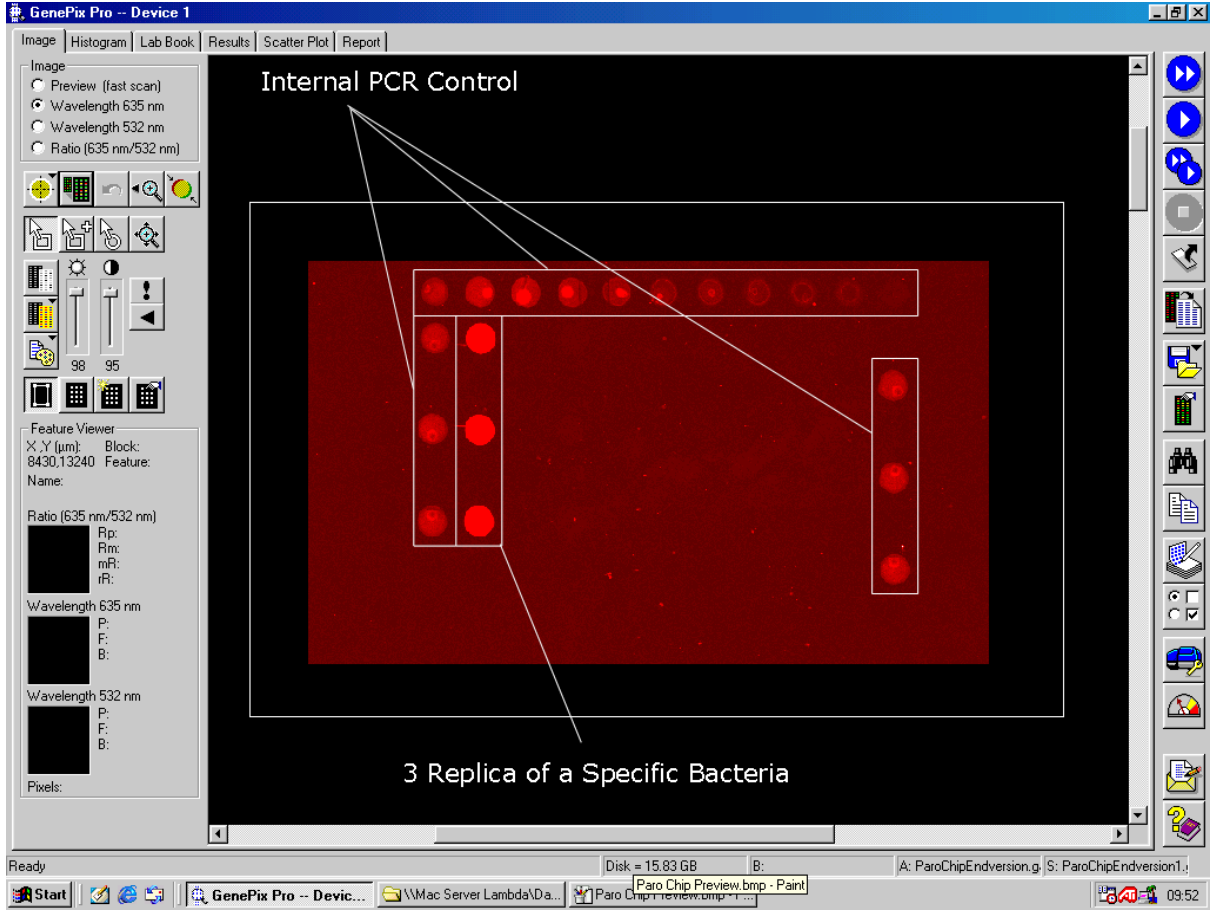


Fig. 4
PCR Kontrolle

Summary Info

Image File Names: 30 uvd.tif

Comment: none

Scanned by: GenePix 4000A [55484]

Analyzed by: GenePix Pro 3.0.6.73

When scanned: 8/2/02 02:00:00 PM

GPS file: ParoChipEndversion1.gps

Image wavelengths: 635 nm, 532 nm

GAL file: ParoChipEndversion.gal

PMT: 700 V, 600 V

Temperature: 45.8 V

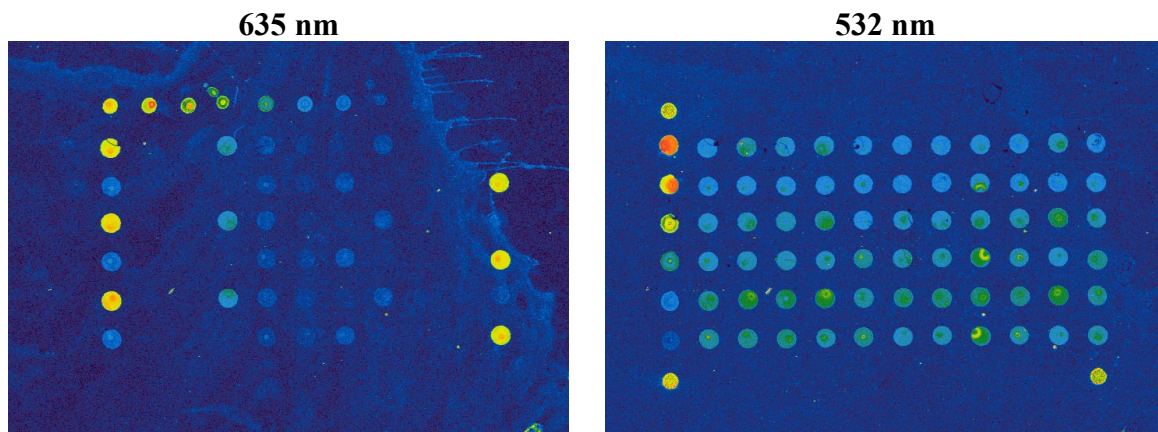
Laser Power: 1.5 V, 3.1 V

Laser On-time: 1155, 1161

Scan Power: 100 %, 100 %

Barcode: none

Results file name: (untitled)



Quality Control

Printing Control

3 of 3 spots have SNR larger than 50

Positive Control

6 of 6 spots have a SNR larger than 2

Sensitivity: Dilution Factor

1 2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024

SNR



Hybridization Control

6 of 6 spots have a SNR larger than 2

Sensitivity: Dilution Factor

1 2 4 8 16 32

SNR



Bacterial Results

Actinobacillus actinomycetemcomitans, A.a.	negative	Fusobacterium nucleatum, F.n.	positive
Actinomyces odontolyticus, A.o.	negative	Peptostreptococcus micros, P.m.	positive
Actinomyces viscosus, A.v.	negative	Porphyromonas gingivalis, P.g.	positive
Bacteriodes forsythus, B.f.	negative	Prevotella intermedia, P.i.	negative
Campylobacter, C.c.	negative	Prevotella nigrescens, P.n.	negative
Campylobacter gracilis (Bacteriodes g.), C.g.	negative	Streptococcus constellatus, S.c.	positive
Campylobacter rectus, C.r.	negative	Streptococcus gordonii, S.g.	negative
Capnocytophaga gingivalis, Cap.g.	negative	Streptococcus mitis, S.m.	negative
Eikenella corrodens, E.c.	negative	Treponema denticola, T.d.	positive
Eubacterium nodatum, E.n.	negative	Veillonella parvula, V.p.	positive

Fig. 5 Ergebnisbogen DNA-Chip

9 Literaturverzeichnis

Albandar, JM.:

Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases
Periodontology 2000, 29, 177-206 (2002)

American Academy of Periodontology:

Tobacco use and the periodontal patient, J Periodontol 70, 1419 (1999)

American Academy of Periodontology:

Parodontalerkrankungen und Gesundheit, Phillip Verlag, München, 5-16, 21-27
(2000)

Apatzidou, DA.; Riggio, MP.; Kinane, DF.:

Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing, II Microbiological findings, J Clin Periodontol 31, 141-148 (2004)

Ashimoto, A.; Chen, C.; Bakker, I.; Slots, I.:

Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions, Oral Microbiol. Immunol. 11, 266-273 (1996)

Beck, J.:

Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Parodontopathien und den Keimen *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia*, Aachen, Techn. Hochsch., Diss. (1997)

Berkenhagen-Hapke, B.:

Fall- Kontrollstudie zur Untersuchung der Korrelation von Parodontitis marginalis profunda und Frühgeburt, Berlin, Freie Univ., Diss. (2002)

Buchmann, R.:

Parodontale Entzündung; klinische, biochemische und mikrobiologische Parameter zur Diagnose und Therapiekontrolle am Modell der chronischen und aggressiven Entzündung und der parodontalen Regeneration, Münster (Westf.) Univ., Habil-Schr. (2000)

Buhlin, K.; Gustafsson, A.; Hakanson, J.; Klinge, B.:

Oral health and cardiovascular disease in Sweden, J Clin Periodontol 29, 254-259 (2002)

Chen, C.; Slots, J.:

Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*, Periodontology 2000, 20, 53-64 (1999)

Conrads, G.; Podbielski, A.; Brauner, A.:

Die Verwendung von DNA-Sonden in der Parodontalmikrobiologie, aus 2. Workshop Mikrobiologie und Immunologie der parodontalen Erkrankungen, Flores-de-Jacoby, L.; Mannheim, W.; Quintessenz Verlags GmbH, Berlin, 203-205 (1992)

Conrads, G.:

Nachweis von parodontopathogenen Bakterien mit Hilfe von nicht radioaktiv markierten DNA-Sonden, Aachen, Techn.-Hochsch., Diss. (1994)

Conrads, G.; Pelz, K.; Hughes, B.; Seyfarth, I.; Devine, DA.:

Optimized oligonucleotides for differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*, Oral Microbiol Immunol 17, 177-120 (1997)

Dierickx, K.; Pauwels, M.; Van Eldere, J.; Cassiman, JJ.; van Steenberghe, D.; Quirynen, M.:

Viability of cultured periodontal pocket epithelium cells and *Porphyromonas gingivalis* association, J Clin Periodontal 29, 987-996 (2002)

Dorn, BR.; Dunn, WA.; Progulske-Fox, A.:

Invasion of Human Coronary Artery Cells by Periodontal Pathogens, Infection and Immunity 67, 5792-5798 (1999)

Doung-Udomacha, S.; Rawlinson, A.; Douglas, CWI.:

Enumeration of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples by a quantitative- competitive PCR method, J.Med.Micobiol. 49, 861-874 (2000)

Eick, S.; Pfister, W.:

Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples, J Clin Periodontol 29, 638-644 (2002)

Flores-de-Jacoby, L.; Tsalikis, L.:

Atlas der parodontalen Mikrobiologie, Quintessenz Verlags GmbH Berlin, 11-13, 61-64, 111-138 (1996)

Garcia, L.; Tercero, JC.; Legido, B.; Ramos, JA.; Alemany, J.; Sanz, M.:

Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* by multiplex PCR, J Periodont Res 33, 59-64 (1998)

Gharbia, S.E.; Haapasalo, M.; Shah, H.N.; Kotiranta, A.; Lounatmaa, K.; Pearce, M.A.; Devine, D.A.:

Charakterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* Isolates From Periodontic and Endodontic Infections, J Periodontol 65, 56-61 (1994)

Göbel, U.; Krekeler, G.; Pelz, K.:

Derzeitiger Stand der parodontalen Mikrobiologie, aus 2. Workshop Mikrobiologie und Immunologie der parodontalen Erkrankungen, Flores-de-Jacoby, L.; Mannheim, W., Quintessenz Verlags GmbH Berlin, 33-42 (1992)

Graevenitz, A ; Zbinden, R.; Mutters, R.:

Actinobacillus, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Kingella*, *Pasteurella*, and other fastidious or rarely encountered Gram- negative rods, Manual of Clinical Microbiology, 8 th Edition, pp. 609-622 (2003)

Greenstein, G.; Lamster, I.:

Bacterial Transmisson in Periodontal Diseases: A Critical Review, J Periodontal 68, 421-431 (1997)

Hahn, H.; Falke, D.; Kaufmann, SHE.; Ullmann, U.:

Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer Verlag Berlin, 876-884 (1999)

Hamlet, SM.; Cullinan, MP.; Westerman, B.; Lindeman, M.; Bird, PS.; Palmer, J.; Seymour, GJ.:

Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in an Australian population, J Clin Periodontol 28, 1163-1171 (2001)

Hetz, G.:

Parodontitis und allgemeiner Gesundheitszustand, zm 94, Nr.5, 518-520 (2004)

Hof, H.; Dörries, R.:

Medizinische Mikrobiologie, Thieme Verlag Stuttgart, New York, 71, 252 (2002)

Hoffmann, S.:

Epidemiologische Untersuchungen zur Bedeutung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* bei der marginalen Parodontitis von Rekruten, Heidelberg Univ., Diss. (2000)

Holm-Pedersen, P.; Agerbaek, N.; Theilade, E.:

Experimental gingivitis in young and elderly individuals, Journal of Clinical Periodontology 2, 14-24 (1975)

Holm-Pedersen, P.; Folke, L.E.A.; Gawronski, T.H.:

Composition and metabolic activity of dental plaque from healthy young and elderly individuals, J Dent Res 59, 771-776 (1980)

Kesavalu, L.; Holt, SC.; Ebersole, JL.:

In vitro environmental regulation of *Porphyromonas gingivalis* growth and virulence, Oral Microbiology Immunology 18, 226-233 (2003)

Kremer, HA.; Loos, BG.; van der Welden, U.; Winkelhoff, A.; Craandijk, H.; Bulthuis, H.; Hutter, J.; Varoufaki, A.; van Steenbergen, M.:

Peptostreptococcus micros Smooth and Rough Genotypes in Periodontitis and Gingivitis, J Periodontol, 71, 209-217 (2000)

Lamont, RJ.; Jenkinson, HF.:

Subgingival colonisation by *Porphyromonas gingivalis*, Oral Microbiol Immunol 15, 341-349 (2000)

Lie, MA.; van der Weijden, GA.; Timmerman, MF.; Loos, BG.; van Steenbergen, TJM.; van der Welden, U.:

Occurrence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in relation to gingivitis and gingival health, J Clin Periodontol 28, 189-193 (2001)

Lindhe, J.:

Klinische Parodontologie, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart, New York, 99-124 (1986)

Listgarten, MA.:

The role of dental plaque in gingivitis and periodontitis, J Clin Periodontol 15, 485-487 (1988)

Loe, H.; Theilade, E.; Jensen, S.B.:

Experimental gingivitis in a man, J Periodontol. 36, 177-178 (1965)

Loos, B.; Claffey, N.; Crigger, M.:

Effects of oral hygiene measures on clinical and microbiological parameters of periodontal disease, J Clin Periodontol 15, 211-216 (1988)

Loos, B.; Craandijk, J.; Hoek, F.; Wetheim-van Dieln, P.; van der Welden, U.:

Elevation of Systemic Markers Related to Cardiovascular Diseases in the Peripheral Blood of Periodontitis Patients, J Periodontol 71, 1528-1534 (2000)

Lopez, R.; Oyarzun, M.; Naranjo, C.; Cumsille, F.; Ortiz, M.; Baelum, V.:

Coronary heart disease and periodontitis- a case control study in Chilean adults, J.Clin. Periodontol 29, 468-473 (2002)

Lösche, W.; Kocher, T.:

Parodontitis als Risikofaktor für Herz- Kreislauf- Erkrankungen aus Risikokompodium Parodontitis, Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V., KZVH, Quintessenz Verlags GmbH Berlin, 67-76 (2002)

Machtei, E.E.; Moon, C.I.; Dunford, R.; Norederyd, J.; Zambon, J.J.; Genco, R.J.:

Clinical, Microbiological, and Historical Factors Which Influence the Success of Regenerative Periodontal Therapy, J Periodontal 65, 154-161 (1994)

Mattila, K.J.; Niminén, M.S.; Valtonen, V.V.; Rasi, V.P.; Kesaniemi, Y.A.; Syrjälä,

S.L.; Jungeli, P.S.; Isoluma, M.; Hietaniemi, K.; Jokinen, M.J.; Huttunen, J.K.:

Association between dental health and acute myocardial infarction, Br Med J 298, 779-782 (1989)

Marsh, P.M.; Michael V.:

Orale Mikrobiologie, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart, New York, 20-94, 122-148 (2003)

Mashimo, PA.; Yamamoto, Y.; Slots, J.; Park, BH.; Genco, RJ.:

The periodontal microflora of juvenile diabetics, Culture, immunofluorescence and serum antibody studies, J Periodontol 7, 420-430 (1983)

Mikits, K.; Hahn, H.:

Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Springer Verlag Berlin, 291-306 (1999)

Mitchell-Lewis, D.; Engebretson, S.T.; Chen, J.; Lamster, I.B.; Papapanou, P.N.:

Periodontal infections and pre-term birth: early findings from a cohort of young minority women in New York, European Journal of Oral Sciences 109, 34 (2001)

Mombelli, A.; Schmid, B.; Rutar, A.; Lang, N.P.:

Persistence Patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* nigrescens, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical Therapy of Periodontal Disease, J. Periodontol 71, 14-21 (2000)

Müller, H.P.; Eger, T.; Lobinsky, D.; Hoffmann, S.; Zöller, S.:

A longitudinal study of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in army recruits, J.Periodont Res. 32, 69-78 (1997)

Müller, H.P.; Heinecke, A.; Borneff, M.; Knopf, A.; Klencke, C.; Pohl, S.:

Microbial ecology of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens* and *Capnocytophaga spp.* in adult. Periodontitis, J Periodont Res. 32, 530-542 (1997)

Müller, H.P.:

Parodontologie, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart, 13-25 (2001)

Mutters, R.:

Referenzstämme für die parodontale Mikrobiologie in der MCGM, der Medizinischen Bakterienstammsammlung Marburg, aus 1. Workshop Parodontalmikrobiologie, Flores-de-Jacoby, L.; Mannheim, W., Quintessenz Verlags GmbH Berlin, 61 (1990)

Mutters, R.:

Actinobacillus, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Klingella* and other fastidious or rarely encountered gram-negative rods, Manual of clin. Microbiology, eds. Murray P. Baron EJ, pp., 561-571 (1999)

Nakawaga, S.; Machida, Y.; Nakawaga, T.; Fuji, H.; Yamada, S.; Takazoe, I.;

Okuda, K.:

Infection by *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and antibody responses at different ages in humans; J Periodont Res 29, 9-16 (1994)

Nonnenmacher, C.:

The relationship between coronary heart disease and periodontal disease, Marburg, Univ. Diss. (2003)

Nonnenmacher, C.; Mengel, R.; Flores-de-Jacoby, L.:

Diagnostik von entzündlichen parodontalen Erkrankungen, Hessisches Zahnärzte Magazin, 4-11 (2003)

Nonnenmacher, C.; Mutters, R.; Flores-de-Jacoby, L.:

Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects, Clin.Microbiol.Infect 7, 213-217 (2001)

Offenbacher, S.; Costopoulos, SV.; Odle, BM.; Van Dyke, TE.:

Microbial colonization patterns of loosely adherent subgingival plaque in adult periodontitis, J Clin Periodontol 15, 53-59 (1988)

Ogawa, H.; Yoshihara, A.; Hirotsu, T.; Ando, Y.; Miyazaki, H.:

Risk factors for periodontal disease progression in among elderly people, J. of Clin. Periodontology 7, 592 (2002)

Pihlstrom, B.L.:

Periodontal risk assessment, diagnosis and treatment planning, Periodontology 2000 25, 37-58 (2001)

Plagmann, H.C.:

Lehrbuch der Parodontologie, Carl-Hanser-Verlag München, 580-610 (1998)

Polson, A.M.; Goodson, M.J.:

Periodontal Diagnosis- Current Status and Future Needs, J Periodontol, 25-31 (1985)

Pratten, J.; Wilson, M.; Spratt, DA.:

Characterization of in vitro oral bacterial biofilms by traditional and molecular methods, Oral Microbiol Immunol 18, 45-49 (2003)

Preus, HR.; Olsen, I.; Namwork, E.:

Association between bacteriophage-infected *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and rapid periodontal destruction, J Clin Periodontol 14, 245-247 (1987)

Progulske-Fox, A.; Kozarow, E.; Dorn, B.; Dunn, Jr. W.; Burks, J., Wu, Y.:

Porphyromonas gingivalis virulence factors and invasion of cells of the cardiovascular system, J Periodont Res 34, 393-399 (1999)

Rams, T.E.; Feik, D.; Listgarten, M.A.; Slots, J.:

Peptostreptococcus micros in human periodontitis, Oral Microbiol Immunol 7, 1-6 (1992)

Riggio, M.P.; Lennon, A.; Roy, K.M.:

Detection of *Prevotella intermedia* in subgingival plaque of adult periodontitis patients by polymerase chain reaction, J Periodont. Res. 33, 369-376 (1998)

Riggio, M.P.; Macfarlane, T.W.; Mackenzi, D.; Lennon, A.; Smith, A.J.; Kinane, D.:

Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples, J Periodontal Res 31, 496-501 (1996)

Rivera-Hidalgo, F.:

Smoking and periodontal disease, Periodontology 2000, Vol.32, 50-58 (2003)

Schroeder, H.:

Orale Strukturbiologie, Georg-Thieme-Verlag Stuttgart , New York, 187-258 (1992)

Schroeder, H.:

Pathobiologie oraler Strukturen, Basel, 137-196 (1997)

Sculean, A.; Jepsen, S.:

Diabetes mellitus als Risikofaktor für Parodontitis aus Risikokompodium Parodontitis, Deutsche Gesellschaft für Parodontologie e.V., KZVH, Quintessenz Verlags GmbH Berlin, 7-16 (2002)

Sigma Aldrich:

ProductInformation GenElute Mammalian Genomic DNA Kit, Product Numbers G1N10, G1N70, G1N350, Technical Bulletin MB-660 (2000)

Slots, J.:

The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis, Scand J Dent Res 84, 1-10 (1976)

Slots, J.:

Predominant cultivable microflora of advanced periodontitis, Scand J Dent Res 85, 114-121 (1977)

Slots, J.:

Selective Medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, J.Clin. Microbiol. 15, 606-609 (1982)

Slots, J.; Listgarten, MA.:

Bacteroides gingivalis, *Bacteroides intermedius* und *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease, J Clin Periodontol 15, 85-93 (1988)

Slots, J.; Ting, M.:

Actinobacillus actinomycetemcomitans und *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment, *Periodontology* 2000, 20, 82-121 (1999)

Socransky, SS.; Haffajee, AD.; Dzink, JL.:

Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites, *J Clin Periodontol* 15, 440-444 (1988)

Stelzel, M.; Conrads, C.; Pankuweit, B.; Maisch, B.; Vogt, S.; Moosdorf, R.; Flores-de-Jacoby, L.:

Detection of *Porphyromonas gingivalis* DNA in aortic tissue by PCR, *J Periodontol.* 73, 868-870 (2002)

Summanen, P.; Baron, E.; Citron, D.; Strong, C.; Wexler, H.; Finegold, S.:

Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual 5th Edition, Star Publishing Company, Los Angeles, 1-20 (1993)

Supplement J Periodontol:

Parameter on Systemic Conditions Affected by Periodontal Diseases, *J Periodontol* 71, Number 5 (Supplement) (May 2000)

Syed, S.A.; Loesche, W.J.:

Survival of human dental plaque flora in various transport media, *Appl Microbiol* 24, 638-644 (1972)

Travis, J.; Pike, R.; Imamura, T.; Potempa, J.:

Porphyromonas gingivalis proteinases as virulence factors in the development of periodontitis, J. Periodont Res 32, 120-125 (1997)

Tsai, CY.; Wolff, LF.; Germaine, G.; Hodges, J.:

A rapid probe test compared to culture methods for identification of subgingival plaque bacteria, J Clin Periodontal 30, 57-62 (2003)

Van Dalen, PJ.; van Winkelhoff, AJ.; van Stenbergen, TJM.:

Prevalence of *Peptostreptococcus micros* morphotypes in patients with adult periodontitis, Oral Microbiol Immunol 13, 62-64 (1998)

Van Winkelhoff, AJ.; Loos, BG.; van der Reijden, WA.; van der Velden, U.:

Porphyromonas gingivalis, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destructions, J Clin Periodontol 29, 1023-1028 (2002)

Winkel, EG.; Abbas, F.; Van der Velden, U.; Vroom, TM.; Scholte, G.; Hart, AAM.:

Experimental gingivitis in relation to age in individuals not susceptible to periodontal destruction, J Clin Periodontal 14, 499-507 (1987)

Ximenez-Fyvie, LA.; Haffajee, AD.; Socransky, SS.:

Comparison of the microbiota of supra and subgingival plaque in health and periodontitis, J.Clin. Periodontol 27, 648-657 (2000)

Ximenez-Fyvie, LA.; Haffajee, AD.; Socransky, SS.:

Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis, J.Clin. Periodontal 27, 722-732 (2000)

Zafiropoulos, GG.; Flores-de-Jacoby, L.; Nisengard, R.; Hungerer, KD.:

Antikörper gegen *A.actinomycescomitans*, *B.ginigvalis* und *B.intermedius* bei Parodontalerkrankungen, aus 2. Worksh op Mikrobiologie und Immunologie der parodontalen Erkrankungen, Flores-de-Jacoby, L.; Mannheim, W.: Quintessenz Verlags GmbH Berlin, 67-78 (1992)

Zambon, JJ.; Haraszthy, VJ.:

The laboratory diagnosis of periodontal infections, Periodontology 2000, 7, 69-82 (1996)

Zee, KY.; Samaranayake, LP.; Attstrom, R.; Davies, WI.:

Predominant cultivable microflora of supragingival dental plaque in Chinese individuals, Arch Oral Biol 7, 647-653 (1996)

10 Anhang

Lebenslauf

Name: Claudia Bonn-Spitzhüttl geb. Bonn
Geburtsdatum: 23.04.73
Wohnsitz: Gerhard-Jahn-Platz 17
35037 Marburg
Familienstand: verheiratet
Andreas Spitzhüttl (Dipl. Kaufmann)
Eltern: Elke Bonn, geb. Metz (Krankenschwester)
Bernd Bonn (Zahnarzt in selbstständiger Tätigkeit)
Geschwister: Alexander Bonn (Student der Zahnmedizin)

Schulischer Werdegang: 1979 - 1980 Grundschule Wetter
1980 - 1983 Grundschule Münchhausen
1983 - 1987 Gymnasium Edertalschule Frankenberg
1987 - 1993 Landschulheim Steinmühle
Abitur 1993

Studentischer Werdegang: 1993 bis 2000 Studium der Zahnmedizin an der
Philipps-Universität Marburg
10.10.1994 Vorphysikum
21.04.1997 Physikum
29.05.2000 Staatsexamen
05.06.2000 Approbation als Zahnärztin

Beruflicher Werdegang: ab 01.07.2000 Assistenz Zahnärztin in Münchhausen
am 01.07.2002 Niederlassung in Münchhausen
Tätigkeitsschwerpunkt Kinder- und Jugendzahn-
heilkunde seit 11.01.2006

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Aumüller, Austermann, Coca, Daut, Dibbets, Flores-de-Jacoby, Fruhstorfer, Habermehl, Hochban, Kern, Lehmann, Lotzmann, Mittag, Pieper, Radsak, Ramaswamy, Schachtschnabel, Schuhmacher, Seitz, Stachniss, Stoll, Werner

Danksagung:

Ich danke Herrn Prof. Dr. Reinier Mutters für die freundliche Überlassung des Dissertationsthema und für seine Unterstützung.

Ich danke Frau Dr. Claudia Nonnenmacher für ihre Unterstützung und ihre Beratung. Ein herzliches Dankeschön gilt meiner Familie, die mir die nötige Zeit für die Arbeit ermöglichten und mich immer unterstützt hat.

Abschließend danke ich allen, die mir bei der Durchführung der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Vergleichende Untersuchung zum Nachweis von ausgewählten parodontalpathogenen Mikroorganismen mittels konventioneller Kultur versus DNA-Chip bei Patienten mit Arteriosklerose-Verdacht“

in dem Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Philipps-Universität Marburg (komm. Leiter: Prof. Dr. M. Lohoff) in Zusammenarbeit der Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH Standort Marburg unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. R. Mutters ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe. Bei der Erstellung der Arbeit habe ich nur die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel verwandt.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch zur Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, 22.11.2006

Claudia Bonn-Spitzhüttl