Aus dem Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. U. Lotzmann
des Fachbereiches Medizin der Philipps- Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

Experimentelle Gingivitis in verschiedenen Altersgruppen -klinische und mikrobiologische Untersuchung mittels quantitativer real-time PCR-

INAUGURAL - DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

DANIEL WERNER
aus Mannheim

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 23.04.10
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent: Prof. Dr. Reiner Mengel
1. Korreferent: Prof. Dr. Klaus Pieper

1. EINLEITUNG 1
1.1 Pathogenese der entzündlichen Parodontalerkrankungen 3
1.2 Mikrobiologie der Gingivitis 5
1.3 Mikrobiologie der Parodontitis 6
1.4 Parodontale pathogene Mikroorganismen 8
1.4.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 8
1.4.2. *Porphyromonas gingivalis* 10
1.4.3 *Prevotella intermedia* 11
1.4.4 *Campyclobacter rectus* 12
1.4.5 *Parvimonas micra* 12
1.4.6 *Dialister pneumosintes* 13
1.5 Die Polymerase Kettenreaktion 14
1.5.1 Quantitative Real-time PCR 18
1.6 Ziel der Studie 20
2. MATERIAL UND METHODE 21
2.1 Probanden 21
2.2 Studiendesign 22
2.3 Klinische Untersuchung 22
2.4 Mikrobiologische Untersuchung 23
2.4.1 Dunkelfeldmikroskopie 23
2.4.2 Quantitative real-time PCR 25
2.5 Statistische Evaluation 28
3. ERGEBNISSE 29
3.1 Klinische Ergebnisse 29
3.2 Mikrobiologische Ergebnisse 35
3.2.1 Ergebnisse der quantitativen real-time PCR 35
3.2.2 Ergebnisse der Dunkelfeldmikroskopie 39
4. DISKUSSION 43
4.1 Diskussion der Methode 43
4.1.1 Diskussion der klinischen Untersuchungsmethoden 43
4.1.2 Die Gewinnung der Sulkusflüssigkeit 45
4.1.3 Diskussion der Dunkelfeldmikroskopie 46
4.1.4 Diskussion der quantitativen real-time PCR 48
4.2 Diskussion der Ergebnisse 50

5. SCHLUSSFOLGERUNG 56
6. ZUSAMMENFASSUNG 57
6.1 Zusammenfassung 57
6.2 Summary 59
7. LITERATURVERZEICHNIS 61
8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 79
9. ANHANG 80
9.1 Materialien und Laborgeräte 80
9.2 Tabellen und Abbildungen 80
9.3 Lebenslauf 88
9.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer 89
9.5 Danksagung 90
9.6 Ehrenwörtliche Erklärung 91

1. EINLEITUNG

In epidemiologischen Studien konnte festgestellt werden, dass mit zunehmendem Alter die Prävalenz, das Ausmaß und die Schwere des parodontalen Attachmentverlustes zunehmen (Albandar et al. 1999).

Bei einem ähnlichen Niveau der Plaqueansammlung steigt die Tendenz, eine Gingivitis zu entwickeln, von der frühen Kindheit bis zum Erwachsenenalter kontinuierlich an (Matsson 1978; Matsson & Goldberg 1985). Vorschulkinder entwickelten trotz Plaqueansammlung nahezu keine Gingivitis während einer 27-tägigen Periode ohne Mundhygiene (Mackler & Crawford 1973).

Altersbedingte Auswirkungen auf die klinischen Veränderungen bei einer parodontalen Entzündung sind durch zahlreiche experimentelle Gingivitisstudien nach dem Modell von Löe dokumentiert (Löe et al. 1965). Die Plaqueansammlung war bei den älteren Probanden zum Teil bedeutend größer (Holm-Pedersen et al. 1975), das Bluten nach Sondieren entwickelte sich schneller (Van der Velden et al. 1985), und nach 3 Wochen war die Schwere der Gingivitis bei den älteren Probanden signifikant höher (Fransson et al. 1996).

Neben diesen klinischen Parametern wurde der Einfluss des Alters auf die histologische Reaktion der gingivalen Gewebe auf Plaqueneubildung in Tierstudien untersucht. Es wurden bei älteren Hunden qualitative und quantitative Änderungen im Bindegewebe, Wurzelzement und Knochen festgestellt (Berglundh et al. 1991). Während einer 3-wöchigen Plaqueakkumulation bildeten alte und junge Tiere zwar gleiche Plaquemengen, allerdings waren die begleitenden gingivalen Läsionen bei den alten Hunden größer, weiter nach apikal ausgedehnt und enthielten mehr Plasmazellen (Berglundh & Lindhe 1993).

Diese Ergebnisse konnten auch am Menschen in experimentellen Gingivitisstudien bestätigt werden, da sich bei älteren Patienten im Vergleich zu den jüngeren zwar vergleichbare Plaquemengen bildeten, sie jedoch mehr Gingivitis entwickelten (Fransson et al 1996). Histologisch waren die entstandenen gingivalen Läsionen bei den älteren Probanden stärker ausgeprägt und zeigten einen höheren Anteil an B-Zellen und eine geringere Dichte an PMN-Zellen (Fransson et al. 1999). Eine weitere Studie zeigte, dass die Gingiva alter Probanden früher und stärker auf Plaqueansammlung reagierte als die jüngerer Probanden (Holm-Pedersen et al 1975).

In anderen, nicht zahnärztlichen Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort im Alter abnehmen. Hierzu liegen sowohl Studien an Tieren (Jaroslow et al. 1974; Menon et al. 1974) als auch an Menschen (Weksler & Hutteroth 1974) vor. Die Beobachtungen, dass die lokale vaskuläre Antwort auf Verletzungen und die Ansammlung von Entzündungszellen in der Wunde junger Ratten höher waren als bei alten, deuten auf eine reduzierte zelluläre Immunantwort mit weniger immunkompetenten Zellen bei den alten Tieren hin (Holm-Pedersen & Zederfeldt 1973). Bei alternden Menschen wurden eine verminderte Antwort auf Impfungen und eine mangelhafte Synthese spezifischer Antikörper festgestellt (Burns et al. 1993; Kishimoto et al. 1980).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Immunmechanismen, die eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Parodontalerkrankungen spielen, altersabhängigen Veränderungen unterliegen.

Aufgrund der beschriebenen Veränderungen wird, neben anderen, auch das Alter als ein Risikofaktor für die Entstehung einer Parodontitis angesehen.

Seit der Einführung des Modells der experimentellen Gingivitis ist es allgemein akzeptiert, dass Bakterien die entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer Gingivitis spielen. Es stellte sich jedoch die Frage, ob es einen Einfluss des Alters auf die Zusammensetzung der subgingivalen Mikroflora gibt. In verschiedenen Studien wurden keine Unterschiede in der Plaquezusammensetzung festgestellt (Holm-Pedersen et al. 1975, Van der Velden et al. 1985, Fransson et al. 1996). Berglundh und Lindhe (1993) hingegen fanden in einer experimentellen Studie an Hunden größere Mengen an parodontopathogenen Keimen bei den älteren Hunden.

Der Nachweis von parodontopathogenen Keimen und die Untersuchung der Zusammensetzung der Plaqueflora hängen in starkem Maß von der verwendeten Nachweismethode ab. In den oben erwähnten Studien erfolgte entweder eine Unterscheidung nach morphologischen Kriterien im Rahmen der Dunkelfeldmikroskopie oder durch Anlegen von Kulturen. In den letzten Jahren wurde durch die Entwicklung der quantitativen real-time PCR eine Methode etabliert, die einen sensitiveren und sehr spezifischen Nachweis von Bakterienspezies erlaubt und darüber hinaus eine exakte Quantifizierung ermöglicht. Mehrere Studien haben die Verwendbarkeit der Technik für die Quantifizierung von Mikroorganismen beschrieben (Asai et al. 2002; Corless et al. 2001; Ke et al. 2000; Lyons et al. 2000; McAvin et al. 2001; Nonnenmacher et al 2004). Es stellt sich die Frage, ob mittels dieser genaueren Nachweis-

methode Unterschiede in der Zusammensetzung der subgingivalen Mikroflora bezüglich der Menge an parodontopathogenen Keimen bei jungen und alten Individuen festgestellt werden können.

1.1 Pathogenese der entzündlichen Parodontalerkrankungen

Die Histopathogenese beschreibt die Entstehungsweise krankhafter Prozesse und erklärt die krankheitstypischen Gewebsveränderungen mit ihren strukturell-funktionellen Abläufen. Bei plaqueassoziierten parodontalen Erkrankungen wird der charakteristische pathogenetische Ablauf vom Zusammenwirken äußerer Faktoren (Bakterien) und wirtseigener Faktoren bestimmt. Die Abläufe im Einzelnen wurden von Page und Schröder nach tierexperimentellen Studien in vier Stadien eingeteilt: die initiale Läsion, die frühe Läsion, die etablierte Läsion und die fortgeschrittene Läsion (Page & Schroeder 1976). Nachfolgende Studien zeigten, dass das zeitliche Aufeinanderfolgen der verschiedenen Stadien sich beim Menschen von den Abläufen beim Tier unterscheidet. Charakteristika der initialen und frühen Läsion treten beim Menschen bereits in der klinisch gesund erscheinenden Ginigiva auf. Wegen dieser Diskrepanz zwischen klinischem Erscheinungsbild und klinischem Verlauf auf der einen Seite und der Histopathogenese auf der anderen Seite definierte Lindhe eine neue Klassifikation (Lindhe et al.2003).

Klinische Bezeichnung	Histopathologischer Befund
Unversehrte Gingiva	Histologische makellos
Normale gesunde Gingiva	Initiale Läsion von Page & Schröder
Frühe Gingivitis	Frühe Läsion von Page & Schröder (wenige Plasmazellen)
Etablierte Gingivitis	Etablierte Läsion ohne Knochenabbau und ohne Epitheltiefenwachstum (Plasmazellanteil zwischen 10% und 30% des Leukozyteninfiltrates)
Parodontitis	Etablierte Läsion mit Knochenabbau und Epitheltiefenwachstum (Plasmazelldichte >50%)

Tab.1: Klassifikation der histopathologischen Stadien von Gingivitis und Parodontitis
(Lindhe et al. 2003)

Die gesunde Gingiva erscheint blass-rosa mit girlandenförmigem Verlauf, matt glänzend, gestippelt, bei sanfter Sondierung nicht blutend und hat eine feste Konsistenz. Die Interdentalpapillen füllen den Raum unter den Kontaktpunkten vollständig aus. Ihr verhorntes orales Epithel geht kontinuierlich in das Saumepithel über und ist über Hemidesmosomen mit der Zahnoberfläche verbunden. Das Bindegewebe enthält kollagene Fasern, die den Geweben ihre Form verleihen und zusätzlich zur Verankerung an der Zahnoberfläche beitragen. Diese in Klinik und Histologie unversehrte Gingiva definiert Lindhe als „jungfräulich“. Dieses Stadium ist unter normalen Mundhygienebedingungen jedoch nicht zu erreichen. Dem gegenüber steht die „klinisch gesunde Gingiva“, die das gleiche klinische Erscheinungsbild hat, histologisch jedoch Veränderungen aufweist. Es existiert ein Entzündungsinfiltrat, das vorwiegend aus neutrophilen Granulozyten im Saumepithel und Lymphozyten im Bindegewebe, daneben aus Makrophagen und Monozyten besteht. Es nimmt etwa 5% des Bindegewebsvolumens ein. Bereits dieses frühe Entzündungsstadium weist einen Kollagenabbau in den infiltrierten Gebieten auf. Exsudative und transudative Flüssigkeit und Plasmaproteine treten in der Sulkusregion auf und bilden die Sulkusflüssigkeit. Es findet eine ständige Passage von neutrophilen Granulozyten durch das Saumepithel in den Sulkus statt, ausgelöst durch chemotaktische Faktoren des Immunsystems wie Interleukin 8 und Komplementfaktor 5a sowie durch Produkte aus dem Biofilm, zum Beispiel Lipopolysaccharide. Eine Vaskulitis durch Dilatation des subepithelialen Gefäßplexus und die Neubildung von Gefäßen ist feststellbar. Dieses Stadium entspricht der initialen Läsion wie von Page und Schröder vorgestellt.

Nach einer Woche der Plaquebildung entwickelt sich die frühe Gingivitis, die histopathologisch mit den Veränderungen der von Schröder und Page beschriebenen frühen Läsion einhergeht. Die Vasodilatation der subepithelialen Gefäße bleibt bestehen, deren Anzahl erhöht sich jedoch durch Öffnung von inaktiven Kapillarbetten. Lymphozyten und PMNs dominieren das entzündliche Infiltrat, wohingegen nur wenige Plasmazellen gefunden werden. Das Zellinfiltrat in diesem Stadium nimmt etwa 15% des Bindegewebsvolumens ein. Fibroblasten degenerieren in diesen Bereichen, und Kollagenfasern werden abgebaut. Basalzellen des Saum- und Sulkusepithels proliferieren. In dieser Phase werden klinische Zeichen der Entzündung sichtbar.

Bleibt die Gingiva weiterhin Angriffen der Bakterien ausgesetzt, verstärkt sich der Entzündungsgrad, und es entwickelt sich der Zustand einer etablierten Gingivitis. Diese Phase wurde von Page und Schroeder anhand von Tierexperimenten histolo-

gisch als etablierte Läsion beschrieben. Hauptcharakteristikum dieser ist das Dominieren von Plasmazellen vor allem im koronalen Anteil des Bindegewebes und um Gefäße. Der Verlust von kollagenen Fasern dehnt sich sowohl nach lateral als auch nach apikal aus, und das Entzündungsinfiltrat nimmt an Volumen zu. Gleichzeitig proliferiert das dentogingivale Epithel im Versuch, eine Barriere gegen das Eindringen der Bakterien aufrechtzuerhalten. Das Saumepithel verwandelt sich in ein Taschenepithel, das von einem Leukozyteninfiltrat dominiert wird und im Vergleich zum ehemaligen Saumepithel durchlässiger ist. Im Gegensatz zum Tierversuch zeigte sich bei Studien am Mensch, dass sich diese Phase erst nach sehr viel längerer Zeit unter Plaqueeinwirkung entwickelt.
Das letzte Stadium in der Entwicklung wurde von Page und Schröder als die fortgeschrittene Läsion bezeichnet und entspricht in ihrem klinischen Erscheinungsbild einer Parodontitis. Die entstandene Tasche vertieft sich durch apikale Ausdehnung des Epithels aufgrund der anhaltenden Plaqueirritation. Das Entzündungsinfiltrat breitet sich im Bindegewebe weiter nach apikal und lateral aus. Ansonsten zeigen sich alle Eigenschaften der etablierten Läsion mit dem gravierenden Unterschied, dass sich das Saumepithel unter die Schmelz-Zement-Grenze zurückzieht, die Schädigung der Fasern stark zunimmt und Verlust von Alveolarknochen auftritt. Die Läsion ist jetzt nicht mehr auf die Gingivabereiche beschränkt, sondern das Zellinfiltrat breitet sich nach apikal in das Bindegewebe des parodontalen Halteapparates aus. Auch in dieser Phase sind Plasmazellen der dominierende Zelltyp.

1.2 Mikrobiologie der Gingivitis

Im **gesunden gingivalen Sulkus** dominieren mit 85% grampositive Mikroorganismen (Slots et al. 1977). Die vorherrschende subgingivale Flora ist relativ einfach und enthält vorwiegend Actinomyces-, Streptococcus- und Veillonenella-Spezies, wie zum Beispiel *Streptococcus sanguis, Streptococcus mitis, Actinomyces naeslundii* und *Actinomyces viscosus*. Mit **zunehmender gingivaler Entzündung** kommt es zu einer Verschiebung der subgingivalen Mikroflora von grampositiven Kokken zu gramnegativen beweglichen Stäbchen und Spirochäten.
Bei einer **Gingivitis** befinden sich im Gegensatz zum entzündungsfreien Sulkus mit ca. 43,7% dreimal mehr gramnegative Bakterien im Sulkus, und die obligaten Anaerobier machen ca. 42,9% der Gesamtflora aus (Slots et al. 1978). Auch die Zusammensetzung der grampositiven Bakterien verändert sich. Die Zahl der grampositiven

Kokken verringert sich mit andauernder Gingivitis, wohingegen die grampositiven Stäbchen zunehmen (Syed & Loesche 1978). Es kommt zu einer Zunahme von spezifischen Actinomycesarten, Streptokokken, Fusobakterien, Veillonellen und Treponemavarianten. Moore et al. (1982a) identifizierten an Gingivaarealen mit klinischen Entzündungszeichen insbesondere *A. israelii*, verschiedene *A. naeslundii*-Spezies, *A. odontolyticus*, *Fusobacterium nucleatum*, *S. micra, S .anginosus, S. mitis* sowie *Veilllonella parvulla*. Bei fortschreitender Gingivitis differenziert sich die Flora weiter, und es treten Bakterienarten hinzu, die auch auf an Parodontitis erkrankten Zahnflächen zu finden sind.

Neben der beschriebenen, durch mangelnde Mundhygiene bedingten Gingivitis, gibt es eine hormonell verursachte Gingivitis, wie sie während der Schwangerschaft oder der Pubertät vorkommen kann. Diese ist gekennzeichnet durch eine Zunahme von anaeroben Bakterien. Signifikant erhöht sind vor allem die Werte für *Prevotella intermedia* (Kornman & Loesche 1980). Dies scheint ursächlich mit dem in der hormonellen Umstellungsphase in hohen Werten auftretenden Hormon Progesteron zusammenzuhängen. In Untersuchungen wurde festgestellt, dass ein verstärktes Auftreten von Progesteron in Plaqueproben mit erhöhten Werten für *P. intermedia* einherging. In vitro-Experimente zeigten eine Aufnahme von radioaktiv markiertem Hormon durch *P. intermedia*-Stämme. Des Weiteren kann Progesteron den für diese Bakterien essentiellen Nährstoff Menadion substituieren. Dies führt zu der Annahme, dass das Hormon am Stoffwechsel des Bakteriums beteiligt ist und bei ausreichender Bereitstellung im gingivalen Sulkus, zum Beispiel während der Schwangerschaft, einen primären Wachstumsfaktor darstellt (Kornman und Loesche 1982)

Auch bei der Ätiologie einer nekrotisierenden ulzerierenden Gingivitis (NUG) spielen spezifische Bakterien eine entscheidende Rolle. In Abstrichen der entzündeten Region dominieren Spirochäten, vor allem *Treponema vincentii* und *microdentum* sowie Fusobakterien, hierbei vorwiegend *F.nucleatum* und *F.fusiforme*. Daneben sind für die Erkrankung auch die parodontopathogenen Keime *P. gingivalis* und *P. intermedia* verantwortlich (Loesche et al. 1982).

1.3 Mikrobiologie der Parodontitis

Anhand zahlreicher Studien wurde gezeigt, dass die Parodontitis eine mit bestimmten Keimen vergesellschaftete Erkrankung ist. Solche Bakterien werden als parodon-

topathogen bezeichnet. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die verschiedenen Formen der Parodontitis ein unterschiedliches Keimspektrum aufweisen, und es wurden bestimmte parodontopathogene Keime in hohen Konzentrationen gefunden. Wenn sich eine Gingivitis zur chronisch generalisierten Parodontitis weiterentwickelt, die vorwiegend bei Erwachsenen vorkommt, nimmt der Anteil an beweglichen Stäbchen und Spirochäten deutlich zu (Listgarten et al. 1978; Loesche et al. 1982; Loesche & Syed 1978). Die subgingivale Mikroflora setzt sich aus gramnegativen, anaeroben Stäbchen (Newman et al. 1976; Tanner et al. 1979), insbesondere *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum* und *Campylobacter rectus* zusammen (Slots 1977; White & Mayrand 1981). In anderen Studien wurden weitere Keime, *Parvimonas micra* und *Dialister pneumosintes*, als parodontopathogen eingestuft (Ghayoumi et al. 2002; Rams et al. 1992)

Mikrobiologische Studien der lokalisierten aggressiven Parodontitis zeigten übereinstimmend ein stark erhöhtes Vorkommen von gramnegativen, anaeroben Stäbchen. In besonders hohen Konzentrationen wurde *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* bei Patienten mit dieser Erkrankung nachgewiesen (Mandell & Socransky 1981; Slots 1982; Zambon et al. 1983). Bei der **generalisierten aggressiven Parodontitis** wird die Mikroflora von *Porphyromonas gingivalis* und anderen Bakterien wie *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga* und *Neisseria* dominiert. So wurden schwarz-pigmentierte Bakterien wie *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* und *Bacteroides forsythus* gehäuft vorgefunden (Bragd et al. 1987; Kamma et al. 1994; Kamma et al. 1995; Slots 1984; Slots et al. 1986; van Winkelhoff et al. 1988). In anderen Studien dominierten *Wolinella recta*, *Capnocytophaga* (Tanner et al. 1979) und *Fusobacterium nucleatum* (Kamma et al. 1994; Kamma et al. 1995; Moore et al. 1982b; Slots 1977). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* wurde ebenfalls häufig nachgewiesen (Bragd et al. 1987; Moore et al. 1982b; Slots 1977; Slots et al. 1986), wobei dies insbesondere bei jüngeren Patienten mit einer vermutlich vorangegangenen lokalisierten aggressiven Parodontitis der Fall war (Van Dyke et al. 1980).

Diese Auflistung der identifizierten Bakterien zeigt, dass offensichtlich keine spezifische Mikroflora in den Zahnfleischtaschen von Patienten mit einer Parodontitis vorliegt.

1.4 Parodontale pathogene Mikroorganismen

1.4.1 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Die Spezies *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (früher Actinobacillus actinomycetemcomitans) gehört zur Familie der Pasteurellaceae, Gattung Aggregatibacter (Norskov-Lauritsen & Kilian 2006) und ist ein kleines, nicht bewegliches, nicht sporenbildendes, saccharolytisches, fakultativ anaerobes, gramnegatives Stäbchen. Der Keim weist drei verschiedene Serotypen (A, B und C) auf, welche durch Oberflächenantigene (Polysaccharide) charakterisiert sind. Die Serotypen A und B sind die am häufigsten in der Mundhöhle vorkommenden, wohingegen der Serotyp C nur etwa 10% ausmacht (Zambon et al 1983). *A. actinomycetemcomitans* ist in besonders hohen Raten in den Läsionen bei lokalisierter aggressiver Parodontitis vorhanden, hierbei wurde vor allem der Serotyp B isoliert. Der Serotyp A ist auch mit Fällen von chronischer generalisierter Parodontitis assoziiert. Der Keim ist auf erhöhtem Niveau an aktiven Stellen vorhanden, das heißt an solchen, die einen anhaltenden Verlust von Attachment und Knochenabbau zeigen.

A. actinomycetemcomitans wurde in Biofilmen lange Zeit als so genannter Nachfolgekeim betrachtet, der sich lediglich an die Oberfläche von Pionierkeimen haftet. In Wirklichkeit bindet das Bakterium jedoch hochaffin an die mit Pellikel bedeckte Zahnoberfläche und haftet auch an Epithel, Kollagen und Fibronektin. Dies gelingt durch Adhäsionsmoleküle auf seinen Fimbrien (Rosan et al. 1988), extrazellulären Membranvesikeln sowie auf extrazellulären amorphen Substanzen (Meyer & Fives-Taylor 1994). Oberflächenproteine, sogenannte Invasine, befähigen *A. actinomycetemcomitans*, in das Gingivaepithel zu penetrieren. Dort ist der Keim vor Angriffen des humoralen Abwehrsystems geschützt, wodurch sich seine Überlebensfähigkeit in der Mundhöhle erhöht (Fives-Taylor et al. 1999).

A. actinomycetemcomitans besitzt eine Reihe von virulenten Faktoren, die zu einer destruktiven parodontalen Erkrankung beitragen. So besitzt der Keim ein hitzelabiles Leukotoxin, zur Gruppe der Porine gehörend, welches in der Lage ist, Monozyten und neutrophile polymorphkernige Granulozyten zu töten. Dabei handelt es sich um ein porenformendes, antichemotaktisches Protein, welches die Bakterien überwiegend in ihrer Außenmembran tragen (Diaz et al. 2006). Es löst Veränderungen in der Zellmembran dieser Zellen aus, die zur Lyse der betreffenden Zelle führen (Baehni et al. 1979; Taichman et al. 1980), oder das Bakterium eliminiert die Abwehrzellen durch Apoptose. Nicht alle Stämme des Keims besitzen dieses Leukotoxin. So wurde

festgestellt, dass nur ein geringer Prozentsatz der bei gesunden Menschen vorkommenden Stämme in der Lage ist, dieses zu produzieren.
Des Weiteren erzeugt *A.actinomycetemcomitans* Faktoren, die seine Abtötung durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten verhindern. Dazu zählen Substanzen, die die Chemotaxis von PMN hemmen (Van Dyke et al. 1982) und solche, die die Verschmelzung von Phagozytosevakuolen und Lysosomen blockieren (Ashkenazi et al. 1992) oder die Freisetzung von bakterizidem H_2O_2 hemmen (Mizoguchi et al. 1997).
A. actinomycetemcomitans produziert ebenfalls einen hitzelabilen Immunsuppressionsfaktor, der den Stoffwechsel und die Zellteilung von T-Lymphozyten verhindert (Shenker et al. 1982). Auf der Zelloberfläche trägt der Keim Moleküle, welche die Fc-Anteile von IgG binden und damit in Wettbewerb mit den Fc-Rezeptoren auf der PMN-Oberfläche treten, was die Wirkung dieser erheblich reduziert. Des Weiteren bildet der Keim einen Faktor, der die Resistenz gegenüber der Abtötung durch das Komplementsystem bedingt (Sundqvist und Johansson 1982). Darüber hinaus kann *A. actinomycetemcomitans* die Funktion von Fibroblasten sowie endothelialer und epithelialer Zellen behindern, indem es ein Protein freisetzt, das seinerseits die DNA-RNA- und Proteinsynthese in Fibroblasten unterdrückt. Dadurch wird die Integrität des gingivalen Bindegewebes gestört und die Heilungstendenz verschlechtert. Dies wird auch durch die in der extrazellulären Matrix befindliche Kollagenase gefördert. Des Weiteren produziert das Bakterium Faktoren, welche die polyklonale B-Zellen-Stimulation und mitogene Reaktionen in menschlichen Blut-Lymphozyten verursachen. Im Rahmen der entzündlichen parodontalen Defekte fördert der Keim den Knochenabbau. Auslösend scheint das Vorhandensein von CPA (capsular-like polysaccharide antigene), einem Antigen aus sich wiederholenden Dissacharideinheiten (Amano et al. 1989) auf der Oberfläche des Bakteriums zu sein. Dies bewirkt eine Formation von osteoklastenartigen Zellen. Untersuchungen zeigten, dass der zugrundeliegende Mechanismus der CPA-induzierten Knochenresorption durch eine initiale Rekrutierung von Osteoklasten durch CPA hervorgerufen wird. Hierbei hat IL-1α eine Vermittlerrolle inne. Darüber hinaus scheint der Prozess der Osteoklastenformation durch CPA in seiner späteren Phase an ein Vorhandensein von PGE_2 gebunden zu sein, da eine cAMP Inhibierung die Osteoklastenformation signifikant hemmte (Nishihara et al. 1995).

1.4.2. *Porphyromonas gingivalis*

Die Spezies *Porphyromonas gingivalis* gehört zur Familie der Porphyromonadaceae, Gattung Porphyromonas. *Porphyromonas gingivalis* ist ein sprorenloses, sehr kurzes, nicht bewegliches, obligat anaerobes Stäbchen von 0,8-2,5µm x 0,5µm Größe. Es gehört zur Gruppe der schwarzpigmentierten, asaccharolytischen oder nur schwach saccharolytischen Stäbchenbakterien (Burdon et al. 1928). Der Keim produziert Essig-, Propion-, Isobutter-, Butter- und Isovaleriensäure mit Spuren von Bernsteinsäuren. Er bildet Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Kohlenhydrate werden nicht verstoffwechselt. Im oralen Milieu ist das bevorzugte Besiedelungsareal der gingivale Sulkus oder Zahnfleischtaschen. Das proteinreiche Sulkus- beziehungsweise Taschenexsudat und der niedrige Sauerstoffpartialdruck bieten ideale Bedingungen. Besonderes Interesse erlangte der Keim durch seine Rolle im Rahmen von Mischinfektionen und durch die Vielzahl an Virulenzfaktoren (MacDonald et al. 1956; Socransky & Gibbons 1965). In zahlreichen Studien wurde der Keim seither als mit der Parodontitis vergesellschaftet beschrieben. So wurde er vor allem bei Patienten mit chronischer Parodontitis regelmäßig nachgewiesen (Slots 1977; Tanner et al. 1979, Moore et al. 1985), aber auch bei jüngeren Patienten mit generalisierter sowie lokalisierter aggressiver Parodontitis gefunden (Loesche et al. 1981; Moore et al. 1985). Einen direkten Zusammenhang zwischen dem Entzündungsgrad und der Anzahl von *P.gingivalis* in der subgingivalen Plaque wurde demonstriert (Tanner et al 1979). Im Gegensatz dazu wird die Spezies bei gesunden Patienten und bei Patienten, die an Gingivitis leiden, seltener und in geringerer Anzahl gefunden (Slots & Ting 1999).

Die Spezies weist eine Vielzahl an Virulenzfaktoren auf. *P. gingivalis* besitzt in der Gruppe der schwarzpigmentierten Bacteroides die größte Fähigkeit, sich an epitheliale Zelloberflächen zu binden. Dies gelingt dem Keim durch Oberflächenstrukturen wie Pili und Fimbrien, Kapselmaterial und Membranvesikel. Darüber hinaus kann sich *P. gingivalis* an Erythrozyten binden, was in einer Hämagglutination mündet (Van Winkelhoff et al. 1988). Der Keim bildet ein besonderes Lipopolysaccharid, das eine endotheliale Freisetzung von E-Selektin verhindert und damit die Diapedese von PMN kaum vermittelt, wodurch ein wichtiger Schritt der Immunabwehr gemildert wird. Die Lipopolysaccharide können auch die Interleukin 1-Produktion aktivieren, was zu osteoklastisch vermittelter Knochenresorption führt (Gowen et al. 1983). Einige Stämme von *P. gingivalis* tragen auf ihrer Oberfläche Kapseln, welche die Phagozytose durch PMN verhindern (Van Steenbergen et al. 1985). Einige Zellwandbestandteile, aber auch Metaboliten wie organische Säuren, wirken toxisch, insbesondere auf

Fibroblasten und Epithelzellen. Darüber hinaus sind Proteasen von *P. gingivalis* bei der Parodontitis involviert. Hierbei ist insbesondere die Fähigkeit des Bakteriums zur Bildung von Gingipainen zu erwähnen. Dies sind trypsin-ähnliche Proteasen, die durch eine Vielzahl an Mechanismen zu parodontalen Destruktion beitragen. Man unterscheidet zwei Proteasen, Gingipain R und Gingipain K, die sich in der spezifischen Spaltung von Peptidbindungen unterscheiden (Potempa et al. 1995). Sie aktivieren das Kallikrenin/Renin-System und erhöhen dadurch die Gefäßpermeabilität, degradieren Fibrinogen und stören den Ablauf der Komplementkaskade, indem der Faktor C3 degradiert wird (Imamura 2003). Des Weiteren werden die Komplementfaktor C5- Rezeptoren der PMN durch die Gingipaine gespalten und hierdurch die Opsonierung verhindert (Jagels et al. 1996). Somit ist der Keim weitgehend vor Phagozytose durch PMN geschützt. Außerdem besitzt *P. gingivalis* eine bakterielle Kollagenase und hat eine trypsin-ähnliche Aktivität. Diese kann Kollagenasen aktivieren und sowohl den klassischen als auch den alternativen Komplementweg auslösen (Van Winkelhoff 1988). Der Keim degradiert IgA und IgG vollständig, was seine Fähigkeit, an Schleimhautoberflächen zu binden, zu begünstigen scheint.

1.4.3 *Prevotella intermedia*

Die Spezies *Prevotella intermedia* gehört zur Familie der Prevotellaceae, Gattung Prevotella. Die Gattung Prevotella wurde 1990 neu geschaffen und ging einerseits aus der *Bacteroides oralis*-Gruppe, andererseits aus der *Bacteroides melaninogenicus*-Gruppe hervor (Shah & Gharbia 1992). Mikroskopisch stellen sie kleine, kurze, kokkoide Stäbchen von 1-2,5µm x 0,5-1µm Größe dar. Wie *P. gingivalis* besitzt der Keim an seiner Oberfläche Pili und Fimbrien, die das Attachment des Keims begünstigen. Sie sind buttersäurenegativ, verwerten Kohlenhydrate und produzieren als Endprodukte Essig-, Bernstein-, Isovalerien- und Isobuttersäure. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wird nicht gebildet. Nach Anzucht bilden die Keime Kolonien in Form von schwarzbraunen Hämatinanhäufungen.

P. intermedia ist in der Mundhöhle ätiologisch mit bestimmten Gingivitisformen wie der NUG und der Schwangerschaftsgingivitis assoziiert, hierbei scheint das in dieser hormonellen Umstellungsphase verstärkt auftretende Hormon Progesteron als Wachstumsfaktor das erhöhte Vorkommen des Keims zu bewirken (Kornman und Loesche 1982). *P. intermedia* ist aber auch aus tiefen Taschen in Zusammenhang

mit chronischer und aggressiver Parodontitis isoliert worden (Slots 1977, Tanner et al. 1979, Van Winkelhoff 1988).

Als parodontopathogener Keim weist *P. intermedia* eine Reihe von Virulenzfaktoren auf. Bedingt durch seine Fimbrien ist der Keim in der Lage, Hämagglutination durchzuführen, ebenfalls fimbrienvermittelt ist die Invasion in orale Epithelzellen. Das von dem Bakterium produzierte Lipopolysaccharid induziert eine Zytokinbildung durch Wirtszellen und setzt dadurch eine Parodontitis in Gang. Eine Beeinflussung der Immunabwehr gelingt durch eine Unterdrückung der Lymphozytenproliferation, wodurch die Phagozytose eingeschränkt wird (Shenker et al. 1991). Der Keim verfügt über Proteasen, die Immunglobuline abbauen (Kilian 1981) und bildet Toxine wie Ammoniak und organische Säuren. Darüber hinaus aktiviert er das Komplementsystem über den klassischen und den alternativen Weg.

1.4.4 *Campyclobacter rectus*

Die Spezies *Campylobacter rectus* (früher *Wolinella recta*) gehört zur Familie der Campylobacteraceae, Gattung *Campylobacter*. *Campylobacter rectus* ist ein gramnegatives, bewegliches, anaerobes, gerades Stäbchen. Seine Virulenz beruht unter anderem auf einem gebildeten Lipopolysaccharid, das zur gleichen Familie wie das des Keims *A.actinomycetemcomitans* gehört und eine ähnliche Wirkung besitzt (Gillespie et al. 1992). Des Weiteren existiert ein S-layer Protein, das die Bindung an Epithelzellen fördert und den Keim gegenüber Komplementsystem und Phagozytose widerstandsfähiger macht. Ebenfalls zur Virulenz trägt ein Hitzeschockprotein bei, das die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 aus körpereigenen Zellen freisetzt (Dongari-Bagtzoglou & Ebersole 1996).

Der Keim konnte im oralen Milieu regelmäßig in erhöhten Konzentrationen aus subgingivalen Proben an erkrankten Parodontien bei chronischer Parodontitis isoliert werden (Lai et al. 1992; Moore et al. 1983). Des Weiteren wurde *C. rectus* häufiger und zahlreicher an Stellen mit aktiver parodontaler Destruktion gefunden (Rams et al. 1993). Nach erfolgreicher Behandlung findet sich das Bakterium weniger häufig und in geringeren Proportionen (Haffajee et al. 1988a). Auch tritt *C. rectus* gemeinsam mit anderen Parodontopathogenen vermehrt an Stellen mit refraktärer Parodontitis in Erscheinung (Haffajee et al. 1988b).

1.4.5 *Parvimonas micra*

Die Spezies *Parvimonas micra* (früher *Micromonas micra* oder *Peptostreptococcus micros*) gehört zur Familie der Peptostreptococcaceae, Gattung Peptostreptococcus.

Der Keim *P. micra* ist ein grampositiver, anaerober, kleiner, asaccharolytischer Kokkus. Neben Bernsteinsäure produziert er vorwiegend Propion- und Buttersäure. Man unterscheidet zwei Genotypen, den glatten und den rauen Genotyp. Diese unterscheiden sich im Wesentlichen im Vorhandensein von fibrillären Strukturen auf der Oberfläche des rauen Genotyps. Ein weiterer Unterschied besteht in der Hydrophobie des rauen Genotyps, wohingegen der glatte Genotyp eine hydrophile Oberfläche besitzt. Dies ist insofern von Bedeutung, da Adhäsion und Phagozytose von Bakterien von der Hydrophobie der Zelloberfläche abhängen (Absolom 1988). Verschiedene Virulenzfaktoren des Bakteriums sind bekannt, darunter seine Fähigkeit, über extrazelluläre Polysaccharide an Zellen des Gingivaepithels zu binden. Des Weiteren produziert *P. micra* ein IgG Fc-Bindungs-Protein, das eine nicht immunologische Bindung an IgG ermöglicht. Hierdurch erfolgt eine Verringerung der Opsonisierung und Phagozytose (Grenier & Michaud 1994). Auch die Produktion von Hydrogensulfit aus Gluthation (Carlsson et al. 1993), die Produktion von Hyaluronidase, wodurch Bestandteile der Grundsubstanz des Bindegewebes zerstört werden (Tam & Chan 1985), und die Expression von fibrillartigen Strukturen (van Dalen et al. 1993) tragen zur Parodontalpathogenität des Bakteriums bei. In der Mundhöhle wie auch an anderen Körperteilen wird *P. micra* mit gemischt anaeroben Infektionen in Verbindung gebracht (Finegold 1977). Bei Patienten mit Parodontitis wird der glatte Genotyp häufiger und in höheren Keimzahlen isoliert als an gesunden Parodontien (Moore et al 1983). An Stellen mit aktiven Läsionen ist sein Auftreten häufiger (Dzink et al. 1988). An erfolgreich behandelten Parodontien wurde er in geringerer Zahl und weniger häufig nachgewiesen (Haffajee et al. 1988a). Ein weiterer Hinweis auf seine Parodontopathogenität zeigt der Sachverhalt, dass Patienten mit schwerer Parodontitis im Vergleich zu Gesunden erhöhte Antikörpertiter gegen diese Spezies aufweisen (Tew et al. 1985).

1.4.6 *Dialister pneumosintes*

Die Spezies *Dialister pneumosintes* gehört zur Familie der Acidaminococcaceae, Gattung Dialister. *Dialister pneumosintes* ist ein obligat anaerobes, nicht bewegliches, nicht sporenbildendes, gramnegatives Stäbchen, mit einer Größe von 0,2-0,4 auf 0,3-9,6µm. Sein natürlicher Lebensraum sind die oberen Atemwege sowie die Mundhöhle (Oltisky et al. 1921; Moore et al. 1984). Daneben wurde die Spezies im Zusammenhang mit Mastoidinfektionen, Lungen- und Hirnabszessen sowie Peritoneal- und Vaginalinfektionen isoliert (Holdeman et al. 1984). Im oralen Milieu wurde

D. pneumosintes im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen beobachtet (Siqueira & Rocas 2002) und bei Kindern und Erwachsenen in subgingivalen Arealen mit Gingivitis und Parodontitis gefunden (Moore et al. 1982a; Moore et al. 1984). Eine Koinfektion des Keims mit *P. gingivalis* wurde mit einer akuten, generalisierten Parodontitis und fast immer mit Bluten auf Sondieren in Verbindung gebracht (Kamma et al. 2001). Eine neuere Studie assoziiert den Keim vor allem mit schweren Parodontopathien, wohingegen er bei milderen Formen der Erkrankung seltener in Erscheinung tritt (Contreras et al. 2000). Des Weiteren wurde ein vermehrtes Auftreten in Abhängigkeit vom Alter nachgewiesen. Die Häufung bei Patienten mittleren Alters korrespondiert mit dem erhöhten Vorkommen von schweren Parodontopathien bei Patienten dieser Altersgruppe (Ghayoumi et al. 2002).

1.5 Die Polymerase Kettenreaktion

Das Prinzip, auf dem die heutigen Varianten der Polymerase Kettenreaktion basieren, wurde 1988 eingeführt. Es basiert auf der Verwendung einer aus thermophilen Bakterien (*Thermus aquaticus*) isolierte DNA-Polymerase, welche den Denaturierungsprozess der DNA unbeschadet übersteht (Saiki et al. 1988).

Abb. 1 Taq-Polymerase

Diese so genannte Taq-Polymerase erfährt nach wie vor breite Anwendung (Abb. 1). Damit wurde eine schnelle, einfache und automatisierbare *in-vitro*-Amplifikation definierter DNA-Fragmente aus geringen Mengen heterogener DNA möglich. Diese technische Verbesserung hatte überaus großen Einfluss auf die gesamte weitere Entwicklung der Molekularbiologie und legte den Grundstein für molekulardiagnostische Verfahren in der Medizin. Seither wurde eine nahezu unüberschaubare Vielzahl

von PCR-Varianten entwickelt. Heute ist die PCR eine der wichtigsten Methoden in der molekularen Biologie und molekularen Medizin. Ihre ersten Anwendungen waren der Mutationsnachweis im Genom von Patienten mit Beta-Thalassämie (Wong et al. 1987) und Sichelzellanämie (Saiki et al. 1985) sowie der Nachweis proviraler DNA in Leukozyten (Abbott et al. 1988). Heute findet sie Verwendung in einem überaus breiten thematischen Spektrum, z. B. beim Nachweis von Viren oder Keimen, bei der Sequenzierung, dem Verwandtschaftsnachweis, der Erstellung von Transkriptionsprofilen und der Quantifizierung von Nukleinsäuren (Bloch 1991; Erlich 1989; Linz & Degenhardt 1990). Zudem lassen sich mit Hilfe der PCR in einfacher Weise beliebige Sequenzabschnitte des Nukleinsäurebestandes eines Organismus klonieren.
Zur Durchführung der PCR werden mehrere Komponenten benötigt. Diese sind:

- Die Original-DNA, die den zu vervielfältigenden Abschnitt enthält
- Zwei Primer, um Anfang und Ende des zu vervielfältigenden Abschnitts festzulegen
- DNA-Polymerase, die bei hohen Temperaturen nicht zerstört wird, um den festgelegten Abschnitt zu replizieren
- Nukleotide, die Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang
- Pufferlösungen, die eine für die DNA-Polymerase geeignete chemische Umgebung sicherstellen

Die Polymerase Kettenreaktion findet in einem so genannten Thermocycler statt. Diese Maschine erhitzt und kühlt die in ihr befindlichen Reaktionsgefäße präzise auf die Temperatur, die für den jeweiligen Schritt benötigt wird. Um Verdunstung zu verhindern, wird ein beheizbarer Deckel auf den Reaktionsgefäßen oder eine Ölschicht auf dem Reaktionsgemisch benutzt.
Der PCR-Prozess besteht aus einer Anzahl von 30 bis 50 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. *Denaturierung*: Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 94-96°C erhitzt, um die Stränge zu trennen. Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt, um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben und nur noch Einzelstränge vorliegen.

2. *Primerhybridisierung* (*primer annealing*): Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass die Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können. Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt normalerweise 2-3°C unter ihrem Schmelzpunkt, typischerweise zwischen 50 und 65°C. Wird die Temperatur falsch gewählt, kann das dazu führen, dass die Primer sich nicht (Temperatur zu hoch) oder an falschen Stellen (Temperatur zu niedrig) an der Ausgangs-DNA anlagern.
3. *Elongation*: Schließlich füllt die DNA-Polymerase die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Der Primer wird nicht wieder abgelöst, da er den Anfang des Einzelstrangs bildet. Die Temperatur hängt nun von der verwendeten DNA-Polymerase ab (zwischen 68 und 72°C). Die Zeit, die dieser Schritt benötigt, hängt ebenfalls von der verwendeten DNA-Polymerase und der Länge des DNA-Fragments, das vervielfältigt werden soll, ab.

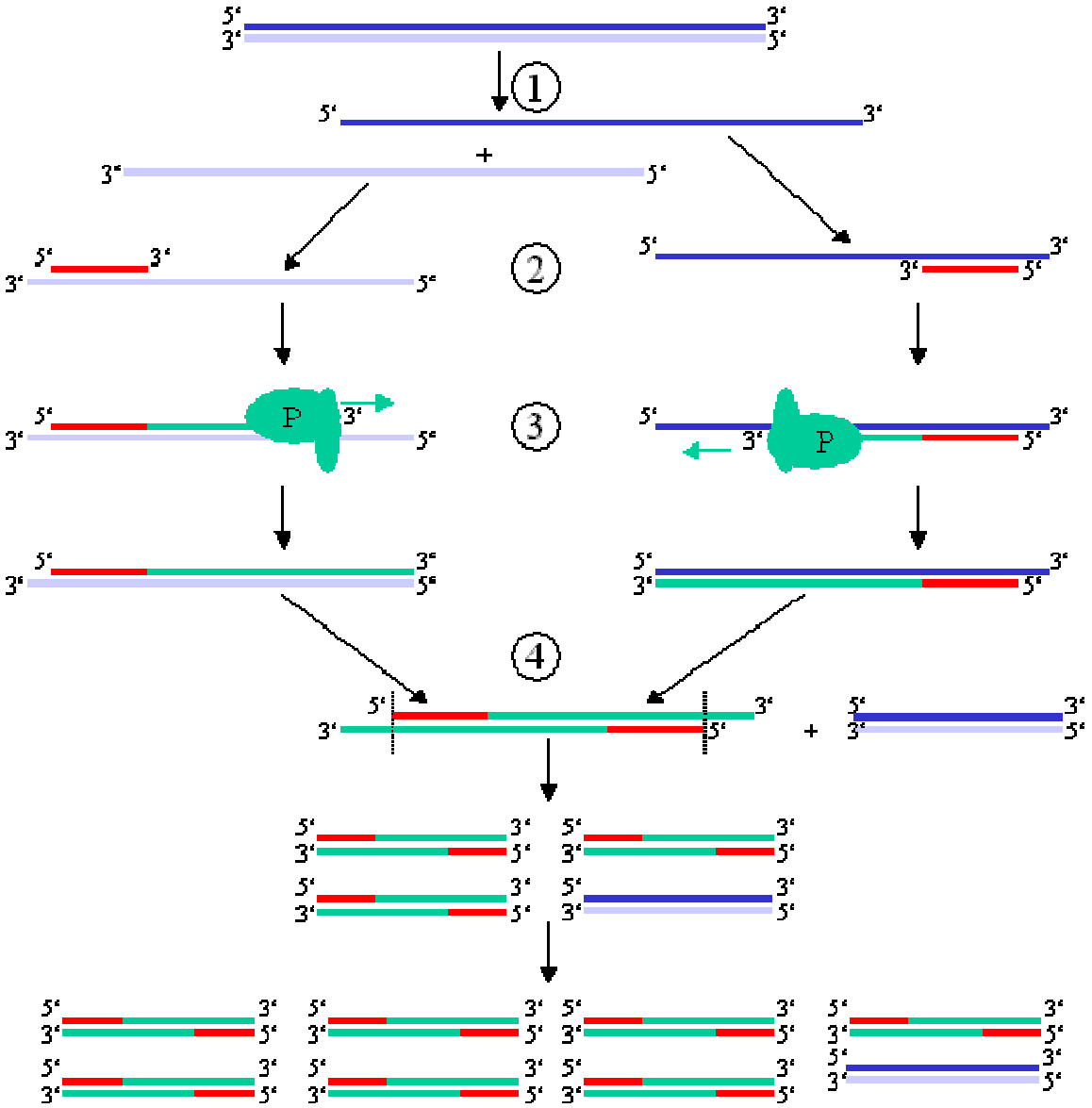


Abb.2 Schematische Darstellung des PCR-Zyklus.

(1) Schmelzen (*Denaturierung*) bei ca. 96°C.

(2) Anlagerung (*Primerhybridisierung*) bei ca. 65°C.

(3) Verlängerung (*Elongation*) bei ca. 72°C (P=Polymerase).

(4) Der erste Zyklus ist beendet.

Die beiden entstandenen DNA-Stränge bilden die Vorlage für den nächsten Durchlauf. Die Menge an DNA verdoppelt sich also mit jedem neuen Zyklus.

1.5.1 Quantitative Real-time PCR

Die quantitiative real-time PCR ist eine auf dem ursprünglichen Verfahren der PCR basierende Methode. Sie stellt eine Anwendung dar, die eine Quantifizierung von bestimmten Nukleinsäuren in einer Probe ermöglicht. Hierbei wird die Produktakkumulation in Echtzeit verfolgt, um die exponentielle Phase der Reaktion zu ermitteln. Gemessen wird die Akkumulation durch Fluoreszenzlicht, das analog zur Produktmenge zunimmt (Heid et al. 1996; Higuchi et al. 1993).

1.5.1.1 Methoden

1.5.1.1.1 Interkalierende Farbstoffe

Die einfachste Möglichkeit der Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von DNA bindenden Farbstoffen wie Ethidiumbromid oder SYBR® Green.
Diese Fluoreszenzfarbstoffe lagern sich in die DNA ein beziehungsweise binden an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da zwischen verschiedenen PCR-Produkten nicht unterschieden werden kann.

1.5.1.1.2 FRET-Sonden

Durch die Verwendung fluorophormarkierter Oligonukleotide als Sonden, die auf der Zielsequenz hybridisieren, lassen sich PCR-Produkte auch sequenzspezifisch detektieren (Cardullo et al. 1988; Clegg 1995; Wu & Brand 1994). Hierbei wird entweder eine produktabhängige Abnahme der Löschung einer Reporter-Fluoreszenz oder die Zunahme des Resonanzenergie-Transfers von einem Donor- auf ein Akzeptorfluorophor gemessen (Clegg 1992; Stryer & Haugland 1967). Dieses Prinzip wird unter dem Begriff Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) geführt. Hierbei gibt es verschiedene Varianten.

Hybridisierungssonden

Das Sondensystem besteht hier aus einem Paar terminal markierter Sonden, die an unmittelbar benachbarten Stellen auf der Zielsequenz hybridisieren, so dass der Donorfluorophor der einen Sonde in räumlicher Nähe des Akzeptorfluorophors der anderen Sonde positioniert ist. Nur das Donorfluorophor absobiert Licht und wird dadurch angeregt. Zur Anregung wird Licht einer Wellenlänge verwendet, welches nur vom Donorfluorophor, nicht jedoch vom Akzeptorfluorophor absorbiert wird. Da sich

Donor- und Akzeptorfluorophor in direkter Nachbarschaft befinden, ist ein Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer vom angeregten Donor- auf das Akzeptorfluorophor möglich. Dieser gibt die übertragene Energie schließlich als Fluoreszenzlicht ab (Wittwer et al. 1997).

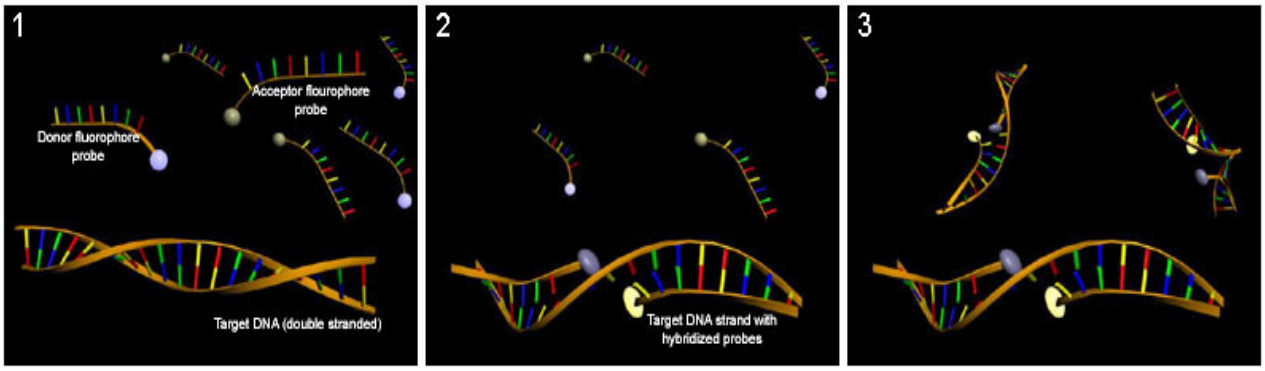


Abb.3 Hybridisierungssonden

Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der real-time PCR und LightCycler®-Sonden. (1) Einsatz von LightCycler®-Sonden, die mit 2 verschiedenen FRET-Fluorophoren markiert wurden. (2) Während eines PCR-Zyklus hybridisieren die Sonden mit dem komplementären DNA-Strang und ermöglichen somit eine Fluoreszenz des Akzeptors. (3) Die Akzeptor-Fluoreszenz steigt proportional mit der Konzentration komplementärer DNA

Hydrolysesonden

Die auch als TaqMan-Sonden bezeichneten Oligonukleotide sind 5'-terminal mit einem Reporterfluorophor und intern mit einem Quencher markiert. Während der Verlängerung eines Primers trifft die hier verwendete *Taq* DNA-Polymerase auf die Sonde, die durch die endonukleolytische Aktivität des Enzyms hydrolysiert wird. Dabei wird der Reporterfluorophor räumlich vom Quencher getrennt und fluoresziert bei Anregung (Gibson et al. 1996; Holland et al. 1991).

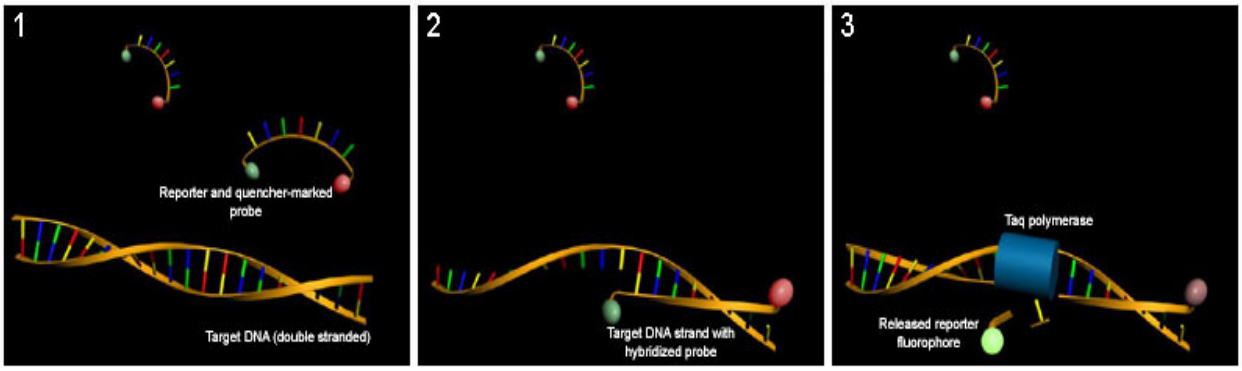


Abb. 4 Hydrolysesonden

Quantifizierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der real-time PCR und TaqMan®-Sonden. (1) Die Fluoresezenz des Reporter-Fluorophors wird bei intakten TaqMan®-Sonden durch einen Quencher durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) unterdrückt. (2) Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang, die Reporter-Fluoreszenz bleibt zunächst unterdrückt. (3) Die Taq-Polymerase baut während eines PCR-Zyklus das 5'-Ende der Sonde ab. Der abgespaltene Reporter ist jetzt zur Fluoreszenz befähigt

Molecular Beacons

Diese Sonden sind beidseitig terminal modifiziert. Sie tragen an dem einen Ende einen Reporterfluorophor und an dem anderen Ende einen Quencher. Ihre terminalen Sequenzen sind zueinander komplementär, so dass diese Sonden
eine Art Ringstruktur bilden. Diese wird als *stem-loop*-Struktur bezeichnet. Die Sonde hybridisiert während der Primerbindungsphase mit dem komplementären Strang des PCR-Produkts, dabei wird die Struktur geöffnet, wodurch Quencher und Reporterfluorophor räumlich getrennt werden. Als Folge hiervon kann der Reporterfluorophor nach Anregung fluoreszieren (Kostrikis et al. 1998; Tyagi et al. 1998; Tyagi & Kramer 1996).

1.6 Ziel der Studie

Das Ziel der experimentellen Gingivitisstudie an jüngeren und älteren Probanden war die Bestimmung der subgingivalen Mikroflora durch Dunkelfeldmikroskopie und quantitativer real-time PCR.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1 Probanden

An der Studie nahmen insgesamt 21 Probanden teil. Sie wurden entsprechend ihres Alters in zwei Gruppen eingeteilt: Die erste Gruppe umfasste 12 Personen (9 Männer, 3 Frauen) im Alter von 18 bis 30 Jahren, die zweite 9 Probanden (5 Männer, 4 Frauen) zwischen 46 und 77 Jahren.

Als Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie galten folgende Kriterien:

a) Die Probanden mussten allgemeinmedizinisch gesund sein.
b) Sie sollten über ein nahezu vollbezahntes Gebiss (mindestens 20 Zähne) ohne umfangreiche prothetische Rekonstruktionen verfügen. Probanden über 48 Jahre mussten wenigstens 8 Zähne im Bereich von 15 bis 25 besitzen.
c) Die parodontale Sondierungstiefe durfte generell 4 mm nicht überschreiten.
d) Akute Entzündungszeichen, spontane Blutung, Schwellung, Schmerzen, purulentes Exsudat oder Zahnlockerungen von Grad II oder III durften nicht vorliegen.
e) Es durften keine aktuelle orthodontische Behandlung (z.B. Brackets) oder funktionelle Störungen vorhanden sein.
f) Eine erfolgte antibiotische Behandlung oder Therapie mit entzündungshemmenden oder desinfizierenden Mitteln in einem Zeitraum von sechs Monaten vor Beginn der Studie führte zum Ausschluss.
g) Eine Schwangerschaft zu Beginn der Studie war mit der Teilnahme nicht vereinbar.
h) Die Probanden mussten Nichtraucher sein.

Alle Probanden wurden vor Beginn der Studie eingehend informiert und gaben ihre schriftliche Einwilligung. Die Teilnahme an der Studie erfolgte freiwillig.

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission des Fachbereiches Humanmedizin der Phillips-Universität Marburg genehmigt.

2.2 Studiendesign

Nach einer eingehenden zahnärztlichen Untersuchung wurden die Probanden zu Mundhygienemaßnahmen motiviert und instruiert, und es wurde eine professionelle Zahnreinigung vorgenommen. Diese wurde bei Bedarf wiederholt, bis eine exzellente Mundhygiene vorlag (API unter 20 %) (Lange 1978). Anschließend wurde eine Baseline-Untersuchung durchgeführt. Diese umfasste die klinische Untersuchung und die Entnahme von Sulkusflüssigkeit. Daraufhin wurden die Probanden aufgefordert, für einen Zeitraum von 14 Tagen jegliche Mundhygienemaßnahmen einschließlich des Gebrauchs von Kaugummis und abrasiver Nahrung zu unterlassen. Nach dieser Zeit hatte sich bei allen Probanden eine experimentelle Gingivitis entwickelt. Die Untersuchungen wurden wiederholt und eine eingehende professionelle Zahnreinigung mit Fluoridierung mit Motivation und Instruktion durchgeführt. Eine Abschlussuntersuchung erfolgte 14 Tage später (Abb.5).

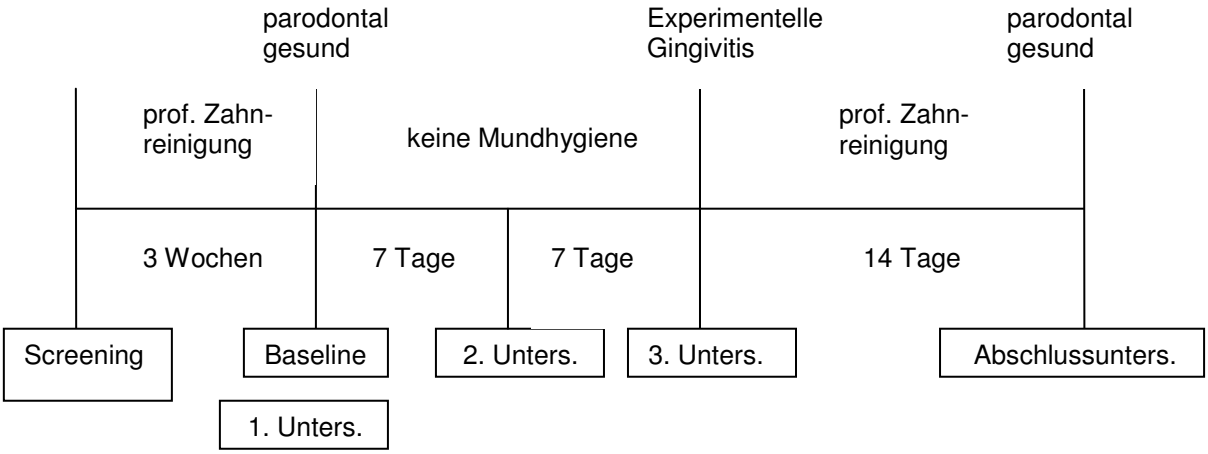


Abb. 5 Zeitlicher Ablauf der Studie

2.3 Klinische Untersuchung

Die klinische Untersuchung erfolgte standardisiert an allen Zähnen jeweils mesial, distal, bukkal, palatinal bzw. lingual zu jedem Untersuchungszeitpunkt nach folgenden Kriterien:

Die **Sondierungstiefen** wurden mit der Parodontalsonde WHO TRS 621 bestimmt und 30 Sekunden danach eine etwaige Blutung festgestellt.

Die **Gingivalen Rezessionen** wurden von der Schmelz-Zement-Grenze bis zum Gingivarand gemessen.

Der **Attachmentlevel** wurde vom Taschenboden bis zur Schmelz-Zement-Grenze bestimmt. Lagen an Zähnen oder einzelnen Zahnflächen gingivale Rezessionen vor, so wurde der Attachmentlevel aus gingivaler Rezession und Sondierungstiefe berechnet.
Der **Gingival Index** nach Löe & Silness (Löe & Silness 1963) diente der Beurteilung des Entzündungsgrades.

Grad 0 entspricht einer entzündungsfreien Gingiva
Grad 1 entspricht einer geringen Entzündung, die mit leichten Farb- und Oberflächenveränderungen einhergeht. Keine Blutung nach Sondierung
Grad 2 entspricht einer mäßigen Entzündung, die sich durch Rötung, Ödem und Hypertrophie der Gingiva sowie Blutung nach Sondierung auszeichnet.
Grad 3 entspricht einer schweren Entzündung mit starker Rötung, Hypertrophie und Ulzerationen. Es besteht eine Tendenz zur spontanen Blutung.

Der **Plaque Index** nach Silness & Löe (Silness & Löe 1964) bewertet den Plaquebefall und die Plaquedicke im Zahnhalsbereich unter Berücksichtigung des Sulkus, der Zahnoberfläche und des Gingivarandes.

Grad 0 entspricht keiner Plaque
Grad 1 entspricht einem dünnen Plaquefilm auf der Gingiva und den benachbarten Zahnflächen, der nach Abstreichen mit der Sonde erkennbar ist.
Grad 2 entspricht einer mäßigen Plaquemenge auf den Zahnflächen und entlang des Gingivarandes, die mit dem Auge erkennbar ist.
Grad 3 entspricht sehr viel Plaque

2.4 Mikrobiologische Untersuchung

2.4.1 Dunkelfeldmikroskopie

Für die mikrobiologische Untersuchung der Sulkusflüssigkeit mittels Dunkelfeldmikroskopie in der Baseline- sowie in allen weiteren Untersuchungen wurde Sulkusflüssigkeit an den mesialen Flächen der Zähne 14, 11, 21 und 24 entnommen. Die entsprechenden Stellen wurden dafür mit Watterollen sorgfältig trockengelegt und zu-

sätzlich mit Luftstrom getrocknet. Vorhandene supragingivale Plaque wurde vorsichtig entfernt. Sterile Papierspitzen (Firma Antaeos, München) wurden in den Sulkus eingeführt und dort für 30sec belassen. Danach erfolgte die sofortige Überführung in ein steriles Eppendorf-Cap mit 0,05ml Kulturlösung. Die Kulturlösung wurde in Anlehnung an Listgarten und Helldèn (1978) folgendermaßen hergestellt: 200 mg Gelatine wurden in 20 ml steriler Ringer-Lösung gelöst und dabei bis knapp unter den Siedepunkt kurzzeiterhitzt. Um die Gefahr eines Absterbens oder unkontrollierten Vermehrens einiger Bakterien oder den Verlust ihrer Beweglichkeit so klein wie möglich zu halten, wurden die Proben innerhalb einer Stunde ausgewertet.

Für die Auswertung wurde ein Tropfen der Plaquesuspension mit einer sterilen Pipette auf einen sauberen Objektträger gebracht und mit einem sauberen Deckgläschen überdeckt. Das Deckgläschen wurde gegen den Objektträger gedrückt und überschüssige Lösung abgesaugt.

Die Auswertung erfolgte mit einem Dunkelfeldmikroskop (Orthoplan, Firma Leitz, Wetzlar) bei einer 1000-fachen Vergrößerung. Jeweils 200 Keime aus einem zufällig ausgewählten Ausschnitt des Dunkelfeldes wurden nach morphologischen Kriterien klassifiziert.

In Anlehnung an Listgarten und Helldèn (1978) wurden die Bakterien nach ihrer Morphologie in acht Gruppen eingeteilt:

Kokken und kokkoide Zellen

Runde oder ovale Zellen mit einem Durchmesser von ca. 0,5-1,0 µm. Zellen, die maximal zweimal so lang wie breit sind, fallen in diese Kategorie.

gerade Stäbchen

Cirka 1 µm breite und höchstens sechsmal so lange wie breite Zellen. Größere Stäbchen sind innen dunkel und außen von einer feinen, hellen Linie umgeben. Kleine Stäbchen sind im Dunkelfeld vollständig hell. Die Zellen haben immer rechtwinklige oder leicht abgerundete Zellenden. Es finden sich keine Anzeichen einer Begeißelung.

bewegliche Stäbchen

In dieser Kategorie werden alle beweglichen Keime mit Ausnahme der Spirochäten zusammengefasst: bewegliche gerade oder gebogene Stäbchen, bewegliche fusiforme Bakterien, bewegliche Filamente oder bewegliche kokkoide Zellen.

kleine Spirochäten

Es handelt sich hier um schraubenförmig gewundene, bakterienähnliche Organismen bis zu einer Länge von maximal 10 µm. Diese Spirochäten sind sehr dünn und haben sehr enge und relativ viele Windungen.

mittlere Spirochäten

Ebenfalls sehr dünne und bis zu 15 µm lange Spirochäten. Es fällt auf, dass sie etwas weitere Windungen aufweisen.

große Spirochäten

Sie sind bis zu 20 µm lang und relativ dick (0,5 µm). Sie haben eine doppelt konturierte, helle äußere Begrenzung sowie einige, teilweise wellenartige, Windungen.

fusiforme Bakterien

Sehr schlanke, an ihren Enden spitz zulaufende „spindelförmige“ Stäbchen, die im Dunkelfeld völlig weiß erscheinen. Sie sind cirka 5-10 µm lang und 0,5 µm breit.

Filamente

Filamente sind große, gerade Stäbchen. Alle geraden Stäbchen, die mehr als sechsmal so lang wie breit sind, fallen in diese Kategorie. Filamente erscheinen innen dunkel und sind von einer feinen, hellen Linie begrenzt. Manchmal können Verzweigungen oder eine Ausbildung von Septen beobachtet werden. Auch die geraden Stäbchen, die eine Septenbildung oder Verzweigungen aufweisen, werden dieser Kategorie zugeordnet.

2.4.2 Quantitative real-time PCR

Für die mikrobiologische Untersuchung der Sulkusflüssigkeit mittels PCR in der Baseline sowie in allen weiteren Untersuchungen wurde von jedem Patienten an drei beliebigen Stellen Sulkusflüssigkeit entnommen. Dies erfolgte nach gründlicher Plaqueentfernung mit sterilen Papierspitzen, die für 30 Sekunden im Sulkus belassen wurden. Nach sofortiger Überführung in Eppendorf-Caps mit RFT (Syed & Loesche 1978) wurden die gesammelten Proben bei -80°C bis zur Auswertung gelagert.

Im Rahmen der Auswertung erfolgte die Analyse der Proben auf den Nachweis von 6 parodontopathogenen Keimen mittels quantitativer real-time PCR. Im einzelnen handelte es sich um die Keime *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (früher *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia,*

Campylobacter rectus, Dialister pneumosintes und *Parvimonas micra*. Ferner wurde eine Erfassung der Gesamtbakterienzahl vorgenommen. Für die Auswertung erfolgte die Isolierung der bakteriellen DNA durch den DNeasy tissue kit (Quiagen, Hilden, Germany) nach Angaben des Herstellers (Nonnenmacher et al 2004).

Die zur Auswertung verwendeten Primer und Sonden sind in der unten stehenden Tabelle dargestellt. Die Primer und Sonden wurden mittels der Primer Express Software V.1.0 (Applied-Biosystems Int., Lincoln, USA) ausgewählt und basieren auf den jeweiligen bakterienspezifischen konstanten Bereichen des 16s rRNA Gens. Die Identifikation dieser konstanten Bereiche der jeweiligen Bakterienart erfolgte mittels der ClustalW Software. Die Fluoreszenzfarbstoffe am 5´ bzw. 3´-Ende der Sonden sind FAM (6-carboxyflourescein) beziehungsweise TAMRA (6-carboxytetramathylrhodamine). Speziesspezifische Primer und Sonden wurden auf Grundlage der variablen Regionen der 16S r-RNAs von *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *D. pneumosintes*, *C. rectus* und *P. micra* designt. Zusätzlich wurde ein universelles Primer-Paar verwendet, um die Gesamt-DNA aller bakteriellen Spezies, die in den Proben vorhanden waren, zu ermitteln. Alle Primer und Sonden wurden auf Kreuzhybridisierung mit anderen bakteriellen Genen mit dem database similarity search-Programm BLAST (http://dove.embl-heidelberg.de/Blast2/) untersucht.

Primer and Probe	Sequence (5'-3')	Strain	Acession numbers*
Universal **			
Forward	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA		
Reverse	TGCGGGACTTAACCCAACA		
Probe	CACGAGCTGACGACA(AG)CCATGCA		
A. actinomycetemcomitans		MCCM 200	M75039
Forward	CAAGTGTGATTAGGTAGTTGGTGGG		
Reverse	CCTTCCTCATCACCGAAAGAA		
Probe	ATCGCTAGCTGGTCTGAGAGGATGGCC		
D. pneumosintes		ATCC 33048	X82500
Forward	GAGGGGTTTGCGACTGATTA		
Reverse	CCGTCAGACTTTCGTCCATT		
Probe	CACCAAGCCGACGATCAGTAGCCG		
M. micros		MCCM 3096	D14143
Forward	AAACGACGATTAATACCACATGAGAC		
Reverse	ACTGCTGCCTCCCGTAGGA		
Probe	TCAAAGATTTATCGGTGTAAGAAGGGCTCGC		
P. gingivalis		MCCM 3199	L16492
Forward	TGCAACTTGCCTTACAGAGGG		
Reverse	ACTCGTATCGCCCGTTATTC		
Probe	AGCTGTAAGATAGGCATGCGTCCCATTAGCTA		
P. intermedia		ATCC 25611	L16468
Forward	CCACATATGGCATCTGACGTG		
Reverse	TCAATCTGCACGCTACTTGG		
Probe	ACCAAAGATTCATCGGTGGAGGATGGG		
C. rectus		MCCM 818	AF550659
Forward	TATAACAACTAAATTGATACGCCGA		
Reverse	GCCTCATCCTACACCGAAAA		
Probe	GGTCAAGGGAGCGCTTGCGC		

*GenBank accession numbers are available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez

** Yang *et al.,* 2002

Tab. 2 Bakterienarten, verwendete Primer und Sonden

Die Proben wurden in einem 25µl Reaktionsgemisch doppelt untersucht. Dieses enthielt 2,5µl template DNA, 2,5 µl TaqMan Universal PCR MasterMix, 1,5 µl $MgCl_2$, 1µ dNTP, 12,5 pmol des jeweiligen Vorwärts- und Rückwärtsprimers und 3,5 pmol der Sonde. Die verwendeten Zyklusbedingungen waren wie folgt: 95°C für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen bei 95°C für 15 Sekunden und 60°C für eine Minute. Während der Primeranlagerung und Verlängerung wurde die real-time PCR Amplifikation durch

den ABI Prism 7700 SDS durch quantitative Analyse der Fluoreszenzemission überwacht. Das Signal des Reporterfarbstoffs (FAM) wurde relativ zum Referenzfarbstoff (ROX), wie er im PCR Mastermix vorhanden war, gemessen. Alle PCRs wurden doppelt ausgeführt.

2.5 Statistische Evaluation

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programmsystems SPSS durchgeführt. Die Hypothesen der Gleichheit der Mittelwerte zu benachbarten Zeitpunkten wurden bei Vorliegen der Normalverteilung mit dem t-Test für verbundene Stichproben getestet. Lag keine Normalverteilung vor, wurde ein Wilcoxon -Test für verbundene Stichproben angewendet. Der Test auf Gruppenunterschiede der zwei Gruppen erfolgte mit dem t.Test der Varianzanalyse bzw. mit dem Mann-Whitney-U-Test. Die Rangkorrelation nach Spearman wurde angewendet, um den Zusammenhang zwischen den einzelnen Parametern zu ermitteln. Der Korrelationskoeffizient r zeigt dabei den Grad des Zusammenhangs für eine entsprechende Parameterkombination an. Für die Korrelationskoeffizienten wurde ein Test auf r = 0 durchgeführt. Bei signifikanten Ergebnissen kann von einem signifikanten Zusammenhang zwischen den Parametern ausgegangen werden.
Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

3. ERGEBNISSE

Alle im Screening ausgewählten Probanden beendeten die Studie.

3.1 Klinische Ergebnisse

Der **Plaque Index** (PI) lag in der Gruppe der 18-30-Jährigen zur Baseline- Untersuchung nahe 0. Während der experimentellen Gingivitis konnte ein statistisch signifikanter Anstieg zwischen den einzelnen Untersuchungen beobachtet werden (Abb. 6 und Tab. 3). Die Zunahme war während der ersten Woche stärker als in der zweiten. In der Gruppe der 46-77-Jährigen zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Anstieg des PI im Verlauf der zweiwöchigen experimentellen Gingivitis im Gruppenvergleich wurden zur Baseline Untersuchung gesunde Verhältnisse in beiden Gruppen ermittelt. Die jüngere Gruppe wies sowohl bei der zweiten als auch bei der dritten Untersuchung einen niedrigeren PI-Wert auf als die ältere Gruppe, jedoch sind diese Unterschiede statistisch nicht signifikant (Abb. 7).

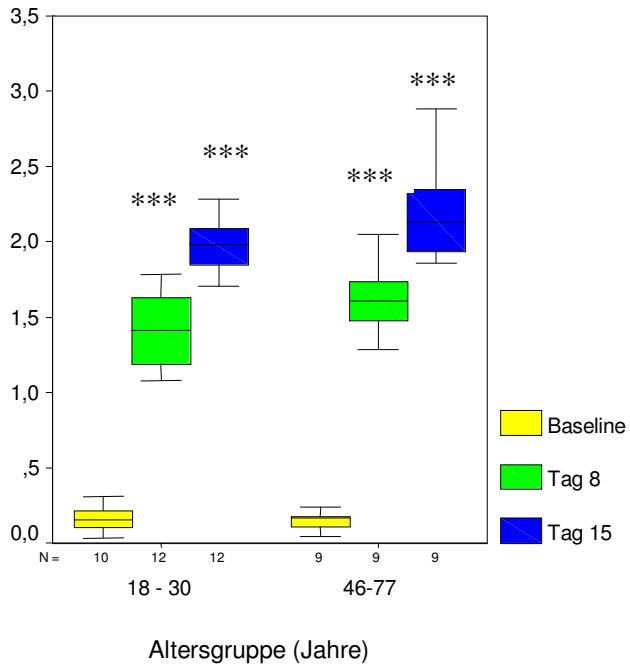


Abb. 6: Plaque Index: Mittelwerte der Indizes über alle Zähne

Der *t-Test für verbundene Stichproben* auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.

* signifikant p<0,05; ** sehr signifikant p<0,005; *** hoch signifikant p<0,001

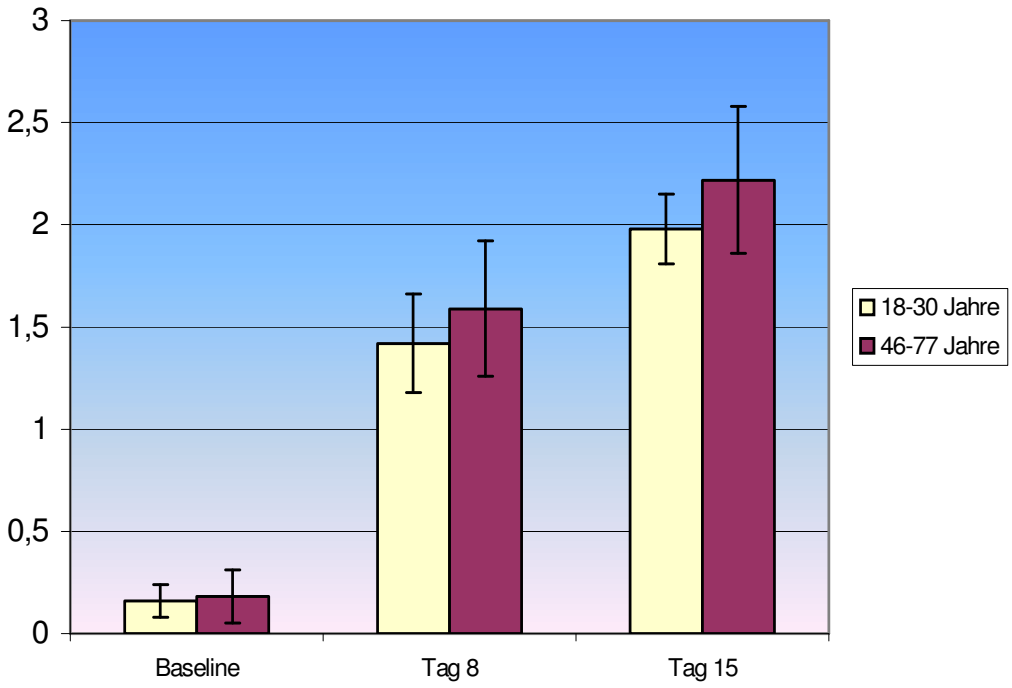


Abb. 7. Plaque Index Gruppenunterschiede

Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Altersgruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

Die Betrachtung der einzelnen Probanden (Abb. 23 und 24 im Anhang) ergab, dass der PI bei allen Teilnehmern von einem Baseline Wert nahe 0 während der experimentellen Gingivitis anstieg. Dabei erfolgte die Zunahme vor allem in der ersten Untersuchungswoche. Am Tag 15 wiesen zwei Drittel der älteren Probanden einen PI>2 auf, bei den jüngeren waren dies lediglich ein Drittel.

Für den **Gingiva Index** (GI) konnte in der Gruppe der 18-30-Jährigen zur Baseline-Untersuchung ein Wert von 0,16 ermittelt werden (Abb. 8 und Tab. 3). Während der experimentellen Gingivitis zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg zwischen den einzelnen Untersuchungen. Die Zunahme war während der ersten Woche stärker als in der zweiten.

In der Gruppe der 46-77-Jährigen wurde ebenfalls ein signifikanter Anstieg des Gingiva-Indexes im Verlauf der zweiwöchigen experimentellen Gingivitis festgestellt.

Im Gruppenvergleich wurden zur Baseline Untersuchung gesunde Verhältnisse in beiden Gruppen beobachtet. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen lagen

nicht vor. Die Werte in der älteren Gruppe waren zu allen Zeitpunkten geringfügig höher als in der jüngeren (Abb. 9).

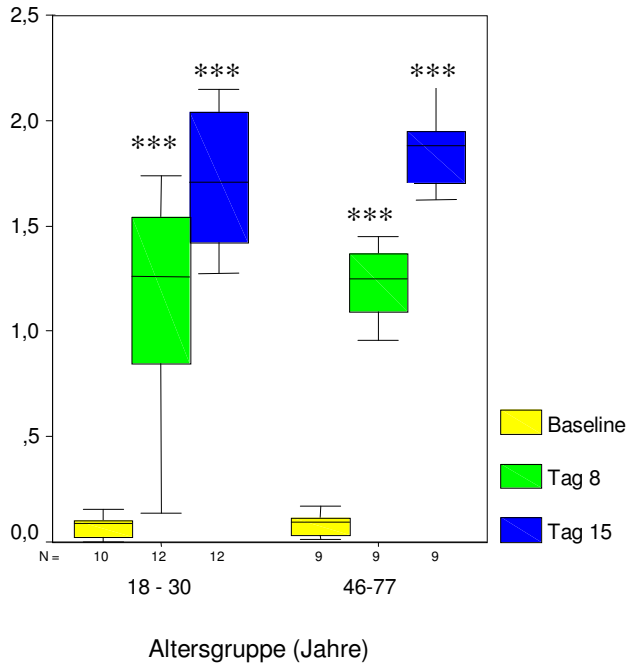


Abb. 8 Gingival Index: Mittelwerte der Indizes über alle Zähne

Der *t-Test für verbundene Stichproben* auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.
* signifikant p<0,05; ** sehr signifikant p<0,005; *** hoch signifikant p<0,001

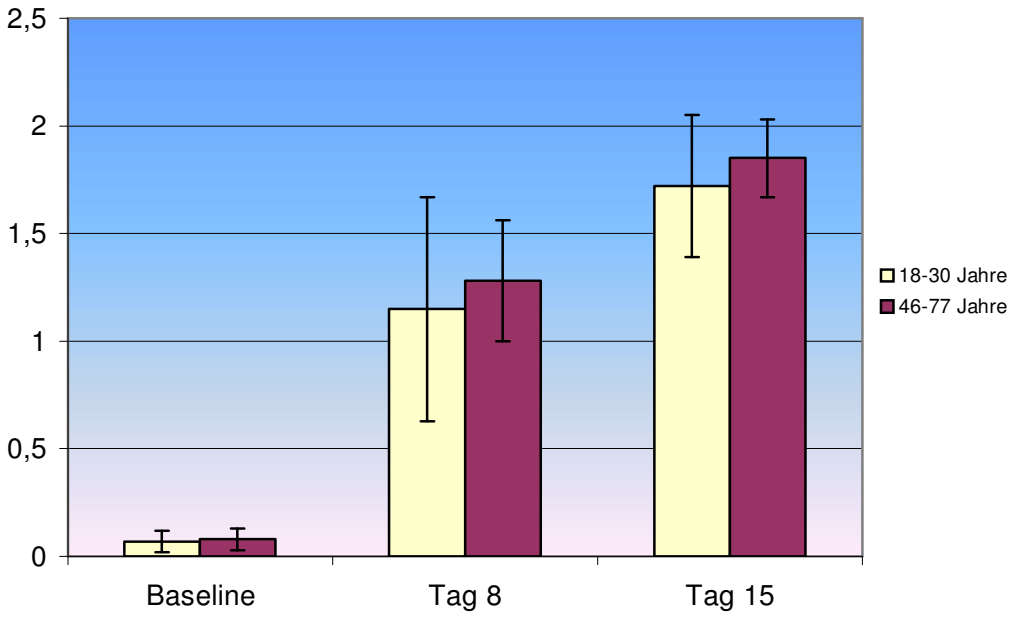


Abb. 9 Gingival Index: Gruppenunterschiede

Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Altersgruppen
zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied

In beiden Gruppen ließ sich bei allen Teilnehmern außer bei zwei Probanden (Nr. 2 und 21) ein stärkerer Anstieg des Gingival Indexes in der ersten Woche ausmachen (Abb. 26 und 27 im Anhang).

Für das **Bluten nach Sondieren (BNS)** lag der Ausgangswert in der jüngeren Gruppe bei 0,15. Das heißt, dass 15 % der sondierten Flächen eine Blutung aufwiesen. Sowohl am Tag 8 als auch am Tag 15 konnte ein signifikanter Anstieg der Blutungspunkte ermittelt werden. Für die Gruppe der älteren Probanden wurde, ausgehend von einem gleichen Baseline-Wert, ebenfalls eine signifikante Zunahme in beiden Untersuchungswochen beobachtet (Abb.10). Im Gruppenvergleich zeigten die jüngeren Probanden sowohl zum zweiten als auch zum dritten Zeitpunkt geringere Werte als die älteren. Die vorhandenen Gruppenunterschiede waren statistisch nicht signifikant (Abb. 11).
Am Tag 15 wiesen 7 von 12 der jungen Probanden (58,3%) ein BNS von mehr als 0,5 auf, d.h. es bluteten mehr als die Hälfte der untersuchten Flächen beim Sondieren. Bei den Älteren wurde dieser Wert von 8 der 9 Teilnehmer (88,9%) überschritten (Abb. 28 und 29 im Anhang).

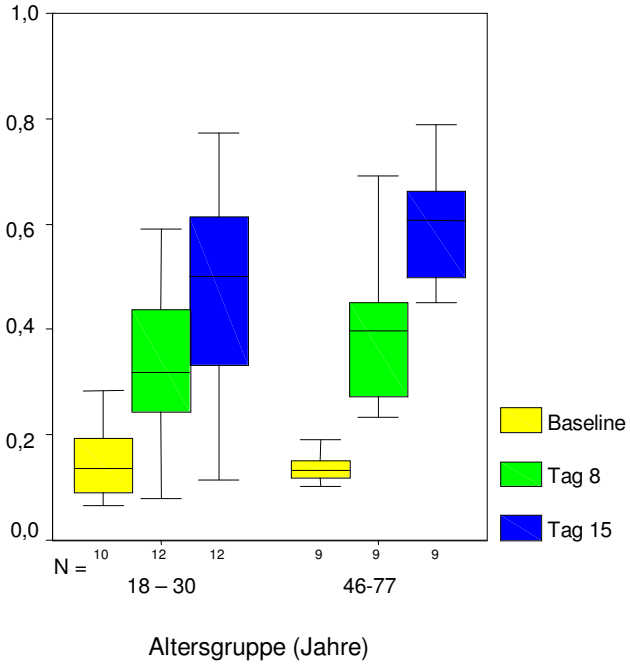


Abb.10 Bluten nach Sondieren

Der *t-Test für verbundene Stichproben* auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.
* signifikant p<0,05; ** sehr signifikant p<0,005; *** hoch signifikant(p<0,001)

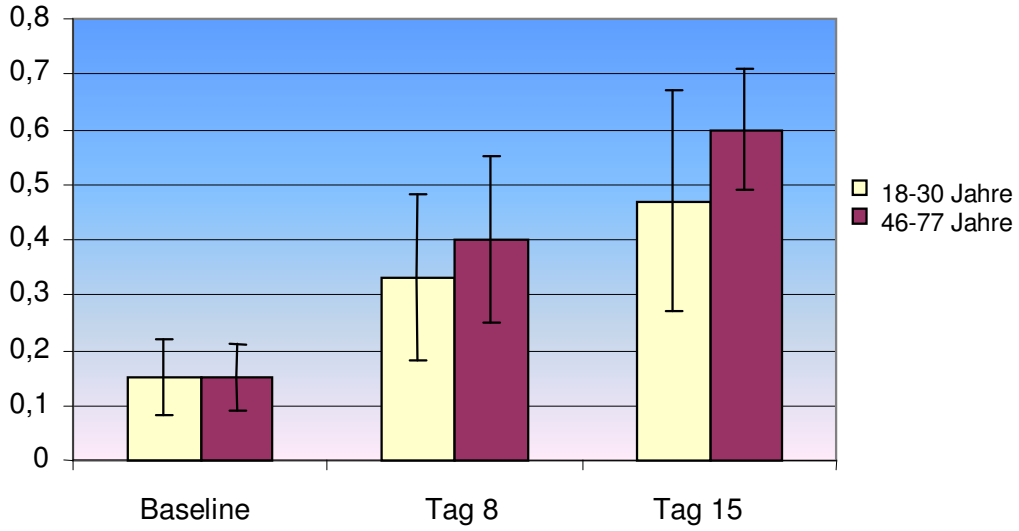


Abb. 11 Bluten nach Sondieren: Gruppenunterschiede

Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Altersgruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

	Plaque Index				Gingival Index				Bluten nach Sondieren			
	18-30 Jahre		46-77 Jahre		18-30 Jahre		46-77 Jahre		18-30 Jahre		46-77 Jahre	
	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD	x	SD
Tag 0	0,07	0,05	0,08	0,05	0,16	0,08	0,18	0,13	0,15	0,07	0,15	0,06
Tag 8	1,15*	0,52	1,28*	0,28	1,42*	0,24	1,59*	0,33	0,33*	0,15	0,4*	0,15
Tag15	1,72*	0,33	1,85*	0,18	1,98*	0,17	2,22*	0,36	0,47*	0,2	0,6*	0,11

Tab. 3: Plaque Index, Gingival Index, Bluten nach Sondieren

x= Mittelwert, SD= Standardabweichung

t-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten zeigt signifikante Anstiege in beiden Gruppen (*, $p<0.05$)

t-Test der Varianzanalyse auf Unterschiede zwischen den Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied

Bei den jüngeren Probanden konnten im entzündungsfreien Zustand **Sondierungstiefen** von 2,18 ± 0,25 erhoben werden. Während der experimentellen Gingivitis nahm dieser Parameter statistisch signifikant zu. In der Gruppe der 46-77-Jährigen lag der Baseline Wert bei 2,17 ± 0,3 und stieg im Verlauf der Studie statistisch signi-

fikant an (Abb. 12). Im Gruppenvergleich konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 13).

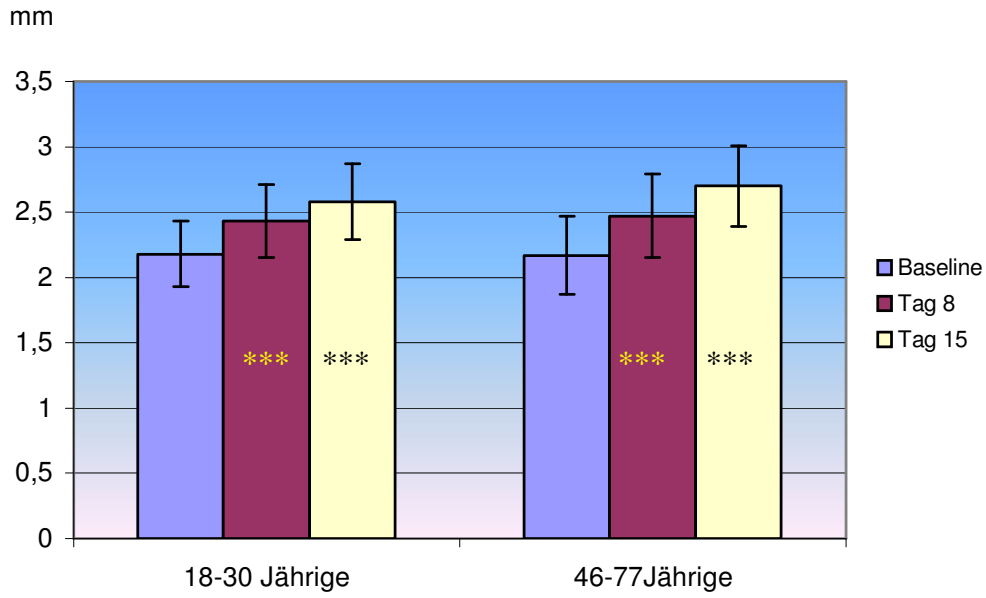


Abb.12 Sondierungstiefe

Der *t-Test für verbundene Stichproben* auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.

* signifikant p<0,05; ** sehr signifikant p<0,005; *** hoch signifikant p<0,001

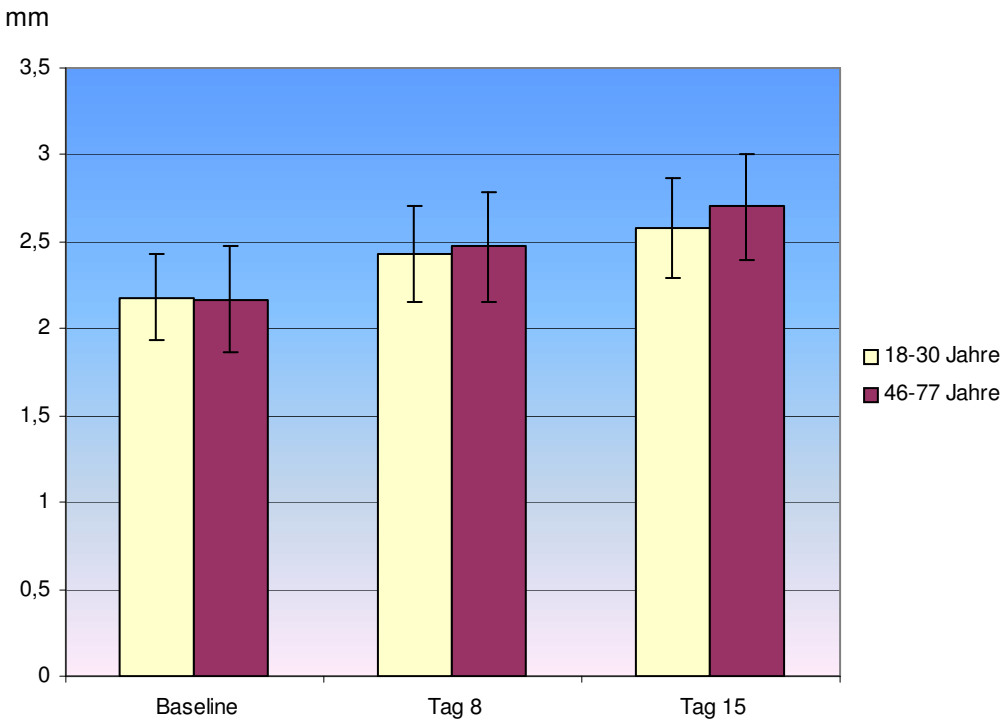


Abb.13 Sondierungstiefe: Gruppenunterschiede

Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Gruppen zeigt keine statistisch signifikanten Unterschiede.

3.2 Mikrobiologische Ergebnisse

3.2.1 Ergebnisse der quantitativen real-time PCR

3.2.1.1 Gesamtbakterienzahl

Während der Phase der experimentellen Gingivitis zeigte sich bezüglich der Gesamtbakterienzahl sowohl für die Gruppe der 18-30-Jährigen als auch in der Gruppe der 46- 77-Jährigen ein Anstieg der Bakterienmenge in der Sulkusflüssigkeit. Im Gruppenvergleich zeigte sich, dass zur Baseline (Jüngere: $1{,}65 \times 10^4$; Ältere: $9{,}7 \times 10^4$) und nach einer Woche (Jüngere: $2{,}0 \times 10^5$; Ältere: $1{,}5 \times 10^6$) deutlich höhere Werte in der älteren Gruppe vorlagen, während zum Ende der experimentellen Phase annähernd gleiche Gesamtbakterienzahlen nachweisbar waren (Abb.14 und Tab.5 im Anhang).

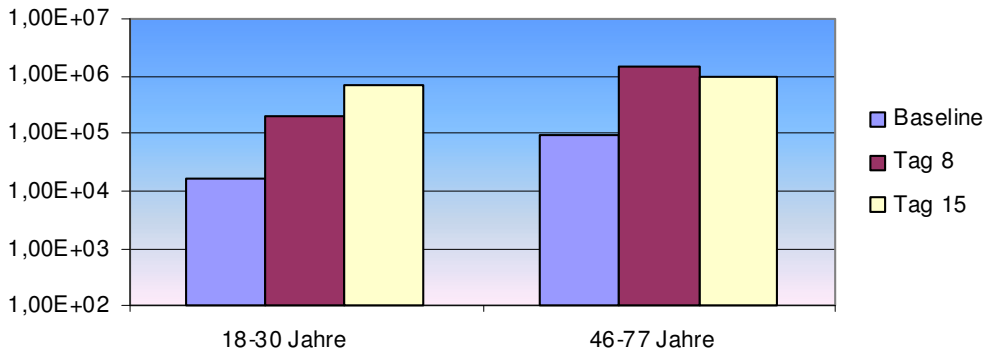


Abb. 14 Gesamtbakterienzahl

Der t-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten zeigt keine signifikanten Anstiege.
Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

3.2.1.2 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

In der Gruppe der 18-30-Jährigen wurde *A. actinomycetemcomitans* zur Baseline nicht nachgewiesen. Im Verlauf der experimentellen Phase wurde ein Anstieg in der Gruppe der 18-30-Jährigen beobachtet, mit einer starken Vermehrung am Tag 15. Dieser Anstieg ist jedoch statistisch nicht signifikant.

In der Gruppe der 46-77-Jährigen konnte *A .actinomycetemcomitans* zur Baseline nachgewiesen werden. Auch in dieser Gruppe erfolgte ein Anstieg der Spezies am Tag 8 und Tag 15. Im Gruppenvergleich zeigt sich zur Baseline ein vermehrtes Vorkommen des Keims in der Gruppe der älteren Probanden. Im Studienverlauf wurde

ein stärkerer Anstieg in der Gruppe der 18-30-Jährigen festgestellt. Zum Tag 15 zeigen sich somit höhere Werte für die jüngeren Probanden
(Abb.15 und Tab.6 im Anhang).

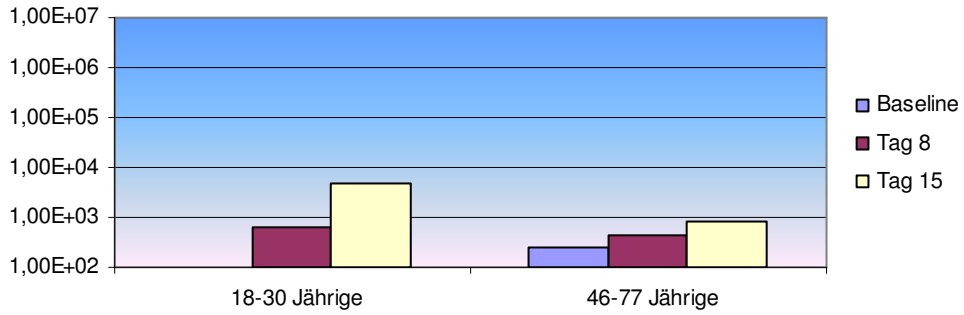


Abb. 15 *A. actinomycetemcomitans*

Der t-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten zeigt keine signifikanten Anstiege.
Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

3.2.1.3 *Prevotella intermedia*

In der Gruppe der 18-30-Jährigen zeigte *P. intermedia* von der Baseline zum Tag 15 einen leichten, statistisch nicht signifikanten Anstieg. In der Gruppe der Älteren konnte eine stärkere Vermehrung am Tag 8 festgestellt werden, danach blieb die Keimzahl konstant. Im Gruppenvergleich zeigten sich sowohl zu Beginn des Experiments (Baseline: Jüngere: $7{,}6x10^2$; Ältere: 2: $1{,}9x10^3$) als auch zum Tag 8 und Tag 15 (Jüngere: Tag 15 $1{,}3x10^3$; Ältere: Tag 15 $8{,}5x10^3$) höhere Bakterienzahlen für die Gruppe der 46-77-Jährigen. Eine statistische Signifikanz lag jedoch nicht vor (Abb.16 und Tab.7 im Anhang).

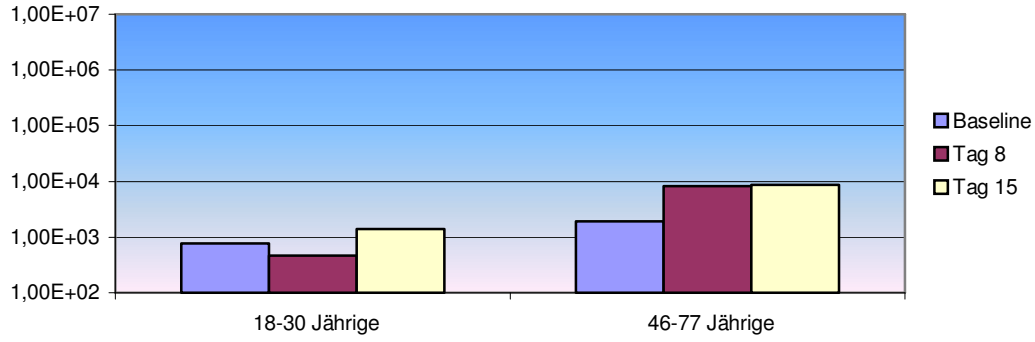


Abb.16 *P. intermedia*

Der t-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten zeigt keine signifikanten Anstiege.
Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

3.2.1.4 *Porphyromonas gingivalis*

In der Gruppe der 18-30-Jährigen wurde *P.gingivalis* zu keinem Zeitpunkt der experimentellen Gingivitis in Werten über der Nachweisgrenze gefunden. In der Gruppe der 46-77-Jährigen lag er zur Baseline in höheren Werten vor; im Verlauf der experimentellen Gingivitis nahm sein Vorkommen ab. Der Gruppenunterschied zur Baseline ist statistisch signifikant (p=0,01) (Abb.17 und Tab.8 im Anhang).

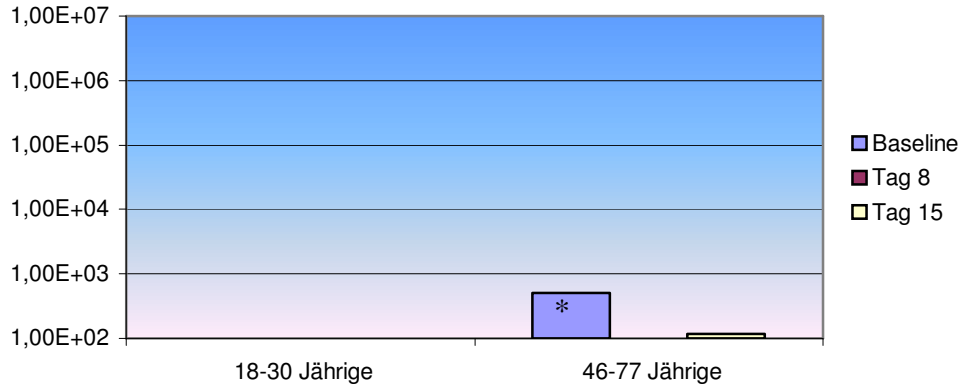


Abb.17 *P. gingivalis*

Der t-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten zeigt keine signifikanten Anstiege.
*Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Gruppen zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zur Baseline- Untersuchung (p=0.01).

3.2.1.5 *Dialister pneumosintes*

In der Gruppe der 18-30-Jährigen wurde *D. p.* an allen drei Untersuchungstagen nachgewiesen. Am Tag 15 war ein leichter, statistisch nicht signifikanter Anstieg festzustellen. In der Gruppe der 46-77-Jährigen wurde die Spezies ebenfalls zu allen Zeitpunkten mit einem Anstieg am Tag 15 detektiert.
Im Gruppenvergleich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Abb.18 und Tab.9 im Anhang).

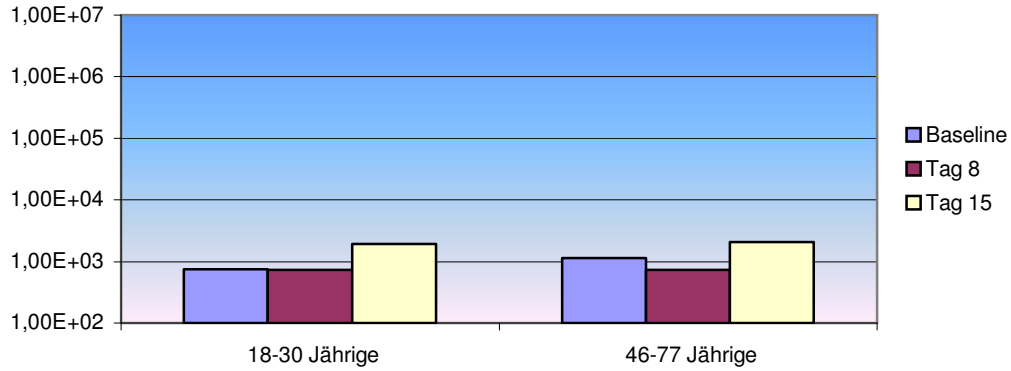


Abb.18 *D. pneumosintes*

Der t-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten zeigt keine signifikanten Anstiege.
Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

3.2.1.6 *Parvimonas micra*

In der Gruppe der 18-30-Jährigen lagen die Werte für *P.m.* zur Baseline nicht über der Nachweisgrenze. Im Verlauf der experimentellen Gingivitis nahm die Zahl der Spezies sowohl zum Tag 8 und zum Tag 15 zu. In der Gruppe der 46-77-Jährigen wurde *P.m.* zur Baseline nachgewiesen. Am Tag 8 zeigte sich ein stärkerer, jedoch statistisch nicht signifikanter Anstieg in dieser Gruppe. Im Gruppenvergleich waren zu allen Untersuchungszeitpunkten höhere Werte in der Gruppe der Älteren festzustellen. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb.19 und Tab.10 im Anhang).

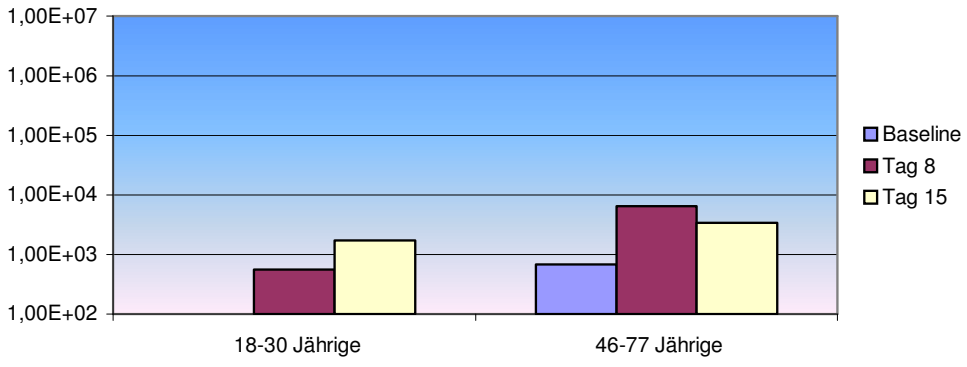


Abb.19 *P. micra*

Der t-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten zeigt keine signifikanten Anstiege.
Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Gruppen zeigt keinen statistisch signifikanten Unterschied.

3.2.1.7 *Campylobacter rectus*

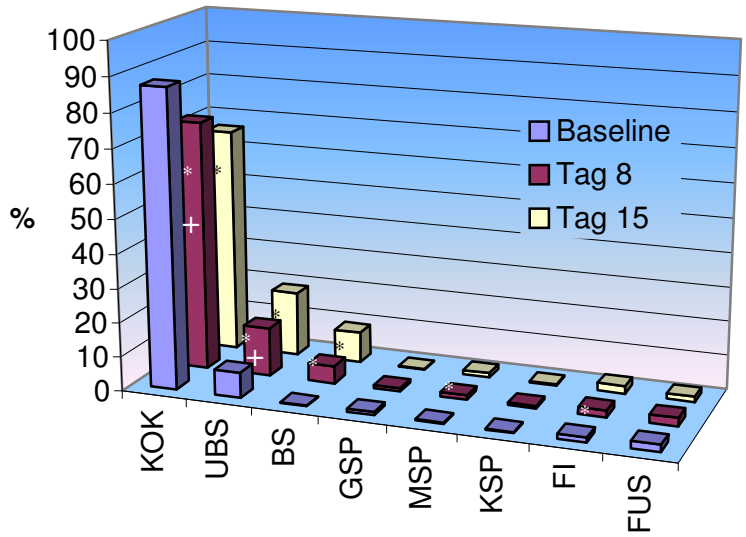
Die Analyse auf *C. rectus* ergab sowohl in der Gruppe der 18-30-Jährigen als auch in der Gruppe der 46-77-Jährigen zu keinem Zeitpunkt der experimentellen Gingivitis Werte über der Nachweisgrenze (Tab.11 im Anhang).

3.2.2 Ergebnisse der Dunkelfeldmikroskopie

Die Untersuchung der Sulkusflüssigkeit mittels Dunkelfeldmikroskopie zeigte zur Baseline in der Gruppe der 18-30-Jährigen eine Flora, die überwiegend von Kokken dominiert wurde (Abb. 21). Im Verlauf der experimentellen Gingivitis kam es in der Gruppe zu einer statistisch signifikanten Verringerung der Kokken zwischen den einzelnen Untersuchungszeitpunkten, während die Zahl der unbeweglichen Stäbchen, beweglichen Stäbchen, Filamente, Fusiformen und Spirochäten signifikant anstieg.

Die Analyse in der Gruppe der 46-77-Jährigen ergab einen ähnlichen Verlauf. Auch hier wurden zur Baseline vorwiegend Kokken gefunden (Abb. 20). In den folgenden Untersuchungen verringerte sich die Anzahl dieser statistisch signifikant, gleichzeitig stiegen die unbeweglichen und beweglichen Stäbchen, Filamente, Fusiforme und Spirochäten ebenfalls signifikant an.

Der Vergleich zwischen den Altersgruppen zeigte eine statistisch signifikant geringere Anzahl an Kokken in der Gruppe der 46-77-Jährigen am Tag 8 der experimentellen Gingivitis. Zum gleichen Zeitpunkt war die Zahl der unbeweglichen Stäbchen in der Gruppe der Älteren signifikant höher. Darüber hinaus zeigte die MANOVA-Analyse einen statistisch signifikanten stärkeren Anstieg der beweglichen Stäbchen in der älteren Gruppe sowohl zum Tag 8 als auch Tag 15 der Untersuchung.

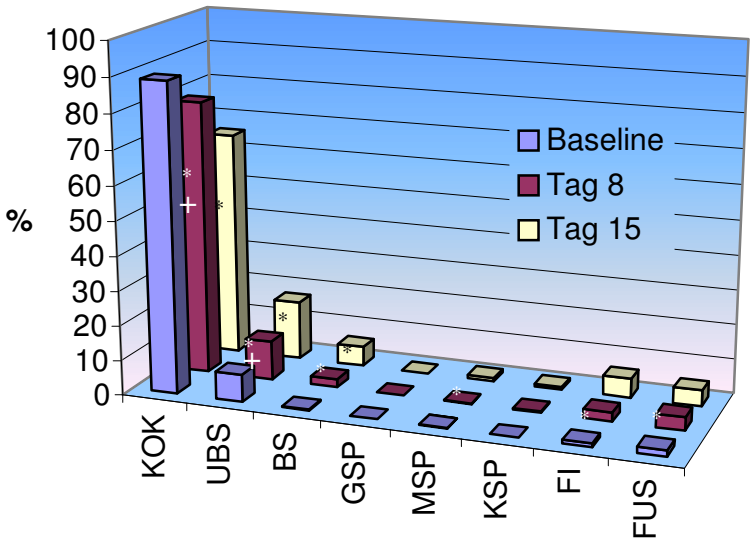


KOK = Kokken
UBS = unbewegliche Stäbchen
BS = bewegliche Stäbchen
GSP = große Spirochäten
MSP = mittlere Spirochäten
KSP = kleine Spirochäten
FI = Filamente
FUS = Fusiforme

Abb. 20 Dunkelfeldmikroskopie der 46-77 Jährigen

Der t-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede in der Gruppe zu den einzelnen Zeitpunkten zeigt eine statistisch signifikante Verringerung der Kokken sowie einen signifikanten Anstieg der unbeweglichen Stäbchen, beweglichen Stäbchen, Filamente, sowie den mittleren Spirochäten. (*)

Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Gruppen zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied für die Parameter Kokken und Stäbchen am Tag 8 (+) sowie für die beweglichen Stäbchen am Tag 8 und Tag 15 (nicht markiert).



KOK = Kokken
UBS = unbewegliche Stäbchen
BS = bewegliche Stäbchen
GSP = große Spirochäten
MSP = mittlere Spirochäten
KSP = kleine Spirochäten
FI = Filamente
FUS = Fusiforme

Abb.21 Dunkelfeldmikroskopie der 18-30 Jährigen

Der t-Test für verbundene Stichproben auf Unterschiede in der Gruppe zu den einzelnen Zeitpunkten zeigt eine statistisch signifikante Verringerung der Kokken sowie einen signifikanten Anstieg der unbeweglichen Stäbchen, beweglichen Stäbchen, Filamente, sowie den mittleren Spirochäten. (*)

Der *t-Test der Varianzanalyse* auf Unterschiede der zwei Gruppen zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied für die Parameter Kokken und Stäbchen am Tag 8 (+) sowie für die beweglichen Stäbchen am Tag 8 und Tag 15 (nicht markiert).

3.3 Korrelationen

Die Korrelationsprüfung der klinischen Parameter ergab für die 18-30-Jährigen statistisch signifikante hohe Korrelationen zwischen BNS und GI zu allen drei Zeitpunkten (Tab. 4). Das Verhältnis von BNS zu PI zum Zeitpunkt 2 zeigte eine geringe Korrelation, die statistisch signifikant war. Außerdem stellte sich jeweils eine mittlere Korrelation zwischen dem Auftreten von *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *D. pneumosintes*, *P. micra* und GI zum Zeitpunkt 3 dar.

BNS korrelierte zum gleichen Zeitpunkt mit *D. p, P.m,* und *P.i*.

Für die ältere Gruppe war eine hohe Korrelation zwischen PI und GI zur Baseline nachzuweisen. Zum Zeitpunkt 1 zeigte sich eine geringe Korrelation zwischen BNS und der Gesamtbakterienzahl sowie *P.m* und eine mittlere Korrelation von BNS mit *P.i*. Das Auftreten von *D.p* korreliert mit BNS ebenfalls zum Zeitpunkt 3.

		Baseline			Tag 8			Tag 15		
18-30 Jahre		**GI**	**PI**	**BNS**	**GI**	**PI**	**BNS**	**GI**	**PI**	**BNS**
PI	r =	0,594			0,424			0,431		
	p =	0,070			0,169			0,162		
BNS	r =	0,679	0,413		0,778	0,595		0,747	0,455	
	p =	**0,025**	0,236		**0,003**	**0,041**		**0,005**	0,137	
Eubac	r =	0,471	0,483	-0,217	0,152	0,224	0,297	0,517	0,133	0,444
	p =	0,201	0,187	0,187	0,676	0,533	0,405	0,154	0,732	0,232
DP	r =	0,587	0,427	0,243	0,418	0,418	0,673	0,762	0,544	0,916
	p =	0,097	0,252	0,529	0,229	0,229	**0,033**	**0,017**	0,130	**0,001**
PM	r =	0,412	0,267	-0,100	-0,115	-0,079	0,042	0,803	0,192	0,866
	p =	0,271	0,488	0,798	0,751	0,829	0,907	**0,009**	0,620	**0,003**
PI	r =	0,504	0,500	0,133	0,491	0,685	0,442	0,753	0,477	0,815
	p =	0,166	0,170	0,732	0,150	0,029	0,200	**0,019**	0,194	**0,007**
AA	r =	-0,160	0,000	-0,567	0,115	0,115	0,212	0,333	-0,317	0,410
	p =	0,682	1,000	0,112	0,751	0,751	0,556	0,381	0,406	0,273
PG	r =	-0,370	-0,183	-0,367	0,588	0,539	0,455	0,733	0,033	0,536
	p =	0,327	0,637	0,332	0,074	0,108	0,187	**0,025**	0,932	0,137
46-77 Jahre										
PI	r =	0,771			0,494			0,662		
	p =	**0,015**			0,176			**0,052**		
BNS	r =	0,018	0,045		-0,395	-0,449		-0,120	0,119	
	p =	0.964	0,909		0,293	0,226		0,758	0,760	
Eubac	r =	0,167	0,586	0,667	0,017	0,383	0,100	0,200	0,483	0,433
	p =	0,668	0,097	**0,050**	0,966	0,308	0,798	0,606	0,187	0,244
DP	r =	-0,469	-0,063	0,393	-0,200	0,033	0,100	-0,167	-0,017	0,667
	p =	0,203	0,872	0,295	0,606	0,932	0,798	0,668	0,966	**0,050**
PM	r =	0,008	0,315	0,678	0,400	0,317	-0,167	0,033	0,183	0,300
	p =	0,983	0,409	**0,045**	0,286	0,406	0,668	0,932	0,637	0,433
PI	r =	0,142	0,462	0,711	0,417	0,317	-0,133	-0,150	0,150	0,633
	p =	0,715	0,210	**0,032**	0,265	0,406	0,732	0,700	0,700	0,067
AA	r =	0,250	0,444	0,450	0,283	-0,050	-0,450	-0,083	-0,150	0,600
	p =	0,516	0,232	0,224	0,460	0,898	0,224	0,831	0,700	0,088
PG	r =	-0,617	-0,075	0,133	-0,483	-0,033	-0,300	-0,333	0,033	0,483
	p =	0,077	0,847	0,732	0,187	0,932	0,433	0,381	0,932	0,187

Tab. 4 Korrelationen

zwischen PI, GI und BNS: Pearsonscher Korrelationswert
zwischen PI, GI ,BNS und Eubac, Dp, Pm, Pi,Aa, Pg: Spearmanscher Korrelationswert

p≤0,05	signifikant	r	Korrelationskoeffizient
p≤0,01	sehr signifikant	r≤0,2	sehr geringe Korrelation
p≤0,001	höchst signifikant	r≤0,5	geringe Korrelation
		r≤0,7	mittlere Korrelation
		r≤0,9	hohe Korrelation
		r>0,9	sehr hohe Korrelation

4. DISKUSSION

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 Diskussion der klinischen Untersuchungsmethoden

Plaque Indizes erlauben eine graduelle Einteilung der oralen Mundhygiene. Obwohl ein Plaqueindex nicht die Gewebereaktion beschreibt, gibt er doch Auskunft über das Vorhandensein von Faktoren, die an der Zahn-Gingiva-Grenzfläche die Gewebereaktion beeinflussen können. Die Beurteilung bezieht sich auf die Quantität der Plaque bzw. auf die Dicke des Plaquebelages in den zu untersuchenden Regionen (Fischman 1986). Der Plaqueindex nach Silness und Löe (1964) wurde in der vorliegenden Studie zur Kontrolle des Plaquezuwachses eingesetzt. Er liefert für klinisch-wissenschaftliche Untersuchungen sehr genaue Ergebnisse und zeigt insbesondere den Einfluss der Plaque auf die Gingivitis (Zafiropoulos et al. 1991a).

Der **Gingival Index** nach Löe und Silness (1963) erlaubt eine graduierte Einschätzung des Entzündungsgrades der parodontalen Gewebe. Ein Gingivalindex von null bis eins entspricht weitgehend gesunden Verhältnissen, bei Grad zwei und drei liegen jedoch starke Entzündungszeichen vor. Optische Anzeichen wie Rötung und Schwellung sind klinische Zeichen der gingivalen Entzündung. Histologische Studien haben bestätigt, dass diese sichtbaren Zeichen der Entzündung mit bedeutenden entzündlichen Veränderungen in der Gingiva korrelieren (Davenport et al. 1982). Der Gingivalindex eignet sich allerdings nur zu einer orientierenden Beurteilung des Entzündungsgrades und der Entzündungsbereitschaft der Gewebe und muss immer im Zusammenhang mit anderen klinischen Befunden gesehen werden. Die Erhebung des Gingivalindexes kann in Kombination mit weiteren klinischen Parametern ein geeignetes Mittel für die Erfassung von Entzündungszeichen sein und wurde in der vorliegenden Studie mit einbezogen.

Die **Blutung nach Sondieren** ist noch früher als Farb- und Formveränderungen der Gingiva feststellbar und im Gegensatz zu diesen ein objektiveres Merkmal einer Entzündung. Die gingivale Blutung ist allgemein als klinisches Zeichen gingivaler Entzündung akzeptiert (Caton et al. 1988). Histologische Studien belegen eine stärkere Entzündungsreaktion in blutendem als in nichtblutendem Weichgewebe. Allerdings korrelierte die Blutung nach Sondieren in einigen Untersuchungen nicht mit dem histologischen Grad der Entzündung (Apse et al. 1991; Lekholm et al. 1986).

Die Bestimmung der **Sondierungstiefe** stellt bei schonender Methodik mit geeigneten manuellen Sonden eine einfache und exakte Befundung dar. In einer Studie gleich bleibende Sondierungstiefen deuten auf gesunde Verhältnisse hin. Die Messung der Zahnfleischtasche ist eine reine „status quo“ Beschreibung, die eine bereits abgelaufene parodontale Destruktion feststellt, jedoch aktive und passive Entzündungsphasen nicht identifizieren kann. Bei der Bestimmung der Sondierungstiefe sollte bedacht werden, dass die Messung nicht unbedingt mit dem tatsächlichen histologischen Befund der Zahnfleischtasche übereinstimmt, da die Sondenspitze selten exakt den apikalsten Punkt des Taschenbodens erreicht. Oftmals wird beim Sondieren das Sulkus - bzw. Taschenepithel durchbrochen, die Sonde bis ins Bindegewebe vorgeschoben, und die klinische Messung führt somit zu überhöhten Werten. Die Sondierungstiefe ist zudem von einer Vielzahl weiterer Faktoren abhängig, wie z.B. der Sondierungskraft, Form, Durchmesser und Einschubrichtung der Parodontalsonde sowie dem Gewebszustand (Garnick et al. 1989; Garnick & Silverstein 2000). So ist beispielsweise entzündetes Gewebe durch eine Kollagenarmut sehr weich und durch die Sonde wesentlich leichter zu penetrieren als gesundes Parodontalgewebe (Listgarten 1980). Die Messung der Sondierungstiefe bei der experimentellen Gingivitis lässt offen, ob der Anstieg durch apikale Verschiebung des Taschenbodens oder durch eine Schwellung der Gingiva verursacht wird (Löe & Silness 1963). Einige der angeführten Fehlerquellen können durch die Verwendung einer standardisierten Parodontalsonde sowie die Durchführung der Untersuchungen durch einen einzigen geübten Behandler vermieden werden.

Die Bestimmung des klinischen **Attachmentlevels** hängt stark von der Messung der Sondierungstiefe und somit auch von den Ungenauigkeiten beim Sondieren ab. Der klinische Attachmentlevel ist definiert als der Abstand zwischen Schmelz-Zement-Grenze und Sulkus- bzw. Taschenboden. Gemeinsam mit der Bestimmung der Sondierungstiefe ist die Messung des klinischen Attachmentlevels trotz der Ungenauigkeiten eine einfache und schnelle Methode, um Veränderungen im parodontalen Gewebe aufzuzeigen und stellt in der klinischen Praxis zur Diagnose von parodontalen Erkrankungen und insbesondere in der Verlaufskontrolle und der Kontrolle von Therapieerfolgen den Goldstandard dar. Im Rahmen einer experimentellen Gingivitisstudie ist er jedoch von untergeordneter Bedeutung, da in einem Experimentzeitraum von 14 Tagen ausgehend von gesunden Verhältnissen nicht mit einer größeren

Apikalverlagerung des Saumepitehls und damit mit einer Veränderung des Attachmentlevels zu rechnen ist.

4.1.2 Die Gewinnung der Sulkusflüssigkeit

Der im Sulkus vorhandene Biofilm mit seinen Stoffwechselprodukten bewirkt noch vor dem Auslösen einer entzündlichen Reaktion den Austritt von Flüssigkeit in Form eines *Transsudates*, dessen Hauptbestandteil die interzelluläre Flüssigkeit bildet. Weitere Bestandteile sind die dem Zahn und der Gingiva in diesem Bereich anfaftenden Bakterien und deren Abbauprodukte (Zafiropoulos et al. 1991b).

Im Rahmen der gingivalen Entzündungsreaktion kommt es zu einer Steigerung der Gefässwandpermeabilität, was zum Austritt von Blutserum in das umgebende Bindegewebe führt (*Exsudat*). Von dort sickert es durch das Saumepithel in den Sulkus, wo es Substanzen des entzündlichen Prozesses aufnimmt und als Sulkusflüssigkeit schließlich in die Mundhöhle austritt. Die Hauptbestandteile leiten sich in diesem Fall vom Plasma, dem Gingivagewebe (durch welches die Flüssigkeit, um in den Sulkus zu gelangen, durchtritt) und den im Gewebe und im Sulkus befindlichen Mikroorganismen sowie deren Bestandteilen bzw. Stoffwechselprodukten ab (Kornman 1987; Lamster et al. 1985; Suido et al. 1988).

Sowohl die Qualität als auch die Quantität der Sulkusflüssigkeit lassen demnach Rückschlüsse auf den Entzündungszustand der Gingiva zu. Mit Hilfe verschiedener Verfahren kann eine Beurteilung der ausgetretenen Sulkusflüssigkeitsmenge vorgenommen werden. Die Wahl der Methode richtet sich dabei in der Regel nach dem Zweck der Untersuchung. Für die eigentliche Gewinnung der Sulkusflüssigkeit sind in der Literatur drei Möglichkeiten beschrieben:

Bei der Auswaschmethode wird der Sulkus mit physiologischer Kochsalzlösung gespült, die dann sofort wieder gemeinsam mit der Sulkusflüssigkeit aspiriert wird. Dieses Verfahren dient der Gewinnung von Sulkusflüssigkeit mit ihren zellulären Bestandteilen. Es sind zwei verschiedene Methoden in der Literatur beschrieben worden. Die einfachere umfasst die Einträufelung und Re-Aspiration von physiologischer Kochsalzlösung an der Interdentalpapille (Skapski & Lehner 1976). Dieser Vorgang wird mehrfach wiederholt, um eine gründliche Mischung der Transportlösung und der Sulkusflüssigkeit zu gewährleisten. Die aufwendigere Methode setzt einen maßgefertigten Acrylstent voraus, der das parodontale Gewebe des entsprechenden Zahnes vom Rest der Mundhöhle isolieren soll. Das Gewebe wird dann für

15min mit einer Salzlösung und einer peristaltischen Pumpe gespült, und die verdünnte Sulkusflüssigkeit wird entnommen (Oppenheim 1970).
Diese Gingivawaschung erscheint sinnvoll, wenn lediglich die Anzahl und die Art der verschiedenen Zelltypen untersucht werden sollen. Als Hauptnachteil dieser Methode ist zu sehen, dass nicht die gesamte Sulkusflüssigkeit durch das Aspirieren und Reaspirieren aufgenommen wird. Dadurch ist eine genaue Quantifizierung des Volumens oder der Zusammensetzung nicht möglich, da ein exakter Verdünnungsfaktor nicht bestimmt werden kann (Griffiths 2003).
Bei der Kapillar-bzw. Mikropipettenmethode wird die Sulkusflüssigkeit in Kapillarröhrchen von standardisiertem Ausmaß bei standardisierter Zeit aufgesaugt (Sueda et al. 1969). Die Sulkusflüssigkeit migriert durch Kapillarkräfte in das Röhrchen, und da der innere Durchmesser bekannt ist, kann das Volumen der gesammelten Sulkusflüssigkeit anhand der zurückgelegten Strecke in dem Röhrchen genau analysiert werden. Solche Mikropipetten kommen immer dann zum Einsatz, wenn größere Mengen an Sulkusflüssigkeit benötigt werden bzw. vorhanden sind, beispielsweise bei entzündetem Gewebe. Bei gesunden Verhältnissen und entsprechend geringer vorhandener Sulkusflüssigkeitsmenge kann es nötig sein, die Kapillare über mehr als 30 min im Sulkus zu belassen, um ein ausreichendes Volumen aufzusaugen. Dies ist weder atraumatisch für den entsprechenden Sulkus, noch in der Praxis am gesunden Untersuchungsort umsetzbar. Eine weitere Komplikation dieser Methode stellt die vollständige Herauslösung der Sulkusflüssigkeit aus der Pipette dar. Dies kann entweder über einen Luftstrahl, eine Verdünnungslösung oder durch Zentrifugation erfolgen.
Die Sulkusflüssigkeit wird bei der Filterpapierstreifen-Methode mit speziellen Filterpapierstreifen aufgenommen, die für eine bestimmte Zeit entweder auf den Eingang des Sulkus (extrakrevikulär) oder in den Sulkus (intrakrevikulär) appliziert werden. Die intrakrevikuläre Methode kann weiter unterteilt werden in die oberflächliche Variante, wobei der Filterpapierstreifen gerade in den Eingangsbereich des Sulkus geführt wird, und die tiefe Variante, bei der der Streifen bis zum Taschenboden appliziert wird. Die Filterpapierstreifen-Methode ist am weitesten verbreitet. Als Vorteile sind die schnelle und einfache Handhabung sowie die - bei korrekter Anwendung- geringe Traumatisierungsgefahr des Gewebes zu nennen.

4.1.3 Diskussion der Dunkelfeldmikroskopie

Die morphologische Zusammensetzung des subgingivalen Bakterienfilms im Verlauf der experimentellen Gingivitis ist von besonderem Interesse. Als Diagnostikum wurde

die Dunkelfeldmikroskopie verwendet, wobei jeweils 200 Keime in einem zufällig ausgewählten Raster nach den morphologischen Kriterien von Listgarten und Helldèn ausgezählt werden (Listgarten und Helldèn 1978). Im Vergleich zu neueren mikrobiologischen Tests, wie der Immunfluoreszenzmikroskopie, Gensonden-Tests, PCR und der konventionellen Kultivierung und Identifikation aufgrund spezieller Stoffwechselleistungen, ist die Dunkelfeldmikroskopie weniger spezifisch und dementsprechend bei ätiologischen Fragestellungen kaum anwendbar. Als Verlaufsdiagnostikum ist sie jedoch nach wie vor aufgrund ihrer einfachen Durchführbarkeit und ihres geringen apparativen Aufwandes zu bevorzugen.

Die Dunkelfeldmikroskopie ermöglicht die Beurteilung von Form, Größe und Beweglichkeit der Bakterien am Nativpräparat. Die Auswertung subgingivaler Proben anhand dieser Methode erlaubt eine verlässliche Aussage über den Fortschritt der Erkrankung sowie den Aktivitätszustand einer parodontalen Läsion (Listgarten und Helldèn 1978). Der parodontale Zustand ist sofort und parodontienspezifisch beurteilbar.

In vorliegender Studie wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt jeweils 4 Proben zur mikrobiologischen Diagnostik entnommen. Als Entnahmepunkt diente jeweils der mesiale Sulkus der Zähne 14, 11, 21 und 24, so dass ein unmittelbarer Vergleich der anteilsmäßig vorhandenen Mikroflora zu vorhergehenden und auch nachfolgenden Untersuchungen stattfinden konnte. Die Anzahl der entnommenen Proben entspricht der Empfehlung, wonach maximal sechs Proben aufgrund des Zeitaufwandes gleichzeitig untersucht werden sollten (Adler & Hefti 1986). Fehlermöglichkeiten, die die Zuverlässigkeit und Praktikabilität der Dunkelfeldmikroskopie einschränken, ergeben sich bei der Probenentnahme und der Auszählung der Bakterien. Wird die Probe mit Papierspitzen entnommen, wird im Wesentlichen die nichtadhärente Plaque gewonnen, die adhärente wird nicht erfasst (Tanner & Goodson 1986). Da die subgingivale Plaque darüber hinaus nicht homogen verteilt ist, wird die Taschenflora nicht repräsentativ ermittelt. Die Probeentnahme ist zudem problematisch, was die Kontamination der Probe angeht. Die Beimengung von supragingivaler Plaque oder Speichel ist nicht auszuschließen. Die anschließende Verdünnung in einer Nährlösung kann ebenso Kontamination verursachen und eine ungleichmäßige Dispersion sowie Zerstörung von lebenden Organismen herbeiführen. Probleme bei der Präparatherstellung können ebenfalls zu Plattenkontamination und Verzögerungen, hierbei zu einem Verlust der Aktivität von beweglichen Zellen und somit zu einer Verfälschung der

Auszählung, führen. Weitere Fehlerquellen liegen in der Verwechslung der Brownschen Molekularbewegung mit der Eigenbewegung der Bakterien und der verzögerten Auswertung, wodurch Mikroorganismen ihre Eigenbeweglichkeit verlieren und ehemals bewegliche Stäbchen nicht erkannt werden (Flores-de-Jacoby 1990).

4.1.4 Diskussion der quantitativen real-time PCR

Die PCR ist in den letzten Jahren zur wichtigsten Nachweismethode in der mikrobiologischen Diagnostik geworden. Sie stellt eine schnelle, sensitive und spezifische Methode des Nachweises von pathogenen Bakterien dar. Die konventionelle Form erlaubt jedoch keine Quantifizierung. Fortschritte in der Entwicklung von Fluoreszenzproben und Instrumenten zur kontinuierlichen Messung der Fluoreszenz ermöglichten die Entwicklung eines real-time PCR-Ansatzes zum spezifischen Nachweis und zur Quantifizierung von Bakterienprodukten.

Bis dato wurden Analysen über die Menge an pathogenen Bakterien über Kulturen oder Immunoassays durchgeführt. Die real-time PCR ist diesen Methoden überlegen. Der Nachweis über Kulturen erfordert Zeit und viele Bakterien. Besonders obligat anaerobe Keime sind aufgrund ihrer anspruchsvollen Wachstumsbedingungen schwierig anzuzüchten und somit nur bedingt nachzuweisen und zu quantifizieren, vor allem, wenn sie nur in geringer Zahl vorhanden sind. Die Auswertung mehrerer Proben ist darüber hinaus sehr arbeitsintensiv (Sakamoto et al. 2002). Studien zum Vergleich der Genauigkeit von Kulturen und PCR demonstrieren die höhere Sensitivität und Spezifität der neuen Technik für parodontopathogene Keime (Jervoe-Storm et al. 2005; Lau et al. 2004). DNA-Hybridisierungs-Techniken sind mit großem Laboraufwand verbunden. Darüber hinaus ist beschrieben, dass ein Nachweis mittels DNA-Sonden häufig falsch positive oder falsch negative Ergebnisse ergibt. Die Verwendbarkeit dieser Technik für die Keime *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und *P. intermedia* wird als fraglich bezeichnet (van Steenbergen et al. 1996). Um einen positiven Nachweis zu erzielen, sind außerdem relativ hohe Keimzahlen (10^3-10^4) notwendig (Socransky et al. 1994; Zappa et al. 1990). Im Gegensatz dazu ist die PCR in der Lage, mit geringerem Aufwand eine einzige Kopie eines DNA-Abschnitts zu identifizieren und zu amplifizieren. Mehrere Proben können in einem Schritt analysiert werden.

In unserer Studie wurde die quantitative real-time PCR mittels des TaqMan-Systems angewendet (Nonnenmacher et al. 2004). Die hier verwendete Methode wurde in einer vorausgegangenen Studie entwickelt und an klinischen Proben auf ihre Ver-

wendbarkeit für den Nachweis und die Quantifizierung von subgingivalen parodontopathogenen Bakterien erfolgreich getestet. Sie stellt eine schnelle, sensitive und hoch spezifische Untersuchungsmethode dar. Dieser Ansatz verwendet eine Fluoreszenzsonde, um ein spezifisches PCR-Produkt während der Amplifikation in seiner Anhäufung nachzuweisen. Falsch positive Fluoreszenz wird durch Verbindung der Fluoreszenzfreisetzung an die Exonuclease-Aktivität der Taq-Poymerase während der Primer-Elongation verhindert. Der Hauptvorteil dieses Ansatzes ist die hohe Spezifität bedingt durch die Sonde (Crockett & Wittwer 2001). Die verwendeten Primer und Sonden basieren auf spezies-spezifischen Regionen des 16S rRNA Gens. Diese Sequenz ist als Ziel geeignet, da sie sowohl Genus- und Spezies - spezifische Regionen enthält und eine geringe Mutationsrate aufweist. In der Wahl dieser Zielsequenz liegt jedoch auch eine Fehlermöglichkeit, da jedes Bakterium eine unterschiedliche Anzahl dieser Sequenz aufweisen kann. Dadurch kann eine exakte Quantifizierung beeinflusst werden (Farrelly et al. 1995). Unsere verwendeten Primer und Sonden sind für die jeweilige Spezies hochspezifisch. Falsch positive Nachweise können durch Kreuz-Hybridisierung entstehen. Diese Möglichkeit wurde durch Überprüfung aller Primer und Sonden mittels des BLAST Programms (Altschul et al. 1990) ausgeschlossen. Die Gesamtbakterienzahl wurde in dieser Studie mittels eines Universalprimers ermittelt. Hierbei besteht das Problem, dass die Taq-Polymerase mit bakterieller DNA verunreinigt ist. Dadurch werden dem PCR-Mix etwa 10^5 Kopien an bakterieller DNA hinzugefügt. Aus diesem Grund können Proben, deren Template-Konzentration nicht signifikant höher ist, nicht exakt auf die Gesamtbakterienzahl mit Universalprimern untersucht werden (Lyons et al. 2000). Eine weitere mögliche Fehlerquelle liegt im Verfahren der DNA-Aufbereitung aus den Untersuchungsproben. Hierbei müssen Isolationstechniken angewendet werden, die die DNA sicher von zellulären Bestandteilen trennt. Diese können die Taq-Polymerase inhibieren und somit zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Die Verwendbarkeit der quantitativen real-time PCR für die Quantifizierung von Mikroorganismen, darunter klinisch relevanten Bakterien und Viren, wurde in mehreren Studien bestätigt (Asai et al. 2001; Corless et al. 2001; Ke et al. 2000; Lyons et al. 2000; Mc Avin et al. 2001).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden die Reaktion der Gingiva und die Veränderungen der subgingivalen mikrobiologischen Flora in zwei unterschiedlichen Altersgruppen mittels des Modells der experimentellen Gingivitis untersucht. Die klinischen Ergebnisse der vorliegenden experimentellen Gingivitisstudie bestätigen andere Studien, in denen keine signifikanten Unterschiede zwischen jüngeren und älteren Probanden hinsichtlich der Plaqueansammlung und der daraus resultierenden gingivalen Entzündung vorlagen (Abbas et al. 1986; Winkel et al. 1987). Fransson et al. (1996) ermittelten zwar einen stärkeren Anstieg des Entzündungsgrades bei älteren Probanden, jedoch war dieser erst in der dritten Woche der experimentellen Gingivitis signifikant höher. Holm-Pedersen et al. (1975) fanden größere Plaquemengen bei älteren Probanden, deren klinische Untersuchung beschränkte sich jedoch auf die unteren Inzisivi, Eckzähne und Prämolaren, an denen sich in einem gegebenen Zeitraum generell größere Plaquemengen bildeten als an anderen Zähnen (Furuichi et al. 1992).
Ein möglicher Einfluss des Alters könnte durch die individuelle Anfälligkeit für Parodontalerkrankungen übertroffen werden (Winkel et al. 1987; Abbas et al. 1986). Die Krankheitsbereitschaft des Parodontiums könnte damit für die Intensität parodontaler Destruktionen ausschlaggebender sein als die Länge der Zeit, während der die parodontalen Gewebe der Plaque ausgesetzt sind (van der Velden et al. 1984). Demnach wäre das Alter von untergeordneter Bedeutung in der Entwicklung der frühen Gingivitis bei Personen, die keine ausgesprochene Prädisposition für Parodontalerkrankungen haben.
Die durch Dunkelfeldmikroskopie erhobenen Daten zeigten im Verlauf der experimentellen Gingivitis eine kontinuierliche Tendenz zur Diversifikation der mikrobiellen Flora, mit signifikanter Verringerung der Kokken sowie Anstieg der unbeweglichen und beweglichen Stäbchen, Filamenten, Fusiformen und Spirochäten. Dies bestätigt andere Studien, in denen diese Untersuchungsmethode vorgestellt wurde (Theilade et al. 1966; Listgarten & Helldén 1978). Im Vergleich zwischen Alten und Jungen ließ sich eine schnellere Kolonisierung mit beweglichen Stäbchen und ein stärkeres Auftreten dieser in der Gruppe 46-77-Jährigen zur dritten Untersuchung feststellen. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit einer Studie, die den Verlauf einer experimentellen Gingivitis in Abhängigkeit zur Anfälligkeit des Parodonts betrachtete (Abbas et al. 1986). Die Mehrzahl unserer älteren Probanden wiesen, obwohl zum Zeitpunkt der Studie parodontal gesund, Anzeichen einer durchgemachten milden Paro-

dontitis auf. Dazu zählt Attachmentverlust in Form von Rezessionen. An diesen Flächen mit freiliegender Zementoberfläche erfolgt eine Plaqueanlagerung und damit einhergehend die entsprechende bakterielle Besiedlung schneller (Mierau 1984; Stoller 1965). Darüber hinaus lässt sich auf eine erhöhte Anfälligkeit für parodontale Erkrankungen schließen. Über eine entsprechende positive Korrelation dieser Anfälligkeit und erhöhten Zahlen von beweglichen Organismen in subgingivaler Plaque wurde berichtet (Listgarten & Levin 1981). In einer Studie, in der mikrobiologische Parameter solitär in Bezug auf das Alter untersucht wurden, konnten mit der gleichen Methode keine Unterschiede zwischen den Altersgruppen festgestellt werden (Winkel et al. 1987).

Die Analyse des Vorkommens von parodontopathogenen Keimen erfolgte durch quantitative real-time PCR. Die Erfassung der Gesamtbakterienzahl ergab für die beiden Altersgruppen keine Unterschiede. Gleiches fanden Fransson et al. (1996) in ihrer Studie mittels DNA-DNA Hybridisierung.

Betrachtet man die Keime im Einzelnen, so zeigten sich für das Bakterium *A. actinomycetemcomitans* keine statistisch signifikanten Veränderungen im Verlauf der experimentellen Gingivitis. Tendenziell war jedoch in beiden Gruppen ein Anstieg mit höheren Werten in der Gruppe der 18-30-Jährigen zu beobachten. Dies ist in Übereinstimmung mit einer australischen Studie, die das Auftreten von parodontopathogenen Keimen bei 504 Probanden untersuchte und ebenfalls eine Verringerung des Auftretens von *A. actinomycetemcomitans* mit zunehmendem Alter feststellte, was jedoch nicht statistisch signifikant war (Hamlet et al. 2001). Eine Studie, die ebenfalls das Auftreten des Keims im Rahmen einer experimentellen Gingivitis untersuchte, fand keine Unterschiede in Abhängigkeit vom Alter (Fransson et al. 1996). Eine Untersuchung an brasilianischen Probanden ergab ein alterunabhängiges Auftreten des Keims, mit nahezu gleicher Anzahl und Häufigkeit in verschiedenen Altersgruppen (Cortelli et al. 2008). Studien, die das Auftreten von parodontopathogenen Keimen in Abhängigkeit vom Alter bei Parodontitispatienten untersuchten, zeigten ein verringertes Auftreten von *A. actinomycetemcomitans* mit zunehmendem Alter (Savitt und Kent 1991; Rodenburg et al. 1990). Die Autoren werteten dies als ein Zeichen für eine Infektion mit diesem Keim in jungen Jahren. Im Rahmen einer Superinfektion mit weiteren Keimen könnte es zu einer Verdrängung beziehungsweise Reduzierung des Bakteriums *A.a.c.* kommen, wodurch sich niedrigere Zahlen in höherem Alter erklären ließen (Rodenburg et al. 1990).

Unsere Analyse bezüglich des Keims *Porphyromonas gingivalis* ergab ein statistisch signifikantes stärkeres Vorkommen des Bakteriums bei den älteren Probanden im gesunden Zustand. Bei den jungen Probanden wurden zu keinem Zeitpunkt Werte über der Nachweisgrenze festgestellt. Im Verlauf ließ sich kein Gruppenunterschied mehr nachweisen, was Ergebnisse einer anderen experimentellen Gingivitisstudie bestätigt (Fransson et al. 1996). Gleiches wurde in einer Untersuchung von jungen gesunden und erfolgreich behandelten älteren Patienten beobachtet (Haffajee et al. 1998). Auch eine Studie, die das Auftreten von *P. gingivalis* in Abhängigkeit vom Parodontalzustand und dem Alter untersuchte, konnte für gesunde Patienten kein vermehrtes Auftreten des Keims mit zunehmenden Alter feststellen. Auch bei Patienten mit Parodontitis wurde kein altersabhängiger Unterschied berichtet (Yang et al. 2004). Im Gegensatz dazu fand die oben angeführte australische Studie ein tendenziell stärkeres Vorkommen von *P. gingivalis* mit steigendem Alter (Hamlet et al. 2001). Eine Studie an Affen unterschiedlichen Alters zeigte signifikant höhere Antikörper-Level gegen den Keim bei den älteren Tieren. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass der Parodontalzustand bei den Tieren nicht vergleichbar war. So waren die Parameter Blutung nach Sondieren und Sondierungstiefen bei den älteren Affen signifikant erhöht (Ebersole et al. 2008). Betrachtet man andere Studien, die Patienten mit parodontaler Erkrankung untersuchten, zeigt sich ein ähnliches Bild. So wurde in mehreren Untersuchungen übereinstimmend ein stärkeres Auftreten von *P. ginigivalis* mit zunehmendem Alter bei Parodontitispatienten gefunden. (Rodenburg et al. 1990; Ghayoumi et al. 2002; Drake et al. 1993; Savitt & Kent 1991). Ebenso zeigte eine Untersuchung an brasilianischen Probanden unterschiedlichen Alters einen Nachweis des Keims erst im späten jugendlichen Alter und erhöhtes Vorkommen in den älteren Gruppen (Cortelli et al. 2008). Eine Untersuchung an Kindern zeigte einen Zusammenhang von persistierender Kolonisation des Keims und steigendem Alter. Dies ist jedoch an das Vorkommen von tieferen Taschen gebunden. Es wurde hier vermutet, dass eine Nische wie eine tiefere Tasche, die Voraussetzung für ein dauerhaftes Überleben von *P.ginigvalis* im oralen Milieu darstellt (Lamell et al. 2000). Dies könnte eine Erklärung für ein fehlendes altersabhängiges Auftreten in Vergesellschaftung mit einer Gingivitis sein. Der Keim ist deutlich mit dem Auftreten einer Parodontitis assoziiert (van Winkelhoff et al. 2002) und spielt offensichtlich im Stadium der Gingivitis, im Rahmen einer sehr diversifizierten Mischflora, für die Entwicklung der Entzündung nur eine untergeordnete, vom Alter unabhängige Rolle. Dies

wird unterstützt durch eine Studie an finnischen Probanden. In dieser wurde ein signifikant häufigeres Auftreten des Keims bei älteren Patienten, die fast alle eine chronische Parodontitis aufwiesen, beschrieben. Demgegenüber fand man an Jüngeren, die überwiegend parodontal gesund waren, geringere Werte (Matto et al. 1998).
Unsere Daten bezüglich der Bakterien *P. intermedia* und *P. micra* zeigten zu allen Untersuchungszeitpunkten einen leichten, statistisch nicht signifikanten Anstieg in beiden Gruppen, sowie höhere Werte in der Gruppe der 46-77-Jährigen. Diese Tendenz bezüglich des Gruppenunterschiedes erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. In anderen Gingivitisstudien konnte für *P. intermedia* kein signigfikanter altersabhängiger Unterschied festgestellt werden (Fransson et al. 1996; Haffajee et al. 1998). Betrachtet man das Auftreten des Keims im Rahmen einer experimentellen Gingivitis unabhängig vom Alter der Probanden, so zeigt sich, dass die Zahl der *P.i.* positiven Probanden sich vom Stadium der gesunden Gingiva zum Stadium der Gingivitis kaum verändert (Lie et al. 2001). Dies bestätigt unsere Ergebnisse. Die Untersuchung zum Auftreten des Keims in unterschiedlichen Altersgruppen in der brasilianischen Population zeigt ein annährend gleich hohes Vorkommen bei jungen und alten Probanden (Cortelli et al. 2008), wohingegen an australischen Patienten das Bakterium mit zunehmendem Alter gehäuft gefunden wurde (Hamlet et al. 2001). Signifikant höhere Antikörperkonzentrationen gegen *P. intermedia* zeigten sich in der oben erwähnten Studie an Affen in den Gruppen der älteren Tiere (Ebersole et al. 2008). Bei Parodontitispatienten wird ein vermehrtes Auftreten von *P.i.* mit zunehmendem Alter beschrieben. Die Autoren sehen eine Verdrängung anderer parodontopathogener Keime, die in früheren Jahren erworben wurden, durch *P. intermedia* als eine mögliche Erklärung (Rodenburg et al. 1990).
Dialister pneumosintes wurde in den letzten Jahren als potentiell parodontopathogener Keim identifiziert (Ghayoumi et al. 2002; Moore & Moore 1994). Mittels quantitativer PCR kann der Keim regelmäßig in Läsionen bei Parodontitispatienten nachgewiesen werden (Nonnenmacher et al. 2004). Der Schweregrad der Parodontitis korreliert mit dem Auftreten des Keims. So zeigte eine Studie einen deutlichen Anstieg in der Detektion des Bakteriums mittels PCR mit zunehmender Taschentiefe und Knochenabbau (Contreras et al. 2000). Unsere Daten zeigen, dass das Bakterium im Verlauf der experimentellen Gingivitis leicht zunimmt, jedoch zwischen den Altersgruppen keine Differenz zu erkennen ist. Dies ist in Übereinstimmung mit einer brasilianischen Studie, die den Keim, neben einem Auftreten bei Parodontitispatienten,

auch bei parodontal Gesunden fanden und bei diesen eine positive Korrelation des Auftretens von *D. pneumosintes* mit Bluten auf Sondieren unabhängig vom Alter der Patienten feststellten (Ferraro et al. 2007). Für Parodontitispatienten jedoch ist ein erhöhtes Auftreten bei älteren Patienten in der Literatur beschrieben (Ghayoumi et al. 2002). Es lässt sich vermuten, dass der Keim im Rahmen der Gingivitis eine untergeordnete Rolle spielt.

Die Überprüfung auf Korrelationen ergab in der Gruppe der 18-30 Jährigen einen positiven Zusammenhang zwischen dem Anstieg von *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *D. pneumosintes* und *P. micra* und Gingival Index und Bleeding on probing. Dies bestätigt eine Studie an amerikanischen Jugendlichen, die ebenfalls eine positive Korrelation zwischen den beiden klinischen Parametern und dem Auftreten von *P.intermedia* feststellten (Tsuruda et al. 1995). Auch für *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* wurde in einer anderen Studie eine positive Korrelation zu den klinischen Parametern Sondierungstiefen und Bleeding on probing festgestellt. Hieraus wurde geschlossen, dass die obigen Bakterien zur gingivalen Entzündung entscheidend beitragen (Demmer et al. 2008). Auch für den Keim D*. pneumosintes* ist eine positive Korrelation beschrieben (Ferraro et al. 2007).

Die erwähnten Studien zeigen, dass der Nachweis auf parodontopathogene Keime in Abhängigkeit vom Alter ein heterogenes Bild liefert. Dies könnte im Zusammenhang mit den verschiedenen Nachweismethoden stehen. Vergleicht man diese, zeigt sich die unterschiedliche Genauigkeit. So werden mit der PCR signifikant höhere Werte gefunden als durch Kulturen. Des Weiteren liefert die real-time PCR für bestimmte Bakterien deutlich häufiger positive Nachweise als Kulturen (Jervoe-Storm et al. 2005). Ein Vergleich zwischen Nachweis durch PCR und ELISA zeigte eine doppelt so hohe Sensitivität der PCR (Shelburne et al. 2000). Dies zeigt, dass die PCR derzeit die sensitivste Nachweismethode darstellt. In dieser unterschiedlichen Sensitivität könnte die Ursache für die abweichenden Ergebnisse zu älteren Studien liegen.

Zusammengefasst zeigt diese Studie, dass bezüglich der klinischen Ergebnisse keine altersabhängigen Unterschiede im Verlauf der experimentellen Gingivitis vorliegen. Tendenziell scheint der Keim *A. actinomycetemcomitans* vermehrt bei jungen, *P. gingivalis, P. intermedia und P. micra* stärker bei den älteren Probanden aufzutreten. Die Unterschiede erreichen jedoch keine statistische Signifikanz. Diese altersabhängige Verteilung scheint in Übereinstimmung mit der häufig beschriebenen Vergesellschaftung von *A. actinomycetemcomitans* mit der juvenilen Form der Parodontitis

und von *P. gingivalis und P. intermedia* mit der Erwachsenenparodontitis zu sein. Eine Verantwortlichkeit der entsprechenden Keime in Verbindung mit anderen Faktoren für den Übergang der Gingivitis in eine altersentsprechende Form der Parodontitis scheint hiernach nachvollziehbar. Studien mit höherer Probandenzahl sind notwendig, um die Tendenz zu überprüfen. Der angewandte Nachweis über die quantitative real-time PCR zeigte seine Verwendbarkeit im Rahmen der experimentellen Gingivitisstudie und stellt für die untersuchten Keime eine sensitive und schnelle Untersuchungsmethode dar.

5. SCHLUSSFOLGERUNG

1. Die klinischen Parameter Plaque Index, Gingival Index und Blutung nach Sondieren zeigten in beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg während der experimentellen Gingivitis. Signifikante Gruppenunterschiede lagen nicht vor.

2. Die mikrobiologischen Ergebnisse mittels Dunkelfeldmikroskopie zeigten in beiden Gruppen während der experimentellen Gingivitis eine signifikante Verringerung der Kokken sowie einen signifikanten Anstieg an beweglichen Stäbchen, Spirochäten, Filamenten und Fusiformen. Im Gruppenvergleich zeigte sich ein signifikant stärkerer Anstieg der beweglichen Stäbchen in der Gruppe der 46-77-Jährigen.

3. Die Analyse durch quantitative real-time PCR ergab für beide Gruppen einen Anstieg der Gesamtbakterienzahl sowie der Keime *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Prevotella intermedia, Parvimonas micra* und *Dialister pneumosintes. Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stieg in der Gruppe der 18-30-Jährigen stärker an, *Prevotella intermedia* und *Parvimonas micra* stärker in der Gruppe der 46-77-Jährigen. Diese Gruppenunterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant. Für *Dialister pneumosintes* und *Porphyromonas gingivalis* ließ sich im Verlauf kein Gruppenunterschied feststellen. Die Bakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis* und *Parvimonas micra* waren zur Baseline nur in der älteren Gruppe nachweisbar. Dieser Gruppenunterschied war für *Porphyromonas gingivalis* statistisch signifikant.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1 Zusammenfassung

Das Ziel der experimentellen Gingivitisstudie an jüngeren und älteren Probanden war die Bestimmung der subgingivalen Mikroflora durch Dunkelfeldmikroskopie und quantitativer real-time PCR. Es nahmen insgesamt 21 parodontal gesunde Probanden teil, die in zwei Gruppen von 18-30 Jahren (n=12) und 46-77 Jahren (n=9) aufgeteilt waren. Nach Etablierung einer sehr guten Mundhygiene erfolgte zur Baseline-Untersuchung eine klinische und mikrobiologische Untersuchung durch Dunkelfeldmikroskopie und auf 6 parodontopathogene Keime mittels real-time PCR (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Camphylobacter rectus, Dialister pneumosintes* und *Parvimonas micra*). Anschließend wurden die Patienten aufgefordert, für einen Zeitraum von 14 Tagen jegliche Mundhygienemaßnahmen zu unterlassen. Am Tag 8 und 15 wurde die Untersuchung wiederholt. Die statistische Analyse basierte auf dem t-Test der Varianzanalyse, Mann-Whitney-U-Test, Spearman Test, Wilcoxon-Test und Pearsonscher Korrelation.

Im Verlauf der experimentellen Gingivitis stiegen die Werte für die klinischen Parameter in beiden Altersgruppen signifikant an, ein Gruppenunterschied ließ sich nicht darstellen. Die mikrobiologischen Ergebnisse mittels Dunkelfeldmikroskopie zeigten in beiden Gruppen während der experimentellen Gingivitis eine signifikante Verringerung der Kokken sowie einen signifikanten Anstieg an beweglichen Stäbchen, Spirochäten, Filamenten und Fusiformen. Im Gruppenvergleich zeigte sich ein signifikant stärkerer Anstieg der beweglichen Stäbchen in der Gruppe der 46-77-Jährigen. Die Analyse durch quantitative real-time PCR ergab für beide Gruppen einen Anstieg der Gesamtbakterienzahl sowie der Keime *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Prevotella intermedia, Parvimonas micra* und *Dialister pneumosintes*. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* stieg in der Gruppe der 18-30-Jährigen stärker an, *Prevotella intermedia* und *Parvimonas micra* stärker in der Gruppe der 46-77-Jährigen. Diese Gruppenunterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant. Für *Dialister pneumosintes* und *Porphyromonas gingivalis* ließ sich im Verlauf kein Gruppenunterschied feststellen. Die Bakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis* und *Parvimonas micra* waren zur Baseline nur in der älteren

Gruppe nachweisbar. Dieser Gruppenunterschied war für *Porphyromonas gingivalis* statistisch signifikant.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass im Rahmen einer experimentellen Gingivitis parodontopathogene Bakterien bei jungen und älteren Probanden in unterschiedlicher Anzahl vorkommen. *A. actinomycetemcomitans* scheint vermehrt bei jungen, *P. gingivalis, P.intermedia* und *P. micra* stärker bei den älteren Probanden aufzutreten. Studien mit höherer Probandenzahl sind notwendig, um die Tendenz zu überprüfen.

6.2 Summary

The aim of this experimental gingivitis study was to determine the subgingival microbiota in young (18 to 30 years) and older (46 to 77 years) healthy adults by darkfield microscopy and quantitative real-time PCR. Analysis by PCR focused on the total bacterial counts and on six parodontopathogenic bacteria (*Aggregatibacter actinomycetem comitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Camphylobacter rectus, Dialister pneumosintes* und *Parvimonas micra*). Subjects received professional tooth cleaning and oral hygiene instruction over a period of three weeks. At baseline clinical data were recorded and samples were collected for microbiological analysis. Subjects were then instructed to avoid any form of oral hygiene during 2 weeks. Examinations were repeated on day 8 and 15. At the end of the study, all subjects received professional tooth cleaning. The following parameters were recorded at 4 sites per tooth (mesial, distal, buccal, lingual): plaque index (Silness &; Löe 1964), gingival index (Löe & Silness 1963), periodontal probing depth and bleeding on probing. For darkfield microscopy analysis gingival crevicular fluid was collected from mesial sites of the upper incisors and upper first premolars. For PCR analysis gingival crevicular fluid was collected at three arbitrary sites.

In both age groups a significant increase in plaque index, gingival index and bleeding on probing was observed during experimental gingivitis. No significant differences were found between age-groups for clinical parameters at any experimental period. Analysis by darkfield microscopy showed an significant decrease of coccus and a significant increase of mobile rods, spirochetes, filaments and fusiformes in both age groups. The increase of mobile rods was significantly higher in the older age group. PCR analysis showed an increase of total bacterial counts and of the amount of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia, Parvimonas micra* und *Dialister pneumosintes.* The increase of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was higher in the younger age group, while *Prevotella intermedia* and *Parvimonas micra* increased higher in the older age group. However, these differences between the groups did not reach significance. The amount of *Dialister pneumosintes* and *Porphyromonas gingivalis* showed no differences between the younger and the older group. At baseline examination *Aggregatibacter actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis* and *Parvimonas micra* were only detected in the older group, which was statistically significant for *Porphyromonas gingivalis.* In summary, all clinical parameters were significantly increased following 14 days of experimental gingivitis.

The amount of parodontopathogenic bacteria differed between the younger and the older age group.
It seems that Aggregatibacter actinomycetemcomitans appears in higher amounts in the younger age group, while *Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia* und *Parvimonas micra* are increased in the older age group. Studies with more probands are necessary to prove this tendency.

7. LITERATURVERZEICHNIS

Abbas, F., van d. Velden, Moorer, W. R., Everts, V., Vroom, T. M. & Scholte, G. (1986) Experimental gingivitis in relation to susceptibility to periodontal disease. II. Phase-contrast microbiological features and some host-response observations. *J.Clin.Periodontol.* **13** (6), 551-557.

Absolom, D. R. (1988) The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. *Can.J.Microbiol.* **34** (3), 287-298.

Abbott, M. A., Poiesz, B. J., Byrne, B. C., Kwok, S., Sninsky, J. J. & Ehrlich, G. D. (1988) Enzymatic gene amplification: qualitative and quantitative methods for detecting proviral DNA amplified in vitro. *J.Infect.Dis.* **158** (6), 1158-1169.

Adler, A. & Hefti, A. (1986) [Dark-field microscopic diagnosis as an aid in assessing periodontitis patients]. *Schweiz.Monatsschr.Zahnmed.* **96** (10), 1168-1175.

Albandar, J. M., Brunelle, J. A. & Kingman, A. (1999) Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J.Periodontol.* **70** (1), 13-29.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* **215** (3), 403-410.

Amano, K., Nishihara, T., Shibuya, N., Noguchi, T. & Koga, T. (1989) Immunochemical and structural characterization of a serotype-specific polysaccharide antigen from Actinobacillus actinomycetemcomitans Y4 (serotype b). *Infect.Immun.* **57** (10), 2942-2946.

Apse, P., Zarb, G. A., Schmitt, A. & Lewis, D. W. (1991) The longitudinal effectiveness of osseointegrated dental implants. The Toronto Study: peri-implant mucosal response. *Int.J.Periodontics.Restorative.Dent.* **11** (2), 94-111.

Asai, Y., Jinno, T., Igarashi, H., Ohyama, Y. & Ogawa, T. (2002) Detection and quantification of oral treponemes in subgingival plaque by real-time PCR. *J.Clin.Microbiol.* **40** (9), 3334-3340.

Ashkenazi, M., White, R. R. & Dennison, D. K. (1992) Neutrophil modulation by Actinobacillus actinomycetemcomitans. I. Chemotaxis, surface receptor expression and F-actin polymerization. *J.Periodontal Res.* **27** (4 Pt 1), 264-273.

Baehni, P., Tsai, C. C., McArthur, W. P., Hammond, B. F. & Taichman, N. S. (1979) Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. *Infect.Immun.* **24** (1), 233-243.

Berglundh, T. & Lindhe, J. (1993) Gingivitis in young and old dogs. *J.Clin.Periodontol.* **20** (3), 179-185.

Berglundh, T., Lindhe, J. & Sterrett, J. D. (1991) Clinical and structural characteristics of periodontal tissues in young and old dogs. *J.Clin.Periodontol.* **18** (8), 616-623.

Bloch, W. (1991) A biochemical perspective of the polymerase chain reaction. *Biochemistry* **30** (11), 2735-2747.

Bragd, L., Dahlen, G., Wikstrom, M. & Slots, J. (1987) The capability of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis and Bacteroides intermedius to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. *J.Clin.Periodontol.* **14** (2), 95-99.

Burdon K.L. (1928) Bacterium melaninogenicum from normal and pathologic tissues. *Journal of infectious Diseases* **42**, 161-171.

Burns, E. A., Lum, L. G., L'Hommedieu, G. & Goodwin, J. S. (1993) Specific humoral immunity in the elderly: in vivo and in vitro response to vaccination. *J.Gerontol.* **48** (6), B231-B236.

Cardullo, R. A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P. C. & Wolf, D. E. (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85** (23), 8790-8794.

Carlsson, J., Larsen, J. T. & Edlund, M. B. (1993) Peptostreptococcus micros has a uniquely high capacity to form hydrogen sulfide from glutathione. *Oral Microbiol.Immunol.* **8** (1), 42-45.

Caton, J., Polson, A., Bouwsma, O., Blieden, T., Frantz, B. & Espeland, M. (1988) Associations between bleeding and visual signs of interdental gingival inflammation. *J.Periodontol.* **59** (11), 722-727.

Clegg, R. M. (1992) Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol.* **211** 353-388.

Clegg, R. M. (1995) Fluorescence resonance energy transfer. *Curr.Opin.Biotechnol.* **6** (1), 103-110.

Contreras, A., Doan, N., Chen, C., Rusitanonta, T., Flynn, M. J. & Slots, J. (2000) Importance of Dialister pneumosintes in human periodontitis. *Oral Microbiol.Immunol.* **15** (4), 269-272.

Corless, C. E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Fox, A. J. & Kaczmarski, E. B. (2001) Simultaneous detection of Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J.Clin.Microbiol.* **39** (4), 1553-1558.

Cortelli, J. R., Aquino, D. R., Cortelli, S. C., Fernandes, C. B., Carvalho-Filho, J., Franco, G. C., Costa, F. O. & Kawai, T. (2008) Etiological analysis of initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity. *J.Clin.Microbiol.* **46** (4), 1322-1329.

Crockett, A. O. & Wittwer, C. T. (2001) Fluorescein-labeled oligonucleotides for real-time pcr: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. *Anal.Biochem.* **290** (1), 89-97.

Davenport, R. H., Jr., Simpson, D. M. & Hassell, T. M. (1982) Histometric comparison of active and inactive lesions of advanced periodontitis. *J.Periodontol.* **53** (5), 285-295.

Demmer, R. T., Papapanou, P. N., Jacobs, D. R., Jr. & Desvarieux, M. (2008) Bleeding on probing differentially relates to bacterial profiles: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study. *J.Clin.Periodontol.* **35** (6), 479-486.

Diaz, R., Ghofaily, L. A., Patel, J., Balashova, N. V., Freitas, A. C., Labib, I. & Kachlany, S. C. (2006) Characterization of leukotoxin from a clinical strain of Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Microb.Pathog.* **40** (2), 48-55.

Dongari-Bagtzoglou, A. I. & Ebersole, J. L. (1996) Production of inflammatory mediators and cytokines by human gingival fibroblasts following bacterial challenge. *J.Periodontal Res.* **31** (2), 90-98.

Drake, C. W., Hunt, R. J., Beck, J. D. & Zambon, J. J. (1993) The distribution and interrelationship of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, and BANA scores among older adults. *J.Periodontol.* **64** (2), 89-94.

Dzink, J. L., Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. (1988) The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J.Clin.Periodontol.* **15** (5), 316-323.

Ebersole, J. L., Steffen, M. J., Gonzalez-Martinez, J. & Novak, M. J. (2008) Effects of age and oral disease on systemic inflammatory and immune parameters in nonhuman primates. *Clin.Vaccine Immunol.* **15** (7), 1067-1075.

Erlich, H. A. (1989) Polymerase chain reaction. *J.Clin.Immunol.* **9** (6), 437-447.

Farrelly, V., Rainey, F. A. & Stackebrandt, E. (1995) Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl.Environ.Microbiol.* **61** (7), 2798-2801.

Ferraro, C. T., Gornic, C., Barbosa, A. S., Peixoto, R. J. & Colombo, A. P. (2007) Detection of Dialister pneumosintes in the subgingival biofilm of subjects with periodontal disease. *Anaerobe.* **13** (5-6), 244-248.

Finegold, S. M. (1977). *Anaerobic Bacteria in Human Disease*. New York: Academic Press.

Fischman, S. L. (1986) Current status of indices of plaque. *J.Clin.Periodontol.* **13** (5), 371-380.

Fives-Taylor, P. M., Meyer, D. H., Mintz, K. P. & Brissette, C. (1999) Virulence factors of Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Periodontol.2000.* **20** 136-167.

Fransson, C., Berglundh, T. & Lindhe, J. (1996) The effect of age on the development of gingivitis. Clinical, microbiological and histological findings. *J.Clin.Periodontol.* **23** (4), 379-385.

Fransson, C., Mooney, J., Kinane, D. F. & Berglundh, T. (1999) Differences in the inflammatory response in young and old human subjects during the course of experimental gingivitis. *J.Clin.Periodontol.* **26** (7), 453-460.

Furuichi, Y., Lindhe, J., Ramberg, P. & Volpe, A. R. (1992) Patterns of de novo plaque formation in the human dentition. *J.Clin.Periodontol.* **19** (6), 423-433.

Garnick, J. J., Keagle, J. G., Searle, J. R., King, G. E. & Thompson, W. O. (1989) Gingival resistance to probing forces. II. The effect of inflammation and pressure on probe displacement in beagle dog gingivitis. *J.Periodontol.* **60** (9), 498-505.

Garnick, J. J. & Silverstein, L. (2000) Periodontal probing: probe tip diameter. *J.Periodontol.* **71** (1), 96-103.

Ghayoumi, N., Chen, C. & Slots, J. (2002) Dialister pneumosintes, a new putative periodontal pathogen. *J.Periodontal Res.* **37** (1), 75-78.

Gibson, U. E., Heid, C. A. & Williams, P. M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6** (10), 995-1001.

Gillespie, J., De Nardin, E., Radel, S., Kuracina, J., Smutko, J. & Zambon, J. J. (1992) Production of an extracellular toxin by the oral pathogen Campylobacter rectus. *Microb.Pathog.* **12** (1), 69-77.

Gowen, M., Wood, D. D., Ihrie, E. J., McGuire, M. K. & Russell, R. G. (1983) An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro. *Nature* **306** (5941), 378-380.

Grenier, D. & Michaud, J. (1994) Demonstration of human immunoglobulin G Fc-binding activity in oral bacteria. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **1** (2), 247-249.

Griffiths, G. S. (2003) Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol.2000.* **31** 32-42.

Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Tanner, A., Pollack, R. P., Smith, C., Kent, R. L., Jr. & Socransky, S. S. (1998) Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J.Clin.Periodontol.* **25** (5), 346-353.

Haffajee, A. D., Dzink, J. L. & Socransky, S. S. (1988a) Effect of modified Widman flap surgery and systemic tetracycline on the subgingival microbiota of periodontal lesions. *J.Clin.Periodontol.* **15** (4), 255-262.

Haffajee, A. D., Socransky, S. S., Dzink, J. L., Taubman, M. A. & Ebersole, J. L. (1988b) Clinical, microbiological and immunological features of subjects with refractory periodontal diseases. *J.Clin.Periodontol.* **15** (6), 390-398.

Hamlet, S. M., Cullinan, M. P., Westerman, B., Lindeman, M., Bird, P. S., Palmer, J. & Seymour, G. J. (2001) Distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Prevotella intermedia in an Australian population. *J.Clin.Periodontol.* **28** (12), 1163-1171.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. & Williams, P. M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6** (10), 986-994.

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* **11** (9), 1026-1030.

Holdeman L.V., Kelly R.W., Moore W.E.C. (1984) Genus I. Bacteroides Castellani and Chalmers 1919, 959^{AL}. In: Krieg N.R., Holt J.G, eds. *Bergey´s manual of systematic bacteriology*, vol 1 Baltimore: Williams & Wilkins Co, 604-631.

Holland, P. M., Abramson, R. D., Watson, R. & Gelfand, D. H. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88** (16), 7276-7280.

Holm-Pedersen, P. & Zederfeldt, B. (1973) Respiratory gas tensions and blood flow in wounds in young and old rats. *Scand.J.Plast.Reconstr.Surg.* **7** (2), 91-96.

Holm-Pedersen, P., Agerbaek, N. & Theilade, E. (1975) Experimental gingivitis in young and elderly individuals. *J.Clin.Periodontol.* **2** (1), 14-24.

Imamura, T. (2003) The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J.Periodontol.* **74** (1), 111-118.

Jagels, M. A., Travis, J., Potempa, J., Pike, R. & Hugli, T. E. (1996) Proteolytic inactivation of the leukocyte C5a receptor by proteinases derived from Porphyromonas gingivalis. *Infect.Immun.* **64** (6), 1984-1991.

Jaroslow, B. N., Suhrbier, K. M. & Fritz, T. E. (1974) Decline and restoration of antibody-forming capacity in aging beagle dogs. *J.Immunol.* **112** (4), 1467-1476.

Jervoe-Storm, P. M., Koltzscher, M., Falk, W., Dorfler, A. & Jepsen, S. (2005) Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J.Clin.Periodontol.* **32** (7), 778-783.

Kamma, J. J., Contreras, A. & Slots, J. (2001) Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *J.Clin.Periodontol.* **28** (9), 879-885.

Kamma, J. J., Nakou, M. & Manti, F. A. (1994) Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. *J.Periodontol.* **65** (11), 1073-1078.

Kamma, J. J., Nakou, M. & Manti, F. A. (1995) Predominant microflora of severe, moderate and minimal periodontal lesions in young adults with rapidly progressive periodontitis. *J.Periodontal Res.* **30** (1), 66-72.

Ke, D., Menard, C., Picard, F. J., Boissinot, M., Ouellette, M., Roy, P. H. & Bergeron, M. G. (2000) Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin.Chem.* **46** (3), 324-331.

Kilian, M. (1981) Degradation of immunoglobulins A2, A2, and G by suspected principal periodontal pathogens. *Infect.Immun.* **34** (3), 757-765.

Kishimoto, S., Tomino, S., Mitsuya, H., Fujiwara, H. & Tsuda, H. (1980) Age-related decline in the in vitro and in vivo syntheses of anti-tetanus toxoid antibody in humans. *J.Immunol.* **125** (5), 2347-2352.

Kornman, K. S. & Loesche, W. J. (1980) The subgingival microbial flora during pregnancy. *J.Periodontal Res.* **15** (2), 111-122.

Kornman, K. S. & Loesche, W. J. (1982) Effects of estradiol and progesterone on Bacteroides melaninogenicus and Bacteroides gingivalis. *Infect.Immun.* **35** (1), 256-263.

Kornman, K. S. (1987) Nature of periodontal diseases: assessment and diagnosis. *J.Periodontal Res.* **22** (3), 192-204.

Kostrikis, L. G., Tyagi, S., Mhlanga, M. M., Ho, D. D. & Kramer, F. R. (1998) Spectral genotyping of human alleles. *Science* **279** (5354), 1228-1229.

Lai, C. H., Oshima, K., Slots, J. & Listgarten, M. A. (1992) Wolinella recta in adult gingivitis and periodontitis. *J.Periodontal Res.* **27** (1), 8-14.

Lamell, C. W., Griffen, A. L., McClellan, D. L. & Leys, E. J. (2000) Acquisition and colonization stability of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in children. *J.Clin.Microbiol.* **38** (3), 1196-1199.

Lamster, I. B., Hartley, L. J. & Vogel, R. I. (1985) Development of a biochemical profile for gingival crevicular fluid. Methodological considerations and evaluation of collagen-degrading and ground substance-degrading enzyme activity during experimental gingivitis. *J.Periodontol.* **56** (11 Suppl), 13-21.

Lange, D. E. (1978) [The use of indices in the diagnosis of periodontal diseases]. *Dtsch.Zahnarztl.Z.* **33** (1), 8-11.

Lau, L., Sanz, M., Herrera, D., Morillo, J. M., Martin, C. & Silva, A. (2004) Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in subgingival plaque samples. *J.Clin.Periodontol.* **31** (12), 1061-1069.

Lekholm, U., Ericsson, I., Adell, R. & Slots, J. (1986) The condition of the soft tissues at tooth and fixture abutments supporting fixed bridges. A microbiological and histological study. *J.Clin.Periodontol.* **13** (6), 558-562.

Lie, M. A., van der Weijden, G. A., Timmerman, M. F., Loos, B. G., van Steenbergen, T. J. & van, d., V (2001) Occurrence of Prevotella intermedia and Prevotella

nigrescens in relation to gingivitis and gingival health. *J.Clin.Periodontol.* **28** (2), 189-193.

Lindhe, J., Karring, T, Lang, N.P. (2003) Clinical periodontology and implant dentistry; fourth edition; Blackwell Munksgaard; 150-163

Linz, U. & Degenhardt, H. (1990) [Polymerase chain reaction: an overview]. *Naturwissenschaften* **77** (11), 515-530.

Listgarten, M. A. (1980) Periodontal probing: what does it mean? *J.Clin.Periodontol.* **7** (3), 165-176.

Listgarten, M. A. & Hellden, L. (1978) Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. *J.Clin.Periodontol.* **5** (2), 115-132.

Listgarten, M. A. & Levin, S. (1981) Positive correlation between the proportions of subgingival spirochetes and motile bacteria and susceptibility of human subjects to periodontal deterioration. *J.Clin.Periodontol.* **8** (2), 122-138.

Löe, H. & Silness, J. (1963) Periodontal disease in pregnancy. I. Prevalence and severitiy. *Acta Odontol.Scand.* **21** 533-551.

Löe, H., Theilade, E. & Jensen, S. B. (1965) Experimental gingivitis in man. *J.Periodontol.* **36** 177-187.

Loesche, W. J. & Syed, S. A. (1978) Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque and gingivitis score. *Infect.Immun.* **21** (3), 830-839.

Loesche, W. J., Syed, S. A., Laughon, B. E. & Stoll, J. (1982) The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J.Periodontol.* **53** (4), 223-230.

Loesche, W. J., Syed, S. A., Morrison, E. C., Laughon, B. & Grossman, N. S. (1981) Treatment of periodontal infections due to anaerobic bacteria with short-term treatment with metronidazole. *J.Clin.Periodontol.* **8** (1), 29-44.

Lyons, S. R., Griffen, A. L. & Leys, E. J. (2000) Quantitative real-time PCR for Porphyromonas gingivalis and total bacteria. *J.Clin.Microbiol.* **38** (6), 2362-2365.

MacDonald, J. B., Sutton, R. M., Knoll, M. L., Madlener, E. M. & Grainger, R. M. (1956) The pathogenic components of an experimental fusospirochetal infection. *J.Infect.Dis.* **98** (1), 15-20.

Mackler, S. B. & Crawford, J. J. (1973) Plaque development and gingivitis in the primary dentition. *J.Periodontol.* **44** (1), 18-24.

Mandell, R. L. & Socransky, S. S. (1981) A selective medium for Actinobacillus actinomycetemcomitans and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J.Periodontol.* **52** (10), 593-598.

Matsson, L. (1978) Development of gingivitis in pre-school children and young adults. A comparative experimental study. *J.Clin.Periodontol.* **5** (1), 24-34.

Matsson, L. & Goldberg, P. (1985) Gingival inflammatory reaction in children at different ages. *J.Clin.Periodontol.* **12** (2), 98-103.

Matto, J., Saarela, M., Alaluusua, S., Oja, V., Jousimies-Somer, H. & Asikainen, S. (1998) Detection of Porphyromonas gingivalis from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. *J.Clin.Microbiol.* **36** (1), 157-160.

McAvin, J. C., Reilly, P. A., Roudabush, R. M., Barnes, W. J., Salmen, A., Jackson, G. W., Beninga, K. K., Astorga, A., McCleskey, F. K., Huff, W. B., Niemeyer, D. & Lohman, K. L. (2001) Sensitive and specific method for rapid identification of Streptococcus pneumoniae using real-time fluorescence PCR. *J.Clin.Microbiol.* **39** (10), 3446-3451.

Menon, M., Jaroslow, R. N. & Koesterer, R. (1974) The decline of cell-mediated immunity in aging mice. *J.Gerontol.* **29** (5), 499-505.

Meyer, D. H. & Fives-Taylor, P. M. (1994) Characteristics of adherence of Actinobacillus actinomycetemcomitans to epithelial cells. *Infect.Immun.* **62** (3), 928-935.

Mierau, H. D. (1984) Relations between plaque formation, tooth surface roughness and self-cleaning. *Dtsch.Zahnarztl.Z.* **39** (9), 691-698.

Mizoguchi, K., Ohta, H., Miyagi, A., Kurihara, H., Takashiba, S., Kato, K., Murayama, Y. & Fukui, K. (1997) The regulatory effect of fermentable sugar levels on the

production of leukotoxin by Actinobacillus actinomycetemcomitans. *FEMS Microbiol.Lett.* **146** (1), 161-166.

Moore, W. E., Holdeman, L. V., Cato, E. P., Smibert, R. M., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G. & Ranney, R. R. (1985) Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect.Immun.* **48** (2), 507-519.

Moore, W. E., Holdeman, L. V., Cato, E. P., Smibert, R. M., Burmeister, J. A. & Ranney, R. R. (1983) Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans. *Infect.Immun.* **42** (2), 510-515.

Moore, W. E., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Cato, E. P., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G. & Ranney, R. R. (1984) Bacteriology of experimental gingivitis in children. *Infect.Immun.* **46** (1), 1-6.

Moore, W. E., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Good, I. J., Burmeister, J. A., Palcanis, K. G. & Ranney, R. R. (1982a) Bacteriology of experimental gingivitis in young adult humans. *Infect.Immun.* **38** (2), 651-667.

Moore, W. E., Holdeman, L. V., Smibert, R. M., Hash, D. E., Burmeister, J. A. & Ranney, R. R. (1982b) Bacteriology of severe periodontitis in young adult humans. *Infect.Immun.* **38** (3), 1137-1148.

Moore, W. E. & Moore, L. V. (1994) The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol.2000.* **5** 66-77.

Newman, M. G., Socransky, S. S., Savitt, E. D., Propas, D. A. & Crawford, A. (1976) Studies of the microbiology of periodontosis. *J.Periodontol.* **47** (7), 373-379.

Nishihara, T., Ueda, N., Amano, K., Ishihara, Y., Hayakawa, H., Kuroyanagi, T., Ohsaki, Y., Nagata, K. & Noguchi, T. (1995) Actinobacillus actinomycetemcomitans Y4 capsular-polysaccharide-like polysaccharide promotes osteoclast-like cell formation by interleukin-1 alpha production in mouse marrow cultures. *Infect.Immun.* **63** (5), 1893-1898.

Nonnenmacher, C., Dalpke, A., Mutters, R. & Heeg, K. (2004) Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J.Microbiol.Methods* **59** (1), 117-125.

Norskov-Lauritsen, N. & Kilian, M. (2006) Reclassification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Haemophilus aphrophilus, Haemophilus paraphrophilus and Haemophilus segnis as Aggregatibacter actinomycetemcomitans gen. nov., comb. nov., Aggregatibacter aphrophilus comb. nov. and Aggregatibacter segnis comb. nov., and emended description of Aggregatibacter aphrophilus to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **56** (Pt 9), 2135-2146.

Oltisky P, Gates F. (1921) Experimental studies of the nasopharyngeal secretions from influenza patients. *J Exp Med* **33**, 713-729.

Oppenheim, F. G. (1970) Preliminary observations on the presence and origin of serum albumin in human saliva. *Helv.Odontol.Acta* **14** (1), 10-17.

Page, R. C. & Schroeder, H. E. (1976) Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* **34** (3), 235-249.

Potempa, J., Pavloff, N. & Travis, J. (1995) Porphyromonas gingivalis: a proteinase/gene accounting audit. *Trends Microbiol.* **3** (11), 430-434.

Rams, T. E., Feik, D., Listgarten, M. A. & Slots, J. (1992) Peptostreptococcus micros in human periodontitis. *Oral Microbiol.Immunol.* **7** (1), 1-6.

Rams, T. E., Feik, D. & Slots, J. (1993) Campylobacter rectus in human periodontitis. *Oral Microbiol.Immunol.* **8** (4), 230-235.

Rosan, B., Slots, J., Lamont, R. J., Listgarten, M. A. & Nelson, G. M. (1988) Actinobacillus actinomycetemcomitans fimbriae. *Oral Microbiol.Immunol.* **3** (2), 58-63.

Rodenburg, J. P., van Winkelhoff, A. J., Winkel, E. G., Goene, R. J., Abbas, F. & de Graff, J. (1990) Occurrence of Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius and Actinobacillus actinomycetemcomitans in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J.Clin.Periodontol.* **17** (6), 392-399.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239** (4839), 487-491.

Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230** (4732), 1350-1354.

Sakamoto, M., Suzuki, M., Umeda, M., Ishikawa, I. & Benno, Y. (2002) Reclassification of Bacteroides forsythus (Tanner et al. 1986) as Tannerella forsythensis corrig., gen. nov., comb. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* **52** (Pt 3), 841-849.

Savitt, E. D. & Kent, R. L. (1991) Distribution of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis by subject age. *J.Periodontol.* **62** (8), 490-494.

Shah, H. N. & Gharbia, S. E. (1992) Biochemical and chemical studies on strains designated Prevotella intermedia and proposal of a new pigmented species, Prevotella nigrescens sp. nov. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **42** (4), 542-546.

Shelburne, C. E., Prabhu, A., Gleason, R. M., Mullally, B. H. & Coulter, W. A. (2000) Quantitation of Bacteroides forsythus in subgingival plaque comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. *J.Microbiol.Methods* **39** (2), 97-107.

Shenker, B. J., Kushner, M. E. & Tsai, C. C. (1982) Inhibition of fibroblast proliferation by Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect.Immun.* **38** (3), 986-992.

Shenker, B. J., Vitale, L. & Slots, J. (1991) Immunosuppressive effects of Prevotella intermedia on in vitro human lymphocyte activation. *Infect.Immun.* **59** (12), 4583-4589.

Silness, J. & Loee, H. (1964) Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontol.Scand.* **22** 121-135.

Siqueira, J. F., Jr. & Rocas, I. N. (2002) Dialister pneumosintes can be a suspected endodontic pathogen. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* **94** (4), 494-498.

Skapski, H. & Lehner, T. (1976) A crevicular washing method for investigating immune components of crevicular fluid in man. *J.Periodontal Res.* **11** (1), 19-24.

Slots, J. (1977) The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. *Scand.J.Dent.Res.* **85** (2), 114-121.

Slots, J., Moenbo, D., Langebaek, J. & Frandsen, A. (1978) Microbiota of gingivitis in man. *Scand.J.Dent.Res.* **86** (3), 174-181.

Slots, J. (1982) Selective medium for isolation of Actinobacillus actinomycetemcomitans. *J.Clin.Microbiol.* **15** (4), 606-609.

Slots, J. (1984) Actinobacillus actinomycetemcomitans and Bacteroides gingivalis in advanced periodontitis in man. *Dtsch.Zahnarztl.Z.* **39** (8), 615-622.

Slots, J., Bragd, L., Wikstrom, M. & Dahlen, G. (1986) The occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis and Bacteroides intermedius in destructive periodontal disease in adults. *J.Clin.Periodontol.* **13** (6), 570-577.

Slots, J. & Ting, M. (1999) Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol.2000.* **20** 82-121.

Socransky, S. S. & Gibbons, R. J. (1965) Reqired role of bacteroides malninogenicus in mixed anaerobic infections. *J.Infect.Dis.* **115** 247-253.

Socransky, S. S., Smith, C., Martin, L., Paster, B. J., Dewhirst, F. E. & Levin, A. E. (1994) "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* **17** (4), 788-792.

Stoller, S. M. (1965) The microtopography of teeth. *J.Periodontol.* **36** (6), 485-493.

Stryer, L. & Haugland, R. P. (1967) Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **58** (2), 719-726.

Sueda, T., Bang, J. & Cimasoni, G. (1969) Collection of gingival fluid for quantitative analysis. *J.Dent.Res.* **48** (1), 159.

Suido, H., Zambon, J. J., Mashimo, P. A., Dunford, R. & Genco, R. J. (1988) Correlations between gingival crevicular fluid enzymes and the subgingival microflora. *J.Dent.Res.* **67** (8), 1070-1074.

Sundqvist, G. & Johansson, E. (1982) Bactericidal effect of pooled human serum on Bacteroides melaninogenicus, Bacteroides asaccharolyticus and Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Scand.J.Dent.Res.* **90** (1), 29-36.

Syed, S. A. & Loesche, W. J. (1978) Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque age. *Infect.Immun.* **21** (3), 821-829.

Taichman, N. S., Dean, R. T. & Sanderson, C. J. (1980) Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from Actinobacillus actinomycetemcomitans. *Infect.Immun.* **28** (1), 258-268.

Tam, Y. C. & Chan, E. C. (1985) Purification and characterization of hyaluronidase from oral Peptostreptococcus species. *Infect.Immun.* **47** (2), 508-513.

Tanner, A. C. & Goodson, J. M. (1986) Sampling of microorganisms associated with periodontal disease. *Oral Microbiol.Immunol.* **1** (1), 15-22.

Tanner, A. C., Haffer, C., Bratthall, G. T., Visconti, R. A. & Socransky, S. S. (1979) A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J.Clin.Periodontol.* **6** (5), 278-307.

Tew, J. G., Marshall, D. R., Burmeister, J. A. & Ranney, R. R. (1985) Relationship between gingival crevicular fluid and serum antibody titers in young adults with generalized and localized periodontitis. *Infect.Immun.* **49** (3), 487-493.

Theilade, E., Wright, W. H., Jensen, S. B. & Loe, H. (1966) Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J.Periodontal Res.* **1** 1-13.

Tsuruda, K., Miyake, Y., Suginaka, H., Okamoto, H. & Iwamoto, Y. (1995) Microbiological features of gingivitis in pubertal children. *J.Clin.Periodontol.* **22** (4), 316-320.

Tyagi, S., Bratu, D. P. & Kramer, F. R. (1998) Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat.Biotechnol.* **16** (1), 49-53.

Tyagi, S. & Kramer, F. R. (1996) Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat.Biotechnol.* **14** (3), 303-308.

van Dalen, P. J., van Steenbergen, T. J., Cowan, M. M., Busscher, H. J. & de Graaff, J. (1993) Description of two morphotypes of Peptostreptococcus micros. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **43** (4), 787-793.

Van Dyke, T. E., Bartholomew, E., Genco, R. J., Slots, J. & Levine, M. J. (1982) Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. *J.Periodontol.* **53** (8), 502-508.

Van Dyke, T. E., Horoszewicz, H. U., Cianciola, L. J. & Genco, R. J. (1980) Neutrophil chemotaxis dysfunction in human periodontitis. *Infect.Immun.* **27** (1), 124-132.

van Steenbergen, T. J., Namavar, F. & de Graaff, J. (1985) Chemiluminescence of human leukocytes by black-pigmented Bacteroides strains from dental plaque and other sites. *J.Periodontal Res.* **20** (1), 58-71.

van Steenbergen, T. J., Timmerman, M. F., Mikx, F. H., de Quincey, G., van der Weijden, G. A., van, d., V & de Graaff, J. (1996) Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. *J.Clin.Periodontol.* **23** (10), 955-959.

van Winkelhoff, A. J., Loos, B. G., van der Reijden, W. A. & van, d., V (2002) Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J.Clin.Periodontol.* **29** (11), 1023-1028.

van Winkelhoff, A. J., van Steenbergen, T. J. & de Graaff, J. (1988) The role of black-pigmented Bacteroides in human oral infections. *J.Clin.Periodontol.* **15** (3), 145-155.

Van der Velden, U. (1984) Effect of age on the periodontium. *J.Clin.Periodontol.* **11** (5), 281-294.

Van der Velden, U., Abbas, F. & Hart, A. A. (1985) Experimental gingivitis in relation to susceptibility to periodontal disease. (I.) Clinical observations. *J.Clin.Periodontol.* **12** (1), 61-68.

Weksler, M. E. & Hutteroth, T. H. (1974) Impaired lymphocyte function in aged humans. *J.Clin.Invest* **53** (1), 99-104.

White, D. & Mayrand, D. (1981) Association of oral Bacteroides with gingivitis and adult periodontitis. *J.Periodontal Res.* **16** (3), 259-265.

Winkel, E. G., Abbas, F., Van, d., V, Vroom, T. M., Scholte, G. & Hart, A. A. (1987) Experimental gingivitis in relation to age in individuals not susceptible to periodontal destruction. *J.Clin.Periodontol.* **14** (9), 499-507.

Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Moss, A. A. & Rasmussen, R. P. (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* **22** (1), 130-138.

Wong, C., Dowling, C. E., Saiki, R. K., Higuchi, R. G., Erlich, H. A. & Kazazian, H. H., Jr. (1987) Characterization of beta-thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* **330** (6146), 384-386.

Wu, P. & Brand, L. (1994) Resonance energy transfer: methods and applications. *Anal.Biochem.* **218** (1), 1-13.

Yang, H. W., Huang, Y. F. & Chou, M. Y. (2004) Occurrence of Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontally diseased and healthy subjects. *J.Periodontol.* **75** (8), 1077-1083.

Zafiropoulos, G. G., Mengel, R. & Flores-de-Jacoby, L. (1991a) [Clinical indices in periodontal diagnosis. A review]. *Dtsch.Zahn Mund Kieferheilkd.Zentralbl.* **79** (2), 125-140.

Zafiropoulos, G. G., Stelzel, M., Mengel, R., Flores-de-Jacoby, L. & Kolb, G. (1991b) [Sulcus fluid in periodontal diagnosis. A review]. *Schweiz.Monatsschr.Zahnmed.* **101** (8), 973-985.

Zambon, J. J., Christersson, L. A. & Slots, J. (1983) Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and dis-

tribution of biotypes and serotypes within families. *J.Periodontol.* **54** (12), 707-711.

Zappa, U., Reinking-Zappa, M., Graf, H., Gmur, R. & Savitt, E. (1990) Comparison of serological and DNA probe analyses for detection of suspected periodontal pathogens in subgingival plaque samples. *Arch.Oral Biol.* **35 Suppl** 161S-164S.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µm	Mikrometer
Aac	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
API	Approximal Plaque Index
BLAST	basic local alignement search tool
BNS	Bluten nach Sondieren
CPA	capsular-like polysaccharid antigene
DNA	desoxy ribonuclein acid
Dp	Dialister pneumosintes
FAM	6-carboxyflourescein
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
GI	Gingival Index
GR	Gruppe
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
NUG	nekrotisierende ulzerierende Gingivitis
PCR	polymerase chain reaction
Pg	Porphyromonas gingivalis
Pi	Prevotella intermedia
PI	Plaque Index
Pm	Parvimonas micra
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RFT	reduced transport fluid
r-RNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SD	standard deviation
SPSS	statistical products and service solutions
TAMRA	6-carboxytetramathylrhodamine
Taq	Thermophilus aquaticus

9. ANHANG

9.1 Materialien und Laborgeräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Geräte wurden von folgenden Firmen bezogen:

- **Antaeos**, München, Deutschland: Sterile Papierspitzen
- **Leitz**, Wetzlar, Deutschland: Orthoplan Dunkelfeldmikroskop
- **Quiagen**, Hilden, Deutschland: Dneasy tissue kit
- **Applied Biosystems International**,Lincoln, USA: Primer express software; ABI Prism 7700 SDS

MWG, München, Deutschland: Primer und Rückwärtsprimer

- **Eurogentec**, Lüttich, Belgien: Probe

9.2 Tabellen und Abbildungen

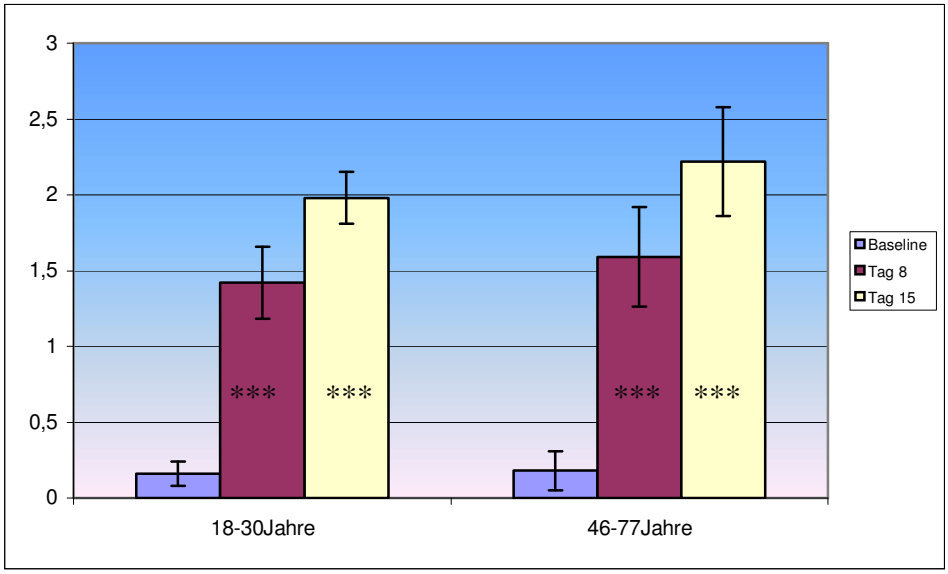


Abb.22 Plaque Index

Der *t-Test für verbundene Stichproben* auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.* signifikant p<0,05; ** sehr signifikant p<0,005; *** hoch signifikant(p<0,001)

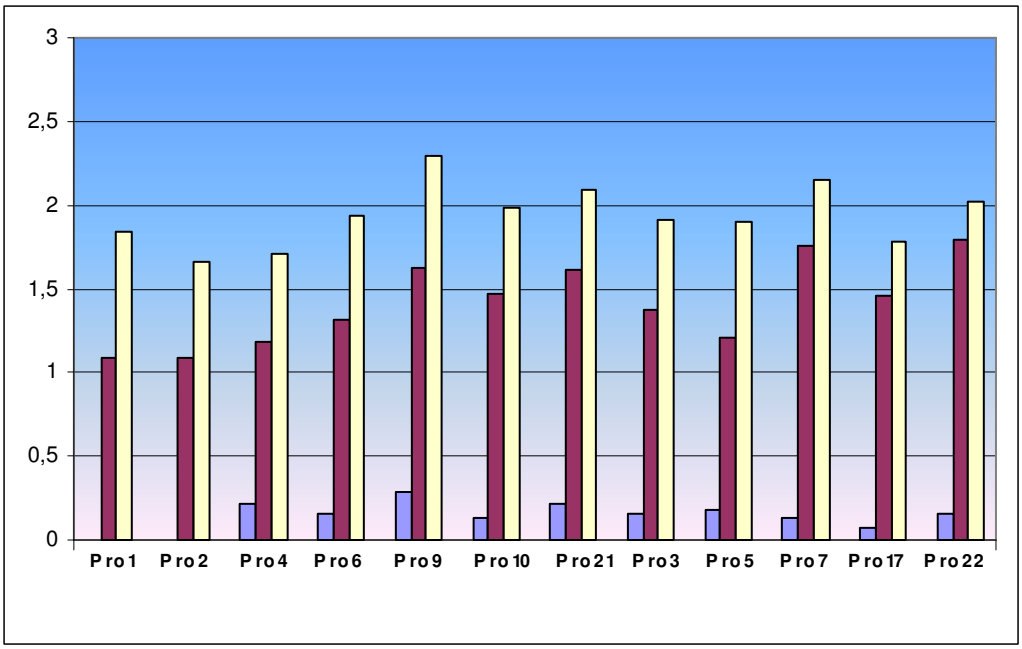


Abb.23 Plaque Index
einzelne Probanden 18-30-Jährige
Pro = Proband

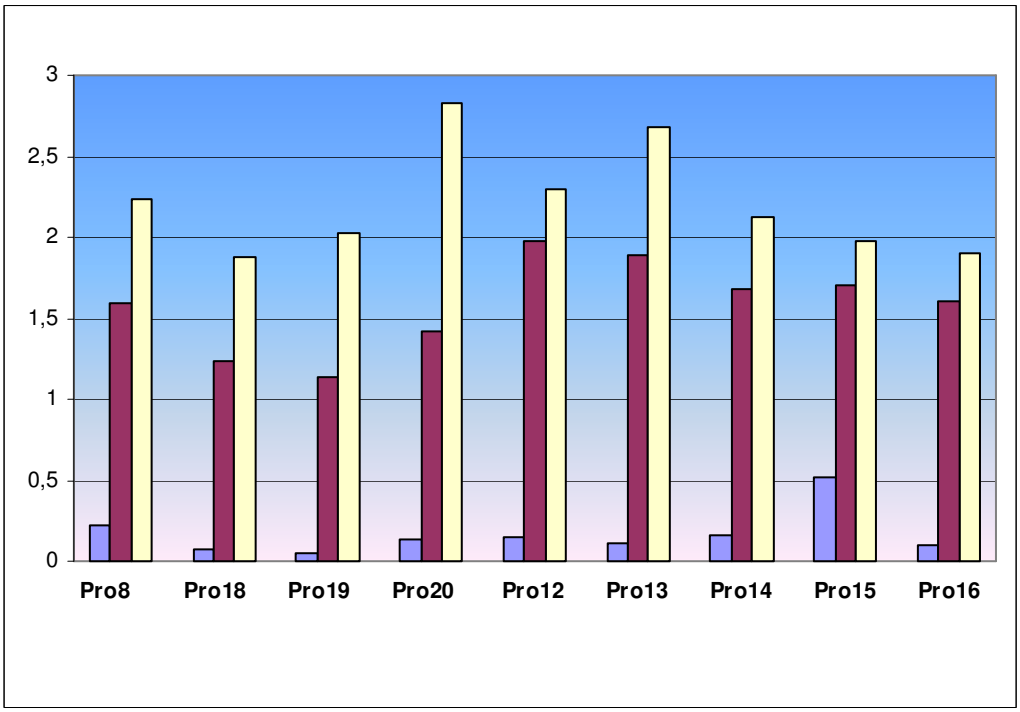


Abb.24 Plaque Index
einzelne Probanden 46-77-Jährige
Pro = Proband

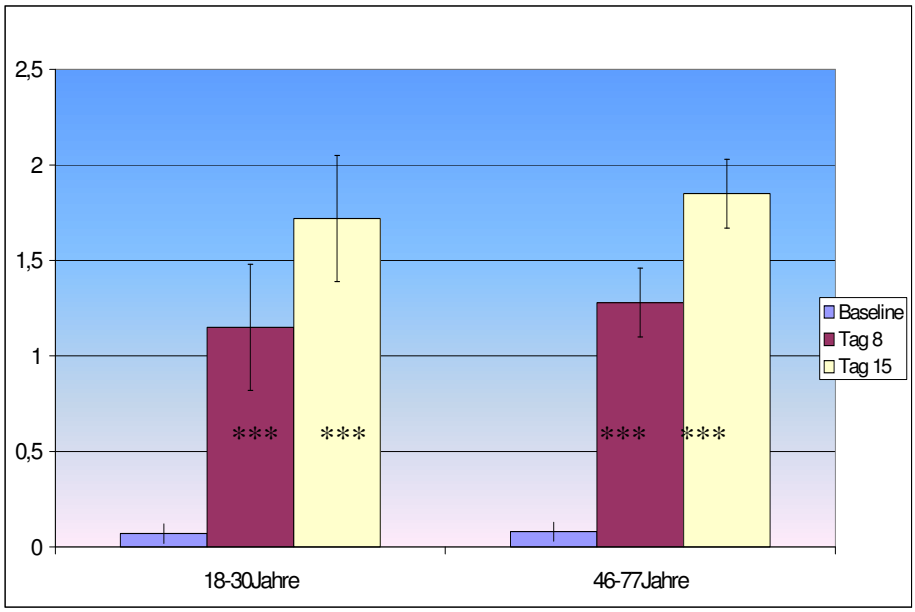


Abb.25 Gingival Index

Der *t-Test für verbundene Stichproben* auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.* signifikant p<0,05; ** sehr signifikant p<0,005; *** hoch signifikant(p<0,001)

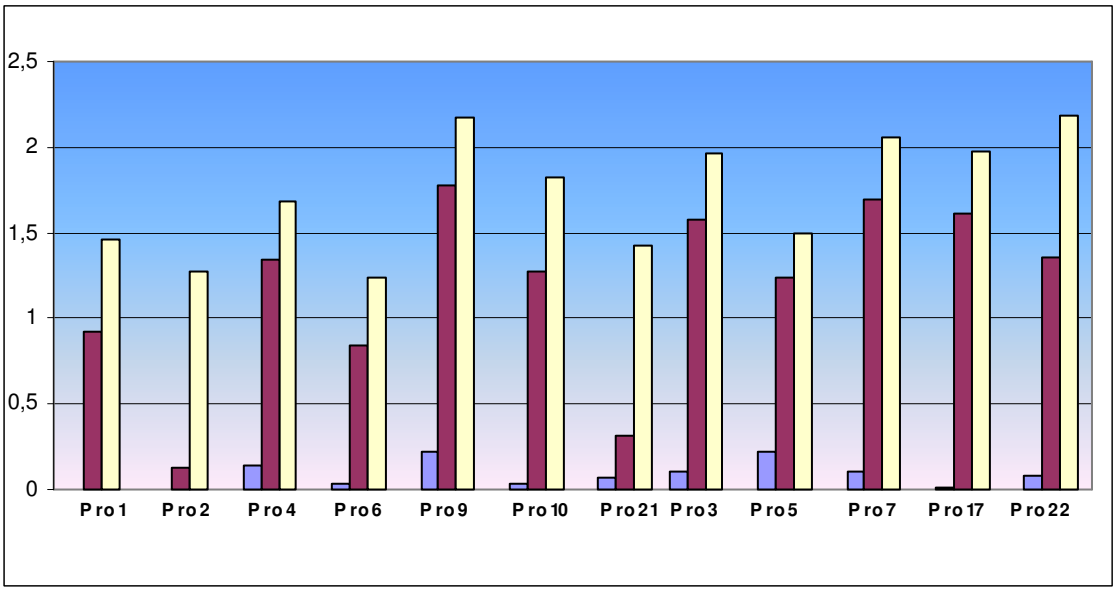


Abb.26 Gingival Index
einzelne Probanden 18-30-Jährige
Pro = Proband

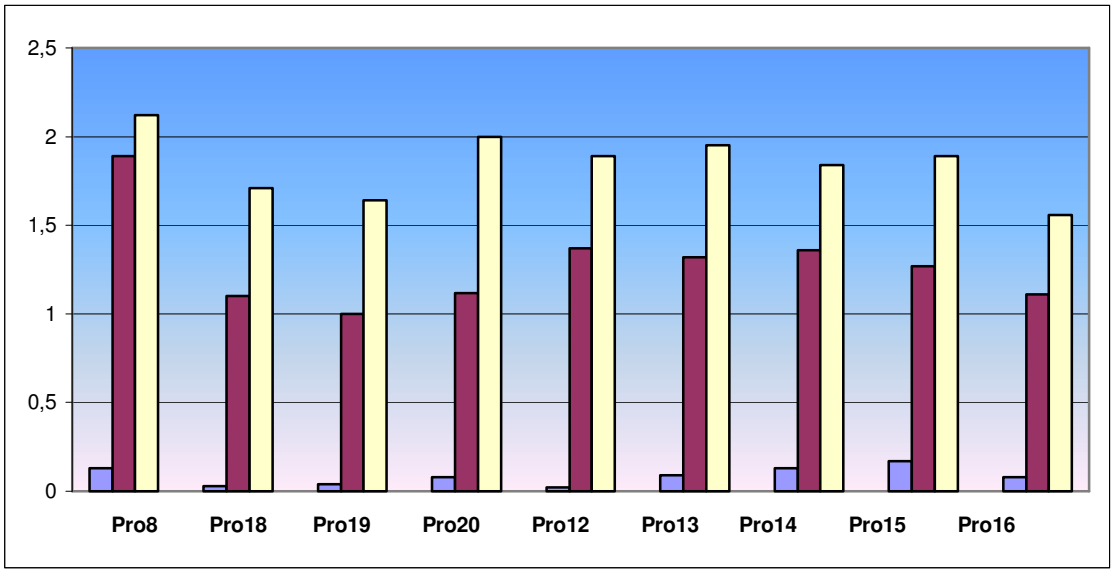


Abb.27 Gingival Index
einzelne Probanden 46-77-Jährige
Pro = Proband

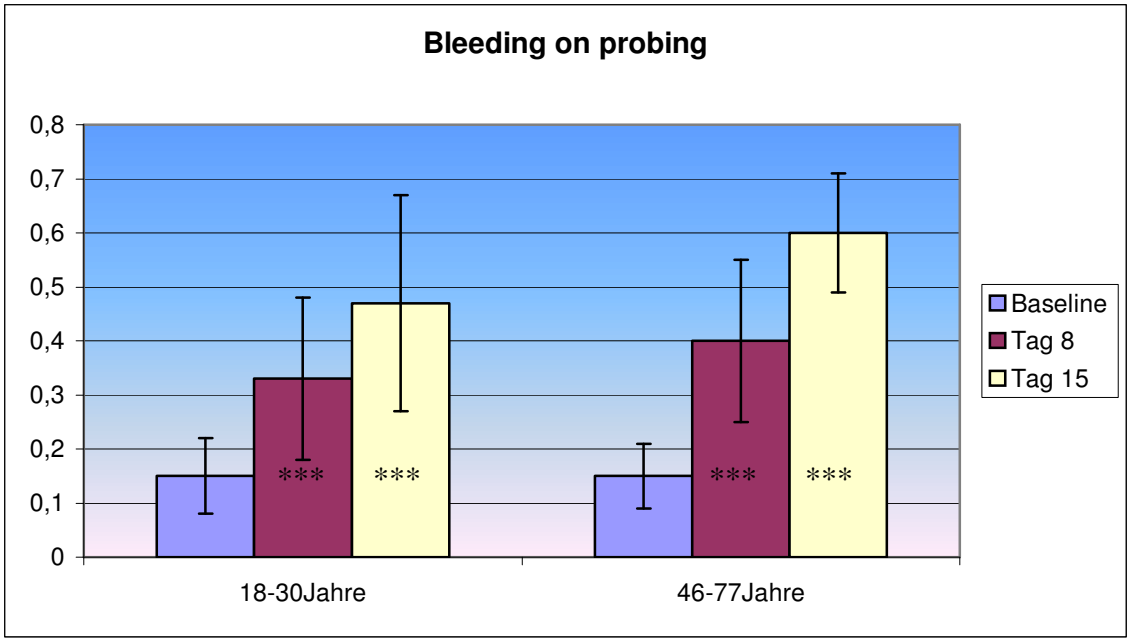


Abb.28 Bluten nach Sondieren

Der *t-Test für verbundene Stichproben* auf Unterschiede zu den Zeitpunkten zeigt signifikante Anstiege.* signifikant p<0,05; ** sehr signifikant p<0,005; *** hoch signifikant(p<0,001)

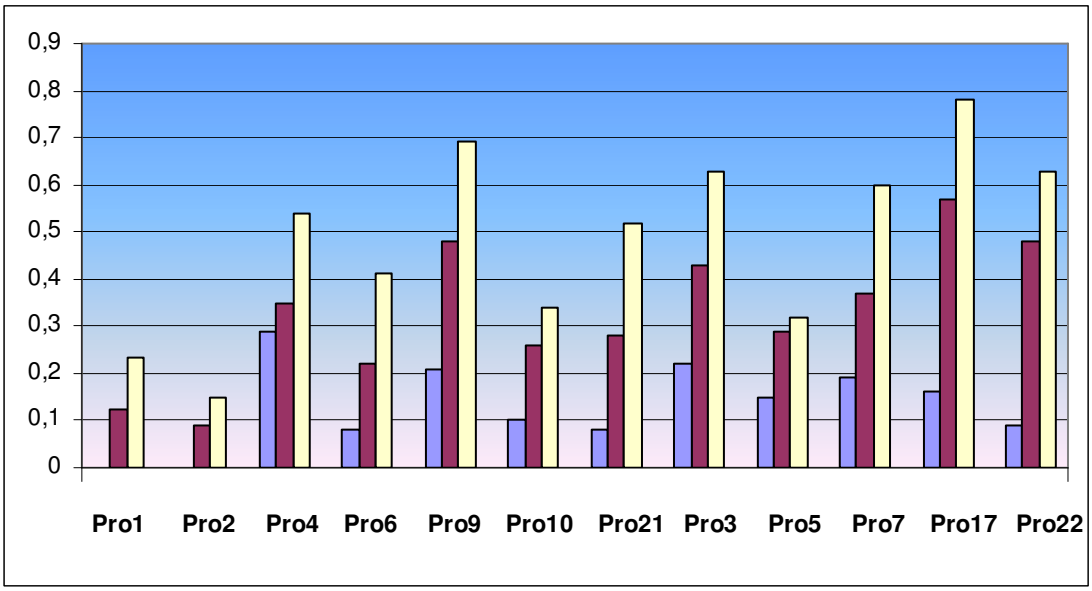


Abb.29 Bluten nach Sondieren
einzelne Probanden 18-30-Jährige
Pro= Proband

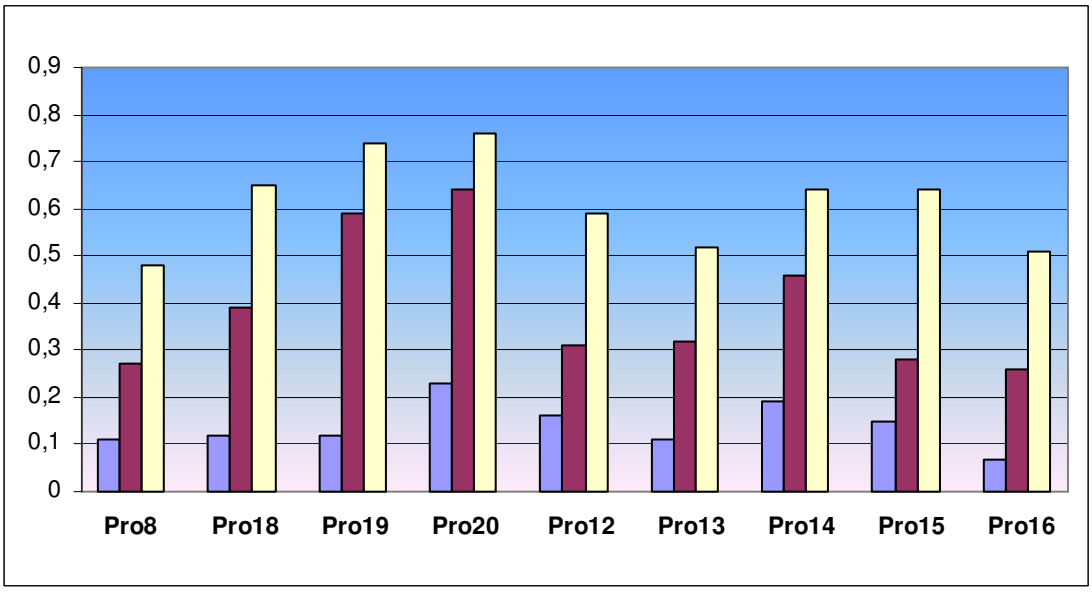


Abb.30 Bluten nach Sondieren
einzelne Probanden 46-77-Jährige
Pro= Proband

	Eubac	
	Gruppe der 18-30 Jährigen	Gruppe der 46-77 Jährigen
	Median	*Median*
Baseline	1,63E+04	9,70E+04
Tag 8	2,05E+05	1,52E+06
Tag 15	6,97E+05	9,89E+05

Tab.5 Gesamtbakterien: Medianwerte der Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten

	Aac	
	Gruppe der 18-30 Jährigen	Gruppe der 46-77 Jährigen
	Median	*Median*
Baseline	6,73E+01	1,14E+03
Tag 8	6,08E+02	7,28E+02
Tag 15	4,63E+03	2,06E+03

Tab.6 A.actinomycetem comitans: Medianwerte der Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten

	P. intermedia	
	Gruppe der 18-30 Jährigen	Gruppe der 46-77 Jährigen
	Median	*Median*
Baseline	7,65E+02	1,91E+03
Tag 8	4,66E+02	8,25E+03
Tag 15	1,40E+03	8,57E+03

Tab.7 P. intermedia: Medianwerte der Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten

	P. gingivalis	
	Gruppe der 18-30 Jährigen	Gruppe der 46-77 Jährigen
	Median	*Median*
Baseline	5,87E+01	5,03E+02
Tag 8	6,37E+01	9,55E+01
Tag 15	7,37E+01	1,17E+02

Tab.8 P. gingivalis:
Medianwerte der Gruppen zu den Einzelnen Zeitpunkten

	D.pneumosintes	
	Gruppe der 18-30 Jährigen	Gruppe der 46-77 Jährigen
	Median	*Median*
Baseline	7,37E+02	1,14E+03
Tag 8	7,32E+02	7,28E+02
Tag 15	1,94E+03	2,06E+03

Tab.9 D. pneumosintes:
Medianwerte der Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten

	P.micros	
	Gruppe der 18-30 Jährigen	Gruppe der 46-77 Jährigen
	Median	*Median*
Baseline	7,68E+01	6,79E+02
Tag 8	5,50E+02	6,50E+03
Tag15	1,70E+03	3,40E+03

Tab.10 P. micra:
Medianwerte der Gruppen zu einzelnen Zeitpunkten

	C.rectus	
	Gruppe der 18-30 Jährigen	**Gruppe der 46-77 Jährigen**
	Median	*Median*
Baseline	4,00E+01	4,10E+01
Tag 8	0,00E+00	0,00E+00
Tag 15	0,00E+00	0,00E+00

Tab.11 C. rectus
Medianwerte der Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten

9.3 Lebenslauf

Name:		Daniel Werner
Geburtsdatum:		19.04.78
Geburtsort:		Mannheim
Staatsangehörigkeit:		Deutsch
Schulausbildung:	1984-1988	Schillerschule Wiesloch
	1988-1997	Gymnasium Wiesloch
	1997	Abitur
Zivildienst:	Juli 1997-Aug. 1998	
Berufsausbildung:	Okt. 1998-Jan. 2004	Studium der Zahnmedizin am Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde an der Philipps-Universität in Marburg
	September 1999	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
	März 2001	Zahnärztliche Vorprüfung
	Dezember 2003	Zahnärztliche Prüfung
	16.01.2004	Approbation als Zahnarzt an der Philipps-Universität in Marburg
Berufstätigkeit:	Mai 2004-Juli 2006	Assistenzzahnarzt in der Praxis Dr. Merz in Göttingen
	Sep. 2006-Feb. 2007	Assistenzzahnarzt in der Praxis Dr. Waldhorn in Würzburg
	Seit März 2007	wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

9.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten an der Philipps Universität Marburg:

Aumüller, Austermann, Barth, Cetin, Daut, Dibbets, Feuser, Flores-de-Jacoby, Gente, Geus, Höffken, Kern, Koolmann, Lang, Lehmann, Lotzmann, Mengel, Mittag, Neubauer, Pieper, Radsak, Ramaswamy, Röhm, Seitz, Siegel, Stachniss, Steiniger, Stelzel, Stoll, Suske, Umstadt, Walter, Weihe, Wenz, Werner, Westermann

9.5 Danksagung

Im Laufe der Erstellung meiner Dissertation haben mir viele Personen zur Seite gestanden:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reiner Mengel für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas und für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Nicht minder herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Claudia Nonnenmacher für ihre fachliche Anleitung bei der Durchführung der PCR und ihre Hilfe beim Erlernen der theoretischen Grundlagen bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Reitze für die stets freundliche Hilfe bei der statistischen Auswertung der Arbeit bedanken.

Frau Petra Grimmelbein danke ich für die nette Unterstützung und die Einweisung in die Dunkelfeldmikroskopie.

Meiner Freundin Kristina danke ich für die gemeinsame Durchführung der klinischen Untersuchung, ihren ständigen Antrieb, Motivation und Optimismus und natürlich für ihre Liebe.

Ein großer Dank gilt meiner Mutter und meinem Bruder und seiner Familie für den Rückhalt und die liebevolle Unterstützung in jeglicher Hinsicht und in allen Lebenslagen.

Ebenso möchte ich mich bei allen teilnehmenden Probanden bedanken, die viele Mühen auf sich genommen und diese Studie so erst ermöglicht haben.

9.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: **„Experimentelle Gingivitis in verschiedenen Altersgruppen – klinische und mikrobiologische Untersuchung mittels quantitativer real-time PCR“** im Medizinischen Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde unter der Leitung von Prof. Dr. R. Mengel und mit Unterstützung von Dr. C. Nonnenmacher ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Würzburg, den 31.03.2010

_____