

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Poliklinik für Parodontologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Benjamin Ehmke

Evaluation ausgewählter Diagnostikverfahren zum Nachweis parodontalpathogener Markerkeime

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR
Erlangung des DOCTOR MEDICINAE DENTIUM

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Kettner, Anna Maria
aus Neuenbürg
-2010-

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dag Harmsen

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Alexander Friedrich

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Poliklinik für Parodontologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Benjamin Ehmke
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dag Harmsen
Koreferent: PD Dr. med. Alexander Friedrich

Zusammenfassung

Evaluation ausgewählter Diagnostikverfahren zum Nachweis parodontalpathogener Markerkeime

Anna Maria Kettner

Der Nachweis parodontalpathogener Erreger und die auf das spezifische Erregerspektrum abgestimmte adjuvante Antibiotikagabe sind nach heutigem Wissensstand als Bestandteil der Therapie bestimmter Formen der Parodontitis oftmals indiziert.

Im Rahmen dieser Studie wurden eine „homebrew-PCR“ mit Agarosegelelektrophorese und der kommerziell zu erwerbende Hain micro-IDent[®] als molekularbiologische Nachweisverfahren mit der Kultivierung, dem derzeitigen „Goldstandard“, verglichen. 109 Patienten der Poliklinik für Parodontologie des Universitätsklinikums Münster wurden Plaqueproben entnommen, welche auf die Anwesenheit von *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* und *Treponema denticola* untersucht wurden. Die statistische Auswertung des qualitativen Vergleichs erfolgte mittels Vierfeldertafeln, McNemar-Test und dem Kappa-Koeffizienten. Zudem wurde für den micro-IDent[®] ein quantitativer Vergleich mit der Kultivierung mittels linearer Regression und dem Bestimmtheitsmaß R^2 durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass mittels molekularbiologischer Diagnostikverfahren die Keime häufiger nachgewiesen wurden als mittels Kultivierung. Sie zeigten hohe Sensitivitäten (PCR: von 90,48% für *P. gingivalis* bis 100% für *A. actinomycetemcomitans* und *T. forsythensis*, micro-IDent[®]: von 86,36% für *A. actinomycetemcomitans* bis 98,91% für *T. forsythensis*) und Spezifitäten von bis zu 91,95% für *A. actinomycetemcomitans*. Für den quantitativen Nachweis der Erreger durch micro-IDent[®] ergab sich kaum ein Zusammenhang (größter Zusammenhang für *A. actinomycetemcomitans* mit $R^2 = 0,21$) mit der Anzahl der Kolonien-bildenden Einheiten in der Auswertung der Kultivierung.

Zum alleinigen qualitativen Nachweis der Keime sind die molekularbiologischen Verfahren eine zeitsparende, kostengünstige und sinnvolle Alternative zum bisherigen „Goldstandard“. Für einen quantitativen Nachweis der parodontalpathogenen Erreger ist das Diagnostikverfahren der Firma Hain nicht zu empfehlen.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.10.2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	Material und Methoden	7
2.1	Geräte	7
2.2	Chemikalien	9
2.3	Medien, Puffer und Lösungen	12
2.3.1	TSBV-Agar	12
2.3.2	Anaerobier-Blutagar nach CDC	13
2.3.3	Herstellung 1,8%iger Agarosegele	14
2.3.4	Herstellung der Ansätze für die benötigten Puffer und Leiter	15
2.4	Probenentnahme	15
2.5	Kultivierung	16
2.6	Isolierung der DNA aus Patientenproben	16
2.7	PCR mit Agarosegelelektrophorese	17
2.7.1	Pipettieren der PCR-Ansätze	19
2.7.2	Amplifikations-Programme	19
2.7.3	Inhibitionskontrolle („Spiken“)	20
2.7.4	Durchführung der Agarosegelelektrophorese	20
2.8	Micro-IDent®	22
2.8.1	Amplifikation der DNA mit Biotin-markierten Primern	22
2.8.2	Hybridisierung der DNA	23
2.9	Statistische Methoden	26
2.9.1	Sensitivität und Spezifität	26
2.9.2	Positiv prädiktiver Wert und negativ prädiktiver Wert	27
2.9.3	Konfidenzintervalle	27
2.9.4	McNemar-Test	28
2.9.5	Kappa-Koeffizient κ	28
2.9.6	Scatter-Plot, Regression und Bestimmtheitsmaß	28
2.9.7	Signifikanz	29
3	Ergebnisse	30
3.1	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	30
3.1.1	Qualitativer Vergleich	30
3.1.2	Quantitativer Vergleich	32
3.2	<i>P. gingivalis</i>	33

3.2.1	Qualitativer Vergleich	33
3.2.2	Quantitativer Vergleich	35
3.3	<i>P. intermedia</i>	35
3.3.1	Qualitativer Vergleich	35
3.3.2	Quantitativer Vergleich	37
3.4	<i>T. forsythensis</i>	38
3.4.1	Qualitativer Vergleich	38
3.4.2	Quantitativer Vergleich	39
3.5	<i>T. denticola</i>	40
3.5.1	Qualitativer Vergleich	40
4	Diskussion	41
	Literaturverzeichnis	45
	Anhang	I
	Patientendaten und Testergebnisse	I
	Abkürzungsverzeichnis	VIII

Tabellenverzeichnis

3	Agarosegelherstellung für Bio-rad-Trays, Inhaltstoffe	14
4	Agarosegelherstellung für Keutz-Trays, Inhaltstoffe	14
5	Für den PCR-Nachweis verwendete Primer	19
6	Pipettierschema	19
7	Vierfeldertafel zum Vergleich von Standardverfahren und Testverfahren .	26
8	Vergleich von PCR u. Kultivierung für <i>A. actinomycetemcomitans</i>	31
9	Vergleich von micro-IDent® u. Kultivierung für <i>A. actinomycetemcomitans</i>	31
10	Vergleich von micro-IDent® u. PCR für <i>A. actinomycetemcomitans</i>	32
11	Vergleich von PCR u. Kultivierung für <i>P. gingivalis</i>	33
12	Vergleich von micro-IDent® u. Kultivierung für <i>P. gingivalis</i>	34
13	Vergleich von micro-IDent® u. PCR für <i>P. gingivalis</i>	34
14	Vergleich von PCR u. Kultivierung für <i>P. intermedia</i>	36
15	Vergleich von micro-IDent® u. Kultivierung für <i>P. intermedia</i>	36
16	Vergleich von micro-IDent® u. PCR für <i>P. intermedia</i>	37
17	Vergleich von PCR u. Kultivierung für <i>T. forsythensis</i>	38
18	Vergleich von micro-IDent® u. Kultivierung für <i>T. forsythensis</i>	38
19	Vergleich von micro-IDent® u. PCR für <i>T. forsythensis</i>	39
20	Vergleich von micro-IDent® u. PCR für <i>T. denticola</i>	40
21	Geschlecht und Diagnose der Patienten	IV
22	Einzelbeobachtungen der Studie	VII

Abbildungsverzeichnis

1	Agarosegel für den Nachweis von <i>A. actinomycetemcomitans</i>	21
2	Agarosegel für den Nachweis von <i>P. intermedia</i>	22
3	Agarosegel für den Nachweis von <i>T. denticola</i>	22
4	Hain Micro-IDent®-Membranstreifen	25
5	Quantitativer Vergleich von Hain micro-IDent® und Kultivierung für <i>A. actinomycetemcomitans</i>	33
6	Quantitativer Vergleich von Hain micro-IDent® und Kultivierung für <i>P. gingivalis</i>	35
7	Quantitativer Vergleich von Hain micro-IDent® und Kultivierung für <i>P. intermedia</i>	37
8	Quantitativer Vergleich von Hain micro-IDent® und Kultivierung für <i>T. forsythensis</i>	40

1 Einleitung

Die Parodontitis ist eine meist bakteriell bedingte Entzündung des Zahnhalteapparates (Parodontium), welche neben Karies als Hauptursache für Zahnverlust gilt [6].

Von einer Polysaccharidmatrix umgeben bilden akkumulierende Bakterien mit weiteren organischen und anorganischen Stoffen einen Biofilm auf der Wurzeloberflächen der Zähne, welcher sie vor äußeren Einflüssen wie zum Beispiel antimikrobiellen Substanzen schützt.

Das Immunsystem antwortet auf die Anwesenheit der Bakterien und der Freisetzung bakterieller Stoffwechsel- und Zerfallsprodukte mit einer Abwehrreaktion des Körpers. An dieser Abwehrreaktion sind verschiedene Entzündungsstoffe und Entzündungszellen beteiligt, welche jedoch nicht nur zu der Zerstörung der Bakterien, sondern auch zu Zerstörung von Eigengewebe führen [19]. Das Resultat dieser Immunantwort ist demnach der Verlust von Bindegewebe und Knochen, welcher anhand von Zahnfleischbluten, Taschenbildung, Rezessionen und letztendlich Lockerung und Verlust von Zähnen bei Parodontitispatienten klinisch sichtbar wird.

Die direkte Wirkung bakterieller Produkte, welche in das Saumepithel am Boden des Sulcus eindringen und Struktur und Funktion des Saumepithels störend beeinflussen, ist Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen [5].

Insgesamt werden über 500 verschiedene Bakterien-Spezies in subgingivaler Plaque vermutet [21], von denen jedoch nicht alle parodontalpathogen sind. Zu den parodontalpathogenen Erregern gehören unter anderem *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* und *Treponema denticola*. Diese Bakterien sind sogenannte Markerkeime der Parodontitis. Sie kommen gehäuft bei Läsionen im subgingivalen Raum vor und ihre Ausscheidungsprodukte verursachen Gewebeerstörungen [5]. Alle diese Keime, ausser *Treponema denticola*, sind gramnegative Stäbchen und anaerob bzw. fakultativ anaerob [19].

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (ehemals *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes Stäbchen. Bei etwa 30 bis 50% der an Parodontitis erkrankten Patienten kann *A. actinomycetemcomitans* nachgewiesen werden [34] [31] zit. n: [14], bei an aggressiven Formen der Krankheit Erkrankten sogar in bis zu über 90% der Fälle [38] [30] zit. n: [14]. Auch bei Gesunden kann der Keim vorhanden sein. Dies trifft auf bis zu 36% der Gesunden zu [39]. Es besteht eine positive Korrelation zwischen dem Vorhandensein des Keims und der Tiefe der parodontalen Tasche sowie Gingivitis [32].

Die Virulenzfaktoren des Erregers verursachen Entzündung, Einleiten von Gewebeerstörung und die Inhibition der Gewebereparatur [11]. *A. actinomycetemcomitans* schüttet

unter anderem den Virulenzfaktor Leukotoxin aus, welcher auf die polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten hemmend wirkt, und somit auch die Immunabwehr verschlechtert [15]. Er ist nicht ausschließlich in Zahnfleischtaschen zu finden, sondern ebenfalls in Nischen der Wangenmukosa und am Zungenrücken [32][25], was bei seiner Bekämpfung zu berücksichtigen ist. Zudem wird *A. actinomycetemcomitans* in einigen Fällen als Erreger von Endokarditiden genannt [23].

Porphyromonas gingivalis ist wie *A. actinomycetemcomitans* ein sogenannter „Leitkeim“ der Parodontitis, da er hauptsächlich bei an Parodontitis Erkrankten nachgewiesen wird [35], meist in Gemeinschaft mit *T. forsythensis* und mit steigender parodontaler Taschentiefe [33] [37], jedoch ausgesprochen selten bei Gesunden [17]. Sein hauptsächlichster Effekt auf das Zahnfleisch ist der Abbau körpereigenen Kollagens [24] und der Abbau von Antikörpern. Das Vorkommen dieses Keims korreliert sowohl mit dem Alter [20] [13] und der Mundhygiene [35] des Patienten, als auch mit dem Schweregrad der Erkrankung [13] [37].

Prevotella intermedia ist mit Hilfe selbst gebildeter Proteasen dazu in der Lage Kollagen, Bindegewebe und Immunglobuline zu zersetzen [9] und leistet so einen Beitrag zur Zerstörung des parodontalen Gewebes.

Tannerella forsythensis zeichnet sich durch eine hohe Aktivität seiner Proteasen aus. Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von *T. forsythensis* und Attachmentverlusten bei an Parodontitis erkrankten Personen [10]. Durch seine Fettsäuren ist der Keim mitverantwortlich für den bei Parodontitis auftretenden Mundgeruch, ebenso wie *T. denticola* [22].

Treponema denticola gehört zu den Spirochäten und ist sehr schwer zu kultivieren. *T. denticola* wurde in großer Anzahl in tiefen parodontalen Taschen nachgewiesen. Die Anzahl stieg mit dem Schweregrad der Erkrankung, was auf einen Zusammenhang des Schweregrads der Parodontitis mit dem Vorhandensein dieses Keims schließen lässt [28].

Der Nachweis der pathogenen Keime im Zusammenhang mit der Erkrankung Parodontitis ist ein wichtiger Bestandteil der Therapieplanung. Denn oftmals reichen mechanische Debridements nicht aus, um eine signifikante Besserung des parodontalen Gesundheitsstatus herbeizuführen. In diesen Fällen ist eine adjuvante Antibiotikatherapie basierend auf einem individuellen Erregernachweis indiziert. Laut Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten (DGZMK) ist die Indikation für eine adjuvante Antibiotikatherapie gegeben bei:

- aggressiver Parodontitis
- schwerer chronischer Parodontitis

- Parodontitiden, die trotz vorangegangener Therapie progrediente Attachmentverluste aufweisen
- mittelschweren bis schweren Parodontitiden bei systemischen Erkrankungen oder Zuständen, die die Funktion des Immunsystems beeinträchtigen.[2] [3]

Für die adjuvante Antibiotikatherapie ist der Nachweis der vorhandenen parodontalpathogenen Keime entscheidend, denn aus der Verifizierung des individuellen Keimspektrums kann der behandelnde Zahnarzt prognostische Schlüsse ziehen und eine spezifische auf das Keimspektrum abgestimmte adjuvante Antibiose erreichen. Wichtig hierfür ist es, über ein möglichst präzises, aussagekräftiges Nachweisverfahren zu verfügen, welches schnell ein Ergebnis liefert und für den Patienten bezahlbar ist.

Diese Studie vergleicht drei verschiedene Nachweisverfahren für die oben genannten Keime: eine „homebrew in vitro-Polymerasekettenreaktion“ mit Agarosegelelektrophorese (im Folgenden auch PCR genannt), den kommerziell angebotenen Hain micro-IDent[®], welcher mit nur geringem Labor- und Zeitaufwand eine preiswerte Diagnose bereitstellen soll, und die Kultivierung. Mittels dieser Verfahren wurden Plaqueproben von 109 Patienten der Poliklinik für Parodontologie des Universitätsklinikums in Münster untersucht.

Im Falle der Polymerasekettenreaktion mit Agarosegelelektrophorese und des Hain microIDent[®] Sondentests handelt es sich um molekularbiologische Verfahren basierend auf dem Nachweis der Bakterien-DNA. Das Nachweisverfahren der Firma Hain Lifescience bedient sich der DNA•Strip[®]-Technologie. Auf einem einzigen Teststreifen können die fünf in dieser Studie zu detektierenden Keime nachgewiesen werden.

Den beiden molekularbiologischen Nachweisverfahren wurde die Kultivierung als mikrobiologisches Diagnostikverfahren und „Goldstandard“ gegenübergestellt.

Die Verfahren wurden auf den qualitativen und im Falle des Hain microIDent[®] Sondentest auch den semiquantitativen Nachweis der Markerkeime parodontaler Erkrankungen überprüft. *T. denticola*, welcher nur sehr schwer zu kultivieren ist, konnte mit den in dieser Studie eingesetzten Kultivierungsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

AEG-Micromat	AEG Electrolux 90429 Nürnberg, Deutschland
Anaerobentöpfe	VWR 64295 Darmstadt, Deutschland
B200 Ultrasonic Cleaner	Branson Ultrasonics Corporation Danbury, CT 06813, USA
Biometra Thermocycler personal	Biometra 37079 Göttingen, Deutschland
Bio-Rad Sub-cell GT-Tray	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA 94547, USA
Brutschrank	Heraeus 63405 Hanau, Deutschland
Eppendorfgefäße	Fa. Eppendorf 22339 Hamburg, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Fa. Eppendorf 22339 Hamburg, Deutschland
Eppendorf Concentrator 5301	Fa. Eppendorf 22339 Hamburg, Deutschland
Eppendorf Mastercycler gradient	Fa. Eppendorf 22339 Hamburg, Deutschland
Eppendorf Thermomixer comfort	Fa. Eppendorf 22339 Hamburg, Deutschland
Erlenmeyerkolben DURAN	Karl Willers Laborbedarf oHG

	48151 Münster, Deutschland
GeneFlash	Syngene Cambridge, CB4 1 TF, United Kingdom
IKA-Combimag RCO Motor	IKA®- Werke 79219 Staufen, Deutschland
Keutz Tray	Keutz Labortechnik 35447 Reiskirchen, Deutschland
Magnetrührstäbchen	neoLab Migge Laborbedarf 69123 Heidelberg, Deutschland
Multiply- μ Strips No./REF 72.991.002	Sarstedt 51582 Nümbrecht, Deutschland
Papierspitzen XXFine	ROEKO GmbH & Co. KG 89129 Langenau, Deutschland
Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf 22339 Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen mit Säule	Sarstedt 51582 Nümbrecht, Deutschland
Stereo-Mikroskop	Carl Zeiss AG 73447 Oberkochen, Deutschland
TwinCubator®	Hain Lifescience GmbH 72147 Nehren, Deutschland
Vacuum-Brutschrank	Heraeus 63405 Hanau, Deutschland
Vortex-Mixer 7-2020	neoLab Migge Laborbedarf 69123 Heidelberg, Deutschland
Watteträger, sterile	Paul Hartmann AG

89522 Heidenheim, Deutschland

2.2 Chemikalien

1kb-DNA-Ladder Invitrogen 15615-024	Invitrogen GmbH 76131 Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar Art. Nr. 1.01614	Merck KGaA 64293 Darmstadt, Deutschland
Alkohol, 96%	Carl Roth GmbH und Co KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
Bacitracin Art. Nr. B-0125	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89552 Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89552 Steinheim, Deutschland
Borsäure	Carl Roth GmbH und Co KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
defibriniertes Schafsblut	WDT 30827 Garbsen, Deutschland
dNTPs	30 20 20 12, Invitex 13125 Berlin, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89552 Steinheim, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH und Co KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH und Co KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
Hain-Kit	Hain Lifescience GmbH

	72147 Nehren, Deutschland
Hefeextrakt Art. Nr. 1.03753.0500	Merck KGaA 64293 Darmstadt, Deutschland
Hemin Art. Nr. 51280	Fluka Chemie AG 9471 Buchs, Schweiz
L-Cystein-HCL Art. Nr. 30129	Fluka Chemie AG 9471 Buchs, Schweiz
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH 31833 Hessisch Oldendorf, Deutschland
15mM und 25mM MgCl ₂	Fa. Eppendorf 22339 Hamburg, Deutschland
molekularbiologisch reines H ₂ O	Fa. Eppendorf 22339 Hamburg, Deutschland
Natriumchlorid Art. Nr. S-9625	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89552 Steinheim, Deutschland
NAM Art Nr. A-3007	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89552 Steinheim, Deutschland
NaOH	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89552 Steinheim, Deutschland
Pepton aus Casein Art. Nr. 4311921	Becton Dickinson 69126 Heidelberg, Deutschland
Pepton aus Sojamehl Art. Nr. LP 0044	Oxoid GmbH 46483 Wesel, Deutschland
Pferdeserum	WDT 30827 Garbsen, Deutschland
Primer	Eurofins MWG Operon

	85560 Ebersberg, Deutschland
Puffer	Fa. Eppendorf 22339 Hamburg, Deutschland
QIAamp DNA Minikit®	Qiagen 40724 Hilden, Deutschland
Ringertabletten 1.15525.0001	VWR International GmbH 64295 Darmstadt, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89552 Steinheim, Deutschland
Taq-Polymerase	Fa. Eppendorf 22339 Hamburg, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan M 121,14g/mol	Carl Roth GmbH und Co KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
Trypticase Soja Agar Art. Nr. 211043	Becton Dickinson 69126 Heidelberg, Deutschland
Vancomycin Art. Nr. V-2002	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89552 Steinheim, Deutschland
Vitamin K Art Nr. V.3501	Sigma-Aldrich Chemie GmbH 89552 Steinheim, Deutschland

2.3 Medien, Puffer und Lösungen

2.3.1 TSBV-Agar

Typische Zusammensetzung (g/Liter):

Trypticase Soja Agar	40,0
Hefeextrakt	1,0
Agar-Agar	2,0
Bacitracin-Stammlösung	1,0ml
Vancomycin-Stammlösung	1,0ml
Pferdeserum	100,0ml

Die Inhaltsstoffe wurden in Aqua dest. gelöst, aufgekocht und autoklaviert. Nachdem der Agar auf 56°C herabgekühlt war, wurden Vancomycin, Bacitracin und Pferdeserum zugegeben.

Stammlösungen

Bacitracin-Stammlösung:	0,75g Bacitracin wurden in 10ml Aqua dest. gelöst und steril filtriert
Vancomycin-Stammlösung	0,05g Vancomycin wurden in 10ml Aqua dest. gelöst und steril filtriert
Pferdeserum	wurde vor Gebrauch bei 56°C 30 Minuten hitzeinaktiviert

2.3.2 Anaerobier-Blutagar nach CDC**Typische Zusammensetzung (g/Liter):**

Pepton aus Casein	15,0
Pepton aus Sojamehl	5,0
Hefeextrakt	5,0
Natriumchlorid	5,0
L-Cystein-HCL/wasserfrei	0,5/0,445
Agar-Agar	16,0
Hemin-Stammlösung	10,0ml
Vitamin K1-Stammlösung	1,0ml
für <i>T. forsythensis</i> zusätzlich NAM-Stammlösung	1,0ml
defibriniertes Schafsblut	50,0ml

Die Inhaltsstoffe wurden in Aqua dest. gelöst, aufgekocht und autoklaviert. Nachdem der Agar auf 48°C herabgekühlt war, wurden Schafsblut und ggf. NAM-Stammlösung zugegeben.

Stammlösungen

Hemin-Stammlösung:	50mg Hemin wurden in 1ml 1N NaOH gelöst (auf dem Wägeschälchen aspiriert), dann 100ml Aqua dest. zugegeben und vermischt
Vitamin K1-Stammlösung 1%	100µ l Vitamin K wurden in 9,9ml 96% igem Alkohol gelöst (beide Stoffe wurden vor dem Pipettieren bei 56°C im Wasserbad erwärmt)
NAM-Stammlösung	von 5ml Aqua dest. wurde 1ml zu 50mg NAM gegeben, bis zur vollständigen Lösung geschwenkt, in die verbliebenen 4ml Aqua dest. gegeben, steril filtriert und in 1ml Portionen bei -20°C eingefroren

2.3.3 Herstellung 1,8%iger Agarosegele

Für Bio-Rad Sub-cell GT-Trays wurden folgende Ingredientien zur Herstellung der Agarosegele benötigt:

Tray-Größe	Agarose in g	1fach TBE Puffer in ml
25,4cm lang (3 Kämme)	4,5	250
20,3cm lang (2 Kämme)	4,1	230
10,1cm lang (1 Kamm)	2,2	120

Tabelle 3: Agarosegelherstellung für Bio-rad-Trays, Inhaltstoffe

Für Keutz-Trays wurde benötigt:

Tray-Größe	Agarose in g	1fach TBE Puffer in ml
25cm lang (3 Kämme)	6,8	380

Tabelle 4: Agarosegelherstellung für Keutz-Trays, Inhaltstoffe

Die angegebene Menge Agarose wurde in einem Erlenmeyerkolben abgewogen, 1fach TBE Puffer hinzugefügt und mit einem Rührfisch auf dem IKA-Combimag RCO Motor vermischt. In der Mikrowelle (AEG-Micromat) wurde das Gemisch für 3 Minuten (bei Agarosegelen für Keutz 5 Minuten) auf maximaler Stufe erhitzt bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Die Lösung wurde danach noch einmal auf dem IKA-Combimag RCO durchmischt. Im Falle, dass noch Schlieren in der Flüssigkeit erkennbar waren, wurde die Flüssigkeit noch einmal in die Mikrowelle gegeben, bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Die schlierenfreie Flüssigkeit kühlte für 10 Minuten ab und wurde dann in das mit drei Kämmen vorbereitete Tray gegossen. Dort kühlte das Agarosegel mindestens eine halbe Stunde aus. Die Kämme wurden entnommen und das Tray mit dem Gel in die mit 1fach TBE Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gegeben. In die drei Reihen Gel-Taschen, die die Kämme nach dem Herausnehmen hinterließen, wurden später die Amplifikations-Ansätze (nach Amplifikation) pipettiert.

2.3.4 Herstellung der Ansätze für die benötigten Puffer und Leiter

10fach TBE Puffer

Für den Ansatz des 10fach TBE Puffers wurden 1500ml Bidest in einem Meßkolben/-zylinder (2000ml Fassungsvermögen) vorgelegt, danach 216g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan M 121,14g/mol, 110g Borsäure, und 18,6g EDTA zugegeben und mit einem Rührfisch vermischt. Nach Lösung der Substanzen wurde mit dem Bidest H₂O auf 2000ml aufgefüllt. Die Lösung wurde in eine Flasche umgefüllt und autoklaviert. Um 1fach TBE Puffer herzustellen wurde der 10fach TBE Puffer mit Bidest verdünnt.

Gebrauchslösung des 1kb-DNA-Leiters

Für den Ansatz von 200µl Gebrauchslösung des 1kb-DNA-Leiters (Stammlösung 1µg/µl) wurden 20µl 1kb-DNA-Ladder mit 40µl Stopp-Puffer und 140 µl H₂O in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert und gevortext.

DNA-Stopp-Puffer

Der DNA-Stopp-Puffer bestand aus 1,85g EDTA, 25g Sucrose, 50mg Bromphenolblau und 50ml sterilem H₂O. Die Inhaltsstoffe wurden zu den vorgelegten 50ml sterilem H₂O in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und durch Vortexen miteinander vermischt.

Sowohl Leiter als auch DNA-Stopp-Puffer wurden bei -20°C im Gefrierfach gelagert.

2.4 Probenentnahme

Die Probenentnahme erfolgte bei Patienten der parodontologischen Abteilung der Zahnklinik des Universitätsklinikums in Münster, bei welchen im Rahmen der Parodontitistherapie eine adjuvante Antibiose indiziert war. Dies waren Patienten mit einer aggressiven Parodontitis oder einer chronischen Parodontitis schweren Schweregrades (s. Kap. 1). Für die Entnahme der Proben wurde dem Probanden nach supragingivaler Plaqueentfernung und Trockenlegung des Zahnes in die am stärksten betroffene parodontale Tasche jedes Quadranten eine Papierspitze eingeführt. Die Papierspitzen wurden für je 20 Sekunden in den Taschen belassen, wieder entnommen und in ein Eppendorfgefäß mit 500µl Ringerlösung gegeben. Mit dieser Patientenprobe wurden die Versuche durchgeführt.

Die Ringerlösung mit den Papierspitzen wurde im Ultraschallbad für 5 Minuten geschallt. Es wurden 400µl in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 100µl der Suspension für die Kultivierung verwendet.

2.5 Kultivierung

Die Kultivierung ist der derzeitige „Goldstandard“ der Nachweisverfahren parodontalpathogener Keime und erfolgt auf bestimmten Nährmedien.

Für die Kultivierung wurden 100µl der noch nicht DNA-extrahierten Proben aus dem Eppendorfgefäß mit 500µl Ringerlösung verwendet. Dies musste direkt nach der Probenentnahme geschehen, da die anaeroben Keime schnell absterben und somit keine exakte Quantifizierung mehr möglich gewesen wäre.

A. actinomycetemcomitans wurde auf TSBV-Agar kultiviert. Dazu wurden 10µl der Originalprobe auf eine Platte und auf eine weitere Platte 10µl einer 1:20-Verdünnung gegeben. Diese wurden daraufhin mit einem sterilen Watteträger ausgestrichen. Die TSBV-Agarplatten mussten 3-5 Tage in CO₂-angereicherter Atmosphäre bei 37°C inkubieren. Der TSBV-Agar enthält Bacitracin und Vancomycin, gegen die *A. actinomycetemcomitans*, im Gegensatz zu den anderen Keimen der Mundhöhle, resistent ist. Der Keim wurde anhand seiner typischen Kolonienmorphologie in Kombination mit der positiven Katalase-Reaktion identifiziert.

Für den Nachweis von *P. gingivalis*, *P. intermedia*, sowie *T. forsythensis* wurden je 10µl einer 1:20-, 1:400- und 1:8000-Verdünnung auf 3 Blutagarplatten mit einem sterilen Watteträger ausgestrichen. Aufgrund seiner Zusammensetzung ist Blutagar ein sehr nährreiches Medium. Die Blutagarplatten mussten im Anaerobentopf bei 37°C inkubieren. Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop anhand der Kolonienmorphologien. Es wurden die Erreger und die Gesamtkeimzahl ausgezählt.

Zusätzlich wurden die aufgrund ihrer spezifischen Kolonienmorphologie ausgewählten Keime aus der Kultivierung mittels PCR verifiziert. Hierfür wurden Kolonien von der Originalplatte abgenommen, in Wasser suspendiert und bei 95°C für 10 Minuten aufgekocht. Diese Ansätze wurden für die PCR verwendet.

War zu wenig Material auf der Originalplatte, mussten Isolate angelegt werden. *T. denticola* war durch die hier angewandte Form der Kultivierung nicht nachzuweisen.

2.6 Isolierung der DNA aus Patientenproben

Beide molekularbiologischen Verfahren, die „homebrew in vitro-Amplifikation“ und der kommerzielle Test der Firma Hain, basieren auf der Isolierung bakterieller DNA aus den Patientenproben. Vor der Isolierung mit dem QIAamp DNA Mini Kit® der Firma Qia-gen wurden die 400µl Proben in den Eppendorfgefäßen im Eppendorf Concentrator 5301 konzentriert. Hierzu wurde die Funktion 3 des Eppendorf Concentrators 5301 verwendet: „Eindampfen wässriger Lösungen“. Für die Versuchsreihe betrug die eingestellte Temperatur 45°C. Der Concentrator lief für 2,5 Stunden, bis die Ringerlösung vollständig ver-

dampft war und ein trockenes Pellet, welches die Bestandteile der parodontalen Tasche beinhaltet, am Boden des Eppendorfgeläßes sichtbar war. Zusätzlich zu den Chargen der Patientenproben wurde eine Wasserprobe mitgeführt um die jeweilige Charge auf Kontaminationen zu überprüfen.

Dem Konzentrieren der Patientenproben im Eppendorf Concentrator folgte die eigentliche Isolierung der Bakterien-DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit[®]. Diese wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Den im Eppendorf Concentrator 5301 konzentrierten Patientenproben wurden je 180µl ATL zugefügt. Die mit ATL versetzten Proben wurden zum Schallen für 5 Minuten in den B200 Ultrasonic Cleaner gegeben. Danach wurden 20µl Proteinase K hinzugefügt und die Probe gevortext. Die Proben blieben zur vollständigen Lyse über Nacht bei 56°C und 350rpm im Eppendorf Thermomixer comfort. Die lysierten Proben wurden mit 200µl AL versetzt, gevortext und bei 70°C im Eppendorf Thermomixer für 10 Minuten inkubiert. Es folgte die Zugabe von 200µl Ethanol. Die Probe wurde gevortext, auf eine Säule gegeben und bei 8000rpm für 1 Minute in der Eppendorf Centrifuge 5415 D zentrifugiert. Diese Säule wurde auf ein neues Eppendorfgeläß gegeben und es wurden 500µl Puffer AW1 zugefügt. Wiederum wurde bei 800rpm 1 Minute lang zentrifugiert. Ein weiteres mal wurde die Säule auf ein neues Eppendorfgeläß gegeben, mit 500µl Puffer AW2 versetzt und bei 13000rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Durch diese Waschvorgänge wurde der Reinheitsgrad der DNA verbessert. Die Säule musste nun absolut trocken sein, sonst wurde ein weiteres Mal zentrifugiert.

Die Säule wurde dann in ein 1,5ml Eppendorfgeläß geben und 200µl Puffer AE dazugegeben. Es wurde eine Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur eingehalten und anschließend bei 8000rpm für 1 Minute zentrifugiert. Nach diesem Vorgang lag die DNA gereinigt in 200µl AE-Puffer zur weiteren Verwendung vor. Diese Lösung wurde direkt für die zu vergleichenden Verfahren eingesetzt oder bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

2.7 PCR mit Agarosegelelektrophorese

Bei der Polymerasekettenreaktion wurden spezifische Abschnitte der Bakterien-DNA in einer Reihe verschiedener Schritte exponentiell vervielfältigt. Durch diese in vitro-Verielfältigung wurde auch die Detektion geringer Ausgangsmengen an DNA möglich. Die Proben durchliefen mehrmals hintereinander einen Denaturierungsschritt, einen Annealingschritt und einen Elongationsschritt.

Um die DNA-Stränge voneinander zu trennen (Denaturierung), wurde die jeweilige Probe zunächst auf 94°C erhitzt. Es folgte eine Temperatursenkung, um eine Anlagerung der für den Keim spezifischen Oligonucleotidprimer an die Einzelstränge zu ermöglichen (Annealingschritt). Dies war der eigentliche molekularbiologische Nachweis des Bakte-

riums. Danach wurde das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase eingestellt. Die Taq-Polymerase bewirkte die Anlagerung der dNTPs an die Primer und deren Verknüpfung zu einem neuen DNA-Strang, komplementär zum Matrizenstrang. Nach einem Zyklus war die doppelte Anzahl an doppelsträngiger DNA vorhanden, welche identisch zu der eingesetzten DNA aus den Patientenproben war. Durch Wiederholung der Zyklen wurde eine Polymerasekettenreaktion erreicht (Amplifikation). Durch den Einsatz spezifischer Primer, die nur mit der DNA des nachzuweisenden Erregers interagierten, konnte gezielt dieser Keim identifiziert werden. Bestimmte Stoffe in einer Probe können eine Amplifikationsinhibition bewirken. Um Inhibitionseffekte und somit falsch negative Ergebnisse auszuschließen, wurde die isolierte DNA aus den Patientenproben „gespiked“ (s. Kap. 2.7.3).

Für die spezifischen Nachweise der parodontalpathogenen Erreger wurden die in Tab.1 aufgeführten Primer¹ eingesetzt.

¹Die Primerbezeichnungen wurden den Originalarbeiten [1], [4] entnommen. Für [1] gilt dabei: die Bezeichnungen wurden aus der Veröffentlichung übernommen. Der Rv-Primer ist eigentlich der Forward-Primer und der Fw-Primer der Reverse-Primer.

Erreger	Primer	[bp]	Gen
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Aa 16S R: 5' - ATG CCA ACT TGA CGT TAA AT - 3' Aa 16S Rv: 5' - TAA CAT CAT TGA CGT TAA CT - 3' Aa 16S F: 5' - AAA CCC ATC TCT GAG TTC TTC - 3' Aa 16S Fw: 5' - TCC CGT ATC TCT ACA GGA TTC - 3'	557 bp	16S rRNA
<i>P. gingivalis</i>	coll 1: 5' - ACA ATC CAC GAG ACC ATC - 3' coll 2: 5' - GAT TCC CTT GCC TAC ATA - 3'	248 bp	<i>prtC</i>
<i>P. intermedia</i>	Pi 1: 5' - TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG - 3' Pi 2: 5' - TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T - 3'	575 bp	16S rRNA
<i>T. forsythensis</i>	Tf 1 (=Bf1): 5' - GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA - 3' Tf 2 (=Bf2): 5' - TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T - 3'	641 bp	16S rRNA
<i>T. denticola</i>	Td 1: 5' - TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT AC - 3' Td 2: 5' - TCA AAG AAG CAT TCC CTC TCT TCT TA - 3'	316 bp	16S rRNA

Tabelle 5: Für den PCR-Nachweis verwendete Primer

Bei den Primern für den *A. actinomycetemcomitans*-Nachweis wurden die beiden Reverse-Primer 1:1 und auch die beiden Forward-Primer 1:1 gemischt.

2.7.1 Pipettieren der PCR-Ansätze

Ansätze	Puffer in μ l (Eppendorf)	Primer in μ l (MWG)	dNTP in μ l (Invitek)	H ₂ O in μ l	Taq in μ l (Eppendorf)
1	2,5	0,5	0,5	16	0,2

Tabelle 6: Pipettierschema

Anhand des Pipettierschemas wurde je nach Anzahl der Ansätze (Proben, plus Positiv- sowie Negativ-Kontrolle) die Menge der benötigten Stoffe mit der Ansatzzahl multipliziert. Für den Mastermix wurden nacheinander molekularbiologisch reines H₂O, Puffer, dNTP, Forward- und Reverse-Primer und zuletzt die Taq-Polymerase in ein Eppendorfgefäß gegeben und gevortext. Für die PCR-Ansätze wurden 20 μ l Mastermix und 5 μ l DNA in Multiply- μ Strips gegeben.

2.7.2 Amplifikations-Programme

Für die Amplifikation der DNA des *P. gingivalis* wurden die Ansätze im Cyclyer initial auf 94°C erhitzt um die DNA-Doppelstränge zu trennen. Diese Temperatur wurde für 3 Minuten beibehalten. Es folgten 34 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt bei 94°C mit einer Dauer von 30 Sekunden, einem Annealingschritt bei 58°C mit einer Dauer von 30 Sekunden und einem Elongationsschritt bei 72°C mit einer Dauer von 50 Sekunden. Abschließend folgte ein Elongationsschritt bei 72°C mit einer Dauer von 3 Minuten, welcher die Polymerasekettenreaktion beendete.

Für die Amplifikation der DNA des *A. actinomycetemcomitans* und der des *P. intermedia* dauerte der initiale Denaturierungsschritt 3 Minuten bei einer Temperatur von 94°C. Es folgten 34 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt von 30 Sekunden bei 94°C, einem Annealingschritt von 30 Sekunden bei 55°C und einem Elongationsschritt von 1 Minute bei 72°C. Beendet wurde die Amplifikation mit einem abschließenden Elongationsschritt von 3 Minuten bei 72°C.

Für die in Amplifikation der DNA der Keime *T. forsythensis* und *T. denticola* wurde ein initialer Denaturierungsschritt mit 3 Minuten Länge bei 94°C durchgeführt. Diesem Denaturierungsschritt folgten 34 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt von 30 Sekunden bei 94°C, einem Annealingschritt von 30 Sekunden bei 60°C und einem Elongationsschritt von 45 Sekunden bei 72°C. Abschließend folgte ein Elongationsschritt von 3 Minuten bei 72°C.

Die DNA-Nachweise wurden im Biometra Tpersonal und im Eppendorf Mastercycler gradient durchgeführt.

2.7.3 Inhibitionskontrolle („Spiken“)

Für die Inhibitionskontrolle wurde jede Patientenprobe noch einmal separat mit *A. actinomycetemcomitans*-DNA einer bekannten Konzentration versetzt (10^4 genomische Äquivalente). 5µl Proben-DNA und 2µl Spike-DNA wurden zum Mastermix gegeben. Der Mastermix bestand aus der selben Zusammensetzung wie im Pipettierschema angegeben, ausgenommen die Wassermenge, welche um die 2µl (die die Spike-DNA einnahm) reduziert wurde. Da die Inhibitoren auf die Taq-Polymerase oder die dNTPs wirkten, war die DNA-Auswahl für die Spike-DNA nicht wesentlich. Die Probe enthielt durch das „Spiken“ in jedem Fall DNA-Material des nachzuweisenden Keims, weshalb ein negatives Ergebnis für diesen Keim auf eine Amplifikations-Inhibition durch die zugegebene DNA-Probe hinwies.

2.7.4 Durchführung der Agarosegelelektrophorese

In die erste Gel-Tasche der ersten Reihe des Gels wurden 10µl 1kb-DNA-Leiter gegeben. Bei der zweiten Reihe des Agarosegels wurde der Leiter in die zweite Tasche gegeben und bei der dritten Reihe entsprechend in die dritte Tasche. So waren die Reihen nach dem Zerschneiden des Gels zu identifizieren. Die PCR-Ansätze wurden dann jeweils ab der ersten Tasche aufgetragen. Dies geschah ebenfalls, um die Reihen und somit auch die unterschiedlichen Keime, welche in den Proben nachgewiesen werden sollten, differenzieren zu können. Sollten verschiedene Keime in ein und der selben Reihe laufen, wurden sie durch das Auftragen von 10µl 1kb-DNA-Leiter voneinander getrennt. Die

PCR-Ansätze wurden mit je 3 μ l Stopp-Puffer vermischt. Mit diesem Gemisch wurden daraufhin die Taschen aufgefüllt.

Nach Befüllen der Taschen wurde der Power-Pac des jeweiligen Gerätes eingeschaltet und die Elektrophorese lief für 70 Minuten bei 180 Volt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wanderten durch Anlegen des Stroms aus den Gel-Taschen in Richtung der positiv geladenen Anode. Anhand der Farbfront des Stopp-Puffers konnte so zusätzlich abgeschätzt werden, wann die Elektrophorese beendet war. Grundsätzlich wandern kleine DNA-Fragmente schnell und große DNA-Fragmente langsam im Gel. Beim Nachweis der amplifizierten DNA-Fragmente lagen alle Banden eines Keims auf einer Höhe, da durch die ausgewählten Primer eine Sequenz bestimmter Länge repliziert wurde. Nach dem Durchlauf wurde das Gel mit einem Skalpell geschnitten, so dass einzelne Gele für die einzelnen Reihen hergestellt waren. Die Gele wurden aus der Kammer genommen und in ein Färbebad (1 μ g Ethidiumbromid/ml TBE Puffer) gegeben. Dort verblieben die Gele für 30 Minuten. Dem Färbebad folgte ein 5-minütiges Entfärbebad (bidest. Wasser) um den Kontrast zu verstärken. Im Färbebad interkalierte das Ethidiumbromid in die DNA-Stränge, so dass diese bei Anregung mit UV-Licht zu leuchten begannen und die DNA-Banden im Gel bei Auflage auf einen UV-Tisch sichtbar wurden und so mit dem GeneFlash ausgewertet und zu Dokumentationszwecken abfotografiert werden konnten.

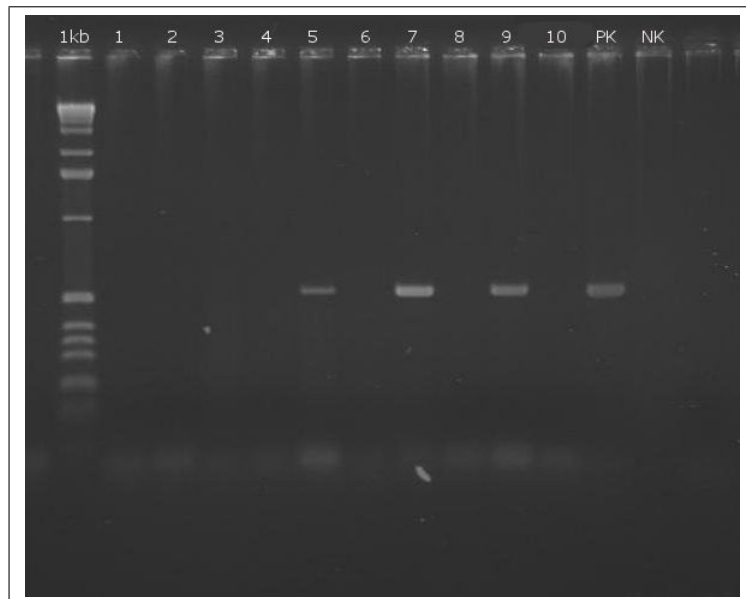


Abbildung 1: Agarosegel für den Nachweis von *A. actinomycetemcomitans*
1kb-DNA-Leiter, 10 PCR-Ansätze, Positiv-Kontrolle (PK) und Negativ-Kontrolle (NK)

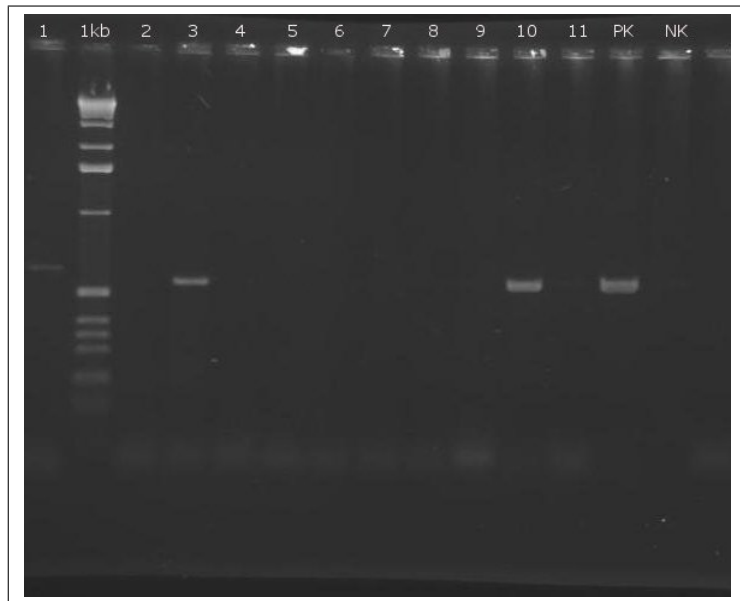


Abbildung 2: Agarosegel für den Nachweis von *P. intermedia*
1kb-DNA-Leiter, 11 PCR-Ansätze, Positiv-Kontrolle (PK) und Negativ-Kontrolle (NK)

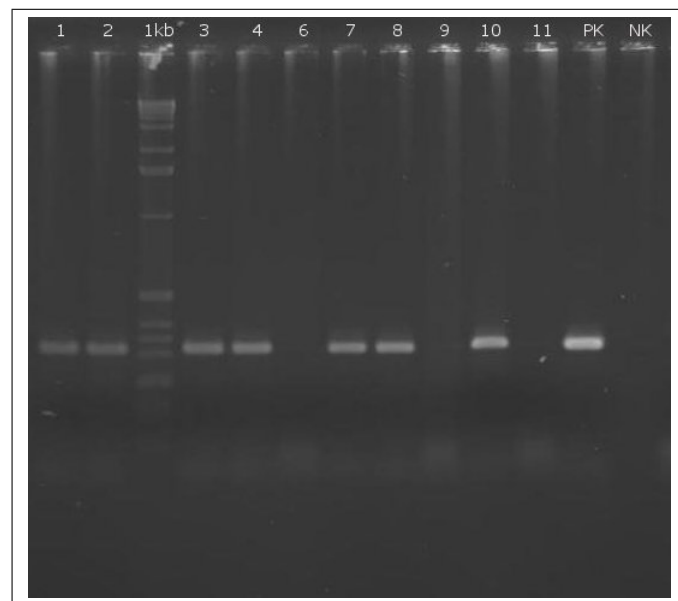


Abbildung 3: Agarosegel für den Nachweis von *T. denticola*
1kb-DNA-Leiter, 11 PCR-Ansätze, PK und NK

2.8 Micro-IDent®

2.8.1 Amplifikation der DNA mit Biotin-markierten Primern

Nach der DNA-Isolierung aus den Patientenproben wurde eine Multiplex-Amplifikation mit Biotin-markierten Primern und eine reverse Hybridisierung durchgeführt. Durch die

Amplifikation der DNA war wie bei der PCR der Nachweis geringer Ausgangsmengen an DNA möglich. Der Amplifikationsmix wurde um Kontaminationen zu vermeiden in einem DNA-freien Raum hergestellt und später die DNA in einem anderen Raum dazugegeben. Zunächst wurde in dem DNA-freien Raum ein Prä-Mix aus 500µl 10fach PCR-Buffer inkl. 15mM MgCl₂, 300µl molekular biologische Grade H₂O und 200µl 25mM MgCl₂ hergestellt. Die Ingredientien wurden in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und gevortext. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank hielt sich der Prä-Mix mehrere Wochen. Vor Gebrauch wurde der Prä-Mix noch einmal gevortext.

Die PCR-Ansätze (Amplifikationsmix mit 5µl DNA-Lösung bzw. H₂O) wurden wie folgt pipettiert: Pro Probe wurden 10µl Prä-Mix, 35µl PN-Mix (Primer-Nukleotid-Mix) aus dem Hain-Kit und 0,2µl Taq-Polymerase in ein steriles Eppendorfgefäß gegeben und gevortext. Aus diesem Eppendorfgefäß wurden pro Probe 45µl in ein Tube (Reaktionsgefäß) gegeben. In dem Raum, der für die Arbeit mit DNA vorgesehen war, wurde in die Tubes zu dem PCR-Ansatz je 5µl DNA-Lösung bzw. H₂O für die Negativkontrolle gegeben.

Im Biometra Thermocycler wurde für den Micro-IDent-Test die DNA amplifiziert und Biotin-markiert. Der initiale Denaturierungsschritt wurde 5 Minuten bei 95°C durchgeführt. Es folgten 10 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt von 30 Sekunden bei 95°C und einem Annealingschritt von 2 Minuten bei 58°C. Daraufhin liefen 20 Zyklen mit einem Denaturierungsschritt von 25 Sekunden bei 95°C, einem Annealingschritt von 40 Sekunden bei 53°C und einem Elongationsschritt von 40 Sekunden bei 70°C. Ein abschließender Elongationsschritt von 8 Minuten bei 70°C beendete die Amplifikation. Die Ansätze wurden auf 4°C abgekühlt, aus dem Gerät entnommen und für den Hain micro-IDent[®] weiterverwendet.

2.8.2 Hybridisierung der DNA

Die Lösungen HYB (Hybridisierungspuffer, grün) und STR (Stringent-Waschlösung, rot) wurden auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt. In die untere Ecke der Wannenkavität wurden 20µl Denaturierungsreagenz (DEN) pipettiert, wiederum 20µl Amplifikat zugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Das Gemisch musste 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Währenddessen wurden die Membranstreifen mit einer Pinzette aus dem Röhrchen entnommen, auf ein sauberes Papiertuch gelegt und im Markierungsbereich beschriftet. Nach der Inkubationszeit von 5 Minuten wurde zu dem Gemisch je 1ml Hybridisierungspuffer (HYB) gegeben. Die Wanne wurde dann vorsichtig geschwenkt bis eine homogene Färbung der Lösung vorlag. Beim Schwenken wurde darauf geachtet, dass keine Lösung in benachbarte Kavitäten gelangte und diese kontaminierte. Die zuvor beschrifteten Membranstreifen wurden so in die Kavitäten gelegt, dass

sie vollständig mit der Lösung bedeckt waren und mit der Farbmarkierung nach oben zeigten. Umgedrehte Streifen wurden mit einer sterilen Pipettenspitze gewendet, die Pipettenspitze danach verworfen. Nach dem Einbringen der Membranstreifen folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei 45°C im TwinCubator[®]. Die Schüttelfrequenz war so eingestellt, dass die Lösung in den Kavitäten verblieb und Kontaminationen ausgeschlossen werden konnten. Während der Hybridisierung banden die Biotin-markierten Amplifikate über Wasserstoffbrückenbindungen an die keimspezifischen Banden auf den Membranstreifen. Nach der Inkubationszeit wurde die Lösung mit Hilfe einer Absauganlage vollständig entfernt. Auch hier wurden die Pipettenspitzen nach Absaugen einer Kavität gewechselt, um die Kontamination zu verhindern. Je 1ml Stringent-Waschlösung (STR) wurde in die Kavitäten pipettiert und die Wanne 15 Minuten bei 45°C im TwinCubator[®] unter Schütteln inkubiert. Nach diesem Schritt wurden alle Komponenten nur noch bei Raumtemperatur verarbeitet. Für das später benötigte Konjugat wurde in dieser Zeit die Lösung CON-C (10µl pro Amplifikat) mit der Lösung CON-D (1ml pro Amplifikat) vermischt. Die Lösung SUB-C (10µl pro Amplifikat) wurde mit der Lösung SUB-D (1ml pro Amplifikat) vermischt und so das Substrat hergestellt, welches wie das Konjugat zu einem späteren Zeitpunkt der Durchführung des Verfahrens Verwendung fand. Das Substrat musste lichtgeschützt aufbewahrt werden. Die Stringent-Lösung wurde, wie auch der Hybridisierungspuffer, komplett durch Absaugen entfernt. Eventuelle Reste wurden durch Abklopfen auf einer saugfähigen Unterlage entfernt. Ebenso wurde mit den Lösungen aus den Waschvorgängen verfahren. Dem ersten Waschvorgang mit je 1ml Rinse-Lösung (RIN) unter stetigem Schütteln folgte die Zugabe von je 1ml Konjugat, welches einen Streptavidin/alkalische Phosphatase-Komplex enthielt, und eine Inkubationszeit von 30 Minuten. Das Konjugat wurde wiederum durch Abschütten und Abklopfen entfernt. Danach wurden drei Waschvorgänge durchgeführt: Zweimal je 1 Minute mit 1ml Rinse-Lösung und einmal 1 Minute mit 1ml destilliertem Wasser. Die Waschvorgänge wurden im TwinCubator[®] durchgeführt, die Lösungen danach abgeschüttet. Es folgte die Zugabe von je 1ml Substrat für die alkalische Phosphatase und eine Inkubationszeit von einer halben Stunde, lichtgeschützt und ohne Schütteln. Die Reaktion des Substrates mit der alkalischen Phosphatase bewirkte eine Farbreaktion an den spezifischen Banden, an welche Amplifikat gebunden hatte. Gestoppt wurde die Substratreaktion durch zweimaliges, einminütiges Waschen mit je 1ml destilliertem Wasser. Zum Trocknen wurden die Membranstreifen mit einer Pinzette aus den Kavitäten genommen und auf ein saugfähiges Papier gelegt. Je nach Konzentration des angefärbten Amplifikats färbten sich die Banden auf den Teststreifen unterschiedlich intensiv, so dass eine semiquantitative Bestimmung des Keims möglich war.

Auf den Streifen befand sich zusätzlich eine Konjugatkontrollzone, welche eine gelun-

gene Konjugatreaktion und Substratreaktion (enzymatische Frabreaktion) anzeigte, sowie eine interne Amplifikationskontrolltöne, welche den korrekten Verlauf der Abarbeitung anzeigte. Zur Qualitätssicherung mussten diese beiden Zonen gefärbt sein.

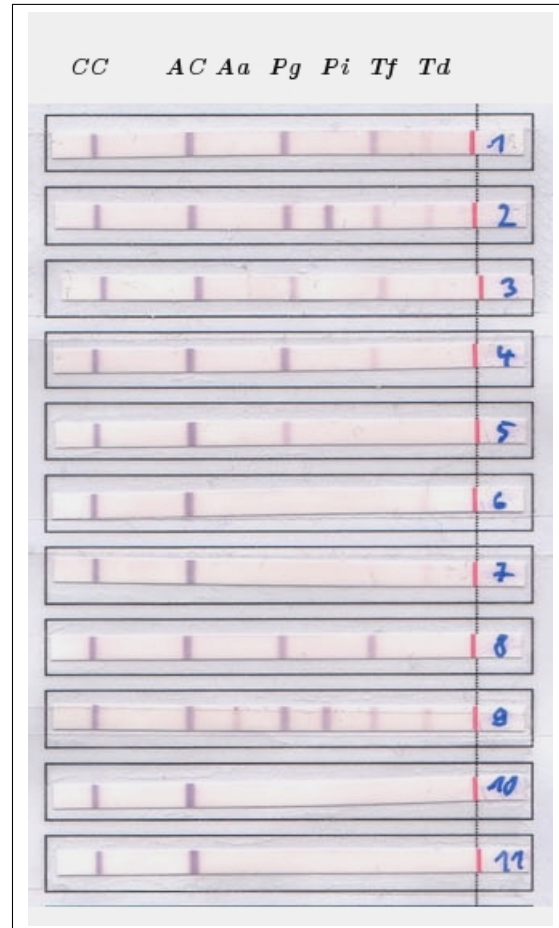


Abbildung 4: 11 Hain Micro-IDent®-Membranstreifen.

CC = Konjugatkontrolle,

AC = Amplifikationskontrolle,

Aa = spezifische Bande für *A. actinomycetemcomitans*,

Pg = spezifische Bande für *P. gingivalis*,

Pi = spezifische Bande für *P. intermedia*,

Tf = spezifische Bande für *T. forsythensis*,

Td = spezifische Bande für *T. denticola*

Jeder der 11 Membranstreifen steht für eine Patientenprobe. Der Nachweis eines Erregers wird durch die Färbung der spezifischen Bande deutlich. Anhand einer mehr oder weniger deutlichen Färbung der Bande ist eine semiquantitative Bestimmung des Erregers möglich.

Die Auswertung erfolgte mit einer Schablone zur exakten Identifizierung der Banden (Hain Lifescience).

2.9 Statistische Methoden

Um die diagnostischen Methoden für den Nachweis der parodontalpathogenen Erreger zu bewerten und zu vergleichen, wurden die Ergebnisse anhand von Vierfeldertafeln ausgewertet. Es wurden Sensitivität, Spezifität, positiv und negativ prädiktiver Wert berechnet. Für die qualitative Auswertung wurde des Weiteren der McNemar-Test zum Vergleich der in den beiden Tests unterschiedlichen Ergebnisse durchgeführt. In einigen Fällen war dies aufgrund zu kleiner Fallzahlen nicht möglich. Die Übereinstimmung der Verfahren wurde zusätzlich anhand des Kappa-Koeffizienten κ geprüft. Die quantitative Auswertung, in welcher der Hain Micro-IDent[®] mit der Kultivierung verglichen wurde, wurde anhand von Scatter-Plots dargestellt. Zudem wurde eine lineare Regression mit dem Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet um auf eine Korrelation der Werte zu überprüfen.

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Anwendung Microsoft Office Excel 2003 vorgenommen.

2.9.1 Sensitivität und Spezifität

Testverfahren	Standard-Verfahren		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	richtig positiv	falsch positiv	gesamt Test-Positive
negativ	falsch negativ	richtig negativ	gesamt Test-Negative
gesamt	gesamt Standard-Positive	gesamt Standard-Negative	Proben gesamt

Tabelle 7: Vierfeldertafel zum Vergleich von Standardverfahren und Testverfahren

Die Sensitivität ist die Wahrscheinlichkeit, mit der ein tatsächlich positiver Sachverhalt auch in einem durchgeführten Test als positiv erkannt wird. Sie bezeichnet den Anteil der richtig positiven Ergebnisse an der Gesamtheit der wirklich positiven Ergebnisse. Ausgedrückt wird dies durch die Formel

$$P(\text{positiv erkannt} \mid \text{tatsächlich positiv}) = \frac{n_{\text{richtig positiv}}}{n_{\text{richtig positiv}} + n_{\text{falsch negativ}}}. \quad (1)$$

Die Spezifität ist die Wahrscheinlichkeit, mit der ein tatsächlich negativer Sachverhalt auch in einem durchgeführten Test als negativ erkannt wird. Sie bezeichnet den Anteil der richtig negativen Ergebnisse an der Gesamtheit der wirklich negativen Ergebnisse. Für die Spezifität gilt folgende Formel

$$P(\text{negativ erkannt} \mid \text{tatsächlich negativ}) = \frac{n_{\text{richtig negativ}}}{n_{\text{richtig negativ}} + n_{\text{falsch positiv}}}. \quad (2)$$

2.9.2 Positiv prädiktiver Wert und negativ prädiktiver Wert

Der positiv prädiktive Wert gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass ein positives Test-Ergebnis auch tatsächlich auf einem positiven Ergebnis beruht. Sie ist der Anteil der richtig als positiv (richtig positiv) erkannten Ergebnisse an der Gesamtheit der als positiv erkannten Ergebnisse. Für den positiv prädiktiven Wert gilt die Formel

$$P(\text{richtig positiv erkannt} \mid \text{positiv erkannt}) = \frac{n_{\text{richtig positiv}}}{n_{\text{richtig positiv}} + n_{\text{falsch positiv}}}. \quad (3)$$

Der negativ prädiktive Wert gibt die Wahrscheinlichkeit dafür an, dass ein negatives Test-Ergebnis auch tatsächlich auf einem negativen Ergebnis beruht. Sie ist der Anteil der richtig negativ erkannten Ergebnisse an der Gesamtheit der als negativ erkannten Ergebnisse:

$$P(\text{richtig negativ erkannt} \mid \text{negativ erkannt}) = \frac{n_{\text{richtig negativ}}}{n_{\text{richtig negativ}} + n_{\text{falsch negativ}}}. \quad (4)$$

Der positiv/negativ prädiktive Wert der diagnostischen Tests zum Nachweis eines Erregers gibt an, wie viele Personen, bei denen der Erreger mittels des betreffenden diagnostischen Verfahrens festgestellt/nicht festgestellt wurde, auch tatsächlich infiziert/nicht infiziert sind.

2.9.3 Konfidenzintervalle

Konfidenzintervalle sind Unsicherheitsbereiche für die Schätzung eines gesuchten Parameters. Das Ergebnis dieser Schätzung weist eine Zufallsschwankung auf, da es vom Umfang der vorliegenden Stichprobe abhängig ist. Um ein Konfidenzintervall berechnen zu können, muss man den gewünschten Vertrauensbereich spezifizieren. In dieser Studie wurden die 95% - Intervalle für die Ereignisse berechnet. Diese Konfidenzintervalle beinhalten den theoretischen Wert des gesuchten Parameters zu 95%. Das bedeutet, dass bei weiteren Untersuchungen das Ergebnis dieser Untersuchung zu den angegebenen Überdeckungswahrscheinlichkeiten in dem berechneten Intervall liegt. Die Größe der Intervalle hängt von der Standardabweichung und dem Stichprobenumfang ab. Berechnet wurden die Konfidenzintervalle mit Excel.

2.9.4 McNemar-Test

Die Vierfeldertafeln können mit dem McNemar-Test ausgewertet werden. Es findet ein Vergleich zwischen den diagnostischen Nachweisverfahren statt, für welchen die Nullhypothese wie folgt lautet: Häufigkeiten in der Grundgesamtheit sind für beide Untersuchungen nicht unterschiedlich, d.h. die Nichtübereinstimmungen anzeigenden Häufigkeiten zeigen nur zufällige Stichprobenschwankungen [26].

Die Nullhypothese wird abgelehnt, d.h. es liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den Nachweismethoden vor, wenn der p-Wert $< 0,05$ ist. Der McNemar-Test wurde mit Excel berechnet. Bei zu geringen Fallzahlen konnte der McNemar-Test nicht durchgeführt werden.

2.9.5 Kappa-Koeffizient κ

Der Kappa-Koeffizient κ zeigt die „zufallskorrigierte Übereinstimmung“ (agreement) der Tests. Die Zufallskorrektur soll die zufällige Übereinstimmung gegenüber der beobachteten Übereinstimmung erfassen.[26]

Für die Beurteilung der Stärke der Übereinstimmung gilt folgende Tabelle [16]:

κ	Übereinstimmung
< 0	keine
0,00-0,20	schwache
0,21-0,40	befriedigende
0,41-0,60	deutliche
0,61-0,80	starke
0,81-1,00	fast vollständige

2.9.6 Scatter-Plot, Regression und Bestimmtheitsmaß

Anhand der Scatter-Plots lässt sich die Anzahl der Kolonien-bildenden Einheiten des gesuchten Keims in einer Patientenprobe der im Hain micro-IDent[®] vorliegenden Bandenintensität zuordnen. Es ist erkennbar, ob die Intensität einer Bande mit einer Anzahl Kolonien-bildender Einheiten korreliert. Wurde der Keim mittels Hain micro-IDent[®] nicht nachgewiesen, wurde keine Bande sichtbar. Schwache Banden wurden als 1 gewertet, mittelstarke Banden als 2 und starke Banden als 3.

Im Idealfall würde eine Probe die keine KbE enthält auch die spezifische Bande des Hain micro-IDent[®] nicht färben und bei einer sehr intensiv gefärbten Bande sollten möglichst viele KbE mit der Kultivierung nachzuweisen sein. Zudem wäre eine nur geringe Streuung der Proben ein gutes Ergebnis.

Um einen Zusammenhang besser beschreiben zu können, wurden zusätzlich zu den Scatter-Plots Regressionen berechnet. Zeigt eine Regression eine Steigung der Geraden, wird deutlich, dass im Hain micro-IDent[®] stärker gefärbte Banden auch mit einer höheren Anzahl Kolonien-bildender Einheiten einhergeht. Das Maß des Zusammenhangs der Parameter wird durch das Bestimmtheitsmaß R^2 beschrieben. R^2 ist das Quadrat des Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson [12] und erklärt, wieviel Prozent der Streuung durch die Regression erklärt werden. Je näher der Wert des Bestimmtheitsmaßes R^2 an dem Wert 1 liegt, desto größer ist der Anteil der Streuung, der durch die Regression erklärt werden kann, desto größer ist demnach der Zusammenhang der Werte. Ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 1 zeigt einen perfekten linearen Zusammenhang. R^2 sagt jedoch nichts über die statistische Signifikanz des ermittelten Zusammenhangs aus.

2.9.7 Signifikanz

Die Signifikanz eines Ergebnisses ist gegeben, wenn nur eine geringe Wahrscheinlichkeit besteht, dass die Ergebnisse durch Zufall zustande gekommen sind. Sie wird mittels statistischer Tests überprüft, welche eine Abschätzung der Irrtumswahrscheinlichkeit ermöglichen. Das Signifikanzniveau (Quantil der maximal zulässigen geschätzten Wahrscheinlichkeit) wird mit α bezeichnet. Bei 5% maximal zulässiger Irrtumswahrscheinlichkeit ist $\alpha = 0,05$. Je geringer die Irrtumswahrscheinlichkeit, desto höher ist die Informationsqualität. Nimmt man das Beispiel $\alpha = 0,05$, ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine richtige Nullhypothese vom Test bestätigt wird $1-\alpha$, also 95%.

3 Ergebnisse

Für die Studie wurden bei 109 an Parodontitis erkrankten Patienten Plaqueproben entnommen. Diese wurden sowohl mit der PCR und dem Hain micro-IDent[®] untersucht, als auch mittels Kultivierung.

Nachgewiesen wurden mit der Kultivierung die Keime *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, und *T. forsythensis*. Mit der PCR und dem Hain micro-IDent[®] wurde zusätzlich *T. denticola* nachgewiesen. Die PCR und der Hain micro-IDent[®] wurden mit der Kultivierung verglichen, da diese als „Goldstandard“ angesehen wird. Zudem wurde die PCR in einem weiteren Vergleich mit dem Hain micro-IDent[®] als „Goldstandard“ gewählt, da mit der Kultivierung der Nachweis von *T. denticola* nicht möglich ist. Die beiden Nachweisverfahren wurden auch für die weiteren vier Keime miteinander verglichen. So konnten die beiden molekularbiologischen Nachweisverfahren einander direkt gegenüber gestellt werden. Diese Verfahren basieren auf dem Nachweis der bakteriellen DNA, während die Kultivierung eine Lebendkeimzahlbestimmung darstellt. Es wurde die Übereinstimmung der Nachweisverfahren überprüft, positiv und negativ prädiktive Werte berechnet und für die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Keime 95% -Konfidenzintervalle (CI95%) berechnet.

Zusätzlich zu der qualitativen Auswertung der Testergebnisse wurden Hain micro-IDent[®] und Kultivierung auch quantitativ ausgewertet und verglichen. Dies war möglich, da der Hain micro-IDent[®] nicht nur anzeigt, ob die Patientenprobe Erreger-DNA beinhaltet, sondern die nachgewiesene DNA anhand der Farbstärke der Banden auch semi-quantitativ ausgewertet werden kann. Verglichen wurden diese mit den nachgewiesenen kolonienbildenden Einheiten der Kultivierung. Der Vergleich wurde in Form von Scatter-Plots visualisiert. Zudem wurde eine Regression berechnet um den Vergleich verifizieren zu können.

3.1 *A. actinomycetemcomitans*

3.1.1 Qualitativer Vergleich

Der *A. actinomycetemcomitans* wurde in 38 der 109 Patientenproben mit der PCR nachgewiesen, mit dem Hain micro-IDent[®] in 26 Patientenproben. Der Keim konnte jedoch nur in 22 Fällen mit Hilfe der Kultivierung nachgewiesen werden.

PCR verglichen mit Kultivierung

Die beiden Nachweisverfahren stimmten in 85,32% ($\kappa = 0,64$) überein. Patientenproben, bei welchen der *A. actinomycetemcomitans* kultiviert werden konnte, wurden zu 100% (CI95%: 84,56%-100%) auch mit der PCR nachgewiesen. 81,61% (CI95%: 71,86%-89,11%) der bei der Kultivierung negativ getesteten Patientenproben wurden bei der PCR ebenfalls negativ auf *A. actinomycetemcomitans* getestet. Demnach lagen für diesen Test eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 81,61% vor.

Nachweis mit PCR	Nachweis mit Kultivierung		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	22	16	38
negativ	0	71	71
gesamt	22	87	109

Tabelle 8: Vergleich von PCR und Kultivierung des Keims *A. actinomycetemcomitans*

Der positiv prädiktive Wert war 57,89%, was bedeutet, dass dieser Anteil an mittels PCR positiv getesteten Proben auch *A. actinomycetemcomitans* in den kulturell positiv getesteten Parodontaltaschen vorhanden war. Bei 100% der negativ getesteten Proben lag auch kulturell kein *A. actinomycetemcomitans* vor (negativ prädiktiver Wert). Der McNemar-Test ergab einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) in der Übereinstimmung der Häufigkeiten der Diagnoseverfahren Kultivierung und PCR.

Hain micro-IDent® verglichen mit Kultivierung

Nachweis mit Hain micro-IDent®	Nachweis mit Kultivierung		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	19	7	26
negativ	3	80	83
gesamt	22	87	109

Tabelle 9: Vergleich von micro-IDent® und Kultivierung des Keims *A. actinomycetemcomitans*

In 90,83% der Ergebnisse stimmte der Hain micro-IDent® mit der Kultivierung überein ($\kappa = 0,73$). In 86,36% (CI95%: 65,01%-97,09%) wurde ein mittels Kultivierung nachgewiesener Keim auch mit dem Hain micro-IDent® nachgewiesen (Sensitivität). Die Spezifität für den *A. actinomycetemcomitans* lag bei 91,95% (CI: 84,12%-96,70%), was bedeutet, dass der Keim, der laut kulturellem Nachweis in der Parodontaltasche nicht existent war, in 91,95% der Fälle auch mittels Hain micro-IDent® nicht nachgewiesen wurde.

Es ergab sich ein positiv prädiktiver Wert von 73,08% und ein negativ prädiktiver Wert von 96,39%.

Der McNemar-Test ergab eine signifikante Übereinstimmung der Häufigkeiten der beiden Nachweisverfahren ($p > 0,05$). Es kann davon ausgegangen werden, dass Unterschiede auf zufälligen Stichprobenschwankungen beruhen.

Hain micro-IDent® verglichen mit PCR

A. actinomycetemcomitans wurde 26-mal mit dem Hain micro-IDent® nachgewiesen und 38-mal mit der PCR.

Nachweis mit Hain micro-IDent®	Nachweis mit PCR		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	24	2	26
negativ	14	69	83
gesamt	38	71	109

Tabelle 10: Vergleich von micro-IDent® und PCR für den Keim *A. actinomycetemcomitans*

Die beiden Verfahren stimmten bezüglich *A. actinomycetemcomitans* zu 85,32% überein ($\kappa = 0,65$). Die von der PCR positiv getesteten Patientenproben wurden zu 63,16% (CI95%: 45,99%-78,19%) auch vom Hain micro-IDent® positiv getestet. Die Patientenproben, in welchen mit Hilfe der PCR kein *A. actinomycetemcomitans* nachgewiesen wurde, wurden zu 97,18% (CI95%: 89,64%-99,80%) auch mittels Hain micro-IDent® negativ auf den Keim getestet. Die Sensitivität betrug somit 63,16%, die Spezifität 97,18%.

Mit einer Wahrscheinlichkeit von 92,31% enthielt eine positiv getestete Patientenprobe auch tatsächlich *A. actinomycetemcomitans*. Der negativ prädiktive Wert betrug 83,13%. Der McNemar-Test ergab eine signifikante Übereinstimmung der Häufigkeiten der Nachweisverfahren ($p > 0,05$).

3.1.2 Quantitativer Vergleich

Im Scatter-Plot ist erkennbar, dass bei einem Vorliegen vieler kulturell detektierter Kolonienbildenden Einheiten auch im Hain micro-IDent® intensiver gefärbte Banden zu sehen sind. Jedoch sind auch Ausreißer zu erkennen.

Aus der positiven Steigung der Regression ist ersichtlich, dass der Hain micro-IDent® stärkere Banden für den *A. actinomycetemcomitans* aufwies, wenn mit der Kultivierung mehr kolonienbildende Einheiten detektiert wurden. Das Bestimmtheitsmaß R^2 betrug für diese Regression 0,21 und zeigte einen geringen Zusammenhang der Werte der beiden Nachweisverfahren.

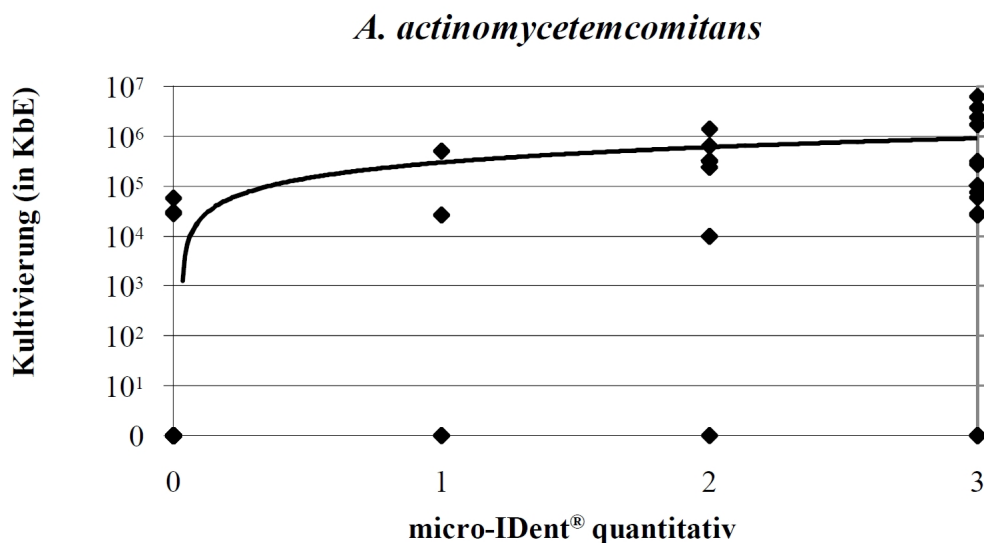


Abbildung 5: Quantitativer Vergleich von Hain micro-IDent® und Kultivierung für *A. actinomycetemcomitans*
 ◆ Patientenprobe, – Regression

Für die weiteren Keime werden im Folgenden die Ergebnisse der Vergleiche in Kurzform aufgeführt.

3.2 *P. gingivalis*

3.2.1 Qualitativer Vergleich

Mit der PCR wurden in 73 Fällen Patienten positiv auf *P. gingivalis* getestet. Mit Hilfe der Kultivierung konnte der Keim in 63 der Patientenproben nachgewiesen werden und mit dem Hain micro-IDent® in 80 der 109 Patientenproben.

PCR verglichen mit Kultivierung

Nachweis mit PCR	Nachweis mit Kultivierung		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	57	17	74
negativ	6	29	35
gesamt	63	46	109

Tabelle 11: Vergleich von PCR und Kultivierung des Keims *P. gingivalis*

Übereinstimmung:	78,90% ($\kappa = 0,55$)
Sensitivität:	90,48% (CI95%: 80,41%-96,42%)
Spezifität:	63,04% (CI95%: 47,55%-76,79%)
positiv prädiktiver Wert:	77,03%
negativ prädiktiver Wert:	82,86%

Der McNemar-Test ergab eine signifikante Übereinstimmung der Häufigkeiten der beiden Diagnostikverfahren ($p > 0,05$).

Hain micro-IDent[®] verglichen mit Kultivierung

Nachweis mit Hain micro-IDent [®]	Nachweis mit Kultivierung		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	61	19	80
negativ	2	27	29
gesamt	63	46	109

Tabelle 12: Vergleich von micro-IDent[®] und Kultivierung des Keims *P. gingivalis*

Übereinstimmung:	80,73% ($\kappa = 0,58$)
Sensitivität:	96,83% (CI95%: 88,00%-99,61%)
Spezifität:	58,70% (CI95%: 43,15%-73,03%)
positiv prädiktiver Wert:	76,25%
negativ prädiktiver Wert:	93,10%

Der McNemar-Test ergab in diesem Fall keine signifikante Übereinstimmung ($p < 0,05$) zwischen den Diagnostikverfahren. Es kann davon ausgegangen werden, dass Unterschiede in den Häufigkeiten nicht rein zufällig sind.

Hain micro-IDent[®] verglichen mit PCR

Nachweis mit Hain micro-IDent [®]	Nachweis mit PCR		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	73	7	80
negativ	1	28	29
gesamt	74	35	109

Tabelle 13: Vergleich von micro-IDent[®] und PCR für den Keim *P. gingivalis*

Übereinstimmung:	92,66% ($\kappa = 0,82$)
Sensitivität:	98,65% (CI95%: 91,92%-100%)
Spezifität:	80% (CI95%: 62,74%-91,86%)
positiv prädiktiver Wert:	91,25%
negativ prädiktiver Wert:	96,55%

Der McNemar-Test konnte aufgrund zu kleiner Fallzahlen nicht durchgeführt werden.

3.2.2 Quantitativer Vergleich

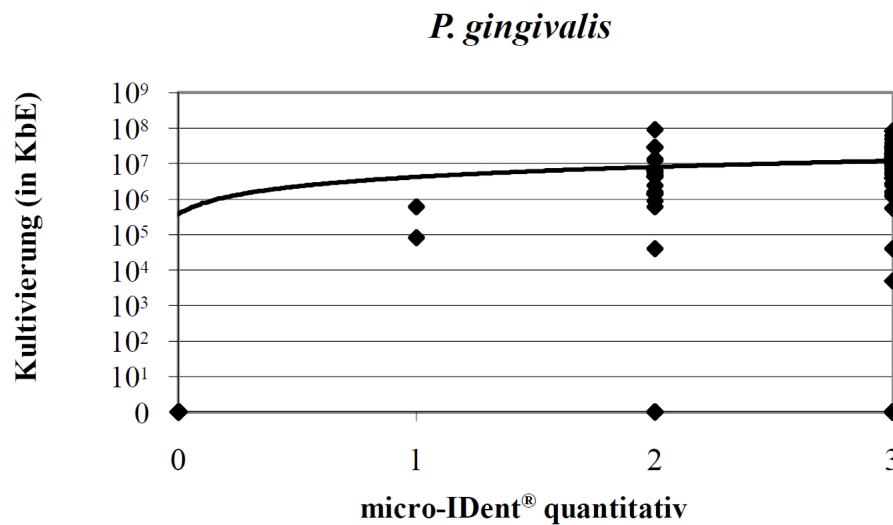


Abbildung 6: Quantitativer Vergleich von Hain micro-IDent® und Kultivierung für *P. gingivalis*
 ◆ Patientenprobe, – Regression

Anhand des Scatter-Plots ist ersichtlich, dass die Punkte bis auf einige Ausreißer relativ dicht beieinander liegen und im Falle einer stärkeren Bande auf dem Strip auch eine höhere Anzahl kolonienbildender Einheiten vorliegt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 lag hier jedoch bei 0,09. Somit liegt kaum ein Zusammenhang zwischen den Werten der beiden Diagnostikverfahren vor.

3.3 *P. intermedia*

3.3.1 Qualitativer Vergleich

Von den 109 Patientenproben konnte in 42 Proben *P. intermedia* mittels Kultivierung nachgewiesen werden. In 75 Fällen wurden Patienten mit Hilfe der PCR positiv auf *P. intermedia* getestet. Mit dem Hain micro-IDent® konnte der Keim in 70 Proben nachgewiesen werden.

PCR verglichen mit Kultivierung

Nachweis mit PCR	Nachweis mit Kultivierung		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	42	33	75
negativ	2	32	34
gesamt	44	65	109

Tabelle 14: Vergleich von PCR und Kultivierung des Keims *P. intermedia*

Übereinstimmung:	67,89% ($\kappa = 0,40$)
Sensitivität:	95,45% (CI95%: 83,72%-99,67%)
Spezifität:	49,23% (CI95%: 36,60%-61,93%)
positiv prädiktiver Wert:	56%
negativ prädiktiver Wert:	94,12%

Der McNemar-Test ergab, dass keine signifikante Übereinstimmung der Häufigkeiten der beiden Diagnostikverfahren bestand ($p < 0,05$).

Hain micro-IDent[®] verglichen mit Kultivierung

Nachweis mit Hain micro-IDent [®]	Nachweis mit Kultivierung		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	40	30	70
negativ	4	35	39
gesamt	44	65	109

Tabelle 15: Vergleich von micro-IDent[®] und Kultivierung des Keims *P. intermedia*

Übereinstimmung:	68,81% ($\kappa = 0,41$)
Sensitivität:	90,91% (CI95%: 78,33%-97,47%)
Spezifität:	53,85% (CI95%: 41,03%-66,30%)
positiv prädiktiver Wert:	57,14%
negativ prädiktiver Wert:	89,74%

Der McNemar-Test ergab auch bei diesen zwei Diagnostikverfahren, dass keine signifikante Übereinstimmung in den Häufigkeiten der Ereignisse für *P. intermedia* bestand ($p < 0,05$).

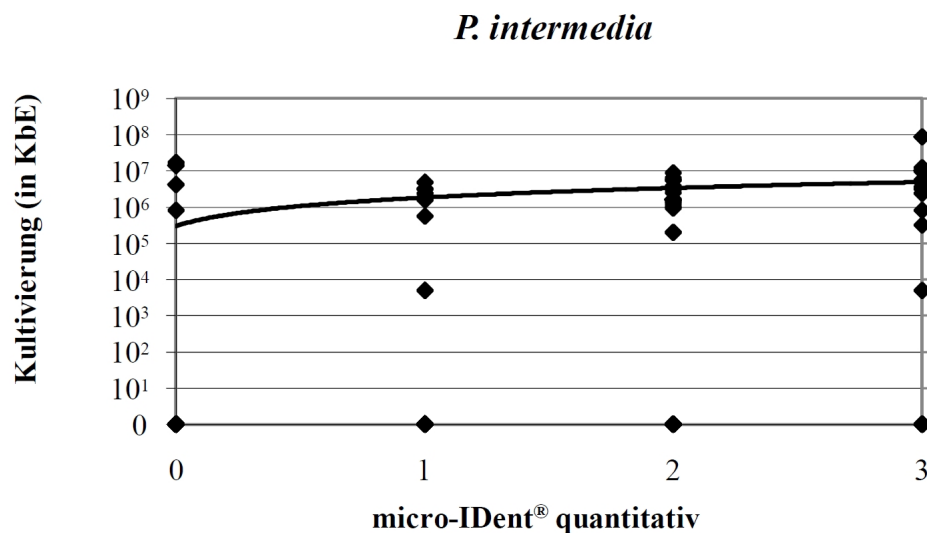
Hain micro-IDent[®] verglichen mit PCR

Nachweis mit Hain micro-IDent [®]	Nachweis mit PCR		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	63	7	70
negativ	12	27	39
gesamt	75	34	111

Tabelle 16: Vergleich von micro-IDent[®] und PCR für den Keim *P. intermedia*

Übereinstimmung:	82,57% ($\kappa = 0,61$)
Sensitivität:	84% (CI95%: 73,72%-91,45%)
Spezifität:	79,41% (CI95%: 61,78%-91,61%)
positiv prädiktiver Wert:	90%
negativ prädiktiver Wert:	94,12%

Der McNemar-Test zeigte für diese beiden Nachweisverfahren eine Übereinstimmung der Häufigkeiten ($p > 0,05$).

3.3.2 Quantitativer Vergleich**Abbildung 7:** Quantitativer Vergleich von Hain micro-IDent[®] und Kultivierung für *P. intermedia*
◆ Patientenprobe, – Regression

Der Scatter-Plot zeigte im Vergleich mit den Scatter-Plots für die anderen Keime relativ viele Ausreißer. Dennoch war auch hier eine positive Steigung des Graphen zu sehen.

Der Zusammenhang zwischen den semiquantitativen Werten des Hain micro-IDent® und den quantitativen Werten der Kultivierung für *P. intermedia* war mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,04$ sehr gering.

3.4 *T. forsythensis*

3.4.1 Qualitativer Vergleich

Mit der PCR wurden alle 109 Patientenproben positiv auf *T. forsythensis* getestet. In 92 dieser Patientenproben wurde der Keim auch mittels Kultivierung nachgewiesen. Der Hain micro-IDent® wies *T. forsythensis* in 105 Patientenproben nach.

PCR verglichen mit Kultivierung

Nachweis mit PCR	Nachweis mit Kultivierung		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	92	17	109
negativ	0	0	0
gesamt	92	17	109

Tabelle 17: Vergleich von PCR und Kultivierung des Keims *T. forsythensis*

Übereinstimmung:	84,40% ($\kappa = 0,00$)
Sensitivität:	100% (CI95%: 96,07%-100%)
Spezifität:	0%(CI95%: 0%-19,51%)
positiv prädiktiver Wert:	84,40%
negativ prädiktiver Wert:	Dividieren durch 0, Berechnung nicht möglich

Der McNemar-Test zeigte keine signifikante Übereinstimmung zwischen den Häufigkeiten der Ergebnisse beider Diagnosikverfahren ($p < 0,05$).

Hain micro-IDent® verglichen mit Kultivierung

Nachweis mit Hain micro-IDent®	Nachweis mit Kultivierung		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	91	13	104
negativ	1	4	5
gesamt	92	17	109

Tabelle 18: Vergleich von micro-IDent® und Kultivierung des Keims *T. forsythensis*

Übereinstimmung:	87,16% ($\kappa = 0,32$)
Sensitivität:	98,91% (CI95%: 94,09%-99,97%)
Spezifität:	23,53% (CI95%: 6,81%-49,90%)
positiv prädiktiver Wert:	87,50%
negativ prädiktiver Wert:	80%

Der McNemar-Test zeigte keine signifikante Übereinstimmung der Häufigkeiten der Ergebnisse von Hain micro-IDent[®] und Kultivierung ($p < 0,05$).

Hain micro-IDent[®] verglichen mit PCR

Nachweis mit Hain micro-IDent [®]	Nachweis mit PCR		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	104	0	104
negativ	5	0	5
gesamt	109	0	109

Tabelle 19: Vergleich von micro-IDent[®] und PCR für den Keim *T. forsythensis*

Übereinstimmung:	95,41% ($\kappa = 0,00$)
Sensitivität:	95,41%
Spezifität:	Dividieren durch 0, keine Berechnung möglich
positiv prädiktiver Wert:	100%
negativ prädiktiver Wert:	0%

Aufgrund zu kleiner Fallzahlen konnte der McNemar-Test nicht durchgeführt werden.

3.4.2 Quantitativer Vergleich

Im Scatter-Plot war erkennbar, dass deutlich höhere Werte von kolonienbildenden Einheiten im Bereich einer „mittleren“ Detektion durch den Hain micro-IDent[®] vorlagen, als im Bereich hoher nachgewiesener Keimzahlen. Auch dieser Graph wies eine positive Steigung auf. Ein Zusammenhang zwischen den Werten war unter Berücksichtigung des Bestimmtheitsmaßes R^2 von 0,01 auszuschließen.

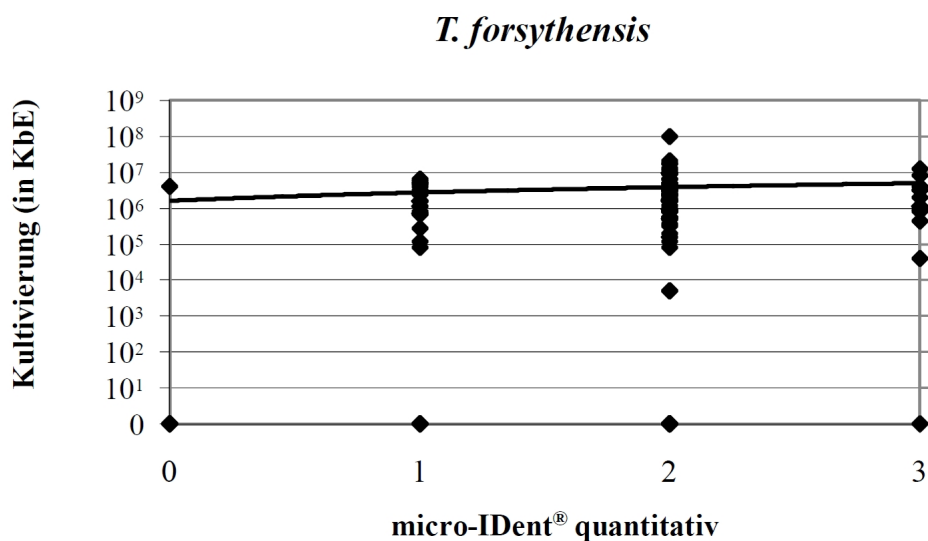


Abbildung 8: Quantitativer Vergleich von Hain micro-IDent® und Kultivierung für *T. forsythensis*
 ◆ Patientenprobe, – Regression

3.5 *T. denticola*

3.5.1 Qualitativer Vergleich

Hain micro-IDent® verglichen mit PCR

T. denticola wurde 96-mal mit dem Hain micro-IDent® nachgewiesen und 101-mal mit der PCR.

Nachweis mit Hain micro-IDent®	Nachweis mit PCR		
	positiv	negativ	gesamt
positiv	95	1	96
negativ	6	7	13
gesamt	101	8	109

Tabelle 20: Vergleich von micro-IDent® und PCR für den Keim *T. denticola*

Übereinstimmung:	93,58% ($\kappa = 0,65$)
Sensitivität:	94,06% (CI95%: 87,52%-97,79%)
Spezifität:	87,50% (CI95%: 47,35%-99,68%)
positiv prädiktiver Wert:	98,96%
negativ prädiktiver Wert:	53,85%

Der McNemar-Test konnte aufgrund zu geringer Fallzahlen nicht durchgeführt werden.

4 Diskussion

Für diese Studie wurden 109 Patienten mit der Diagnose einer aggressiven Parodontitis oder einer chronischen Parodontitis schweren Schweregrades Plaqueproben entnommen. Diese wurden mittels zweier molekularbiologischer Verfahren und einem mikrobiologischen Verfahren auf das Vorhandensein von *A. actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* und *T. denticola* untersucht.

Als „Goldstandard“ wird aktuell das mikrobiologische Verfahren, der kulturelle Nachweis, angesehen. Bei der Kultivierung ist die Art des Transportes der die Keime enthaltenden Proben von Relevanz [29], da die parodontalpathogenen Keime Anaerobier sind und mittels Kultur ausschließlich Lebendkeime nachgewiesen werden können. Zudem ist die Kultivierung abhängig von den Fähigkeiten des Mikrobiologen, die unterschiedlichen Bakterienkolonien zu erkennen und voneinander zu differenzieren. Einige Bakterienarten können nur schlecht oder gar nicht kultiviert werden [18], wie zum Beispiel *T. denticola* mittels der in dieser Studie verwendeten Kultivierungsmethoden. Vorteil der Kultivierung ist, dass eine große Anzahl an Mikroorganismen detektiert werden kann, unter anderem auch solche, nach denen nicht im Speziellen gesucht wurde. Zudem können mittels Kultivierung Antibiogramme erstellt werden [29], die Aufschluss über Resistenzen einzelner Erreger geben. Nachteile sind die hohen Kosten und der für den kulturellen Nachweis erforderliche Zeitaufwand. Daher zeigt sich immer häufiger eine Tendenz zu auf DNA-Isolierung basierenden molekularbiologischen Verfahren wie PCR und Hain micro-IDent®. Die einfache Durchführung, der geringe Zeitaufwand und die Möglichkeit, auch nicht vitale Keime nachzuweisen [29], sind Vorteile dieser Verfahren. In einigen Studien - einschließlich dieser - zeigte sich, dass mittels molekularbiologischer Verfahren mehr Erreger in den Plaqueproben nachgewiesen werden können als mittels Kultivierung. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die „homebrew-PCR“ und der Hain micro-IDent® für jeden nachzuweisenden Keim mehr Plaqueproben positiv testeten als die Kultivierung. Auch Loesche et al. (1992) detektierten mittels von ihnen untersuchter Nachweisverfahren mehr Keime als durch die Kultur. Eine falsch positive Reaktion der auf dem Nachweis von DNA basierenden Methode wurde nicht ausgeschlossen. Jedoch wurde eher vermutet, dass die Kultur eine zu geringe Schätzung des Vorhandenseins von *A. actinomycetemcomitans* und *P. gingivalis* zulässt und in Zukunft neuere, verbesserte Nachweismethoden als Referenzstandard für mikrobiologische Nachweisverfahren dienen könnten [18].

Nicht nur wiesen die molekularbiologischen Diagnostikverfahren in dieser Studie mehr Keime nach als die Kultur, sie zeigten zudem in den Nachweishäufigkeiten eine gute Übereinstimmung, auch wenn sie für keinen der Keime die gleiche Anzahl positiver Plaqueproben aufwiesen. Des Weiteren können mittels DNA-Amplifizierung geringere

Ausgangsmengen der Keime detektiert werden.

Die gute Übereinstimmung von mehr als 84% für die fünf parodontalpathogenen Erreger mag darauf basieren, dass beiden Verfahren eine DNA-Amplifikation zu Grunde liegt und auch Material abgestorbener Keime nachgewiesen werden kann. Die beste Übereinstimmung ($\kappa = 0,82$) zeigten die beiden Diagnostikverfahren für den *P. gingivalis*. Und auch für *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* und *T. denticola* war der Kappa-Koeffizient $>0,6$, was eine starke Übereinstimmung bedeutet.

Bei allen Vergleichen der Übereinstimmung zwischen den unterschiedlichen Nachweisverfahren lagen für den Nachweis von *T. forsythensis* die größten Übereinstimmungen vor (84,40%-95,41%). Der berechnete Kappa-Koeffizient lässt eine Bestätigung dieser Aussage jedoch nicht uneingeschränkt zu, da κ in diesen Fällen 0,00 und 0,32 betrug, welches für bei $\kappa=0,00$ für keine und bei $\kappa=0,32$ für eine befriedigende Übereinstimmung steht. Zudem waren die Übereinstimmungen der Häufigkeiten der Ergebnisse nicht signifikant (McNemar-Test: $p<0,05$). Grund für diese schwachen Übereinstimmungen war, dass insgesamt zu wenig negative Proben gefunden wurden.

Ähnliche Übereinstimmungen wie in dieser Studie liegen auch bei Eick und Pfister (2002) vor. Die Übereinstimmungen des Hain micro-IDent[®] mit der Kultivierung waren 70% für den *A. actinomycetemcomitans*, 76% für den *P. gingivalis*, 62% für *P. intermedia* und 80% für *T. forsythensis*. Diese Übereinstimmungen sind wahrscheinlich geringer, da bei Eick und Pfister (2002) lediglich ein quantitativer Vergleich durchgeführt wurde und nicht qualitativ ausgewertet wurde.

In dieser Studie wurde der Hain micro-IDent[®] ebenfalls quantitativ ausgewertet und mit der quantitativen Auswertung der Kultivierung verglichen. Zu diesem Zweck wurden Scatterplots mit linearen Regressionen erstellt und das Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet. Anhand der Darstellung der Regressionen war ersichtlich, dass die Graphen eine positive Steigung haben und somit bei vorhandenen größeren Zahlen für die KbE auch stärkere Banden auf dem Teststreifen des Hain micro-IDent[®] vorlagen. Jedoch zeigte sich für den quantitativen Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* nur ein geringer Zusammenhang zwischen der Anzahl der KbE und der Bandenstärke des micro-IDent[®] ($R^2= 0,21$) und für den Nachweis von *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *T. forsythensis* kaum ein Zusammenhang ($0,01 \leq R^2 \leq 0,09$). Zudem waren viele Ausreißer vorhanden.

Eick und Pfister (2002) kamen in ihrer Studie hingegen auf gute Werte der Übereinstimmung im quantitativen Vergleich. Sie nutzten eine Einteilung in Grad 0, Grad 1 und Grad 2, wobei 0 für keinen Nachweis, 1 für eine schwache Bande und 2 für eine starke Bande stand. Im Gegensatz dazu wurden in dieser Studie Unterteilungen in vier verschiedene Nachweisstärken gemacht, welches ein Grund für die etwas schlechtere Übereinstimmung sein könnte.

stimmung der Diagnostikverfahren bezogen auf die Quantität sein kann.

Grundsätzlich besteht durch die Möglichkeit des quantitativen Nachweises parodontalpathogener Erreger auch die Möglichkeit, eine Verlaufskontrolle der bakteriellen Belastung im Rahmen der Nachsorge der Parodontitistherapie durchzuführen. Daher sind die Ergebnisse einer durch die Poliklinik für Parodontologie in Münster durchgeführten Studie abzuwarten, welche sich mit dem Nachweis der Keime durch eine quantitative Realtime-PCR beschäftigt.

Der qualitative Vergleich der Verfahren zeigte, dass sowohl „homebrew-PCR“ als auch Hain micro-IDent[®] eine hohe Sensitivität (86,36%-100%) besitzen. Für alle Keime außer *A. actinomycetemcomitans* zeigte der Hain micro-IDent[®] eine Sensitivität von über 90%. Dies sind deutlich größere Sensitivitäten für dieses Diagnostikverfahren als bei Eick und Pfister (2002). Dort lagen die Werte für die Sensitivität des Diagnostikverfahrens zwischen 52% und 86%.

Die Sensitivitäten der PCR für die verschiedenen parodontalpathogenen Erreger lagen in unserer Studie zwischen 90,48% und 100%. Die Spezifitäten der beiden Verfahren liegen deutlich niedriger, was bedeutet, dass weniger tatsächlich negative Proben von den Verfahren negativ getestet wurden. Dies ist jedoch kritisch zu beurteilen, da für die berechneten Spezifitäten die Kultivierung als „Goldstandard“ diente, welche im Gegensatz zu den beiden molekularbiologischen Nachweisverfahren höhere Nachweisgrenzen hat.

Für *T. denticola* ist die Sensitivität des Hain micro-IDent[®] 94,06% und die Spezifität 78,50%. In diesem Fall wurde das Nachweisverfahren mit der PCR verglichen, da der Nachweis des Keims mit den in dieser Studie verwendeten Kultivierungsmethoden sehr schwierig ist.

Der Hain micro-IDent[®] weist für alle zu detektierende Keime höhere positiv prädiktive Werte auf als die PCR. Demnach ist bei dem Nachweis eines Keims durch den Hain micro-IDent[®] die Wahrscheinlichkeit höher (57,14% als niedrigster Wert für *P. i.* und 87,50% für *T. f.*), dass ein positives Testergebnis auch auf dem Vorhandensein des jeweiligen Erregers basiert. Die berechneten negativ prädiktiven Werte sind sowohl bei der PCR als auch bei dem Hain micro-IDent[®] hoch ($\geq 80\%$). Dies gilt im Vergleich mit der Kultivierung als „Goldstandard“. Der negativ prädiktive Wert des Hain micro-IDent[®] für den *T. d.* beträgt 53,85%. Hier wurde die PCR als „Goldstandard“ gesetzt.

Angesichts der Vorteile der PCR und des Hain micro-IDent[®] in Form der schnelleren und vereinfachten Durchführung und der Möglichkeit abgestorbene Keime nachzuweisen [29], bieten sich diese Verfahren im Behandlungsalltag und besonders bei langen Transportwegen an. Zudem bietet der Hain micro-IDent[®], bei dem ein quantitativer Nachweis

aller fünf Keime auf einem einzigen Membranstreifen möglich ist, eine gute Übersichtlichkeit.

Diverse Studien zeigen den Trend, dass kulturunabhängige Diagnostikverfahren in Zukunft eine große Rolle in der Identifikation der Keime spielen werden [18] [7] [36] und sogar „kulturelle Methoden als Goldstandard in der mikrobiologischen Diagnostik ablösen sollten“ [8].

Kein Diagnostikverfahren weist ideale Charakteristika auf [27]. Zum Beispiel erlauben die auf DNA-Detektion basierenden Verfahren nur die Detektion der gesuchten Targets. Andere Keime als die gesuchten können nicht nachgewiesen werden. Eine Untersuchung auf Resistenz gegenüber Antibiotika ist mit diesen Verfahren ebenfalls nicht möglich. Für die Durchführung von experimentellen Studien kann es daher notwendig sein, auf die Kultivierung als Nachweisverfahren zurückzugreifen.

Bei Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Studie kann die Verwendung des Hain micro-IDent[®] und der PCR für den alleinigen qualitativen Nachweis der Erreger in der Therapie empfohlen werden, da diese Verfahren im Vergleich zu der Kultivierung zeitsparend und kostengünstig sind. Die beiden molekularbiologischen Nachweisverfahren zeigen in Bezug auf die Sensitivität und die Spezifität keine großen Unterschiede und können somit gleichermaßen zur mikrobiellen Diagnostik eingesetzt werden. Für den quantitativen Nachweis der Erreger ist der Hain micro-IDent[®] nicht zu empfehlen.

Literatur

- [1] A. Ashimoto, C. Chen, I. Bakker, and J. Slots (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.
- [2] T. Beikler, H. Karch, and T.F. Flemmig (2002). Adjuvante Antibiotika in der Parodontitistherapie. Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten (DGZMK).
- [3] T. Beikler, H. Karch, and T.F. Flemmig (2005). Mikrobiologische Diagnostik in der Parodontitistherapie. Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie (DGP) und der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten (DGZMK).
- [4] A. Bodinka, H. Schmidt, B. Henkel, T.F. Flemmig, B. Klaiber, and H. Karch (1994). Polymerase chain reaction for the identification of *Porphyromonas gingivalis* collagenase genes. *Oral Microbiol Immunol*, 9:161–165.
- [5] D.D. Bosshardt and N.P. Lang (2005). The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res*, 87:9–20.
- [6] B.A. Burt, A.I. Ismail, E.C. Morrison, and E.D. Beltran (1990). Risk factors for tooth loss over a 28-year period. *J Dent Res*, 69:1126–1130.
- [7] A. de Lillo, V. Booth, L. Kyriacou, A.J. Weightman, and W.G. Wade (2004). Culture-independent identification of periodontitis-associated *Porphyromonas* and *Tannerella* populations by targeted molecular analysis. *J Clin Microbiol*, 42:5523–5527.
- [8] S. Eick and W. Pfister (2002). Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*, 29:638–644.
- [9] M.I. Gazi, S.W. Cox, D.T. Clark, and B.M. Eley (1997). Characterisation of protease activities in *Capnocytophaga spp.*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella spp.*, *Treponema denticola* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immunol*, 12:240–248.

- [10] S. Hamlet, R. Ellwood, M. Cullinan, H. Worthington, J. Palmer, P. Bird, D. Narayanan, R. Davies, and G. Seymour (2004). Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. *J Dent Res*, 83:232–235.
- [11] B. Henderson, M. Wilson, L. Sharp, and J.M. Ward (2002). *Actinobacillus actinomycescomitans*. *J Med Microbiol*, 51:1013–1020.
- [12] R. Jeske (1999). Spaß mit Statistik. Oldenbourg, München, Wien, 3. Auflage.
- [13] Y. Kasuga, K. Ishihara, and K. Okuda (2000). Significance of detection of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* in periodontal pockets. *Bull Tokyo dent Coll*, 41:109–117.
- [14] J.W. Kleinfelder, R.F. Müller, and D.E. Lange (1999). Intraoral persistence of *Actinobacillus actinomycescomitans* in periodontally healthy subjects following treatment of diseased family members. *J Clin Periodontol*, 26:583–589.
- [15] J. Korostoff, J.F. Wang, I. Kieba, M. Miller, B.J. Shenker, and E.T. Lally (1998). *Actinobacillus actinomycescomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. *Infect Immun*, 66:4474–4483.
- [16] J.R. Landis and G.G. Koch (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33:159–174.
- [17] L. Liu, X. Wen, H. He, J. Shi, and C. Ji (2003). Species specific DNA probe for the detection of *Porphyromonas gingivalis* from adult chinese periodontal patients and healthy subjects. *J Periodontol*, 74:1000–1006.
- [18] W.J. Loesche, D.E. Lopatin, J. Stoll, N. van Poperin, and P.P. Hujoel (1992). Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: Can culture be considered as the primary reference standard? *J Clin Microbiol*, 30:418–426.
- [19] H.-P. Müller (2006). Parodontologie. Checklisten der Zahnmedizin. Thieme, Stuttgart.
- [20] C. Nonnenmacher, R. Mutters, and L. Flores de Jacoby (2001). Microbiological characteristics of subgingival microbiotain adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. *Clin Microbiol Infect*, 7:213–217.
- [21] B.J. Paster, S.K. Boches, J.L. Galvin, R.E. Ericson, C.N. Lau, V.A. Levanos, A. Sahasrabudhe, and F.E. Dewhirst (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*, 183:3770–3783.

- [22] S. Persson, M.B. Edlund, R. Claesson, and J. Carlsson (1990). The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*, 5:195–201.
- [23] J. Peters et al. (1983). Subacute bacterial endocarditis due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Am J Med Sci*, 286:35–41.
- [24] J. Potempa, A. Banbula, and J. Travis (2000). Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol 2000*, 24:153–192.
- [25] J.D. Rudney, R. Chen, and G.J. Sedgewick (2005). *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res*, 84:59–63.
- [26] L. Sachs and J. Hedderich (2006). *Angewandte Statistik*, 11. Auflage. Springer.
- [27] M. Sanz, L. Lau, D. Herrera, J.M. Morillo, and A. Silva (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.
- [28] L.G. Simonson, C.H. Goodman, J.J. Bial, and H.E. Morton (1988). Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease. *Infect Immun*, 56:726–728.
- [29] M. Sixou (2003). Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Diseases*, 9:54–62.
- [30] J. Slots and R. J. Genco (1984). Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. virulence factors in colonisation, survival and tissue destruction. *J Dent Res*, 63:412–421.
- [31] J. Slots and M. A. Listgarten (1988). *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *A. actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 15:85–93.
- [32] J. Slots, H.S. Reynolds, and R.J. Genco (1980). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun*, 29:1013–1020.
- [33] S.S. Socransky, A.D. Haffajee, M.A. Cugini, C. Smith, and R.L. Kent Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25:134–144.

- [34] A. C. R. Tanner, C. Haffer, G. T. Brathall, R. A. Visconti, and S. S. Socransky (1979). A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J Clin Periodontol*, 6:278–307.
- [35] A.J. van Winkelhoff, B.G. Loos, W.A. van der Reijden, and U. van der Velden (2002). *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*, 29:1023–1028.
- [36] R.C. Williams, J.D. Beck, and S.N. Offenbacher (1996). The impact of new technologies to diagnose and treat periodontal disease. a look to the future. *J Clin Periodontol*, 23:299–305.
- [37] Y. Wu, J. Yan, L. Chen, and Z. Gu (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.
- [38] J. J. Zambon, L. A. Christersson, and J. Slots (1983). *A. actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. prevalence in patients groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol*, 43:707–711.
- [39] J.J. Zambon, L.A. Christersson, and J. Slots (1985). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 12:1–20.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Dag Harmsen bedanken, der mir dieses Thema überlassen hat und mich bei der Durchführung der Dissertation unterstützt und beraten hat. Danke für die gute Betreuung!

Des Weiteren gilt mein Dank Frau Dr. rer. medic. Karola Prior, die mir bei den labortechnischen Arbeiten mit Rat und Tat zur Seite stand und durch ihre Hilfsbereitschaft in allen Fragen einen wesentlichen Beitrag zur Entstehung dieser Dissertation geleistet hat.

Herrn PD Dr. med Alexander Friedrich danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen Dank auch an die Mitarbeiterinnen des mikrobiologischen Labors der Poliklinik für Parodontologie, die mich bei der Durchführung der Verfahren unterstützt haben und die meine Zeit in den Labors zu einer lehrreichen und schönen Erfahrung gemacht haben. Mein Dank gilt Margard Karpisch-Tölke, Anja Schultes und Beate Walters.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in der Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist, begleitet haben. Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund, auf deren Unterstützung immer Verlass ist. Meinem Bruder Thomas danke ich für seine ständige Bereitschaft, mir beratend zur Seite zu stehen.

Lebenslauf

Anhang

Patientendaten und Testergebnisse

Patient	Geschlecht	Diagnose
3074	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3081	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3082	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3083	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3084	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3087	weiblich	generalisierte aggressive Parodontitis
3088	männlich	lokalisierte aggressive Parodontitis
3089	weiblich	generalisierte aggressive Parodontitis
3092	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3095	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3096	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3097	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3100	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3102	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3103	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3104	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3108	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3114	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3115	weiblich	generalisierte aggressive Parodontitis
3116	weiblich	lokalisierte aggressive Parodontitis
3117	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3120	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3121	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3122	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3125	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3126	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3127	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3135	männlich	generalisierte aggressive Parodontitis
3142	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3143	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3144	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades

3145	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3147	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3148	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3149	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3152	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3153	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3154	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3155	weiblich	lokalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3156	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3158	weiblich	generalisierte aggressive Parodontitis
3159	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3160	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3161	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3162	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3167	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3169	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3170	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3171	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3173	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3174	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3175	männlich	generalisierte aggressive Parodontitis
3176	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3177	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3178	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3181	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3184	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3186	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3187	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3188	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3189	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3192	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3193	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3195	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3198	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3199	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3200	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades

3203	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3205	weiblich	generalisierte aggressive Parodontitis
3210	männlich	generalisierte aggressive Parodontitis
3211	männlich	lokalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3213	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3214	weiblich	generalisierte aggressive Parodontitis
3215	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3216	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3217	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3218	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3220	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3221	weiblich	lokalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3222	weiblich	lokalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3223	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3224	weiblich	lokalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3225	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3226	männlich	generalisierte aggressive Parodontitis
3227	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3228	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3229	weiblich	generalisierte aggressive Parodontitis
3230	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3231	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3232	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3233	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3234	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3235	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3236	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3237	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3238	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3243	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3245	männlich	generalisierte aggressive Parodontitis
3246	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3247	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3249	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3251	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3252	männlich	lokalisierte aggressive Parodontitis

3253	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3254	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3256	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3258	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3259	männlich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades
3260	weiblich	generalisierte chronische Parodontitis schweren Schweregrades

Tabelle 21: Geschlecht und Diagnose der Patienten

Patient	<i>A. a.</i>			<i>P. g.</i>			<i>P. i.</i>			<i>T. f.</i>			<i>T. d.</i>		
	P	H	K	P	H	K	P	H	K	P	H	K	P	H	K
3074	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3081	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
3082	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3083	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	
3084	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	
3087	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	
3088	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3089	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	
3092	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	
3095	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3096	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3097	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	
3100	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3102	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
3103	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3104	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	
3108	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	
3114	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
3115	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	
3116	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
3117	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	
3120	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
3121	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
3122	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3125	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
3126	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	

3127	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3135	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
3142	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
3143	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
3144	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
3145	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3147	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3148	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3149	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
3152	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3153	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3154	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
3155	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3156	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
3158	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3159	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
3160	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3161	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3162	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3167	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3169	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3170	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
3171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3173	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
3174	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
3175	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+
3176	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
3177	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+
3178	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
3181	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
3184	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3186	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3187	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3188	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
3189	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
3192	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3193	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-

3195	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3198	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
3199	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+
3200	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3203	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
3205	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3210	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
3211	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
3213	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
3214	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-
3215	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
3216	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
3217	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3218	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3220	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
3221	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
3222	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3223	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3224	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3225	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
3226	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
3227	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
3228	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3229	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
3230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3231	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3232	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3233	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3234	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
3235	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
3236	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3237	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3238	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
3243	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
3245	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
3246	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
3247	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+

3249	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
3251	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3252	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
3253	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
3254	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
3256	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
3258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
3259	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
3260	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Tabelle 22: Einzelbeobachtungen der Studie: K = Kultivierung, P = PCR, H = Hain micro-IDent®

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. a./A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
Bidest	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
H ₂ O	Wasser
kb	Kilobase; =1000 Basenpaare
KbE	Kolonien-bildende Einheit
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimol
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
p	p-Wert (Signifikanz)
P	Wahrscheinlichkeit
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>P. g./P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. i./P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
PN-Mix	Primer-Nucleotid-Mix
Primer	Oligonukleotid, das als Startfragment für eine DNA-Synthese dient
rpm	Umdrehungen pro Minute
Taq-Polymerase	Enzym, welches die Synthese von DNA aus Desoxyribonukleotiden an einer DNA-Matrize katalysiert, isoliert aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	Tris-borat-EDTA-Puffer
<i>T. d./T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. f./T. forsythensis</i>	<i>Tannerella forsythensis</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan; Puffersubstanz
TSBV-Agar	tryptic-soy-serum-bacitracin-vancomycin-Agar
Tube	Reaktionsgefäß
UV	Ultraviolett
vortexen	gründlich mischen mit Hilfe eines Vortex™