

Aus der Poliklinik für Präventive Zahnmedizin, Parodontologie und Kariologie  
Prof. Dr. med.dent. A. Wiegand  
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Mikrobiologische Diagnostik bei periimplantären Erkrankungen –  
ein Vergleich von PCR und Real-time PCR**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Sandra Tsigaras

aus

Stuttgart-Bad Cannstatt

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. H.K. Kroemer

I. Berichtersteller: PD Dr. D. Ziebolz

II. Berichtersteller/in: Prof. Dr. R. Bürgers

III. Berichtersteller/in: Prof. Dr. R. Mausberg

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Mai 2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>Periimplantäre Erkrankungen .....</b>	<b>3</b>
2.1.1	Definition, Epidemiologie und Ätiologie periimplantärer Erkrankungen .....	3
2.1.1.1	Vergleich: Zahn vs. Implantat.....	6
2.1.1.2	Mukositis .....	6
2.1.1.3	Periimplantitis .....	8
2.1.2	Oraler Biofilm.....	9
2.1.3	Keimflora bei osseointegrierten Implantaten mit gesunden Verhältnissen .....	12
2.1.4	Keimflora bei periimplantären Erkrankungen .....	12
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Verfahren .....</b>	<b>13</b>
2.2.1	Übersicht der Möglichkeiten an mikrobiologischen Verfahren .....	13
2.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	14
2.2.3	Real-time-Polymerasekettenreaktion SYBRgreen System (Real-time PCR) ....	17
<b>3</b>	<b>VERSUCHSPLANUNG.....</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>Studiendesign.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2</b>	<b>Patienten .....</b>	<b>20</b>
<b>4.3</b>	<b>Probenentnahme .....</b>	<b>21</b>
<b>4.4</b>	<b>DNA-Isolierung aus Patientenproben .....</b>	<b>21</b>
<b>4.5</b>	<b>Polymerasekettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>22</b>
4.5.1	Amplifikation .....	23
4.5.2	Hybridisierung .....	24
4.5.3	Auswertungskriterien PCR .....	27
<b>4.6</b>	<b>Real-Time-Polymerasekettenreaktion (Real-time PCR) .....</b>	<b>27</b>
4.6.1	Vorversuche zur Primerauswahl .....	27
4.6.1.1	Protokolloptimierung für Real-time PCR .....	29
4.6.2	Vorbereitungen für die Durchführung der Real-time PCR .....	29
4.6.3	Durchführung der Real-time PCR .....	30

4.6.4	Protokoll und Amplifikationsbedingungen .....	32
4.6.5	Auswertungskriterien Real-time PCR.....	33
<b>4.7</b>	<b>Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der Real-time PCR als Kontrolle ....</b>	<b>34</b>
<b>4.8</b>	<b>Statistische Methodik .....</b>	<b>36</b>
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1</b>	<b>Ergebnisse <i>Aa</i> .....</b>	<b>38</b>
5.1.1	Prävalenz PCR.....	38
5.1.2	Prävalenz und Bakterienmenge Real-time PCR .....	39
5.1.3	Vergleich beider Verfahren .....	41
<b>5.2</b>	<b>Ergebnisse <i>Pg</i> .....</b>	<b>42</b>
5.2.1	Prävalenz PCR.....	42
5.2.2	Prävalenz und Bakterienmenge Real-time PCR .....	43
5.2.3	Vergleich beider Verfahren .....	45
<b>5.3</b>	<b>Ergebnisse <i>Td</i>.....</b>	<b>46</b>
5.3.1	Prävalenz PCR.....	46
5.3.2	Prävalenz und Bakterienmenge Real-time PCR .....	47
5.3.3	Vergleich beider Verfahren .....	49
<b>5.4</b>	<b>Ergebnisse <i>Tf</i>.....</b>	<b>50</b>
5.4.1	Prävalenz PCR.....	50
5.4.2	Prävalenz und Bakterienmenge Real-time PCR .....	51
5.4.3	Vergleich beider Verfahren .....	53
<b>5.5</b>	<b>Ergebnisse <i>Fn</i>.....</b>	<b>54</b>
5.5.1	Prävalenz PCR.....	54
5.5.2	Prävalenz und Bakterienmenge Real-time PCR .....	56
5.5.3	Vergleich beider Verfahren .....	58
<b>5.6</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>60</b>
<b>6.1</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>60</b>
<b>6.2</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>67</b>
<b>6.3</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>72</b>

<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURNACHWEIS.....</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>ANLAGE .....</b>	<b>90</b>
<b>9.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>9.2</b>	<b>Verwendete Geräte.....</b>	<b>92</b>
<b>9.3</b>	<b>Reagenzien, Puffer und Lösungen .....</b>	<b>93</b>
9.3.1	DNA-Isolierung .....	93
9.3.2	PCR.....	93
9.3.3	Real-time PCR .....	94
9.3.4	Agarosegelelektrophorese .....	94
<b>9.4</b>	<b>Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese für Real-time PCR.....</b>	<b>95</b>

## 1 Einleitung

In den letzten Jahren vollzog sich ein Wandel im zahnmedizinischen Bewusstsein der Gesellschaft. Patienten wünschen sich für die „dritte Generation“ der eigenen Zähne eine perfekte Ästhetik, Phonetik und Funktion. Zudem steht ein stabiler, sicherer und schmerzfreier Tragekomfort im Vordergrund. Der Trend geht hin zum Implantat als Zahnersatz (Walton und MacEntee 2005). Basierend auf eigenen Schätzungen einer internationalen Marktforschung (iData Research) werden jährlich über 1 Mio. Implantate in Deutschland inseriert. Entsprechend liegt diese Zahl für Europa bei 4 Mio. und weltweit bei ca. 9 Mio. Implantatinsertionen pro Jahr. Die Tendenz ist steigend (Camlog Wimsheim Deutschland).

Laut der IV. Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS IV) von 2006 sind die Gründe für Zahnverlust aufgrund von Karies rückläufig. Dafür liegt eine Progression der Zahnverluste aufgrund parodontaler Erkrankungen vor. So leiden 52,7 % der Erwachsenen an einer mittelschweren und 20,5 % an einer schweren Form der Parodontitis. Bei den Senioren sind 48 % von einer mittelschweren und 39,8 % von einer schweren Parodontalerkrankung betroffen (IDZ 2006). Eine parodontale Vorerkrankung stellt einen Risikofaktor für die Entstehung periimplantärer Erkrankungen dar (Heitz-Mayfield 2008). Patienten mit einer parodontalen Vorgeschichte zeigen nach Implantatinsertion häufiger das Bild periimplantärer Erkrankungen als parodontal gesunde Patienten (Karoussis et al. 2003). Dabei liegt die Prävalenz von Periimplantitis bei bis zu 47,1 % (Koldslund et al. 2010).

Die Überlebensraten und Erfolgsquoten von Implantaten sind bemerkenswert. In einer retrospektiven Langzeitstudie wurden 511 Implantate von 303 Patienten untersucht. Dabei ergab sich eine 10 Jahres-Überlebensrate von 98,8 % und eine Erfolgsquote von 97 % (Buser et al. 2012). Weitere aktuelle Studien bestätigen dieses Ergebnis (Filippi et al. 2013, Sanz et al. 2013). Um aber eine Progression der Periimplantitis zu verhindern und die Erfolgsquoten zu sichern, ist es von großer diagnostischer Wichtigkeit, dieses Krankheitsbild frühzeitig zu erkennen. Darauf folgend sollte analysiert werden, welche Bakterien sich qualitativ und quantitativ in einer Implantattasche befinden.

Dabei sind mikrobiologische Untersuchungen von der Diagnostik parodontaler und periimplantärer Erkrankungen nicht mehr wegzudenken. Sie dienen neben der Einschätzung des Krankheitsbildes auch der Prognose und der Kontrolle des Behandlungserfolges. Gegebenenfalls helfen sie bei der Auswahl der geeigneten Antibiotika zur adjuvanten Therapie (Sixou 2003).

Mit der Einführung kommerzieller Tests auf Basis der Polymerasekettenreaktion (PCR) können mit geringem zeitlichem Aufwand qualitativ und semiquantitativ verschiedene Markerkeime parodontaler Erkrankungen bestimmt werden. Die Weiterentwicklung stellt die Real-time Polymerasekettenreaktion (Real-time PCR) dar. Hiermit kann die DNA der Bakterien über Fluoreszenzsignale quantitativ detektiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass Bakterien des periimplantären subgingivalen Biofilms sowohl über die PCR als auch über die Real-time PCR erfolgreich detektiert werden können (Sato et al. 2011, Al-Radha et al. 2012, Galassi et al. 2012).

Beim direkten Vergleich beider Verfahren bei parodontalen Erkrankungen lagen keine signifikanten Unterschiede bzw. die Überlegenheit eines Verfahrens vor (Eick et al. 2011). Für periimplantäre Erkrankungen fehlen vergleichende Daten.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist es, die beiden Verfahren - PCR und Real-time PCR - bei periimplantären Erkrankungen durchzuführen und die Ergebnisse zu vergleichen.

Dabei soll die Hypothese bestätigt werden, dass die Durchführung der konventionellen PCR bei periimplantären Erkrankungen ausreichend ist, um Aufschlüsse über das Krankheitsbild zum Zwecke der Diagnostik zu erhalten.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Periimplantäre Erkrankungen

#### 2.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie periimplantärer Erkrankungen

Der Begriff „periimplantäre Erkrankungen“ wurde erstmalig von Mombelli im Jahre 1987 erwähnt (Mombelli et al. 1987). Heute wird zwischen Mukositis und Periimplantitis unterschieden. Im Rahmen des siebten European Workshop on Periodontology im Jahre 2011 konnten diagnostische Kriterien so definiert werden, dass sie eine objektive Beurteilung periimplantärer Erkrankungen zulassen. Mukositis ist definiert als eine reversible Entzündung des periimplantären Weichgewebes. Das Hauptdiagnostikum einer Mukositis ist Blutung auf Sondierung. Periimplantitis stellt im Gegensatz dazu eine irreversible Erkrankung dar. Aussagekräftig dabei ist der radiologisch festgestellte Knochenabbau mit einhergehender Blutung auf Sondierung – erhöhte Taschentiefen sind möglich (Lang und Berglundh 2011).

Beim Vergleich epidemiologischer Studien für periimplantäre Erkrankungen zeigen sich Unterschiede in der Prävalenz. Dies kann damit erklärt werden, dass viele Studien nur über einen Beobachtungszeitraum von bis zu fünf Jahren durchgeführt wurden. Periimplantäre Erkrankungen könnten dabei klinisch womöglich noch nicht erkannt werden. Ein weiterer Grund liegt in der unterschiedlichen Diagnostik der Behandler. Bei einem Pool von 999 Implantaten (218 Patienten) und einem Beobachtungszeitraum von 9-14 Jahren wurde bei über 50 % der Implantate Mukositis diagnostiziert. Für Periimplantitis war dies bei 6,6 % der Implantate der Fall (Roos-Jansåker et al. 2006). In einer weiteren Studie waren bei der Untersuchung von 662 Patienten fünf Jahre nach Implantatinsertion 12,4 % der Implantate bzw. 27,8 % der Patienten an Periimplantitis erkrankt (Fransson et al. 2005). Bei einer Untersuchung von 108 Implantaten konnte Mukositis bei 32,9 % der Implantate ein Jahr nach Implantation nachgewiesen werden (Tang et al. 2000). Tendenziell wird die Prävalenz für Periimplantitis zwischen 6 % und 47,1 % eingeschätzt (Brägger et al. 1996, Buser et al. 1997, Karoussis et al. 2003, Koldslund et al. 2010).

Im Rahmen der Implantation können Früh- und Spätkomplikationen auftreten. Frühkomplikationen entstehen vor und/oder während der Implantatinsertion oder während der Einheilphase. Es kann zu Hitzenekrosen bei unzureichender Kühlung kommen. Weitere Gründe sind Wunddehiszenzen bei augmentativen Verfahren sowie Störung der Einheilung durch mechanische Überbelastung. Gelockerte Sekundärteile können ebenfalls ein Grund für Frühkomplikationen sein (Buser et al. 1990).



Spätkomplikationen betreffen die Ätiologie periimplantärer Erkrankungen. Der Hauptrisikofaktor für die Entstehung periimplantärer Geschehnisse ist eine schlechte Mundhygiene und die damit einhergehende Bildung des oral pathogenen Biofilms. Sie erhöht das Risiko für die Entstehung einer Periimplantitis um das 2,5fache (Heitz-Mayfield 2008). Weitere Studien kommen zu ähnlichen Ergebnissen (Alcofardo et al. 1991, Berglundh et al. 1992, Pontoriero et al. 1994, Mombelli et al. 1998). Parodontopathien gelten als häufigste Ursache für Zahnverlust (Reich und Hiller 1993, Richards et al. 2005). So kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der Implantatträger eine parodontale Vorgeschichte aufweist. In einer klinischen Studie von Karoussis et al. (2003) wurden Patienten über zehn Jahre beobachtet. Eine Gruppe waren Implantatträger mit parodontaler Vorgeschichte und eine Gruppe wurde eingeteilt als Implantatträger mit gesunden oralen Verhältnissen. Trotz parodontaler Vorbehandlung und Recall zeigte sich eine höhere Periimplantitisinzidenz in der Gruppe mit parodontaler Vorgeschichte (28,6 % vs. 5,8 %). In einer anderen Studie konnten umfangreichere Knochenverluste bei Implantatträgern mit vorhergehender Parodontitis festgestellt werden als in der gesunden Kontrollgruppe (Hardt et al. 2002). Weitere Autoren belegen diesen Zusammenhang (Heitz-Mayfield 2008, Cho-Yan Lee et al. 2012).

Je rauer die Implantatoberfläche, desto besser ist die Osseointegration (Albrektsson und Wennerberg 2004). Dennoch dient diese auch als optimale Retentionsstelle für Bakterien und die Ausbildung des oral pathogenen Biofilms (Teughels et al. 2006). So stellt also eine erhöhte Mikrorauigkeit einen prädisponierenden Faktor bei der bakteriellen Besiedelung dar (Karoussis et al. 2004, Heitz-Mayfield 2008) und damit bei der Entstehung einer Periimplantitis (Rosenberg et al. 2004).

Das Rauchen als exogener Risikofaktor nimmt ebenfalls eine wichtige Rolle ein. Es kann das Risiko für die Entstehung einer Mukositis um das 1,3fache und für Periimplantitis sogar um das 32fache erhöhen (Rinke et al. 2006, Roos-Jansåker et al. 2006). Die vasokonstriktorische Wirkung beim Rauchen führt häufig zu einer falschen Diagnostik. So wird bei der periimplantären Sondierung ein entzündungsfreier Zustand vorgetäuscht. In zahlreichen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen Tabakkonsum und Implantatverlust nachgewiesen werden (Woo et al. 2004, Dodson 2006, Baig und Rajan 2007). Wie auch bei den parodontalen Erkrankungen gehört Diabetes mellitus Typ II ebenfalls zu den Risikofaktoren für die Entstehung periimplantärer Erkrankungen (Ferreira et al. 2006). Bisher konnte bei Diabetes eine verspätete Osseointegration, nicht aber ein vermehrter Implantatverlust festgestellt werden (Turkyilmaz 2010).

Bei der Frage nach dem Einfluss des Genpols eines Individuums für die Entstehung periimplantärer Geschehnisse nimmt der Entzündungsmediator Interleukin 1 (IL-1) eine besondere Rolle ein. Er wird sowohl mit Periimplantitis als auch mit Parodontitis in Zusammenhang gebracht und kontrovers diskutiert. Bisher konnte ein Einfluss nicht eindeutig bestätigt werden (Laine et al. 2006, Heitz-Mayfield 2008).

Ein ebenfalls diskutierter Risikofaktor ist das Fehlen keratinisierter Mukosa bei Implantatinsertion. So könnte es zur Ausbildung von pathologisch periimplantären Verhältnissen kommen kann. Der Zusammenhang konnte bis heute nicht eindeutig belegt werden (Renvert und Persson 2009).

Verbleibende Zementreste im Sulkus nach Eingliederung der Suprakonstruktion können Periimplantitis begünstigen (Linkevicius et al. 2012). Die Störkontakte einer prothetischen Suprakonstruktion könnten einen möglichen Einfluss bei der Entstehung von Periimplantitis haben. Der genaue Zusammenhang konnte aber noch nicht belegt werden. Bisher wurde nur gezeigt, dass die Kombination aus Störkontakten und einem oral pathogenen Biofilm die Entstehung von Periimplantitis stärker begünstigen als beim alleinigen Vorhandensein des oral pathogenen Biofilms (Chambone et al. 2010).

Mögliche weitere Einflussfaktoren für die Entstehung periimplantärer Erkrankungen könnten sein: Alter, Geschlecht, Implantatdurchmesser und die prothetische Versorgung; das bedeutet, ob eine festsitzende oder herausnehmbare Konstruktion eingegliedert wurde. Hierzu liegen aber keine Untersuchungsergebnisse vor.

### 2.1.1.1 Vergleich: Zahn vs. Implantat

In Tabelle 1 wird dargestellt, wie sich der natürliche Zahn und ein Implantat unterscheiden. Dabei werden die Anatomie des parodontalen bzw. periimplantären Gewebes und die Form der Inflammation beschrieben.

Tabelle 1: Vergleich: Zahn vs. Implantat

Anatomie		Zahn	Implantat
Faserapparat		komplexes Netzwerk	parallel zur Implantatoberfläche
Saumepithel		vorhanden	vorhanden
Weichgewebe		Gingiva, zellreich	Mukosa, faserreich, Narbe
Inflammation		Zahn	Implantat
Vaskularisation		direkt, Wedl-Gefäßknäuel	indirekt, über Alveolarknochen
Immunantwort		adäquat	vermindert

### 2.1.1.2 Mukositis

Mukositis ist eine reversible Entzündung der implantat-umgebenden Schleimhaut, der sogenannten Mukosa (Salvi et al. 2012). Das Hauptdiagnostikum einer Mukositis stellt die Blutung auf Sondierung dar (Lang und Berglundh 2011).

In einem Tierexperiment wurden Hunden Implantate inseriert. Nach einer Biofilmmak-kumulation von 90 Tagen wurden Gewebeproben entnommen. Einmal von der Mu-kosa der Implantatregion und zum anderen von der benachbarten Gingiva der zahn-tragenden Bereiche. Die histologischen Ergebnisse beider Gruppen zeigten ähnl-iche Entzündungscharakteristika (Ericsson et al. 1992). Die Studie von Pontoriero et al. (1994) bestätigt diese Ergebnisse anhand von menschlichen Biofilmp-roben. Folg-lich kann die Entstehung einer Mukositis auf Grundlage der Gingivitis erklärt wer-den. Dennoch sind einige Unterschiede zwischen beiden Krankheitsbildern zu ver-merken. Das fehlende ausgeprägte Fasernetz der Mukosa lässt eine leichtere Aus-breitung der Entzündung zu. Bei Mukositis sind die Entzündungszeichen Rötung und Schwellung geringer ausgeprägt. Die Vaskularisierung geht nicht wie bei der Gingiva von parodontalen und suprapariostalen Gefäßen aus, sondern lediglich vom Periost des umgebenden Knochens (Berglundh et al. 1994). Die Abwehrreaktion der

periimplantären Mukosa gegenüber der Gingiva zeigt ähnliche, aber nicht so starke immunologische Antworten auf bakterielle Angriffe. Gründe dafür sind die bereits genannte schlechtere Vaskularisierung und das gebildete Narbengewebe. Somit ist die Progredienz der Destruktion im Weichgewebe und Knochen bei Implantaten mit vorliegender Entzündung ausgeprägter als an natürlichen Zähnen (Zitzmann et al. 2004, Hellwig et al. 2006).

Die Hauptursache einer Mukositis ist die mangelhafte Mundhygiene und die damit einhergehende pathogene Biofilmbildung. Zusätzlich spielen bereits erwähnte exogene und endogene Faktoren eine Rolle.

Im Folgenden wird die Mukositis auf Basis der Gingivitis erklärt. Eine klinisch gesunde Gingiva ist gekennzeichnet durch eine Biofilmschicht mit einer Dominanz von aeroben und fakultativ anaeroben grampositiven Kokkenspezies, vor allem Streptokokken (ca. 75 %). Die Biofilmanlagerung auf Zahnoberflächen beginnt innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden. Dabei entsteht ein hoch strukturierter Film von Glykoproteinen der die Ausbildung einer Proteinschicht, dem *acquired pellicle* zulässt. Bei der bakteriellen Primärbesiedelung von mehreren Stunden bis zwei Tagen sind vorwiegend fakultativ anaerobe grampositive Kokken wie *Streptococcus mutans*, *sanguis*, *salivarius* und *mitis* zu finden. Wird dieser Biofilm durch geeignete Mundhygienemaßnahmen nicht entfernt, kommt es innerhalb von zwei bis vier Tagen zu einer ersten akuten Entzündungsreaktion der Gingiva. Der sogenannten initialen Läsion. Diese ist klinisch noch nicht sichtbar. Histologisch ist aber schon eine Gefäßdilataion und Schwellung zu erkennen. Diese lässt die Bildung eines subgingivalen Raums zu. So kann sich der supragingivale Biofilm in der Tiefe niederlassen. Durch die dabei entstehende Anaerobidität verändert sich die Keimflora. Es kommt zu einer Besiedelung von Anaerobiern wie gramnegativen Kokken, gramnegativen und grampositiven Stäbchen wie den *Actinomyces* Spezies (Plagmann 1998, Hellwig et al. 2006).

Innerhalb von 14 Tagen entsteht eine frühe Läsion der Gingiva. Diese ist charakterisiert durch starke Rötung und Schwellung. Zudem nimmt die Anzahl an fusiformen Bakterien und Spirochäten zu. Bei weiterem Voranschreiten stellt sich die letzte reversible Phase ein, die etablierte Läsion der Gingiva. Durch die Proliferation des Saumepithels ist eine gingivale Tasche entstanden. Hier etablieren sich nun weiter gramnegative Keime (Plagmann 1998, Hellwig et al. 2006).

Lässt sich der Prozess nicht aufhalten, greifen die Keime auf das gesamte Parodont inklusive Alveolarknochen über. Dennoch muss daraus keine Parodontitis bzw. Periimplantitis hervorgehen. Die Situation kann bei guter Immunabwehr stagnieren. Dazugehörige immunologische Reaktionen sind unter anderem in der angegebenen

Literatur ausführlich dargestellt (Plagmann 1998, Mutschelknauss 2000, Hellwig et al. 2006, Müller 2006).

### 2.1.1.3 Periimplantitis

Periimplantitis ist definiert als eine irreversible Entzündung des periimplantären Gewebes. Das Hauptdiagnostikum ist dabei der radiologisch erkennbare crestale Knochenabbau (Rinke et al. 2011). Klinisch zeigt sich Rötung und Schwellung. Zusätzlich ist Blutung bzw. Pusentleerung bei leichter Sondierung und die Entstehung einer periimplantären Tasche möglich. Dabei liegt häufig ein schmerzfreier Zustand vor (Mombelli 1997). Periimplantitis verläuft entsprechend der Mukositis auch zirkulär und bildet häufig schüsselförmig erkennbare Defekte aus (Schwarz et al. 2007). Gründe für die Entstehung einer Periimplantitis wurden bereits unter 2.1.1 ausführlich beschrieben. Dazu zählen schlechte Mundhygiene, parodontale Vorerkrankung, Rauchen sowie weitere endogene und exogene Faktoren (Heitz-Mayfield 2008).

Äquivalent zum ähnlichen Krankheitsbild Mukositis und Gingivitis lässt sich die Periimplantitis auch auf der Basis der Parodontitis erläutern. Der gravierende Unterschied zwischen beiden Krankheitsbildern ist jedoch hier die stärkere Progression der Periimplantitis. Diese basiert, wie bei der Mukositis, auf dem fehlenden kollagenen Fasernetz des Parodontiums eines natürlichen Zahnes. In mehreren Tierstudien wurde experimentell Parodontitis und Periimplantitis induziert (Leonhardt et al. 1992, Lang et al. 1993, Marinello et al. 1995). Dafür wurden Ligaturen gelegt und so die Biofilmmakulation gefördert sowie die mikrobielle Flora verändert. An Implantaten konnte das Infiltrat bis zum marginalen Knochen vordringen. Folge waren fortschreitender Knochenabbau mit eventuellem Implantatverlust oder Stagnation in einem chronischen Stadium. An natürlichen Zähnen konnte der destruiende Prozess durch den Faserapparat aufgehalten werden. Eine trennende bindegewebige Zone zum Knochen blieb erhalten. Grundsätzlich muss zunächst eine Mukositis vorliegen. Ist die körpereigene lokale Immunabwehr nicht ausreichend und findet keine Elimination exogener Risikofaktoren statt, schreitet die Gewebedestruktion fort. Dies führt zu Knochenresorptionsvorgängen und Bildung tiefer Taschen, die den Übergang der Mukositis zur Periimplantitis darstellen. Ist es zu einer Periimplantitis gekommen, schreitet sie mit rapider Progression voran. Die Periimplantitis ist sehr viel schwerer zu kontrollieren und in ihrem Verlauf aufzuhalten als die Parodontitis (Zitzmann et al. 2004).

### 2.1.2 Oraler Biofilm

Der Begriff „oraler Biofilm“ ist definiert als weiche, zähe, dreidimensionale mikrobielle Besiedelung und feste Anhaftung von Bakterien an Oberflächen der Mundhöhle (Hellwig et al. 2006). Diese Bakterien (Anteil ca. 15-20 %) sind eingebettet in eine organische Matrix, bestehend aus extrazellulären Bakterienprodukten und Speichelglykoproteinen. Dieser orale Biofilm ist durch Wasserspray und Mundspülungen nicht entfernbar. Man unterscheidet einen supragingivalen und subgingivalen Biofilm mit einem jeweils unterschiedlichen Keimspektrum. Zusätzlich unterscheidet sich dieser nicht nur von Patient zu Patient, sondern sogar innerhalb einer Mundhöhle von Zahn zu Zahn bzw. Implantat zu Implantat (Plagmann 1998). Mit dem oralen Biofilm geht der Begriff „ökologische Plaquehypothese“ einher (Marsh 2003). Es besteht ein physiologisches Gleichgewicht zwischen den vorhandenen pathogenen Bakterien und der Immunabwehr. Kommt es durch endogene und exogene Einflüsse (z.B. veränderter pH-Wert, geschwächte Immunabwehr) zu einer Störung des dynamischen Gleichgewichts, überwiegt der Bakterienangriff und es kommt zur Gewebedestruktion.

Innerhalb des oralen Biofilms bildet sich ein selbstorganisiertes System aus, das nach außen wie eine geschlossene Einheit wirkt. Die Stoffwechselaktivität der Bakterien wird verändert und eine größere Effektivität der Bakterien geschaffen. Sie kommunizieren und interagieren untereinander (quorum sensing), so dass sie sich gegenseitig über Botenstoffe wie Metabolite und Nährstoffe unterstützen. Dieses System ist resistent gegenüber schwankenden Umwelteinflüssen (Caldwell et al. 1997).

Einige Bakterien enthalten Virulenzfaktoren, die indirekt Antigene aussenden. Die daraus resultierende Immunantwort aktiviert über Prostaglandine und Zytokine die Osteoklasten. Nachfolgend kommt es zur Auflösung des parodontalen Ligaments durch Kollagenasen und damit zu Gewebeschäden (Müller 2006).

In der Mundhöhle konnten bisher über 500 Bakterienspezies isoliert und identifiziert werden (Moore und Moore 1994). Aus dieser großen Anzahl von Keimen wird aber nur eine geringe Anzahl mit Parodontalerkrankungen assoziiert. Dabei unterscheidet man sehr stark, stark und gering pathogene Bakterien (Socransky et al. 1998).

Parodontopathogene Bakterien sind bevorzugt beim Erkrankten nachweisbar. Bei parodontal gesunden Patienten sind sie quantitativ und qualitativ in geringerem Umfang isolierbar oder gar abwesend (Socransky 1979, Ximénez-Fyvie 2000).

Der orale Biofilm kann entsprechend der Pathogenität in verschiedene mikrobielle Komplexe eingeteilt werden. Jeder Komplex enthält Bakterien ähnlicher Pathogenität und ähnlicher Charakteristika. Bei Etablierung parodontaler Erkrankungen müs-

sen die Leitkeime jedes Komplexes nicht zwingend zusammen auftreten. Die Komplexe arbeiten untereinander spezifisch synergistisch (Socransky et al. 1998).

Abbildung 1 zeigt die einzelnen Komplexe mit Ihren Leitkeimen bei Etablierung einer Parodontalerkrankung.

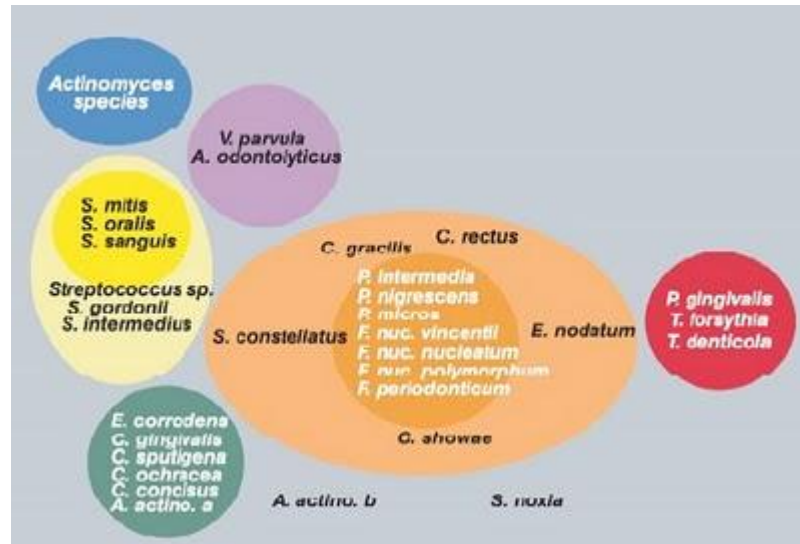


Abbildung 1: Darstellung der Bakterien in Komplexen bei Etablierung parodontaler Erkrankungen (Socransky et al. 1998).

Die wichtigsten parodontopathogenen Bakterien *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td), *Tannerella forsythia* (Tf) und *Fusobacterium nucleatum* (Fn) werden im Folgenden genauer charakterisiert.

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) gilt als nicht motiles, fakultativ anaerobes gramnegatives Stäbchen. Es ist Teil des grünen bzw. blauen Komplexes. Aa zeigt sich mit großer Präsenz bei aggressiver Parodontitis (Timmermann und Van der Weijden 2006). Es tritt vermehrt bei Taschentiefen >5mm auf sowie in der bukkalen Mukosa. Aa konnte ebenfalls bei 36 % der parodontal Gesunden detektiert werden (Zambon 1985). Es überwindet die epitheliale Barriere und vermehrt sich in der Wirtszelle (Meyer et al. 1996). Aa enthält Virulenzfaktoren wie Leukotoxine, immunsupprimierende Faktoren, Kollagenasen und Proteasen, die Immunglobulin G spalten können (Henderson et al. 2003). Die Immunantwort wird ausgeschaltet. Gleichzeitig wird das Bindegewebe durch ausgeschüttete Enzyme und freie Radikale geschädigt (Taichman et al. 1980, Diaz et al. 2006).

*Porphyromonas gingivalis* (Pg) ist ein anaerobes, gramnegatives, nicht sporenbildendes Stäbchen. Es fungiert, ähnlich wie Aa, als Leitkeim der Parodontitis. Pg hält sich vorwiegend in tieferen Parodontaltaschen auf. Häufig lässt es sich auch gemeinsam mit Tf detektieren (Socransky et al. 1998, Wu et al. 2007). Im Gegensatz

zu *Aa* ist es jedoch selten bei parodontal gesunden Patienten zu finden (Liu et al. 2003). In Untersuchungen konnten Korrelationen zwischen dem quantitativen Vorkommen von *Pg* und dem Schweregrad der Parodontalerkrankung (Liu et al. 2003, Wu et al. 2007) bzw. einer schlechten Mundhygiene aufgezeigt werden (Van Winkelhoff et al. 2002). Als Virulenzfaktoren verzeichnet *Pg* Proteasen. Diese sind in der Lage, Immunglobuline und Proteinaseinhibitoren des Wirtes abzubauen. Zusätzlich enthält es Fimbrien, welche die Etablierung des Keimes steuern (Gängler et al. 2005).

*Treponema denticola (Td)* gilt als anaerobe, gramnegative Spirochäte. *Td* bildet mit *Pg* und *Tf* den roten Komplex. Es zeigt sich vorwiegend in großer Anzahl in tiefen parodontalen Taschen (Socransky et al. 1998). In Studien konnte die Korrelation zwischen der Präsenz von *Td* und dem Schweregrad der Erkrankung festgestellt werden (Simonson et al. 1998, Sixou 2003). Es ist aber unklar, ob sie zur Entstehung der Parodontitis beitragen oder nur infolge der Erkrankung quantitativ zunehmen. Die Virulenz geht mit der Anhaftung der Keime an epithelialen Oberflächen einher. Durch diese verändert sich die Morphologie der Wirtszelle, und das Eindringen in tiefere Schichten wird den Bakterien erleichtert. Die bakterieneigene chymotrysin- bzw. trypsinähnliche Funktion fördert die Pathogenität (Uitto et al. 1988).

*Tannerella forsythia (Tf)* ist ein obligat anaerobes gramnegatives Stäbchen. Als Teil des roten Komplexes tritt es häufig mit *Pg* und *Td* auf (Socransky et al. 1998) und geht mit Attachmentverlust bei parodontal Erkrankten einher (Hamlet et al. 2004). Das Bakterium enthält genauso wie *Td* Fettsäuren. Diese sind verantwortlich für die sich bei parodontalen Erkrankungen entwickelnde Halitosis (Persson et al. 1990).

*Fusobacterium nucleatum (Fn)* ist ein nicht motiles, obligat anaerobes gramnegatives, spindelförmiges Stäbchen. Vermehrtes Vorkommen verzeichnet sich bei parodontalen Erkrankungen (Moore und Moore 1994, Socransky et al. 2002). Ebenso konnte es in der gesunden Mundflora detektiert werden (Kumar et al. 2003). Den Hauptvirulenzfaktor stellen die an der Oberfläche befindlichen Membranproteine dar (Bakken et al. 1989). Es wird diskutiert, ob *Fn* durch seine Brückenfunktion zu anderen Bakterienspezies eine Schlüsselfunktion einnimmt (Kolenbrander et al. 1995). Es konnte nachgewiesen werden, dass *Fn* mit *Aa*, *Pg* und *Tf* aggregiert (Kolenbrander und Andersen 1989, Weiss et al. 2000, Sharma et al. 2005). Dies geschieht über adhäsionvermittelte Zell-Zell-Kontakte mittels des galaktosebindenden Lektins (Murray et al. 1988).



### 2.1.3 Keimflora bei osseointegrierten Implantaten mit gesunden Verhältnissen

In einer Studie von Leonhardt et al. (1999) wurde die Keimflora gesunder osseointegrierter Implantate untersucht und mit der Keimflora parodontal gesunder Verhältnisse natürlicher Zähne verglichen. In beiden Fällen zeigte sich eine ähnliche Zusammensetzung der Präsenz von Parodontopathogenen. Die vorkommenden Keime sind hauptsächlich Streptokokken, *Veillonella parvula* (*Vp*), *Peptostreptococcus micros* (*Pm*) und *Fn* (Lee et al. 1999). Weitere mikrobiologische Untersuchungen fanden vor allem grampositive, fakultativ anaerobe Stäbchen und Kokken (Lekholm et al. 1986, Mombelli und Mericske-Stern 1990, Keller et al. 1998). In wenigen Proben bzw. nur zu geringer Konzentration konnten gramnegative Bakterien wie *Pg*, *Tf* und *Prevotella intermedia* (*Pi*) gefunden werden (Sordyl et al. 1995, Lee et al. 1999).

Vergleicht man die Keimflora gesunder Implantate von zahnlosen Kiefern mit der Keimflora gesunder Implantate von bezahnten Kiefern, zeigen sich signifikante Unterschiede. Dabei fand man in Studien bei gesunden Implantaten von zahnlosen Kiefern weitaus mehr Kokken und nicht motile Stäbchen. So konnte dabei ein Anteil von bis zu 94 % gefunden werden (Adell et al. 1986, Lekholm et al. 1986). In einer anderen Untersuchung fand man in der mikrobiellen Flora osseointegrierter Implantate in zahnlosen Kiefern 71,3 % Kokken und nur 0,4 % bewegliche Stäbchen (Quiryen und Listgarten 1990).

### 2.1.4 Keimflora bei periimplantären Erkrankungen

Die mikrobielle Flora von Patienten mit periimplantären Erkrankungen und zusätzlicher Eigenbezahnung ähnelt der einer chronischen Parodontitis bzw. Gingivitis (Mombelli et al. 1987). Dies zeigten auch Leonhardt et al. (1992) bei Tierexperimenten an Hunden. Die Keimflora bei periimplantären Erkrankungen ist aber komplexer zusammengesetzt als bei parodontalen Erkrankungen (Koyanagi et al. 2010, Heuer et al. 2011). Die dabei wichtigsten detektierten Keime sind *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Tf*, *Td* und *Fn* (Tanner et al. 1997). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Ata-Ali et al. (2011) und Hultin et al. (2002). Shibli et al. (2008) fand vor allem *Pg*, *Td* und *Tf* bei der Untersuchung periimplantärer Biofilmpuben. Dabei verzeichneten sich keine Unterschiede bei der Detektion von supra- oder subgingivalen Proben. Folglich besteht der Hauptanteil der Keimflora bei Periimplantitis aus anaeroben gramnegativen Bakterien oder Keimen des „roten Komplexes“. In anderen Studien konnten im Vergleich zur Parodontitis mehr Spirochäten ausfindig gemacht werden (Mombelli 1993, Eke et al. 1998). Zusätzlich konnte bei Periimplantitispatienten gegenüber Parodon-

titispatienten eine größere Anzahl von *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus oralis* detektiert werden (Pye et al. 2009, Faveri et. al 2011).

Bei Patienten mit Periimplantitis in zahnlosen Kiefern konnten im Vergleich zu Patienten mit Periimplantitis in bezahnten Kiefern weniger pathogene Keime gefunden werden (Apse et al. 1989, Quirynen und Listgarten 1990). So scheint hier der Faktor Zeit eine entscheidende Rolle zu spielen. Die bakterielle Besiedelung des Sulkus eines natürlichen Zahnes kann so als kontinuierliches Keimreservoir für das periimplantäre Gewebe dienen. Dennoch zeigt sich keine geringere Misserfolgsrate bei zahnlosen Patienten mit Implantatversorgung (Listgarten und Lai 1999).

## 2.2 Molekularbiologische Verfahren

### 2.2.1 Übersicht der Möglichkeiten an mikrobiologischen Verfahren

Laut gemeinsamer Stellungnahme der DGZMK und DGP wird bei folgenden Formen parodontaler Erkrankungen eine mikrobiologische Diagnostik als sinnvoll erachtet: Dazu zählen die aggressiven Formen der Parodontitis, die schweren chronischen sowie die rezidivierenden Parodontitiden. Zusätzlich sind es Parodontitiden in Kombination mit systemischen Erkrankungen oder Zuständen, die die Funktion des Immunsystems beeinträchtigen (DGZMK 2005). Die mikrobiologische Diagnostik dient zum einen als diagnostisches Hilfsmittel prätherapeutisch, d.h. zur korrekten Diagnosestellung für die adäquate Behandlungsplanung und zur geeigneten adjuvanten Antibiotikatherapie. Zum anderen findet sie Anwendung bei der Therapiekontrolle. Zusätzlich sollten mikrobiologische Testverfahren bei weiterer Progression der Erkrankung trotz systemischer Antibiose angewendet werden (Sanderink et al. 2004). Zur mikrobiologischen Diagnostik stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Diese sind im Einzelnen Kultivierung, Enzymtests, immunologische Tests, Polymerasekettenreaktion (PCR) und Real-time Polymerasekettenreaktion (Real-time PCR). Nachfolgend werden die Verfahren kurz dargestellt:

- Die Kultivierung erlaubt die Anzucht, Identifizierung und Resistenzbestimmung gegen Antibiotika der oralen Bakterienflora. Jedoch konnten bisher nur 50 % der oralen Bakterien kultiviert werden (van Winkelhoff 2003, Paster et al. 2001). Zusätzlich treten viele Nachteile in den Vordergrund, wie die maximale Transportzeit von nur 48h und die aufwendige bzw. kostenintensive Durchführung des Verfahrens (van Winkelhoff 2003, Loomer 2004). Zudem lassen sich nur vitale Keime detektieren.
- Enzymtests gelten als sehr schnelle Methode und lassen sich *chair side* durchführen. Dabei färbt sich ein Teststreifen gemäß der Identifizierung sei-

nes Bakteriums. Dies geschieht durch die Reaktion eines spezifischen Enzyms auf dem Streifen mit dem dazugehörigen Bakterium des oralen Biofilms. Als Beispiel der benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA)-Test. Er ist nicht in der Lage Aa als wichtiges Bakterium parodontaler und periimplantärer Erkrankungen zu identifizieren. Enzymtests detektieren nicht die Quantität sondern nur vorkommende Keimgruppen (Loesche 1986, Loomer 2004).

- Zur Identifizierung pathogener Keime können auch immunologische Verfahren herangezogen werden. Weit verbreitet sind der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Test, die Durchflusszytometrie und der Latexagglutinationstest. Aufgrund von möglichen Kreuzreaktionen führen diese Verfahren aber zu einer geringen Spezifität (Tsalikis et al. 1989, Nisengard et al. 1992, Sanderink et al. 2004).

Nachfolgend werden die Verfahren der PCR und Real-time PCR genauer beschrieben.

### 2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Erstmalig wurde ein Verfahren zur Amplifikation von DNA 1971 entwickelt (Replication 1971). Mit dem Einsatz hitzestabiler Taq-Polymerasen schaffte Mullis 1988 einen Durchbruch (Saiki et al. 1988). Mullis entwickelte das wichtigste biochemische Verfahren der molekularen DNA-Analytik. Dieses findet große Anwendung in der Medizin, z.B. bei Infektionen, Erbkrankheiten, Abstammungsgutachten sowie in der Aufklärung von Kriminalverbrechen über genetische Fingerabdruckanalysen. Bei der Analyse parodontopathogener Bakterien aus subgingivalen Biofilmproben lassen sich diese qualitativ bestimmen und relativ quantifizieren (Riggio et al. 1996, Watanabe und Frommel 1996). Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Sequenzen durch eine in vitro durchgeführte DNA-Replikation. So ist es möglich, bis zu 33 Millionen Kopien von einer Nukleotidsequenz beim Durchlauf von 25 PCR-Zyklen herzustellen. Durch den Einsatz der PCR sind keine großen Gewebeproben mehr erforderlich, um eine ausreichende Menge DNA zur Sequenzierung oder Klonierung zu gewinnen (Müller 2001, Horton et al. 2008, Rassow et al. 2008).

Das Prinzip der PCR basiert auf drei Schritten, die bei unterschiedlichen Temperaturen ablaufen. Sie teilen sich auf in die Denaturierung, das Annealing und die Elongation:

- I. Denaturierung: Mit dem ersten Schritt wird die Matrizen-DNA durch Erhitzen bei etwa 95°C denaturiert und in Einzelstränge aufgetrennt.

- II. Annealing: Im zweiten Schritt erfolgt das Annealing (=Hybridisierung der Primer). Pro zu analysierende DNA-Sequenz werden zwei spezifische Primer (Oligonukleotid, dient als Startpunkt für die DNA-Polymerase) verwendet. Jeder der beiden Primer lagert sich an den komplementären Bereich „seines“ DNA-Einzelstrangs an. Die Annealingtemperatur hängt von der Basenzusammensetzung und der Länge der Primer ab. Für jedes Primerpaar müssen die Bedingungen optimiert werden. Bei der richtig eingestellten Annealingtemperatur wird ein Primer nur an seine vollständig komplementäre Sequenz binden, da bei Basenfehlpaarungen keine effizienten DNA-Doppelstrangbildungen möglich sind.
- III. Elongation: Im letzten Schritt findet die eigentliche DNA-Synthese oder Elongation statt. Die Primer werden an ihrem freien 3'-OH-Ende angelagert und mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und der Nukleotide dATP, dGTP, dCTP und dTTP verlängert. Die Arbeitstemperatur thermostabiler DNA-Polymerasen liegt meist bei 70-72°C (Müller 2001, Horton et al. 2008, Rassow et al. 2008).

Nach einer gewissen Polymerisationszeit beginnt man einen neuen PCR-Zyklus. Bei der Denaturierung werden sowohl die ursprünglichen als auch die im ersten Schritt synthetisierten DNA-Moleküle erneut mit den im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer hybridisiert. Es ist zu beachten, dass zwei der im zweiten Zyklus synthetisierten Einzelstrangkettens bereits exakt die Länge zwischen den 5'-Enden der beiden Primer aufweisen und somit dem gewünschten DNA-Abschnitt entsprechen. Mit jedem Zyklus steigt die Anzahl der DNA-Stränge, die exakt die Länge des gewünschten DNA-Abschnitts besitzen, exponentiell an. Gleichzeitig nimmt die Anzahl der DNA-Stränge mit Sequenzen, die über diesen Abschnitt hinausreichen, nur linear zu. Es werden im Schnitt ca. 25 Zyklen pro PCR durchgeführt. Nach dem letzten Zyklus wird zusätzlich ein 5-15 minütiger Extensionsschritt bei 72°C angehängt, um partiell verlängerte Produkte zu vervollständigen, da die DNA-Polymerasen mit steigender Zyklenanzahl immer langsamer werden. Ohne Extensionsschritt kann es zu unvollständigen bzw. unspezifischen Fragmenten in der Gelelektrophorese kommen (Müller 2001, Horton et al. 2008, Rassow et al. 2008).

Innerhalb einer PCR (bzw. Real-time PCR) werden drei kinetische Phasen unterschieden:

- a) Die erste Phase ist die frühe Phase. Hier findet noch keine optimale Amplifikation statt. Die Enzyme sind noch nicht hundertprozentig aktiv, und die Reaktion muss erst in Gang kommen.

- b) Die zweite Phase stellt die exponentielle Phase dar. Hier liegen optimale Reaktionsbedingungen vor. Die Amplifikation verläuft in jedem Zyklus exakt und präzise. Die Reaktionskomponenten wie Polymerase und Primer sind hundertprozentig aktiv.
- c) Die letzte kinetische Phase wird als Plateauphase bezeichnet. In dieser finalen Phase neigt sich die PCR (bzw. Real-time PCR) dem Ende zu. Die Reaktionskomponenten (Primer, Polymerase, dNTPs) sind aufgebraucht und die Amplifikation verläuft nur noch suboptimal (Müller 2001, Horton et al. 2008, Rassow et al. 2008).

Das Ergebnis der Quantifizierung wird bei der PCR während der Plateauphase abgelesen. Die Amplifikation der PCR wird gestoppt aufgrund der limitierten Menge an Nukleotiden und benötigten Enzymen. Es besteht keine akurate Quantifizierung der DNA in der Plateauphase. Mit der Amplifikation geht auch der Wirkungsverlust der Taq-Polymerase einher (Kainz 2000).

Die thermostabile Taq-Polymerase ist ein Enzym, das von dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wird. Sie hat den entscheidenden Vorteil, dass sie nur einmal, zu Beginn der PCR, zugegeben werden muss, da sie bei Erhitzung auf 95°C nicht so leicht denaturiert. Darüber hinaus steigert ihre Hitzestabilität auch die Spezifität der PCR. Sie zeigt eine hohe Prozessivität und Robustheit, sodass eine akurate und fehlerfreie Amplifikation möglich ist. Sie besitzt eine 5'-3' Syntheserichtung (Ashimoto et al. 1996, Müller 2001).

Die Sequenz der beiden Primer wird so gewählt, dass sie komplementär zu der Sequenz jeweils eines Einzelstrangs der zu vervielfältigenden DNA ist. Die Sequenzen an den Enden des DNA-Abschnitts, der vervielfältigt werden soll, müssen bekannt sein, um zwei Oligonukleotidprimer entwerfen zu können, die den gewünschten Abschnitt auf beiden Seiten flankieren (Müller 2001, Horton et al. 2008, Rassow et al. 2008).

In einer Studie wurden fünf Bakterien aus Biofilmproben quantifiziert, einmal über eine konventionelle Kultivierung und zum anderen über die PCR. Dabei wurde die PCR als das empfindlichere und spezifischere Verfahren erkannt. Es zeigt sich also eine deutlichere Effizienz der molekularbiologischen Verfahren (Eick und Pfister 2002). Eine Vielzahl von Studien bestätigen eine akurate semiquantitative Bestimmung parodontopathogener Bakterien aus subgingivalen Biofilmproben mit der konventionellen PCR (Ashimoto et al. 1996, Riggio et al. 1996, Tran und Rudney 1999, Hamlet et al. 2004, Haffajee et al. 2009).

### 2.2.3 Real-time-Polymerasekettenreaktion SYBRgreen System (Real-time PCR)

Mit der Real-time PCR lassen sich neben qualitativen auch relative und absolute quantitative Aussagen treffen, sodass dieses Verfahren eine hohe Spezifität mit sich bringt (Socransky et al. 2005). Die Amplifikation erfolgt nicht wie bei der PCR in der Plateauphase, sondern bereits in der exponentiellen Phase. Hier liegen optimale Amplifikationsbedingungen vor, die genaue Ergebnisse liefern können (Kainz 2000). Die Real-time-PCR wird durch Thermocycler durchgeführt, in denen PCR-Produkte direkt während ihrer Bildung, sozusagen in „Echtzeit“ erfasst werden können.

Als Detektionshilfsmittel für die Amplifikationsmenge werden in der Regel fluoreszierende Moleküle (Fluorophore) eingesetzt, die an sequenzspezifische Oligonukleotide endständig gekoppelt sind. Das generelle Prinzip der Detektion basiert auf Anregung (Extinktion) der eingesetzten Fluorophore durch kurzwelligeres Licht, worauf höherwelligeres Licht (500-800 nm) abgestrahlt (ermittelt) wird. Diese Emission wird von optischen Detektionseinheiten pro PCR-Zyklus gelesen und die Fluoreszenzintensität ausgewertet (Müller 2001, Schrimpf 2002).

In dieser Studie fiel die Wahl auf das Detektionssystem mit DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen, das SYBRgreen System der Firma Bio-Rad (München, Deutschland). Zwischen doppelsträngigen Nucleinsäuren können kleine Moleküle eingebunden werden, die daraufhin unter Anregung von kurzwelligem UV-Licht längerwelliges Licht emittieren. Diese Substanzen nennt man Interkalatoren. Sie lagern sich in die kleine Furche doppelsträngiger DNA. In Abhängigkeit der Quantität amplifizierter DNA steigt die Fluoreszenzintensität. Hier wird der Farbstoff SYBRgreen der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) verwendet – Extinktion 488 nm und Emission 520 nm. Der große Vorteil dieser Variante ist, dass eine kostenintensive Synthese und Markierung von sequenzspezifischen Sonden entfällt (Higuchi et al. 1993, Heid et al. 1996, Müller 2001, Schrimpf 2002).

In einer Vielzahl von Studien wurde die präzise Quantifizierung parodontopathogener Keime aus subgingivalen Biofilmproben mit Real-time PCR erfolgreich durchgeführt (Lyons et al. 2000, Riggio et al. 2003, Boutaga et al. 2007).

### 3 Versuchsplanung

45 Subgingivale Biofilmproben von Implantattaschen sollen auf ihre Pathogenität bzgl. Qualität und Quantität von Bakterien untersucht werden. Dabei werden drei Gruppen mit je n=15 Proben gebildet – eine frei von periimplantären Erkrankungen (*gesund*) und zwei mit periimplantären Erkrankungen, je *Mukositis* und *Periimplantitis*. Die gewonnenen Biofilmproben werden auf fünf Markerkeime *Aa*, *Pg*, *Td*, *Tf* und *Fn* untersucht. Als mikrobiologisches Verfahren werden die PCR und die Real-time PCR durchgeführt. Jeder Versuch wird in einer Dreifachbestimmung jeder einzelnen Probe erfolgen.

Zunächst wird jedes Verfahren für sich ausgewertet werden. Dies erfolgt nach Prävalenz und Bakterienmenge. Dabei sollen folgende Fragestellungen geklärt werden. Wie groß ist die relative Quantität der vorkommenden Keimkonzentrationen der einzelnen Bakterien allgemein? Wie ist die quantitative Verteilung eines Bakteriums innerhalb der drei gebildeten Gruppen? Gibt es dabei einen signifikanten Einfluss eines Bakteriums auf das Krankheitsbild?

Die Ergebnisse beider Verfahren sollen dann miteinander verglichen werden. Sind die ermittelten relativen Bakterienmengen tendenziell identisch und wie hoch ist die Korrelation der Proben? Daraus ergibt sich die Hauptfrage dieser Studie. Es soll die Hypothese bestätigt werden, dass die konventionelle PCR bei periimplantären Erkrankungen ausreicht, um repräsentative mikrobiologische Ergebnisse bei periimplantären Erkrankungen zu erhalten. Zusätzlich soll die Sinnhaftigkeit der mikrobiologischen Tests bei der Anwendung zur erweiterten Diagnose periimplantärer Erkrankung geklärt werden. Eventuell genügt schon die klinische Untersuchung allein, um eine eindeutige und ausreichende Diagnose periimplantärer Erkrankungen stellen zu können.

In Abbildung 2 wird der Versuchsplan der Studie dargestellt.

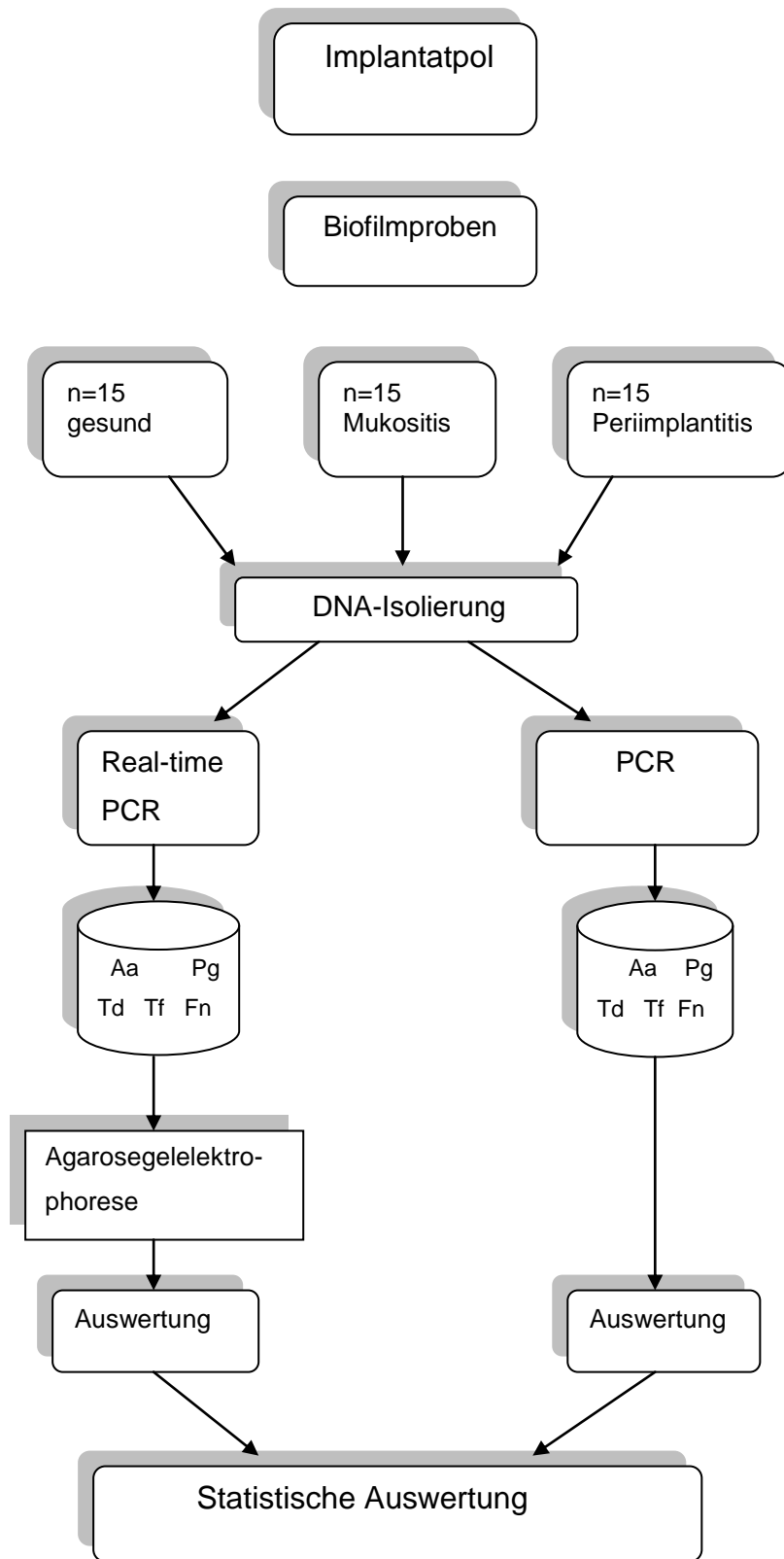


Abb.2: Versuchsablauf der Studie



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Studiendesign

Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine klinisch experimentelle Untersuchung zum Vergleich unterschiedlicher mikrobiologischer Verfahren (PCR und Real-time PCR) anhand vorliegender subgingivaler Biofilmprouben von Einzelzahnimplantaten. Die verwendeten Proben stammen aus einem Untersuchungsklientel einer klinischen Studie. Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen, Deutschland genehmigt (Nr. 3/1/09).

Vor Studienbeginn wurden die Patienten über Ablauf und Inhalt schriftlich und mündlich aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

### 4.2 Patienten

Für die Untersuchung wurde ein Pool von 88 Patienten mit 237 Biofilmprouben aus einer klinischen Studie herangezogen. Diese umfassten 16 Biofilmprouben mit Periimplantitis von 12 Patienten, 56 Biofilmprouben mit Mukositis von 40 Patienten und 114 Biofilmprouben mit gesunden Implantaten von 69 Patienten. Die restlichen 51 Biofilmprouben wurden von parodontal-gesunden und -geschädigten Zähnen aus der Mundhöhle von einigen der bereits genannten Implantatträger entnommen. Sie wurden in dieser Studie nicht berücksichtigt.

Aus diesem Implantatpool, bestehend aus 186 Proben, wurden zufällig 45 Proben zu je gleichen Anteilen (*gesund*, *Mukositis*, *Periimplantitis*) ausgewählt:

- *Gesund*: 15 unterschiedliche Proben von verschiedenen Implantatträgern mit keinem weiteren Implantat in der Mundhöhle.
- *Mukositis*: 15 unterschiedliche Proben von verschiedenen Implantatträgern mit keinem weiteren erkrankten Implantat in der Mundhöhle.
- *Periimplantitis*: 15 unterschiedliche Proben von Implantatträgern mit teilweise Proben von Implantaten aus derselben Mundhöhle.

Die Diagnose erfolgte anhand klinischer Untersuchung und Erfassung der Parameter Sondierungstiefe, BOP, radiologisch festgestellter Knochenabbau gemäß Definitionskriterien aus der Literatur (Rinke et al. 2011).

### 4.3 Probenentnahme

Die Proben des subgingivalen Biofilms wurden mit sterilen Papierspitzen entnommen. Zu Beginn entfernte man den supragingivalen Biofilm über eine professionelle Zahnreinigung. Die betreffende Implantatkonstruktion wurde mit Watterollen trocken gelegt und somit isoliert. Dann wurde die Papierspitze mit Hilfe einer Pinzette in die periimplantäre Tasche vorgeschoben. Am Taschenfundus verblieb diese für ca. zehn Sekunden und wurde nach Entnahme in ein Transportröhrchen gegeben. Dieser Vorgang wurde jeweils mesial und distal am Implantat durchgeführt (je zwei Papierspitzen).

### 4.4 DNA-Isolierung aus Patientenproben

Um die parodontopathogenen Bakterien nachweisen zu können, muss die DNA zunächst aus dem Nukleoid isoliert werden. Für diese DNA-Isolierung wurde das QIAamp DNA Mini Kit<sup>®</sup> der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Dieses enthält alle im Folgenden verwendeten Puffer und Lösungen. Die Isolierung wurde basierend auf dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die DNA-Isolierung teilt sich in drei Hauptschritte: Lyse, Adsorption und Waschung. Nachfolgend werden die einzelnen Arbeitsschritte beschrieben:

- Lyse: Pro Probe wurde 180 µl ATL-Puffer (Lysepuffer) und 20 µl Proteinase K-Lösung in einem geeigneten Gefäß zusammengegeben und gemischt. Dieses Gemisch dient der vollständigen Lyse der zellulären Bestandteile aus dem subgingivalen Biofilm. Aus diesem Grunde wurde nun in jedes Probenröhrchen mit innen liegender Papierspitze 200 µl dieser Mischung zugegeben und 30 s gevortext (kurz gründlich mischen mit Hilfe eines Vortexmischers). Das Gemisch wurde nun 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend an zentrifugiert.
- Adsorption: Danach wurde pro Probe 200 µl AL-Puffer (enthält chaotrope Salze) zugegeben, gevortext und 5 min bei 95°C inkubiert. Die chaotropen Salze des AL-Puffers bewirken eine Adsorption der DNA-Bestandteile von den übrigen Proteinbestandteilen. Anschließend wurde kurz an zentrifugiert. Zu diesem Gemisch wurden zusätzlich 200 µl Ethanol (96-100%ig) zugegeben. Dieses wurde 15 s gevortext und kurz an zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde ein beschriftetes Filter-Tube in ein Auffanggefäß eingesetzt. Die gewonnene Lösung der Probenröhrchen (ohne Papierspitze) wurde in das obere Reservoir des Filter-Tubes pipettiert.
- Waschung: Der dritte Schritt bestand im Auswaschen letzter Verunreinigungen, z.B. Lipide und Proteine. Dazu wurde das Filter-Tube verschlossen und

1 min bei 6000 x g (ca. 8000 Upm) in einer Standard-Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Das Filter-Tube wurde wieder in das Auffanggefäß gesetzt. Dann wurden 500 µl AW1-Puffer zupipettiert (erster Waschpuffer) und wieder wie im vorherigen Schritt zentrifugiert. Der Durchlauf wurde erneut verworfen, das Filter-Tube wieder in das Auffanggefäß gesetzt und 500 µl AW2-Puffer zupipettiert (zweiter Waschpuffer). Dieses Gemisch wurde nun 3 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Daraufhin wurde das Filter-Tube in ein frisches Auffanggefäß gesetzt und nochmals 1 min bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Dann wurde das Auffanggefäß verworfen und das Filter-Tube in ein sauberes, beschriftetes 1,5 ml Reaktionsgefäß eingesetzt. Zu dieser DNA-Elution wurden 200 µl AE-Puffer (Elutionspuffer) in das Filter-Tube pipettiert. So konnten die Proben nach Beschriftung bei -20°C im Gefrierschrank gelagert werden.

Zusätzlich sollte noch eine Anmerkung zur Vorbereitung der DNA-Isolierung gemacht werden. Gemäß dem Protokoll des Herstellers Qiagen (Hilden, Deutschland) wurden zum einen AW1- und AW2- Puffer (beides Waschpuffer der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) bei erstmaligem Arbeiten mit Ethanol versehen. Zum anderen wurde der ATL-Puffer (Lysepuffer der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) zum Lösen in warmes Wasser gestellt. Je ein Heizblock wurde auf 70°C und 95°C vorgewärmt.

#### 4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Durch die DNA-Isolierung konnte die DNA aus den Bakterienzellen des subgingivalen Biofilms isoliert werden. Um nun herauszufinden, welche Bakterien-DNA in den Proben vorlag, wurde im Weiteren die Polymerasekettenreaktion (PCR) im Labor der Poliklinik für Präventive Zahnmedizin, Parodontologie und Kariologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

Im Rahmen parodontaler und periimplantärer Erkrankungen haben sich kommerzielle Tests auf Basis der PCR etabliert. Diese identifizieren qualitativ und semiquantitativ parodontopathogene Bakterien. In dieser Untersuchung wurde der kommerzielle Test der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) mit dem Namen Micro-IDent<sup>®</sup> und Micro-IDent<sup>®</sup> plus Test verwendet. Mit diesem Test lassen sich insgesamt die folgenden elf parodontopathogenen Markerkeime detektieren und semiquantitativ bestimmen: *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Tf*, *Td*, *Pm*, *Fn*, *Campylobacter rectus* (*Cr*), *Eikenella corrodens* (*Ec*), *Eubacterium nodatum* (*En*) und *Capnocytophaga species* (*Cs*). Der Micro-IDent<sup>®</sup> (plus) Test der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) ist in Abbildung 3 dargestellt.



Abb.3: Micro-IDent<sup>®</sup> (plus) Test der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland). (Die Verwendung von Abbildung 3 erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland)).

Dieser Test bzw. diese Polymerasekettenreaktion teilt sich in zwei Hauptschritte auf. Im ersten Teil des Untersuchungsverfahrens wird die bereits isolierte DNA vervielfältigt, d.h. mittels biotin-markierten Primern amplifiziert. Dies ist notwendig um im zweiten Teil des Untersuchungsverfahrens die vorkommenden Bakterien qualitativ und semiquantitativ bestimmen zu können. Hier findet dann die sogenannte Hybridisierung statt. Die vervielfältigte DNA lagert sich an membrangebundene Sonden. Diese wurden speziell von der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) hergestellt und sind spezifisch für das jeweilige Bakterium. Durch einen Farbumschlag auf einem Teststreifen wird die Bindung einer Bakterien-DNA mit der Sonde nachgewiesen und so das entsprechende Bakterium identifiziert. Die Intensität des Farbumschlags gibt die relative Menge des detektierten Bakteriums an.

Das Testverfahren wurde nach dem Protokoll des Testverfahrens Micro-IDent<sup>®</sup> (plus) der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) durchgeführt.

Im Folgenden werden die durchgeführten beiden Teilschritte des Tests ausführlich beschrieben.

#### 4.5.1 Amplifikation

Für die Vervielfältigung der DNA wurde pro zu untersuchende Probe in ein steriles Eppendorfcup pipettiert. Folgende Substanzen wurden zugegeben:

- 35 µl PNM (Primernukleotidmix) bestehend aus den Primern der jeweiligen Bakterien des Tests und den dNTPs (Nukleotide) der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland).

- 10,5 µl Mastermix bestehend aus 5 µl Polymerasepuffer 10 x, 2 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 3 µl Ampuwa und 0,5 µl DNA-Polymerase der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland).
- Zu diesem wurde pro Eppendorfcup 5 µl der zu analysierenden DNA-Probe zupipettiert.

Eine Negativkontrolle wurde ebenfalls amplifiziert. Dafür wurde in ein Eppendorfcup 5 µl Wasser anstatt 5 µl einer DNA-Probe zupipettiert. Hier durften sich keine DNA-Produkte bilden. So konnte ausgeschlossen werden, dass sich unerwünschte Nebenprodukte und Verunreinigungen gebildet hatten.

Die zu untersuchenden Cups wurden gevortext und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die Amplifikation im Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

Der theoretische Ablauf wurde bereits in Kapitel 2.2.2 erläutert. Die hier durchgeführten Amplifikationsschritte werden in Tabelle 2 aufgezeigt.

Tabelle 2: Amplifikationsschritte der PCR

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklus
1	5 min	95°C	1
2	30 s	95°C	10
	2 min	58°C	
3	25 s	95°C	20
	40 s	53°C	
	40 s	70°C	
4	8 min	70°C	1

Dann wurden die Ansätze auf 4°C abgekühlt und konnten nach Entnahme aus dem Gerät für die Hybridisierung verwendet werden.

#### 4.5.2 Hybridisierung

Die im ersten Schritt amplifizierte DNA musste nun identifiziert werden, um einem Bakterium zugeordnet werden zu können. Dazu fand die Hybridisierung mittels membrangebundener Sonden statt. Die in diesem Kapitel verwendeten Materialien stammen alle von der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) und liegen dem Micro-IDent<sup>®</sup> (plus) Test bei. Sie wurden nach dessen Protokoll angewandt.

Zur Vorbereitung wurden die beiden folgenden Lösungen im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt: der Hybridisierungspuffer (HYB, grün) und die Stringent-Waschlösung (STR, rot).

Die Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) bietet vorgefertigte Kunststoffbehälter an. Diese enthalten mehrere kleine Wannenkavitäten- für jede einzelne zu detektierende Probe eine. Für jede zu untersuchende Probe wurde in die untere Ecke einer jeden Wannenkavität 20 µl Denaturierungsreagenz (DEN, blau) pipettiert. Dazu wurde 20 µl des jeweils zu untersuchenden Amplifikats gegeben. Durch Auf- und Abpipettieren wurde gut gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurde 1 ml vorgewärmter und gemischter Hybridisierungspuffer (HYB, grün) zugegeben und die Wanne solange geschwenkt bis eine homogene Flüssigkeit entstanden war. Dabei sollten heftige Bewegungen vermieden werden, um eine Kontamination benachbarter Kavitäten durch Spritzen zu vermeiden.

Dann wurde der Membranstreifen mit den enthaltenen Sonden der spezifischen Bakterien eingesetzt. Dieser wurde aus dem Transportbehälter entnommen und mit einem Bleistift zur Identifizierung beschriftet. Pro verwendete Kavität wurde nun ein Membranstreifen zugegeben, der vollständig von Flüssigkeit bedeckt sein musste. Die Wanne wurde nun bei 45°C im Schüttelbad/ TwinCubator der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) inkubiert. Der TwinCubator mit enthaltenen Membranstreifen in den Wannenkavitäten ist in Abbildung 4 dargestellt.



Abb.4: TwinCubator mit Wannenkavitäten und Membranstreifen der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland). (Die Verwendung von Abbildung 4 erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland)).

Die Schüttelfrequenz wurde so eingestellt, dass eine kontinuierliche Vermischung des Reagenz gewährleistet wurde, aber nichts in Nachbarkavitäten übertrat. Während dieser Hybridisierung bildeten sich Wasserstoffbrücken zwischen den Biotinmarkierten Amplifikaten und den keimspezifischen Sonden auf dem Membranstrei-

fen aus. Der Hybridisierungspuffer war für die Aufrechterhaltung dieser Reaktion verantwortlich. Nach 30 min wurde der Hybridisierungspuffer mittels Pasteurpipetten, verbunden mit einer Vakuumpumpe, vollständig entfernt.

Um unspezifisch gebundene Sonden zu entfernen, wurde dann 1 ml vorgewärmte Stringent-Waschlösung (STR, rot) zugegeben und bei 45°C für 15 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde diese Lösung entfernt. Durch Adhäsionskräfte blieben die Membranstreifen an der Wannenkavität kleben und die Wanne ließ sich gut mit einem Papiertuch kopfüber trocknen.

Von diesem Schritt an wurde nur noch bei Raumtemperatur gearbeitet. Dabei wurde der nächste Schritt, der erste Waschgang durch Zugabe von 1 ml Rinse-Lösung (RIN) bei einer Inkubation von 1min durchgeführt. Danach konnte die Rinse-Lösung abgeschüttet werden.

Nun wurde die Konjugat-bzw. Substratlösung angesetzt. Sie wurde jeweils im Verhältnis 1:100 pipettiert, d.h. pro Probe wurde 10 µl Konjugatkonzentrat (CON-C) mit 1ml Konjugatpuffer (CON-D) sowie 10 µl Substratkonzentrat (SUB-C) mit 1 ml Substratpuffer (SUB-D) angesetzt und lichtgeschützt gelagert. Jedem Membranstreifen wurde nun 1 ml verdünntes Konjugat zugegeben und dann inkubiert. Es enthält einen Streptavidin/alkalische Phosphatase Komplex. Nach 30 min wurde die Flüssigkeit abgeschüttet und es fanden drei Waschgänge auf dem Horizontalschüttler/TwinCubator statt; zweimal je 1 min mit 1 ml Rinse-Lösung (RIN) und einmal mit ca. 1ml destilliertem Wasser. Die Lösungen wurden nach jedem Waschgang vollständig entfernt.

Nachfolgend wurde die Zugabe von bereits vorher verdünntem Substrat mit je 1 ml durchgeführt. Die Inkubation und Farbreaktion fand lichtgeschützt für ca. 10 min statt. Dabei führte die Reaktion des Substrats mit der alkalischen Phosphatase des Konjugats zu einem Farbumschlag an den Banden, wo bereits Amplifikate gebunden hatten. Zum Abschluss wurden die Membranstreifen zweimal kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und diese dann mit Hilfe einer Pinzette entnommen und auf einem saugfähigen Papier getrocknet.

Mit dem beiliegenden Test-Auswertungsbogen bzw. der Schablone ließen sich die Bakterien *Aa*, *Pg*, *Td*, *Tf* und *Fn* qualitativ zuordnen und semiquantitativ bestimmen. Waren die Banden an denselben Stellen gemäß der Schablone sichtbar, so war das Bakterium qualitativ identifiziert. War zudem eine einem Bakterium zugeordnete Bande stärker gefärbt, war das Bakterium in höheren Konzentrationen zu finden. Die Einschätzung der Tiefenfärbung erfolgt subjektiv. Auf dem Membranstreifen werden relative Keimkonzentrationen im Bereich von  $<10^3$  bis  $>10^7$  angegeben bzw. codiert.

Auf dem Teststreifen befindet sich zusätzlich eine Konjugatkontrolle (CC), die die Reaktion von Konjugat und Substrat widerspiegelt. Zudem eine Amplifikationskontrolle (AC) die eine korrekte Durchführung der Amplifikation bestätigte. Beide mussten für die korrekte Durchführung des Tests positiv ausfallen. In Abbildung 5 ist der Teststreifen des Micro-IDent<sup>®</sup> Tests der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) dargestellt.

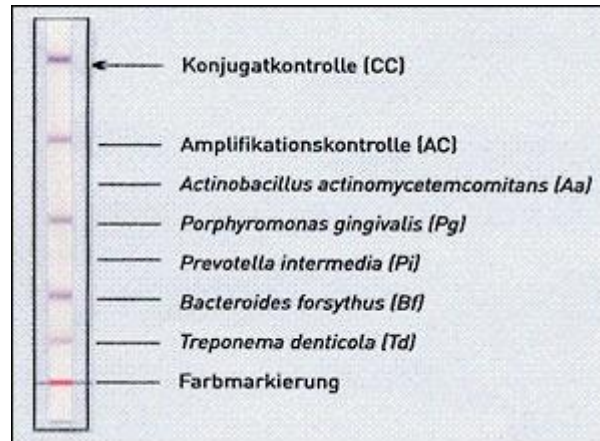


Abb. 5: Teststreifen Micro-IDent<sup>®</sup> Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland). (Die Verwendung von Abbildung 5 erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland)).

#### 4.5.3 Auswertungskriterien PCR

Für die Polymerasekettenreaktion lässt sich die Pathogenität der Proben mittels Bakterienart und Höhe der Keimkonzentration ermitteln. Für die Bakterien *Pg*, *Td*, *Tf* und *Fn* lässt sich ein Keimspektrum im Bereich von  $<10^4$  (Keimkonzentration unter Nachweisgrenze),  $10^4$  (Keimkonzentration an Nachweisgrenze),  $<10^5$  (erhöhte Keimkonzentration),  $<10^6$  (stark erhöhte Keimkonzentration) und  $>10^7$  (sehr stark erhöhte Keimkonzentration) festlegen. Für das Bakterium *Aa* gilt entsprechend dazu der Keimbereich  $<10^3$  (Keimkonzentration unter Nachweisgrenze),  $10^3$  (Keimkonzentration an Nachweisgrenze),  $<10^4$  (erhöhte Keimkonzentration),  $<10^5$  (stark erhöhte Keimkonzentration) und  $>10^6$  (sehr stark erhöhte Keimkonzentration).

#### 4.6 Real-Time-Polymerasekettenreaktion (Real-time PCR)

##### 4.6.1 Vorversuche zur Primerauswahl

Analog der PCR sollten die Bakterien *Aa*, *Pg*, *Td*, *Tf* und *Fn* mit Hilfe spezifischer Primer durch die Real-time Polymerasekettenreaktion (Real-time PCR) detektiert



werden. Für die Auswahl der Primer wurde für alle fünf Bakterien eine umfangreiche Literaturrecherche durchgeführt. Hierbei wurde im ersten Schritt eine Vorauswahl an Primern getroffen. Dafür wurden Primer herangezogen, die bereits in anderen Studien bei der Detektion parodontopathogener Bakterien erfolgreich verwendet wurden.

Im zweiten Schritt wurden mit diesen Primern Standardversuche durchgeführt. Per Zufall wurden Proben dieser Studie ausgewählt und Real-time PCRs mit den Primern durchgeführt. Es mussten für den optimalen Primer folgende Anforderungen erfüllt werden: Grundvoraussetzung war, dass der Primer auf die Patientenproben anspricht und sich DNA-Amplifikate bilden. Zusätzlich durfte die Negativkontrolle mit Wasser keine weiteren DNA-Produkte aufweisen. So konnte sicher gestellt werden, dass sich nur DNA-Produkte der gesuchten Bakterien bilden. Dies wurde zum einen über die Fluoreszenzsignale der Real-time PCR und zum anderen über eine Agarosegelelektrophorese nachgewiesen. Die Primer der Vorversuche sind in Tabelle 3 und 4 dargestellt. Die Primersequenzen aus Tabelle 3 erfüllten nicht alle oben genannten Voraussetzungen für die Studie. Die Primersequenzen aus Tabelle 4 erfüllten alle Voraussetzungen und konnten für die hier durchgeführte Studie verwendet werden.

Tabelle 3: Primersequenzen der Vorversuche für Real-time PCR (erfüllten nicht alle Voraussetzungen für die Studie)

	<b>Primerdesign</b>
<i>Pg</i>	vorwärts 5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3' rückwärts 5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT-3' (Ashimoto et al. 1996)
<i>Tf</i>	vorwärts 5'-GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA-3' rückwärts 5'-TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T-3' (Ashimoto et al. 1996)
<i>Fn</i>	MutaGel Parodontitis Kit (Firma Immundiagnostik Bensheim, Deutschland)
<i>Fn</i>	vorwärts 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' rückwärts 5'-GTC ATC GTG CAC ACA GAA TTG CTG-3' (Fouad et al. 2002)

Tabelle 4: Primersequenzen der Vorversuche für Real-time PCR (erfüllten alle Voraussetzungen für die Studie)

	<b>Primerdesign</b>	<b>Frag- mentlän- ge in bp</b>	<b>Annea- ling- tempe- ratur in °C</b>
<i>Aa</i>	vorwärts 5'-GTA CGG CGA AGG TAT TTC CA-3' rückwärts 5'-CCA ACA ATT CAT CAC GCA AG-3'	197	58
<i>Pg</i>	vorwärts 5'-GCG ACG CTA TAT GCA AGA CA-3' rückwärts 5'- GCT GAT GGT GGC ATT ACC TT-3'	191	60
<i>Td</i>	vorwärts 5'-TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T-3' rückwärts 5'-TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA-3' (Ashimoto et al. 1996)	316	60
<i>Tf</i>	MutaGel Parodontitis Kit (Firma Immundiagnostik Bensheim, Deutschland)	120	60
<i>Fn</i>	vorwärts 5'-CGC AGA AGG TGA AAG TCC TGT AT-3' rückwärts 5'-TGG TCC TCA CTG ATT CAC ACA GA-3' (Braga et al. 2010)	23	60

#### 4.6.1.1 Protokolloptimierung für Real-time PCR

Um bestmögliche repräsentative Ergebnisse bei der Real-time PCR zu erhalten, mussten die Bedingungen der spezifischen Primer optimiert werden. Dabei optimierte man die Annealingtemperatur. Dies war die Temperatur, bei der die Primer bestmöglichst funktionierten und sich die größte Anzahl an DNA-Amplifikaten bildeten. Hierfür wurden bei Standardversuchen die definitiv verwendeten Primer bei verschiedenen Temperaturen ausprobiert und die Ergebnisse analysiert. Es wurden Temperaturen im Bereich von 55°C bis 65°C eingesetzt. Diese Versuche ergaben die optimale Annealingtemperatur für *Aa* bei 58°C, für *Pg*, *Td*, *Tf* und *Fn* bei 60°C.

#### 4.6.2 Vorbereitungen für die Durchführung der Real-time PCR

Vor Beginn der Real-time PCR war eine gründliche Vorbereitung bzgl. folgender Aspekte wichtig:

1. Die detektierten Bakterien einer Real-time PCR sollten einer relativen Quantifizierung unterliegen. Dies bedeutet grundsätzlich, dass gewonnene Werte

zu einem Referenzwert, der 100 % entspricht, gesetzt werden bzw. berechnet werden. Die Überlegung war nun, was man als Referenz einsetzen könnte. Dazu wurde ein sogenannter Referenzpool gebildet. Dies war ein Gemisch aus allen 45 Patientenproben. Später wurde jede einzelne zu untersuchende Probe zu diesem Referenzpool berechnet. So war sicher gestellt, dass exakt relativ quantifiziert wurde.

Dabei wurde von jeder Probe 15 µl entnommen. Diese wurden zusammen in ein weiteres 1,5 ml Eppendorfcup gegeben und bei Nichtgebrauch im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

Dieser Referenzpool wurde als Pool 4 bezeichnet.

2. Welche positive Kontrolle sollte als zusätzliche Referenz dienen?

Es wurde als sinnvoll erachtet, einen weiteren Referenzpool anzulegen. Dieser sollte bestätigen, dass exakt quantifiziert wurde. Nur wenn dieser ebenso positive Werte erbrachte, wurde bestätigt, dass die Real-time PCR sinngemäß funktionierte. Bei diesem zweiten Referenzpool wurde ein Gemisch aus bekannten positiven DNA-Proben diverser Nachbarstudien gebildet.

Dazu wurden 19 Proben herangezogen. Jeder Probe wurden 15 µl entnommen und diese gemeinsam in einem 1,5 ml Eppendorfcup im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

Dieser positive Kontrollpool wurde als Pool 3 bezeichnet.

3. Um fundamentierte und repräsentative Ergebnisse zu erhalten, entschied man sich, jede Probe dreimal zu untersuchen (Dreifachbestimmung).

#### 4.6.3 Durchführung der Real-time PCR

1. Im ersten Schritt der Real-time PCR wurde der Mastermix angesetzt. Dies war ein Gemisch aus den Bestandteilen, die grundsätzlich für eine Real-time PCR notwendig sind. Dazu wurde der SYBRgreen Supermix der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) verwendet. Dieser enthält zum einen Primernucleotide für die Amplifikation. Zum anderen enthält er den Fluoreszenzfarbstoff, der die Detektion der Bakterien-DNA in Echtzeit zulässt. Ausführlich wurde dies in Kapitel 2.2.3 beschrieben. Zusätzlich wurden die spezifisch für jedes Bakterium ausgewählten Primer eingesetzt (siehe Kapitel 4.6.1 Tabelle 4).

Der Mastermix wurde in einem Röhrchen, bestehend aus 1250 µl SYBRgreen Supermix, 650 µl Ampuwa (Sterilwasser) der Firma Fresenius (Bad Homburg, Deutschland), 50 µl Primer sense (bakterienspezifisch), 50 µl Primer antisense (bakterienspezifisch), angesetzt.

2. Für Pool 4, der als Referenz für alle Proben galt, wurde eine Verdünnungsreihe mit Ampuwa angelegt. So wurde zusätzlich sichergestellt, dass richtig quantifiziert wurde. Diese Verdünnungsreihe wurde wie folgt pipettiert:

Sechs Cups wurden von A-F beschriftet. In jedes der Cups wurde Ampuwa, wie in Tabelle 5 dargestellt, pipettiert. In Cup A wurde 3  $\mu$ l des Pool 4 gegeben. Cup A wurde nun durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Dann wurde aus diesem Cup A 12  $\mu$ l entnommen und in Cup B pipettiert. Cup B wurde nun durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Dann wurde wieder 12  $\mu$ l aus Cup B entnommen und in Cup C pipettiert. Die Verdünnungsreihe wurde nun weiter nach diesem Schema angelegt (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Darstellung der Verdünnungsreihe

Verdünnung	
A	3 $\mu$ l Probenpool 4 + 27 $\mu$ l Ampuwa
B	12 $\mu$ l A + 12 $\mu$ l Ampuwa
C	12 $\mu$ l B + 12 $\mu$ l Ampuwa
D	12 $\mu$ l C + 12 $\mu$ l Ampuwa
E	12 $\mu$ l D + 12 $\mu$ l Ampuwa
F	12 $\mu$ l E + 12 $\mu$ l Ampuwa

3. Da nun alle Vorbereitungen getroffen waren, konnten die Probengemische für die Durchführung der Real-time PCR mit dem Thermocycler angelegt werden. Die Fima Bio-Rad (München, Deutschland) stellt dazu Kunststoffplatten bereit. Diese enthalten 96 Vertiefungen, sog. wells, in die die jeweilige zu untersuchende Probe pipettiert wird. Zur Orientierung und Bestimmung der Probe erhielt jedes well eine eigene Bezeichnung (Buchstabe und Zahl). Das angewandte Plattendesign ist in Abbildung 6 dargestellt.

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12
B1	B2	B3	B4	B5	B6						
C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12
E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12
F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12
G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12

Abb.6: Plattendesign für Real-time PCR

In jedes Well (siehe Plattendesign) wurde zuerst 20  $\mu$ l Mastermix vorgelegt. Dann wurden 5  $\mu$ l der zu untersuchenden Probe in das jeweilige Well pipettiert. Wie in Abbildung 3 dargestellt, wurden die Proben wie folgt pipettiert:

- Well A1-A12: Pool 4 wurde als Standardverdünnung angesetzt (siehe oben Cup A-F Tabelle 5). Der Inhalt jedes Cup wurde zweimal bestimmt. D.h. Cup A wurde verteilt in well A1 und A2. Cup B wurde verteilt in well A3 und A4, usw. .
- Well B1-B2: Pool 4 unverdünnt
- Well B3: Ampuwa (Negativkontrolle mit Wasser NTC)
- Well B4-B6: Pool 3 (der zusätzliche Referenzpool, Dreifachbestimmung)
- C1-H12: die 45 zu untersuchenden Proben in einer Dreifachbestimmung
  - acht bzw. sieben Proben *gesund* (C1- D12)
  - acht bzw. sieben Proben *Mukositis* (E1-F12)
  - acht bzw. sieben Proben *Periimplantitis* (G1-H12)

Nach dem vollständigen Ansetzen der Versuchsreihe, wurde die Kunststoffplatte mit einer Folie abgeklebt, beschriftet und 3 min bei 3000 Upm zentrifugiert.

Die Platte wurde im Kühlschrank lichtgeschützt in Alufolie verpackt gelagert und blieb dort bis zu ihrer Amplifikation.

#### 4.6.4 Protokoll und Amplifikationsbedingungen

Die Real-time PCR wurde im Thermocycler der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) durchgeführt. Für die Amplifikation wurden im Programm Bio-Rad IQ5 das in Tabelle 6 und 7 dargestellte Protokoll eingegeben. Die Protokolloptimierung für das jeweilige Bakterium wurde in Vorversuchen (Kapitel 4.6.1.1) durchgeführt.

Tabelle 6: Protokoll und Amplifikationsbedingungen Aa

Schritte	Temperatur	Laufzeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	15 s	45
Annealing	58°C	20 s	45
Elongation	72°C	20 s	45
Denaturierung	95°C	1 min	1
Schmelzkurve	55°C	1 min	1
Schmelzkurve	55°C	10 s	75

Tabelle 7: Protokoll und Amplifikationsbedingungen für *Pg*, *Td*, *Tf*, *Fn*,

Schritte	Temperatur	Laufzeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	15 s	45
Annealing	60°C	20 s	45
Elongation	72°C	20 s	45
Denaturierung	95°C	1 min	1
Schmelzkurve	55°C	1 min	1
Schmelzkurve	55°C	10 s	75

Die fertig pipettierte Kunststoffplatte wurde in die Vorrichtung des Thermocyclers eingesetzt und das Programm gestartet.

#### 4.6.5 Auswertungskriterien Real-time PCR

Nach Durchführung der Versuche wurde über folgende Formel die relative Quantifizierung der Bakterien erhoben:

$$R = 2 \times E^{(Ct_x - P)}$$

R: Relative Quantifizierung

E : Effizienz der jeweiligen Real-time PCR

Ct: Cycle threshold, ist der Wert, bei dem die Fluoreszenz bei Durchführung einer Real-time PCR erstmals exponentiell ansteigt. Je kleiner der Wert, desto schneller kommt es zu Fluoreszenzsignalen und desto mehr DNA wird amplifiziert.

X: jeweilige Probe

P: Pool 4 unverdünnt. Referenzpool aus DNA aller 45 Patientenproben.

Dies ergab bei allen Versuchen für P (Pool 4 unverdünnt. Referenzpool aus DNA aller 45 Patientenproben) eine relative Quantifizierung  $R = 2$ . Dieser Wert entspricht dem Referenzwert und wurde in folgender Auswertung bzw. Abbildung als 100 % angesehen.

Es erfolgte eine Einteilung entsprechend der ermittelten Konzentration:

Keimkonzentration unter Nachweisgrenze:	0 - ≤0,2
Keimkonzentration an Nachweisgrenze:	>0,2-≤0,8
erhöhte Keimkonzentration:	>0,8-≤1,4
stark erhöhte Keimkonzentration:	>1,4-≤2,0
sehr stark erhöhte Keimkonzentration:	>2

#### 4.7 Agarosegelelektrophorese zum Nachweis der Real-time PCR als Kontrolle

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Kontrolle nach der Real-time PCR durchgeführt. Sie diente zur Auftrennung bzw. Darstellung der gefundenen DNA-Fragmente.

Die Separierung der einzelnen Substanzen erfolgte nicht nur durch ihre Ladung. Zusätzlich wurden durch den Siebeffekt eines Gels (Trägermaterials) die Moleküle in Größe und Gestalt getrennt. Als Gel wurde Agarose verwendet. Als Faustregel galt, je kleiner die zu trennenden Fragmente waren, desto höher musste die Agarosekonzentration sein. Nachfolgend werden die Arbeitsschritte aufgeführt:

1. Herstellung des Agarosegels: Da wir uns in einem Bereich von Molekülgrößen zwischen 100-300 bp (Größe der Primer, siehe auch Kapitel 4.6.1 Tabelle 4) bewegten, wurde für die Gelelektrophorese ein 3 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurde 2,4 g Agarose der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) zu 80 ml TAE-Puffer 1x (Tris-Acetat-EDTA-Puffer 50 x verdünnt im Verhältnis 1:50 mit Aqua dest.) im Erlenmeyerkolben zugegeben. Der TAE-Puffer 50 x wurde zu Beginn angesetzt aus 242 g TrisBase, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5M EDTA pH8 und dann auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Das Gemisch wurde geschwenkt, bis sich das Agarosepulver homogen verteilte. Daraufhin wurde es in der Mikrowelle aufgelöst, bis eine klare Lösung entstanden war und keine Schlieren mehr zu sehen waren. Die Lösung konnte nun abkühlen, bis sie lauwarm war. Dabei bildeten sich Doppelhelices aus, die sich in Gruppen parallel zu Fäden zusammenlagerten.
2. Vorbereitung der Proben: In dieser Wartezeit wurden die zu analysierenden Proben vorbereitet:
  - 11 Cups wurden bereitgestellt
  - Pro Cup wurde 1 µl 6 x Ladepuffer der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) verteilt.

Dieser Ladepuffer enthielt Glycerol. Es erhöhte die Dichte der DNA-Lösung und die Proben konnten so in die Geltasche sinken, ohne dass sie herausgespült wurden. Zusätzlich enthielt der Ladepuffer Bromphenolblau, um später den Lauf der Proben bei der Gelelektrophorese erkennen zu können. Dieser Farbstoff wanderte mit der DNA, und so wurde genau ersichtlich, wann die Elektrophorese beendet war (bevor die DNA-Fragmente aus dem Agarosegel in den Laufpuffer übertreten konnten).
  - Dann wurde je 5 µl Real-time PCR-Produkt aus den Real-time PCR-Platten dazugegeben. Aus jeder der zehn PCR-Platten (jeweils zwei pro

Primer) wurden primerspezifisch Real-time PCR-Produkte entnommen und zwar nach folgendem Schema (siehe auch Kapitel 4.6.3 Abbildung 6):

- 1 Probe Pool 4 (Gesamtpool aller 45 Patienten)
- 1 Probe Pool 3 (positiver Kontrollpool aus 19 Proben diverser Studien)
- 1 Probe NTC (Negativkontrolle mit Ampuwa)
- Patientenproben (zufällig ausgewählt)

Durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette wurde das PCR-Produkt mit dem Ladepuffer homogen vermischt.

3. Vorbereitung der Gelelektrophoresekammer: Dann wurde das Gel-Tray der Firma Polymehr (Paderborn, Deutschland) mit zwei kleinen Kunststoffkämmen für die Proben bereitgestellt. War die Lösung der Agarose abgekühlt, wurde sie in das Tray gegossen. Nach ca. 45 min war das Gel erhärtet. Das Gel wurde mit Laufpuffer TAE-Puffer 1 x übergossen, bis es komplett bedeckt war. Die Kunststoffkämme wurden dann vorsichtig entfernt.
4. Pipettieren der Proben: Nun wurde der gesamte Inhalt jedes einzelnen Cups in eine Tasche pipettiert. Pro Kammreihe wurde parallel in je eine Tasche ein bereits fertig angesetzter 20 bp- und 100 bp- Ladder (Größenstandards) der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) von 5 µl pipettiert. So konnten die DNA-Fragmente der Bakterien durch das Mitwandern von DNA-Fragmenten bekannter Größe identifiziert werden.
5. Durchführung der Gelelektrophorese: Die nun angelegte Spannung betrug 85 V. DNA ist aufgrund der negativen Ladungen der Phosphatreste ein Polyanion. Sie wandert dementsprechend von der Kathode zur Anode. Die Laufstrecke linearer DNA-Fragmente ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Länge. Zusätzlich hängt die elektrophoretische Beweglichkeit geladener Teilchen von nachfolgenden Punkten ab:
  - der Gesamt-Nettoladung des Moleküls
  - der Größe und Gestalt des Moleküls
  - der Porengröße des Trägers
  - von pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke des Puffers
  - der elektrischen Feldstärke

Nach ca. 1 h hatten die DNA-Fragmente die Anode erreicht, und die Spannung wurde abgeschaltet.

6. Sichtbarmachen der Proben: War die Trennung durchgeführt, wurden die Banden durch Anfärben mit Fluoreszenzfarbstoffen erkennbar gemacht. Hier wurde der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid der Firma Roth (Karlsruhe,



Deutschland) verwendet. Dafür wurde das Gel für ca. 15 min in ein Gemisch von 100 ml TAE-Puffer 1 x und 10 µl Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt. Da es mutagen wirkt, durfte auf Laborhandschuhe nicht verzichtet werden. EtBr interkalierte zwischen den Basen der DNA und wurde unter UV-Licht durch seine orangefarbene Fluoreszenz bei 254 nm im BioDoc Analyzer der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) sichtbar gemacht. Dies wurde fotografiert und dokumentiert.

7. Auswertung: Die Proben unbekannter Größe konnten jetzt mit dem Lauf des Ladders verglichen werden. Stimmt diese Laddergröße mit den Primerbp-Fragmenten überein, war das Bakterium positiv identifiziert. Die NTC-Probe durfte kein DNA-Fragment enthalten (Schimpf 2002, Rassow et al. 2008).

#### 4.8 Statistische Methodik

Die Ergebnisse wurden in codierter Form mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft EXCEL (Redmond USA, Version 2010, 2010) archiviert. Diese wurden dem Institut Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen vorgelegt und in Kooperation bearbeitet.

Ebenfalls mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Microsoft EXCEL (Redmond USA, Version 2010, 2010) wurde die Prävalenz vorkommender Bakterien für PCR und Real-time PCR bestimmt. Die tabellarische Darstellung wurde unterstützt durch Säulendiagramme.

Für die weitere statistische Auswertung wurde die Statistiksoftware Statistica der Firma StatSoft (Hamburg, Deutschland, Version 10, 2010) herangezogen. Zum einen wurde die Bakterienmenge in drei verschiedenen Patientengruppen bei Real-time PCR über Boxplots dargestellt. Dabei ist die Box der Bereich, in dem sich 25-75 % der Daten ansiedeln. Am Median sind 50 % der Daten kleiner oder gleich diesem Zentralwert. Mit dem unteren bzw. oberen Whiskers wird der komplette Datenbereich dargestellt. Ausreißerwerte oder Extremalwerte werden ebenfalls markiert. Zum anderen wurde mit Statistica der Vergleich der beiden Verfahren PCR und Real-time PCR mit den einzelnen ermittelten Bakterienkonzentrationen der Proben durchgeführt und über Bubbleplots dargestellt.

Bei der Überprüfung eines signifikanten Zusammenhangs der Bakterien auf das Krankheitsbild mit dem Verfahren PCR wurde mit dem Fisher-Exakttest gearbeitet. Ein P-Wert  $<0,05$  liefert einen signifikanten Zusammenhang.

Über eine Varianzanalyse (ANOVA) wurde bei dem Verfahren der Real-time PCR ermittelt, inwieweit ein signifikanter Zusammenhang der Bakterien auf das Krank-

heitsbild vorliegt. Hier wurde diese Analyse gewählt, da es sich um absolute Zahlen handelt. Ein P-Wert  $<0,05$  liefert einen signifikanten Zusammenhang.

Mit dem Spearman und Kendalls Tau-Test sollte ermittelt werden, ob es einen signifikanten Zusammenhang der beiden Testverfahren gibt. Ein p-Wert  $<0,05$  liefert einen signifikanten Zusammenhang.

## 5 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der beiden Nachweismethoden (PCR und Real-time PCR) dargestellt. Insgesamt wurden 45 Patientenproben mit jeder Nachweismethode untersucht. Jede dieser Proben wurde auf fünf Bakterien *Aa*, *Pg*, *Td*, *Tf* und *Fn* dreimal getestet. Der gemittelte Wert jeder Probe wurde als Ergebnis verwendet. Die Ergebnisse jedes Bakteriums wurden für sich ausgewertet. Demzufolge werden die Ergebnisse auch für jedes Bakterium einzeln aufgelistet. Dabei werden zuerst die Prävalenzen und Bakterienmengen aufgezeigt. Im Weiteren wird dargestellt, inwieweit ein signifikanter Zusammenhang des Bakteriums auf das Krankheitsbild vorlag. Dann erfolgt bakterienspezifisch ein Vergleich der relativen Quantifizierung beider Verfahren (PCR vs. Real-time PCR) gegeneinander. Im letzten Teil der Ergebnisdokumentation wird aufgezeigt, ob ein signifikanter Zusammenhang der Nachweismethoden vorlag. Die Keimkonzentrationsverteilung der PCR erfolgte gemäß Kapitel 4.5.3. Die Keimkonzentrationsverteilung der Real-time PCR erfolgte gemäß Kapitel 4.6.5.

### 5.1 Ergebnisse *Aa*

#### 5.1.1 Prävalenz PCR

Tabelle 8 zeigt die Prävalenz für *Aa* in den drei verschiedenen Patientengruppen. 80 % (n=36) aller Proben wurden unter der Nachweisgrenze detektiert. 20 % (n=9) aller Proben lagen über Nachweisgrenze der Keimkonzentration.

Tabelle 8: Tabellarische Darstellung der Prävalenz für *Aa* mit PCR in Anzahl der Proben und prozentuaalem Anteil.

<i>Aa</i>	< Nachweisgrenze		≥ Nachweisgrenze			
	<10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	<10 <sup>4</sup>	<10 <sup>5</sup>	>10 <sup>6</sup>	
gesund	13 86,67 %	1 6,67 %	1 6,67 %	0 0 %	0 0 %	
Mukositis	11 73,33 %	1 6,67 %	0 0 %	0 0 %	3 20 %	
Periimplantitis	12 80 %	2 13,33 %	0 0 %	0 0 %	1 6,67 %	

Diese neun positiven Proben verteilten sich wie folgt: In der Gruppe *gesund* wurden zwei Proben detektiert. Sie erreichten Werte bis zum erhöhten Keimkonzentrationsbereich. Für *Mukositis* wurden drei von vier positiven Proben im Bereich sehr stark erhöhter Keimkonzentrationen gefunden. In der Gruppe *Periimplantitis* erreichte eine von drei Proben Keimkonzentrationen im sehr stark erhöhten Keimkonzentrati-

onsbereich. In Abbildung 7 ist die Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Aa* dargestellt.

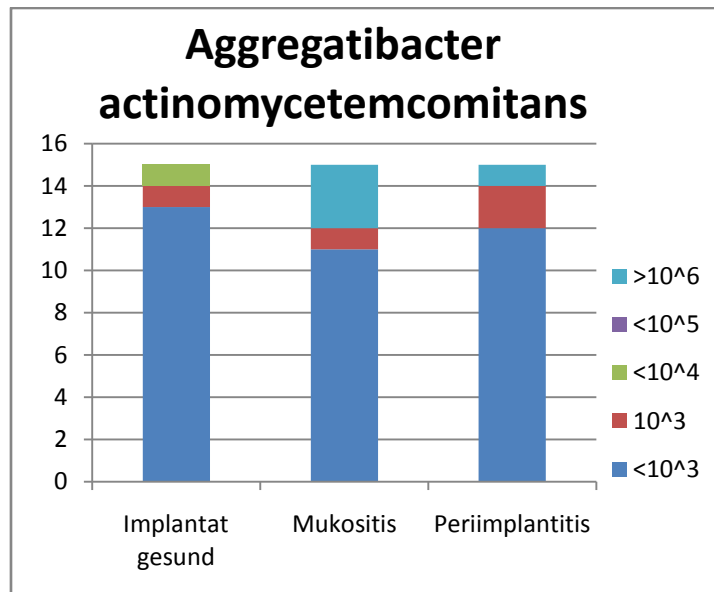


Abb. 7: Darstellung der Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Aa* in drei verschiedenen Patientengruppen mit PCR.

Für *Aa* war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen ( $p=0,56$ ).

### 5.1.2 Prävalenz und Bakterienmenge Real-time PCR

Tabelle 9 zeigt die Prävalenz für *Aa* in den drei verschiedenen Patientengruppen. 77,78 % ( $n=35$ ) aller Proben wurden unter der Nachweisgrenze detektiert. 22,22 % ( $n=10$ ) aller Proben lagen über Nachweisgrenze der Keimkonzentration.

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der Prävalenz für *Aa* mit Real-time PCR in Anzahl der Proben und prozentualem Anteil.

<i>Aa</i>	< Nachweisgrenze		≥ Nachweisgrenze			
	0-≤0,2	>0,2-≤0,8	>0,8-≤1,4	>1,4-≤2,0	>2	
gesund	13 86,67 %	2 13,33 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	
Mukositis	9 60 %	2 13,33 %	2 13,33 %	1 6,67 %	1 6,67 %	
Periimplantitis	13 86,67 %	1 6,67 %	0 0 %	1 6,67 %	0 0 %	

Diese zehn positiven Proben verteilten sich wie folgt: In der Gruppe *gesund* wurden die zwei positiv detektierten Proben an Nachweisgrenze der Keimkonzentration ge-

funden. In der Gruppe *Mukositis* verteilten sich sechs positive Proben homogen auf alle Keimkonzentrationsbereiche an Nachweisgrenze bis hin zu sehr stark erhöhten Keimkonzentrationen. Bei *Periimplantitis* lag eine von zwei Proben im stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich. In Abbildung 8 ist die Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Aa* dargestellt.

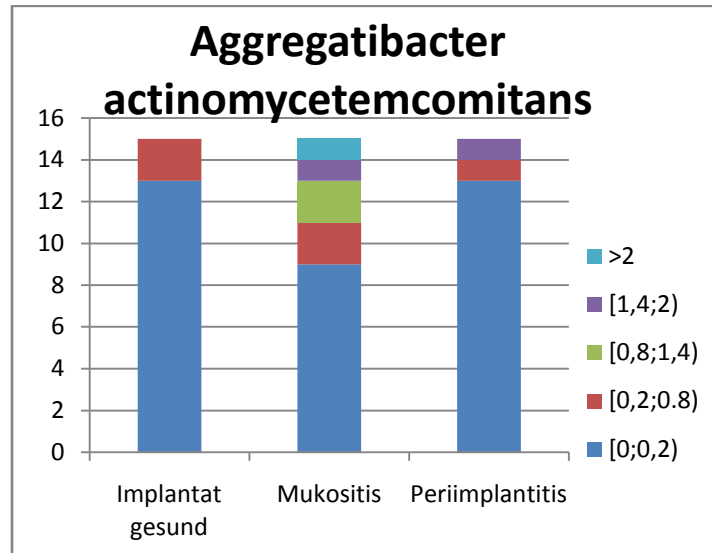


Abb. 8 : Darstellung der Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Aa* in drei verschiedenen Patientengruppen mit Real-time PCR.

Im Folgenden wird die relative Bakterienmenge in Abhängigkeit zu den drei Patientengruppen *gesund*, *Mukositis* und *Periimplantitis* aufgezeigt.

Abbildung 9 zeigt die relative Bakterienmenge für *Aa* in den drei Patientengruppen. In der Gruppe *Mukositis* lagen 50 % der Proben (Median) unter Nachweisgrenze der Keimkonzentration (0,00). Jedoch erstreckten sich 75 % der Proben zwischen den Keimkonzentrationsbereichen unter Nachweisgrenze und erhöhten Keimkonzentrationen. Bis auf wenige Ausreißer lagen alle Proben bei der Patientengruppe *gesund* (Median 0,00) und *Periimplantitis* (Median 0,00) unter Nachweisgrenze der Keimkonzentration.

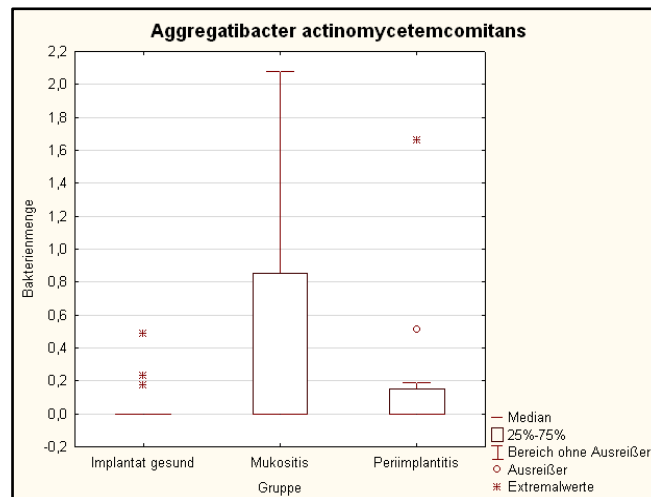


Abb. 9: Darstellung der relativen Bakterienmenge für Aa in drei verschiedenen Patientengruppen mit Real-time PCR.

In Abbildung 10 ist der Mittelwert vorkommender relativer Bakterienmengen von Aa in drei Patientengruppen dargestellt. Für Aa war kein signifikanter Zusammenhang vom Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen ( $p=0,32$ ).

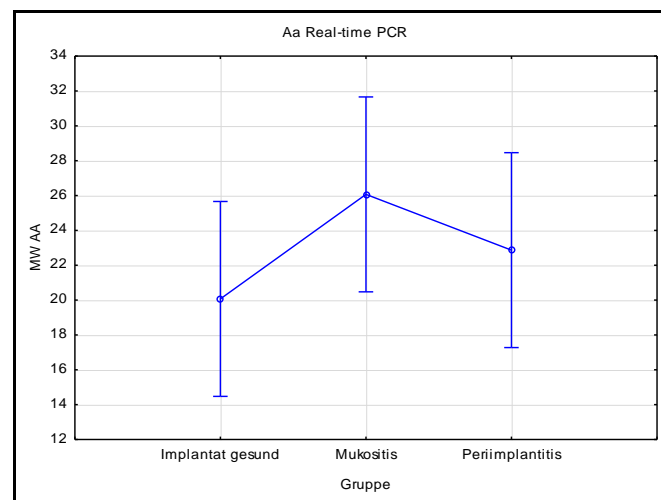


Abb. 10: Darstellung der Mittelwerte vorkommender relativer Bakterienmengen von Aa in drei Patientengruppen mit Real-time PCR.

### 5.1.3 Vergleich beider Verfahren

Die Ergebnisse beider Verfahren wurden miteinander verglichen. Aa wurde mit PCR in 20 % (*gesund*  $n=2$ ; *Mukositis*  $n=4$ ; *Periimplantitis*  $n=3$ ) und mit Real-time PCR in 22,22 % (*gesund*  $n=2$ ; *Mukositis*  $n=6$ ; *Periimplantitis*  $n=2$ ) aller Proben über der Nachweisgrenze detektiert. Abbildung 11 zeigt die Korrelation der Keimkonzentration der Einzelproben ermittelt über PCR und Real-time PCR für Aa. Übereinstimmungen zeigten sich in 84,44 % der Proben ( $n=38$ ).

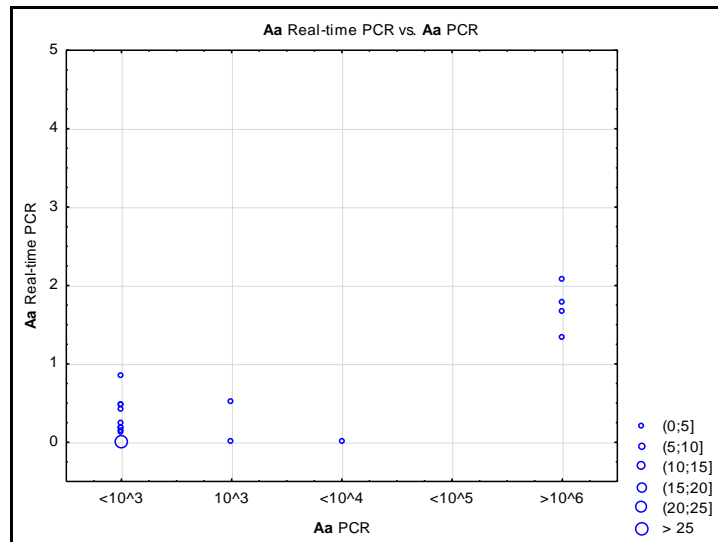


Abb.11: Darstellung der Ergebnisse der PCR gegenüber den Ergebnissen der Real-time PCR für Aa.

Für Aa wurde kein signifikanter Zusammenhang der beiden Verfahren festgestellt (p-Wert Kendalls Tau 0,38 bzw. Spearman 0,42).

## 5.2 Ergebnisse Pg

### 5.2.1 Prävalenz PCR

Tabelle 10 zeigt die Prävalenz für Pg in den drei verschiedenen Patientengruppen. 33,33 % (n=15) aller Proben wurden unter der Nachweisgrenze detektiert. 66,67 % (n=30) aller Proben lagen über Nachweisgrenze der Keimkonzentration.

Tabelle 10: Tabellarische Darstellung der Prävalenz für Pg mit PCR in Anzahl der Proben und prozentuaem Anteil.

Pg	< Nachweisgrenze		≥ Nachweisgrenze		
	<math><10^4</math>	$10^4$	<math><10^5</math>	<math><10^6</math>	>math>10^7</math>
gesund	3 20 %	5 33,33 %	2 13,33 %	2 13,33 %	3 20 %
Mukositis	7 46,67 %	2 13,33 %	0 0%	2 13,33 %	4 26,67 %
Periimplantitis	5 33,33 %	0 0 %	1 6,67 %	5 33,33 %	4 26,67 %

Diese 30 positiven Proben verteilten sich wie folgt: 12 Proben waren in der Patientengruppe *gesund* zu finden. Davon lagen fünf Proben im Bereich stark bis sehr stark erhöhter Keimkonzentration. In der Gruppe *Mukositis* fand man acht Proben über der Nachweisgrenze. Davon waren sechs Proben im Bereich stark bis sehr stark erhöhter Keimkonzentration zu finden. Von den zehn positiv detektierten Pro-

ben bei *Periimplantitis* waren neun Proben im Bereich stark bis sehr stark erhöhter Keimkonzentration detektiert worden. In Abbildung 12 ist die Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Pg* dargestellt.

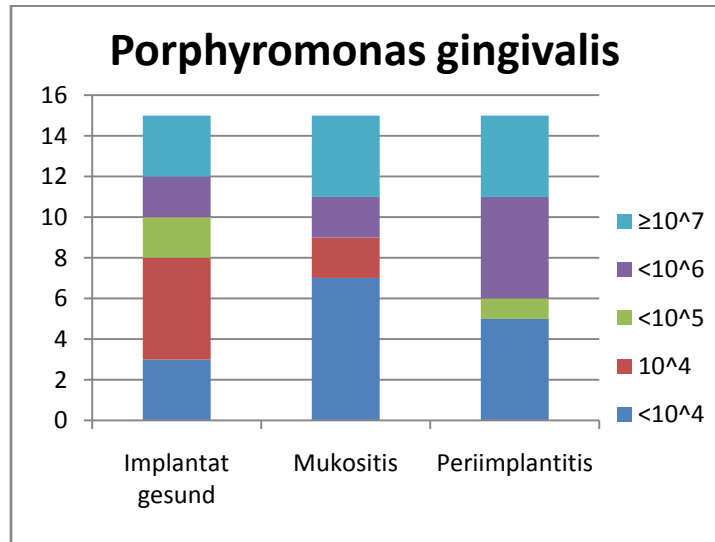


Abb. 12: Darstellung der Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Pg* in drei verschiedenen Patientengruppen mit PCR.

Für *Pg* war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen ( $p=0,20$ ).

### 5.2.2 Prävalenz und Bakterienmenge Real-time PCR

Tabelle 11 zeigt die Prävalenz für *Pg* in den drei verschiedenen Patientengruppen. 62,22 % ( $n=28$ ) aller Proben wurden unter der Nachweisgrenze detektiert. 37,78 % ( $n=17$ ) aller Proben lagen über Nachweisgrenze der Keimkonzentration.

Tabelle 11: Tabellarische Darstellung der Prävalenz für *Pg* mit Real-time PCR in Anzahl der Proben und prozentalem Anteil.

<i>Pg</i>	< Nachweisgrenze		$\ge$ Nachweisgrenze			
	0- $\le 0,2$	>0,2- $\le 0,8$	>0,8- $\le 1,4$	>1,4- $\le 2,0$	>2	
gesund	10 66,67 %	3 20 %	2 13,33 %	0 0 %	0 0 %	
Mukositis	7 46,67 %	2 13,33 %	1 6,67 %	2 13,33 %	3 20 %	
Periimplantitis	11 73,33 %	0 0 %	0 0 %	0 0 %	4 26,67 %	

Diese 17 positiven Proben verteilten sich wie folgt: Fünf Proben verteilten sich in der Patientengruppe *gesund* im Keimkonzentrationsbereich an Nachweisgrenze und im



erhöhten Keimkonzentrationsbereich. In der Gruppe *Mukositis* verteilten sich die 8 positiven Proben tendenziell zu gleichen Anteilen in allen vier Keimkonzentrationsbereichen. Die Patientengruppe *Periimplantitis* verzeichnete vier positive Proben. Diese siedelten sich alle im Bereich sehr stark erhöhter Keimkonzentrationen an. In Abbildung 13 ist die Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Pg* dargestellt.

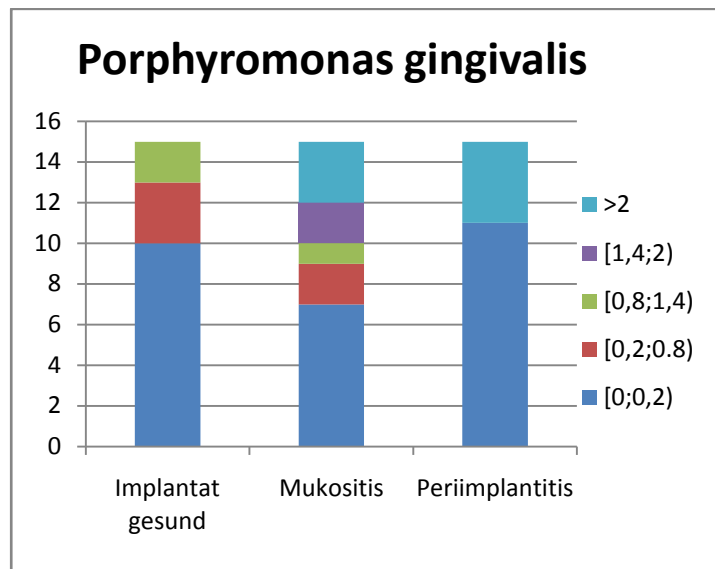


Abb. 13: Darstellung der Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Pg* in drei verschiedenen Patientengruppen mit Real-time PCR.

Abbildung 14 zeigt die relative Bakterienmenge für *Pg* in drei den Patientengruppen. 50 % der Proben (Median) lagen in den Gruppen *gesund* (0,00), *Mukositis* (0,20) und *Periimplantitis* (0,00) unter Nachweisgrenze der Keimkonzentration. Über 75 % der Proben erstreckten sich bei der Gruppe *gesund* zwischen den Bereichen unter Nachweisgrenze und an Nachweisgrenze an. Für *Mukositis* lagen diese zwischen den Keimkonzentrationsbereichen unter Nachweisgrenze und stark erhöhten Keimkonzentrationen. Für die Gruppe *Periimplantitis* galt dies zwischen den Keimkonzentrationsbereichen unter Nachweisgrenze und sehr stark erhöhten Keimkonzentrationen.

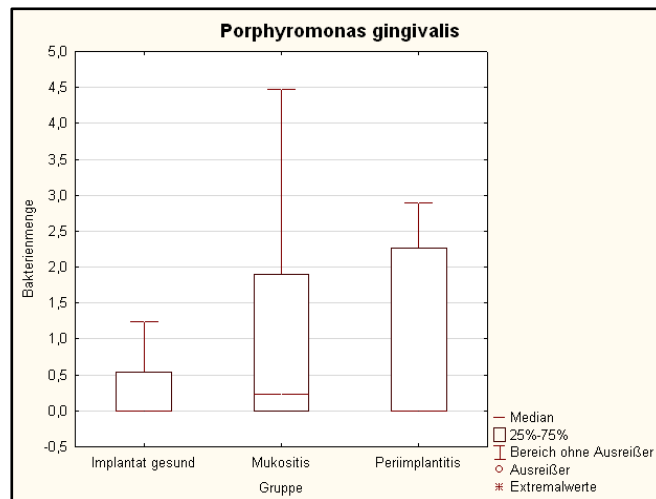


Abb. 14: Darstellung der relativen Bakterienmenge für *Pg* in drei verschiedenen Patientengruppen mit Real-time PCR.

In Abbildung 15 ist der Mittelwert vorkommender relativer Bakterienmengen von *Pg* in drei Patientengruppen dargestellt. Für *Pg* war kein signifikanter Zusammenhang vom Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen ( $p=0,16$ ).

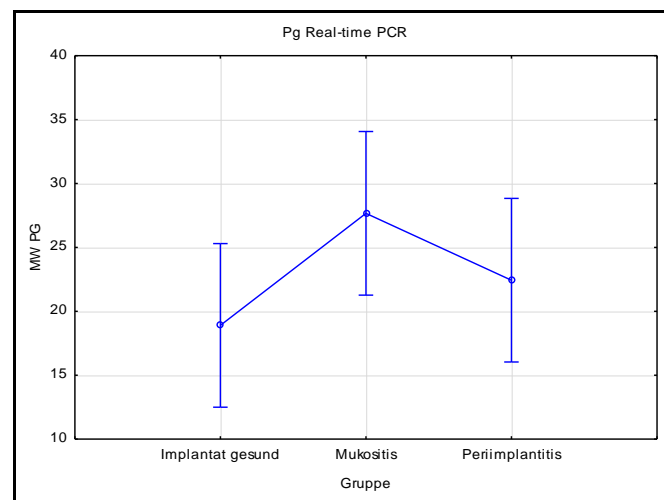


Abb. 15: Darstellung der Mittelwerte vorkommender relativer Bakterienmengen von *Pg* in drei Patientengruppen mit Real-time PCR.

### 5.2.3 Vergleich beider Verfahren

Die Ergebnisse beider Verfahren wurden miteinander verglichen. *Pg* wurde mit PCR in 66,66 % (*gesund*  $n=12$ ; *Mukositis*  $n=8$ ; *Periimplantitis*  $n=10$ ) und mit Real-time PCR in 37,78 % (*gesund*  $n=5$ ; *Mukositis*  $n=8$ ; *Periimplantitis*  $n=4$ ) aller Proben über der Nachweisgrenze detektiert. Abbildung 16 zeigt die Korrelation der Keimkonzentration der Einzelproben ermittelt über PCR und Real-time PCR für *Pg*. Exakte Übereinstimmungen gab es aber nur in 33,33 % der Proben ( $n=15$ ). Starke Abweichungen waren wie folgt zu finden: 12 Proben wurden mit PCR im Bereich stark bis sehr

stark erhöhter Keimkonzentrationen detektiert. Diese wurden aber mit Real-time PCR unter Nachweisgrenze nachgewiesen.

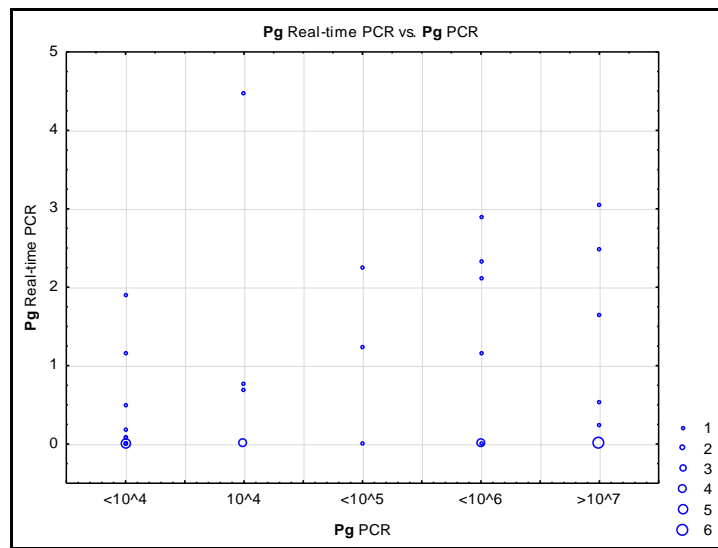


Abb. 16: Darstellung der Ergebnisse der PCR gegenüber den Ergebnissen der Real-time PCR für *Pg*.

Für *Pg* wurde kein signifikanter Zusammenhang der beiden Verfahren festgestellt (p-Wert Kendalls Tau 0,04 bzw. Spearman 0,04).

### 5.3 Ergebnisse *Td*

#### 5.3.1 Prävalenz PCR

Tabelle 12 zeigt die Prävalenz für *Td* in den drei verschiedenen Patientengruppen. 66,67 % (n=30) aller Proben wurden unter der Nachweisgrenze detektiert. 33,33 % (n=15) aller Proben lagen über Nachweisgrenze der Keimkonzentration.

Tabelle 12: Tabellarische Darstellung der Prävalenz für *Td* mit PCR in Anzahl der Proben und prozentualem Anteil.

<i>Td</i>	< Nachweisgrenze		≥ Nachweisgrenze		
	<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	<10 <sup>5</sup>	<10 <sup>6</sup>	>10 <sup>7</sup>
gesund	11 73,33 %	3 20 %	1 6,67 %	0 0 %	0 0 %
Mukositis	11 73,33 %	1 6,67 %	0 0 %	3 20 %	0 0 %
Periimplantitis	8 53,33 %	4 26,67 %	1 6,67 %	1 6,67 %	1 6,67 %

Diese 15 positiven Proben verteilten sich wie folgt: Vier Proben wurden in der Gruppe *gesund* detektiert und zwar bis zu erhöhten Keimkonzentrationen. In der Gruppe

*Mukositis* wurden drei von vier Proben im stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich gefunden. Sieben Proben wurden in der Gruppe *Periimplantitis* ermittelt. Davon waren vier Proben an der Nachweisgrenze der Keimkonzentration zu finden.

In Abbildung 17 ist die Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Td* dargestellt.

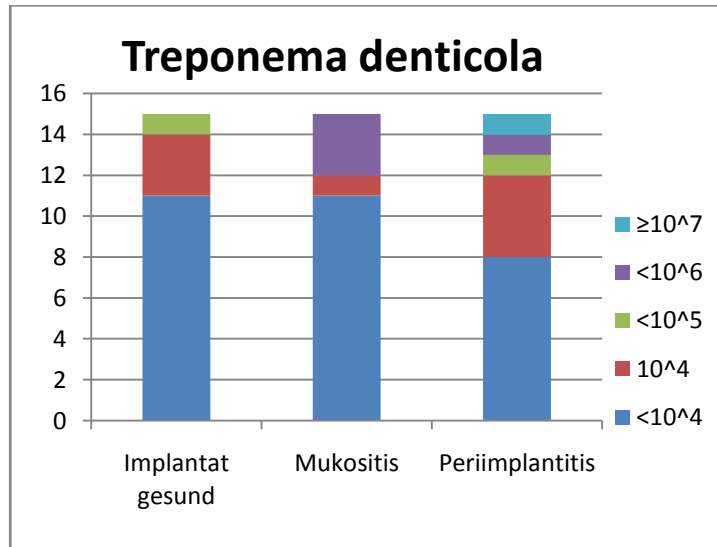


Abb. 17: Darstellung der Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Td* in drei verschiedenen Patientengruppen mit PCR.

Für *Td* war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen ( $p=0,31$ ).

### 5.3.2 Prävalenz und Bakterienmenge Real-time PCR

Tabelle 13 zeigt die Prävalenz für *Td* in den drei verschiedenen Patientengruppen. 44,44 % ( $n=20$ ) aller Proben wurden unter der Nachweisgrenze detektiert. 55,56 % ( $n=25$ ) aller Proben lagen über Nachweisgrenze der Keimkonzentration.

Tabelle 13: Tabellarische Darstellung der Prävalenz für *Td* mit Real-time PCR in Anzahl der Proben und prozentualem Anteil.

<i>Td</i>	< Nachweisgrenze		$\ge$ Nachweisgrenze		
	0- $\le 0,2$	>0,2- $\le 0,8$	>0,8- $\le 1,4$	>1,4- $\le 2,0$	>2
gesund	6 40 %	3 20 %	0 0 %	6 40 %	0 0 %
Mukositis	7 46,67 %	2 13,33 %	2 13,33 %	3 20 %	1 6,67 %
Periimplantitis	7 46,67 %	3 20 %	0 0 %	4 26,67 %	1 6,67 %

Diese 25 positiven Proben verteilten sich wie folgt: In der Gruppe *gesund* wurden sechs von neun Proben im stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich gefunden. Für *Mukositis* wurden acht Proben detektiert. Diese verteilten sich homogen in allen Keimkonzentrationsbereichen (von der Nachweisgrenze bis zu sehr stark erhöhten Keimkonzentrationen). Fünf von acht Proben waren bei *Periimplantitis* im stark bis sehr stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich zu finden.

In Abbildung 18 ist die Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Td* dargestellt.

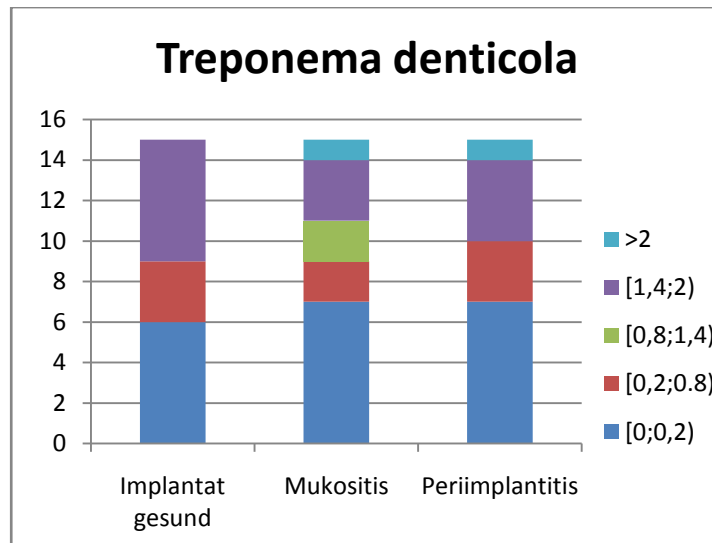


Abb. 18: Darstellung der Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Td* in drei verschiedenen Patientengruppen mit Real-time PCR.

Abbildung 19 zeigt die relative Bakterienmenge für *Td* in den drei Patientengruppen. Jeweils über 50 % der Proben (Median) zeigten sich in allen drei Patientengruppen bis an Nachweisgrenze. Wobei in der Gruppe *Periimplantitis* (0,38) die höchsten Werte erzielt wurden, gefolgt von der Gruppe *gesund* (0,30) und *Mukositis* (0,21). Ebenfalls erstreckten sich jeweils in allen drei Gruppen 75 % der Proben unter Nachweisgrenze bis hin zu stark erhöhten Keimkonzentrationen.

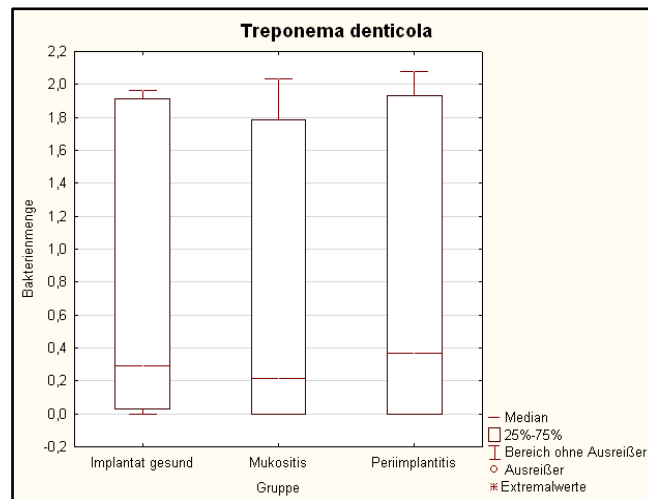


Abb. 19: Darstellung der relativen Bakterienmenge für *Td* in drei verschiedenen Patientengruppen mit Real-time PCR.

In Abbildung 20 ist der Mittelwert vorkommender relativer Bakterienmengen von *Td* in drei Patientengruppen dargestellt. Für *Td* war kein signifikanter Zusammenhang vom Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen ( $p=0,92$ ).

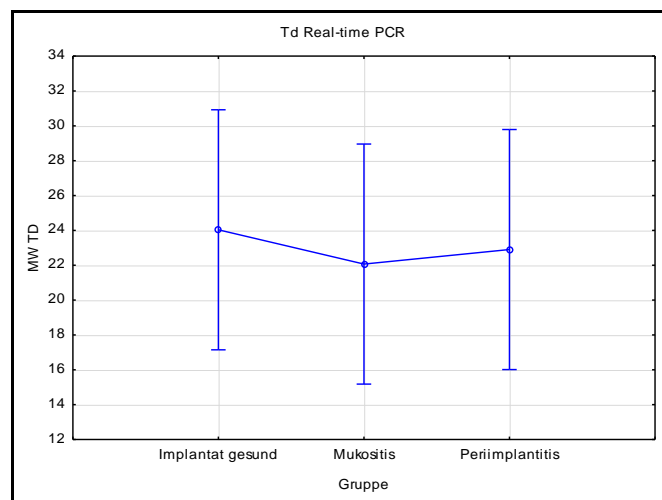


Abb. 20: Darstellung der Mittelwerte vorkommender relativer Bakterienmengen von *Td* in drei Patientengruppen mit Real-time PCR.

### 5.3.3 Vergleich beider Verfahren

Die Ergebnisse beider Verfahren wurden miteinander verglichen. *Td* wurde mit PCR in 33,33 % (*gesund*  $n=4$ ; *Mukositis*  $n=4$ ; *Periimplantitis*  $n=7$ ) und mit Real-time PCR in 55,55 % (*gesund*  $n=9$ ; *Mukositis*  $n=8$ ; *Periimplantitis*  $n=8$ ) aller Proben über der Nachweisgrenze detektiert. Abbildung 21 zeigt die Korrelation der Keimkonzentration der Einzelproben ermittelt über PCR und Real-time PCR für *Td*. Exakte Übereinstimmungen gab es in 51,11 % der Proben ( $n=23$ ). Tendenziell wurden mit Real-

time PCR höhere Werte ermittelt. Starke Abweichungen waren wie folgt zu finden: Acht Proben wurden mit Real-time PCR im stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich detektiert. Mit PCR wurden diese unter bzw. an Nachweisgrenze festgestellt.

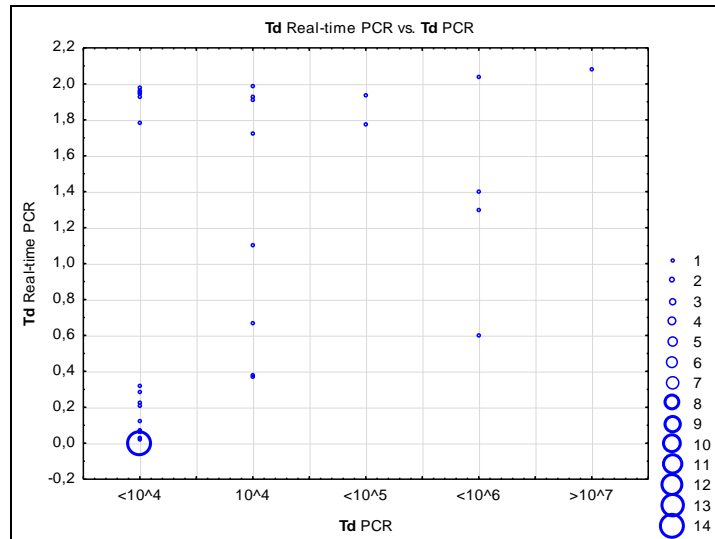


Abb. 21: Darstellung der Ergebnisse der PCR gegenüber den Ergebnissen der Real-time PCR für *Td*.

Für *Td* wurde kein signifikanter Zusammenhang der beiden Verfahren festgestellt (p-Wert Kendalls Tau 0,49 bzw. Spearman 0,59).

## 5.4 Ergebnisse *Tf*

### 5.4.1 Prävalenz PCR

Tabelle 14 zeigt die Prävalenz für *Tf* in den drei verschiedenen Patientengruppen. 44,44 % (n=20) aller Proben wurden unter der Nachweisgrenze detektiert. 55,56 % (n=25) aller Proben lagen über Nachweisgrenze der Keimkonzentration.

Tabelle 14: Tabellarische Darstellung der Prävalenz für *Tf* mit PCR in Anzahl der Proben und prozentuaalem Anteil.

<i>Tf</i>	< Nachweisgrenze		≥ Nachweisgrenze		
	<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	<10 <sup>5</sup>	<10 <sup>6</sup>	>10 <sup>7</sup>
gesund	7 46,67 %	5 33,33 %	0 0 %	2 13,33 %	1 6,67 %
Mukositis	7 46,67 %	2 13,33 %	3 20 %	3 20 %	0 0 %
Periimplantitis	6 40 %	4 26,67 %	1 6,67 %	3 20 %	1 6,67 %

Diese 25 positiven Proben verteilten sich wie folgt: In der Gruppe *gesund* wurden fünf von acht positiven Proben an Nachweisgrenze der Keimkonzentration nachgewiesen. In der Gruppe *Mukositis* wurden ebenfalls acht Proben gefunden. Diese verteilten sich ungefähr zu gleichen Anteilen zwischen den Keimkonzentrationen an Nachweisgrenze und stark erhöhten Konzentrationen. Im sehr stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich wurde keine Probe nachgewiesen. In der Gruppe *Periimplantitis* wurden neun Proben gefunden. Davon wurden vier Proben an Nachweisgrenze und drei Proben im stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich detektiert. In Abbildung 22 ist die Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Tf* dargestellt.

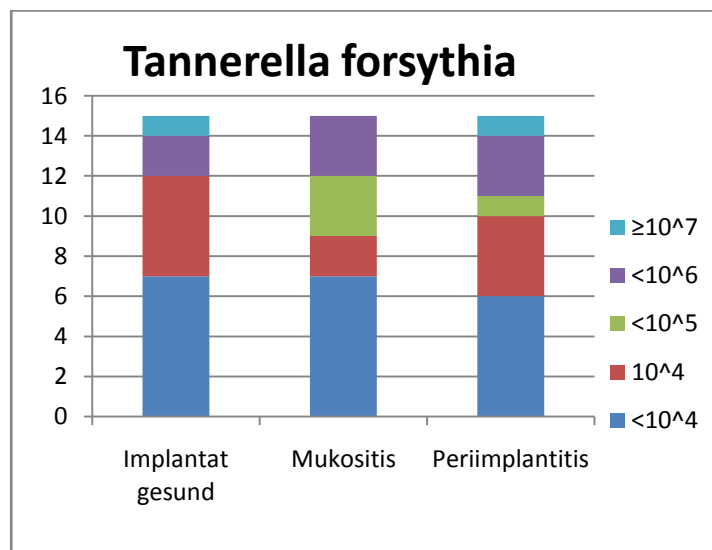


Abb. 22: Darstellung der Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Tf* in drei verschiedenen Patientengruppen mit PCR.

Für *Tf* war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen ( $p=0,71$ ).

#### 5.4.2 Prävalenz und Bakterienmenge Real-time PCR

Tabelle 15 zeigt die Prävalenz für *Tf* in den drei verschiedenen Patientengruppen. 46,67 % ( $n=21$ ) aller Proben wurden unter der Nachweisgrenze detektiert. 53,33 % ( $n=24$ ) aller Proben lagen über Nachweisgrenze der Keimkonzentration.



Tabelle 15: Tabellarische Darstellung der Prävalenz für *Tf* mit Real-time PCR in Anzahl der Proben und prozentualem Anteil.

<i>Tf</i>	< Nachweisgrenze		≥ Nachweisgrenze			
	0-≤0,2	>0,2-≤0,8	>0,8-≤1,4	>1,4-≤2,0	>2	
gesund	7 46,67 %	5 33,33 %	0 0 %	1 6,67 %	2 13,33 %	
Mukositis	6 40 %	4 26,67 %	4 26,67 %	1 6,67 %	0 0 %	
Periimplantitis	8 53,33 %	2 13,33 %	2 13,33 %	2 13,33 %	1 6,67 %	

Diese 24 positiven Proben verteilten sich wie folgt: In der Gruppe *gesund* wurden fünf von acht positiven Proben an Nachweisgrenze der Keimkonzentration gefunden. Bei *Mukositis* wurden neun Proben ermittelt. Davon lagen vier Proben an Nachweisgrenze der Keimkonzentration und vier Proben im erhöhten Konzentrationsbereich. In der Gruppe *Periimplantitis* wurden sieben Proben detektiert. Diese verteilten sich homogen auf die Konzentrationsbereiche an Nachweisgrenze bis hin zu sehr stark erhöhten Keimkonzentrationen. In Abbildung 23 ist die Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Tf* dargestellt.

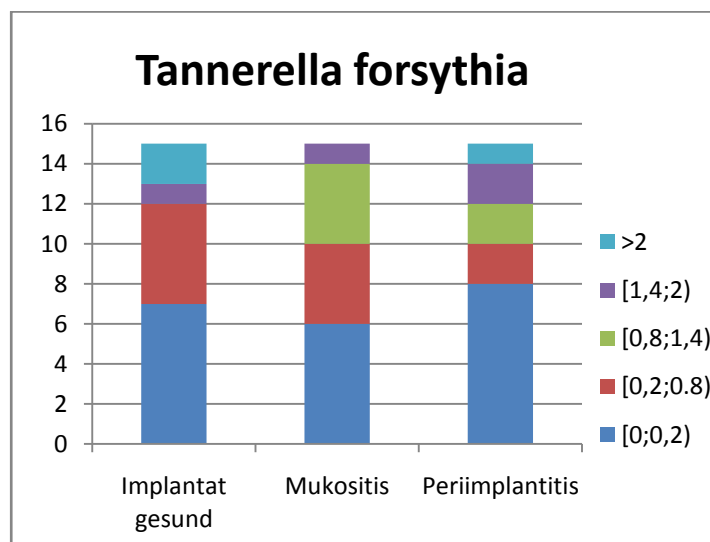


Abb. 23: Darstellung der Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Tf* in drei verschiedenen Patientengruppen mit Real-time PCR.

Abbildung 24 zeigt die relative Bakterienmenge für *Tf* in den drei Patientengruppen. 75 % (Median 0,45) der Proben reichten in der Gruppe *gesund* bis an Nachweisgrenze der Keimkonzentration. Dem gegenüber waren 50 % (Median) der Proben in den Gruppen *Mukositis* (Median 0,2) und *Periimplantitis* (Median 0,05) unter Nachweisgrenze der Keimkonzentration zu finden. 75 % der Proben erstreckten sich aber

in der Gruppe *Mukositis* bis zum erhöhten Keimkonzentrationsbereich. Bei *Periimplantitis* galt dies bis zum stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich.

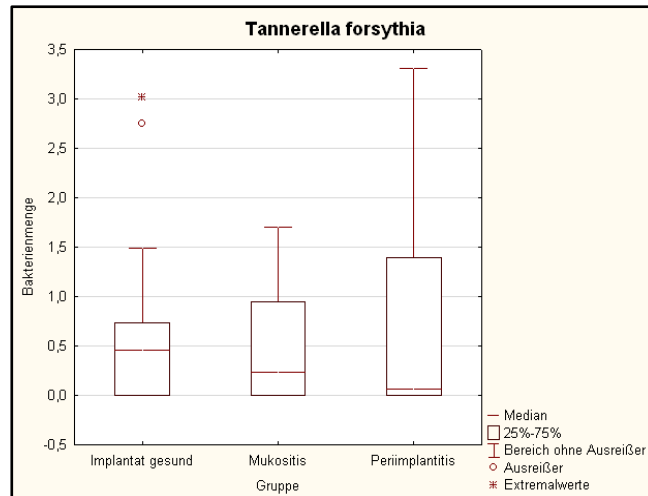


Abb. 24: Darstellung der relativen Bakterienmenge für *Tf* in drei verschiedenen Patientengruppen mit Real-time PCR.

In Abbildung 25 ist der Mittelwert vorkommender relativer Bakterienmengen von *Tf* in drei Patientengruppen dargestellt. Für *Tf* war kein signifikanter Zusammenhang vom Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen ( $p=0,97$ ).

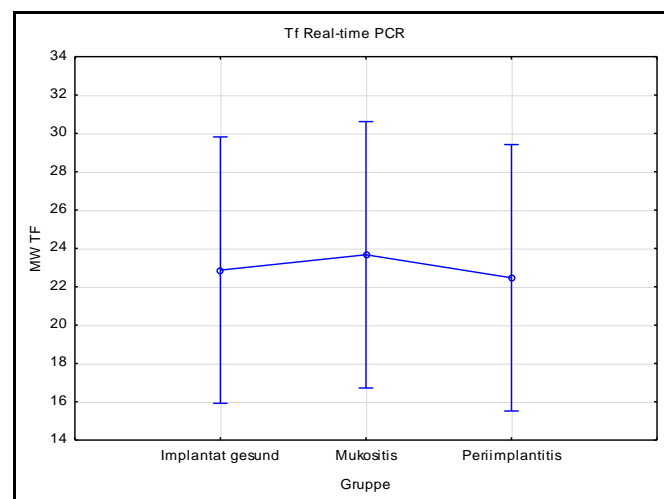


Abb. 25: Darstellung der Mittelwerte vorkommender relativer Bakterienmengen von *Tf* in drei Patientengruppen mit Real-time PCR.

#### 5.4.3 Vergleich beider Verfahren

Die Ergebnisse beider Verfahren wurden miteinander verglichen. *Tf* wurde mit PCR in 44,44 % (*gesund*  $n=8$ ; *Mukositis*  $n=8$ ; *Periimplantitis*  $n=9$ ) und mit Real-time PCR in 53,33 % (*gesund*  $n=8$ ; *Mukositis*  $n=9$ ; *Periimplantitis*  $n=7$ ) aller Proben über der

Nachweisgrenze detektiert. Abbildung 26 zeigt die Korrelation der Keimkonzentration der Einzelproben ermittelt über PCR und Real-time PCR für *Tf*. Exakte Übereinstimmungen gab es in 55,56 % der Proben (n=25). Abweichungen verzeichneten sich wie folgt: Im Bereich unter und an Nachweisgrenze der Keimkonzentrationen mit PCR wurden mit Real-time PCR höhere Keimkonzentrationen, d.h. im erhöhten bis stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich gefunden. Im Bereich erhöhter bzw. stark erhöhter Keimkonzentrationen mit PCR war es genau anders herum. Hier wurden dieselben Proben mit Real-time PCR nur unter Nachweisgrenze bzw. bis zum erhöhten Keimkonzentrationsbereich detektiert.

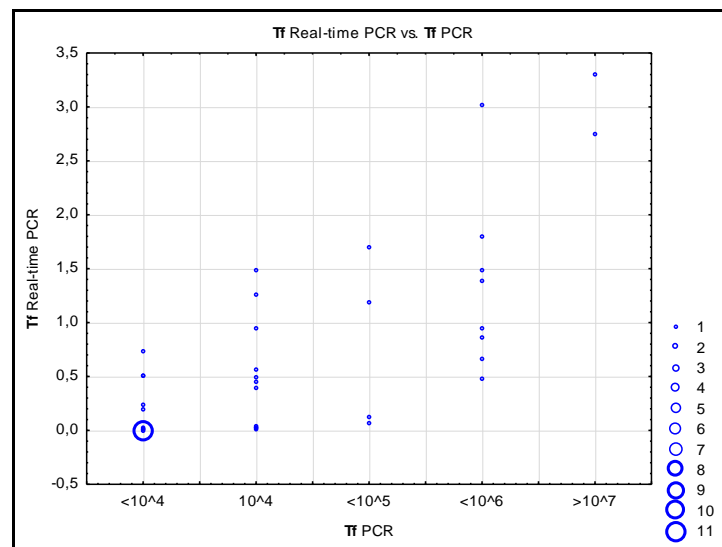


Abb. 26: Darstellung der Ergebnisse der PCR gegenüber den Ergebnissen der Real-time PCR für *Tf*.

Für *Tf* wurde kein signifikanter Zusammenhang der beiden Verfahren festgestellt (p-Wert Kendalls Tau 0,65 bzw. Spearman 0,78).

## 5.5 Ergebnisse *Fn*

### 5.5.1 Prävalenz PCR

Tabelle 16 zeigt die Prävalenz für *Fn* in den drei verschiedenen Patientengruppen. 11,11 % (n=5) aller Proben wurden unter der Nachweisgrenze detektiert. 88,89 % (n=40) aller Proben lagen über Nachweisgrenze der Keimkonzentration.

Tabelle 16: Tabellarische Darstellung der Prävalenz für *Fn* mit PCR in Anzahl der Proben und prozentuaalem Anteil.

<i>Fn</i>	< Nachweisgrenze		≥ Nachweisgrenze		
	<10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	<10 <sup>5</sup>	<10 <sup>6</sup>	>10 <sup>7</sup>
gesund	1 6,67 %	1 6,67 %	10 66,67 %	3 20 %	0 0 %
Mukositis	3 20 %	2 13,33 %	4 26,67 %	5 33,33 %	1 6,67 %
Periimplantitis	1 6,67 %	1 6,67 %	6 40 %	7 46,67 %	0 0 %

Diese 40 Proben verteilten sich wie folgt: In der Gruppe *gesund* wurden von 14 positiven Proben zehn Proben im erhöhten und drei Proben im stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich detektiert. 12 Proben wurden in der Gruppe *Mukositis* gefunden. Davon waren vier Proben im erhöhten Keimkonzentrationsbereich und fünf Proben im stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich zu finden. Für *Periimplantitis* wurden 14 positive Proben gefunden. Davon wurden sechs Proben im erhöhten Keimkonzentrationsbereich und sieben Proben im stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich nachgewiesen. In Abbildung 27 ist die Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Fn* dargestellt.

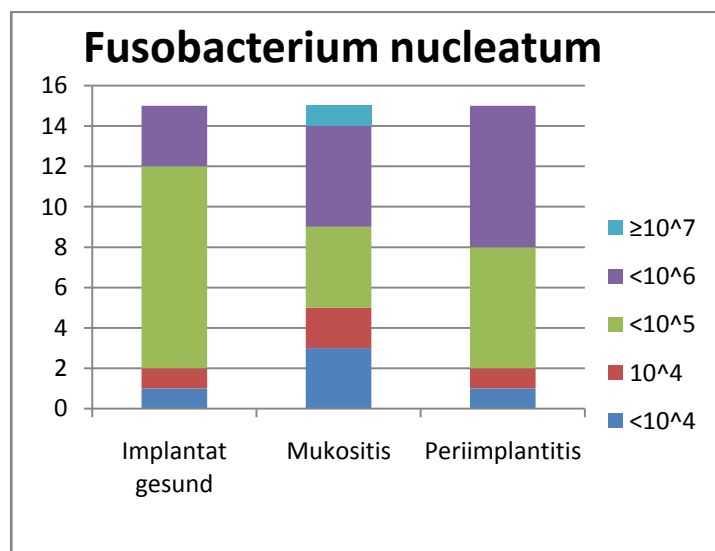


Abb. 27: Darstellung der Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Fn* in drei verschiedenen Patientengruppen mit PCR.

Für *Fn* war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen ( $p=0,41$ ).

### 5.5.2 Prävalenz und Bakterienmenge Real-time PCR

Tabelle 17 zeigt die Prävalenz für *Fn* in den drei verschiedenen Patientengruppen. Alle 45 Proben wurden über Nachweisgrenze der Keimkonzentration detektiert.

Tabelle 17: Tabellarische Darstellung der Prävalenz für *Fn* mit Real-time PCR in Anzahl der Proben und prozentalem Anteil.

<i>Fn</i>	< Nachweisgrenze		≥ Nachweisgrenze		
	0-≤0,2	>0,2-≤0,8	>0,8-≤1,4	>1,4-≤2,0	>2
gesund	0 0 %	0 0 %	1 6,67 %	13 86,67 %	1 6,67 %
Mukositis	0 0 %	0 0 %	3 20 %	12 80 %	0 0 %
Periimplantitis	0 0 %	0 0 %	2 13,33 %	12 80 %	1 6,67 %

Diese 45 positiven Proben verteilten sich wie folgt: In der Gruppe *gesund* wurden 14 von 15 Proben im stark bis sehr stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich gefunden. Bei *Mukositis* wurden 12 von 15 positiven Proben im stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich nachgewiesen. Ebenfalls lagen 13 von 15 Proben bei *Periimplantitis* im Bereich stark bis sehr stark erhöhter Keimkonzentrationen. In allen drei Gruppen wurde keine Probe an Nachweisgrenze der Keimkonzentration detektiert. In Abbildung 28 ist die Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Fn* dargestellt.

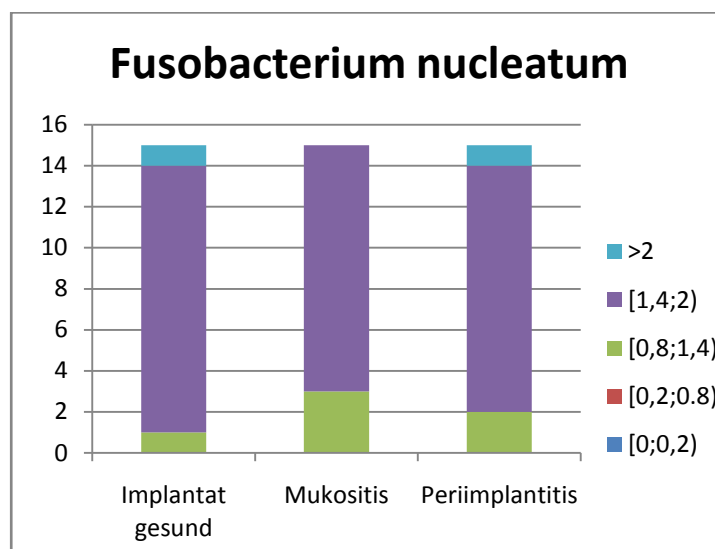


Abb. 28: Darstellung der Verteilung der Nachweiskonzentrationen für *Fn* in drei verschiedenen Patientengruppen mit Real-time PCR.

Abbildung 29 zeigt die relative Bakterienmenge für *Fn* in drei Patientengruppen. In allen drei Patientengruppen wurden jeweils über 75 % der Proben im Bereich stark

erhöhter Keimkonzentrationen detektiert. Ebenso waren 50 % (Median) der Proben in fast identischen Keimkonzentrationsbereichen zu finden: *gesund* 1,85; *Mukositis* 1,85 und *Periimplantitis* 1,83. Keine Probe verzeichnete sich im Bereich an/unter Nachweisgrenze.

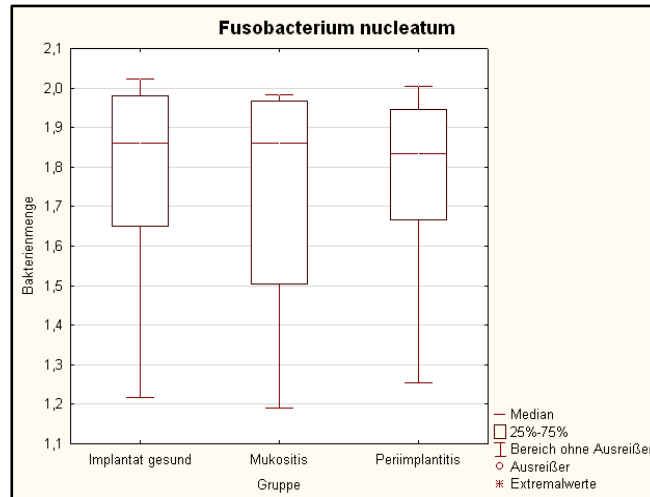


Abb. 29 : Darstellung der relativen Bakterienmenge für *Fn* in drei verschiedenen Patientengruppen mit Real-time PCR.

In Abbildung 30 ist der Mittelwert vorkommender relativer Bakterienmengen von *Fn* in den drei Patientengruppen dargestellt. Für *Fn* war kein signifikanter Zusammenhang vom Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen ( $p=0,87$ ).

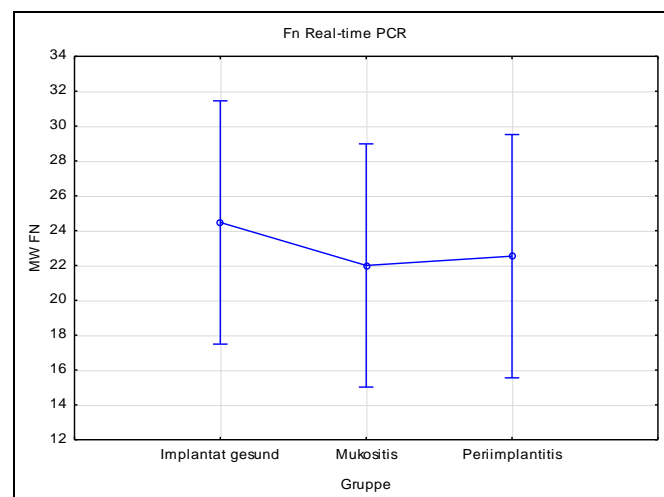


Abb. 30: Darstellung der Mittelwerte vorkommender relativer Bakterienmengen von *Fn* in drei Patientengruppen mit Real-time PCR.

### 5.5.3 Vergleich beider Verfahren

Die Ergebnisse beider Verfahren wurden miteinander verglichen. *Fn* wurde mit PCR in 88,89 % (*gesund* n=14; *Mukositis* n=12; *Periimplantitis* n=14) und mit Real-time PCR in 100 % (*gesund* n=15; *Mukositis* n=15; *Periimplantitis* n=15) aller Proben über der Nachweisgrenze detektiert. Abbildung 31 zeigt die Korrelation der Keimkonzentration der Einzelproben ermittelt über PCR und Real-time PCR für *Fn*. Exakte Übereinstimmungen waren in 28,89 % der Proben (n=13) zu finden. Mit Real-time PCR wurden bei allen anderen Proben höhere Keimkonzentrationen ermittelt. Es verzeichneten sich folgende Abweichungen: Fünf Proben die mit PCR unter Nachweisgrenze detektiert wurden, wurden mit Real-time PCR im Bereich erhöhter bis stark erhöhter Keimkonzentrationen nachgewiesen. 18 Proben die mit PCR im erhöhten Keimkonzentrationsbereich gefunden wurden, wurden mit Real-time PCR bei stark erhöhten Keimkonzentrationen detektiert.

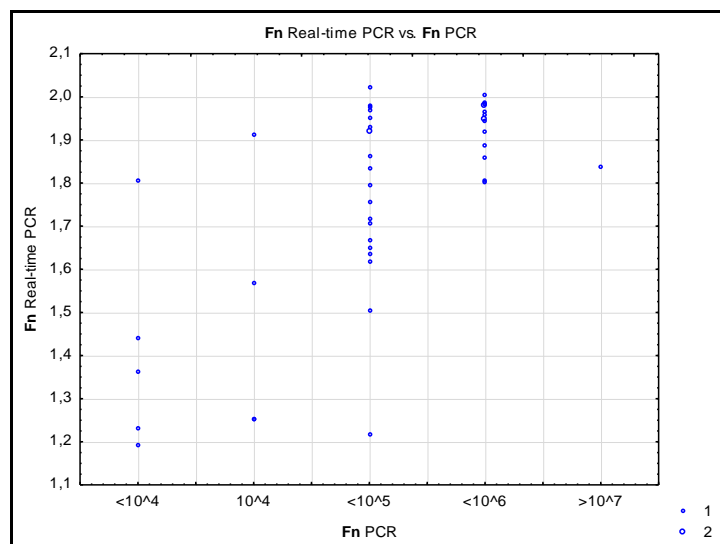


Abb. 31: Darstellung der Ergebnisse der PCR gegenüber den Ergebnissen der Real-time PCR für *Fn*.

Für *Fn* wurde kein signifikanter Zusammenhang der beiden Verfahren festgestellt (p-Wert Kendalls Tau 0,49 bzw. Spearman 0,61).

## 5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

### Aa:

- Sowohl für PCR ( $p=0,56$ ) als auch für Real-time PCR ( $p=0,32$ ) war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen.
- Ein signifikanter Zusammenhang von PCR und Real-time PCR war nicht angezeigt (p-Wert Kendalls Tau 0,38 bzw. Spearman 0,42).

### Pg:

- Sowohl für PCR ( $p=0,20$ ) als auch für Real-time PCR ( $p=0,16$ ) war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen.
- Ein geringer signifikanter Zusammenhang von PCR und Real-time PCR wurde gefunden (p-Wert Kendalls Tau 0,04 bzw. Spearman 0,04).

### Td:

- Sowohl für PCR ( $p=0,31$ ) als auch für Real-time PCR ( $p=0,92$ ) war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen.
- Ein signifikanter Zusammenhang von PCR und Real-time PCR war nicht angezeigt (p-Wert Kendalls Tau 0,49 bzw. Spearman 0,59).

### Tf:

- Sowohl für PCR ( $p=0,71$ ) als auch für Real-time PCR ( $p=0,97$ ) war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen.
- Ein signifikanter Zusammenhang von PCR und Real-time PCR war nicht angezeigt (p-Wert Kendalls Tau 0,65 bzw. Spearman 0,78).

### Fn:

- Sowohl für PCR ( $p=0,41$ ) als auch für Real-time PCR ( $p=0,87$ ) war kein signifikanter Zusammenhang zwischen Vorliegen des Bakteriums und einem Krankheitsbild festzustellen.
- Ein signifikanter Zusammenhang von PCR und Real-time PCR war nicht angezeigt (p-Wert Kendalls Tau 0,49 bzw. Spearman 0,61).



## 6 Diskussion

Im Rahmen dieser Studie wurden 45 Biofilmproben von unterschiedlichen Krankheitszuständen periimplantärer Taschen entnommen. Diese wurden für die qualitative und semiquantitative Bestimmung der fünf parodontalen Markerkeime *Aa*, *Pg*, *Td*, *Tf* und *Fn* verwendet. Dazu wurden zwei Verfahren, die konventionelle PCR und die Real-time PCR, durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei sollte die Hypothese bewiesen werden, dass die konventionelle PCR genügt, um Aufschlüsse über das Krankheitsbild zu erhalten, um dann diese Ergebnisse für diagnostische Zwecke nutzen zu können. Zusätzlich sollte geklärt werden, inwieweit mikrobiologische Tests in der Diagnostik periimplantärer Erkrankungen überhaupt einen Mehrwert für die nachfolgende Therapiewahl bringen.

### 6.1 Methoden

Nachfolgend sollen zunächst Vor- und Nachteile jeder Methode für sich beleuchtet werden und dann Stärken und Schwächen der Studie aufgezeigt werden.

Bei der Durchführung der konventionellen **PCR** besteht das Risiko der Kontamination der Proben mit fremder DNA. Der erste Teil der PCR, die Amplifikation, findet im verschlossenen Thermocycler statt. Beim zweiten Teil der PCR sind die Proben jedoch im Schüttelbad der atmosphärischen Luft ausgesetzt. Hier könnte fremde DNA aus der Luft in die Proben gelangen. So könnte es eher zu falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnissen kommen.

Das Ergebnis der Quantifizierung wird bei der PCR während der Plateauphase abgelesen. Die Amplifikation der PCR wird aufgrund der limitierten Menge an Nucleotiden und benötigten Enzymen gestoppt. So wird die Quantifizierung in der Plateauphase unsicher. Die Quantifizierung wird dann subjektiv visuell über einen Teststreifen abgelesen. Da diese Teststreifen nach einiger Zeit verblassen, sind die Ergebnisse nicht mehr reproduzierbar. Man muss sich dann auf das notierte Ergebnis verlassen.

Im Allgemeinen muss jeder verwendete Primer zu einem anderen Ende des gewünschten Abschnitts im entgegengesetzten Strang der Bakterien-DNA komplementär sein (Müller 2001, Horton et al. 2008, Rassow et al. 2008). Primer sollten eine Länge von 18-30 Basen haben. Längere Primer erhöhen die Spezifität (Mülhardt 2002). Grundsätzlich sollten die Basen Cytosin (C) und Guanin (G) gleichmäßig verteilt sein und nicht im Bereich des 3'-Endes vermehrt vorliegen. Sonst könnte es bei der Denaturierung durch den starken Wasserstoffbrückenverbund zu Schwierigkeiten in der Auftrennung des DNA-Doppelstranges kommen. Der Guanin-Cytosin-Gehalt des Primers sollte zwischen 40-60 % liegen (Mülhardt 2002). Spezi-

fität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit hängen in hohem Maße vom Design der verwendeten Primer ab. Dabei sollten Schmelztemperatur, 3'-Enden, Nukleotidzusammensetzung -bzw. verteilung und Primer/Primerwechselwirkungen beachtet werden. Ein Primer sollte weder stabile Sekundärstrukturen noch Dimere bilden können (Müller 2001, Rassow et al. 2008).

Die bakterienspezifischen Basenlängen der Primer bei der PCR wurden von der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) nicht angegeben. Dieser Test wurde bereits in zahlreichen Studien erfolgreich verwendet (De Boever und De Boever 2006, Haffajee et al. 2009, Ertugrul et al. 2013) und gilt daher als valide.

Die Annealingtemperatur ist die Temperatur, bei der sich die DNA-Amplifikate bilden. Diese hängt von der Basenzusammensetzung und der Länge der Primer ab: je höher der Gehalt der Basen Guanin und Cytosin ist (=diese haben eine höhere Anzahl an Wasserstoffbrücken), desto höher ist die günstigste Annealingtemperatur. Sie liegt meist 5°C unter der berechneten Schmelztemperatur. Diese ist definiert als die Temperatur, bei der 50 % der betrachteten DNA-Moleküle denaturiert sind. Sie liegt in der Regel zwischen 40°C und 70°C. Für die konventionelle PCR lieferte der Hersteller Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) schon das optimierte Protokoll für alle Markerkeime mit 58°C.

Eine PCR umfasst optimal 25-30 Zyklen. Zyklus bedeutet in diesem Fall, wie oft die drei PCR-Schritte Denaturierung Annealing und Elongation durchlaufen werden. Die Herstellerangaben der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) gaben in ihrem Protokoll eine Zyklenanzahl von 30 an. Eine größere Anzahl steigert das Risiko, dass fehlerhafte Nukleotide eingebaut werden (Müller 2001, Horton et al. 2008, Rassow et al. 2008).

Je länger die DNA-Amplifikate im Allgemeinen sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Taq-Polymerase in der Synthese Fehler einbaut. Eine Basenlänge von 5000 ist dabei kritisch anzusehen. Bei einer Länge von 1000 bp liegt die Fehlerquote bereits bei 1 % (Mülhardt 2002). Als optimal sind Zielsequenzen zwischen 60-200 bp anzusehen. Die Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) liefert für die PCR keine bakterienspezifischen Fragmentlängen. Hier wurde für die Fragmente bei *Aa*, *Pg*, *Td* und *Tf* eine Basenlänge von 280 bp angegeben. Von Herstellerseite wurde für *Fn* keine Angabe gemacht.

Magnesiumchlorid ( $MgCl_2$ ) ist ein metabolischer Cofaktor für die meisten Polymerasen. Magnesiumionen alleine beeinflussen die Enzymaktivität und erhöhen die Schmelztemperatur der Doppelstrang-DNA. Zusätzlich bilden sie einen löslichen Komplex mit Nukleotiden, den die Polymerase erkennt (Müller 2001, Rassow et al. 2008). Andererseits muss  $MgCl_2$  auch als kritischer Faktor angesehen werden. Er

hat Einfluss bei der Denaturierung, der Primerdimerbildung sowie der Primeranlagerung (Mülhardt 2002). Die optimale Konzentration liegt bei 0,5 mM - 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Mülhardt 2002). Für die PCR wurde von der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) eine Konzentration von 25 mM empfohlen.

Bei der Durchführung der Real-time PCR entfällt das Risiko der Kontamination der Proben mit fremder DNA. Hier befinden sich die Proben kontinuierlich im geschlossenen Reaktionsraum, dem Thermocycler.

Mit Real-time PCR erfolgt die Quantifizierung in der exponentiellen Phase. Hier liegen optimale Amplifikationsbedingungen vor. Es ist gewährleistet, dass genügend Substrat und Enzym vorliegt (Kainz 2000). Die gewonnene Produktmenge wird direkt nach der PCR ausgesandt und die Kinetik der gesamten Reaktion wird sichtbar. So bietet die Real-time PCR sehr genaue Ergebnisse. Die Ergebnisse sind reproduzierbar und können jederzeit im PC abgerufen werden. Zusätzlich kann über eine sogenannte Schmelzkurvenanalyse sofort analysiert werden, ob sich eventuell unerwünschte Nebenprodukte gebildet haben (Ginzinger 2002).

Die in dieser Studie verwendeten Primer für Real-time PCR wurden nicht selbst entwickelt. Im ersten Schritt wurden bereits erfolgreich verwendete Primer anderer Studien über eine Literaturrecherche auffindig gemacht (Ashimoto et al. 1996, Fouad et al. 2002, Braga et al. 2010, Firma Immundiagnostik (Bensheim, Deutschland)). Diese wurden dann in Vorversuchen auf ihre Funktionalität gegenüber den Biofilmpollen aus dem periimplantären Gewebe getestet. Voraussetzung war, dass die DNA-Lösung und die verwendeten Materialien frei von PCR-hemmenden Produkten waren. Ein getesteter Primer für *Pg* (Ashimoto et al. 1996) lieferte zum einen positive Werte in der Negativkontrolle Wasser (NTC) und ebenfalls andere DNA-Produkte in den Proben beim Nachweis über Agarosegelelektrophorese. Erste Überlegungen waren, dass das verwendete Wasser verunreinigt war. So wurden Standardreihenversuche mit Ampuwa (Fresenius Bad Homburg, Deutschland), aqua dest. und RNase free water (Qiagen Hilden, Deutschland) durchgeführt. Doch diese erbrachten keine verwendbaren Ergebnisse. Für *Tf* (Ashimoto et al. 1996) und *Fn* (Firma Immundiagnostik Bensheim, Deutschland) zeigten die getesteten Primer keine DNA-Amplifikate, obwohl diese bereits erfolgreich in anderen Studien Verwendung fanden. Ein Primer für *Fn* (Fouad et al. 2002), der bereits bei der Detektion endodontischer Infektionen zum Einsatz kam, lieferte ebenfalls keine DNA-Amplifikate. Bei einem weiteren Primer für *Fn* (Braga et al. 2010) konnte in der Schmelzkurve ein Signal geringerer Stärke bei der Negativkontrolle mit Wasser (NTC) und später auch in der Agarosegelelektrophorese gefunden werden. Hier war aber kein zweites Produkt entstanden. Es handelte sich lediglich um ein Produkt mit

anderer Basenlänge. So konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um ein Primerdimer innerhalb des Wassers handelte. Dieses Produkt trat in keiner der anderen detektierten Biofilmproben auf. So konnte dieser Primer für *Fn* für diese Studie genutzt werden. Der Primer für *Fn* wurde bereits in der Studie von Braga et al. 2010 erfolgreich eingesetzt. So war es verwundernswert, dass sich bei dieser Studie mit dem Primer für *Fn* Primerdimere bildeten und bei der Studie von Braga et al. (2010) nicht. Für die in dieser Studie ausgewiesenen Primer bei Real-time PCR für *Aa* und *Pg* war eine Basenlänge von 20 ausgeschrieben, für *Td* 25 bzw. 27 Basen (Ashimoto et al. 1996) und für *Fn* 23 Basen (Braga et al. 2010). Da der verwendete Primer für *Tf* aus einem fertigen Kit der Firma Immundiagnostik (Bensheim, Deutschland) stammte, war diese Basenlänge unbekannt. Die Primerlängen liegen damit im optimalen Bereich, der mit 18-30 Basen ausgeschrieben ist (Mülhardt 2002).

Für die Real-time PCR war primerspezifisch die aufwendige Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur notwendig. Dafür wurden vor der definitiven DNA-Amplifikation Standardreihenversuche mit verschiedenen Annealingtemperaturen durchgeführt. Für jedes Primerpaar mussten die Bedingungen optimiert werden. Würde die geeignete Annealingtemperatur unterschritten werden, käme es bei der Hybridisierung zu Basenfehlpaarungen und folglich zu unerwünschten Nebenprodukten. Bei Überschreitung würde die gewonnene DNA-Menge zu gering ausfallen (Müller 2001, Rassow et al. 2008). In dieser Studie wurde für Real-time PCR eine optimale Annealingtemperatur für *Aa* bei 58°C festgelegt. Für *Pg*, *Td*, *Tf* und *Fn* lag diese bei 60°C. Diese wurde auch durch das verwendete Protokoll der von Ashimoto et al. (1996) durchgeführten Studie bestätigt.

Bei der Real-time PCR wird eine Zyklenanzahl von bis zu 50 empfohlen. Die erforderliche Sensitivität kann nur durch diese große Anzahl der PCR-Zyklen erreicht werden (Müller 2001, Horton et al. 2008, Rassow et al. 2008). In dieser Studie wurde eine Real-time PCR über 45 Zyklen durchgeführt. Bei anderen Studien erbrachte eine niedriger gewählte Zyklenanzahl ebenfalls positive Ergebnisse (Lyons et al. 2000, Lau et al. 2004).

Die Längen der Amplifikate lagen für *Aa* bei 197 bp, für *Pg* bei 191 bp, für *Td* bei 316 bp, für *Tf* bei 120 bp und für *Fn* bei 101 bp. Alle fünf Fragmentgrößen lieferten dabei günstige bis akzeptable Bedingungen für die Taq-Polymerase.

Der Cofaktor  $MgCl_2$  wurde bei der Real-time PCR in einer Konzentration von 6mM verwendet. Dies war bei dem verwendeten SYBRgreen Supermix der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) vorgegeben. Die durchaus hohe Konzentration könnte eine Erklärung für die Primerdimerbildung bei *Fn* sein. Bei der noch höheren Kon-

zentration mit PCR (25 mM) gab es diese jedoch nicht. Braga et al. (2010) verwendete für Real-time PCR ebenfalls 6 mM MgCl<sub>2</sub> mit SYBRgreen Supermix. Hier kam es aber nicht zur Primerdimerbildung.

Das Prinzip einer Real-time PCR basiert auf dem Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen. Dies muss als kritisch betrachtet werden. In dieser Studie wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBRgreen der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) verwendet. Er ist in der Lage, an jeden gebildeten Doppelstrang der DNA zu binden. So zeigen nicht nur die DNA-Amplifikate der Bakterien Fluoreszenzsignale, sondern auch unerwünschte DNA-Produkte. Eventuell sind diese nach Primerdimerisierung entstanden. Um dies auszuschließen, wurden, wie bereits beschrieben, Vorversuche zur Auswahl der richtigen Primer durchgeführt. Bereits in der Schmelzkurvenanalyse wurden unerwünschte Nebenprodukte identifiziert. Nach Durchführung der Real-time PCR mit den Patientenproben wurde zusätzlich eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt, um unerwünschte DNA-Produkte zu registrieren.

Jeder Real-time PCR-Versuch ergibt eine individuelle Effizienz. Eine optimale Effizienz liegt vor, wenn die Real-time PCR-Produkte mit jedem Zyklus verdoppelt werden können. Liegt diese unter 100 % kann es auf Pipettierfehler, ein suboptimales Primerdesign und schlechte Reaktionsbedingungen zurück zu führen sein. Dennoch hat die Effizienz einen geringen Einfluss auf die Genauigkeit der Ergebnisse. Sie beeinflusst vielmehr die Sensitivität (Wilhelm 2003). Mit geringerer Effizienz müssen mehr Zyklen ablaufen, um die gewünschte Sequenz zu amplifizieren. Dabei kann es aber zur Amplifikation unerwünschter Nebenprodukte kommen. Die Amplifikation der gewünschten Zielsequenz könnte somit gehemmt werden und einen negativen Einfluss auf das Ergebnis haben. Bei unseren Versuchen lagen die Effizienzen für die Durchführung der Real-time PCR mit *Aa* bei 82,5 % und 91,5 %, mit *Pg* bei 76,6 % und 80,6 %, mit *Td* bei 81,2 % und 107,5 %, mit *Tf* bei 65,1 % und 83,6 % und mit *Fn* bei 95,2 % und 119,2 %. Die Effizienzen von *Pg* und *Tf* lagen somit nicht im optimalen Bereich.

Vergleicht man nun beide Verfahren – PCR und Real-time PCR- miteinander, so lässt sich folgendes feststellen. Die PCR bietet für den Behandler eine gute Möglichkeit mit relativ geringem Aufwand parodontale Markerkeime zu detektieren. Ein entscheidender Vorteil gegenüber der Real-time PCR ist der Zeitgewinn. Bei der PCR können gleichzeitig alle ausgewählten Bakterien bestimmt werden. Dazu wird von der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) ein einziger fertiger Primeroligonukleotidmix für alle Bakterien bereitgestellt und die DNA der ausgewählten Bakterien wird über ein- und dasselbe Protokoll amplifiziert. Hier muss nicht, wie bei der Real-time PCR, für jedes Bakterium primerspezifisch ein neuer Ansatz pipettiert

und amplifiziert werden. Nachteilig ist dennoch, dass die PCR (Micro-Ident-Test) der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) bisher nur die semiquantitative Bestimmung von bis zu elf Markerkeimen zulässt. In der Mundhöhle befinden sich aber ca. 500 verschiedene Keimspezies (Moore und Moore 1994). Davon könnten eventuell einzelne Bakterien eine wichtige bisher ungeklärte Rolle bei periimplantären Erkrankungen einnehmen. Dem gegenüber bietet die Real-time PCR als Methode für wissenschaftliche Studien einen großen Vorteil. Sie ist zwar sehr kostenintensiv, dennoch kann gleichzeitig eine große Anzahl von Proben analysiert werden. Zudem gibt es die Möglichkeit für jedes Bakterium einen individuellen Primer herzustellen. So lassen sich auch Subtypen der Bakterien bestimmen. Möchte man einzelne Proben mit der Real-time PCR für die Praxis bestimmen, so geht dies mit einem hohen Arbeits- und Materialaufwand einher und stellt somit keinen wirtschaftlichen Vorteil dar. Zusammenfassend bedeutet dies, die konventionelle PCR ist für die Anwendung im Praxisalltag bevorzugt zu empfehlen, während sich die Real-time PCR für Forschungszwecke sehr gut eignet.

Im Folgenden sollen nun die Stärken und Schwächen dieser Studie dargelegt werden.

Eine Schwäche der Studie könnte die Auswahl der Proben darstellen. Für diese Untersuchung wurden Biofilmproben aus einer klinischen Studie von einem Pool mit 88 Patienten und insgesamt 237 Biofilmproben herangezogen. Das Ziel war, Proben zu untersuchen, die patientenunabhängig waren, d.h. jede Probe sollte von einem anderen Patienten stammen. Dies war aufgrund der begrenzten Anzahl an Proben nicht möglich, sodass in der Gruppe *Periimplantitis* auch Proben von Patienten derselben Mundhöhle stammten. Bei einer Studie von Shibli et al. (2008) wurden 44 Biofilmproben des periimplantären Gewebes untersucht, die jeweils einem anderen Patienten zugeordnet werden konnten. Eine weitere Schwäche der hier durchgeführten Studie liegt in der geringen Anzahl an Patientenproben. Insgesamt wurden 45 Proben untersucht. Davon wurden je 15 Proben einem Krankheitsbild zugeordnet. Vergleicht man direkt die Ergebnisse der Proben mit beiden Verfahren, so spielt die Anzahl der Proben keine Rolle. Möchte man aber eine aussagekräftige Prävalenz und Bakterienmenge bestimmen, könnten 45 Proben zu wenig sein. In einer anderen Studie wurden zur quantitativen Bestimmung mit Real-time PCR von *Pg* bei periimplantären Erkrankungen 97 Patientenproben herangezogen (Galassi et al. 2012). In einer weiteren Studie wurden bei der Detektion von parodontopathogenen Bakterien nur 19 Patientenproben untersucht (De Leitão et al. 2005). Bei der Auswahl der Proben war nicht klar, wie lange sich die Implantate bei Probenentnahme schon in der Mundhöhle befanden oder ob eine parodontale Vorgeschichte vorlag.

Bei Shibli et al. (2008) wurden nur Biofilmprouben von periimplantärem Gewebe, deren Implantate mindestens zwei Jahre in situ waren, analysiert.

Einen weiteren Schwachpunkt der Studie stellt die Primerauswahl und die damit verbundenen Subtypen dar. Die konventionelle PCR wurde mit den von der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) mitgelieferten Primern durchgeführt. Länge und Design dieser Primer waren unbekannt. Bei der Real-time PCR wurden in vollem Umfang andere Primer verwendet. Diese wurden über Literaturrecherche auffindig gemacht und in aufwendigen Vorversuchen getestet und als funktionsfähig befunden. Zu jedem Bakterium gibt es Subtypen, die auf unterschiedliche Primerdesigns ansprechen. Es könnte also bei Verwendung unterschiedlicher Primer zu anderen Ergebnissen in der quantitativen Bestimmung der Bakterien kommen. Dies lässt eventuell auch die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Korrelation beider Verfahren erklären. Die Lösung, um dies zu verhindern, wäre eine arbitrarily primed PCR (AP-PCR) (Jessing et al. 2003, Alves et al. 2006, Ito 2006). Auf diesem Wege ließe sich der genaue Genotyp eines Bakteriums identifizieren. Basierend darauf könnte ein geeigneter Primer designt werden. Dies war aber für die einfache mikrobielle Aufschlüsselung von Biofilmprouben zu aufwendig und nicht Sinn dieser Studie. Hier sollten Tendenzen als Übereinstimmungen genügen.

Ein Auswertungsteil umfasste die Gegenüberstellung der Ergebnisse der Proben mit beiden Verfahren. Hier wurden, wie oben erwähnt, übereinstimmende Tendenzen in der Keimkonzentration als Übereinstimmungen geltend gemacht. Die PCR funktioniert vom Hersteller nach einem Teststreifen über eine relative Quantifizierung. Ab einer Keimkonzentration von  $10^3$  für *Aa* bzw.  $10^4$  für *Pg*, *Td*, *Tf* und *Fn* werden positive Erregernachweise geliefert. Stufenweise je nach Stärke des Farbumschlags auf dem Teststreifen werden die Keimkonzentrationen subjektiv bestimmt – bei *Aa* bis  $>10^6$  und für *Pg*, *Td*, *Tf* und *Fn* bis  $>10^7$ . Für eine vergleichende Einstufung bzw. Abstufung der Keimkonzentrationen bei der Real-time PCR wurde über einen Referenzpool eine 100 %-Marke festgelegt. Dieser Pool enthielt alle 45 Patientenproben und lieferte demnach bei der Durchführung der Real-time PCR den höchsten Wert. Über eine mathematische Formel wurden absolute Werte berechnet (von 0 bis 2). Entsprechend der PCR wurden Abstufungen für die Keimkonzentrationen vorgenommen. So erfolgte eine Einteilung nach Keimkonzentration unter Nachweisgrenze ( $0 \leq 0,2$ ), an Nachweisgrenze ( $>0,2 \leq 0,8$ ), erhöhte Keimkonzentration ( $>0,8 \leq 1,4$ ) stark erhöhte Keimkonzentration ( $>1,4 \leq 2$ ) und sehr stark erhöhte Keimkonzentration ( $>2$ ). Bei der direkten Gegenüberstellung der Ergebnisse der Proben mit beiden Verfahren ließen sich also nur Tendenzen als Übereinstimmungen festlegen.

Eine Stärke der Studie liegt in der unterschiedlichen Probenherkunft. Dies bedeutet, dass es sich, bis auf wenige Ausnahmen für *Periimplantitis*, um jeweils Proben unterschiedlicher Patienten handelte. So konnte gewährleistet werden, dass es zu definitiv voneinander unabhängigen relativen Bakterienmengen kam.

Ebenso positiv zu bewerten ist, dass hier absolut gleiche Proben für beide Verfahren genutzt wurden. Es wurden keine Proben eingesetzt, die lediglich aus klinischen Aspekten einem Krankheitsbild zugeordnet wurden.

Schon im Vorfeld entschied man sich jede Probe in einer Dreifachbestimmung zu analysieren. So konnten Pipettierfehler erkannt und eindeutige Ergebnisse gewährleistet werden. Ähnliche Studien zur quantitativen Bestimmung von Parodontopathogenen liefern dazu keine Angaben (Riggio et al. 1996, Verner et al. 2006).

Das komplette Augenmerk konnte hier auf die Bakteriendetektion gelegt werden. So wurden weitere Cofaktoren wie exogene und endogene Einflüsse (Rauchen, Vorerkrankungen, etc.) nicht mit in das Auswertungsprofil einbezogen. Ebenso wurden die Biofilmpollen nicht in bestimmten zeitlichen Abständen entnommen (Eick et al. 2011).

## 6.2 Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Studie kritisch beleuchtet werden. Dabei sollen die Keimkonzentrationen jedes Bakteriums betrachtet und dabei geklärt werden, ob ein signifikanter Zusammenhang zwischen Bakterium und Krankheitsbild vorliegt. Zusätzlich soll die Hypothese aufgegriffen werden, dass die konventionelle PCR bei periimplantären Erkrankungen genügt, um aussagekräftige Ergebnisse über ein Krankheitsbild zu erhalten.

*Aa* wurde mit beiden Verfahren nur in einer geringen Anzahl von Proben positiv detektiert (PCR 20 % und Real-time PCR 22,22 % aller Proben über Nachweisgrenze). Dabei lag kein signifikanter Zusammenhang zu einem Krankheitsbild vor (PCR  $p=0,56$ ; Real-time PCR  $p=0,32$ ). *Aa* wurde ebenso häufig bei gesunden Implantaten, wie bei *Mukositis* und *Periimplantitis* positiv detektiert. *Mukositis* und *Periimplantitis* zeigten dabei minimal höhere Keimkonzentrationen. In einer anderen Studie (Casado et al. 2011) wurden 30 Patienten mit periimplantären Erkrankungen untersucht. Neben klinischen Parametern wurden auch Biofilmpollen analysiert. Wie auch in der hier vorliegenden Studie wurden diese Patienten nach ihrem Krankheitsbild zugeordnet. Sie wurden ebenfalls eingeteilt in die Gruppen gesund, *Mukositis* und *Periimplantitis*. Dabei konnte bestätigt werden, dass für *Aa* (ebenso auch für *Pg*, *Td* und *Tf*) kein signifikanter Zusammenhang mit der Diagnose vorlag. Zu ähnlichen Ergebnissen kam man in der Studie von Cortelli et al. (2013). Hier fand



man auch, ähnlich wie bei dieser Studie, zwar Unterschiede im Bakterienkonzentrationsvorkommen zwischen der Gruppe gesund und Periimplantitis, aber fast keine zwischen Mukositis und Periimplantitis. Ito et al. (2013) detektierten parodontale Bakterien vor Implantatinsertion. *Aa* konnte hier ebenfalls bei gesunden und parodontal vorerkrankten Patienten gefunden werden. Dem gegenüber zeigten sich aber in einer anderen Studie verstärkt hohe Keimkonzentrationen bei Periimplantitis. Eine Assoziation von *Aa* mit anderen Keimen lag aber ebenfalls nicht vor (Persson und Renvert 2013).

*Pg* wurde mit PCR in 66,66 % und mit Real-time PCR in 37,78 % aller Proben positiv detektiert. Vor allem bei *Mukositis* und *Periimplantitis* zeigten sich in dieser Studie mit PCR und Real-time PCR Keimkonzentrationen im stark bis sehr stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich. Zu ähnlichen Ergebnissen kam Eick und Pfister (2002) mit der PCR bei parodontalen Biofilmpollen. Hier wurde zusätzlich ein Zusammenhang zwischen Keimkonzentration und Taschentiefe festgestellt. In der hier durchgeführten Studie verzeichneten sich Unterschiede im quantitativen Vorkommen des Bakteriums innerhalb der drei Patientengruppen. Dennoch konnte kein signifikanter Zusammenhang des Bakteriums auf das Krankheitsbild festgestellt werden (PCR  $p=0,20$ ; Real-time PCR  $p=0,16$ ). Wie bei Galassi et al. (2012) zeigte sich *Pg* ebenfalls nicht signifikant als spezifisches Bakterium für *Periimplantitis*. Bei einer Detektion der Bakterien innerhalb der Cist-Level war bei periimplantären Erkrankungen für *Pg* und *Td* kein Einfluss des Bakteriums auf das Fortschreiten des Knochenabbaus zu erkennen (Sato et al. 2011).

*Td* wurde mit PCR in 33,33 % und bei Real-time PCR in 55,55 % aller Proben positiv detektiert. Dabei verzeichnete sich bei PCR ein Trend der Keimkonzentrationen innerhalb der drei Gruppen. Stark bis sehr stark erhöhte Keimkonzentrationen gab es eher bei *Mukositis* und *Periimplantitis*. Eine signifikante Korrelation zwischen Taschentiefe und dem Vorkommen von *Td* bestätigte die Studie von Yoshida et al. (2004). *Td* (*Aa*, *Pg*, *Tf*) geht mit einer progressiven Entzündung und weniger mit einer patientenbezogenen schlechten Wirtsantwort einher (Hultin et al. 2002). Damit aber nicht konform sind die Ergebnisse für Real-time PCR. Hier fand man in allen drei Gruppen stark bis sehr stark erhöhte Keimkonzentrationen. Dennoch zeigte sich aber kein signifikanter Zusammenhang zwischen Bakterium und Diagnose (PCR  $p=0,31$ ; Real-time PCR  $p=0,92$ ). Zu diesem Ergebnis kamen auch andere Studien (Casado et al. 2011, Sato et al. 2011, Ata-Ali et al. 2013).

*Tf* wurde mit PCR in 44,44 % und mit Real-time PCR in 53,33 % aller Proben positiv detektiert. Mit beiden Verfahren gab es dabei keinen signifikanten Unterschied in der Keimkonzentrationsverteilung innerhalb der drei Gruppen. Das heißt, in allen

drei Gruppen wurden alle Keimkonzentrationen zu tendenziell gleichen Anteilen gefunden. In einer anderen Studie (Lau et al. 2004) wurden 92 Patienten ebenfalls in Gruppen eingeteilt. Dabei wurden aber Gruppen nach der Diagnose gesund, Gingivitis und Parodontitis gebildet. Bei der mikrobiellen Untersuchung der Biofilmprouben zeigte sich hier aber ein qualitativer Unterschied bezüglich des Nachweises von *Tf* mit Real-time PCR innerhalb der drei Gruppen (gesund < Gingivitis < Parodontitis). *Tf* konnte mit Real-time PCR sogar in 100 % der Proben von Parodontitisträgern nachgewiesen werden. In der hier durchgeführten Studie zeigte sich kein signifikanter Einfluss des Bakteriums auf das Krankheitsbild (PCR  $p=0,71$ ; Real-time PCR  $p=0,97$ ). Dieses Ergebnis wird in anderen Studien bestätigt (Casado et al. 2011, Ata-Ali et al. 2013). In einer aktuellen Untersuchung konnte jedoch ein Zusammenhang von *Tf* für Periimplantitis festgestellt werden (Persson und Renvert 2013).

*Fn* wurde mit PCR in 88,89 % und mit Real-time PCR in 100 % aller Proben positiv detektiert. In allen drei Gruppen gab es keine merklichen Unterschiede in der Keimkonzentrationsverteilung untereinander, d.h., es wurde in allen drei Gruppen Keimkonzentrationen zu tendenziell gleichen Anteilen gefunden. Aber mit dem großen Unterschied, dass es bei Real-time PCR ausschließlich Proben im stark bis sehr stark erhöhten Keimkonzentrationsbereich gab. Bei der PCR wurden alle Keimkonzentrationen gefunden. Nun stellte sich die Frage, warum es hier so große Abweichungen gab. Bei unseren Versuchen lagen die Effizienzen für die Durchführung mit *Fn* bei Real-time PCR mit 95,2 % und 119,2 % im optimalen Bereich, sodass der Einfluss von bereits in Kapitel 6.1 beschriebenen negativen Faktoren keine Rolle spielte. Die Gründe für die hohe Prävalenz und Bakterienmenge bei *Fn* sind eher in der Charakteristik des Bakteriums zu suchen. Es wird als wichtiges Bakterium in der Ausbildung mikrobieller Gemeinschaften angesehen (Kolenbrander et al. 1995). *Fn* ist zwar nicht stark pathogen, aber es ist ein Brückenbildner zwischen Früh- und Spätbesiedler. Folglich werden Voraussetzungen geschaffen, dass spätere Pathogene gut invadieren können und *Fn* so indirekt die Gewebedestruktion fördert (Bolsstad et al. 1996). Es ist nicht verwunderlich, dass *Fn* auch schon bei gesunden Implantattaschen vorzufinden ist. In einer anderen mikrobiellen Untersuchung (Koyanagi et al. 2013) zeigte sich *Fn* bei Periimplantitis und Parodontitis mit den Verfahren Real-time PCR und 16sRNA-Genklonbibliothek als sehr dominantes Bakterium. Die Prävalenz war aber bei Periimplantitis noch höher. Für *Fn* konnte in der hier durchgeführten Untersuchung kein Zusammenhang zum Krankheitsbild festgestellt werden (PCR  $p=0,41$ ; Real-time PCR  $p=0,87$ ).

Gründe für die unterschiedlichen Prävalenzen und Bakterienmengen in verschiedenen Studien könnten folgende sein: Die Biofilmproubenentnahme könnte unterschied-

lich durchgeführt worden sein und somit andere Ergebnisse liefern. Die Patienten könnten diverse unbekannte exogene und endogene Faktoren mit sich gebracht haben, die einen Einfluss auf die Etablierung parodontopathogener Keime gehabt haben könnte. Zudem könnten unterschiedliche Serotypen der Keime detektiert worden sein (Primerdesign). Ebenfalls zu berücksichtigen sind geographische Unterschiede (Lau et al. 2004). Parodontopathogene des subgingivalen oder periimplantären Biofilms wurden schon in zahlreichen Studien bestimmt und sind bekannt (Moore und Moore 1994, Ashimoto et al. 1996, Quirynen et al. 2005, Casado et al. 2011). Die herausragende Erkenntnis aus dieser Studie liegt darin, dass es für alle fünf zu untersuchenden Bakterien keine Relevanz hatte, ob es sich um gesundes periimplantäres Gewebe, Mukositis -oder Periimplantitisträger handelte. In jeder Patientengruppe wurden erhöhte Keimkonzentrationen festgestellt. So ist davon auszugehen, dass ein mikrobiologischer Test für Behandler und Patient in der Aufschlüsselung der mikrobiellen Flora keinen Mehrwert erlangt. Auch wenn die PCR vor einigen Jahren als die zukunftsträchtigste Methode für die parodontologische Diagnostik angesehen wurde (Sanz et al. 2004), zeigt sich heute, dass mikrobiologische Tests bei periimplantären Erkrankungen keinen Vorzug verzeichnen. Auf diesem Wege kann so keine alleinige Diagnose gestellt werden, um daraus die Konsequenz für die richtige Therapie zu erhalten, z.B. mit Antibiotika.

Im zweiten Schritt wurden die Ergebnisse beider Verfahren direkt miteinander verglichen, um zu analysieren, wie hoch die Korrelationen wirklich waren. Dabei sollte geklärt werden, mit welchem Verfahren höhere Keimkonzentrationen detektiert werden können. Möglicherweise könnte kein Unterschied in der Auswahl des angewendeten Verfahrens bestehen. Es zeigten sich für *Aa* 84,44 % exakte Übereinstimmungen der Keimkonzentrationen. Für *Pg* lagen diese bei 33,33 %, für *Td* bei 51,11 %, für *Tf* bei 55,56 % und für *Fn* bei 28,89 %. Mit Real-time PCR wurden bei allen fünf Bakterien tendenziell höhere Keimkonzentrationen ermittelt. Über Kendalls Tau -und Spearman Test wurde der signifikante Zusammenhang der beiden Verfahren (bakterienspezifisch) bestimmt. Bei *Aa* (0,38; 0,42), *Td* (0,49; 0,59), *Tf* (0,65; 0,78) und *Fn* (0,49; 0,61) bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Verfahren. Für *Pg* wurde aber ein geringer Zusammenhang beider Verfahren bestätigt (0,04; 0,04). Bei PCR und Real-time PCR wurden verschiedene Primer verwendet. So könnte es sein, dass es zur Ausbildung von Subtypen kam, die im Endeffekt dann zu anderen Prävalenzen führten. Studienbezogen könnte dies wiederum an der Kalibrierung liegen. Wie schon unter 6.1 beschrieben, stellten die Einteilungen der verschiedenen Keimkonzentrationen beider Verfahren nur tendenzielle Vergleichsmöglichkeiten dar. Bei Eick et al. (2011) war bei allen fünf Bakterien ein

deutlicher Zusammenhang zwischen beiden Verfahren zu verzeichnen. Die Sensitivität erstreckte sich dabei, mit Real-time PCR als Referenz, auf Werte zwischen 83,5 % (*Aa*) und 97,9 % für (*Fn*) und auf eine Spezifität von 76,2 % (*Aa*) und 18,9 % (*Fn*). Weitere Studien zum direkten Vergleich von PCR und Real-time PCR bei parodontalen oder periimplantären Erkrankungen liegen zum momentanen Zeitpunkt nicht vor. Es gibt aber zahlreiche Studien, die PCR oder Real-time PCR mit der Kultivierung oder Checkerboard-DNA-DNA-Hybridisierung vergleichen. Die PCR wurde dabei als die überlegenere Methode angeführt (Riggio et al. 1996, Eick und Pfister 2002, Haffajee et al. 2009). Bei einer Metaanalyse wurde bei der Detektion von *Aa* und *Pg* die Real-time PCR gegenüber der Kultivierung als die exaktere Methode bestimmt (Atieh 2008). Dem gegenüber verzeichnete eine andere Studie gute Übereinstimmungen zwischen Real-time PCR und Kultivierung (Lau et al. 2004). Je nachdem, welches Ziel man verfolgt, sollte das jeweilige Verfahren gewählt werden. Für eine schnelle Quantifizierung parodontopathogener Bakterien liefert die Real-time PCR sehr gute Ergebnisse. Stellt das Ziel aber ein Antibiogramm dar oder die Bestimmung der Keimaktivität, so findet die Kultivierung Anwendung (Verner et al. 2006).

In der hier durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass sich bei der quantitativen und qualitativen Bestimmung von Parodontopathogenen bei periimplantären Erkrankungen mit PCR und Real-time PCR ähnliche Ergebnisse darstellen. Hier zeigt keine Methode bessere Ergebnisse, die für die Diagnostik eine wesentliche Rolle spielen könnten. So kann die Hypothese dieser Studie bestätigt werden, dass die konventionelle PCR bei periimplantären Erkrankungen ausreicht, um aussagekräftige mikrobiologische Ergebnisse in Qualität und Quantität der untersuchten Bakterien zu erhalten. Bezüglich der Nebenfragestellungen dieser Studie, kann festgehalten werden, dass es bei keinem der fünf detektierten Bakterien einen Einfluss hatte, um welches Krankheitsbild es sich handelte. Bei jedem Bakterium wurden nicht nur in den Gruppen *Mukositis* und *Periimplantitis* pathologische Keimkonzentrationen gefunden, sondern ebenso in der Gruppe *gesund*. Es zeigten sich nur bakterienspezifisch Unterschiede. Bei *Fn* wurde z.B. insgesamt die höchste Anzahl an Biofilmproben zu pathologischen Keimkonzentrationen gefunden, gefolgt von *Pg*, *Td* und *Tf*. Bei *Aa* wurden nur wenige Proben zu pathologischen Keimkonzentrationen gefunden. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Shibli et al. (2008) bei der Detektion von Parodontopathogenen bei periimplantären Erkrankungen. Auch hier wurden für *Aa* nur geringe Keimkonzentrationen ermittelt. Die Bakterien des roten Komplexes (*Pg*, *Td*, *Tf*) sowie *Fn* verzeichneten dabei höhere Keimkonzentrationen.

### 6.3 Schlussfolgerung

In dieser Untersuchung wurden mit Real-time PCR und der konventionellen PCR für alle Proben tendenziell ähnliche Ergebnisse erzielt. Man fand aber heraus, dass für die fünf Markerkeime *Aa*, *Pg*, *Td*, *Tf* und *Fn* kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Bakterium und der Diagnose vorlag. Es wurden für jedes Krankheitsbild Parodontopathogene in erhöhten Konzentrationen gefunden. Somit kann die Sinnhaftigkeit molekularbiologischer Methoden zum Zwecke der mikrobiologischen Diagnostik bei periimplantären Erkrankungen in Frage gestellt werden. Zudem konnte aufgezeigt werden, dass mikrobiologische Tests (egal ob PCR oder Real-time PCR Verwendung finden) keinen Mehrwert in der Diagnostik erreichen. Viel wichtiger und aussagekräftiger ist die klinische Diagnostik. Möchte man dennoch eine mikrobiologische Aufschlüsselung des Keimfeldes erhalten, so ist die Verwendung konventioneller kommerzieller Tests mittels PCR ausreichend. Dieser ist zwar nur fähig, semiquantitative Bestimmungen durchzuführen, er genügt aber zur Darstellung der mikrobiellen Flora.

## 7 Zusammenfassung

Durch die fortwährend steigende Anzahl von Implantationen rückt das Thema periimplantärer Erkrankungen immer mehr in den Vordergrund. Mit der Einführung mikrobiologischer Tests bei parodontalen Erkrankungen erhoffte man sich einen diagnostischen Mehrwert. In der hier vorliegenden Studie sollten periimplantäre Biofilmpollen mit zwei mikrobiologischen Verfahren – der konventionellen PCR und der Real-time PCR- untersucht und verglichen werden. Es sollte die Hypothese bewiesen werden, dass die konventionelle PCR genügt, um eine adäquate quantitative und qualitative Aufschlüsselung der mikrobiellen Flora bei periimplantären Erkrankungen zu erhalten, um diese für diagnostische Zwecke nutzen zu können. Zusätzlich sollte die Sinnhaftigkeit mikrobiologischer Tests geklärt werden.

Es wurden 45 periimplantäre Biofilmpollen nach Diagnosestellung in drei Gruppen zu jeweils 15 Proben eingeteilt: *gesund*, *Mukositis* und *Periimplantitis*. Diese wurden auf die fünf Markerkeime *Aa*, *Pg*, *Td*, *Tf* und *Fn* – zum einen mit PCR und zum anderen mit Real-time PCR untersucht. Die PCR basierte auf dem kommerziellen Test Micro-Ident der Firma Hain Lifescience (Nehren, Deutschland). Die semiquantitative Bestimmung der Bakterien wurde dabei subjektiv visuell über einen Teststreifen nach der erfolgten PCR durchgeführt. Bei der Real-time PCR wurden die Bakterien semiquantitativ in Echtzeit mittels des Fluoreszenzfarbstoffs SYBRgreen-System detektiert. Dabei erfolgte die Auswahl der Primer bakterienspezifisch über eine Literaturrecherche und speziell durchgeführte Vorversuche.

Mit beiden Verfahren war kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Bakterium und dem Krankheitsbild festzustellen. Es wurden folgende p-Werte ermittelt: *Aa* (PCR 0,56; Real-time PCR 0,32), *Pg* (PCR 0,20; Real-time PCR 0,16), *Td* (PCR 0,31; Real-time PCR 0,92), *Tf* (PCR 0,71; Real-time PCR 0,97), *Fn* (PCR 0,41; Real-time PCR 0,87). Beim direkten Vergleich der Ergebnisse beider Verfahren verzeichnete *Aa* in 86,66 %, *Pg* in 33,33 %, *Td* in 51,11 %, *Tf* in 55,56 % und *Fn* in 28,89 % exakte Übereinstimmungen. Mit Real-time PCR wurden tendenziell höhere Keimkonzentrationen erreicht. Nur bei *Pg* konnte ein (geringer) signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Verfahren festgestellt werden (*Aa* 0,42; *Pg* 0,04; *Td* 0,59; *Tf* 0,78; *Fn* 0,61).

Beide Verfahren kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Stark bis sehr stark erhöhte Keimkonzentrationen fand man nicht nur bei Mukositis -und Periimplantitisträgern, sondern auch im gesunden periimplantären Gewebe. Da kein Zusammenhang zwischen Bakterium und Krankheitsbild vorlag, kann davon ausgegangen werden, dass mikrobiologische Untersuchungen zum Zwecke der Diagnostik bei periimplantären Erkrankungen keinen Mehrwert bedeuten. Entscheidend ist die klinische Diagnostik.

Werden mikrobiologische Tests dennoch durchgeführt, so ist die Hypothese der Studie bestätigt, dass die konventionelle semiquantitative PCR zur Aufschlüsselung der periimplantären Bakterienflora ausreichend ist.

## Abstract

With the increasing number of dental implants, peri-implant diseases are coming to the fore. By the introduction of commercial microbiological testing in periodontal diseases the expectation of a diagnostic benefit was present. The aim of this study was to evaluate the presence of periodontopathogens in subgingival peri-implant sites using the conventional polymerase chain reaction (PCR) and the real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). The hypothesis should be established that the PCR meets all requirements to get qualitative and quantitative microbiological results in peri-implant diseases for use in diagnostic purposes. In addition, the utilization of microbiological tests should be clarified.

The subgingival peri-implant microflora of 45 subjects was classified into three groups (15 subjects each): *healthy*, *mucositis* and *peri-implantitis*. These 45 subjects were determined by the presence of the following five periodontopathogens *Aa*, *Pg*, *Td*, *Tf* and *Fn* by PCR and Real-time PCR. The PCR was a semiquantitative commercially available test (Micro-IDent, Hain Lifescience, Nehren, Germany) based on DNA-strip technology. The detection of the microbiota by Real-time PCR was based on the application of the fluorescent dye SYBRgreen-system. The utilized primers were chosen by literature research and specific pre-experiments conducted.

There was no significant correlation between bacterium and disease pattern: *Aa* (PCR  $p=0,56$ ; Real-time PCR  $p=0,32$ ), *Pg* (PCR  $p=0,20$ ; Real-time PCR  $p=0,16$ ), *Td* (PCR  $p=0,31$ ; Real-time PCR  $p=0,92$ ), *Tf* (PCR  $p=0,71$ ; Real-time PCR  $p=0,97$ ), *Fn* (PCR  $p=0,41$ ; Real-time PCR  $p=0,87$ ). The direct comparison of the results of the two methods showed the following exact accordances: *Aa* 86,66 %, *Pg* 33,33 %, *Td* 51,11 %, *Tf* 55,56 % und *Fn* 28,89 %. The bacterial loads by Real-time PCR tended to be higher than by the detection with PCR. Only with *Pg* there was a slight significant correlation between both methods (*Aa*  $p=0,42$ ; *Pg*  $p=0,04$ ; *Td*  $p=0,59$ ; *Tf*  $p=0,78$ ; *Fn*  $p=0,61$ ).

Both methods produced similar results. High and very high bacterial loads were detected in all three groups. No significant correlation between bacterium and disease pattern was found. For this very reason there is no benefit in using microbiological tests for diagnostic in peri-implant diseases. More important is the clinical diagnostic. Are microbiological tests be carried out, the hypothesis can be established that the conventional semiquantitative PCR is enough to analyze the periodontopathogenetic bacterial species.



## 8 Literaturnachweis

Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI, Lindhe J, Eriksson B, Sbordone L (1986): Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures (I). A 3-year longitudinal prospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 15, 39-52

Albrektsson T, Wennerberg A (2004): Oral implant surfaces: part 1- review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them aspects of surface quality. *Int J Prosthodont* 17, 536-543

Alcoforado GA, Rams TE, Feik D, Slots J (1991): Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. *J Parodontol (France)* 10, 11-18

Al-Radha ASD, Pal A , Petteimerides AP, Jenkinson HF (2012): Molecular analysis of microbiota associated with peri-implant diseases. *J Dent* 40, 989-998

Alves ACBA, Napimoga MH, Klein MI, Hofling JF, Gonçalves RB (2006): Increase in probing depth is correlated with a higher number of prevotella intermedia genotypes. *J Periodontal* 77, 61-66

Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA (1989): Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Periodont Res* 24, 96-105

Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J (1996): Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 11, 266-273

Ata-Ali J, Candel-Marti ME, Flichy-Fernandez AJ, Penarrocha-Oltra D, Balaguer-Martinez J, Penarrocha MA (2011): Peri-implantitis: associated microbiota and treatment. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 16, 937–943

Ata-Ali J, Flichy-Fernandez AJ, Ata-Ali F, Penarrocha-Diago M, Penarrocha-Diago M (2013): Clinical, microbiologic, and host response characteristics in patients with peri-implant mucositis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 28, 883-890

Atieh MA (2008): Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of aggregatibacter actinomycetemcomitans and porphyromonas gingivalis: a meta-analysis. *J Periodontol* 79, 1620–1629

Baig MR, Rajan M (2007): Effects of smoking on the outcome of implant treatment: a literature review. *Indian J Dent Res* 18, 190–195

Bakken V, Aarø S, Hofstad T, Vasstrand EN (1989): Outer membrane proteins as major antigens of *Fusobacterium nucleatum*. *FEMS Microbiol Immunol* 1, 473–483

Berglundh T, Lindhe J, Marinello C, Ericsson I, Liljenberg B (1992): Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res* 3, 1–8

Berglundh T, Lindhe J, Jonsson K, Ericsson I (1994): The topography of the vascular systems in the periodontal and peri-implant tissues in the dog. *J Clin Periodontol* 21, 189–193

Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V (1996): Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 9, 55-71

Boutaga K, Savelkoul PHM, Winkel EG, Van Winkelhoff AJ (2007): Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *J Periodontol* 78, 79–86

Brägger U, Hugel-Pisoni C, Bürgin W, Buser D, Lang NP (1996): Correlations between radiographic, clinical and mobility parameters after loading of oral implants with fixed partial dentures. A 2-year longitudinal study. *Clin Oral Implants Res* 7, 230–239

Braga RRR, Carvalho MAR, Bruña-Romero O, Teixeira RE, Costa JE, Mendes EN, Farias LM, Magalhães PP (2010): Quantification of five putative periodontal pathogens in female patients with and without chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *Anaerobe* 16, 234–239

Buser D, Weber HP, Lang NP (1990): Tissue integration of non-submerged implants. 1-year results of a prospective study with 100 ITI hollow-cylinder and hollow-screw implants. *Clin Oral Implants Res* 1, 33–40

Buser D, Mericske-Stern R, Bernard JP, Behneke A, Behneke N, Hirt HP, Belser UC (1997): Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clin Oral Implants Res* 8, 161–172

Buser D, Janner SF, Wittneben JG, Brägger U, Ramseier CA, Salvi GE (2012): 10-year survival and success rates of 511 titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a retrospective study in 303 partially edentulous patients. *Clin Implant Dent Relat Res* 14, 839-851

Caldwell DE, Atuku E, Wilkie DC, Wivcharuk KP, Karthikeyan S, Korber DR, Schmid DF (1997): Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. *Adv Dent Res* 11, 4–13

Camlog Vertriebs GmbH (o.J.), in: Patientenbroschüre Fragen und Antworten zu Zahnimplantaten, S.21, URL:[http://www.zm-online.de/dl/4/9/9/3/7/CAMLOG\\_Patientenbroschuere\\_Implantatkompetenz.pdf](http://www.zm-online.de/dl/4/9/9/3/7/CAMLOG_Patientenbroschuere_Implantatkompetenz.pdf) (Stand: 02.02.2014)

Casado PL, Otazu IB, Balduino A, De Mello W, Barboza EP, Duarte MEL (2011): Identification of periodontal pathogens in healthy periimplant sites. *Implant Dent* 20, 226–235

Chambrone L, Chambrone LA, Lima LA (2010): Effects of occlusal overload on peri-implant tissue health: a systematic review of animal-model studies. *J Periodontol* 81, 1367–1378

Cho-Yan Lee J, Mattheos N, Nixon KC, Ivanovski S (2012): Residual periodontal pockets are a risk indicator for peri-implantitis in patients treated for periodontitis. *Clin Oral Implants Res* 23, 325–333

Cortelli SC, Cortelli JR, Romeiro RL, Costa FO, Aquino DR, Orzechowski PR, Araújo VC, Duarte VM (2013): Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses. *Arch Oral Biol* 58, 67-74

De Boever AL, De Boever JA (2006): Early colonization of non-submerged dental implants in patients with a history of advanced aggressive periodontitis. *Clin Oral Implants Res* 17, 8-17

De Leitão JAO, De Lorenzo JL, Avila-Campos MJ, Sendyk WR (2005): Analysis of the presence of pathogens which predict the risk of disease at peri-implant sites through polymerase chain reaction (PCR). *Braz Oral Res* 19, 52–57

DGZMK (2005), in: Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten(DGZMK),1,URL:[http://www.dgzmk.de/uploads/tx\\_szdgzmkdocuments/Mikrobiologische\\_Diagnostik\\_in\\_der\\_Parodontitistherapie.pdf](http://www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgzmkdocuments/Mikrobiologische_Diagnostik_in_der_Parodontitistherapie.pdf) (Stand: 08.02.2014)

Diaz R, Ghofaily LAI, Patel J, Balashova NV, Freitas AC, Labib I, Kachlany SC (2006): Characterization of leukotoxin from a clinical strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog* 40, 48–55

- Dodson TB (2006): Predictors of dental implant survival. *J Mass Dent Soc* 54, 34–38
- Eick S, Pfister W (2002): Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodont* 29, 638–644
- Eick S, Straube A, Guentsch A, Pfister W, Jentsch H (2011): Comparison of real-time polymerase chain reaction and DNA-strip technology in microbiological evaluation of periodontitis treatment. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69, 12–20
- Eke PI, Braswell LD, Fritz ME (1998): Microbiota associated with experimental peri-implantitis and periodontitis in adult *Macaca mulatta* monkeys. *J Periodontol* 69, 190–194
- Ericsson I, Berglundh T, Marinello C, Liljenberg B, Lindhe J (1992): Long-standing plaque and gingivitis at implants and teeth in the dog. *Clin Oral Implants Res* 3, 99–103
- Ertugrul AS, Arslan U, Dursun R, Hakki SS (2013): Periodontopathogen profile of healthy and oral lichen planus patients with gingivitis or periodontitis. *Int J Oral Sci* 5, 92-97
- Faveri M, Gonçalves LFH, Feres M, Figueiredo LC, Gouveia LA, Shibli JA, Mayer MPA (2011): Prevalence and microbiological diversity of archaea in peri-implantitis subjects by 16S ribosomal RNA clonal analysis. *J Periodont Res* 46, 338–344
- Ferreira SD, Silva GLM, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO (2006): Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol* 33, 929–935
- Filippi A, Higginbottom FL, Lambrecht T, Levin BP, Meier JL, Rosen PS, Wallkamm B, Will C, Rocuzzo M (2013): A prospective noninterventional study to document implant success and survival of the Straumann Bone Level SLActive dental implant in daily dental practice. *Quintessence Int* 44: 499-512
- Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, Hazlett K, Radolf JD (2002): PCR-Based Identification of Bacteria Associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* 40, 3223–3231
- Fransson C, Lekholm U, Jemt T, Berglundh T (2005): Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants. *Clin Oral Implants Res* 16, 440–446

Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer NEM: Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005; 263-264

Galassi F, Kaman WE, Anssari Moin D, Van Der Horst J, Wismeijer D, Crielaard W, Laine ML, Veerman EC, Bikker FJ, Loos BG (2012): Comparing culture, real-time PCR and fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Porphyromonas gingivalis* in patients with or without peri-implant infections. *J Periodont Res* 47, 616-625

Ginzinger DG (2002): Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol* 30, 503–512

Haffajee AD, Yaskell T, Torresyap G, Teles R, Socransky SS (2009): Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 36, 642–649

Hamlet S, Ellwood R, Cullinan M, Worthington H, Palmer J, Bird P, Narayanan D, Davies R, Seymour G (2004): Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. *Journal of dental research* 83, 232–235

Hardt CR, Gröndahl K, Lekholm U, Wennström JL (2002): Outcome of implant therapy in relation to experienced loss of periodontal bone support: a retrospective 5-year study. *Clin Oral Implants Res* 13, 488-494

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM (1996): Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986–994

Heitz-Mayfield LJA (2008): Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *J Clin Periodontol* 35, 292–304

Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung. 4.Auflage; Elsevier GmbH Urban & Fischer Verlag, München 2006; 371, 377-380,424

Henderson B, Nair SP, Ward JM, Wilson M (2003): Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annu Rev Microbiol* 57, 29–55

Heuer W, Kettenring A, Stumpp SN, Eberhard J, Gellermann E, Winkel A, Stiesch M (2011): Metagenomic analysis of the peri-implant and periodontal microflora in patients with clinical signs of gingivitis or mucositis. *Clin Oral Invest* 16, 843-850

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

Horton HR, Moran LA, Scrimgeour KG, Perry MD, Rawn JD: *Biochemie*. 4.Auflage; Pearson Studium, Hallbergmoos 2008; 978-981

Hultin M, Gustafsson A, Hallström H, Johansson L.-A, Ekfeldt A, Klinge B (2002): Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 13, 349–358

Institut der Deutschen Zahnärzte (IDZ) (2006): Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV), 11–13, URL:<http://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/presse/dms/brosch.pdf> (Stand: 02.02.2014)

Ito H (2010): Development of a cps-based multiplex PCR for typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 1, 2 and 5. *J Vet Med Sci* 72, 653–655

Ito T, Yasuda M, Kaneko H, Sasaki H, Kato T, Yajima Y (2013): Clinical evaluation of salivary periodontal pathogen levels by real-time polymerase chain reaction in patients before dental implant treatment. *Clin Oral Implants Res* 00, 1-6

Jessing SG, Angen Ø, Inzana TJ (2003): Evaluation of a multiplex PCR test for simultaneous identification and serotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes 2, 5, and 6. *J Clin Microbiol* 41, 4095–4100

Kainz P (2000): The PCR plateau phase- towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta* 1494, 23–27

Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJA, Brägger U, Hämmerle CHF, Lang NP (2003): Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res* 14, 329–339

Karoussis IK, Brägger U, Salvi GE, Bürgin W, Lang NP (2004): Effect of implant design on survival and success rates of titanium oral implants: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res* 15, 8–17

Keller W, Brägger U, Mombelli A (1998): Peri-implant microflora of implants with cemented and screw retained suprastructures. *Clin Oral Implants Res* 9, 209–217

Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM (2010): Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. *J Periodontol* 81: 231-238

Kolenbrander PE, Andersen RN (1989): Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by lactose and related sugars. *Infect Immun* 57, 3204–3209

Kolenbrander PE, Parrish KD, Andersen RN, Greenberg EP (1995): Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infect Immun* 63, 4584–4588

Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Ohkuma M, Izumi Y (2010): Analysis of microbiota associated with peri-implantitis using 16S rRNA gene clone library. *J Oral Microbiol* 2, 1–7

Koyanagi T, Sakamoto M, Takeuchi Y, Maruyama N, Ohkuma M, Izumi Y (2013): Comprehensive microbiological findings in peri-implantitis and periodontitis. *J Clin Periodontol* 40, 218–226

Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML, Leys EJ (2003): New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 82, 338–344

Laine ML, Leonhardt A, Roos-Jansåker AM, Peña AS, Van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Renvert S (2006): IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res* 17, 380–385

Lang NP, Berglundh T (2011): Periimplant diseases: where are we now? Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* 38, 178–181

Lang NP, Brägger U, Walther D, Beamer B, Kornman KS (1993): Ligature-induced peri-implant infection in cynomolgus monkeys. I. Clinical and radiographic findings. *Clin Oral Implants Res* 4, 2–11

Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín 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 samp. *J Clin Periodontol* 31, 1061–1069

Lee KH, Maiden MF, Tanner AC, Weber HP (1999): Microbiota of successful osseointegrated dental implants. *J Periodontol* 70, 131–138

- Lekholm U, Adell R, Lindhe J, Brånemark PI, Eriksson B, Rockler B, Lindvall AM, Yoneyama T (1986): Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures. (II) A cross-sectional retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 15, 53–61
- Leonhardt A, Berglundh T, Ericsson I, Dahlén G (1992): Putative periodontal pathogens on titanium implants and teeth in experimental gingivitis and periodontitis in beagle dogs. *Clin Oral Implants Res* 3, 112–119
- Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G (1999): Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res* 10, 339–345
- Linkevicius T, Puisys A, Vindasiute E, Linkeviciene L, Apse P (2012): Does residual cement around implant-supported restorations cause peri-implant disease? A retrospective case analysis. *Clin Oral Implants Res* 24, 1179-1184
- Listgarten MA, Lai CH (1999): Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol* 70, 431–437
- Liu L, Wen X, He H, Shi J, Ji C (2003): Species-specific DNA probe for the detection of *Porphyromonas gingivalis* from adult Chinese periodontal patients and healthy subjects. *J Periodontol* 74, 1000–1006
- Loesche WJ (1986): The identification of bacteria associated with periodontal disease and dental caries by enzymatic methods. *Oral Microbiol Immunol* 1, 65–72
- Loomer PM (2004): Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 34, 49–56
- Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ (2000): Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol* 38, 2362–2365
- Marinello CP, Berglundh T, Ericsson I, Klinge B, Glantz PO, Lindhe J (1995): Resolution of ligature-induced peri-implantitis lesions in the dog. *J Clin Periodontol* 22, 475–479
- Marsh PD (2003): Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiol* 149, 279-294
- Meyer DH, Lippmann JE, Fives-Taylor PM (1996): Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun* 64, 2988–2997
- Mombelli A (1993): Microbiology of the dental implant. *Adv Dent Res* 7, 202–206



- Mombelli A (1997): Etiology, diagnosis, and treatment considerations in peri-implantitis. *Curr Opin Periodontol* 4, 127–136
- Mombelli A, Mericske-Stern R (1990): Microbiological features of stable osseointegrated implants used as abutments for overdentures. *Clinical Oral Implants Research* 1, 1–7
- Mombelli A, Lang NP (1998): The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontol 2000* 17, 63–76
- Mombelli A, Van Oosten MA, Schurch E, Land NP (1987): The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol* 2, 145–151
- Moore WE, Moore LV (1994): The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 5, 66–77
- Mülhardt C: *Der Experimentator: Molekularbiologie*. 3.Auflage; Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, Heidelberg 2002; 71-99
- Müller HJ: *PCR-Polymerasekettenreaktion*. 1. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, Heidelberg 2001; 1-6, 61-62
- Müller HP: *Checklisten der Zahnmedizin Parodontologie*. 2.Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006; 30,48,66
- Murray PA, Kern DG, Winkler JR (1988): Identification of a galactose-binding lectin on *Fusobacterium nucleatum* FN-2. *Infect Immun* 56, 1314–1319
- Mutschelknauss R: *Lehrbuch der klinischen Parodontologie*. 1. Auflage; Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin 2000; 112-120
- Nisengard RJ, Mikulski L, McDuffie D, Bronson P (1992): Development of a rapid latex agglutination test for periodontal pathogens. *J Periodontol* 63, 611–617
- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE (2001): Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183, 3770–3783
- Persson GR, Renvert S (2013): Cluster of Bacteria Associated with Peri-Implantitis. *Clin Implant Dent Relat Res*, doi: 10.1111/cid.12052 (epub ahead of print)

- Persson S, Edlund MB, Claesson R, Carlsson J (1990): The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol and Immunol* 5, 195–201
- Plagmann HC: Lehrbuch der Parodontologie. 1.Auflage; Hanser Verlag, München 1998; 39-41, 65-75, 92-95
- Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP (1994): Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res* 5, 254–259
- Pye A, Lockhart D, Dawson M, Murray C, Smith A, Smith A (2009): A review of dental implants and infection. *J Hosp Infect* 72, 104–110
- Quirynen M, Listgarten MA (1990): Distribution of bacterial morphotypes around natural teeth and titanium implants ad modum Brånemark. *Clin Oral Implants Res* 1, 8–12
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Duale Reihe Biochemie. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2008; 492,494
- Reich E, Hiller KA (1993): Reasons for tooth extraction in the western states of Germany. *Community Dent Oral Epidemiol* 21, 379–383
- Renvert S, Persson GR (2009): Periodontitis as a potential risk factor for peri-implantitis. *J Clin Periodontol* 36, 9–14
- Replication R (1971): Studies on polynucleotides \*1, \*2XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 56, 341–361
- Richards W, Ameen J, Coll AM, Higgs G (2005): Reasons for tooth extraction in four general dental practices in South Wales. *Br Dent J* 198, 275–278
- Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D (1996): Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Periodont Res* 31, 496–501
- Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D (2003): Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res* 31, 496–501

Rinke S, Ohl S, Ziebolz D, Lange K, Eickholz P (2011): Prevalence of periimplant disease in partially edentulous patients: a practice based cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res* 22, 826-833

Roos-Jansåker AM, Lindahl C, Renvert H, Renvert S (2006): Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions. *J Clin Periodontol* 33, 290–295

Rosenberg ES, Cho SC, Elian N, Jalbout ZN, Froum S, Evian CI (2004): A comparison of characteristics of implant failure and survival in periodontally compromised and periodontally healthy patients: a clinical report. *Int J Oral Maxillofac Implants* 19, 873–879

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487–491

Salvi GE, Aglietta M, Eick S, Sculean A, Lang NP, Ramseier CA (2012): Reversibility of experimental peri-implant mucositis compared with experimental gingivitis in humans. *Clin Oral Implants Res* 23, 182-190

Sanderink RBA, Bernhardt H, Knoke M, Meyer J, Weber C, Weiger R: *Orale Mikrobiologie und Immunologie*. 1.Auflage; Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin 2004; 495,503,526-527

Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A (2004): Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 31, 1034–1047

Sanz M, Ivanoff CJ, Weingart D, Wiltfang J, Gahlert M, Cordaro L, Ganeles J, Bragger U, Jackowski J, Martin WC (2013): Clinical and radiologic Outcomes after Submerged and Transmucosal Implant Placement with Two-Piece Implants in the Anterior Maxilla and Mandible: 3-Year Results of a randomized Controlled Clinical trial. *Clin Impl Res*, doi: 10.1111/cid.12107 (epub ahead of print)

Sato J, Gomi K, Makino T, Kawasaki F, Yashima A, Ozawa T, Maeda N, Arai T (2011): The evaluation of bacterial flora in progress of peri-implant disease. *Aust Dent J* 56, 201–206

Schrimpf G: *Gentechnische Methoden*. 3. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer, Heidelberg 2002; 66, 67, 80, 163

- Schwarz F, Herten M, Sager M, Bieling K, Sculean A, Becker J (2007): Comparison of naturally occurring and ligature-induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clin Oral Impl Res* 18, 161-170
- Sharma A, Inagaki S, Sigurdson W, Kuramitsu HK (2005): Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation. *Oral Microbiol Immunol* 20, 39–42
- Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Favari M, Feres M (2008): Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Impl Res* 19, 975-982
- Simonson LG, Goodman CH, Bial JJ, Morton HE (1988): Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease. *Infect Immun* 56, 726–728
- Sixou M (2003): Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis* 9, 54–62
- Socransky SS (1979): Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 6, 16–21
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL (1998): Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25, 134–44
- Socransky SS, Sigmund S, Haffajee AD (2002): Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 28, 12–55
- Socransky SS, Sigmund S, Haffajee AD (2005): Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 38, 135–87
- Sordyl CM, Simons AM, Molinari JA (1995): The microbial flora associated with stable endosseous implants. *J Oral Implantol* 21, 19–22
- Taichman NS, Dean RT, Sanderson CJ (1980): Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 28, 258–268
- Tang Z, Sha Y, Lin Y, Zhang G, Wang X, Cao C (2000): Peri-implant mucosal inflammation and bone loss: clinical and radiographic evaluation of 108 dental implants after 1-year loading. *Chin J Dent Res* 3, 15–20
- Tanner A, Maiden MF, Lee K, Shulman LB, Weber HP (1997): Dental implant infections. *Clin Infect Dis* 25, 213–217

Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M (2006): Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res* 20, 68–81

Timmerman MF, Van Der Weijden GA (2006): Risk factors for periodontitis. *Int J Dent Hygiene* 7, 2–7

Tran S, Rudney J (1999): Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 37, 3504-3508

Tsalikis L, Flores-de-Jacoby L, Zafiroopoulos GG, Pisanty S, Nisengard R (1989): A latex agglutination test for the rapid identification of periodontally pathogenic microorganisms in subgingival plaque. The preliminary results. *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 77, 659–67

Turkyilmaz I (2010): One-year clinical outcome of dental implants placed in patients with type 2 diabetes mellitus: a case series. *Implant Dent* 19, 323–329

Utto VJ, Grenier D, Chan EC, McBride BC (1988): Isolation of a chymotrypsinlike enzyme from *Treponema denticola*. *Infect Immun* 56, 2717–2722

Van Winkelhoff AJ (2003): Microbiology in diagnosis and treatment planning in periodontics. *International J Dent Hygiene* 1, 131–137

Van Winkelhoff AJ, Loos BG, Van Der Reijden WA, Van Der Velden U (2002): *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 29, 1023–1028

Verner C, Lemaitre P, Daniel A, Giumelli B, Lakhssassi N, Sixou M (2006): Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiol Immunol* 21, 341–346

Walton JN, MacEntee MI (2005): Choosing or refusing oral implants: a prospective study of edentulous volunteers for a clinical trial. *Int J Prosthodont* 18, 483–488

Watanabe K, Frommel TO (1996): *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol* 23, 212–219

Weiss EI, Shanitzki B, Dotan M, Ganeshkumar N, Kolenbrander PE, Metzger Z (2000): Attachment of *Fusobacterium nucleatum* PK1594 to mammalian cells and its coaggregation with periodontopathogenic bacteria are mediated by the same galactose-binding adhesin. *Oral Microbiol Immunol* 15, 371–377

Wilhelm J: Entwicklung real-time-pcr-basierter Methoden für die moderne DNA-Analytik. Biochem.Diss. Gießen 2003

Woo VV, Chuang SK, Daher S, Muftu A, Dodson TB (2004): Dentoalveolar reconstructive procedures as a risk factor for implant failure. *J Oral Maxillofac Surg* 62, 773–780

Wu Y, Yan J, Chen L, Gu Z (2007): Association between infection of different strains of *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque and clinical parameters in chronic periodontitis. *J Zhejiang Univ Sci B* 8, 121–131

Ximénez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS (2000): Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 27, 648–657

Yoshida A, Kawada M, Suzuki N, Nakano Y, Oho T, Saito T, Yamashita Y (2004): TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for the correlation of *Treponema denticola* numbers with the severity of periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 19, 196–200

Zambon JJ (1985): *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 12, 1–20

Zitzmann NU, Berglundh T, Ericsson I, Lindhe J (2004): Spontaneous progression of experimentally induced periimplantitis. *J Clin Periodontol* 31, 845–84

## 9 Anlage

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

<i>Aa</i>	Aggregatibacter Actinomycetem-comitans
AC	Amplifikationskontrolle
BANA	N- $\alpha$ -benzoyl-DL-arginin-2-naphthylamid
BOP	bleeding on probing
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CC	Konjugatkontrolle
Cr	Campylobacter rectus
Cs	Capnocytophaga species
Ct	cycle threshold
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEN	Denaturierungsreagenz
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Effizienz
<i>Ec</i>	Eikenella corodens
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
<i>En</i>	Eubacterium nodatum
EtBr	Ethidiumbromid
<i>Fn</i>	Fusobacterium nucleatum
g	Gramm/Erdbeschleunigung
h	Stunde
HYB	Hybridisierungspuffer
IL-1	Interleukin 1
KendT	Kendalls Tau
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
mm	Millimeter
$\mu$ l	Mikroliter

---

ml	Milliliter
mM	Millimolar
n	Anzahl der Proben
NTC	Negativkontrolle Wasser
P	Pool 4
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Pg</i>	Porphyromonas gingivalis
<i>Pi</i>	Prevotella intermedia
<i>Pm</i>	Peptostreptococcus Micros
p-Wert	Signifikanzwert
R	Relative Quantifizierung
Real-time PCR	Real-time Polymerasekettenreaktion
RIN	Rinse-lösung
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
Spe	Spearman
STR	Stringent-Waschlösung
SYBRgreen	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)propylamino]-1-phenyl-1 <i>H</i> -chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Td</i>	Treponema denticola
<i>Tf</i>	Tannerella forsythia
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
<i>Vp</i>	Veionella parvula
X	Probe
x	mal
°C	Grad Celcius
%	Prozent
%ig	Volumenprozent



## 9.2 Verwendete Geräte

Die verwendeten Geräte wurden für alle Teile der Experimente verwendet und werden deshalb hier in Tabelle 18 allgemein aufgeführt und nicht spezifisch den einzelnen Arbeitsschritten zugeordnet.

Tabelle 18: Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Cups	1,5 ml	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Elektrophoresekammer	Mini 440.000	Polymehr (Paderborn, Deutschland)
Gel Dokumentationsgerät	Bio-Doc-Analyzer	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Mini Zentrifuge	MC6	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipetten	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen	10 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Schüttelwasserbad	TwinCubator	Hain Lifescience (Nehren, Deutschland)
Stromquelle für Agarosegel	Elite 3000plus	Wealtec (Sparks, Nevada USA)
Thermocycler für PCR	Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Thermocycler für Real-time PCR	MyiQ Single Color RT-PCR Detection System	Bio-Rad (München, Deutschland)
Tubes	0,2 ml	Starlab (Hamburg, Deutschland)
Waage	1106	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus (Hanau, Deutschland)

### 9.3 Reagenzien, Puffer und Lösungen

#### 9.3.1 DNA-Isolierung

Die verwendete Chemikalie für die DNA-Isolierung ist in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Reagens für die DNA-Isolierung

Chemikalien	Hersteller
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)

Die verwendeten Puffer und Lösungen für die DNA-Isolierung sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: Puffer und Lösungen für die DNA-Isolierung

Art des Puffers/Lösung	Hersteller
QIAamp DNA Mini Kit (ATL-Puffer, AW1-Puffer, AW2-Puffer, AE-Puffer, Proteinase K-Lösung)	Qiagen (Hilden, Deutschland)

#### 9.3.2 PCR

Die verwendeten Chemikalien für die PCR sind in Tabelle 21 aufgeführt.

Tabelle 21: Reagenzien für die PCR

Chemikalien	Hersteller
Ampuwa	Fresenius (Bad Homburg, Deutschland)
MgCl <sub>2</sub>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Polymerasepuffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Primeroligonukleotidmix	Hain Lifescience (Nehren, Deutschland) Micro-IDent <sup>®</sup> -Kit
Taq-Polymerase	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Die verwendeten Puffer und Lösungen für die PCR sind in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Puffer und Lösungen für die PCR

Art des Puffers/Lösung	Hersteller
Denaturierungsreagenz	Hain Lifescience
Hybridisierungspuffer	(Nehren, Deutschland)
Stringentwaschlösung	Micro-IDent®-Kit

### 9.3.3 Real-time PCR

Die verwendeten Chemikalien für die Real-time PCR sind in Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: Reagenzien für die Real-time PCR

Chemikalien	Hersteller
Ampuwa	Fresenius (Bad Homburg, Deutschland)
Primer Oligonukleotide	Biomers (Ulm, Deutschland)
Rnase-DNAse free water	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SYBRgreen Supermix	Bio-Rad (München, Deutschland)

### 9.3.4 Agarosegelelektrophorese

Die verwendeten Chemikalien für die Agarosegelelektrophorese sind in Tabelle 24 aufgeführt.

Tabelle 24: Reagenzien für die Agarosegelelektrophorese

Chemikalien	Hersteller
Agarose GTQ	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromid (EtBr)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
20 bp-DNA-Ladder	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
100 bp-DNA-Ladder	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Roti-Load-DNA 6 x DNA-Auftragspuffer	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Die verwendeten Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese sind folgende: 50 x TAE Puffer (242 g TrisBase, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5M EDTA pH8, mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen). Dieser wird also im Verhältnis 1:50 zum TAE-Puffer 1 x angesetzt.

#### 9.4 Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese für Real-time PCR

Im Folgenden werden die Nachweise der gebildeten DNA-Fragmente über die Agarosegelelektrophorese dargelegt.

In Abbildung 32 ist die Agarosegelelektrophorese für *Aa* dargestellt. Alle gebildeten DNA-Fragmente siedelten sich im Bereich von 197 bp an. Die Negativkontrolle mit Wasser „NTC“ (rot markiert) wurde bestätigt. Als „PF“ gekennzeichnet ist ein Pipettierfehler, der nicht in das Ergebnis einfließt.

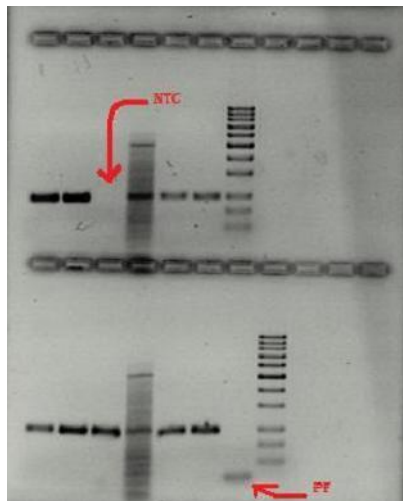
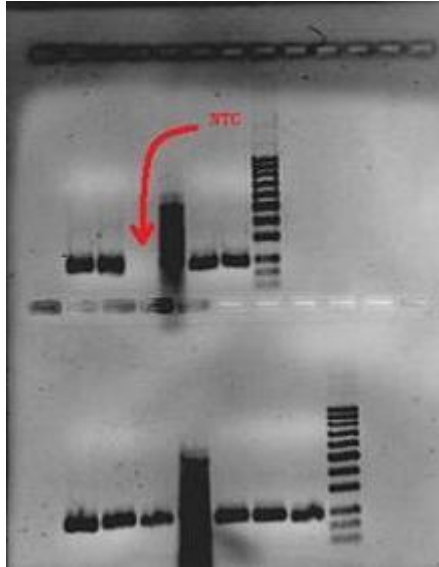
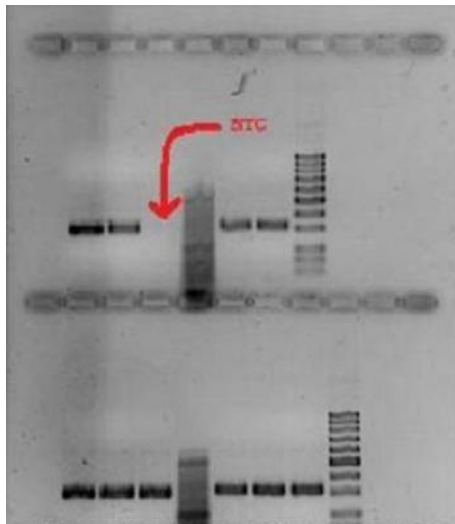


Abb. 32: Agarosegelelektrophorese für *Aa*

In Abbildung 33 ist die Agarosegelelektrophorese für *Pg* dargestellt. Alle gebildeten DNA-Fragmente siedelten sich im Bereich von 191 bp an. Die Negativkontrolle mit Wasser „NTC“ (rot markiert) wurde bestätigt.

Abb. 33: Agarosegelelektrophorese für *Pg*

In Abbildung 34 ist die Agarosegelelektrophorese für *Td* dargestellt. Alle gebildeten DNA-Fragmente siedelten sich im Bereich von 316 bp an. Die Negativkontrolle mit Wasser „NTC“ (rot markiert) wurde bestätigt.

Abb. 34: Agarosegelelektrophorese für *Td*

In Abbildung 35 ist die Agarosegelelektrophorese für *Tf* dargestellt. Alle gebildeten DNA-Fragmente siedelten sich im Bereich von 120 bp an. Die Negativkontrolle mit Wasser „NTC“ (rot markiert) wurde bestätigt.

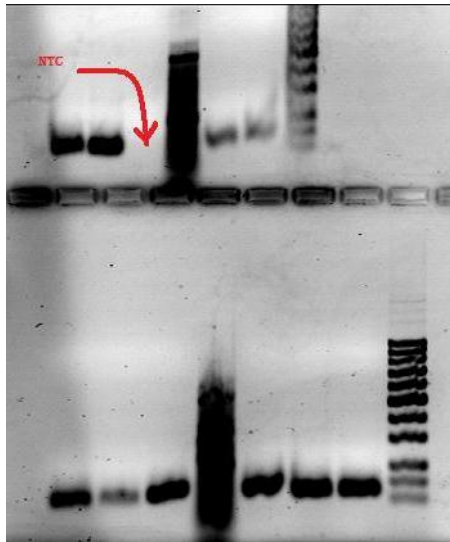


Abb. 35: Agarosegelelektrophorese für *Tf*

In Abbildung 36 ist die Agarosegelelektrophorese für *Fn* dargestellt. Alle gebildeten DNA-Fragmente der Proben siedelten sich im Bereich von 101 bp an. Die Negativkontrolle mit Wasser „NTC“ (rot markiert) siedelte sich in einem anderen Basenlängenbereich an. Darauf wird in der Diskussion (Kapitel 6) eingegangen.

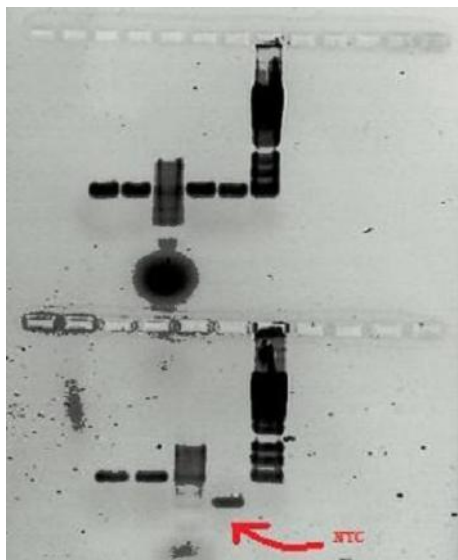


Abb. 36: Agarosegelelektrophorese für *Fn*

## Danksagung

Mein herzlichstes Dankeschön geht an

- Herrn PD Dr. med.dent. Dirk Ziebolz für die Vergabe des interessanten Themas und die sehr gute Betreuung im Rahmen meiner Dissertation.
- Frau Monika Hoch für die große Hilfe während der experimentellen Arbeit.

## Curriculum Vitae

Geboren wurde ich am 17. Oktober 1984 in Stuttgart-Bad Cannstatt als Tochter von Inge Korthals, geb. Schäfer und von Jürgen Korthals.

Von 1991 bis 1995 besuchte ich die Neckar-Grundschule in Remseck, von 1995 bis 2004 das Gustav-Stresemann-Gymnasium in Schmiden. Im Juli 2004 erlangte ich die allgemeine Hochschulreife.

Von September 2004 bis Juli 2007 absolvierte ich die Ausbildung zur Zahntechnikerin. Im Juli 2007 erhielt ich den Gesellenbrief.

Von Oktober 2007 bis Juni 2013 studierte ich Zahnmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im September 2008, die zahnärztliche Vorprüfung im März 2010 ab. Meine Dissertation begann ich im August 2011 bei Herrn PD Dr. med.dent. Dirk Ziebolz in der Abteilung Poliklinik für Präventive Zahnmedizin, Parodontologie und Kariologie des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Göttingen.

Im Juni 2013 legte ich erfolgreich mein Staatsexamen ab und erhielt die Approbation als Zahnärztin.

Seit Oktober 2013 arbeite ich als Assistenz Zahnärztin in einer niedergelassenen Praxis in München.