

**Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

---

**Untersuchung des in-vitro Resistenzverhaltens  
parodontalpathogener Keime gegenüber Amoxicillin,  
Metronidazol und Clindamycin**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Theresa Wirsing

aus Bad Neustadt an der Saale

**2019**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. dent. Karin C. Huth, MME
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Christine Josenhans PD Dr. med. Dr. med. dent. Sven Otto
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. dent. Maximilian Kollmuß
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	22.10.2019

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>3</b>
1.1	Ätiopathogenese der Parodontitis .....	3
1.2	Mikrobiologische Aspekte der Parodontitis .....	6
1.2.1	Definition und Struktur des oralen Biofilms .....	7
1.2.2	Plauehypothesen .....	7
1.2.2.1	Unspezifische Plauehypothese.....	8
1.2.2.2	Spezifische Plauehypothese.....	9
1.2.2.3	Marker-Keime und parodontopathogene Komplexe .....	9
1.3	Immunopathogenese .....	12
1.3.1	Entstehung gingivaler und parodontaler Läsionen .....	13
1.3.1.1	Initiale Läsion .....	13
1.3.1.2	Frühe Läsion .....	13
1.3.1.3	Etablierte Läsion.....	14
1.3.1.4	Fortgeschrittene Läsion - Parodontitis.....	15
1.3.2	Immunregulierung .....	15
1.4	Klinische Diagnostik .....	16
1.5	Therapiemaßnahmen.....	17
1.5.1	Mechanische Wurzeloberflächenreinigung .....	17
1.5.1.1	Klinische Auswirkungen des SRPs .....	18
1.5.1.2	Mikrobiologische Auswirkungen des SRPs .....	18
1.6	Adjuvante Antibiotikagabe in der Parodontitisbehandlung.....	19
1.6.1	Mikrobiologische Diagnostik .....	19
1.6.2	Indikation adjuvanter Antibiose .....	20
1.7	Problematik der Resistenzentwicklung.....	23
1.7.1	Resistenzmechanismen .....	25
1.7.2	Antibiotika: Wirkmechanismen und Resistenzen.....	26
1.7.2.1	Amoxicillin .....	26
1.7.2.2	Metronidazol.....	28
1.7.2.3	Clindamycin.....	29
<b>2</b>	<b>Fragestellung und Studienziel .....</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methode.....</b>	<b>32</b>
3.1	Patientenkollektiv .....	32

---

3.2	Anamnese und Befund.....	33
3.3	Probenentnahme .....	34
3.4	Kultivierung und Nährmedium.....	34
3.5	Isolierung und Kryokonservierung der Bakterien .....	36
3.6	Bestimmung der Bakterienspezies.....	37
3.6.1	MALDI-TOF-MS-Analyse.....	37
3.6.2	Prinzip und Durchführung des Parident™-Tests.....	39
3.7	Resistenztest: Epsilon-Meter-Test (E-Test) .....	45
3.8	Statistische Auswertung der Sensibilitätsprüfung (E-Test).....	47
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>48</b>
4.1	Daten aus Anamnese und Befund.....	48
4.2	Speziesbestimmung mittels MALDI-TOF-MS-Verfahren.....	49
4.3	Resistenztest (E-Test) der Bakterienstämme gegenüber Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin .....	50
4.4	Auswertung der Antibiotikaempfindlichkeit im paarweisen Vergleich der Bakteriengruppen.....	54
4.5	Mikrobiologische Untersuchung einer Patientenauswahl vor und nach adjuvanter Antibiose und definiertem Untersuchungszeitraum mittels Parident™ .....	57
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>90</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>109</b>
<b>13</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>110</b>

# 1 Einleitung

Das Krankheitsbild der Parodontitis stellt trotz zahlreicher Präventivmaßnahmen eine große Herausforderung im klinischen Alltag des Zahnarztes dar und ist eine der am weitesten verbreiteten Krankheiten des Menschen (Tonetti *et al.*, 2015; Kassebaum *et al.*, 2014). Während die Mundgesundheit und die Kariesinzidenz der deutschen Bevölkerung in den letzten Jahren eine positive Veränderung erfuhr (Jordan *et al.*, 2014; Schiffner *et al.*, 2009; Kassenzahnärztliche Bundesvereinigung und Bundeszahnärztekammer, 2016), zeigt die Prävalenz parodontaler Erkrankungen eine negative Tendenz (Zhan *et al.*, 2014; Holtfreter *et al.*, 2010). Mögliche Ursachen dieser Erscheinung liegen im demographischen Wandel mit einer erhöhten Lebenserwartung und in erfolgreichen prophylaktischen Maßnahmen zum Erhalt der Mundgesundheit bis ins hohe Lebensalter (Jordan *et al.*, 2014). Für die vorhandenen Zähne steigt jedoch das Risiko für parodontale Erkrankungen und die Manifestation einer Parodontitis mit zunehmenden Lebensalter (Micheelis und Schiffner, 2005). Um bei zunehmender Schwere der Erkrankung suffiziente Ergebnisse zu erzielen, können parodontalchirurgische Maßnahmen und eine adjuvante Antibiotikatherapie erforderlich werden (Haffajee *et al.*, 2003b; Heitz-Mayfield *et al.*, 2002). Übermäßig hohe Verschreibungsraten von Antibiotika zur Bekämpfung bakterieller Infektionen aller Art (Konde *et al.*, 2016), führen jedoch zunehmend zu Anpassungsvorgängen und Resistenzentwicklung der Bakterien, welche den gewünschten Therapieeffekt verhindern können (Feres *et al.*, 2002; Levy, 2000). Mit Hilfe mikrobiologischer Verfahren können Bakterienspezies analysiert und anschließend auf mögliche Resistenzen gegenüber bestimmten Antibiotika getestet werden.

## 1.1 Ätiopathogenese der Parodontitis

Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparates, die durch bestimmte Mikroorganismen verursacht wird und mit progressivem Knochen- und Attachmentverlust einhergeht (Deutsche Gesellschaft für Parodontologie, 2014; Armitage, 1999). Durch eine Klassifikation erfolgte in den letzten 17 Jahren eine Einteilung in gingivale Erkrankungen, aggressive und chronische Parodontitiden, die lokalisiert oder generalisiert auftreten können, Parodontitis im Zuge systemischer Erkrankungen, nekrotisierende Parodontitis, Parodontalabszesse und im Zusammenhang mit endodontischen Läsionen stehende Parodontitis und

entwicklungsbedingte oder erworbene Deformitäten und Zustände (Armitage, 1999). Die Erkrankung konnte in Bezug auf den Attachmentverlust in drei Schweregrade von „mild“ (1 - 2 mm) über „moderat“ (3 - 4 mm) bis hin zu „schwer“ ( $\geq 5$  mm) eingeteilt werden und lokalisiert ( $\leq 30\%$  der Zähne betroffen) oder generalisiert ( $> 30\%$  der Zähne betroffen) auftreten (Armitage, 2004).

Auf der EuroPerio9 2018 in Amsterdam wurde eine neue Klassifikation parodontaler und periimplantärer Erkrankungen vorgestellt (Caton *et al.*, 2018; Jepsen, 2018). Basierend auf der Zusammenfassung von Carton und Mitarbeitern (2018), Jepsen (2018) und auf den vier Konsensusberichten (Berglundh *et al.*, 2018; Chapple *et al.*, 2018; Jepsen *et al.*, 2018; Papapanou *et al.*, 2018) wird eine Übersicht der Ergebnisse des „World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions“ aufgeführt. Diese fasst die ursprüngliche Einteilung von Armitage (1999) in „chronische“ und „aggressive“ Parodontitis zu einer Gruppe zusammen, sodass nun drei Formen der Parodontitis differenziert werden können: nekrotisierende Parodontitis, Parodontitis als Manifestation systemischer Erkrankungen und Parodontitis im Allgemeinen – all diejenigen Parodontitiden, die vorher als „chronisch“ bzw. „aggressiv“ klassifiziert wurden. Zur Charakterisierung der Parodontitis wird nun ein „Staging“ – Stadium der Krankheit abhängig vom Schweregrad der Diagnose und auch von der Komplexität der Therapie – und ein „Grading“ – Grad der Erkrankung mit Zusatzinformationen zu Krankheitsprogression und Risiken - zur Anwendung kommen. Das „Staging“ der Parodontitis umfasst eine Einteilung in Stadium I bis IV, wobei klinische und röntgenologische Befunde, röntgenologisch sichtbarer Knochenabbau, vertikale Defekte, Sondierungstiefen, Furkationsbeteiligung, Zahnbeweglichkeit und Zahnverluste aufgrund von Parodontitis erhoben werden. Tabelle 1 verbildlicht die neue Stadieneinteilung der Parodontitis.

Beim „Grading“ der Parodontitis werden Grad A – niedriges Risiko, von Grad B - mittleres Risiko - und Grad C - hohes Risiko - für die Krankheitsprogression unterschieden. Die Grad-Einteilung berücksichtigt auch Risikofaktoren wie Rauchen und metabolische Indikatoren eines Diabetes mellitus. Die Vorteile durch „Staging“ und „Grading“ sollen eine individualisiertere Diagnose und Behandlungsoption ermöglichen. Weiterhin erfolgt eine Einteilung in nekrotisierende parodontale Erkrankungen sowie Endo-Paro-Läsionen und Parodontalabszesse.

Tabelle 2 bildet die Einteilung der Parodontitis in Grad A,B und C sowie die Berücksichtigung weitere Risiko-Aspekte ab.

Parodontitis-Stadium		Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
Schwere	interdentaler CAL an Stelle mit größtem Verlust	1 - 2 mm	3 - 4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
	röntgenologischer Knochenabbau	koronales Drittel (< 15 %)	koronales Drittel (15 - 33 %)	bis ins mittlere oder apikale Wurzelfdrittel	bis ins mittlere oder apikale Wurzelfdrittel
	Zahnverlust	Kein Zahnverlust aufgrund von Parodontitis		Zahnverlust aufgrund von Parodontitis ≤ 4 Zähne	Zahnverlust aufgrund von Parodontitis ≥ 5 Zähne
Komplexität	lokal	Maximale Sondierungstiefe 3 - 4 mm, zumeist horizontaler Knochenabbau	Maximale Sondierungstiefe 4 - 5 mm, zumeist horizontaler Knochenabbau	zusätzlich zur Stadium-II-Komplexität: Sondierungstiefe ≥ 6 mm, vertikaler Knochenabbau ≥ 3 mm, Furkationsbeteiligung Grad II oder III, moderater Kammdefekt	zusätzlich zur Stadium-III-Komplexität: Notwendigkeit für komplexe Rehabilitation wegen: mastikatorischer Dysfunktion; sekundärem okklusalem Trauma; (Zahnbeweglichkeit ≥ Grad 2); schwerer Kammdefekt; Bisskollaps; Zahnwanderung, Auffächerung; weniger als 20 verbleibende Zähne (10 gegenüberliegende Paare)
Ausmaß und Verteilung	Als Deskriptor zum Stadium hinzufügen	Für jedes Ausmaß als lokalisiert (< 30 % der Zähne betroffen), generalisiert oder Molaren-Inzisiven-Muster beschreiben			

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Parodontitis nach neuer Klassifizierung des „World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions“ 2018 nach Papapanou und Mitarbeitern (2018) und Jepsen (2018); CAL= clinical attachment loss

Parodontitis-Grade			Grad A Langsame Progressions-Rate	Grad B Moderate Progressions-Rate	Grad C Schnelle Progressions-Rate
Primäre Kriterien	direkte Evidenz für Progression	longitudinale Daten (röntgenologischer Knochenverlust oder CAL)	Evidenz für keinen Knochenabbau über 5 Jahre	< 2 mm über 5 Jahre	≥ 2 mm über 5 Jahre
	indirekte Evidenz für Progression	Knochenabbau/Alter	< 0,25	0,25-1,0	> 1,0
		Fall-Phänotyp	viel Biofilm-Auflagerungen mit wenig parodontalem Abbau	parodontale Destruktion entspricht Biofilm-Auflagerungen	parodontale Destruktion überschreitet die Erwartung angesichts der Biofilmauflagerungen; spezifisches klinisches Muster legt Perioden schneller Progression und/oder früh einsetzende Erkrankung, d.h. Molaren-Inzisiven-Muster nahe; fehlendes zu erwartendes Ansprechen auf Standardtherapien zur bakteriellen Kontrolle
Grad-Modifikatoren	Risikofaktoren	Rauchen	Nichtraucher	Raucher < 10 Zigaretten / Tag	Raucher ≥ 10 Zigaretten / Tag
		Diabetes	normoglykämisch mit oder ohne vorherige Diagnose von Diabetes	HbA1c < 7,0 bei Diabetes-Patienten	HbA1c ≥ 7,0 bei Diabetes-Patienten

Tabelle 2: Einteilung der Parodontitis in Grad A,B und C unter Berücksichtigung weiterer Risiko-Aspekte nach neuer Klassifizierung des „World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions“ 2018 nach Papapanou und Mitarbeitern (2018) und Jepsen (2018); CAL= klinischer Attachmentverlust; HbA1c = glykiertes Hämoglobin

Bei den parodontal destruierenden Mikroorganismen handelt es sich vorwiegend um eine Gruppe gramnegativer, anaerober oder mikroaerophiler Bakterien, die die Zahn- und Wurzeloberfläche besiedelt (Socransky und Haffajee, 2002; Page und Kornman, 1997). Dazu zählen: Spirochäten, Aktinomyzeten und gramnegative, anaerobe Stäbchen, einschließlich schwarz-pigmentierter *Bacteroides* (*Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*), *Veionella* und fakultativ anaerobe, gramnegative Stäbchen wie *Capnocytophaga*, *Eikenella* und *Actinobacillus spp.* (Slots und Genco, 1984; Socransky *et al.*, 1982; van Palenstein Helderma, 1981). Parodontale Läsionen weisen besonders häufig bestimmte Mikroorganismen auf, zu denen vor allem *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tanerella forsythia* (*T. forsythia*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) und *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) zählen (Holt und Ebersole, 2005; Ezzo und Cutler, 2003).

Diskutiert wird auch der Beitrag einer Gruppe der Herpesviridae zur Entstehung der Parodontitis (Haffajee und Socransky, 2005). Während Page und Schroeder 1976 die Pathogenese der Parodontitis primär noch auf zellulärer Ebene betrachteten (Page und Schroeder, 1976), ist es heutzutage sinnvoll, die Erkenntnisse auf molekulare oder gar genetische Ebene auszuweiten.

Wie viele Krankheiten der Mundhöhle, liegt dem Krankheitsbild der Parodontitis ein multifaktorielles Geschehen zugrunde (Kinane, 1999). Neben dem Nachweis parodontopathogener Keime sind zusätzliche Faktoren wie unzureichende Mundhygiene sowie die Anatomie der Zähne selbst von bedeutender Wichtigkeit (Nunn, 2003). Hinzu kommen exogene Faktoren wie Tabakkonsum (Page und Kornman, 1997), geringe Aufnahme von Calcium und Vitamin D über die Nahrung (Krall *et al.*, 2001) und psychischer Stress durch finanzielle (Genco, 1996) oder soziale Belastung (Moss *et al.*, 1996). Eine genetische Disposition durch Polymorphismen bestimmter Interleukin- und Vitamin-D-Rezeptor-Genotypen (Nunn, 2003) sowie systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus (Kinane und Chestnutt, 1997) gelten ebenfalls als mögliche Risikofaktoren.

## 1.2 Mikrobiologische Aspekte der Parodontitis

Die menschliche Mundhöhle bietet den Bakterien bei einer Temperatur von 36°C und einem langfristig stabilem pH-Wert zwischen 6,75 und 7,25 eine feuchte Umgebung,

die reich an Nährstoffen ist (de Almeida Pdel *et al.*, 2008; Marsh, 2003). Diese Bedingungen stellen für Biofilm-bildende Bakterien eine ideale Voraussetzung dar.

### 1.2.1 Definition und Struktur des oralen Biofilms

Unter dem Begriff des oralen Biofilms versteht man eine strukturierte Gemeinschaft mikrobieller Lebewesen, die sich unter anderem auf Zahn- und Wurzeloberflächen ansiedelt (Jenkinson und Lappin-Scott, 2001).

Die auch als Zahnplaque bezeichnete Auflagerung auf den Zähnen wurde erstmals 1684 von Antoni van Leewenhoek (Leewenhoek, 1684) beschrieben. Eingebettet in eine extrazelluläre Matrix (Glykokalix), ermöglicht der Biofilm, als dreidimensionale Struktur, den Mikroorganismen das Anheften und Wachsen an Oberflächen. Durch die umgebende Glykokalix, eine dicke, hydratisierte und geladene Schicht, fungieren die Mikroorganismen als Einheit, die es ermöglicht, Umwelteinflüssen, den Abwehrmechanismen des Immunsystems und antibiotischen Medikamenten Einhalt zu gebieten (Marsh, 2003; Mah und O'Toole, 2001; Graves *et al.*, 2000). Costerton und Mitarbeiter (1999) schätzten, dass im Biofilm strukturierte Bakterien eine 1000 - 1500fach höhere Resistenz gegenüber Antibiotika aufweisen als planktonische Bakterien.

Möglich wird das einheitliche Agieren der Bakterien nach Waters und Bassler (2005) durch zellübergreifende Kommunikation, Quorum sensing genannt. Mit Hilfe chemischer Signalmoleküle (Autoinducer) können die Zelldichte einer Population gemessen und Prozesse koordiniert werden, die ineffektiv wären, wenn sie nur von einzelnen Bakterien ausgeführt werden würden. Mit steigender Autoinducer-Konzentration wird ein Schwellenwert überschritten, der von den Bakterien erkannt wird und in veränderten Verhaltensweisen und variierender Genexpression resultiert (Waters und Bassler, 2005). Somit kreieren sich die Bakterien ein eigenes Kommunikationsnetzwerk und können ähnlich einem multizellulären Organismus agieren.

### 1.2.2 Plaquehypothesen

Die physiologische Mundflora des Menschen beheimatet nach neuesten Erkenntnissen über 700 verschiedene Bakterienspezies (Aas *et al.*, 2005). Zu dieser Flora gehören neben aeroben und fakultativ bzw. obligat anaeroben Bakterien auch Viren, Pilze und teilweise Protozoen (Schuster, 1999), wobei die Zusammensetzung der Bakterien von

Mensch zu Mensch durch Einflussnahme von Umwelt und Genetik variiert (Listgarten, 1987). Ein großer Teil der Bakterien lebt im Einklang mit dem Wirt und dient der Aufrechterhaltung physiologischer Bedingungen in der Mundhöhle (Saxer und Saxer, 2011). Im gesunden Parodont dominiert dabei eine „benefizielle“ Flora, die vorwiegend aus aeroben, grampositiven Bakterien besteht. Parodontopathogene anaerobe Keime, die in geringen Konzentrationen auch im gesunden Parodont residieren können, werden dabei vom Immunsystem des Wirts unter Kontrolle gehalten (Ximenez-Fyvie et al., 2000). Gerät dieses Gleichgewicht aus benefizieller und potentiell pathogener Flora ins Wanken, können sich krankhafte Prozesse in der Mundhöhle entwickeln (Marsh, 1994).

### 1.2.2.1 Unspezifische Plaquehypothese

Theorien über die Pathogenese oraler Erkrankungen werden bereits seit mehr als 100 Jahren diskutiert (Theilade, 1986; Loesche, 1976; Miller, 1890; Black, 1884). Die Grundlagen dazu beruhten auf Forschungen von Black (1884) und Miller (1890). Es wurde postuliert, dass ein übermäßiges Vorkommen unspezifischer Bakterien zu oralen Infektionen führt und sowohl die Gesundheit der Zähne als auch des Zahnfleisches beeinflusst (Black, 1899; Miller, 1890; Loesche, 1986; Black, 1884). Der zugrundeliegende pathologische Mechanismus konnte aufgrund mangelnder diagnostischer Verfahren keiner Bakterienspezies zugeordnet werden. Es etablierte sich der Begriff der unspezifischen Plaquehypothese (Loesche, 1976). Bei ausbleibender Mundhygiene siedeln sich unspezifische, zur Mundflora gehörende Bakterien im Gingivaspalt an und formieren sich zur Plaque, die bei weiterer Proliferation entzündliche Prozesse und parodontale Läsionen hervorrufen kann (Theilade, 1986; Loe *et al.*, 1965). Dieser Vorgang, der bei Wiederaufnahme der Mundhygiene noch reversibel ist, resultiert nach einer Zeitspanne von zwei bis drei Wochen im klinischen Bild der Gingivitis (Listgarten, 1987; Theilade *et al.*, 1966; Loe *et al.*, 1965). Die Schlussfolgerung daraus war, dass maßgeblich die Masse an Bakterien und nicht deren Pathogenität die Ursache der Erkrankung darstellte (Theilade, 1986; Miller, 1890; Black, 1884). Diese Theorie unterlag der Annahme, dass das Immunsystem des Menschen eine gewisse Menge an Bakterien und deren toxische Produkte toleriere und zu neutralisieren vermag, sich jedoch bei Überschreiten dieser Schwelle ein pathologischer Prozess entwickle (Theilade, 1986). Als notwendig ergab sich aus dieser Erkenntnis die Plaquekontrolle als prophylaktische und eine unspezifische mechanische Entfernung aller vorhandener Plaque als therapeutische Maßnahme (Zambon, 1996;

Theilade, 1986). Diese Methode stellt bis heute einen wichtigen Punkt zur Prophylaxe oraler Erkrankungen dar (Rosier *et al.*, 2014).

#### 1.2.2.2 Spezifische Plaquehypothese

Mit Hilfe neuer wissenschaftlicher Methoden wurde es möglich, bestimmte Bakterienspezies zu kultivieren und gramnegative und grampositive Bakterienspezies zu identifizieren (Theilade *et al.*, 1966). Die Akkumulation spezifischer Bakterien in parodontalen Läsionen ließ darauf schließen, dass orale Erkrankungen durch spezifische Pathogene initiiert werden (Theilade, 1986; Socransky, 1977).

Es herrschte ein Konsens darüber, dass pathogene Bakterien Teil der physiologischen Flora der Mundhöhle sind (Zambon, 1996; Theilade, 1986). Schließlich führte dies zu der Überlegung, dass bestimmte in der Mundhöhle vorkommende Bakterien ein größeres Pathogenitätspotential besitzen als andere Bakterien und somit unterschiedlich stark mit einer Erkrankung assoziiert sind. Da nicht jede Gingivitis fortschreitet und mit Knochen- oder Gewebedefekten einhergeht, nahm man an, dass das Pathogenitätspotential primär durch die Zusammensetzung und die Interaktion der Bakterienspezies innerhalb der Plaque beeinflusst wird (Listgarten, 1987). Diese Annahme entfachte die Diskussion über Marker-Keime und parodontopathogene Komplexe (Rosier *et al.*, 2014; Socransky, 1977).

#### 1.2.2.3 Marker-Keime und parodontopathogene Komplexe

Die vorherrschenden Bakterien der subgingivalen Flora variieren von Patient zu Patient, von Kieferhälfte zu Kieferhälfte und auch von Zeit zu Zeit (Moore *et al.*, 1984). Zu den Parodontalpathogenen werden wie bereits erwähnt insbesondere *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* und *P. intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Camphylobacter rectus* (*C. rectus*) und *Parvimonas micra* (*P. micra*) gezählt (Holt und Ebersole, 2005; Loomer, 2004; van Winkelhoff *et al.*, 2002; Ezzo und Cutler, 2003). Beobachtungen ergaben, dass bestimmte gramnegative Bakterien gemeinsam in subgingivaler Plaque auftreten: *P. gingivalis* und *T. forsythia*, wobei *T. forsythia* den Komplex zu initiieren scheint, *P. gingivalis* und *T. denticola* sowie *F. nucleatum* und *P. intermedia* (Ali *et al.*, 1994; Simonson *et al.*, 1992; Gmur *et al.*, 1989).

Socransky und Mitarbeiter (1998) entwickelten nach Auswertung von über 13.000 subgingivalen Plaqueproben eine Komplextheorie. Parodontalpathogene

Mikroorganismen werden dabei nicht als individuelle Pathogene gesehen, sondern aufgrund ihres gemeinsamen Auftretens in verschiedene Komplexe zusammengefasst. Gemäß der Komplextheorie variiert der Aufbau des subgingivalen Biofilms von der initialen bis hin zur fortgeschrittenen Phase von Parodontalerkrankungen und führt zur Annahme, dass die mikrobielle Besiedelung des Sulkus schrittweise erfolgt (Socransky *et al.*, 2002; Socransky *et al.*, 1998). Die Komplexe und deren Zusammenhänge werden im Pyramidendiagramm in Abbildung 1 veranschaulicht.

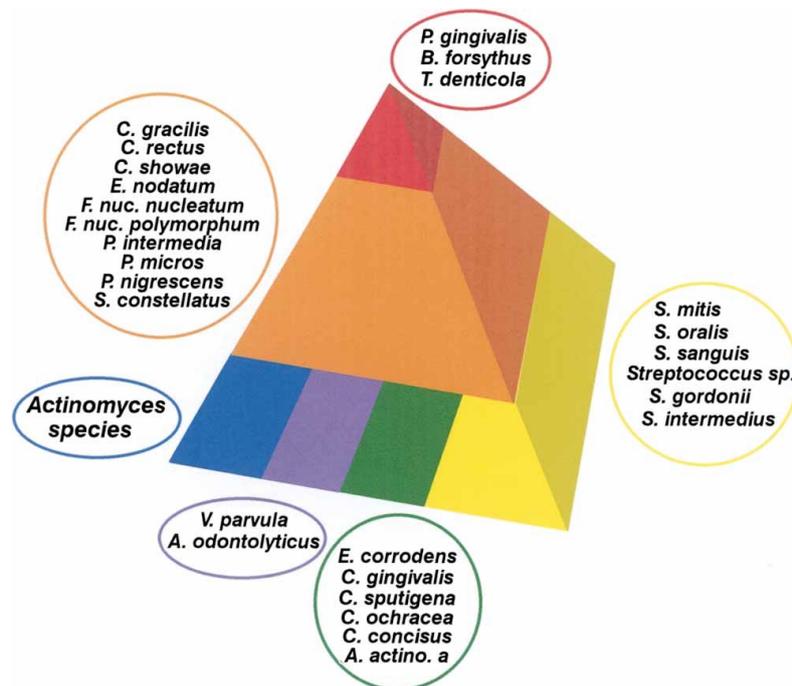


Abbildung 1: Pyramidendiagramm zur Darstellung mikrobiologischer Komplexe und der Beziehungen bestimmter Spezies untereinander (Socransky und Haffajee, 2002; Socransky *et al.*, 1998)

Zum roten Komplex gehören *P. gingivalis*, *T. denticola* und *T. forsythia* (Socransky *et al.*, 1998) Diese Bakterien werden als stark pathogen angesehen, da ihre Anwesenheit mit hohen Taschentiefen, Blutung bei Sondierung (BOP) und ausgedehnter parodontaler Destruktion assoziiert ist (Haffajee und Socransky, 2005; Suda *et al.*, 2004; Socransky *et al.*, 1998). Zudem ist ihre Prävalenz an fortgeschrittenen parodontalen Läsionen erhöht (Holt und Ebersole, 2005; Socransky und Haffajee, 2005; Ezzo und Cutler, 2003).

*P. gingivalis* nimmt eine Schlüsselrolle ein. Mit Hilfe von Fimbrien und Oberflächenadhäsinen auf der äußeren Membran des Bakteriums kann es an Epithelzellen, Fibroblasten und extrazelluläre Matrix binden und so Kontakt mit dem Wirtsorganismus aufnehmen (Amano, 2003). Mit Hilfe zahlreicher Virulenzfaktoren,

darunter die Produktion von Lipopolysacchariden (LPS) und Proteasen, gelingt es dem Bakterium, sich in der subgingivalen Plaque zu etablieren und das Immunsystem des Wirts zu modulieren (How *et al.*, 2016).

Zum orangefarbenen Komplex gehören *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *P. micra*, *C. rectus*, *Camphylobacter showae*, *Camphylobacter gracilis*, *Eubacterium nodatum* und *Streptococcus constellatus*. Diese Bakterien sind stark mit denen des roten Komplexes assoziiert und können als Brückenkeime zwischen den Frühkolonisierern und den sehr pathogenen Keimen des roten Komplexes angesehen werden. Sie vermitteln zwischen den Erstbesiedlern, die als Pyramidenbasis dargestellt sind und den Spätkolonisierern des roten Komplexes.

In tiefen parodontalen Taschen wird *P. intermedia* hierbei immer in Anwesenheit von *F. nucleatum* wiedergefunden (Ali *et al.*, 1994), während andere orange-assoziierte Bakterien wie *P. micra* und *C. rectus* in Plaqueproben von stark gelockerten Zähnen signifikant erhöht sind (Grant *et al.*, 1995). Gleichmaßen erhöht sind *P. intermedia*, *C. rectus* und *P. micra* in Speichelproben von Patienten mit fortgeschrittener Parodontitis (von Troil-Linden *et al.*, 1995).

Dem Bakterium *A. actinomycetemcomitans* wird eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der lokalisierten aggressiven Parodontitis zugeschrieben (Slots und Ting, 1999; Zambon, 1985). Befähigt, sich der Immunabwehr des Wirts zu entziehen (Shenker *et al.*, 1994), penetriert das Bakterium das Weichgewebe (Lepine *et al.*, 1998). Es konnten sechs Serotypen des Bakteriums identifiziert werden, wobei drei in direktem Zusammenhang mit parodontalen Erkrankungen stehen (Bandhaya *et al.*, 2012; Kawamoto *et al.*, 2009). Über bestimmte Virulenzfaktoren wie cytholethal distending toxin (CDT), Leukotoxin oder Lipopolysaccharide (LPS) wird das Immunsystem des Wirts zu pathophysiologischen Entzündungsreaktionen aktiviert (Herbert *et al.*, 2016). Im Tiermodell wurde eine Osteoklasten-Aktivierung durch hochregulierte Entzündungsmediatoren nachgewiesen, die eine Knochenresorption zur Folge hatte (Zhang *et al.*, 2001). Dies könnte die Grundlage dafür sein, dass Patienten in Anwesenheit von *A. actinomycetemcomitans* einen deutlich ausgeprägteren Knochenverlust zu verzeichnen haben, als Patienten, die negativ auf *A. actinomycetemcomitans* getestet wurden (Fine *et al.*, 2007).

### 1.3 Immunopathogenese

Durch Mechanismen der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr wird die kommensale Flora im Gleichgewicht gehalten (Feng und Weinberg, 2006). Wird dieses Gleichgewicht erschüttert, können dominierende pathogene Bakterien das Immunsystem des Menschen durch Produktion schädlicher Noxen stimulieren und einen Entzündungsprozess initiieren (Graves et al., 2000). Die komplexen immunologischen Abläufe gleichen einem zweiseitigen Schwert. Der Gewebeschaden wird nicht nur durch pathogene Bakterien selbst hervorgerufen, die durch Ausscheidung zytotoxischer Substanzen und proteolytischer Enzyme das parodontale Weich- und Knochengewebe zerstören und die Destruktion des Zahnhalteapparates herbeiführen (Amano, 2010). Zutraglich sind die Mechanismen der körpereigenen Immunabwehr, die durch den Bakterienangriff in Gang gesetzt werden (Page und Schroeder, 1976). Da entzündliche Vorgänge aller Art vom menschlichen Körper mit immunologischen Reaktionen bekämpft werden und so den Heilungsprozess initiieren, sind diese per se nicht krankheitsfördernd. Durch exogene oder intrinsische Faktoren wird jedoch eine gesteigerte Immunantwort getriggert und so ein kontinuierlicher destruktiver Prozess gefördert (Page und Kornman, 1997).

Wie Hirschfeld und Wasserman (1978) in einer Langzeitstudie aufgezeigten, wird der Krankheitsverlauf der Parodontitis maßgeblich von der Neigung des Patienten zur Erkrankung bestimmt. Unter Berücksichtigung der Risikofaktoren und der Prognose resultierten trotz simultaner Therapiemaßnahmen stark variierende Behandlungsergebnisse, was die Schlussfolgerung zuließ, dass primär Faktoren der individuellen Neigung zur Erkrankung beitragen.

Experimentelle Studien in den 1960er Jahren zur Entstehung der Gingivitis verdeutlichten, dass Plaque eine Voraussetzung darstellte, die Zeitspanne zur Etablierung der Gingivitis jedoch von Patient zu Patient unterschiedlich war und selbst bei vorhandener Gingivitis nicht zwangsläufig Parodontitis oder Zahnverlust folgten (Loe et al., 1965). Trotz des Konsens über das Pathogenitätspotential parodontaler Komplexe (Socransky et al., 1998) führte das Vorhandensein pathogener Keime nicht zwingend zur Etablierung der Krankheit, was wiederum das Zusammenspiel pathogener Keime mit der individuellen Immunantwort des Patienten in den Vordergrund rückte (Cullinan et al., 2003).

### **1.3.1 Entstehung gingivaler und parodontaler Läsionen**

Auf mikrobiellen Angriff reagiert zunächst das unspezifische (angeborene) Immunsystem, im weiteren Verlauf kommen spezifische (erworbene) Immunreaktionen hinzu. Die nachfolgenden verschiedenen Stadien zur Entstehung der Gingivitis und Parodontitis wurden von Page und Schroeder (1976) - überarbeitet von Ohlrich und Mitarbeitern (2009) - in eine initiale, frühe, und etablierte Gingivitis eingeteilt und diese von der Parodontitis als fortgeschrittene Läsion abgegrenzt, wobei die verschiedenen Stadien nicht immer als eigenständige Phase erkennbar sind.

#### **1.3.1.1 Initiale Läsion**

Die initiale Läsion etabliert sich innerhalb der ersten vier Tage nach Plaqueakkumulation. Sezernierte bakterielle Enzyme und metabolische Endprodukte erhöhen die Permeabilität des Saumeithels und führen schließlich dazu, dass sowohl weitere bakterielle Produkte eindringen können, als auch Sulkusflüssigkeit austreten kann. Die in der Sulkusflüssigkeit enthaltenen Komplementfaktoren werden dabei über den alternativen Weg aktiviert und die Anaphylatoxine C3a und C5a produziert, was zur Freisetzung vasoaktiver Amine aus Mastzellen führt. Diese vasoaktiven Substanzen erhöhen die Gefäßpermeabilität, ein Ödem resultiert. Durch den aus Mastzellen in dieser initialen Phase freigesetzten Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), der Endothelzellen dazu veranlasst, Adhäsionsmoleküle zu bilden, werden schließlich polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) befähigt, in und durch das Saumeithel bis in den Sulkus zu wandern. Während die Bakterien nun einen stark haftenden Biofilm auf der Zahnoberfläche bilden, sezernieren die PMNs im Sulkus lysosomale Proteine, sind dort jedoch unfähig, Bakterien zu phagozytieren (abortive phagocytosis). Diese lysosomalen Enzyme gelangen zurück in das Gewebe und führen zu lokalen Destruktionen des Bindegewebes. Diese Vorgänge sind jedoch nur histologisch nachweisbar.

#### **1.3.1.2 Frühe Läsion**

Nach vier bis sieben Tagen sind im gingivalen Gewebe neben PMNs Makrophagen und Lymphozyten vorherrschend. Diese besitzen neben Phagozytose-Fähigkeiten auch die Eigenschaft, phagozytierte Mikroorganismen gegenüber Lymphozyten und somit Zellen der erworbenen Immunabwehr zu präsentieren. Zudem stehen in der Gingiva dendritische Zellen zur Präsentation körperfremder Antigene gegenüber Lymphozyten

zur Verfügung (Ford *et al.*, 2010). Es bilden sich perivaskuläre entzündliche Infiltrate, die mit dem voranschreitenden Eindringen von bakteriellen Produkten in die erweiterten Interzellularräume den Entzündungsvorgang vorantreiben. Durch die Ausschüttung höherer Konzentrationen von Interleukin-8 (IL-8) werden PMNs durch das Saumepithel in den Gingivavaskulus befördert (Moughal *et al.*, 1992), um dort eine Abwehrwand zu bilden (Attstrom, 1971). In diesen lokalisiert von Bakterien infiltrierten Bereichen liegt ein Kollagenabbau von 60 - 70% vor (Page und Schroeder, 1976).

Bakterien dringen jedoch nur selten in das Gewebe ein und können daher kaum von Makrophagen, die sich im Gewebe befinden, oder von PMNs im Gingivalsulkus eliminiert werden. Durch den persistierenden bakteriellen Angriff wird ein Entzündungsprozess aufrechterhalten, der sich chronifizieren kann. Obwohl das Immunsystem des Wirts meist ein Gleichgewicht zwischen bakteriellem Angriff und immunologischen Gegenreaktionen herzustellen vermag, kann nur durch eine mechanische Reinigung und Entfernung der mikrobiellen Plaque eine Reparatur und Heilung initiiert werden (Ohlrich *et al.*, 2009).

Wie Seymour und Mitarbeiter (1983) beschrieben, werden die immunologischen Vorgänge während der Entwicklung einer Gingivitis primär von T-Lymphozyten dominiert, wobei die Verteilung der CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten bei 2:1 liegt (Seymour *et al.*, 1988). Dringt ein lösliches Antigen in Körpergewebe ein, wird es von dort ansässigen Lagerhans-Zellen erkannt, zu den regionalen Lymphknoten transportiert und dort T-Lymphozyten präsentiert. Die T-Zellen werden sensibilisiert und durch weitere Antigen-Präsentation durch dendritische T-Zellen aktiviert (Ohlrich *et al.*, 2009).

### **1.3.1.3 Etablierte Läsion**

Aus der zunächst stabilen Läsion kann sich eine etablierte Läsion entwickeln. Zugrunde liegt eine veränderte immunologische Reaktion, die bei Progression der Erkrankung mit einer vorwiegend von B-Zellen und Plasmazellen getragenen adaptiven Immunantwort einhergeht (Seymour *et al.*, 1979; Seymour und Greenspan, 1979; Seymour *et al.*, 1978; Mackler *et al.*, 1977). Diese Veränderung kann durch Umwelteinflüsse oder angeborene Neigung zur Entwicklung einer Krankheit bedingt sein (Ohlrich *et al.*, 2009). Eine erhöhte Produktion von Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) führt zu Gewebeschäden und Knochenverlust, während durch die Apikalwanderung des Saumepithels eine parodontale Tasche entsteht (Ohlrich *et al.*, 2009; Page und

Schroeder, 1976). Das Taschenepithel ist durch seine erhöhte Durchlässigkeit weiterhin bakteriellen Angriffen ausgesetzt und durch das Vorherrschen entzündlicher Zytokine wie IL-1, TNF- $\alpha$  und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Gemmell *et al.*, 1997) führt der andauernde Entzündungsprozess zu kontinuierlicher Zerstörung des Gewebes (Reynolds und Meikle, 1997).

#### **1.3.1.4 Fortgeschrittene Läsion - Parodontitis**

Die fortgeschrittene Läsion zeichnet sich durch sowohl histologisch als auch klinisch evidente Gewebedestruktion und Attachmentverlust aus (Ohlrich *et al.*, 2009). Verantwortlich dafür sind die Mechanismen der Immunantwort und deren Auswirkungen: Fibroblasten und Makrophagen werden von IL-1, TNF- $\alpha$  und PGE<sub>2</sub> zur Produktion von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) stimuliert (Cox *et al.*, 2006; Nishikawa *et al.*, 2002), die in ihrer Funktion als Protein-spaltendes Enzym den Kollagenabbau initiieren (Johnson *et al.*, 1998) und folglich den Knochenverlust klinisch sichtbar machen.

#### **1.3.2 Immunregulierung**

Es wurde bereits erläutert, dass das Fortschreiten einer Gingivitis zur Parodontitis auf das Umschalten der T-Zell- zur B-Zell-getragenen Immunantwort zurückzuführen ist. Wie Mosmann und Mitarbeiter (1986) beschrieben, können innerhalb der T-Zellen Th1-Helferzellen (Th1) und Th2-Helferzellen (Th2) unterschieden werden. Th1 regulieren die Immunantwort auf zellulärer Ebene. Sie sezernieren Interleukin 2 (IL-2) und Interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) und sind zudem fähig, B-Zellen und Plasmazellen zu unterdrücken. Th2-Zellen dagegen induzieren den humoralen Abwehrmechanismus über B-Zellen, die Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-10 (IL-10) sezernieren und zudem die zelluläre Immunantwort der T-Zellen unterbinden (Modlin und Nutman, 1993). Daraus lässt sich schließen, dass die definitive Immunantwort vom Gleichgewicht der Th1 und Th2-Helferzellen abhängt. Untersuchungen haben ergeben, dass bei einer Gingivitis und einer stabilen parodontalen Läsion hauptsächlich Th1 an der Immunreaktion beteiligt sind, während bei chronischer Parodontitis vorwiegend Th2 vermitteln (Berglundh und Donati, 2005; Seymour *et al.*, 1993). Dies führt zur Annahme, dass ein starkes, nicht zu Parodontitis neigendes Immunsystem bakterielle Angriffe mit Hilfe von Th1 beantwortet und das Immunsystem eines Menschen mit Veranlagung zur Erkrankung den immunologischen Prozess über Th2 initiiert (Ohlrich *et al.*, 2009). Berglundh und Donati (2005) zeigten in ihren Untersuchungen, dass in

parodontalen Läsionen Plasmazellen und B-Zellen vorherrschend sind und deren Zahl mit zunehmender Schwere im Verlauf weiter zunimmt.

#### 1.4 Klinische Diagnostik

Eine umfassende Diagnostik stellt die Voraussetzung für die Entwicklung eines adäquaten Behandlungsplans jeder Parodontalerkrankung dar (Armitage, 2004). Plaque-induzierte Erkrankungen der Mundhöhle können in gesunde klinische Verhältnisse, Gingivitis und Parodontitis eingeteilt werden, wobei eine Gingivitis bei deutlichen Entzündungszeichen (Rötung, Schwellung, Bluten auf Sondierung), jedoch ohne Attachmentverlust und eine Parodontitis bei vorhandenen Entzündungszeichen und sichtbarer Destruktion des zahntragenden Gewebes und des Knochens diagnostiziert werden kann (Armitage, 2004; Armitage, 1995). Das Krankheitsbild der Parodontitis wird von erhöhten Sondierungstiefen und Taschenbildung begleitet. Die Messung der Sondierungstiefen wird dabei an sechs Stellen je Zahn vorgenommen (Armitage, 1995) und erfolgt vom Gingivalrand bis zum tiefsten sondierbaren Punkt des Parodontalspaltes mit Hilfe der Markierungen einer Parodontalsonde (Armitage, 2004). Dabei muss jedoch der Zustand der Gingiva beachtet werden, um bei Schwellung oder Wucherung das Ausmaß der Sondierungstiefe nicht fehlzuinterpretieren. Tiefe Taschen sind für den Patienten äußerst schwierig zu reinigen und sollten daher in jedem Therapieplan Beachtung finden (Armitage, 1995).

Mit der Messung der Rezession wird ein weiterer Parameter erhoben. Sie bezeichnet den Abstand der Schmelz-Zement-Grenze zum Gingivalrand. Addiert man die Sondierungstiefe eines Zahnes mit dem Wert der Rezession, erhält man den Betrag des klinischen Attachmentverlusts (Armitage, 1995). Zudem erfolgt eine Untersuchung auf Furkationsbeteiligung, Zahnwanderungen und vorhandener Lockerung. Des Weiteren sollte für eine vollständige Einschätzung der parodontalen Verhältnisse eine Röntgendiagnostik vorgenommen werden, bei der die Auswirkungen parodontaler Destruktion interpretiert werden können.

Am häufigsten etabliert sich die Parodontitis in einer chronischen, progredienten Verlaufsform (Papapanou, 1996; Albandar, 2002). Die Patienten sind typischerweise über 30 Jahre alt und weisen lokale Reizfaktoren wie Plaque und Konkremente auf. Die Erkrankung kann lokalisiert oder generalisiert auftreten und nimmt meist einen langsamen und progredienten Verlauf (Brown und Loe, 1993; Papapanou *et al.*, 1989; Loe *et al.*, 1986), der von kurzen Perioden schneller Progredienz mit hohem

Attachmentsverlust gezeichnet sein kann (Socransky et al., 1984). Abzugrenzen davon ist die seltenere Form der aggressiven Parodontitis, assoziiert mit dem pathogenen *A. actinomycetemcomitans*, die vor allem jüngere Menschen betrifft und lokalisiert (mittlere Inzisivi und erste Molaren) oder generalisiert auftreten kann (Albandar und Tinoco, 2002; Papapanou, 1996). Die vorhandene Plaquemenge korreliert hierbei nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung (Armitage, 2004). Die häufig positive Familienanamnese lässt auf eine genetische Veranlagung schließen (Lang et al., 1999).

Neueren Studien zufolge können sich parodontale Erkrankungen nicht nur als Folge systemischer Erkrankungen manifestieren, sondern auch primär als Ursache der Etablierung gelten. Neben der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen und Diabetes können negative Auswirkungen auf die Schwangerschaft (Seymour et al., 2007) auftreten. Auch zwischen rheumatischer Arthritis (Mercado et al., 2001), Präeklampsie (Kumar et al., 2014), onkologischen Vorgängen in der Mundhöhle (Tezal et al., 2009), gastrointestinalen Erkrankungen (Watabe et al., 1998) und einer manifesten Parodontitis wird ein direkter Zusammenhang gesehen.

## **1.5 Therapiemaßnahmen**

In erster Linie sind prophylaktische Maßnahmen im Sinne einer Gingivitisstherapie anzustreben (Chapple et al., 2015). Eine professionell angewandte Plaquekontrolle in Kombination mit einer Mundhygiene-Instruktion des Patienten verbessert dabei signifikant Zahnfleischentzündungen und verringert vorhandene Plaque, wobei eine zusätzliche Reinigung der betroffenen Zahnzwischenräume und eine chemische Plaquekontrolle hilfreich sind.

### **1.5.1 Mechanische Wurzeloberflächenreinigung**

Ist die Parodontitis bereits etabliert, sind neben wiederholten, auf den Patienten individuell angepassten Hygieneunterweisungen und professioneller Entfernung aller Zahnbeläge (Tonetti et al., 2015) weitere Maßnahmen erforderlich. Hierbei hat sich als Standardtherapie die unspezifische Reduktion der Bakterienzahl durch mechanische supra- und subgingivale Reinigung und Glättung der Wurzeloberfläche (SRP = scaling and root planning) mit Hilfe dafür ausgelegter Instrumente bewährt (Eickholz et al., 2005; Kaldahl et al., 1996; Kaldahl et al., 1993; Ramfjord et al., 1987; Hill et al., 1981). Neben Handinstrumenten, Schallinstrumenten und Ultraschallscalern können hierzu auch Laser zum Einsatz kommen, wobei hinsichtlich der klinischen Parameter keine

signifikanten Unterschiede in Bezug auf das verwendete Instrument bestehen (Jepsen *et al.*, 2011; Petersilka *et al.*, 2002; Tunkel *et al.*, 2002).

#### **1.5.1.1 Klinische Auswirkungen des SRPs**

Zur Beurteilung und Verlaufskontrolle klinischer Effekte werden bestimmte Parameter herangezogen (Bolerazska *et al.*, 2016; Heitz-Mayfield *et al.*, 2002). Hierzu zählen insbesondere Sonderungstiefe, Rezession, Attachmentlevel, Parodontaler-Screening-Index (PSI), Approximaler-Plaque-Index (API) und Blutung auf Sondierung (BOP). Cercek und Mitarbeiter (1983) zeigten, dass zwar Plaque- und Blutungsindizes durch Mundhygienemaßnahmen deutlich abnahmen, sich jedoch kaum Erfolge zur Verringerung der Sondierungstiefe einstellten. Erschwerend kommt hinzu, dass parodontale Taschen ab 4 mm Tiefe bei rein supragingivaler Reinigung innerhalb kürzester Zeit wieder rekolonisiert werden (Petersilka *et al.*, 2002). Einige Studien zeigen jedoch, dass eine supragingivale Reinigung eine wichtige Prophylaxemaßnahme zur Vermeidung eines Rezidivs bzw. einer Neuinfektion von inaktiven Resttaschen darstellt (Axelsson *et al.*, 2002; Nyman *et al.*, 1977; Knowles *et al.*, 1979). Eine Erklärung dafür ist, dass sich bei dauerhaft guter Plaquekontrolle eine langsame, aber nachhaltig veränderte mikrobielle Zusammensetzung der Plaque innerhalb der parodontalen Taschen einstellt und zudem prozentual weniger Parodontalpathogene vorzufinden sind (Haffajee *et al.*, 2003a; Petersilka *et al.*, 2002; Feres *et al.*, 2001; Haffajee *et al.*, 2001).

#### **1.5.1.2 Mikrobiologische Auswirkungen des SRPs**

Durch mechanische supra- und subgingivale Reinigung und Glättung der Wurzeloberfläche kann eine Reduktion parodontopathogener Keime in der subgingivalen Plaque erreicht und die schützende Biofilmstruktur der Bakterien desintegriert werden (Mombelli, 2006; Petersilka *et al.*, 2002). Die Wiederbesiedelung der gereinigten Wurzeloberfläche erfolgt durch Erstbesiedler, die überwiegend Teil der nützlichen, nicht pathogenen Flora sind. Diese können die erneute Etablierung pathogener Keime behindern. Somit wird infolge der instrumentellen Therapie die Zusammensetzung der subgingivalen Plaque verändert und nachhaltig beeinflusst. Auch eine Reduktion des roten Komplexes kann mit Hilfe des SRPs erreicht werden (Haffajee *et al.*, 1997; Simonson *et al.*, 1992).

## 1.6 Adjuvante Antibiotikagabe in der Parodontitisbehandlung

Einige Patienten reagieren jedoch nicht zufriedenstellend auf ein konventionelles SRP, sodass der erwünschte klinische Erfolg reduziert ist oder gar ausbleiben kann (Armitage, 2004; Fine, 1994; Rosenberg *et al.*, 1993). Die Anwesenheit von *P. gingivalis* und bzw. *P. gingivalis* zusammen mit *T. denticola* und deren Persistenz nach Parodontistherapie korrelieren klinisch mit parodontaler Destruktion und fortschreitender Erkrankung (Byrne *et al.*, 2009; Chaves *et al.*, 2000). Auch eine Eradikation des Bakteriums *A. actinomycetemcomitans* ist durch Wurzelglättung und Kürretage nicht zufriedenstellend erreichbar (Ishikawa *et al.*, 2002; Eickholz *et al.*, 2001). Daher kann eine begleitende systemische Antibiose zum Erfolg der Behandlung beitragen. Sie dient dazu, die Auswirkungen des mechanischen Débridements zu verstärken und das Immunsystem des Patienten bei der Eliminierung der nach mechanischer Reinigung verbleibenden subgingivalen Pathogene zu unterstützen (van Winkelhoff *et al.*, 1996). Eine adjuvante antimikrobielle Therapie kann daher nach vorheriger mechanischer Reinigung und Desintegration des Biofilms für den Erfolg der Behandlung entscheidend sein (Winkel *et al.*, 2001; van Winkelhoff *et al.*, 1996). Antibiotika, wie Penicillin V, Amoxicillin, Tetracycline, Metronidazol oder Kombinationen werden zahlreich zur Therapie parodontaler Erkrankungen, besonders bei aggressiven und schweren Verlaufsformen der Parodontitis, eingesetzt (Jepsen und Jepsen, 2016; Teughels *et al.*, 2014). Clindamycin dient dabei gelegentlich als Alternative bei Penicillinallergie (Teughels *et al.*, 2014).

### 1.6.1 Mikrobiologische Diagnostik

Um die ursächlichen Bakterien der vorliegenden Infektion kausal behandeln zu können, ist eine mikrobiologische Diagnostik zur Auswahl des geeigneten Antibiotikums sinnvoll (Beikler *et al.*, 2004; Slots und Jorgensen, 2002). Hierzu sollten bereits vor Beginn der Therapie Proben der supra- und subgingivalen Plaqueflora entnommen werden, die umso repräsentativer sind, je mehr Plaqueproben zur mikrobiologischen Untersuchung pro Patient gesammelt wurden (Loomer, 2004). Zur Analyse und zum Nachweis von Parodontitisekeimen kommen im Labor neben molekularbiologischen Verfahren (Polymerasekettenreaktion [PCR] und darauf basierende Techniken wie RT-PCR [Realtime-Polymerasekettenreaktion], mit DNA-Sonden, Koloniehybridisierung sowie Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung [FISH]), auch Immuntests (ELISA, Immunfluoreszenz), Kultivierung mit biochemischen Tests und/oder Serodiagnostik

zum Einsatz (Loomer, 2004). Ein vielversprechender Ansatz zur Eignung in der mikrobiologischen Diagnostik stellt die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie mit Flugzeitanalyse (MALDI-TOF-MS) dar, mit deren Hilfe Bakterien innerhalb weniger Minuten direkt aus kultivierten Kolonien identifiziert werden können (Wieser *et al.*, 2012). Die Methode kommt im Rahmen der Studie zur Anwendung.

Auf der Basis mikrobiologischer Diagnostik können so spezifische potentiell pathogene Keime mit Hilfe adjuvanter Antibiotika gezielt bekämpft werden und die klinischen Resultate dadurch deutlich verbessert werden (Worch *et al.*, 2001; Worch und Listgarten, 1998; Renvert *et al.*, 1996).

### **1.6.2 Indikation adjuvanter Antibiose**

Eine zusätzliche Gabe von Antibiotika sollte einer strengen Indikation unterliegen, da eine systemische Anwendung nicht nur Nebenwirkungen, sondern auch Veränderungen der physiologischen Bakterienflora und mikrobielle Resistenzen zur Folge haben kann (Seymour und Hogg, 2008). Die Stellungnahme der American Academy of Periodontology (AAP) zur Indikation adjuvanter Antibiotika in der Parodontistherapie wurden von Slots und Mitarbeitern (2004) zusammengefasst. Zu den möglichen Indikationen zählen: aggressive Parodontitis, schwere chronische Parodontitis, therapierefraktäre Parodontitis, parodontaler Abszess mit Ausbreitung in benachbarte Logen, Fieber und/oder Lymphadenopathie, nekrotisierende ulzerierende Gingivitis oder Parodontitis mit ausgeprägter Allgemeinsymptomatik, moderate und schwere Parodontitis bei systemischer Erkrankung oder beeinträchtigtem Immunsystem. Patienten mit akuten und schwerwiegenden parodontalen Infektionen (parodontale Abszesse, akute nekrotisierende Gingivitis/Parodontitis) profitieren ebenfalls von einer adjuvanten Antibiotikagabe. Bei plaqueassoziiierter Gingivitis und milden bis moderaten Parodontalläsionen konnte sich eine adjuvante Antibiotikatherapie zur Unterstützung der supra- und subgingivalen Reinigung nicht erweisen (Slots und Jorgensen, 2002; Ciancio, 2002). Mombelli und Mitarbeiter (Mombelli *et al.*, 2015) zeigten, dass eine adjuvante Antibiose den Bedarf chirurgischer Maßnahmen deutlich senken kann. Es wird auch diskutiert, dass eine alleinige Gabe von Antibiotika zur Therapie parodontaler Erkrankungen eine Verbesserung der klinischen Ergebnisse erzielen kann (Lopez *et al.*, 2006; Mombelli, 2006).

Wenige Studien suggerieren, dass einige Patienten mit einem bestimmten Bakterien-Profil von einer adjuvanten Antibiose profitieren können und diese somit nur bei Vorhandensein spezifischer Bakterien indiziert ist. Dazu zählen Patienten mit lokalisierter aggressiver Parodontitis, die positiv auf *A. actinomycetemcomitans* getestet wurden (Saxen und Asikainen, 1993) und Patienten mit chronischer Parodontitis und vorhandenen *A. actinomycetemcomitans* und/oder *P. gingivalis* (Flemmig *et al.*, 1998) oder mit einem Anteil von mehr als 10% Spirochäten in den entnommenen subgingivalen Plaqueproben (Loesche *et al.*, 1984). Cionca und Mitarbeiter (2010) zeigten jedoch, dass eine zusätzliche systemische Antibiotikagabe unabhängig von dem Vorhandensein bestimmter Bakterienspezies, wie *A. actinomycetemcomitans* oder *P. gingivalis* positive klinische Ergebnisse erzielt. Diverse Studien belegen die Wirksamkeit einer adjuvanten Antibiose (Guerrero *et al.*, 2014; Heitz-Mayfield, 2009; Rooney *et al.*, 2002) nach Indikationsstellung, wobei noch darüber diskutiert wird, welches das effektivste Präparat hinsichtlich klinischer und mikrobiologischer Ergebnisse darstellt (Herrera *et al.*, 2012; Mdala *et al.*, 2012). Eine einheitliche internationale Richtlinie zur Dosierung und Einnahmedauer ist daher nicht vorhanden.

Tabelle 3 zeigt eine Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) bezüglich der Anwendung adjuvanter Antibiotika in der Parodontitistherapie hinsichtlich der Dosierungsempfehlung und des Wirkspektrums (Beikler *et al.*, 2003). Abgebildet sind die Antibiotikakonzentrationen in der Gingivalflüssigkeit bei systemischer Verabreichung, ausgedrückt in Vielfachen der in-vitro minimalen Hemmkonzentration (MHK<sub>90</sub>); +: 10<sup>1</sup>fach; ++: 10<sup>2</sup>fach.

	A.a.	T.f.	P.g.	P.i.	E.c.	P.n.	Dosierung
Amoxicillin	+	+	++				3 x 500 mg/d, 14 Tage
Metronidazol		++	+	+		++	3 x 400 mg/d, 7 Tage
Ciprofloxacin	+				+		2 x 250 mg/d, 10 Tage
Doxycyclin		+			+		1 x 200 mg/d, 1 Tage 1 x 100 mg/d, 18 Tage
Tetracyclin	+	+	+				4 x 250 mg/d, 21 Tage
Clindymaycin		++				+	4 x 300 mg/d, 7 Tage
Metronidazol & Amoxicillin	+	++	++	+		++	3 x 400 mg/d, 7 Tage & 3 x 500 mg/d, 7 Tage
Metronidazol & Ciprofloxacin	+	++	+	+	+	++	2 x 500 mg/d, 7 Tage & 2 x 250 mg/d, 7 Tage

Tabelle 3: Empfohlene Dosierung adjuvanter Antibiotika der Deutschen Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) (Beikler et al., 2003)

Da es sich bei der Parodontitis um eine Mischinfektion handelt, kann eine Kombination zweier Antibiotika erforderlich werden, um eine möglichst ausgedehnte antimikrobielle Wirkung aufweisen zu können (Heitz-Mayfield, 2009). Van Winkelhoff und Mitarbeiter (1992) zeigten in einer Studie, dass sich die Kombination aus Metronidazol und Amoxicillin äußerst effektiv hinsichtlich klinischer und mikrobiologischer Parameter erweisen kann. Die Kombination beider Antibiotika führte zu deutlichen positiven Auswirkungen auf TST und Attachmentlevel sowie einem bei nahezu allen Patienten negativen Nachweis des Bakteriums *A. actinomycetemcomitans*.

Während einige weitere Studien eine deutliche Verbesserung der klinischen parodontalen Verhältnisse unter systemischer Gabe von Amoxicillin in Kombination mit Metronidazol suggerieren (Sgolastra et al., 2012a; Sgolastra et al., 2012b; Goodson et al., 2012; Feres et al., 2012), zeigen andere Studien wiederum, dass sich die klinischen Ergebnisse einer adjuvanten Kombinationstherapie aus Amoxicillin und Metronidazol nicht von denen einer Placebo-Kontrollgruppe unterscheiden (Winkel et al., 2001; Matarazzo et al., 2008; Mestnik et al., 2012).

Es ist bekannt, dass die im Biofilm enthaltenen Bakterien eine erhöhte Resistenz besitzen und durch den Schutz des Biofilms die Penetration des Antibiotikums

behindert wird (Costerton *et al.*, 1999; Gilbert *et al.*, 1997). Bei Einsatz eines adjuvanten Antibiotikums sollte daher ein mechanisches Entfernen der supra- und subgingivalen Plaque vorausgehen, sodass der protektive Biofilm desintegriert und dem Antibiotikum eine erhöhte Wirksamkeit ermöglicht werden kann (Herrera *et al.*, 2008; Berglundh *et al.*, 1998; Loesche und Giordano, 1994).

## 1.7 Problematik der Resistenzentwicklung

In der Geschichte der Menschheit forderten infektiöse Erkrankungen aufgrund mangelnder Therapiemöglichkeiten unzählige Menschenleben (Slavkin, 1997). Die Entdeckung des Penicillins 1928 durch Sir Alexander Fleming stellte somit einen Meilenstein in der Entdeckung der Antibiotika dar und bildete die Grundlage für eine effektive Behandlung bakterieller Infektionen (Seymour und Hogg, 2008; Fleming, 1945). Neben der Entdeckung eines deutlichen Hemmhofes um den Schimmelpilz *Penicillium notatum* auf einer befallenen Staphylokokkenkultur, beobachtete Fleming (1945), dass eine subletale Dosis des Penicillins innerhalb kürzester Zeit Penicillin-resistente Keime hervorbringen konnte. Nach der Einführung des Penicillin G Anfang der 40er Jahre konnten durch bestimmte Erreger (*Staphylococcus aureus*) ausgelöste Infektionen effektiv behandelt werden, 1942 wurden jedoch schon erste Resistenzen gegenüber Antibiotika evident, die bis heute stetig zunehmen (Slavkin, 1997). Die Entwicklung vielfältiger Antibiotika ermöglichte es, die kontinuierlich wachsende Zahl resistenter Keime in Schach zu halten. Seit den 90er Jahren wird jedoch ein Rückschritt und Mangel an neuen Antibiotikaklassen verzeichnet, die auf neue und modifizierte bakterielle Resistenzmechanismen zurückzuführen sind (Laxminarayan *et al.*, 2013; Gould, 2009; Talbot *et al.*, 2006). Die Zunahme von Antibiotikaresistenzen stellt ein weltweit ernstzunehmendes Problem dar (Seymour und Hogg, 2008). 2007 wurde daher in Deutschland das Projekt "Antibiotikaresistenz Surveillance (ARS)" am Robert-Koch-Institut eingerichtet, um Resistenzdaten zu erheben (Robert Koch Institut, 2007). Den Resistenzentwicklungen unterliegt ein evolutionärer Mechanismus, der Bakterien über viele Jahrtausende ein Überleben durch Anpassung an veränderte Umweltbedingungen sicherstellte (Levy, 2000). Seit vielen Jahren versuchen Organisationen, wie die WHO (World Health Organisation), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) und die CDC (Centre for Disease Prevention and Control) das Bewusstsein internationaler Behörden und Entscheidungsträger über die globale Problematik und Reichweite zu schärfen (Carlet *et al.*, 2014). Antibiotika-resistente Keime werden von

der World Health Organization (WHO) als eine der drei größten Bedrohungen für die Menschheit eingestuft (Carlet *et al.*, 2014).

Unter den Anführern der Keime, die Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Medikamenten zeigen, befinden sich der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*, Vancomycin-resistente Enterokokken, Extended-Spektrum- $\beta$ -Laktamase-(ESBL)-bildende Bakterien, Enterobacteriaceae (Livermore, 2003) und *Acinetobacter baumannii* (Tang *et al.*, 2014). Abbildung 2 zeigt den zeitlichen Verlauf der Entwicklung verschiedener Antibiotikaklassen und aufkommende Resistenzen.

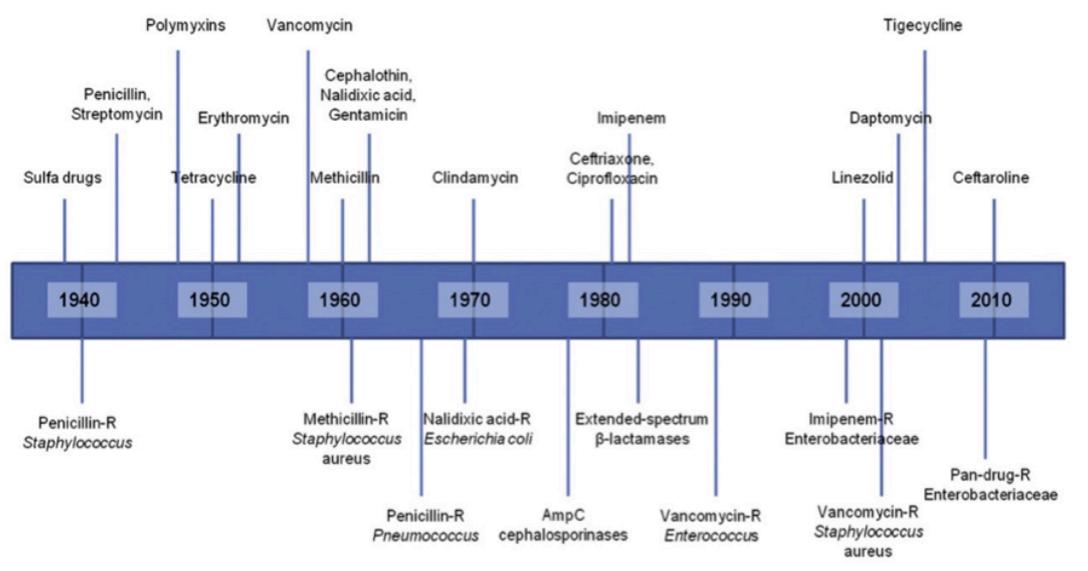


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Entwicklung verschiedener Antibiotikaklassen gegen sich ausbildende Resistenzen (Tang *et al.*, 2014)

Die übermäßig hohe Verschreibungsrate von Antibiotika zur Bekämpfung odontogener (Poveda Roda *et al.*, 2007) und bakterieller Infektionen aller Art (Seymour und Hogg, 2008), führte zu Anpassungsvorgängen und Resistenzentwicklung der Bakterien (Levy, 2000; Levy, 1994). Listgarten (1993) sowie Rams und Mitarbeiter (2014) zeigten, dass davon auch parodontopathogene Keime betroffen sind, die resistente Stämme hervorgebracht haben oder nur noch eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika aufweisen. Mit Hilfe diverser Resistenzmechanismen können diese Bakterien antibiotische Wirkstoffe unwirksam werden lassen (Rams *et al.*, 2014; Feres *et al.*, 2002; Walker, 1996).

Studien brachten hervor, dass in Regionen, in denen der Gebrauch von Antibiotika stark eingeschränkt wird, nur geringe Antibiotika-Resistenzen unter Parodontalpathogenen zu finden sind (Veloo *et al.*, 2012), während in denjenigen Regionen, in denen der Zugang zu Antibiotika weniger stark überwacht wird, ein deutlich höheres Ausmaß an

Antibiotikaresistenzen vorhanden ist (Ardila *et al.*, 2010a; van Winkelhoff *et al.*, 2005). Diese Studien suggerieren somit, dass die Verfügbarkeit von Antibiotika und die Häufigkeit der Antibiotikaeinnahme mit dem Auftreten von Resistenzen korrelieren.

### 1.7.1 Resistenzmechanismen

Den bakteriellen Resistenzentwicklungen liegen prinzipielle Mechanismen zu Grunde (Hof und Dörries, 2005): Zum einen kann die Penetration des Wirkstoffs in die Zelle verhindert werden, sodass das ursprüngliche Ziel (Target) unzugänglich wird. Zum anderen kann der Wirkstoff durch das Bakterium direkt inaktiviert oder derart verändert werden, dass ein Binden an die Zielstruktur nicht mehr möglich ist. Ein dritter Mechanismus zielt auf eine Veränderung des Targets ab, sodass auch ein unverändertes Medikament nicht mehr wirken kann.

Antibiotikaresistenzen parodontopathogener Keime können vererbt, mutationsbedingt oder erworben sein (Walker, 1996). Organismen können dabei bereits eine natürliche Unempfindlichkeit gegenüber Antibiotika aufweisen. Dem Bakterium *A. actinomycetemcomitans* mangelt es beispielsweise an einem Enzym, das nötig ist, um die Wirkung des Antibiotikums Metronidazol zu entfalten und kann somit bei therapeutischer Konzentration keinen Schaden nehmen. *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*) ist unempfindlich gegenüber Clindamycin, ein Großteil der Fusobakterien-Spezies zeigt keine Empfindlichkeit gegenüber Erythromycin (Walker *et al.*, 1979).

Mutationen im Genom der Bakterien, die pro repliziertem Basenpaar mit einer Wahrscheinlichkeit von  $10^{-9}$  bis  $10^{-10}$  spontan und willkürlich entstehen (Bridges, 2001), stellen eine weitere Ursache dar. Dabei können ursprüngliche Zielstrukturen des Medikaments verändert, Enzyme mit inaktivierendem Mechanismus exprimiert, ein (Efflux-)System, welches Medikamente aus der Zelle schleust, aktiviert und gleichzeitig die Aufnahme in die Zelle inaktiviert werden (Livermore, 2003).

Durch die enge topographische Beziehung der Bakterien können Resistenzgene über horizontalen Gentransfer ausgetauscht werden (Walker, 1996). Die Übertragung erfolgt dabei über die Mechanismen der Transformation, Transduktion oder Konjugation. Transformation impliziert die Aufnahme freier DNA aus der Umgebung in das Bakterium, während bei der Transduktion via Phagen exogene DNA von einem Bakterium zum nächsten geleitet wird. Die DNA-Stücke stammen dabei entweder aus dem Bakterienchromosom selbst oder von einem Plasmid (kleine extrachromosomale DNA). Die Konjugation erfordert hingegen engen Zellkontakt und erfolgt durch

Übertragung von Plasmid-DNA eines Spender-Bakteriums auf ein Empfänger-Bakterium. Möglich ist hierbei auch ein spezieübergreifender Austausch verschiedener Resistenzgene (Courvalin, 1994).

Levin und Rozen (2006) beschreiben zudem phänotypische Resistenzen, die nicht vererbbar sind und keinen genetischen Ursprung besitzen. Dazu zählen neben Medikamentenunempfindlichkeit (drug indifference), das Heranwachsen im Biofilm und die Bakterien-Persistenz.

Die Antibiotikaempfindlichkeit pathogener Keime kann mit Hilfe von Resistenzprüfungen detektiert werden (Jorgensen und Ferraro, 2009). Am häufigsten werden neben der Agardiffusionsmethode, der Bouillon-Dilutionstest/Reihenverdünnungstest und die Gradientenmethode mittels Epsilometer-Tests (E-Test) angewandt. Häufig werden Antibiotika zur Behandlung parodontaler Erkrankungen jedoch ohne vorherige Analyse des subgingivalen Biofilms verschrieben (Ellen und McCulloch, 1996), sodass das gewählte Antibiotikum möglicherweise auf resistente Stämme oder auf Bakterien mit nur geringer Empfindlichkeit trifft.

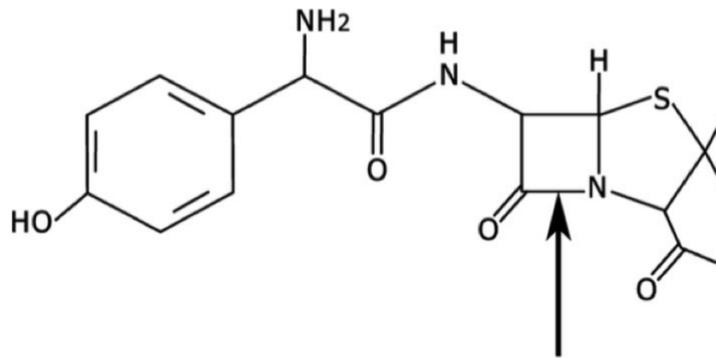
## **1.7.2 Antibiotika: Wirkmechanismen und Resistenzen**

### **1.7.2.1 Amoxicillin**

Amoxicillin ist ein Penicillin-Derivat, das neben dem primär grampositiven Wirkspektrum der Penicilline zudem über eine substantielle antimikrobielle Aktivität gegen gramnegative Bakterien verfügt (Seymour und Hogg, 2008; Goodson, 1994). Alle Penicilline besitzen einen Thiazolring und einen  $\beta$ -Lactamring mit einer freien Aminogruppe, an den gewöhnlich eine Acyl-Seitenkette gebunden ist (Slavkin, 1997). Der antimikrobielle Mechanismus besteht in der Fähigkeit des  $\beta$ -Lactam-Rings, direkt kovalent an Enzyme der bakteriellen Zellwand (PBP = Penicillin bindendes Protein) binden zu können. Diese PBP gehören einer Reihe von Transpeptidasen oder Carboxypeptidasen an, die die Verknüpfung der Bakterien-Zellwand-Bestandteile (Peptidoglykane, auch Murein genannt) katalysieren.  $\beta$ -Lactam-Antibiotika entfalten ihre Wirksamkeit durch Inhibition der Enzymfunktion, die die Bildung einer schützenden Zellwand verhindert und durch osmotische Prozesse bedingt zur Lyse des Bakteriums führt (Seymour und Hogg, 2008; Slavkin, 1997).

Neben Penicillin-induzierter Anaphylaxie (Greenwood, 2008) ist die Entwicklung von Resistenzen eine der größten unerwünschten Nebenwirkungen des Medikaments

(Seymour und Hogg, 2008). Die Wirkungsweise der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika kann dabei durch eine plasmidcodierte bakterielle Penicillinase beeinträchtigt werden, die den  $\beta$ -Lactamring des Penicillin-Moleküls zu spalten vermag und die Wirkung des Medikaments somit inaktiviert (Slavkin, 1997). Abbildung 3 zeigt die Strukturformel des Amoxicillins und den Angriffspunkt der  $\beta$ -Lactamasen.



Angriffspunkt der  $\beta$ -Lactamasen

*Abbildung 3: Strukturformel des Amoxicillins mit Angriffspunkt der  $\beta$ -Lactamasen am  $\beta$ -Lactam-Ring des Moleküls (Seymour und Hogg, 2008)*

Ein instabiles DNA-Stück gilt dabei als codierendes Gen der  $\beta$ -Lactamasen und besitzt als „springendes Gen“ (Transposon) die Fähigkeit, seine Position innerhalb des Chromosoms zu ändern (Tang *et al.*, 2014; Slavkin, 1997; Walker, 1996). Extended-Spectrum-Betalactamase-(ESBL)-bildende Bakterien sind dabei besonders Besorgnis erregend (Benachinmardi *et al.*, 2014). Sie konnten in Läsionen chronischer Parodontitis nachgewiesen werden und sind nicht nur resistent gegenüber einem breiten Spektrum an  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, sondern auch in der Lage, Bakterien im direkten Umfeld zur Resistenzbildung zu animieren (Benachinmardi *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2014). Die Anzahl der  $\beta$ -Lactamasen hat sich zwischen 1990 und 2010 bereits verzehnfacht (Davies und Davies, 2010). Weitere Resistenzmechanismen gegenüber  $\beta$ -Lactam-Antibiotika stellen eine Veränderung der Zielstruktur, der PBPs, oder ein limitierter Zugang des Medikaments zur Zielstruktur dar (Tang *et al.*, 2014; Poole, 2004). Dabei können sowohl Modulationen der Ionenkanäle (Porine) in der äußeren Membran des Bakteriums den Zutritt des Medikaments zur Zielstruktur behindern, als auch Efflux-Pumpen dazu beitragen, das Medikament aus der Zelle zu entfernen.

### 1.7.2.2 Metronidazol

Als Vertreter der Nitroimidazole ist Metronidazol ein häufig in der Zahnmedizin verschriebenes Antibiotikum zur Behandlung gramnegativer, anaerober Infektionen und hat sich in der Behandlung parodontaler Erkrankungen etabliert (Seymour und Hogg, 2008; Slots und Ting, 2002). Es kommt sowohl als Penicillin-Alternative und -Ergänzung bei  $\beta$ -Lactamase-produzierenden Anaerobiern als auch bei ulzerierender nekrotisierender Gingivitis zum Einsatz. Abbildung 4 zeigt die Strukturformel eines Metronidazol-Moleküls.

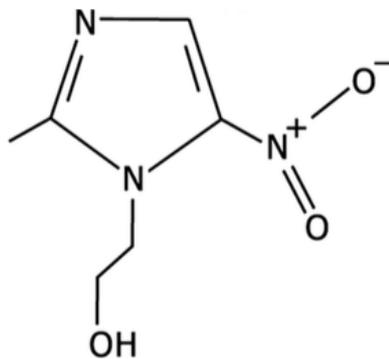


Abbildung 4: Strukturformel des Metronidazols (Seymour und Hogg, 2008)

Metronidazol diffundiert in inaktiver Form passiv als Pro-Drug in das Zellinnere (Ings et al., 1974). Der exakte Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheint die Aktivierung mit Hilfe der im anaeroben Milieu vorhandenen bakteriellen Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase stattzufinden (Edwards, 1993; Edwards *et al.*, 1973). Dieses Enzym reduziert die Nitrogruppe des Moleküls partiell, sodass ein radikalisches Anion entsteht, das zielgerichtet bakterielle DNA oxidiert, Strangbrüche induziert und so schließlich zum Zelltod führt. Aufgrund des niedrigen Redoxpotentials kann die Reduktion nur in anaerobem Milieu erfolgen (Seymour und Hogg, 2008).

Resistenzen gegenüber Metronidazol werden selten beobachtet (Diniz *et al.*, 2004). Zurückzuführen sind sie vermutlich auf eine mangelnde Aktivierung der Pro-Drug, möglicherweise durch eine Fehlfunktion der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase oder durch ein mangelndes Reduktionspotential (Seymour und Hogg, 2008). Diniz und Mitarbeiter (2004) fanden bei Metronidazol-resistenten Stämmen ein verändertes Proteinprofil, das mit erhöhten Laktat- und verringerten Acetatspiegeln einher ging. Möglich ist auch, dass Veränderungen im Genom der Bakterien den Reduktionsvorgang

zur Aktivierung des Metronidazols derart beeinflussen, dass keine radikalischen Anionen entstehen können.

In der Parodontitistherapie werden häufig Monopräparate angewandt. Metronidazol hat bei systemischer Anwendung eine Verringerung der Mikroorganismen des orangenen Komplexes zu verzeichnen und führt so zu einer Verbesserung der parodontalen Verhältnisse (von Troil-Linden *et al.*, 1995). Jedoch hat sich aufgrund der Vielfalt pathogener Keime in parodontalen Läsionen eine Kombinationstherapie als erfolgreich erwiesen (Slots, 2000). Van Winkelhoff und Mitarbeiter (1989) sprachen Empfehlungen zur Therapie einer akuten, aggressiven Parodontitis mit einer Kombination von Amoxicillin (3 x 375 mg) und Metronidazol (3 x 250 mg) über acht Tage aus und prägten damit den sich später etablierten Begriff des „Winkelhoff-Cocktails“. Hierbei verstärkt die Kombination aus Metronidazol und Amoxicillin oder Metronidazol mit Ciprofloxacin den Effekt gegen *A. actinomycetemcomitans* und weitere starke Parodontopathogene (Pavicic *et al.*, 1992). Amoxicillin und Metronidazol können in Kombination bei Gabe während des SRPs schneller zum Erfolg führen und eine weitere chirurgische Behandlung unnötig machen (Mombelli *et al.*, 2015).

### 1.7.2.3 Clindamycin

Clindamycin gehört der Gruppe der Lincosamid-Antibiotika an (Seymour und Hogg, 2008) und entfaltet seine Wirkung vor allem gegen gram-positive Kokken und gram-negative anaerobe Stäbchen (Walker und Gordon, 1990). Bei Penicillinallergie kann Clindamycin als Alternativ-Therapeutikum angewandt werden (Seymour und Hogg, 2008). Abbildung 5 zeigt die Strukturformel von Clindamycin.

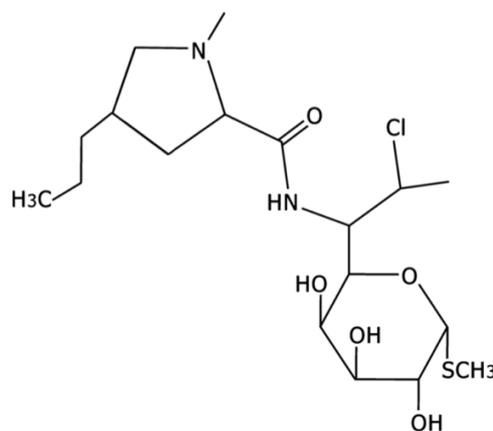


Abbildung 5: Strukturformel des Clindamycins (Seymour und Hogg, 2008)

Clindamycin inhibiert die bakterielle Proteinbiosynthese durch Bindung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen (Tenson *et al.*, 2003). Dabei wird die Peptidyltransferase, das Enzym, welches die Peptidbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren katalysiert, blockiert.

Gegenüber Lincosamid-Antibiotika sind drei Mechanismen bakterieller Resistenzen bekannt (Seymour und Hogg, 2008; Leclercq, 2002). Durch Methylierung oder Modifikation wird die Zielstruktur derart verändert, dass ein Erkennen durch das Antibiotikum unmöglich wird. Eine Vielzahl von erm-(erythromycin ribosome methylation)-Genen konnten identifiziert und in einer Nomenklatur festgehalten werden (Roberts *et al.*, 1999). Die Aktivität der Erm-Methylasen induziert die Methylierung eines einzelnen Adenins auf der sich bildenden 23s-RNA der ribosomalen 50S-Untereinheit und resultiert in einem Unvermögen des Antibiotikums, an seine Zielstruktur zu binden (Weisblum, 1995). Mit Hilfe von Efflux-Pumpen können Clindamycin-Moleküle gezielt aus der Zelle heraustransportiert werden. Die Regulierung der Expression der Efflux-Pumpen erfolgt dabei über Efflux-Gene (Leclercq, 2002). Der dritte Mechanismus besteht in einer direkten Inaktivierung des Medikaments durch Bildung spezifischer bakterieller Enzyme (Roberts *et al.*, 1999).

## 2 Fragestellung und Studienziel

Die stetige Zunahme von Antibiotikaresistenzen zahlreicher Bakterien gilt global als schwerwiegendes Problem. Die aktuelle Studienlage deutet an, dass auch Parodontitis-assoziierte Bakterien Resistenzmechanismen gegenüber diversen Antibiotika entwickelt haben.

In dieser Studie soll anhand eines Patientenkollektivs ( $n = 44$ ) eine möglichst große Anzahl an Wild-Stämmen parodontopathogener Keime auf Resistenzen hinsichtlich den in der Parodontologie häufig eingesetzten Antibiotika Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin in-vitro getestet werden. Die mittels MALDI-TOF-MS differenzierte anaerobe Flora soll anschließend in Bakteriengruppen eingeteilt und paarweise bezüglich der Antibiotikaempfindlichkeit/minimalen Hemmkonzentration (MHK) verglichen werden. Zudem sollen als Nebeneffekt der Studie an einer Auswahl an Patienten, die nach Indikationsstellung eine adjuvante Antibiose und nach einem definierten Kontrollintervall eine weitere mikrobiologische Diagnostik erhielt, potentielle Zusammenhänge zwischen zuvor nachgewiesenen Resistenzen und dem prä- und postantibiotischen mikrobiologischen Befund aufgezeigt werden.

In Anlehnung an die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde (Beikler *et al.*, 2003) wird die Hypothese aufgestellt, dass ein sehr großer Anteil der in der Studie nachgewiesenen und mit Parodontitiden assoziierten Bakterien in-vitro sicher durch die empfohlenen Antibiotika gefasst und erfolgreich beseitigt wird. Zudem wird angenommen, dass die Verteilung der Antibiotikaempfindlichkeit/MHK-Werte der PA-assoziierten Bakterien beim paarweisen Vergleich über die Bakteriengruppen hinweg identisch sei.

Diese Studie soll somit einen Beitrag zum Verständnis möglicher Antibiotikaresistenzen parodontopathogener Keime leisten. Zudem soll ein Vergleich der Antibiotikaempfindlichkeit der vorherrschenden anaeroben Bakterienspezies untereinander aufgestellt werden und potentielle Zusammenhänge aus nachgewiesenen Antibiotikaresistenzen und persistenten Parodontalkeimen nach erfolgter adjuvanter Antibiose herausgearbeitet werden, die die Grundlage für weitere Forschung in diesem Bereich legen könnten.

### 3 Material und Methode

Die für die klinische und mikrobiologische Untersuchung herangezogenen Methoden der Studie sind im Folgenden beschrieben. Abbildung 6 zeigt graphisch den Aufbau und Ablauf der Studie.

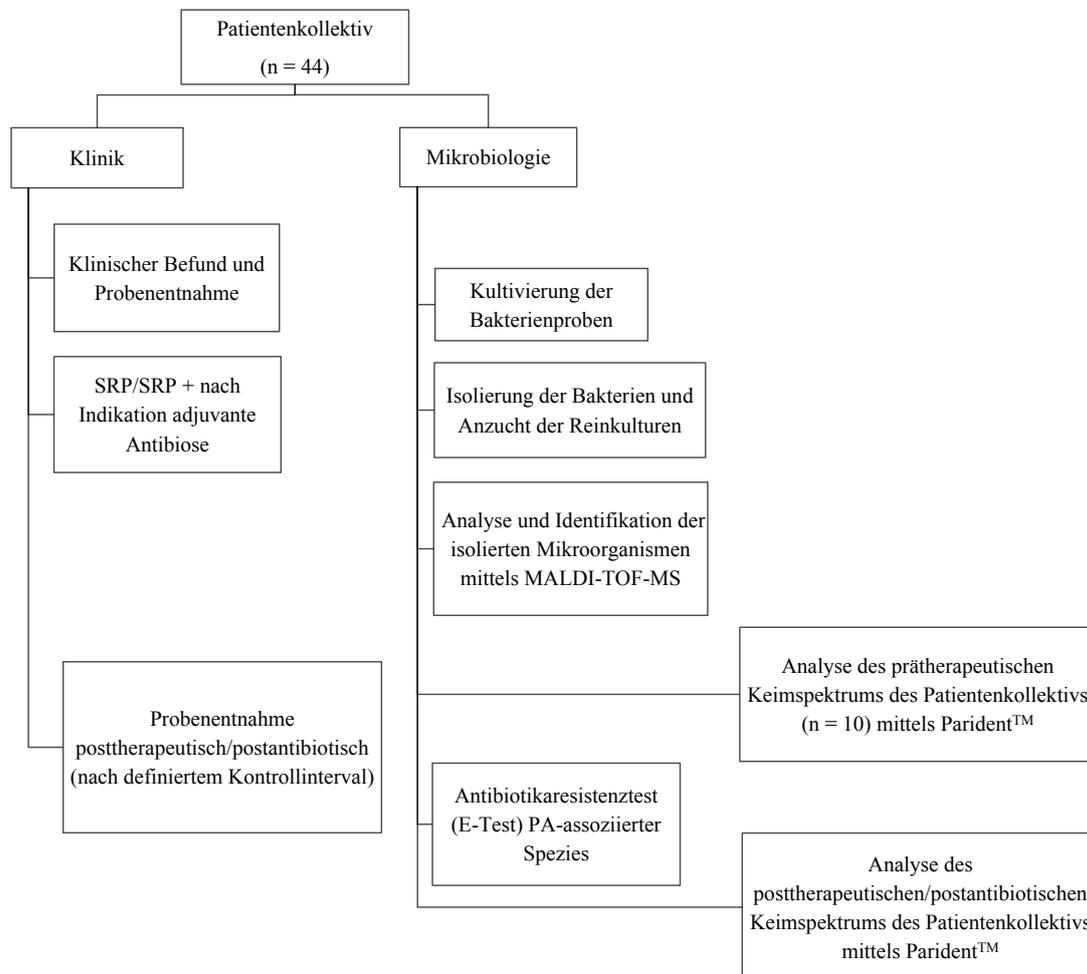


Abbildung 6: Graphische Darstellung des Studienablaufs

#### 3.1 Patientenkollektiv

Nach Begutachtung des Studienprotokolls durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität München bestätigte diese die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit (17-8-16, Votum im Anhang).

Die teilnehmenden Patienten rekrutierten sich aus der allgemeinen Ambulanz der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Universität München. Grundsätzlich kamen alle Patienten mit Parodontalerkrankung in Betracht, unabhängig von Typ und Schwere der Erkrankung. Bei den ausgewählten Patienten wurde in den

vergangenen sechs Monaten vor Beginn der Studie weder eine parodontologische Therapie noch eine systemische Antibiose durchgeführt. Weitere Ausschlusskriterien stellten ernsthafte Erkrankungen wie HIV, Tuberkulose, Hepatitis B oder Hepatitis C, fortlaufende Chemotherapie, Bestrahlung oder Immunsuppression dar.

### **3.2 Anamnese und Befund**

Die Patienten wurden zunächst hinreichend mündlich und schriftlich über die Studie aufgeklärt und nach Einwilligung zur Teilnahme im Anschluss mit Hilfe eines standardisierten Anamnese- und Befundbogens befragt. Die Vorlagen dazu sowie die der Patienteninformation und Einwilligungserklärung befinden sich im Anhang. Hierbei wurden neben familien-anamnestischen Aspekten (Vorkommen parodontologischer Erkrankungen bei direkten Familienmitgliedern) die Allgemeinanamnese (Einnahme von Medikamenten, Vorliegen von Erkrankungen wie Osteoporose, Diabetes mellitus, Atherosklerose oder Bluterkrankung, Nikotinkonsum) erfragt. Die Patienten wurden zudem gebeten, zu vergangenen parodontologischen Behandlungen, Symptomen wie Zahnfleischbluten, Zahnlockerung und Zahnverlusten durch Zahnlockerungen Angaben zu machen.

Es wurde ein zahnärztlicher Befund erhoben, um einen Gesamtüberblick über vorhandene Erkrankungen der Mundhöhle zu erhalten. Daraufhin erfolgte eine parodontologische Untersuchung, bei der neben der Ermittlung der Taschensondierungstiefen (6-Punkt-Messung) und des BOP (Bleeding on Probing) vorhandene Lockerungen und Furkationen festgehalten wurden. Das Ausmaß der Sondierungstiefen und des BOP ermöglichten eine Einschätzung über die individuelle Anzahl der behandlungsbedürftigen Stellen und Zähne und somit über den Behandlungsbedarf der parodontologischen Erkrankung. Als „behandlungsbedürftig“ wurden Stellen des Zahnes mit mehr als 4mm Sondierungstiefe oder bei genau 4mm und vorhandener Blutung definiert. Sobald eine behandlungsbedürftige Stelle pro Zahn vorhanden war, galt der Zahn ebenfalls als „behandlungsbedürftig“. Bei 10 Patienten (n = 10) des Patientenkollektivs (n = 44) wurde bei klinischer Untersuchung unter Beachtung aktueller Empfehlungen (Slots *et al.*, 2004; Beikler *et al.*, 2003) die Indikation einer adjuvanten Antibiose gestellt und anschließend mit einer Kombination aus Amoxicillin (3 x 500 mg) und Metronidazol (3 x 400 mg) über 7 Tage behandelt.

### 3.3 Probenentnahme

Für die Entnahme einer Bakterienprobe wurde die im Rahmen der 6-Punkt-Messung ermittelte jeweils tiefste Stelle pro Quadrant herangezogen. Sterile Papierspitzen (Paper Points in Größe 40) wurden in den Fundus der parodontalen Tasche vorgeschoben und für 10 s in situ gehalten. Unmittelbar nach Entnahme wurden diese in 500 µl des Probeentnahmemediums VMG II, (Moller, 1966; Dahlen *et al.*, 1993) in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und dort bis zur mikrobiologischen Analyse aufbewahrt. Dieses Medium verhindert sowohl das Wachstum als auch das Absterben der Bakterien (Syed und Loesche, 1972). Für das Patientenkollektiv (n = 10), welches mit adjuvanter Antibiose behandelt wurde, wurde initial eine weitere Bakterienprobe zur Durchführung des Parident<sup>TM</sup>-Tests entnommen. Die Probenentnahme erfolgte analog, jedoch an der zweittiefsten Stelle je Quadrant. Auf ein Transportmedium konnte dort verzichtet werden. Nach einem Kontrollzeitraum von 6 - 8 Wochen des Patientenkollektivs (n = 10) erfolgte eine abschließende Probenentnahme zum Vergleich des mikrobiologischen Befundes vor und nach Antibiotikatherapie. Abbildung 7 zeigt die getränkten Papierspitzen nach Probenentnahme.



Abbildung 7: getränkte Papierspitzen nach Probenentnahme; Links: Aufbewahrung in VMG II-Transportmedium zur mikrobiologischen Analyse mittels MALDI-TOF-Verfahren; Rechts: Aufbewahrung ohne Medium zur Durchführung des Parident<sup>TM</sup> - Tests

### 3.4 Kultivierung und Nährmedium

Im nächsten Schritt sollten die für die Studie relevanten Bakterien aus der Plaqueprobe, mit dem Fokus auf gramnegative, anaerobe Bakterien, angezüchtet werden. Dies erfolgte daher unter vollständigem Ausschluss von Sauerstoff bei konstanter Temperatur von 36°C in einer anaeroben Kammer (BACTRON anaerobic chamber;

SHEL LAB, Sheldon Manufacturing, Inc., Oregon, USA). Diese wurde mit einem Gasgemisch bestehend aus 85% Stickstoff (N), 10% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und 5% Wasserstoff (H<sub>2</sub>) geflutet. Ein mit einer Palladium-Legierung gefüllter Katalysator und spezielle Gaspaks (GasPak™ EZ Anaerobe Container System, Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA) ermöglichten ein frühzeitiges Binden von Restsauerstoff in der Kammer und ermöglichten somit ideale Wachstumsbedingungen für fakultativ und obligat anaerobe Bakterien. Abbildung 8 zeigt die anaerobe Kammer (BACTRON anaerobic chamber).

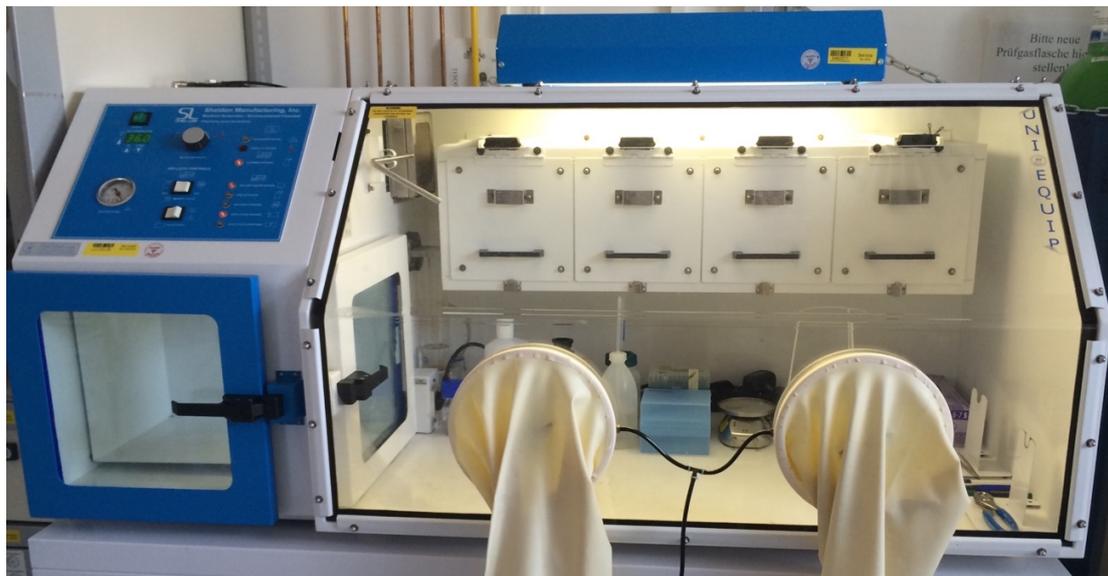


Abbildung 8: anaerobe Kammer (BACTRON anaerobic chamber; SHEL LAB, Sheldon Manufacturing, Inc., Oregon, USA)

Zur gleichmäßigen Verteilung der Bakterien im Probeentnahmemedium wurde dieses zunächst für 30 s gevortext (Vortex Mixer VM-300, neoLab 7-2020, Heidelberg, Deutschland). Darauf folgte eine Verdünnungsserie in 900 µl 0,9%-iger Natriumchloridlösung (B. Braun, Melsungen, Deutschland) jeweils von 1:10, bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-5</sup>. Die serielle Verdünnung diente dazu, die Bakterienquantität zu verringern und der gewachsenen Bakterienmischkultur auf den Agarplatten einzelne Bakterienspezies gezielt zur Generierung von Reinkulturen entnehmen zu können. Jeweils 100 µl jeder Verdünnung wurden auf den einzelnen Agarplatten (Schaedler Agar with Vitamin K and 5% Sheep Blood, BD BBL™ Stacker™ Plates; und BD™ Brucella Blood Agar with Hemin und Vitamin K1; BD, Heidelberg, Deutschland) ausplattiert und danach für 48 - 72 h in der anaeroben Kammer unter oben genannten Bedingungen bebrütet. Neben Schaedler-Platten wurden für die ersten fünf Bakterienproben zudem Brucella-Platten (BD™ Brucella Blood Agar with Hemin und

Vitamin K1, BD, Heidelberg, Deutschland) zum Vergleich des Nährmedium-Potentials verwendet. Abbildung 9 zeigt das Bakterienwachstum beider Agarplatten bei einer Verdünnung von  $10^{-4}$  im Vergleich.

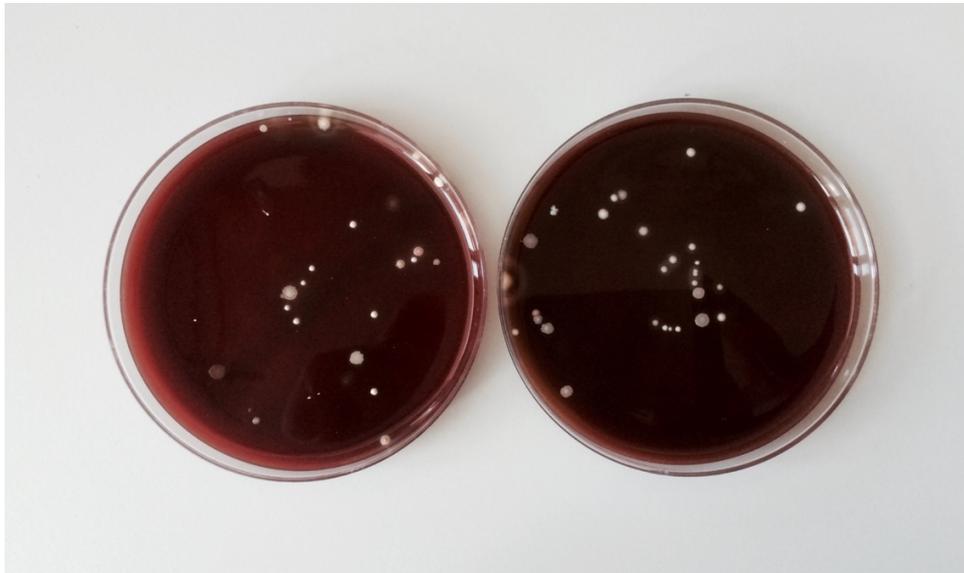


Abbildung 9: Vergleich des Bakterienwachstums auf unterschiedlichen Nährmedien; Links: Schaedler; Rechts: Brucella

Da kein ersichtlicher Mehrwert des Brucella-Nährmediums im Vergleich zu den Schaedler-Platten festgestellt werden konnte, wurde die Anzucht aller weiteren Bakterienproben ausschließlich auf Schaedler-Platten durchgeführt.

### 3.5 Isolierung und Kryokonservierung der Bakterien

Aus der Bakterienmischkultur galt es im nächsten Schritt Einzelkulturen zu entnehmen und Reinkulturen zu züchten. Anhand optisch erkennbarer, morphologischer Abweichungen wurden verschiedene Kolonien einzeln mit einer Impföse (10  $\mu$ l, steril, VWR International, Ismaning, Deutschland) von der Agarplatte isoliert und auf eine neue Schaedler-Platte nach der Dreifelder-Ausstrich-Methode übertragen und weiter bebrütet.

Im nächsten Schritt wurden die erfolgreich kultivierten Einzelkolonien in einen transportfähigen und lagerungsbeständigen Zustand überführt. Hierzu wurden die Reinkulturen nach 48 h (Wieser et al., 2012) vom Agar entnommen und in ein Cryoröhrchen (Cryo.S<sup>TM</sup>, Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland), gefüllt mit 1 ml Suspension aus Brain Heart Infusion (BHI) und 10% Glycerin (Sigma), gegeben. Die Brain Heart Infusion wurde zuvor nach Anleitung angemischt (3,7 g Pulver auf 100 g destilliertes Wasser) und autoklaviert. Die Bakterien-Reinkulturen wurden großzügig

mit einer Impföse abgetragen und durch Rotieren der Impföse in die Lösung suspendiert. Bis zur mikrobiologischen Analyse wurden die Cryoröhrchen zunächst im Gefrierfach bei -20 °C und nach einigen Tagen schließlich in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

### 3.6 Bestimmung der Bakterienspezies

#### 3.6.1 MALDI-TOF-MS-Analyse

Prinzip der MALDI-TOF-MS-Analyse:

Die Bestimmung der Bakterienspezies des Patientenkollektivs (n = 44) wurde im Max-von-Pettenkofer Institut der Universität München (Abteilung für Medizinische Mikrobiologie, Prof. Dr. Sören Schubert) durchgeführt. Mittels MALDI-TOF-MS (matrix-assisted Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie; MALDI-TOF-MS; Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland, Abb. 9) können Bakterien durch Analyse ribosomaler Proteine identifiziert werden (Wieser *et al.*, 2012). Diese Methode stellt einen neuartigen Ansatz zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen in der mikrobiologischen Diagnostik dar. Dabei wird eine kleine Bakterienkolonie auf eine MALDI-Probenplatte (Targetplatte) aufgebracht und mit einer Matrixlösung kokkristallisiert. Im MALDI-TOF-MS-Gerät werden die Matrixlösung und die darin eingebetteten Mikroorganismen von einem fokussierten Laserstrahl beschossen und explosionsartig verdampft. Die bakteriellen Proteine werden dabei ionisiert und in einem elektrischen Feld (Beschleunigungsspannung  $U = 10 - 30$  kV) beschleunigt. Beeinflusst von der Masse und dem Ionisierungsgrad der Proteine ergeben sich unterschiedliche Flugzeiten, die im Vakuum exakt analysiert werden können. Es resultieren speziesspezifische Massenspektren, die einem „molekularen Fingerabdruck“ gleichen und im Massenbereich von 2000 – 12000 Da (Bereich mit hauptsächlich ribosomalen Proteinen) besonders aussagekräftig sind (Wieser *et al.*, 2012). Die Massenspektren können mit einer Referenzdatenbank humanpathogener Keimspektren abgeglichen werden. Die Zuverlässigkeit der automatisierten Zuordnung wird durch die Software (MALDI Biotyper V3.1, Bruker Daltonic) anhand eines Faktors (Score) validiert, der einen Wert  $> 2$  annehmen sollte, um von einer korrekten Speziesdifferenzierung auszugehen. Abbildung 10 zeigt das MALDI-TOF-MS-Gerät.



Abbildung 10: MALDI-TOF-MS

Durchführung der MALDI-TOF-MS-Analyse:

Zunächst wurden die bei  $-196\text{ °C}$  in flüssigem Stickstoff gelagerten Bakterienproben langsam auf Eis aufgetaut und als Reinkulturen auf einer Agarplatte neu ausplattiert. Eine kleine Menge frischer Einzelkolonien wurde auf eine MALDI-Probenplatte (Targetplatte) für insgesamt 96 Proben auf eine definierte Analyseposition gegeben. Abbildung 11 zeigt eine frische Maldiplatte (Targetplatte) mit noch nicht aufgetragener Bakterienprobe.

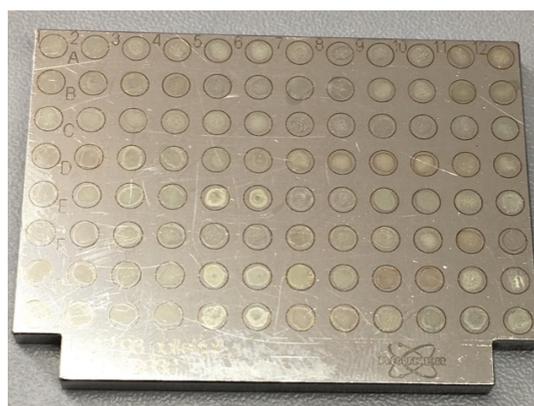


Abbildung 11: Targetplatte des MALDI-TOF-MS

Für jeden Keim wurden dabei zwei Positionen als Referenz besetzt. Jede Bakterienprobe wurde mit einer Matrixlösung (Benzoessäurederivat [2,5-Dihydroxybenzoessäure]/Zimtsäurederivat [ $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-Zimtsäure]; Sigma) überschichtet und getrocknet. Es kam dabei zur Ko-Kristallisation der Matrixlösung und

der darin eingebetteten Bakterienprobe. Nach Einschleußen der Targetplatte in das MALDI-TOF-MS wurde ein Hochvakuum aufgebaut und automatisch gemessen. Dabei entstanden charakteristische Massenspitzen (Peaks) des Spektrums, die mit o.g. Datenbankeinträgen verglichen wurden.

Bei einigen Keimen konnte kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden, was möglicherweise auf eine zu geringe Menge aufgetragener Probe zurückzuführen war. Es erfolgte eine erneute Analyse. Im Anschluss wurden die analysierten Parodontitis-assoziierten Keime mit Hilfe des E-Tests (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich – s.u.) auf Resistenzen gegenüber den für die Studie ausgewählten Antibiotika (Amoxicillin, Metronidazol, Clindamycin) untersucht.

### 3.6.2 Prinzip und Durchführung des Parident™-Tests

Der Parident™-Test ist ein qualitatives in-vitro Diagnostikum zum gemeinsamen molekulargenetischen Nachweis der sieben Parodontopathogene: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Parvimonas micra*, *Treponema denticola* und *Fusobacterium nucleatum*. Dieses Prinzip kam in der Studie bei einer Patientenauswahl (n = 10 aus n = 44), die nach Indikationsstellung mit einer adjuvanten Antibiose (3 x 500 mg Amoxicillin und 3 x 400 mg Metronidazol; über 7 Tage) behandelt wurde, zur Anwendung. Das Keimspektrum dieses Patientenkollektivs wurde post-Antibiotikum nach einem Kontrollzeitraum von 6 - 8 Wochen mikrobiologisch mittels Parident™ analysiert. Die Durchführung erfolgte dabei in drei Schritten. Nach Isolierung und Reinigung der bakteriellen DNA wurde diese mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Anschließend konnte durch das ELISA-Nachweisverfahren (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit des in der Probe vermuteten Bakteriums verifiziert werden.

Durchführung der DNA-Extraktion:

Die Reinigung und Extraktion der DNA aus den Bakterienproben des Patientenkollektivs wurde mit dem MagNA Pure LC Instrument (Roche, Deutschland) und dem MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I (Roche) durchgeführt. Je nach Isolations-Kit handelt es sich dabei um ein vollautomatisches System zur Extraktion von Nukleinsäuren aller Art (DNA, RNA, mRNA). Die DNA wird dabei nach dem Prinzip der Festphasenextraktion isoliert. Abbildung 12 zeigt die im MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I enthaltenen farbcodierten Reagenzien.



Abbildung 12: im MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I enthaltenen farbcodierten Reagenzien

Als Vorbereitung der DNA-Extraktion wird die im MagNA Pure Isolation Kit I enthaltene Proteinkinase K (pink) in 1,2 ml des Elutionspuffers (gelb) in Lösung gebracht, gevortext und vorerst bei 4°C gelagert. Zu jeder Bakterienprobe wurden nun 195 µl des bakteriellen Lysepuffers (durchsichtig) und 30 µl gelöste Proteinkinase K gegeben. Der Lyse-Puffer diente durch Denaturierung der Proteine der Freisetzung der DNA. Proteinkinase K ist eine Serinprotease, die durch proteolytische Aktivität Peptidbindungen spaltet, die Bakterienhülle aufbricht und ebenfalls eine Voraussetzung zur DNA-Freisetzung darstellt. Die Probengemische wurden vorerst für 10 min bei 65°C und weitere 10 min bei 95°C inkubiert und im Anschluss für eine Minute im Centrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 10.000 g zentrifugiert. Nach kurzem Abkühlen wurden jeweils 100 µl des Bakterien-Reagenzien-Gemisches in kleine processing cartridges (Roche, Mannheim, Deutschland) pipettiert und an die vorgegebene Stelle in das MagNA Pure LC Instrument eingesetzt. Alle weiteren notwendigen Reagenzien wie Waschpuffer I (schwarz), II (blau), III (rot), Lysis/binding Puffer (grün) und Elutionspuffer (gelb) wurden in die entsprechenden Vorrichtungen gefüllt und in das MagNA Pure LC Instrument eingebracht. Bevor das Protokoll gestartet werden konnte, wurde als letztes Reagenz MGPs (magnetic glass particles – braun) hinzugefügt. Die speziellen magnetischen Glaspartikel (MGPs) dienten mit den im Lysis/binding Puffer enthaltenen chaotropischen Salzen dazu, die DNA zu binden. Durch einen am Pipettierarm befindlichen Magnet wurden die gebundenen Nukleinsäuren in den Spitzen zurückgehalten. So konnten die Partikel von Waschvorgang zu Waschvorgang bewegt und von noch vorhandenen Verunreinigungen befreit werden. Im letzten Schritt des Protokolls wurden die Partikel bei hoher

Temperatur in einem Medium mit niedriger Ionenstärke inkubiert, wobei die gebundenen Nukleinsäuren wieder von den Partikeln gelöst wurden. Nach Entfernung der Partikel durch einen Magneten, lag eine Lösung von gereinigten Nukleinsäuren vor. Abbildung 13 zeigt das mit allen Reagenzien befüllte Gerät MagNA Pure LC, mit Hilfe dessen die bakterielle DNA isoliert wurde. Nach Ablauf des Protokolls wurden die Cartridges mit den nun isolierten Nukleinsäuren aus dem Gerät entnommen und bei - 20 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.



Abbildung 13: MagNA Pure LC zur Isolierung der bakteriellen DNA mit allen einzubringenden Reagenzien befüllt

Prinzip von Polymerasekettenreaktion (PCR) und ELISA:

Die Parident™-Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur DNA-Amplifikation, die bei Anwesenheit relevanten Genmaterials mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Prinzip visualisiert werden kann. Die Parident™ PCR-Reagenzien (Nachweis-Kit Parident von amplexDiagnostics GmbH, Gars, Deutschland) enthalten Oligonukleotide (DNA-Sonden), die Farbstoff-markiert sind und deren Hydrolyse durch Extinktionsmessung sichtbar wird. Potentiell vorhandene DNA wird dazu zunächst durch Hitze denaturiert und zu einzelsträngigen, spezifischen Sonden gegeben, die an der Polystyroloberfläche der Mikrotiterplatten immobilisiert sind. Um eine Anlagerung und folgende Vervielfältigung bakterieller DNA zu ermöglichen, werden zwei unterschiedliche spezifische Primer-Master-Mix zur vermuteten bakteriellen DNA hinzugegeben. PAF-PCR-Primer-Mix zur potentiellen Anlagerung an Bakteriengenom von *A. actinomycetemcomitans.*, *P. gingivalis*, und *F. nucleatum* und PMT-PCR-Primer-Mix für *P. intermedia*, *T. forsythia*, *P. micra* und *T. denticola*. PCR-

Primer und Sonde hybridisieren dabei sequenzspezifisch an die bakterielle DNA an und die Replikation wird durch 3'OH-Elongation des Primers gestartet. Trifft der Primer in der Extensionsphase auf die gebundene DNA-Sonde und wird dadurch behindert, kommt es durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase zur Hydrolyse der Sonden-DNA. Während das PCR-Produkt nun kontinuierlich weiter synthetisiert werden kann, werden die an die Sonde gebundenen Farbstoffe freigesetzt. Mit Akkumulation neu synthetisierter PCR-Produkte steigt das Ausmaß der in der Extinktionsmessung sichtbar werdenden Fluoreszenz der freigesetzten Farbstoff-Moleküle. Eine anschließende Extinktionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzlänge von 620 nm. Positive Signale zeigen die spezifische Amplifikation bestimmter DNA-Bereiche während der Parident™ PCR an und verifizieren damit das Vorhandensein des entsprechenden Bakteriengenoms in der zu untersuchenden Probe.

Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR):

Die bei -20 °C gelagerten Bakterienproben und Parident™-PCR-Reagenzien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Nun wurden die zwei unterschiedlichen spezifischen Mastermixe (PAF-PCR und PMT-PCR) nach Anleitung hergestellt. Diese bestehen pro Probe aus folgenden Reagenzien und Mengen: 1 µl dNTP (Nukleotid-Mix), 5 µl PAF/PMT Primer, 5 µl PCR Puffer, 2 µl Ultrastart Tth DNA-Polymerase und 36 µl ddH<sub>2</sub>O (destilliertes Wasser). Die DNA-Polymerase wurde dabei immer zuletzt pipettiert. Die Lösungen wurden dabei vor dem Pipettieren regelmäßig und sorgfältig durchmischt. Jeweils 45 µl des PAF/PMT-Mastermix wurden in die PCR-Röhrchen pipettiert. Jeweils 5 µl bakterielle DNA wurden hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 50 µl pro Probe entstand ist, und durchmischt. Als Negativkontrolle wurde ein Röhrchen mit 5 µl Wasser statt 5 µl bakterieller DNA integriert. Die PCR-Reaktionen wurden nun in den Thermocycler (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Biozym Diagnostik GmbH, Deutschland) eingebracht und mit einem definierten Programm (PAF\_PMT), welches in Tabelle 4 zu sehen ist, gestartet:

Zyklus	Temperatur [°C]	Zeit	Reaktion
1x	94	5 min	Anfangsdenaturierung der DNA
40x	94	25 s	Denaturierung der DNA
	58	25 s	Bindung der Primer
	72	45 s	3'-OH-Elongation der Primer
1x	72	3 min	finale Elongation

Tabelle 4: Definiertes PCR-Programm des Thermocyclers

Nach Beendigung des Programms wurde das Reaktionsgemisch bis zur Durchführung der reversen Hybridisierung bei 4 °C gelagert.

Durchführung des ELISA-Prinzips/der reversen Hybridisierung:

Zur Durchführung der auf dem ELISA-Prinzip basierenden reversen Hybridisierung zum Nachweis der DNA-Amplifikation wurden die acht verschiedenen Parident™ Sonden-Module benötigt. Pro Patientenprobe werden jeweils eine Sonde AA, PG, FN für PAF-PCR, TF, PI, TD, PM für die PMT-PCR und eine interne Kontrolle IC verwendet. Die Sonden enthaltenden Kavitäten wurden dafür fest in den dafür vorgesehenen Rahmen gesteckt. Die Kavitäten, die die spezifischen Sonden enthielten sind jeweils farbcodiert und in Abbildung 14 zu sehen.



Abbildung 14: farbig markierte Kavitäten mit spezifischen DNA-Sonden: AA (rot), PG (blau), FN (gelb), PI (grün), TF (orange), PM (schwarz), TD (violett), IK (weiß); zusätzliche Kavitäten: Blank (rot, äußerste Kavität rechts) und Negativkontrolle (blau, äußerste Kavität rechts)

Zur Qualitätssicherung und Vermeidung von Kontamination des Probenmaterials, der Reagenzien oder der Reaktionsansätze wurden neben einer internen Kontrolle (= Kontroll-DNA + Patientenprobe) eine Negativkontrolle (keine Zugabe von DNA) und ein Blank mitgeführt.

Die Reaktionsgemische der beiden durchgeführten Parident™-PCRs wurden im Reaktionsgefäß für 10 min bei 95 °C im Thermocycler (Biozym Diagnostik GmbH, Deutschland) denaturiert. Umgehend wurde der gesamte PCR-Ansatz (50 µl) zu 300 µl 2 – 8 °C kühler Hybridisierungslösung gegeben, gut gemischt und davon jeweils 50 µl in die Kavitäten pipettiert. Dabei wurden den Kavitäten mit den Sonden AA, PG, FN der PAF-PCR-Ansatz und den Kavitäten mit den Sonden TF, PI, TD, PM der PMT-

PCR-Ansatz zugefügt. Im Anschluss wurde die Mikrotiterplatte für 30 min bei 50 °C abgedeckt inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Kavitäten vollständig geleert und dreimal mit je 200 µl vorgewärmter stringenter Waschlösung durchspült/gewaschen. Es wurde darauf geachtet, letzte Flüssigkeitsreste der stringenten Waschlösung zwischen den Waschsritten und durch abschließendes Ausklopfen der Platte auf einem Papiertuch aus den Kavitäten zu entfernen. Abbildung 15 zeigt den Waschvorgang der Kavitäten mit Waschlösung bzw. Waschpuffer.

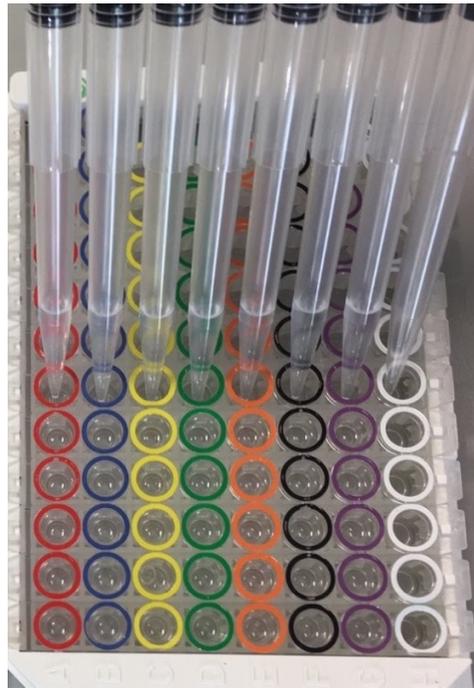


Abbildung 15: Wasch-/Pipettiervorgang der PCR-Röhrchen mit farbcodierten spezifischen Hybridisierungssonden

Im Anschluss erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit Hilfe eines Waschpuffers, dessen Konzentrat in einem Verhältnis von 1:20 mit destilliertem Wasser zuvor angemischt wurde. Dazu wurden 100 µl einer Konjugatlösung (Peroxidase-[POD]-Konjugat) aus Konjugat-Konzentrat und Waschpuffer (Verdünnung 1:100) in die Kavitäten pipettiert und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Konjugat bindet hochspezifisch an die Markierung des an die Oligonukleotidsonde gebundenen Einzelstrangs des PCR-Produkts. Ein weiterer dreimaliger Waschvorgang mit je 200 µl Waschpuffer folgte. Nun wurden 100 µl der gebrauchsfertigen TMB-Substratlösung in die Kavitäten gegeben und wiederum für 30 min bei 37 °C inkubiert. Diese Substratlösung wird durch die POD umgesetzt und erzeugt eine blaue Farbe. Die Reaktion wurde nach Ablauf der Zeit mit 100 µl Stopplösung beendet, sodass ein Farbumschlag nach gelb zu beobachten ist. Die Extinktionsmessung wurde in einem

Mikrotiterplatten-Photometer (Varioskan Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzlänge von 620 nm durchgeführt. Die Extinktion ist dabei ein Maß für die Abschwächung einer Strahlung nach Durchqueren eines Mediums.

Der Test ist unter folgenden Bedingungen auswertbar:

- Extinktion Reagenzienkontrolle < 0,200
- Extinktion Negativkontrolle < 0,150
- Extinktion der internen Kontrolle > 0,500

Anhand des Auswerteschemas in

*Tabelle 5* konnten die Ergebnisse der Photometrie ausgewertet werden und in den Patientenproben vorhandene Bakterien verifiziert werden.

Auswertekriterien für PAF-PMT-PCR							
	AA	PG	FN	PI	TF	PM	TD
+	> 0,3	> 0,3	> 0,3	> 0,2	> 0,2	> 0,15	> 0,2
++	> 1,0	> 1,0	> 1,5	> 0,4	> 0,4	> 0,3	> 0,5
+++	> 2,0	> 2,0	> 2,5	> 0,6	> 0,6	> 0,5	> 1,0

*Tabelle 5: Auswerteschema zur Extinktionsmessung*

Der Parident<sup>TM</sup>-Test wurde als Methode der Nachkontrolle nach einem definierten Zeitraum von 6 - 8 Wochen bei allen Patienten des ausgewählten Kollektivs (n = 10) angewandt, die nach klinischer Indikationsstellung neben SRP eine adjuvante Antibiose erhalten haben. Somit liegen für diese Patienten Auswertungen der mikrobiologischen Probenentnahme präantibiotisch (mittels MALDI-TOF-MS) und postantibiotisch (mittels Parident<sup>TM</sup>) vor.

### 3.7 Resistenztest: Epsilonometer-Test (E-Test)

Mit Hilfe des Epsilonometer-Tests (Gradientendiffusionstest) als Variante der Agardiffusionsmethode kann die Empfindlichkeit bzw. Sensibilität eines Bakteriums gegenüber einem bestimmten Antibiotikum getestet werden (Schuetz, 2014). Das Procedere der Agardiffusionsmethode zur Untersuchung anaerober Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika stellt die Goldstandard-Methode dar (Schuetz, 2014). In dieser Studie wurden nach vorheriger Analyse der Bakterienspezies deren Verhalten auf die Antibiotika Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin (0.016-256 µg/ml) genauer untersucht. Zur Durchführung des E-Tests wurde ein mit einem Antibiotikakonzentrationsgradienten imprägnierter Teststreifen (Etest<sup>®</sup>, bioMérieux,

Marcy l'Etoile, Frankreich) auf eine mit einer Reinkultur beimpften Agarplatte mit der Antibiotikaseite nach unten gelegt. Nach einer Bebrütungszeit von 24 h bei 37 °C konnte die minimale Hemmkonzentration (MHK) anhand einer auf der anderen Seite des Teststreifens angebrachten Skala abgelesen werden (Schuetz, 2014; Jorgensen und Ferraro, 2009). Die MHK ist dabei die Konzentration, die das Bakterienwachstum gerade noch verhindert. Im Falle einer hemmenden Wirkung des Antibiotikums auf das Bakterienwachstum bildete sich eine Ellipse auf der Agarplatte. Das auf den Teststreifen aufgebrauchte Antibiotikum diffundiert in den Agar und führte zu einem Wachstumstopp der Bakterien. In Abbildung 16 ist die an der Skala abzulesende MHK im Versuchsaufbau des E-Tests abgebildet.

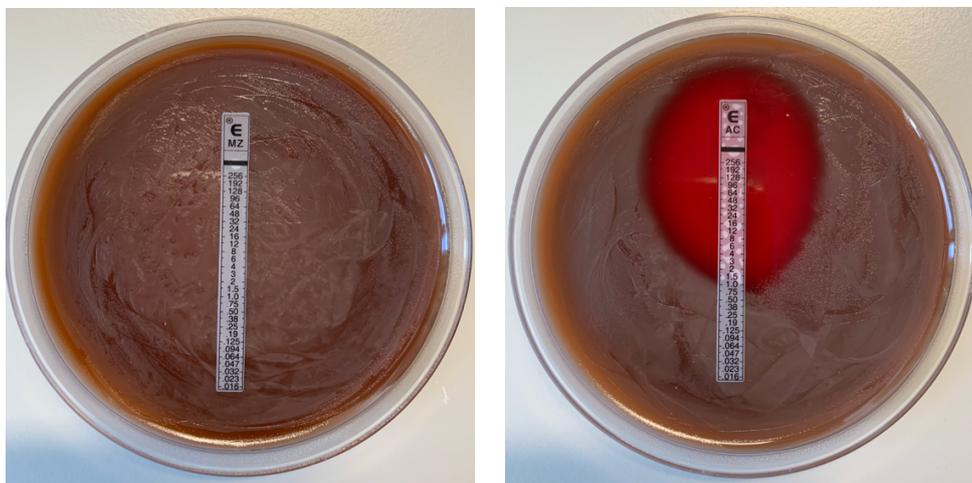


Abbildung 16: Sensibilitätsprüfung mittels E-Test; Links: keine Ellipse erkennbar (Keim resistent); Rechts: Ablesen der minimalen Hemmkonzentration (MHK) anhand der entstandenen Ellipse am Antibiotikum-Teststreifen

Für jedes zu testende Antibiotikum (Amoxicillin, Metronidazol, Clindamycin) wurden als Referenzwert jeweils zwei Agarplatten mit dem entsprechenden Bakterium beimpft und mit dem jeweiligen Teststreifen bebrütet. Für jedes Antibiotikum liegen somit zwei Ablesewerte der MHK vor, aus denen jeweils für die weitere Auswertung der Mittelwert gebildet wurde.

Konnte trotz sorgfältigen Arbeitens keine Ellipse erkannt werden (Abbildung 16 links), führte dies zu der Schlussfolgerung, dass die MHK den höchsten Wert auf der Skala des Teststreifens überschritten hatte. Der Keim wurde als „resistent“ ( $> 256 \mu\text{g/ml}$ ) gegenüber dem getesteten Antibiotikum eingestuft bzw. konnte dessen Wachstum nicht bei der in der Studie verwendeten Konzentration gehemmt werden. Bei einem Ablesewert  $< 0.16 \mu\text{g/ml}$  war die MHK kleiner als die minimale Konzentration des Antibiotikums auf dem Teststreifen und das Bakterium somit hoch sensibel. Mittels E-

Test wurden alle PA-assoziierten Bakterien, die zuvor aus der Liste aller durch MALDI-TOF-MS-Analyse analysierten Bakterien ausgewählt wurden hinsichtlich ihrer Sensibilität gegenüber Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin untersucht.

### **3.8 Statistische Auswertung der Sensibilitätsprüfung (E-Test)**

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte zunächst deskriptiv. Für die statistische Auswertung der Sensibilitätsprüfung (E-Test) wurden die ermittelten Werte in die Statistik-Software SPSS (SPSS, Version 24.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) übertragen. Die ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen für jedes Antibiotikum und jeden untersuchten Bakterienstamm wurden mittels des Shapiro-Wilks-Tests auf das Vorliegen einer Normalverteilung geprüft. Das Signifikanzniveau wurde für alle statistischen Tests auf  $\alpha = 0.05$  festgesetzt.

Da sich sämtliche Datensätze als nicht normalverteilt erwiesen, erfolgte die Auswertung mittels des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests. Der Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen wurde anschließend mit dem Dunn-Bonferroni-Test als Post-Hoc-Test durchgeführt, wobei eine Anpassung des Signifikanzniveaus nötig wurde.

## 4 Ergebnisse

Zunächst erfolgt eine kurze Übersicht der im Folgenden sowohl graphisch als auch deskriptiv dargestellten Ergebnisse. Als Erstes werden die Auswertungen der Anamnese- und Befundbögen sowie der klinischen Parameter des gesamten Patientenkollektivs (n = 44) dargestellt. Anschließend werden die Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse beschrieben. Weiter erfolgt die Darstellung und Visualisierung der Ergebnisse der Sensibilitätsprüfung (E-Test) der mittels MALDI-TOF analysierten und als PA-assoziiert gruppierten Bakterien gegenüber den hier in der Studie untersuchten Antibiotika Amoxicillin, Metronidazol und Clindymacin. Im Anschluss werden die Daten des paarweisen Vergleichs der Antibiotikaempfindlichkeit (MHK) der Bakteriengruppen erläutert. Zuletzt werden die Daten der mikrobiologischen Nachuntersuchung mittels Parident<sup>TM</sup> derjenigen Patientenauswahl (n = 10) aufgeführt, die nach Indikationsstellung eine adjuvante Antibiose (3 x 500 mg Amoxicillin und 3 x 400 mg Metronidazol über 7 Tage) erhielt und nach einem Kontrollzeitraum von 6 - 8 Wochen mikrobiologisch nachuntersucht wurde.

### 4.1 Daten aus Anamnese und Befund

In dieser Studie wurden 44 Probanden untersucht, darunter 19 weibliche und 25 männliche Patienten. Insgesamt befanden sich unter den Probanden 18 Raucher (40,9%), von denen 3 Probanden  $\leq 10$  pack years (Zahl der täglich konsumierten Packungen multipliziert mit der Zahl der Raucherjahre) und 15 Probanden  $> 10$  pack years aufwiesen. 15 Patienten (34,1%) gaben an, von parodontalen Erkrankungen innerhalb der engeren Familie Kenntnis zu haben.

Die allgemeine Anamnese ergab eine Medikamenteneinnahme bei 25 Patienten (56,8%), ein Diabetes mellitus Typ II lag bei zwei Patienten (4,5%) vor. Zwei Patienten (4,5%) waren von einer Atherosklerose und drei Patienten (6,8%) von einer Bluterkrankung betroffen. Zudem wurde nach einer bestehenden Osteoporose gefragt; keiner der 44 Patienten war erkrankt.

Weiterhin wurde erfragt, ob Symptome wie Zahnfleischbluten oder Lockerung oder die Kombination aus Zahnfleischbluten und Lockerung auffällig wurden. Bei 29 Probanden (65,9%) waren subjektiv Symptome vorhanden. Davon kam es bei 16 Probanden (36,4%) zu Zahnfleischbluten, bei fünf Patienten (11,4%) zu Lockerungen der Zähne

und bei acht Patienten (18,2%) zu einer Kombination aus Zahnfleischbluten und Zahnlockerung.

Es folgte die Frage, ob es bereits zu einem Verlust von Zähnen aufgrund der parodontalen Erkrankung kam. Bei 21 Patienten (47,7%) wurden bereits Zähne extrahiert, bei 11 dieser Patienten (25,0%) wurden  $\leq 3$  Zähne, bei fünf Patienten (11,4%) zwischen 4 - 7 Zähne und bei ebenso fünf Patienten (11,4%) wurden bereits  $> 7$  Zähne extrahiert. Bei 29 Probanden (65,9%) wurde bereits eine Parodontaltherapie durchgeführt. Bei 11 dieser Patienten (25,0%) lag die Parodontaltherapie zum Befragungszeitpunkt  $\leq 1$  Jahr, bei 18 Patienten (40,9%)  $> 1$  Jahr zurück.

Tabelle 6 zeigt die Mittelwertangaben der erhobenen Patientendaten in Bezug auf Anzahl aller Zähne bzw. Stellen und Anzahl der behandlungsbedürftigen Zähne bzw. Stellen:

Patientenkollektiv (n = 44)	$\bar{X}$ vorhandene Zähne	$\bar{X}$ vorhandene Stellen	$\bar{X}$ behandlungs- bedürftige Zähne	$\bar{X}$ behandlungs- bedürftige Stellen
	22,91	137,45	12,32	27,95

Tabelle 6: Arithmetische Mittel der Anzahl aller Zähne bzw. Stellen und der Anzahl der behandlungsbedürftigen Zähne bzw. Stellen des Patientenkollektivs (n = 44)

## 4.2 Speziesbestimmung mittels MALDI-TOF-MS-Verfahren

Mittels MALDI-TOF-MS-Analyse konnte eine Gesamtzahl von 159 Bakterien identifiziert werden. Prädominant waren *Fusobacterium spp.*, *Parvimonas micra*, *Prevotella spp.*, *Veillonella spp.*, *Eikenella corrodens* und *Gamella morbillorum*. In geringerer Anzahl traten *Atopobium spp.*, *Granulicatella adiacens*, *Eubacterium spp.*, *Bifidobacterium dentinum*, *Eggerthia catenaformis* und *Dialister pneumosintes* auf. Eine Liste aller im MALDI-TOF-MS analysierten Keime findet sich im Anhang dieser Arbeit. Aus der Liste aller im MALDI-TOF-MS ermittelten Bakterien wurden 131 Keime als parodontalpathogen eingestuft und im nächsten Schritt mit Hilfe des E-Tests auf Antibiotikaresistenzen untersucht.

### 4.3 Resistenztest (E-Test) der Bakterienstämme gegenüber Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin

Der E-Test wurde bei im MALDI-TOF-MS analysierten und PA-assoziierten Bakterien (n = 131) durchgeführt. Da einige Bakterien beim Versuchsvorgang des E-Tests nicht angewachsen sind, wurden diese aus der Liste aussortiert, sodass eine Gesamtzahl von 100 PA-assoziierten Keimen mittels E-Test auf Antibiotikaresistenzen untersucht werden konnte. Die PA-assoziierten Keime der erfolgreich durchgeführten E-Tests wurden für weitere Auswertungen in fünf Gruppen eingeteilt. Tabelle 7 zeigt die Einteilung in Gattung-/Spezies-Gruppen mit Anzahl der vorhandenen Bakterien innerhalb der Gruppe:

Anzahl	Gattung/Spezies
28	<i>Fusobacterium spp.</i>
23	<i>Prevotella spp.</i>
25	<i>Parvimonas micra</i>
18	<i>Veillonella spp.</i>
6	<i>Eikenella corrodens</i>

Tabelle 7: Einteilung der PA-assoziierten und mittels E-Test auf Antibiotikaresistenzen untersuchten Bakterien in fünf Gruppen

Für die Auswertung des E-Tests wurden innerhalb der Gattungs-/Spezies-Gruppierung anhand der Mittelwerte hinsichtlich der Empfindlichkeit weitere Gruppen gebildet. Dabei wurden Bakterien, die für die MHK Ablesewerte von  $> 256 \mu\text{g/ml}$  aufwiesen, als resistent eingestuft. Ablesewerte von  $> 1 \mu\text{g/ml}$  und  $\leq 256 \mu\text{g/ml}$  spiegelten eine geringere Empfindlichkeit des Bakteriums gegenüber diesem Antibiotikum wider bzw. wären höhere Antibiotikakonzentrationen notwendig geworden, um dieses Bakterium zu bekämpfen. Ablesewerte  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$  bedeuteten eine hohe Empfindlichkeit und ein gutes Ansprechen des Antibiotikums. Im Nachfolgenden werden die Ergebnisse der Sensibilitätsprüfung der Bakteriengruppen Antibiotika-spezifisch von Abbildung 17 bis Abbildung 21 graphisch dargestellt.

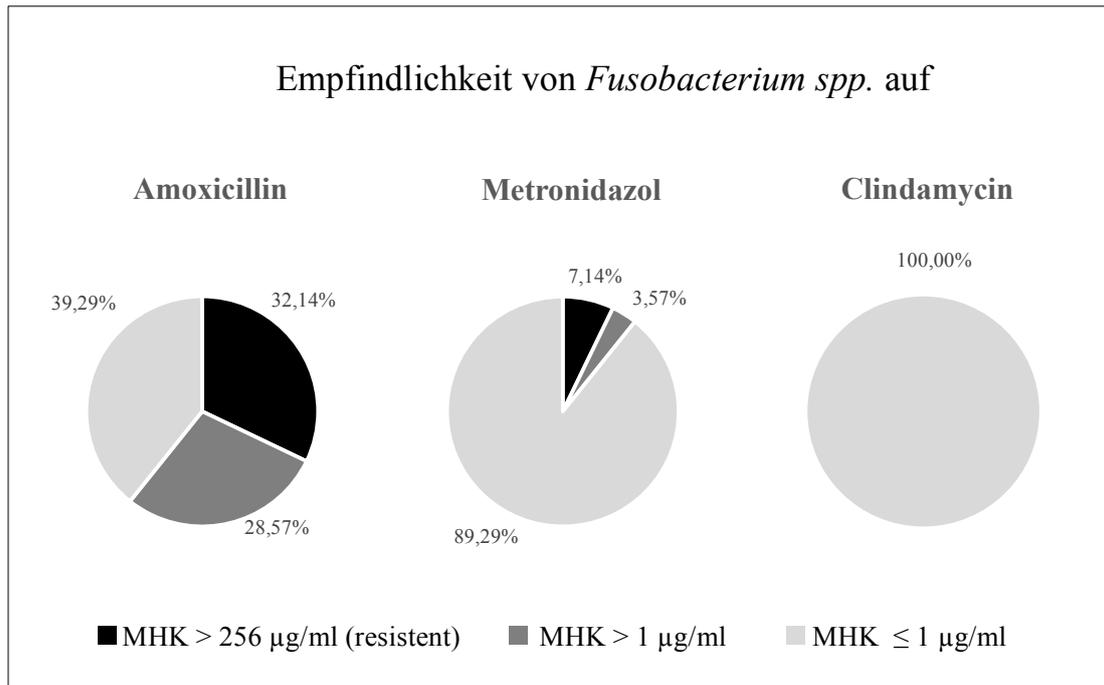


Abbildung 17: Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung mittels E-Test von *Fusobacterium spp.* auf Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin; MHK = Minimale Hemmkonzentration

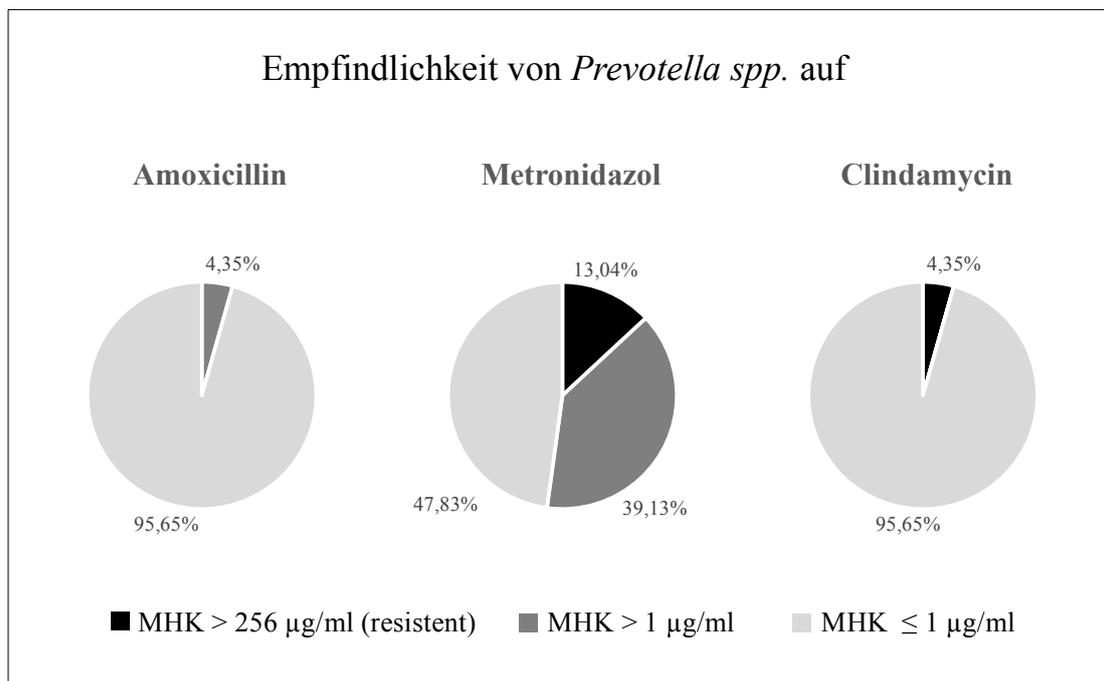


Abbildung 18: Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung mittels E-Test von *Prevotella spp.* auf Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin; MHK = Minimale Hemmkonzentration

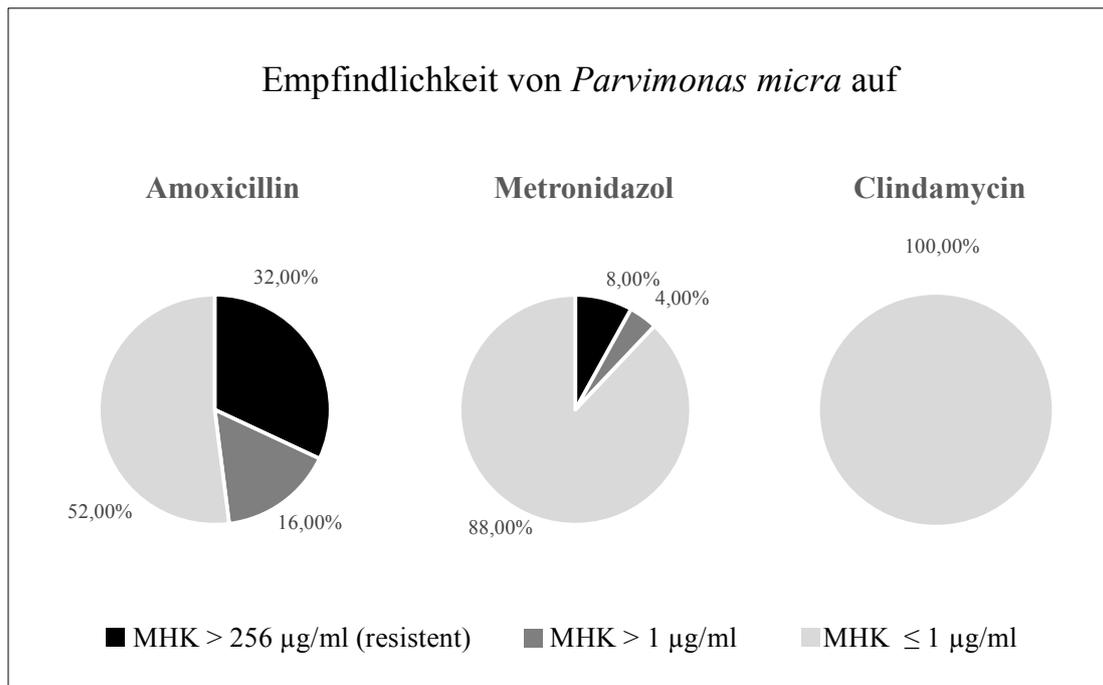


Abbildung 19: Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung mittels E-Test von *Parvimonas micra* auf Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin; MHK = Minimale Hemmkonzentration

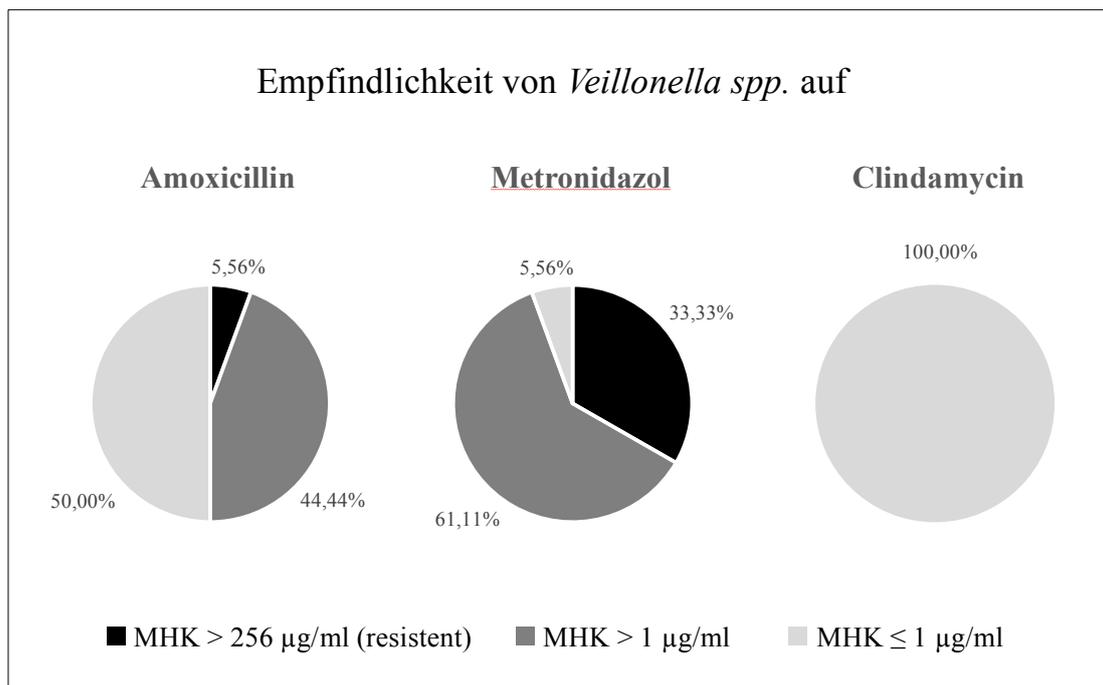


Abbildung 20: Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung mittels E-Test von *Veillonella spp.* auf Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin; MHK = Minimale Hemmkonzentration

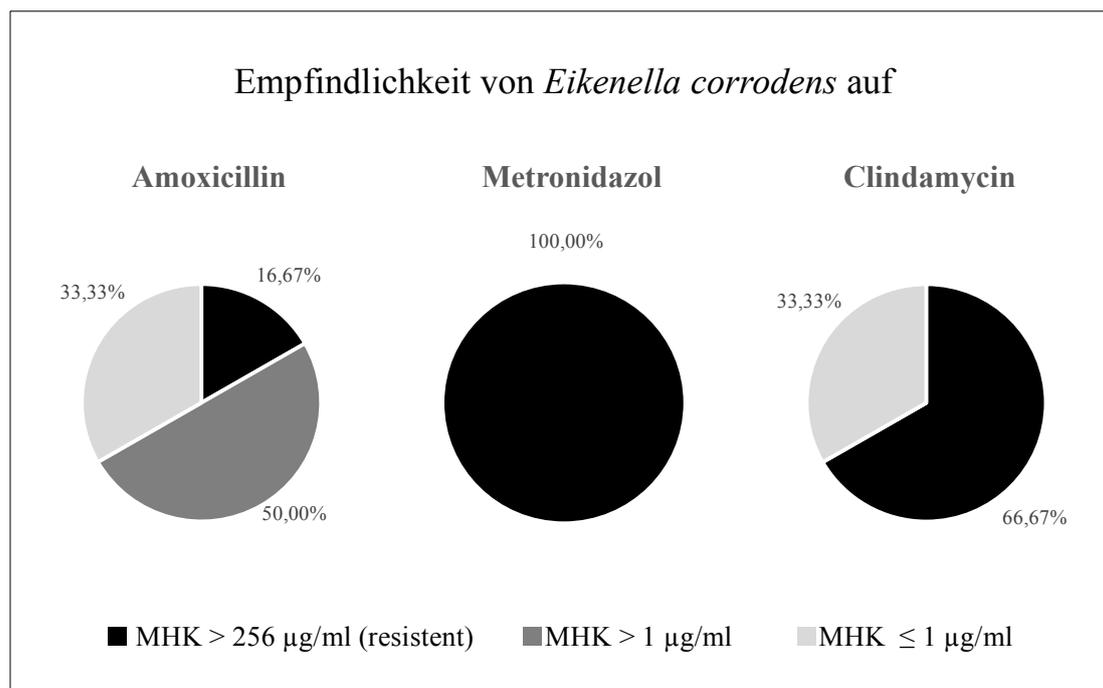


Abbildung 21: Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung mittels E-Test von *Eikenella corrodens* auf Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin; MHK = Minimale Hemmkonzentration

Es ist durch nahezu alle Bakteriengruppen hinweg ersichtlich, dass eine hohe Empfindlichkeit in Bezug auf Clindamycin vorliegt. 100% der getesteten Bakterien der Gruppen *Fusobacterium spp.*, *Parvimonas micra* und *Veillonella spp.* wiesen eine mittelwertige MHK von  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$  auf. In der Gruppe *Prevotella spp.* waren 95,65% hochsensibel (MHK  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ) und 4,35% resistent (MHK  $> 256 \mu\text{g/ml}$ ). In der Gruppe *Eikenella corrodens* wurde zu 33,33% eine hohe Empfindlichkeit nachgewiesen während sich 66,67% der getesteten Bakterien resistent zeigten (MHK  $> 256 \mu\text{g/ml}$ ).

Die Ergebnisse zeigten des Weiteren eine hohe Empfindlichkeit der Gruppen *Fusobacterium spp.* (89,29% mit MHK  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ) und *Parvimonas micra* (88,00% mit MHK  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ) gegenüber Metronidazol, jedoch war jeweils sowohl eine kleine Gruppe an gering empfindlichen als auch resistenten Keimen vorhanden. *Prevotella spp.* wies mit 13,04% eine markantere Prozentzahl an resistenten Keimen auf (MHK  $> 256 \mu\text{g/ml}$ ), 39,13% waren gering empfindlich (MHK  $> 1 \mu\text{g/ml}$ ), 47,83% hochsensibel (MHK  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ). Während 5,56% der *Veillonella spp.* hochsensibel (MHK  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ) und 61,11% gering empfindlich (MHK  $> 1 \mu\text{g/ml}$ ) auf Metronidazol reagierten, waren 33,33% der *Veillonella spp.* resistent (MHK  $> 256 \mu\text{g/ml}$ ). Die *Eikenella corrodens*-Gruppe wurde zu 100,00% resistent (MHK  $> 256 \mu\text{g/ml}$ ) getestet.

Für *Fusobacterium spp.* lag bezüglich Amoxicillin zu 39,29% eine hohe Empfindlichkeit (MHK  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ), zu 28,57% eine geringe Empfindlichkeit (MHK  $> 1 \mu\text{g/ml}$ ) und zu 32,14% eine Resistenz (MHK  $> 256 \mu\text{g/ml}$ ) vor. *Prevotella spp.* hingegen erwies sich zu 95,65% als hoch sensibel (MHK  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ), 4,35% waren gering empfindlich (MHK  $> 1 \mu\text{g/ml}$ ). Die Ergebnisse der *Parvimonas micra*-Gruppe lieferten eine Resistenz bei 32,00%, eine geringe Empfindlichkeit (MHK  $> 1 \mu\text{g/ml}$ ) bei 16,00% und eine hohe Empfindlichkeit (MHK  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ) bei 52,00% der getesteten Bakterien. Bezüglich *Veillonella spp.* sprachen 50,00% der untersuchten Bakterien hochsensibel auf Amoxicillin an, 44,44% mit geringer Empfindlichkeit (MHK  $> 1 \mu\text{g/ml}$ ), 5,56% zeigten eine Resistenz (MHK  $> 256 \mu\text{g/ml}$ ). Die Hälfte aller getesteten Bakterien in der untersuchten Gruppe *Eikenella corrodens* waren gering empfindlich (MHK  $> 1 \mu\text{g/ml}$ ), zu 33,33% lagen hoch sensible (MHK  $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ ), zu 16,67% resistente Keime (MHK  $> 256 \mu\text{g/ml}$ ) vor.

Die zu Beginn aufgestellte Hypothese, dass ein großer Teil der in der Studie nachgewiesenen und mit Parodontitiden assoziierten Bakterien in-vitro sicher durch die in den Leitlinien empfohlenen Antibiotika gefasst und erfolgreich beseitigt wird, kann somit abgelehnt werden.

#### **4.4 Auswertung der Antibiotikaempfindlichkeit im paarweisen Vergleich der Bakteriengruppen**

Um das Verhalten und die Empfindlichkeit der fünf Bakteriengruppen gegenüber einem bestimmten Antibiotikum genauer zu untersuchen, wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Bonferroni-Test als Post-Hoc-Test durchgeführt. Dabei wurden die für das jeweils getestete Antibiotikum ermittelten MHK-Mittelwerte aller fünf Bakteriengruppen paarweise verglichen und auf signifikante Unterschiede der Antibiotikaempfindlichkeit geprüft. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Verteilung der Werte der minimalen Hemmkonzentration (MHK) über die Bakteriengruppen hinweg identisch sei. Die Auswertungen der Analyse sind in Abbildung 22, Abbildung 23 und Abbildung 24 jeweils mit Signifikanzen dargestellt.

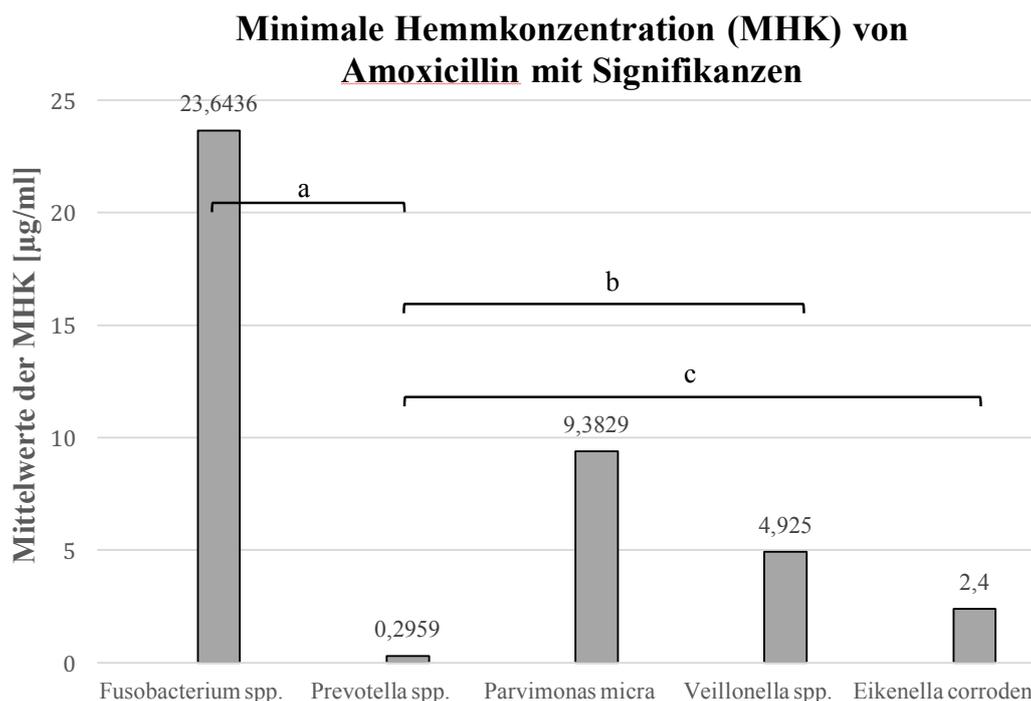


Abbildung 22: Darstellung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Amoxicillin der paarweise verglichenen Bakteriengruppen mit Signifikanzen; Dunn-Bonferroni-Post-Hoc-Test; <sup>a</sup> $p = 0.009$ ; <sup>b</sup> $p < 0.001$ ; <sup>c</sup> $p = 0.008$

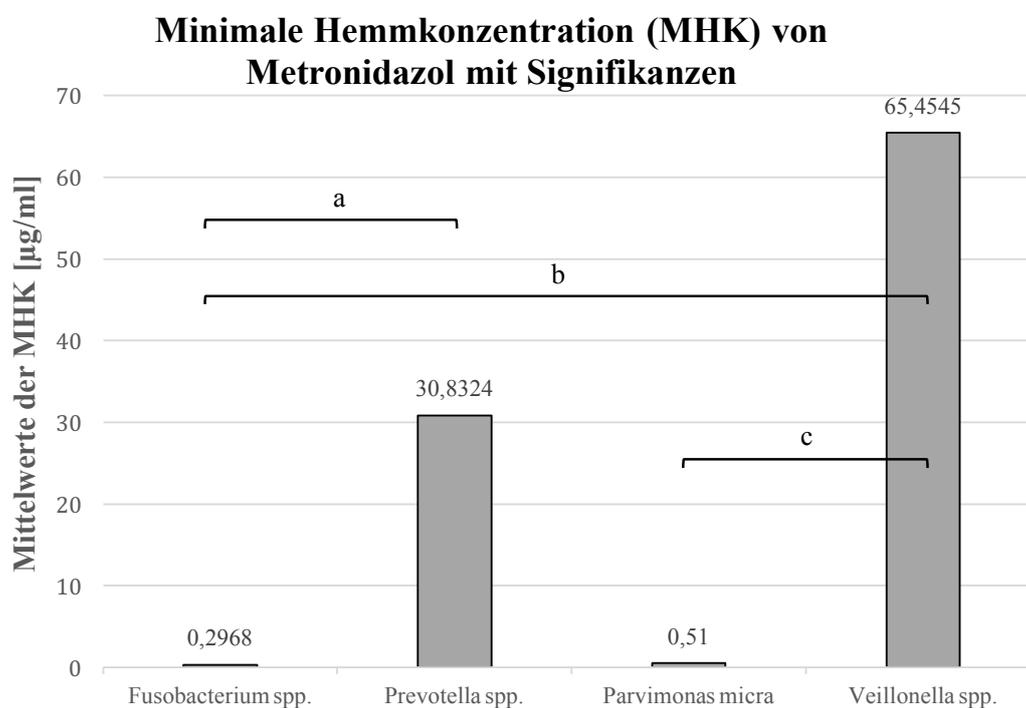


Abbildung 23: Darstellung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Metronidazol der paarweise verglichenen Bakteriengruppen mit Signifikanzen; Dunn-Bonferroni-Post-Hoc-Test; <sup>a</sup> $p = 0.023$ ; <sup>b</sup> $p < 0.001$ ; <sup>c</sup> $p < 0.001$

### Minimale Hemmkonzentration (MHK) von Clindamycin mit Signifikanzen

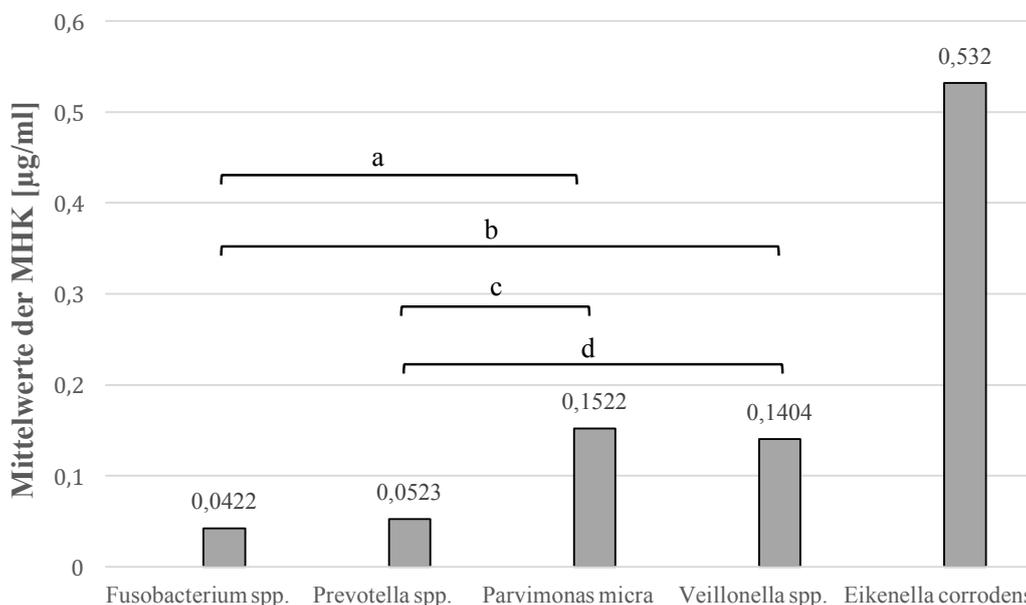


Abbildung 24: Darstellung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Clindamycin der paarweise verglichenen Bakteriengruppen mit Signifikanzen; Dunn-Bonferroni-Post-Hoc-Test; <sup>a</sup> $p < 0.001$ ; <sup>b</sup> $p = 0.002$ ; <sup>c</sup> $p < 0.001$ ; <sup>d</sup> $p < 0.001$

Abbildung 22 verbildlicht den paarweisen Vergleich der jeweiligen MHK-Mittelwerte [µg/ml] aller Bakteriengruppen bezüglich Amoxicillin und zeigt auf, dass sich sowohl die Bakteriengruppen *Fusobacterium spp.* und *Prevotella spp.* (<sup>a</sup> $p = 0.009$ ), *Prevotella spp.* und *Veillonella spp.* (<sup>b</sup> $p < 0.001$ ) als auch *Prevotella spp.* und *Eikenella corrodens* (<sup>c</sup> $p = 0.008$ ) signifikant hinsichtlich der in der Studie erhobenen MHK-Mittelwerte unterscheiden und somit ein signifikant unterschiedliches Sensibilitätsverhalten aufweisen.

Hinsichtlich des Sensibilitätsverhaltens der Bakteriengruppen auf das Antibiotikum Metronidazol wird in Abbildung 23 deutlich, dass es signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen *Fusobacterium spp.* und *Prevotella spp.* (<sup>a</sup> $p = 0.023$ ), *Fusobacterium spp.* und *Veillonella spp.* (<sup>b</sup> $p < 0.001$ ) sowie *Parvimonas micra* und *Veillonella spp.* (<sup>c</sup> $p < 0.001$ ) gibt. Aufgrund der natürlichen Resistenz von *Eikenella corrodens* gegenüber Metronidazol, die hier mit 100%iger Resistenz (MHK > 256 µg/ml) evident wurde, war diese Gruppe nicht Teil dieser Auswertung.

Abbildung 24 zeigt, dass sich bei paarweisem Vergleich der MHK-Werte der fünf Bakteriengruppen auf das Antibiotikum Clindamycin die Gruppen *Fusobacterium spp.* und *Parvimonas micra* (<sup>a</sup> $p < 0.001$ ), *Fusobacterium spp.* und *Veillonella spp.* (<sup>b</sup> $p = 0.002$ ), *Prevotella spp.* und *Parvimonas micra* (<sup>c</sup> $p < 0.001$ ) sowie *Prevotella spp.* und

*Veillonella spp.* ( $p < 0.001$ ) signifikant bezüglich ihrer Antibiotikaempfindlichkeit unterscheiden. *Eikenella corrodens* wurde ebenso aufgrund der natürlich vorliegenden Resistenz gegenüber Clindamycin, trotz der 33,33 % empfindlich getesteten Bakterien, nicht mit in die Auswertung einbezogen.

Die Annahme, dass die Verteilung der MHK-Werte über die Bakteriengruppen hinweg identisch sei, kann somit abgelehnt werden.

#### 4.5 Mikrobiologische Untersuchung einer Patientenauswahl vor und nach adjuvanter Antibiose und definiertem Untersuchungszeitraum mittels Parident™

Auf der Suche nach einem weiteren möglichen Ansatzpunkt, warum häufig nach initialer PA-Therapie und adjuvanter Antibiose der zunächst erzielte Therapieerfolg nicht gehalten werden kann, wurde anhand eines kleinen Patientenkollektivs ( $n = 10$ ) sowohl vor adjuvanter Antibiose als auch post-Antibiotikum (3 x 500 mg Amoxicillin und 3 x 400 mg Metronidazol über 7 Tage) mit einem Kontrollintervall von 6 – 8 Wochen eine mikrobiologische Diagnostik mittels Parident™ durchgeführt, um diese Ergebnisse mit denen der Resistenzprüfung genauer zu untersuchen. Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse des Parident™-Tests, der zum Nachweis der Bakterien AA, PG, FN, PI, TF, PM und TD diente, initial und nach erfolgtem SRP in Kombination mit einer adjuvanten Antibiose.

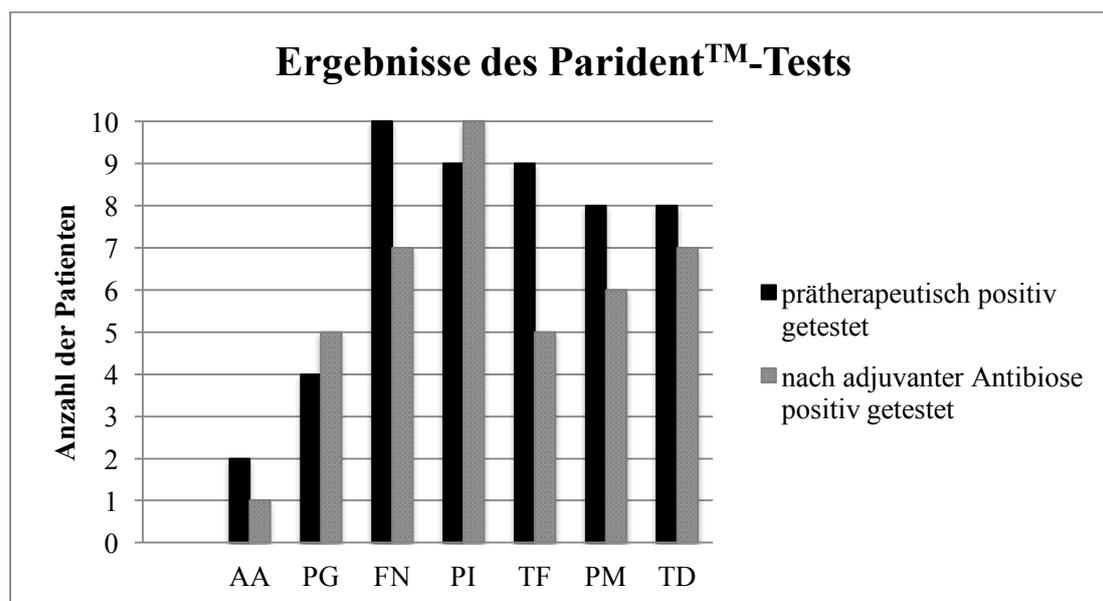


Abbildung 25: Ergebnisse des Parident™-Tests des Patientenkollektivs ( $n = 10$ ) prätherapeutisch und nach adjuvanter Antibiose; AA = *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; PG = *Porphyromonas gingivalis*; FN = *Fusobacterium*

*nucleatum*; PI = *Prevotella intermedia*; TF = *Tannerella forsythia*; PM = *Parvimonas micra*; TD = *Treponema denticola*

Die Darstellung macht deutlich, dass hinsichtlich der Bakterien AA, FN, TF, PM, TD zwar eine Reduktion der positiv getesteten Patientenproben zu verzeichnen war, für PG und PI jedoch post-Antibiotikum sogar jeweils eine Patientenprobe mehr positiv auf diese Bakterien getestet werden konnte als vor Therapie. Insgesamt ist nur eine mäßige Reduktion der initial vorhandenen Bakterien zu erkennen. Bei keinem Patienten konnte eine vollständige Eradikation des ursprünglich positiv getesteten Bakteriums nachgewiesen werden.

Die Parident<sup>TM</sup>-Auswertungen zweier Patienten (Patientennummer 34 und 19) wurden exemplarisch genauer untersucht und mit der zuvor getesteten in-vitro Sensibilität bezüglich Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin verglichen, um eine mögliche Ursache des Antibiotikum-Versagens aufzuzeigen. Bei Patient 34 wurden sowohl vor als auch nach einer den Leitlinien entsprechenden Therapie mit adjuvanter Antibiose mittels Parident<sup>TM</sup> die PA-assoziierten Keime PI und PM nachgewiesen. Die *in-vitro* Sensibilität der Patientenprobe 34 hinsichtlich der drei Antibiotika Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin ergab für *Parvimonas micra* eine Resistenz gegenüber Amoxicillin und für *Prevotella intermedia* eine Resistenz gegenüber Metronidazol.

Für Patient 19 konnte sowohl initial als auch nach erfolgter Therapie *Fusobacterium nucleatum* positiv mittels Parident<sup>TM</sup> nachgewiesen werden. Bei genauerer Betrachtung der ermittelten Antibiotikaempfindlichkeit dieser Patientenprobe ergab sich für *Fusobacterium nucleatum* eine Resistenz gegenüber Amoxicillin. Eine nachgewiesene in-vitro Resistenz könnte somit als Ansatzpunkt für eine Therapierefraktärität bzw. für einen persistierenden parodontopathogenen Keim gesehen werden. Hierbei handelt es sich lediglich um zwei Patientenbeispiele, es wurden nicht alle Parident<sup>TM</sup>-Auswertungen posttherapeutisch mit den Daten der Resistenzprüfung verglichen, sodass keine allgemeingültige Aussage getroffen werden kann und weitere Studien diesbezüglich durchgeführt werden müssen.

## 5 Diskussion

In dieser Studie sollte das Resistenzverhalten einer möglichst großen Anzahl an Wild-Stämmen parodontopathogener Keime hinsichtlich den in der Parodontologie häufig eingesetzten Antibiotika Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin in-vitro getestet werden und die Antibiotikaempfindlichkeit/Minimale Hemmkonzentration der geprüften parodontopathogenen Bakterien auf signifikante Unterschiede untersucht werden. Als Nebeneffekt sollten potentielle Zusammenhänge zwischen zuvor nachgewiesenen Resistenzen und dem prä- und postantibiotischen mikrobiologischen Befund aufgezeigt werden.

Bei den in dieser Studie untersuchten PA-assoziierten Keimen (*Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Parvimonas micra*, *Veillonella spp.*, *Eikenella corrodens*) konnten mittels E-Test Antibiotikaresistenzen bezüglich der Antibiotika Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin in-vitro nachgewiesen werden. Die Auswahl der verwendeten adjuvanten Antibiose, ein modifizierter „Winkelhoff-Cocktail“ bestehend aus Amoxicillin (3 x 500 mg) und Metronidazol (3 x 400 mg) über 7 Tage, erfolgte anhand den in den Leitlinien empfohlenen Therapieoptionen zur adjuvanten Antibiose und den in der Literatur häufig verwendeten Antibiotika Amoxicillin, Metronidazol, Tetrazyklin sowie bei Allergie-Patienten Clindamycin (Beikler *et al.*, 2003; Teughels *et al.*, 2014). Loesche und Mitarbeiter (1987) schlugen Metronidazol als Therapeutikum der Wahl der adjuvanten Antibiose vor, da mikrobiologische Untersuchungen der subgingivalen Flora vor allem streng anaerobe und gramnegative Bakterien, Spirochäten und *Treponema spp.* zeigten und diese Bakterien somit das Hauptziel der Therapie darstellten. Aufgrund der bei einer Parodontitis vorliegenden Mischinfektion mit auch fakultativen Bakterien wie *A. actinomycetemcomitans*, die keine Empfindlichkeit gegenüber Metronidazol aufweisen, beschrieb die Forschungsgruppe um Loesche 1987 den Trend zu Breitspektrum-Antibiotika, um alle potentiell pathogenen Keime zu erfassen, sodass eine Kombination aus Amoxicillin und Metronidazol in vielen klinischen Studien und somit auch in dieser Studie als adjuvante Antibiose nach SRP Anwendung fand (Mombelli, 2012; Sgolastra *et al.*, 2012b; van Winkelhoff *et al.*, 1989). In einer Studie zur bestmöglichen Dosierung und idealen Einnahmedauer einer adjuvanten Antibiose bei einer Kombination von Amoxicillin und Metronidazol konnten drei Monate nach Therapie keine bedeutenden klinischen Unterschiede hinsichtlich der Länge der Antibiotikaeinnahme oder der Dosierung evident werden,

sodass McGowan und Mitarbeiter (2018) eine generelle Empfehlung zur möglichst hochdosierten (500/500 mg oder 500/400 mg Amoxicillin und Metronidazol) und kurzen Einnahmedauer (7 Tage) aussprachen, um das Risiko von Antibiotikaresistenzen zu minimieren.

Anhand der Ergebnisse wird ersichtlich, dass Resistenzen gegenüber Amoxicillin in-vitro nachgewiesen werden konnten. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf den prozentualen Anteil der getesteten Bakterien innerhalb der zuvor gebildeten Bakteriengruppen (*Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Parvimonas micra*, *Eikenella corrodens*, *Veillonella spp.*). Von Resistenzen betroffen waren in dieser Studie vor allem *Fusobacterium spp.* (32,14%), *Parvimonas micra* (32,00%), *Eikenella corrodens* (16,67%) und geringfügig auch *Veillonella spp.* (5,56%). Für *Prevotella spp.* hingegen wurden widersprüchlich zu Ergebnissen der Literatur keine Resistenzen evident. Rams und Mitarbeiter (2014) fanden vor allem für *Prevotella intermedia* und *Prevotella nigrescens* Resistenzen gegenüber Amoxicillin, die auf die Entwicklung von  $\beta$ -Lactamase-Enzymen zur Hydrolyse des  $\beta$ -Lactam-Rings zurückzuführen waren (Rams *et al.*, 2013). Auch van Winkelhoff und Mitarbeiter (2005) wiesen Amoxicillin-Resistenzen gegenüber *Prevotella intermedia* nach. Beide Studien verwendeten jedoch unterschiedliche Methoden der Resistenztestung im Vergleich zur vorliegenden Studie.

Die Ergebnisse zeigten ebenso in-vitro Resistenzen gegenüber Metronidazol für alle getesteten Bakteriengruppen: *Eikenella corrodens* (100,00%), *Veillonella spp.* (33,33%), *Prevotella spp.* (13,04%), *Parvimonas micra* (8,00 %) sowie *Fusobacterium spp.* (7,14 %). Bei Durchsicht der Literatur ergaben sich ambivalente Studienergebnisse (mit geographischer Variabilität). Bereits 1993 brachte Listgarten in seiner Studie hervor, dass Resistenzen gegenüber Metronidazol bei parodontalen Keimen wie *A. actinomycetemcomitans* und *Fusobacterium spp.* gefunden werden konnten (Listgarten *et al.*, 1993). Während Veloo und Mitarbeiter (2012) für Metronidazol auch Resistenzen gegenüber *Prevotella spp.* beschrieben und ebenso auch Ardila und Mitarbeiter (2010a; Ardila *et al.*, 2010b) pathogene Bakterien der parodontalen Flora (PG, PI, FN) resistent testeten, konnten Dahlen und Preus (2017) in ihrer Studie 5 Jahre nach erfolgter Parodontaltherapie mit oder ohne adjuvante Metronidazol-Gabe keine kultivierbaren Metronidazol-Resistenzen unter Anaerobiern in der prädominanten subgingivalen Flora ihrer untersuchten Parodontitis-Patienten feststellen (alle *Porphyromonas spp.* und *Tannerella spp.* waren hochsensibel). Bei einer Studie mit Patienten, die an chronischer Parodontitis litten, konnten in den USA Metronidazol-Resistenzen vorwiegend unter

Nicht-Anaerobiern gefunden werden, dagegen kaum unter Anaerobiern (Rams *et al.*, 2014). Die Gründe hierfür sind allerdings im Wirkungsmechanismus des Metronidazols zu suchen, da es nur in einem vollständig anaeroben Milieu seine Wirkung entfalten kann. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen europäische Studien, die anaerobe Parodontalkeime auf Resistenzen untersuchten (Veloo *et al.*, 2012; van Winkelhoff *et al.*, 2005; van Winkelhoff *et al.*, 2000) sowie ein Review aller Studien zu Resistenzen unter Anaerobiern zwischen 2000-2013 (Boyanova *et al.*, 2015). Es ist hervorzuheben, dass die Ergebnisse für *Eikenella corrodens* gegenüber Metronidazol nicht überraschend sind. *Eikenella spp.* besitzt eine natürliche Resistenz gegenüber Metronidazol, sodass dieses Antibiotikum somit nicht zur Therapie dieser Spezies geeignet ist (Paul und Patel, 2001).

Betrachtet man die Ergebnisse des E-Tests für Clindamycin, wurden keine Resistenzen für *Fusobacterium spp.*, *Parvimonas micra* und *Veillonella spp.* evident. Die Auswertungen ergaben für *Eikenella corrodens* 66,67% sowie für *Prevotella spp.* 4,35% resistente Keime. Auch Veloo und Mitarbeiter (2012) beschrieben, dass keine Resistenzen oder nur in sehr geringer Form unter Anaerobier gegenüber Clindamycin in ihrer Studie vorzufinden waren und dass deren Ergebnisse konsistent mit denjenigen Ergebnissen von Walker und Gordon (1990) waren, die nach systemischer Clindamycin-Gabe deutliche klinische Verbesserungen bei refraktärer Parodontitis aufzeigten. Anhand der vorliegenden in-vitro Untersuchung könnte Clindamycin somit als hocheffektives Therapeutikum zur Behandlung bei Beteiligung von *Fusobacterium spp.*, *Parvimonas micra* und *Veillonella spp.* beschrieben werden. Zu beachten gilt hier jedoch, dass Clindamycin durch Inhibition der Proteinbiosynthese einem bakteriostatischem Wirkmechanismus folgt. Durch Bindung an die 50S-Untereinheit der Ribosomen kommt es zur Blockade des Enzyms Peptidyltransferase, welches die Peptidbindungen zwischen den einzelnen Aminosäuren katalysiert (Tenson *et al.*, 2003). So wird das Ausmaß der durch Clindamycin erfassten Bakterien zwar während der Einnahme und potentiell darüber hinaus in Schach gehalten, jedoch sind nachhaltige Effekte nach Beendigung der Antibiotika-Einnahme möglicherweise zu vernachlässigen. Da *Eikenella corrodens* ebenso wie für Metronidazol eine natürliche Resistenz gegenüber Clindamycin aufweist (Tami und Parker, 1984; Paul und Patel, 2001; Walker, 1996), stellen die 33,33% hoch empfindlich getesteten Bakterien der Gruppe *Eikenella corrodens* ein unerwartetes Ergebnis dar, allerdings wurden insgesamt nur wenige Stämme von *Eikenella corrodens* untersucht.

Der E-Test wurde als Gradienten-Diffusionsmethode angewandt, um Antibiotika-Resistenzen zu untersuchen. Die Vorteile bestehen in einer einfachen Anwendung und einer exakt abzulesenden MHK (Schuetz, 2014). Der E-Test gilt als eine, wenn nicht die einzige kommerziell verfügbare Testmethode zur „wahren“ Bestimmung der MHK (Shah, 2001). Als nachteilig wird beschrieben, dass Metronidazol-Resistenzen häufig überbewertet werden, da oftmals die notwendigen anaeroben Verhältnisse nicht korrekt eingehalten werden (Schuetz, 2014). Metronidazol stellt ein Pro-Drug dar, das erst durch die im anaeroben Milieu vorhandene Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aktiviert wird (Schuetz, 2014; Cormican *et al.*, 1996). Strikte anaerobe Verhältnisse während der Empfindlichkeitsprüfung sind entscheidend, um valide Ergebnisse für Metronidazol zu erzielen. Cormican (1996) beschrieb seine Ergebnisse als konkordant mit denen von Brazier und Mitarbeitern (1992) sowie Palmer und Mitarbeitern (1994), die die meisten mittels E-Test nachgewiesenen Metronidazol-Resistenzen auf Laborfehler zurückführten. Besondere Beachtung sollte auch die Tatsache finden, dass eine in-vitro nachgewiesene Resistenz nicht zwingend mit einer in-vivo Unwirksamkeit des Antibiotikums korreliert (Stratton, 2006). Essentielle Einflüsse von Wirtsfaktoren und Pharmakokinetik finden in-vitro keine Berücksichtigung. Ebenso ist es möglich, dass eine in-vitro nachgewiesene Empfindlichkeit des Antibiotikums hohe klinische Effektivität suggeriert, jedoch in klinischem Therapieversagen resultiert. Rex und Pfaller (2002) zeigten in klinischen Fallstudien, dass die Korrelation der Ergebnisse der in-vitro Resistenzprüfung mit dem therapeutischen Erfolg dem Muster einer „90-60-Regel“ bzw. einer „Natürlichen Response-Rate“ folgt. Diese Regel beschreibt, dass die Behandlung einer Infektion mit einem als empfindlich getesteten Bakterium in 90% der Fälle mit einem passenden Therapeutikum erfolgreich möglich ist. Hingegen kann in nur 60% der Fälle ein Therapieerfolg einer Infektion mit einem als resistent eingestuften Bakterium bei adäquater Therapie oder bei einem sensiblen Bakterium mit einem inadäquaten Therapeutikum verzeichnet werden.

In der Literatur sind unterschiedliche Ergebnisse zur Resistenz vorzufinden und möglicherweise auf eine große Auswahl an Methoden zurückzuführen, über deren Interpretation keine Einigkeit herrscht (Schuetz, 2014).

Um das Verhalten der Bakterien gegenüber Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin genauer zu untersuchen, wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Der Vergleich der in-vitro ermittelten Antibiotikaempfindlichkeit der Bakterienspezies untereinander ergab für Amoxicillin signifikante Unterschiede zwischen *Fusobacterium*

*spp.* und *Prevotella spp.* (<sup>a</sup>p = 0.009), *Prevotella spp.* und *Veillonella spp.* (<sup>b</sup>p < 0.001) sowie *Prevotella spp.* und *Eikenella corrodens* (<sup>c</sup>p = 0.008). Für Metronidazol differierten *Fusobacterium spp.* und *Prevotella spp.* (<sup>a</sup>p = 0.023), *Fusobacterium spp.* und *Veillonella spp.* (<sup>b</sup>p < 0.001) sowie *Parvimonas micra* und *Veillonella spp.* (<sup>c</sup>p < 0.001) signifikant während für Clindamycin *Fusobacterium spp.* und *Parvimonas micra* (<sup>a</sup>p < 0.001), *Fusobacterium spp.* und *Veillonella spp.* (<sup>b</sup>p = 0.002), *Prevotella spp.* und *Parvimonas micra* (<sup>c</sup>p < 0.001) sowie *Prevotella spp.* und *Veillonella spp.* (<sup>d</sup>p < 0.001) signifikante Unterschiede ergaben. Die Ergebnisse implizieren, dass eine teilweise signifikant abweichende Reaktion der Bakterienspezies auf die untersuchten Antibiotika vorlag, sodass als Schlussfolgerung die Dosierung eines adäquaten Antibiotikums an diejenige Bakterienspezies adaptiert werden sollte, welche die höchste MHK aufweist, sodass auch diese Spezies sicher erfasst werden kann.

Zur Evaluierung sowie zur allgemeinen Betrachtung von Fehlerquellen ist die angewandte Methodik genauer zu untersuchen. Die initiale Probenentnahme zur mikrobiologischen Diagnostik erfolgte sowohl für die anschließende MALDI-TOF-MS-Analyse als auch für den Parident<sup>TM</sup>-Test in einer Sitzung und direkt hintereinander mittels Papierspitzen. Bei jedem Patienten wurde stets mit der Probenentnahme für die MALDI-Analyse an den tiefsten Taschen des jeweiligen Quadranten begonnen, gefolgt von weiteren vier Probenentnahmen in den zweittiefsten Taschen des jeweiligen Quadranten. Dabei ist hervorzuheben, dass Papierspitzen nicht ideal dazu geeignet sind, möglichst viele Bakterien aufzunehmen und nicht alle Keime, die in Taschennischen oder am Taschenfundus residieren, erfasst werden können (Loomer, 2004). Zudem gilt zu beachten, dass eine einzelne entnommene Probe eines Quadranten bzw. einer Tasche nicht die in der gesamten Mundhöhle vorkommende parodontopathogene Flora repräsentiert (Loomer, 2004).

Im weiteren Verlauf der Studie konnten folglich auch nur diejenigen Bakterien angezchtet, analysiert, auf Resistenzen und mittels Parident<sup>TM</sup> getestet werden, die auch erfolgreich aus den parodontalen Taschen des Patienten entnommen und transportiert werden konnten. Zum Transport der MALDI-TOF-MS-Proben wurde das VMG-II-Transportmedium, das idealerweise sowohl das Wachstum als auch das Absterben der Bakterien verhindern sollte, herangezogen (Syed und Loesche, 1972). Die Anzucht erfolgte in einer anaeroben Kammer (BACTRON anaerobic chamber; SHEL LAB, Sheldon Manufacturing, Inc., Oregon, USA), die mit einem Gasgemisch bestehend aus 85% Stickstoff (N), 10% Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und 5% Wasserstoff

(H<sub>2</sub>) geflutet wurde. Ein mit einer Palladium-Legierung gefüllter Katalysator und spezielle Gaspaks (GasPak<sup>TM</sup> EZ Anaerobe Container System, Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA) sollten ein frühzeitiges Binden von Restsauerstoff in der Kammer unterbinden und ideale Wachstumsbedingungen für fakultativ und obligat anaerobe Bakterien ermöglichen. Der Schlußvorgang zum Transport der Agarplatten und den Verdünnungsreihen der Keimproben sowie im späteren Verlauf zur Anzucht von Reinkulturen und Durchführung des E-Tests in das Innere der anaeroben Kammer wurde sorgfältig durchgeführt, jedoch muss erwogen werden, dass es bei Versagen einer der erwähnten Maßnahmen, die absolute anaerobe Verhältnisse sicherstellen sollten, möglicherweise zur Hemmung des Wachstums obligat anaerober Bakterien gekommen sein kann und somit potentiell in der Patientenprobe vorhandene parodontopathogene Keime nicht im weiteren Verlauf der Studie (MALDI-TOF-MS und E-Test) analysiert und berücksichtigt werden konnten.

Mit der MALDI-TOF-MS-Analyse sollte ein neuartiger Ansatz zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen in der mikrobiologischen Diagnostik Anwendung finden (Schubert und Wieser, 2010). Mit Hilfe der Analyse des Proteinprofils von mehrheitlich ribosomalen Proteinen können Bakterienspezies identifiziert werden. Aufgrund der Ähnlichkeit der Sequenz der ribosomalen Proteine mit denen der 16S-rDNA-Sequenz können sehr eng verwandte Bakterienspezies mittels MALDI-TOF-MS jedoch nicht analysiert werden. Zur Analyse der Bakterienspezies sind dabei Bakterienkulturen notwendig, was eine mögliche Anfälligkeit der Untersuchungsmethode darstellt. Nur Keime, die kultivierbar sind und zuvor auch unter anaeroben Bedingungen angewachsen sind, können mit dieser Methode analysiert werden. Als großer Vorteil der MALDI-TOF-MS-Methode ist zu erwähnen, dass eine umfangreiche Datenbank an Protein-Referenzspektren verfügbar ist, die auch jederzeit erweitert werden kann und somit alle in der Datenbank eingetragenen Bakterien und – im Gegensatz zum Parident<sup>TM</sup>-Test – nicht nur diejenigen Bakterien analysiert werden können, nach denen vorher mittels DNA-Sonden spezifisch gesucht wurde. Die MALDI-TOF-MS-Methode besaß den Vorteil, dass durch die vorhandenen Kulturen im Anschluss Resistenzen mittels E-Test gegenüber Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin untersucht werden konnten. Der Parident<sup>TM</sup>-Test hingegen eignete sich nicht zur Durchführung der Resistenztests mittels E-Test, da für den Versuchsvorgang des Parident<sup>TM</sup>-Tests keine Bakterienkulturen generiert wurden, die jedoch für die Durchführung von Resistenztests mittels E-Test obligat waren.

Mittels Parident<sup>TM</sup> wurden die sieben Parodontalpathogene AA, PG, FN, PI, TF, PM und TD untersucht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten nur eine geringe Reduktion des initialen Keimspektrums nach adjuvanter Antibiose aus einer Kombination von Amoxicillin (3 x 500 mg) und Metronidazol (3 x 400 mg) über 7 Tage nach einem Kontrollzeitraum von 6 – 8 Wochen nach adjuvanter Antibiose. Es wurde keine vollständige Eradikation des ursprünglich positiv getesteten Bakteriums nachgewiesen.

Kritisch betrachtet werden sollte bei der Interpretation dieses Ergebnisses das Vorgehen zur Probenentnahme des Parident<sup>TM</sup>-Tests vor und nach adjuvanter Antibiose. Wie beschrieben wurde zur Analyse des initialen Keimspektrums mittels Parident<sup>TM</sup> die Probenentnahme in der jeweils nur zweittiefsten Tasche pro Quadrant herangezogen, während bei der Nachuntersuchung nach einem Kontrollintervall von 6 – 8 Wochen nach adjuvanter Antibiose die Probenentnahme durch Papierspitzen an den tiefsten gemessenen Stellen pro Quadrant stattfand. So ist bei der Interpretation der Ergebnisse des Parident<sup>TM</sup>-Tests und dem Vergleich des Keimspektrums vor und nach adjuvanter Antibiose zu bedenken, dass das Vorgehen zur Entnahme des Keimspektrums der initial zweittiefsten Tasche und der post-Antibiotikum tiefsten Taschen die Aussagekraft des Ergebnisses gemindert haben könnte. Von essentieller Bedeutung hinsichtlich der Beurteilung der Parident<sup>TM</sup>-Ergebnisse ist auch die Patienten-Compliance. Mangelhafte Patienten-Compliance durch inadäquate oder unvollständige Einnahme der verschriebenen adjuvanten Antibiose oder bewusste Non-Compliance könnten die Resultate maßgeblich beeinflusst haben. Bei der Einordnung der Ergebnisse vor und nach Antibiotika-Therapie sollte jedoch auch bedacht werden, dass potentiell entwickelte Resistenzen der Bakterien eine Rolle gespielt haben können. Die im Ergebnisteil beschriebenen Parident<sup>TM</sup>-Auswertungen zweier Patienten (Patientennummer 34 und 19) zeigten einen Vergleich der getesteten *in-vitro* Sensibilität bezüglich Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin der parodontalen Keime vor und nach adjuvanter Antibiose, um eine mögliche Ursache des Antibiotikum-Versagens in einer Resistenzentwicklung der Keime aufzuzeigen. Es wurde für Patient 34 ersichtlich, dass sowohl vor als auch nach einer den Leitlinien entsprechenden Therapie mit adjuvanter Antibiose mittels Parident<sup>TM</sup> die PA-assozierten Keime PI und PM nachgewiesen werden konnten. Die *in-vitro* Sensibilität der Patientenprobe 34 hinsichtlich der drei Antibiotika Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin ergab für *Parvimonas micra* eine Resistenz gegenüber Amoxicillin und für *Prevotella intermedia* eine Resistenz gegenüber Metronidazol, sodass angenommen

werden könnte, dass die in-vitro nachgewiesenen Resistenzen ursächlich für die Persistenz der parodontalpathogenen Keime verantwortlich sind. Ob in diesem Fall jedoch die Kombination aus Amoxicillin (3 x 500 mg) und Metronidazol (3 x 400 mg) unter Vorbehalt der adäquaten Einnahme des Patienten trotzdem beide Keime hätte erfassen können, bleibt weiter zu untersuchen. Ebenso wurde ein zweites Beispiel herausgearbeitet. Bei Patient 19 konnte sowohl initial als auch nach erfolgter Therapie *Fusobacterium nucleatum* positiv mittels Parident<sup>TM</sup> nachgewiesen werden. Bei genauerer Betrachtung der ermittelten Antibiotikaempfindlichkeit dieser Patientenprobe ergab sich für *Fusobacterium nucleatum* eine Resistenz gegenüber Amoxicillin. Eine nachgewiesene in-vitro Resistenz könnte somit als Ansatzpunkt für eine Therapierefraktärität bzw. für einen persistierenden parodontopathogenen Keim gesehen werden. Hierbei handelt es sich lediglich um zwei Patientenbeispiele, es wurden nicht alle Parident<sup>TM</sup>-Auswertungen posttherapeutisch mit den Daten der Resistenzprüfung verglichen, sodass keine allgemeingültige Aussage getroffen werden kann und weitere Studien diesbezüglich durchgeführt werden müssen.

Ziel der vorliegenden Studie war nicht, Therapieempfehlungen hinsichtlich adjuvanter Antibiose auszusprechen, sondern die Problematik der Resistenzentwicklung parodontaler Pathogene aufzuzeigen und anhand nachgewiesener Resistenzen und Antibiotikaempfindlichkeit der untersuchten Bakteriengruppen zu verdeutlichen, dass diese Problematik ein wichtiger Ansatzpunkt zur Vermeidung eines klinischen sowie mikrobiologischen Therapieversagens sein kann. Wichtiger Bestandteil dessen könnte sicherlich eine adäquate mikrobiologische Diagnostik und in Anlehnung an die nachgewiesenen und dargelegten Resistenzen eine individuelle Sensibilitätsprüfung der parodontalen Flora des Parodontitispatienten vor initialer Therapie darstellen. Nur so könnte sichergestellt werden, dass die vorliegenden Parodontopathogene mit hoher Sensibilität auf das getestete Antibiotikum reagieren werden und hinsichtlich der adjuvanter Antibiose die bestmöglichen mikrobiologischen Ergebnisse erzielt werden können.

Es wurde aufgezeigt und beschrieben, dass Antibiotikaresistenzen gegenüber Parodontalkeimen in-vitro nachgewiesen werden konnten und es signifikante Unterschiede hinsichtlich der in-vitro Antibiotikaempfindlichkeit der parodontalpathogenen Keime gibt. So sind einige der getesteten Bakterien hochsensibel auf Clindamycin getestet worden (*Fusobacterium spp.*, *Parvimonas micra* sowie *Veillonella spp.*) während *Eikenella corrodens* eine natürliche Resistenz aufweist und

auch *Prevotella spp.* in geringem Ausmaß von Resistenzen betroffen ist. Eine alleinige Gabe von Clindamycin zur Therapie wäre somit nicht umfassend genug. Ebenso verhält es sich mit einer alleinigen Gabe von Metronidazol. Die natürliche Resistenz von *Eikenella corrodens* und die in-vitro ermittelten Resistenzen von *Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Parvimonas micra* sowie *Veillonella spp.*, führen zu der allgemein bekannten Schlussfolgerung, dass auch Metronidazol als Monopräparat es nicht vermag, die gesamte pathogene parodontale Flora zu erfassen. Gegenüber dem Breitband-Antibiotikum Amoxicillin waren ebenso in nahezu allen Bakteriengruppen Resistenzen auffällig. *Fusobacterium spp.*, *Parvimonas micra*, *Eikenella corrodens* und *Veillonella spp.* zeigten Resistenzen gegenüber Amoxicillin, sodass auch für dieses häufig verschriebene Wahl-Therapeutikum für bakterielle Infektionen aller Art (Konde *et al.*, 2016) kein alle parodontalpathogenen Bakterien erfassendes Monopräparat darstellt. Dies unterstützt somit die Empfehlung, dass Kombinationspräparate zur Therapie parodontaler Erkrankungen erfolgsversprechend sind und Anwendung finden sollten (Jepsen und Jepsen, 2016; Teughels *et al.*, 2014; Winkel *et al.*, 2001; van Winkelhoff *et al.*, 1996).

Diese Studie zeigt, dass Resistenzen parodontapathogener Keime gegenüber Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin in-vitro nachgewiesen werden können. Des Weiteren wird ersichtlich, dass signifikante Unterschiede zwischen einigen Bakteriengruppen hinsichtlich der in-vitro ermittelten Antibiotikaempfindlichkeit/MHK vorhanden sind. Es wird zudem suggeriert, dass eine in-vitro-Resistenz ein in-vivo Therapieversagen zur Folge haben kann. Außerdem wird hervorgehoben, dass die Rolle und die Auswahl des adjuvanten Antibiotikums ein wichtiger Parameter in der Behandlung parodontaler Erkrankungen sein kann sowie einen Erklärungsansatz darstellen kann, warum trotz optimaler Mundhygieneverhältnisse und sorgfältig durchgeführter PA-Therapie mit adjuvanter Antibiose ein Therapieversagen resultieren kann.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde anhand eines Patientenkollektivs eine möglichst große Anzahl an Wild-Stämmen parodontopathogener Keime auf Resistenzen hinsichtlich den in der Parodontologie häufig eingesetzten Antibiotika Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin in-vitro getestet. Zur Analyse der Parodontopathogene kam dabei das MALDI-TOF-MS-Verfahren zur Anwendung. Anschließend wurde die ermittelte Antibiotikaempfindlichkeit/Minimale Hemmkonzentration (MHK) der getesteten Bakterienspezies paarweise untereinander verglichen, um mögliche Signifikanzen im Verhalten der Bakterien gegenüber den untersuchten Antibiotika aufzuzeigen.

Zudem sollten als Nebeneffekt der Studie an einer Auswahl an Patienten, die nach Indikationsstellung eine adjuvante Antibiose und nach einem definierten Kontrollintervall eine weitere mikrobiologische Diagnostik erhielt, potentielle Korrelationen zwischen nachgewiesenen Resistenzen und dem prä- und postantibiotischen mikrobiologischen Befund herausgearbeitet werden.

Ein Patientenkollektiv (n = 44) wurde im Rahmen parodontologischer Diagnostik vor Behandlung mikrobiologisch und klinisch untersucht. Hierzu wurden Daten zur allgemeinen und speziellen Anamnese abgefragt, ein umfassender Parodontalbefund erhoben sowie bei jedem Patienten mikrobiologische Proben entnommen. Es wurden Bakterienkulturen angezchtet, Reinkulturen generiert und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Diese Bakterienspezies wurden im nächsten Schritt mittels E-Test auf Empfindlichkeit gegenüber den in der Parodontologie häufig eingesetzten und von der Deutschen Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde (Beikler *et al.*, 2003) nach Indikationsstellung empfohlenen Antibiotika Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin in-vitro getestet und die ermittelten MHK-Werte der Bakterienspezies mittels des Kruskal-Wallis-Tests und des zugehörigen Dunn-Bonferroni-Post-Hoc-Tests untereinander auf signifikante Unterschiede untersucht.

Einer kleinen Patientenauswahl (n = 10) des Patientenkollektivs (n = 44) wurde nach klinisch rechtfertigender Indikation und erfolgtem SRP eine adjuvante Antibiose (3 x 500 mg Amoxicillin und 3 x 400 mg Metronidazol) über 7 Tage verabreicht. Nach einem definierten Kontrollintervall von 6 - 8 Wochen erfolgte eine weitere mikrobiologische Analyse mittels Parident<sup>TM</sup>. Aus dem Vergleich der initialen mikrobiologischen Ergebnisse und denen der Nachuntersuchung konnten Rückschlüsse in Bezug auf potenzielle Antibiotikaresistenzen der Bakterienspezies gezogen werden.

Mit Hilfe des E-Tests konnten in dieser Studie in-vitro Resistenzen gegenüber den Antibiotika Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin nachgewiesen werden. Die aufgeführten Prozentangaben beziehen sich jeweils auf den prozentualen Anteil der getesteten Bakterien innerhalb der zuvor gebildeten Bakteriengruppen (*Fusobacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Parvimonas micra*, *Eikenella corrodens*, *Veillonella spp.*).

Von Resistenzen gegenüber Amoxicillin waren vor allem *Fusobacterium spp.* (32,14%), *Parvimonas micra* (32,00%), *Eikenella corrodens* (16,67%) und geringfügig auch *Veillonella spp.* (5,56%) betroffen. Für Metronidazol konnten in allen Bakteriengruppen resistente Keime nachgewiesen werden: *Eikenella corrodens* (100,00%), *Veillonella spp.* (33,33%), *Prevotella spp.* (13,04%), *Parvimonas micra* (8,00%) sowie *Fusobacterium spp.* (7,14%). In-vitro Resistenzen bezüglich Clindamycin wurden für *Eikenella corrodens* (66,67%) sowie für *Prevotella spp.* (4,35%) evident, während für *Fusobacterium spp.*, *Parvimonas micra* und *Veillonella spp.* keine in-vitro Resistenzen gefunden werden konnten.

Der paarweise Vergleich der in-vitro ermittelten Antibiotikaempfindlichkeit/MHK der gruppierten Bakterienspezies ergab für Amoxicillin signifikante Unterschiede zwischen *Fusobacterium spp.* und *Prevotella spp.* (<sup>a</sup>p = 0.009), *Prevotella spp.* und *Veillonella spp.* (<sup>b</sup>p < 0.001) sowie *Prevotella spp.* und *Eikenella corrodens* (<sup>c</sup>p = 0.008). Für Metronidazol differierten *Fusobacterium spp.* und *Prevotella spp.* (<sup>a</sup>p = 0.023), *Fusobacterium spp.* und *Veillonella spp.* (<sup>b</sup>p < 0.001) sowie *Parvimonas micra* und *Veillonella spp.* (<sup>c</sup>p < 0.001) signifikant, während für Clindamycin *Fusobacterium spp.* und *Parvimonas micra* (<sup>a</sup>p < 0.001), *Fusobacterium spp.* und *Veillonella spp.* (<sup>b</sup>p = 0.002), *Prevotella spp.* und *Parvimonas micra* (<sup>c</sup>p < 0.001) sowie *Prevotella spp.* und *Veillonella spp.* (<sup>d</sup>p < 0.001) signifikante Unterschiede zeigten.

Die Auswertung des Parident<sup>TM</sup>-Tests vor und nach adjuvanter Antibiose ergab hinsichtlich der Bakterien AA, FN, TF, PM, TD zwar eine Reduktion der positiv getesteten Patientenproben, PG und PI wurden post-Antibiotikum jeweils bei einer Patientenprobe mehr positiv getestet als vor Therapie. Insgesamt war nur eine mäßige Reduktion der initial vorhandenen Bakterien zu erkennen. Bei keinem Patienten konnte eine vollständige Eradikation des ursprünglich positiv getesteten Bakteriums nachgewiesen werden.

Die vorliegende Studie leistet als Pilotstudie einen Beitrag zum Verständnis von in-vitro ermittelten Antibiotikaresistenzen und zur Beurteilung der Antibiotikaempfindlichkeit parodontalpathogener Keime.

Um die Ergebnisse dieser Studie umfassend einordnen zu können und unter Berücksichtigung potentieller Resistenzen weitreichendere Therapieempfehlungen hinsichtlich adjuvanter Antibiotika aussprechen zu können, sind weiterführende Studien notwendig. Dabei könnten prätherapeutische mikrobiologische Maßnahmen im Sinne von Resistenztests und der Generierung eines individuellen Antibiogramms bei einem größeren Patientenkollektiv im Vordergrund stehen, sodass eine individuell auf die prädominanten parodontal-assoziierten Keime und deren Resistenzverhalten angepasste adjuvante Antibiotikatherapie evaluiert werden kann.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aas, JA, Paster, BJ, Stokes, LN, Olsen, I, Dewhirst, FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 2005: 43:5721-32.
2. Albandar, JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontol 2000*, 2002: 29:31-69.
3. Albandar, JM, Tinoco, EM. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. *Periodontol 2000*, 2002: 29:153-76.
4. Ali, RW, Skaug, N, Nilsen, R, Bakken, V. Microbial associations of 4 putative periodontal pathogens in Sudanese adult periodontitis patients determined by DNA probe analysis. *J Periodontol*, 1994: 65:1053-7.
5. Amano, A. Host-parasite interactions in periodontitis: microbial pathogenicity and innate immunity. *Periodontol 2000*, 2010: 54:9-14.
6. Amano, A. Molecular interaction of Porphyromonas gingivalis with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*, 2003: 74:90-6.
7. Ardila, CM, Granada, MI, Guzman, IC. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res*, 2010a: 45:557-63.
8. Ardila, CM, Lopez, MA, Guzman, IC. High resistance against clindamycin, metronidazole and amoxicillin in Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans isolates of periodontal disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2010b: 15:e947-51.
9. Armitage, GC. Clinical evaluation of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 1995: 7:39-53.
10. Armitage, GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 1999: 4:1-6.
11. Armitage, GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 2004: 34:9-21.
12. Attstrom, R. Studies on neutrophil polymorphonuclear leukocytes at the dento-gingival junction in gingival health and disease. *J Periodontal Res Suppl*, 1971: 8:1-15.
13. Axelsson, P, Albandar, JM, Rams, TE. Prevention and control of periodontal diseases in developing and industrialized nations. *Periodontol 2000*, 2002: 29:235-46.
14. Bandhaya, P, Saraihong, P, Likittanasombat, K, Hengprasith, B, Torrungruang, K. Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotypes, the JP2 clone and cytolethal distending toxin genes in a Thai population. *J Clin Periodontol*, 2012: 39:519-25.
15. Beikler, T, Karch, H, Flemmig, TF. 2003. *Adjuvante Antibiotika in der Parodontitistherapie* [Online]. Available: <http://www.dgzmk.de/zahnaerzte/wissenschaft-forschung/stellungnahmen/archiv/details/document/adjuvante-antibiotika-in-der-parodontitistherapie.html> [Accessed 05.06.2016].
16. Beikler, T, Prior, K, Ehmke, B, Flemmig, TF. Specific antibiotics in the treatment of periodontitis--a proposed strategy. *J Periodontol*, 2004: 75:169-75.
17. Benachinmardi, KK, Nagmoti, J, Kothiwale, S, Metgud, SC. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase producing anaerobic bacteria in chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*, 2014: 18:567-9.
18. Berglundh, T, Armitage, G, Araujo, MG, Avila-Ortiz, G, Blanco, J, Camargo, PM, Chen, S, Cochran, D, Derks, J, Figuero, E, Hammerle, CHF, Heitz-Mayfield, LJA, Huynh-Ba, G, Iacono, V, Koo, KT, Lambert, F, Mccauley, L, Quirynen, M, Renvert, S, Salvi, GE, Schwarz, F, Tarnow, D, Tomasi, C, Wang, HL, Zitzmann, N. Peri-

- implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*, 2018: 45 Suppl 20:S286-S291.
19. Berglundh, T, Donati, M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J Clin Periodontol*, 2005: 32 Suppl 6:87-107.
  20. Berglundh, T, Krok, L, Liljenberg, B, Westfelt, E, Serino, G, Lindhe, J. The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, 1998: 25:354-62.
  21. Black, GV. The Formation of Poisons by Micro-Organisms. A biological Study of the Germ Theory of Disease. Philadelphia, PA: P.Blakiston, son & co., 1884:
  22. Black, GV. Susceptibility and immunity in dental caries. *Dent. Cosmos* 41, 1899: 826-830.
  23. Bolerazska, B, Marekova, M, Markovska, N. Trends in Laboratory Diagnostic Methods in Periodontology. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2016: 59:3-9.
  24. Boyanova, L, Kolarov, R, Mitov, I. Recent evolution of antibiotic resistance in the anaerobes as compared to previous decades. *Anaerobe*, 2015: 31:4-10.
  25. Brazier, JS, Hall, V, Duerden, BI. Artefactual resistance to metronidazole in anaerobes of the Bacteroides fragilis group. *J Antimicrob Chemother*, 1992: 30:553-4.
  26. Bridges, BA. Hypermutation in bacteria and other cellular systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2001: 356:29-39.
  27. Brown, LJ, Loe, H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol* 2000, 1993: 2:57-71.
  28. Byrne, SJ, Dashper, SG, Darby, IB, Adams, GG, Hoffmann, B, Reynolds, EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*, 2009: 24:469-77.
  29. Carlet, J, Pulcini, C, Piddock, LJ. Antibiotic resistance: a geopolitical issue. *Clin Microbiol Infect*, 2014: 20:949-53.
  30. Caton, J, Armitage, G, Berglundh, T, Chapple, ILC, Jepsen, S, K, SK, B, LM, Papananou, PN, Sanz, M, M, ST. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*, 2018: 89 Suppl 1:S1-S8.
  31. Cercek, JF, Kiger, RD, Garrett, S, Egelberg, J. Relative effects of plaque control and instrumentation on the clinical parameters of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 1983: 10:46-56.
  32. Chapple, IL, Van Der Weijden, F, Doerfer, C, Herrera, D, Shapira, L, Polak, D, Madianos, P, Louropoulou, A, Machtei, E, Donos, N, Greenwell, H, Van Winkelhoff, AJ, Eren Kuru, B, Arweiler, N, Teughels, W, Aimetti, M, Molina, A, Montero, E, Graziani, F. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol*, 2015: 42 Suppl 16:S71-6.
  33. Chapple, ILC, Mealey, BL, Van Dyke, TE, Bartold, PM, Dommisch, H, Eickholz, P, Geisinger, ML, Genco, RJ, Glogauer, M, Goldstein, M, Griffin, TJ, Holmstrup, P, Johnson, GK, Kapila, Y, Lang, NP, Meyle, J, Murakami, S, Plemons, J, Romito, GA, Shapira, L, Tatakis, DN, Teughels, W, Trombelli, L, Walter, C, Wimmer, G, Xenoudi, P, Yoshie, H. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*, 2018: 45 Suppl 20:S68-S77.
  34. Chaves, ES, Jeffcoat, MK, Ryerson, CC, Snyder, B. Persistent bacterial colonization of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, and Actinobacillus

- actinomycetemcomitans in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol*, 2000: 27:897-903.
35. Ciancio, SG. Systemic medications: clinical significance in periodontics. *J Clin Periodontol*, 2002: 29 Suppl 2:17-21.
  36. Cionca, N, Giannopoulou, C, Ugolotti, G, Mombelli, A. Microbiologic testing and outcomes of full-mouth scaling and root planing with or without amoxicillin/metronidazole in chronic periodontitis. *J Periodontol*, 2010: 81:15-23.
  37. Cormican, MG, Erwin, ME, Jones, RN. False resistance to metronidazole by E-test among anaerobic bacteria investigations of contributing test conditions and medium quality. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1996: 24:117-9.
  38. Costerton, JW, Stewart, PS, Greenberg, EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 1999: 284:1318-22.
  39. Courvalin, P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994: 38:1447-51.
  40. Cox, SW, Eley, BM, Kiili, M, Asikainen, A, Tervahartiala, T, Sorsa, T. Collagen degradation by interleukin-1beta-stimulated gingival fibroblasts is accompanied by release and activation of multiple matrix metalloproteinases and cysteine proteinases. *Oral Dis*, 2006: 12:34-40.
  41. Cullinan, MP, Hamlet, SM, Westerman, B, Palmer, JE, Faddy, MJ, Seymour, GJ. Acquisition and loss of Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans and Prevotella intermedia over a 5-year period: effect of a triclosan/copolymer dentifrice. *J Clin Periodontol*, 2003: 30:532-41.
  42. Dahlen, G, Pipattanagovit, P, Rosling, B, Moller, AJ. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol*, 1993: 8:375-82.
  43. Dahlen, G, Preus, HR. Low antibiotic resistance among anaerobic Gram-negative bacteria in periodontitis 5 years following metronidazole therapy. *Anaerobe*, 2017: 43:94-98.
  44. Davies, J, Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010: 74:417-33.
  45. De Almeida Pdel, V, Gregio, AM, Machado, MA, De Lima, AA, Azevedo, LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract*, 2008: 9:72-80.
  46. Deutsche Gesellschaft Für Parodontologie, EV. 2014: <https://www.dgparo.de/parodontitis/parodontitis>.
  47. Diniz, CG, Farias, LM, Carvalho, MA, Rocha, ER, Smith, CJ. Differential gene expression in a Bacteroides fragilis metronidazole-resistant mutant. *J Antimicrob Chemother*, 2004: 54:100-8.
  48. Edwards, DI. Nitroimidazole drugs--action and resistance mechanisms. I. Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother*, 1993: 31:9-20.
  49. Edwards, DI, Dye, M, Carne, H. The selective toxicity of antimicrobial nitroheterocyclic drugs. *J Gen Microbiol*, 1973: 76:135-45.
  50. Eickholz, P, Dannewitz, B, Kim, T. Antibiotics in Periodontal Therapy. *Perio*, 2005: 2:235-251.
  51. Eickholz, P, Kugel, B, Pohl, S, Naher, H, Staehle, HJ. Combined mechanical and antibiotic periodontal therapy in a case of Papillon-Lefevre syndrome. *J Periodontol*, 2001: 72:542-9.
  52. Ellen, RP, McCulloch, CA. Evidence versus empiricism: rational use of systemic antimicrobial agents for treatment of periodontitis. *Periodontol 2000*, 1996: 10:29-44.
  53. Ezzo, PJ, Cutler, CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000*, 2003: 32:24-35.

54. Feng, Z, Weinberg, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000*, 2006: 40:50-76.
55. Feres, M, Haffajee, AD, Allard, K, Som, S, Goodson, JM, Socransky, SS. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol*, 2002: 29:724-35.
56. Feres, M, Haffajee, AD, Allard, K, Som, S, Socransky, SS. Change in subgingival microbial profiles in adult periodontitis subjects receiving either systemically-administered amoxicillin or metronidazole. *J Clin Periodontol*, 2001: 28:597-609.
57. Feres, M, Soares, GM, Mendes, JA, Silva, MP, Faveri, M, Teles, R, Socransky, SS, Figueiredo, LC. Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*, 2012: 39:1149-58.
58. Fine, DH. Microbial identification and antibiotic sensitivity testing, an aid for patients refractory to periodontal therapy. A report of 3 cases. *J Clin Periodontol*, 1994: 21:98-106.
59. Fine, DH, Markowitz, K, Furgang, D, Fairlie, K, Ferrandiz, J, Nasri, C, Mckiernan, M, Gunsolley, J. Aggregatibacter actinomycetemcomitans and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol*, 2007: 45:3859-69.
60. Fleming, A. 1945. *Nobel Lecture: Penicillin* [Online]. Available: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf) [Accessed 29.5.2016].
61. Flemmig, TF, Milian, E, Karch, H, Klaiber, B. Differential clinical treatment outcome after systemic metronidazole and amoxicillin in patients harboring Actinobacillus actinomycetemcomitans and/or Porphyromonas gingivalis. *J Clin Periodontol*, 1998: 25:380-7.
62. Ford, PJ, Gamonal, J, Seymour, GJ. Immunological differences and similarities between chronic periodontitis and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, 2010: 53:111-23.
63. Gemmell, E, Marshall, RI, Seymour, GJ. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. *Periodontol 2000*, 1997: 14:112-43.
64. Genco, RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*, 1996: 67:1041-9.
65. Gilbert, P, Das, J, Foley, I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res*, 1997: 11:160-7.
66. Gmur, R, Strub, JR, Guggenheim, B. Prevalence of Bacteroides forsythus and Bacteroides gingivalis in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J Periodontol Res*, 1989: 24:113-20.
67. Goodson, JM. Antimicrobial strategies for treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 1994: 5:142-68.
68. Goodson, JM, Haffajee, AD, Socransky, SS, Kent, R, Teles, R, Hasturk, H, Bogren, A, Van Dyke, T, Wennstrom, J, Lindhe, J. Control of periodontal infections: a randomized controlled trial I. The primary outcome attachment gain and pocket depth reduction at treated sites. *J Clin Periodontol*, 2012: 39:526-36.
69. Gould, IM. Antibiotic resistance: the perfect storm. *Int J Antimicrob Agents*, 2009: 34 Suppl 3:S2-5.
70. Grant, DA, Grant, DA, Flynn, MJ, Slots, J. Periodontal microbiota of mobile and non-mobile teeth. *J Periodontol*, 1995: 66:386-90.
71. Graves, DT, Jiang, Y, Genco, C. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. *Curr Opin Infect Dis*, 2000: 13:227-232.

72. Greenwood, M. Medical emergencies in the dental practice. *Periodontol 2000*, 2008: 46:27-41.
73. Guerrero, A, Nibali, L, Lambertenghi, R, Ready, D, Suvan, J, Griffiths, GS, Wilson, M, Tonetti, MS. Impact of baseline microbiological status on clinical outcomes in generalized aggressive periodontitis patients treated with or without adjunctive amoxicillin and metronidazole: an exploratory analysis from a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, 2014: 41:1080-9.
74. Haffajee, AD, Arguello, EI, Ximenez-Fyvie, LA, Socransky, SS. Controlling the plaque biofilm. *Int Dent J*, 2003a: 53 Suppl 3:191-9.
75. Haffajee, AD, Cugini, MA, Dibart, S, Smith, C, Kent, RL, Jr., Socransky, SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 1997: 24:324-34.
76. Haffajee, AD, Smith, C, Torresyap, G, Thompson, M, Guerrero, D, Socransky, SS. Efficacy of manual and powered toothbrushes (II). Effect on microbiological parameters. *J Clin Periodontol*, 2001: 28:947-54.
77. Haffajee, AD, Socransky, SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000*, 2005: 38:9-12.
78. Haffajee, AD, Socransky, SS, Gunsolley, JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol*, 2003b: 8:115-81.
79. Heitz-Mayfield, LJ. Systemic antibiotics in periodontal therapy. *Aust Dent J*, 2009: 54 Suppl 1:S96-101.
80. Heitz-Mayfield, LJ, Trombelli, L, Heitz, F, Needleman, I, Moles, D. A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 2002: 29 Suppl 3:92-102; discussion 160-2.
81. Herbert, BA, Novince, CM, Kirkwood, KL. Aggregatibacter actinomycetemcomitans, a potent immunoregulator of the periodontal host defense system and alveolar bone homeostasis. *Mol Oral Microbiol*, 2016: 31:207-27.
82. Herrera, D, Alonso, B, Leon, R, Roldan, S, Sanz, M. Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *J Clin Periodontol*, 2008: 35:45-66.
83. Herrera, D, Matesanz, P, Bascones-Martinez, A, Sanz, M. Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics. *J Evid Based Dent Pract*, 2012: 12:50-60.
84. Hill, RW, Ramfjord, SP, Morrison, EC, Appleberry, EA, Caffesse, RG, Kerry, GJ, Nissle, RR. Four types of periodontal treatment compared over two years. *J Periodontol*, 1981: 52:655-62.
85. Hirschfeld, L, Wasserman, B. A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol*, 1978: 49:225-37.
86. Hof, H, Dörries, R 2005. *Duale Reihe - Medizinische Mikrobiologie (3. überarbeitete und erweiterte Auflage)*.
87. Holt, SC, Ebersole, JL. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000*, 2005: 38:72-122.
88. Holtfreter, B, Kocher, T, Hoffmann, T, Desvarieux, M, Micheelis, W. Prevalence of periodontal disease and treatment demands based on a German dental survey (DMS IV). *J Clin Periodontol*, 2010: 37:211-9.
89. How, KY, Song, KP, Chan, KG. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Front Microbiol*, 2016: 7:53.
90. Ings, RM, Mcfadzean, JA, Ormerod, WE. The mode of action of metronidazole in Trichomonas vaginalis and other micro-organisms. *Biochem Pharmacol*, 1974: 23:1421-9.

91. Ishikawa, I, Kawashima, Y, Oda, S, Iwata, T, Arakawa, S. Three case reports of aggressive periodontitis associated with *Porphyromonas gingivalis* in younger patients. *J Periodontol Res*, 2002: 37:324-32.
92. Jenkinson, HF, Lappin-Scott, HM. Biofilms adhere to stay. *Trends Microbiol*, 2001: 9:9-10.
93. Jepsen, K, Jepsen, S. Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontol 2000*, 2016: 71:82-112.
94. Jepsen, S. Parodontale und periimplantäre Erkrankungen - Neue Klassifikation vorgestellt. *Zahnärztliche Mitteilungen*, 2018: 108:76-82.
95. Jepsen, S, Caton, JG, Albandar, JM, Bissada, NF, Bouchard, P, Cortellini, P, Demirel, K, De Sanctis, M, Ercoli, C, Fan, J, Geurs, NC, Hughes, FJ, Jin, L, Kantarci, A, Lalla, E, Madianos, PN, Matthews, D, McGuire, MK, Mills, MP, Preshaw, PM, Reynolds, MA, Sculean, A, Susin, C, West, NX, Yamazaki, K. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 2018: 89 Suppl 1:S237-S248.
96. Jepsen, S, Deschner, J, Braun, A, Schwarz, F, Eberhard, J. Calculus removal and the prevention of its formation. *Periodontol 2000*, 2011: 55:167-88.
97. Johnson, LL, Dyer, R, Hupe, DJ. Matrix metalloproteinases. *Curr Opin Chem Biol*, 1998: 2:466-71.
98. Jordan, RA, Bodechtel, C, Hertrampf, K, Hoffmann, T, Kocher, T, Nitschke, I, Schiffner, U, Stark, H, Zimmer, S, Micheelis, W, Group, DVSI. The Fifth German Oral Health Study (Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie, DMS V) - rationale, design, and methods. *BMC Oral Health*, 2014: 14:161.
99. Jorgensen, JH, Ferraro, MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*, 2009: 49:1749-55.
100. Kaldahl, WB, Kalkwarf, KL, Patil, KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol*, 1993: 64:243-53.
101. Kaldahl, WB, Kalkwarf, KL, Patil, KD, Molvar, MP, Dyer, JK. Long-term evaluation of periodontal therapy: I. Response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol*, 1996: 67:93-102.
102. Kassebaum, NJ, Bernabe, E, Dahiya, M, Bhandari, B, Murray, CJ, Marcenes, W. Global Burden of Severe Tooth Loss: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res*, 2014: 93:20S-28S.
103. Kassenzahnärztliche Bundesvereinigung, Bundeszahnärztekammer. 2016. *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) - Kurzfassung* [Online]. <https://www.bzaek.de/wir-ueber-uns/daten-und-zahlen/deutsche-mundgesundheitsstudie-dms.html>. Available: [https://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/dms/Zusammenfassung\\_DMS\\_V.pdf](https://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/dms/Zusammenfassung_DMS_V.pdf) [Accessed].
104. Kawamoto, D, Ando, ES, Longo, PL, Nunes, AC, Wikstrom, M, Mayer, MP. Genetic diversity and toxic activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates. *Oral Microbiol Immunol*, 2009: 24:493-501.
105. Kinane, DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol*, 1999: 4:54-64.
106. Kinane, DF, Chestnutt, IG. Relationship of diabetes to periodontitis. *Curr Opin Periodontol*, 1997: 4:29-34.
107. Knowles, JW, Burgett, FG, Nissle, RR, Shick, RA, Morrison, EC, Ramfjord, SP. Results of periodontal treatment related to pocket depth and attachment level. Eight years. *J Periodontol*, 1979: 50:225-33.

108. Konde, S, Jairam, LS, Peethambar, P, Noojady, SR, Kumar, NC. Antibiotic overusage and resistance: A cross-sectional survey among pediatric dentists. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*, 2016: 34:145-51.
109. Krall, EA, Wehler, C, Garcia, RI, Harris, SS, Dawson-Hughes, B. Calcium and vitamin D supplements reduce tooth loss in the elderly. *Am J Med*, 2001: 111:452-6.
110. Kumar, A, Begum, N, Prasad, S, Lamba, AK, Verma, M, Agarwal, S, Sharma, S. Role of cytokines in development of pre-eclampsia associated with periodontal disease - Cohort Study. *J Clin Periodontol*, 2014: 41:357-65.
111. Lang, NP, Bartold, PM, Cullinan, M, Jeffcoat, M, Mombelli, A, Murakami, S, Page, R, Papapanou, P, Tonetti, M. Consensus report: Aggressive Periodontitis. *Ann Periodontol*, 1999: 4:53.
112. Laxminarayan, R, Duse, A, Wattal, C, Zaidi, AK, Wertheim, HF, Sumpradit, N, Vlieghe, E, Hara, GL, Gould, IM, Goossens, H, Greko, C, So, AD, Bigdeli, M, Tomson, G, Woodhouse, W, Ombaka, E, Peralta, AQ, Qamar, FN, Mir, F, Kariuki, S, Bhutta, ZA, Coates, A, Bergstrom, R, Wright, GD, Brown, ED, Cars, O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*, 2013: 13:1057-98.
113. Leclercq, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis*, 2002: 34:482-92.
114. Leewenhoek, A. An Abstract of a Letter from Mr. Anthony Leewenhoek at Delft, Dated Sep. 17.1683. Containing some microscopical observations, about animals in the scurf of the teeth, the substance call'd worms in the nose, the cuticula consisting of scales *Phil Trans R Soc Lond*, 1684: 14:568-574.
115. Lepine, G, Caudry, S, Dirienzo, JM, Ellen, RP. Epithelial cell invasion by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains from restriction fragment-length polymorphism groups associated with juvenile periodontitis or carrier status. *Oral Microbiol Immunol*, 1998: 13:341-7.
116. Levin, BR, Rozen, DE. Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 2006: 4:556-62.
117. Levy, SB. Balancing the drug-resistance equation. *Trends Microbiol*, 1994: 2:341-2.
118. Levy, SB. The future of antibiotics: facing antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect*, 2000: 6 Suppl 3:101-6.
119. Listgarten, MA. Nature of periodontal diseases: pathogenic mechanisms. *J Periodontal Res*, 1987: 22:172-8.
120. Listgarten, MA, Lai, CH, Young, V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol*, 1993: 64:155-61.
121. Livermore, DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis*, 2003: 36:S11-23.
122. Loe, H, Anerud, A, Boysen, H, Morrison, E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol*, 1986: 13:431-45.
123. Loe, H, Theilade, E, Jensen, SB. Experimental Gingivitis in Man. *J Periodontol*, 1965: 36:177-87.
124. Loesche, WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev*, 1976: 9:65-107.
125. Loesche, WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, 1986: 50:353-80.
126. Loesche, WJ, Giordano, JR. Metronidazole in periodontitis V: debridement should precede medication. *Compendium*, 1994: 15:1198, 1201, 1203 passim; quiz 1218.
127. Loesche, WJ, Schmidt, E, Smith, BA, Caffessee, R, Stoll, J. Metronidazole therapy for periodontitis. *J Periodontal Res*, 1987: 22:224-6.

128. Loesche, WJ, Syed, SA, Morrison, EC, Kerry, GA, Higgins, T, Stoll, J. Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. *J Periodontol*, 1984: 55:325-35.
129. Loomer, PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 2004: 34:49-56.
130. Lopez, NJ, Socransky, SS, Da Silva, I, Japlit, MR, Haffajee, AD. Effects of metronidazole plus amoxicillin as the only therapy on the microbiological and clinical parameters of untreated chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 2006: 33:648-60.
131. Mackler, BF, Frostad, KB, Robertson, PB, Levy, BM. Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. *J Periodontol Res*, 1977: 12:37-45.
132. Mah, TF, O'toole, GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 2001: 9:34-9.
133. Marsh, PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, 2003: 149:279-94.
134. Marsh, PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*, 1994: 8:263-71.
135. Matarazzo, F, Figueiredo, LC, Cruz, SE, Faveri, M, Feres, M. Clinical and microbiological benefits of systemic metronidazole and amoxicillin in the treatment of smokers with chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*, 2008: 35:885-96.
136. Mcgowan, K, Mcgowan, T, Ivanovski, S. Optimal dose and duration of amoxicillin-plus-metronidazole as an adjunct to non-surgical periodontal therapy: A systematic review and meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *J Clin Periodontol*, 2018: 45:56-67.
137. Mdala, I, Haffajee, AD, Socransky, SS, De Blasio, BF, Thoresen, M, Olsen, I, Goodson, JM. Multilevel analysis of clinical parameters in chronic periodontitis after root planing/scaling, surgery, and systemic and local antibiotics: 2-year results. *J Oral Microbiol*, 2012: 4:
138. Mercado, FB, Marshall, RI, Klestov, AC, Bartold, PM. Relationship between rheumatoid arthritis and periodontitis. *J Periodontol*, 2001: 72:779-87.
139. Mestnik, MJ, Feres, M, Figueiredo, LC, Soares, G, Teles, RP, Fermiano, D, Duarte, PM, Faveri, M. The effects of adjunctive metronidazole plus amoxicillin in the treatment of generalized aggressive periodontitis: a 1-year double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*, 2012: 39:955-61.
140. Micheelis, W, Schiffner, U. Vierte deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Neue Ergebnisse zu oralen Krankheitsprävalenzen, Risikogruppen und zum zahnärztlichen Versorgungsgrad in Deutschland. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag, 2006, 2005:
141. Miller, WD. The Micro-Organisms of the Human Mouth. Philadelphia: The S.S. White Dental MFG. Co, 1890:
142. Modlin, RL, Nutman, TB. Type 2 cytokines and negative immune regulation in human infections. *Curr Opin Immunol*, 1993: 5:511-7.
143. Moller, AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr*, 1966: 74:Suppl:1-380.
144. Mombelli, A. Antimicrobial advances in treating periodontal diseases. *Front Oral Biol*, 2012: 15:133-48.
145. Mombelli, A. Heresy? Treatment of chronic periodontitis with systemic antibiotics only. *J Clin Periodontol*, 2006: 33:661-2.
146. Mombelli, A, Almaghlouth, A, Cionca, N, Courvoisier, DS, Giannopoulou, C. Differential benefits of amoxicillin-metronidazole in different phases of periodontal

- therapy in a randomized controlled crossover clinical trial. *J Periodontol*, 2015: 86:367-75.
147. Moore, WE, Holdeman, LV, Cato, EP, Good, IJ, Smith, EP, Ranney, RR, Palcanis, KG. Variation in periodontal floras. *Infect Immun*, 1984: 46:720-6.
148. Mosmann, TR, Cherwinski, H, Bond, MW, Giedlin, MA, Coffman, RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 1986: 136:2348-57.
149. Moss, ME, Beck, JD, Kaplan, BH, Offenbacher, S, Weintraub, JA, Koch, GG, Genco, RJ, Machtei, EE, Tedesco, LA. Exploratory case-control analysis of psychosocial factors and adult periodontitis. *J Periodontol*, 1996: 67:1060-9.
150. Moughal, NA, Adonogianaki, E, Thornhill, MH, Kinane, DF. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally-induced gingivitis. *J Periodontol Res*, 1992: 27:623-30.
151. Nishikawa, M, Yamaguchi, Y, Yoshitake, K, Saeki, Y. Effects of TNF $\alpha$  and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol Res*, 2002: 37:167-76.
152. Nunn, ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000*, 2003: 32:11-23.
153. Nyman, S, Lindhe, J, Rosling, B. Periodontal surgery in plaque-infected dentitions. *J Clin Periodontol*, 1977: 4:240-9.
154. Ohlrich, EJ, Cullinan, MP, Seymour, GJ. The immunopathogenesis of periodontal disease. *Aust Dent J*, 2009: 54 Suppl 1:S2-10.
155. Page, RC, Kornman, KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*, 1997: 14:9-11.
156. Page, RC, Schroeder, HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest*, 1976: 34:235-49.
157. Palmer, J, Chen, S, Gottlieb, T, Schio, F, Gilbert, G. False resistance to metronidazole of anaerobic bacteria using the E test. *J Antimicrob Chemother*, 1994: 34:598-600.
158. Papapanou, PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol*, 1996: 1:1-36.
159. Papapanou, PN, Sanz, M, Buduneli, N, Dietrich, T, Feres, M, Fine, DH, Flemmig, TF, Garcia, R, Giannobile, WV, Graziani, F, Greenwell, H, Herrera, D, Kao, RT, Kerschull, M, Kinane, DF, Kirkwood, KL, Kocher, T, Kornman, KS, Kumar, PS, Loos, BG, Machtei, E, Meng, H, Mombelli, A, Needleman, I, Offenbacher, S, Seymour, GJ, Teles, R, Tonetti, MS. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 2018: 89 Suppl 1:S173-S182.
160. Papapanou, PN, Wennstrom, JL, Grondahl, K. A 10-year retrospective study of periodontal disease progression. *J Clin Periodontol*, 1989: 16:403-11.
161. Paul, K, Patel, SS. *Eikenella corrodens* infections in children and adolescents: case reports and review of the literature. *Clin Infect Dis*, 2001: 33:54-61.
162. Pavicic, MJ, Van Winkelhoff, AJ, De Graaff, J. In vitro susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a number of antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992: 36:2634-8.
163. Petersilka, GJ, Ehmke, B, Flemmig, TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol 2000*, 2002: 28:56-71.
164. Poole, K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci*, 2004: 61:2200-23.
165. Poveda Roda, R, Bagan, JV, Sanchis Bielsa, JM, Carbonell Pastor, E. Antibiotic use in dental practice. A review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2007: 12:E186-92.

166. Ramfjord, SP, Caffesse, RG, Morrison, EC, Hill, RW, Kerry, GJ, Appleberry, EA, Nissle, RR, Stults, DL. 4 modalities of periodontal treatment compared over 5 years. *J Clin Periodontol*, 1987: 14:445-52.
167. Rams, TE, Degener, JE, Van Winkelhoff, AJ. Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota. *J Periodontol*, 2014: 85:160-9.
168. Rams, TE, Degener, JE, Van Winkelhoff, AJ. Prevalence of beta-lactamase-producing bacteria in human periodontitis. *J Periodontol Res*, 2013: 48:493-9.
169. Renvert, S, Dahlen, G, Wikstrom, M. Treatment of periodontal disease based on microbiological diagnosis. Relation between microbiological and clinical parameters during 5 years. *J Periodontol*, 1996: 67:562-71.
170. Rex, JH, Pfaller, MA. Has antifungal susceptibility testing come of age? *Clin Infect Dis*, 2002: 35:982-9.
171. Reynolds, JJ, Meikle, MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol 2000*, 1997: 14:144-57.
172. Robert Koch Institut. Zur Surveillance der Antibiotikaresistenz in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin*, 2007: 44:405-412.
173. Roberts, MC, Sutcliffe, J, Courvalin, P, Jensen, LB, Rood, J, Seppala, H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999: 43:2823-30.
174. Rooney, J, Wade, WG, Sprague, SV, Newcombe, RG, Addy, M. Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazole and amoxicillin alone and combined. A placebo controlled study. *J Clin Periodontol*, 2002: 29:342-50.
175. Rosenberg, ES, Torosian, JP, Hammond, BF, Cutler, SA. Routine anaerobic bacterial culture and systemic antibiotic usage in the treatment of adult periodontitis: a 6-year longitudinal study. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 1993: 13:213-43.
176. Rosier, BT, De Jager, M, Zaura, E, Krom, BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol*, 2014: 4:92.
177. Saxen, L, Asikainen, S. Metronidazole in the treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol*, 1993: 20:166-71.
178. Saxer, C, Saxer, UP. Wirrwarr in der Mundhöhle. *Dental Magazin*, 2011: 29:54-61.
179. Schiffner, U, Hoffmann, T, Kerschbaum, T, Micheelis, W. Oral health in German children, adolescents, adults and senior citizens in 2005. *Community Dent Health*, 2009: 26:18-22.
180. Schubert, S, Wieser, A. MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *BIOspektrum*, 2010: 760-762.
181. Schuetz, AN. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis*, 2014: 59:698-705.
182. Schuster, GS. Oral flora and pathogenic organisms. *Infect Dis Clin North Am*, 1999: 13:757-74, v.
183. Seymour, GJ, Dockrell, HM, Greenspan, JS. Enzyme differentiation of lymphocyte subpopulations in sections of human lymph nodes, tonsils and periodontal disease. *Clin Exp Immunol*, 1978: 32:169-78.
184. Seymour, GJ, Ford, PJ, Cullinan, MP, Leishman, S, Yamazaki, K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect*, 2007: 13 Suppl 4:3-10.
185. Seymour, GJ, Gemmell, E, Reinhardt, RA, Eastcott, J, Taubman, MA. Immunopathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: cellular and molecular mechanisms. *J Periodontol Res*, 1993: 28:478-86.
186. Seymour, GJ, Gemmell, E, Walsh, LJ, Powell, RN. Immunohistological analysis of experimental gingivitis in humans. *Clin Exp Immunol*, 1988: 71:132-7.

187. Seymour, GJ, Greenspan, JS. The phenotypic characterization of lymphocyte subpopulations in established human periodontal disease. *J Periodontol Res*, 1979: 14:39-46.
188. Seymour, GJ, Powell, RN, Cole, KL, Aitken, JF, Brooks, D, Beckman, I, Zola, H, Bradley, J, Burns, GF. Experimental gingivitis in humans. A histochemical and immunological characterization of the lymphoid cell subpopulations. *J Periodontol Res*, 1983: 18:375-85.
189. Seymour, GJ, Powell, RN, Davies, WI. Conversion of a stable T-cell lesion to a progressive B-cell lesion in the pathogenesis of chronic inflammatory periodontal disease: an hypothesis. *J Clin Periodontol*, 1979: 6:267-77.
190. Seymour, RA, Hogg, SD. Antibiotics and chemoprophylaxis. *Periodontol 2000*, 2008: 46:80-108.
191. Sgolastra, F, Gatto, R, Petrucci, A, Monaco, A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*, 2012a: 83:1257-69.
192. Sgolastra, F, Petrucci, A, Gatto, R, Monaco, A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as an adjunctive therapy to full-mouth scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*, 2012b: 83:731-43.
193. Shah, PM. Determination of MICs in the routine laboratory. *J Antimicrob Chemother*, 2001: 48:931.
194. Shenker, BJ, Vitale, LA, Keiba, I, Harrison, G, Berthold, P, Golub, E, Lally, ET. Flow cytometric analysis of the cytotoxic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human natural killer cells. *J Leukoc Biol*, 1994: 55:153-60.
195. Simonson, LG, Robinson, PJ, Pranger, RJ, Cohen, ME, Morton, HE. *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* as prognostic markers following periodontal treatment. *J Periodontol*, 1992: 63:270-3.
196. Slavkin, HC. Benefit-to-risk ratio: the challenge of antibiotic drug resistance. *J Am Dent Assoc*, 1997: 128:1447-51.
197. Slots, J. Primer for antimicrobial periodontal therapy. *J Periodontol Res*, 2000: 35:108-14.
198. Slots, J, Genco, RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res*, 1984: 63:412-21.
199. Slots, J, Jorgensen, MG. Effective, safe, practical and affordable periodontal antimicrobial therapy: where are we going, and are we there yet? *Periodontol 2000*, 2002: 28:298-312.
200. Slots, J, Research, S, Therapy, C. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol*, 2004: 75:1553-65.
201. Slots, J, Ting, M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol 2000*, 1999: 20:82-121.
202. Slots, J, Ting, M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 2002: 28:106-76.
203. Socransky, SS. Microbiology of periodontal disease -- present status and future considerations. *J Periodontol*, 1977: 48:497-504.
204. Socransky, SS, Haffajee, AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*, 2002: 28:12-55.
205. Socransky, SS, Haffajee, AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000*, 2005: 38:135-87.

206. Socransky, SS, Haffajee, AD, Cugini, MA, Smith, C, Kent, RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 1998: 25:134-44.
207. Socransky, SS, Haffajee, AD, Goodson, JM, Lindhe, J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 1984: 11:21-32.
208. Socransky, SS, Smith, C, Haffajee, AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 2002: 29:260-8.
209. Socransky, SS, Tanner, ACR, Haffajee, AD, Hillman, JD, Goodson, JM. Present Status of Studies on the Microbial Etiology of Periodontal Diseases. In host-parasite interactions in periodontal disease, eds. Genco, R. J.; Mergenhagen, S. E. *Washington, DC: American Society for Microbiology*, 1982: 1-12.
210. Stratton, CW. In vitro susceptibility testing versus in vivo effectiveness. *Med Clin North Am*, 2006: 90:1077-88.
211. Suda, R, Kobayashi, M, Nanba, R, Iwamaru, M, Hayashi, Y, Lai, CH, Hasegawa, K. Possible periodontal pathogens associated with clinical symptoms of periodontal disease in Japanese high school students. *J Periodontol*, 2004: 75:1084-9.
212. Syed, SA, Loesche, WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol*, 1972: 24:638-44.
213. Talbot, GH, Bradley, J, Edwards, JE, Jr., Gilbert, D, Scheld, M, Bartlett, JG, Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society Of, A. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 2006: 42:657-68.
214. Tami, TA, Parker, GS. *Eikenella corrodens*. An emerging pathogen in head and neck infections. *Arch Otolaryngol*, 1984: 110:752-4.
215. Tang, SS, Apisarnthanarak, A, Hsu, LY. Mechanisms of beta-lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community- and healthcare-associated multidrug-resistant bacteria. *Adv Drug Deliv Rev*, 2014: 78:3-13.
216. Tenson, T, Lovmar, M, Ehrenberg, M. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol*, 2003: 330:1005-14.
217. Teughels, W, Dhondt, R, Dekeyser, C, Quirynen, M. Treatment of aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, 2014: 65:107-33.
218. Tezal, M, Sullivan, MA, Hyland, A, Marshall, JR, Stoler, D, Reid, ME, Loree, TR, Rigual, NR, Merzianu, M, Hauck, L, Lillis, C, Wactawski-Wende, J, Scannapieco, FA. Chronic periodontitis and the incidence of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009: 18:2406-12.
219. Theilade, E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, 1986: 13:905-11.
220. Theilade, E, Wright, WH, Jensen, SB, Loe, H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontol Res*, 1966: 1:1-13.
221. Tonetti, MS, Eickholz, P, Loos, BG, Papapanou, P, Van Der Velden, U, Armitage, G, Bouchard, P, Deinzer, R, Dietrich, T, Hughes, F, Kocher, T, Lang, NP, Lopez, R, Needleman, I, Newton, T, Nibali, L, Pretzl, B, Ramseier, C, Sanz-Sanchez, I, Schlegelhauf, U, Suvan, JE. Principles in prevention of periodontal diseases: Consensus report of group 1 of the 11th European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *J Clin Periodontol*, 2015: 42 Suppl 16:S5-11.
222. Tunkel, J, Heinecke, A, Flemmig, TF. A systematic review of efficacy of machine-driven and manual subgingival debridement in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 2002: 29 Suppl 3:72-81; discussion 90-1.

223. Van Palenstein Helderma, WH. Microbial etiology of periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 1981: 8:261-80.
224. Van Winkelhoff, AJ, Herrera, D, Oteo, A, Sanz, M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol*, 2005: 32:893-8.
225. Van Winkelhoff, AJ, Herrera Gonzales, D, Winkel, EG, DelleMijn-Kippuw, N, Vandenbroucke-Grauls, CM, Sanz, M. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol*, 2000: 27:79-86.
226. Van Winkelhoff, AJ, Loos, BG, Van Der Reijden, WA, Van Der Velden, U. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*, 2002: 29:1023-8.
227. Van Winkelhoff, AJ, Rams, TE, Slots, J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000*, 1996: 10:45-78.
228. Van Winkelhoff, AJ, Rodenburg, JP, Goene, RJ, Abbas, F, Winkel, EG, De Graaff, J. Metronidazole plus amoxicillin in the treatment of Actinobacillus actinomycetemcomitans associated periodontitis. *J Clin Periodontol*, 1989: 16:128-31.
229. Van Winkelhoff, AJ, Tjihof, CJ, De Graaff, J. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in Actinobacillus actinomycetemcomitans-associated periodontitis. *J Periodontol*, 1992: 63:52-7.
230. Veloo, AC, Seme, K, Raangs, E, Rurenga, P, Singadji, Z, Wekema-Mulder, G, Van Winkelhoff, AJ. Antibiotic susceptibility profiles of oral pathogens. *Int J Antimicrob Agents*, 2012: 40:450-4.
231. Von Troil-Linden, B, Torkko, H, Alaluusua, S, Jousimies-Somer, H, Asikainen, S. Salivary levels of suspected periodontal pathogens in relation to periodontal status and treatment. *J Dent Res*, 1995: 74:1789-95.
232. Walker, C, Gordon, J. The effect of clindamycin on the microbiota associated with refractory periodontitis. *J Periodontol*, 1990: 61:692-8.
233. Walker, CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol 2000*, 1996: 10:79-88.
234. Walker, CB, Ratliff, D, Muller, D, Mandell, R, Socransky, SS. Medium for selective isolation of Fusobacterium nucleatum from human periodontal pockets. *J Clin Microbiol*, 1979: 10:844-9.
235. Watabe, K, Nishi, M, Miyake, H, Hirata, K. Lifestyle and gastric cancer: a case-control study. *Oncol Rep*, 1998: 5:1191-4.
236. Waters, CM, Bassler, BL. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005: 21:319-46.
237. Weisblum, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995: 39:577-85.
238. Wieser, A, Schneider, L, Jung, J, Schubert, S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012: 93:965-74.
239. Winkel, EG, Van Winkelhoff, AJ, Timmerman, MF, Van Der Velden, U, Van Der Weijden, GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol*, 2001: 28:296-305.
240. Worch, KP, Listgarten, MA. Treatment considerations in rapidly progressive periodontitis: a case report. *Compend Contin Educ Dent*, 1998: 19:1203-6, 1208, 1210-6; quiz 1218.

241. Worch, KP, Listgarten, MA, Korostoff, JM. A multidisciplinary approach to the diagnosis and treatment of early-onset periodontitis: a case report. *J Periodontol*, 2001: 72:96-106.
242. Ximenez-Fyvie, LA, Haffajee, AD, Socransky, SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol*, 2000: 27:722-32.
243. Zambon, JJ. Actinobacillus actinomycetemcomitans in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 1985: 12:1-20.
244. Zambon, JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol*, 1996: 1:879-925.
245. Zhan, Y, Holtfreter, B, Meisel, P, Hoffmann, T, Micheelis, W, Dietrich, T, Kocher, T. Prediction of periodontal disease: modelling and validation in different general German populations. *J Clin Periodontol*, 2014: 41:224-31.
246. Zhang, YH, Heulsmann, A, Tondravi, MM, Mukherjee, A, Abu-Amer, Y. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem*, 2001: 276:563-8.

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pyramidendiagramm zur Darstellung mikrobiologischer Komplexe und der Beziehungen bestimmter Spezies untereinander (Socransky und Haffajee, 2002; Socransky et al., 1998) .....	10
Abbildung 2: Graphische Darstellung der Entwicklung verschiedener Antibiotikaklassen gegen sich ausbildende Resistenzen (Tang et al., 2014).....	24
Abbildung 3: Strukturformel des Amoxicillins mit Angriffspunkt der $\beta$ -Lactamasen am $\beta$ -Lactam-Ring des Moleküls (Seymour und Hogg, 2008).....	27
Abbildung 4: Strukturformel des Metronidazols (Seymour und Hogg, 2008).....	28
Abbildung 5: Strukturformel des Clindamycins (Seymour und Hogg, 2008).....	29
Abbildung 6: Graphische Darstellung des Studienablaufs .....	32
Abbildung 7: getränkte Papierspitzen nach Probenentnahme; Links: Aufbewahrung in VMG II-Transportmedium zur mikrobiologischen Analyse mittels MALDI-TOF-Verfahren; Rechts: Aufbewahrung ohne Medium zur Durchführung des Parident <sup>TM</sup> -Tests .....	34
Abbildung 8: anaerobe Kammer (BACTRON anaerobic chamber; SHEL LAB, Sheldon Manufacturing, Inc., Oregon, USA) .....	35
Abbildung 9: Vergleich des Bakterienwachstums auf unterschiedlichen Nährmedien; Links: Schaedler; Rechts: Brucella .....	36
Abbildung 10: MALDI-TOF-MS .....	38
Abbildung 11: Targetplatte des MALDI-TOF-MS.....	38
Abbildung 12: im MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I enthaltenen farbcodierten Reagenzien.....	40
Abbildung 13: MagNA Pure LC zur Isolierung der bakteriellen DNA mit allen einzubringenden Reagenzien befüllt.....	41
Abbildung 14: farbig markierte Kavitäten mit spezifischen DNA-Sonden: AA (rot), PG (blau), FN (gelb), PI (grün), TF (orange), PM (schwarz), TD (violett), IK (weiß); zusätzliche Kavitäten: Blank (rot, äußerste Kavität rechts) und Negativkontrolle (blau, äußerste Kavität rechts).....	43
Abbildung 15: Wasch-/Pipettiervorgang der PCR-Röhrchen mit farbcodierten spezifischen Hybridisierungssonden .....	44
Abbildung 16: Sensibilitätsprüfung mittels E-Test; Links: keine Ellipse erkennbar (Keim resistent); Rechts: Ablesen der minimalen Hemmkonzentration (MHK) anhand der entstandenen Ellipse am Antibiotikum-Teststreifen.....	46
Abbildung 17: Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung mittels E-Test von <i>Fusobacterium</i> spp. auf Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin; MHK = Minimale Hemmkonzentration .....	51
Abbildung 18: Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung mittels E-Test von <i>Prevotella</i> spp. auf Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin; MHK = Minimale Hemmkonzentration.....	51
Abbildung 19: Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung mittels E-Test von <i>Parvimonas micra</i> auf Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin; MHK = Minimale Hemmkonzentration....	52

Abbildung 20: Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung mittels E-Test von <i>Veillonella</i> spp. auf Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin; MHK = Minimale Hemmkonzentration....	52
Abbildung 21: Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung mittels E-Test von <i>Eikenella corrodens</i> auf Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin; MHK = Minimale Hemmkonzentration.....	53
Abbildung 22: Darstellung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Amoxicillin der paarweise verglichenen Bakteriengruppen mit Signifikanzen; Dunn-Bonferroni-Post-Hoc-Test; <sup>a</sup> p = 0.009; <sup>b</sup> p < 0.001; <sup>c</sup> p = 0.008.....	55
Abbildung 23: Darstellung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Metronidazol der paarweise verglichenen Bakteriengruppen mit Signifikanzen; Dunn-Bonferroni-Post-Hoc-Test; <sup>a</sup> p = 0.023; <sup>b</sup> p < 0.001; <sup>c</sup> p < 0.001.....	55
Abbildung 24: Darstellung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Clindamycin der paarweise verglichenen Bakteriengruppen mit Signifikanzen; Dunn-Bonferroni-Post-Hoc-Test; <sup>a</sup> p < 0.001; <sup>b</sup> p = 0.002; <sup>c</sup> p < 0.001; <sup>d</sup> p < 0.001.....	56
Abbildung 25: Ergebnisse des Parident <sup>TM</sup> -Tests des Patientenkollektivs (n = 10) prätherapeutisch und nach adjuvanter Antibiose; AA = <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ; PG = <i>Porphyromonas gingivalis</i> ; FN = <i>Fusobacterium nucleatum</i> ; PI = <i>Prevotella intermedia</i> ; TF = <i>Tannerella forsythia</i> ; PM = <i>Parvimonas micra</i> ; TD = <i>Treponema denticola</i> .....	57

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung der Parodontitis nach neuer Klassifizierung des „World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions“ 2018 nach Papapanou und Mitarbeitern (2018) und Jepsen (2018); CAL= clinical attachment loss .....	5
Tabelle 2: Einteilung der Parodontitis in Grad A,B und C unter Berücksichtigung weiterer Risiko-Aspekte nach neuer Klassifizierung des „World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions“ 2018 nach Papapanou und Mitarbeitern (2018) und Jepsen (2018); CAL= clinical attachment loss/klinischer Attachmentverlust; HbA1c = glykiertes Hämoglobin .....	5
Tabelle 3: Empfohlene Dosierung adjuvanter Antibiotika der Deutschen Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) (Beikler et al., 2003).....	22
Tabelle 4: Definiertes PCR-Programm des Thermocyclers.....	42
Tabelle 5: Auswerteschema zur Extinktionsmessung.....	45
Tabelle 6: Arithmetische Mittel der Anzahl aller Zähne bzw. Stellen und der Anzahl der behandlungsbedürftigen Zähne bzw. Stellen des Patientenkollektivs (n = 44) .....	49
Tabelle 7: Einteilung der PA-assoziierten und mittels E-Test auf Antibiotikaresistenzen untersuchten Bakterien in fünf Gruppen.....	50

## 10 Abkürzungsverzeichnis

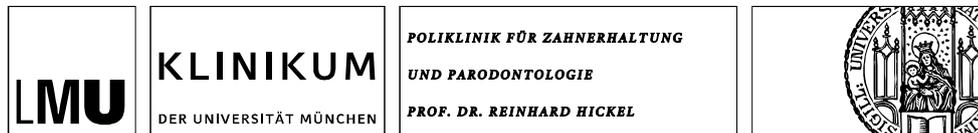
A. actinomycetemcomitans/AA	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
API	Approximaler-Plaque-Index
AAP	American Academy of Periodontology
ARS	Antibiotikaresistenz Surveillance
BHI	Brain Heart Infusion
BOP	Blutung auf Sondierung
CAL	Clinical attachment loss
CDC	Centre for Disease Prevention and Control
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
C. rectus	Camphylobacter rectus
Da	[Dalton]; Einheit nach John Dalton; 1 Dalton = $1,6601 \cdot 10^{-27}$ kg
DGZMK	Deutschen Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphate
E. corrodens	Eikenella corrodens
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EBSL	Extended-Spektrum- $\beta$ -Laktamase-bildende Bakterien
erm	erythromycin ribosome methylation
E-Test	Epsilometer-Test
F. nucleatum/FN	Fusobacterium nucleatum
H <sub>2</sub>	Wasserstoff
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IC	interne Kontrolle
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-6	Interleukin-6
IL-10	Interleukin-10
INF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation- Massenspektrometrie
MGPs	magnetic glass particles/magnetische Glaspartikel
mRNA	messenger RNA
N	Stickstoff
PA	Parodontitis
pack years	Zahl der täglich konsumierten Packungen multipliziert mit der Anzahl der Raucherjahre
PCR	Polymerasekettenreaktion
PAF/PMT	PCR-Primer
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin 2
P. gingivalis/PG	Porphyromonas gingivalis
P. intermedia/PI	Prevotella intermedia
P. micra/PM	Parvimonas micra
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten

---

P. nigrescens	Prevotella nigrescens
POD	Peroxidase
PSI	Parodontaler-Screening-Index
PBP	Penicillin bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
S. constellatus	Streptococcus constellatus
SRP	Scaling and root planning
T. denticola/TD	Treponema denticola
T. forsythia/TF	Tanerella forsythia
Th1	Th1-Helferzellen
Th2	Th2-Helferzellen
<sup>TM</sup>	TradeMark
TMB-Substratlösung	3.3'-5.5'-Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
WHO	World Health Organisation

# 11 Anhang

## Anhang 1: Patientenaufklärung



### Patienteninformation und Einwilligungserklärung

OÄ Prof. Dr. Karin C. Huth MME  
ZA Maximilian Kollmuß

Telefon +49 (0)89 4400-59378  
+49 (0)89 4400-59411  
Telefax +49 (0)89 4400-59302

khuth@dent.med.uni-muenchen.de  
kollmuss@dent.med.uni-muenchen.de

www.dent.med.uni-muenchen.de

Postanschrift:  
Goethestr. 70  
D-80336 München

### I. Patienteninformation

Studientitel:

#### Evaluation der Eignung von MALDI-TOF/MS zur mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Sie werden gefragt, ob Sie damit einverstanden sind an einer Studie im Bereich der Parodontologie teilzunehmen.

Bei Ihnen wurde in einer Untersuchung eine behandlungsbedürftige Entzündung des Zahnhalteapparats (Bindegewebe und den Zahn umgebenden Knochen) diagnostiziert. Diese als „Parodontitis“ bezeichnete Erkrankung ist eine durch Bakterien ausgelöste Entzündung, die unbehandelt mit einer irreversiblen Zerstörung der oben genannten Gewebe einhergeht und damit in der Folge zur Lockerung oder gar zum Verlust von Zähnen führen kann.

Der für die Therapie entscheidende Schritt ist die Beseitigung der spezifischen Bakterien aus der Zahnfleischtasche. Dazu kommen, neben der mechanischen Reinigung der Zahnwurzeloberfläche („subgingivale Kürettage“), bei schweren Verlaufsformen auch Antibiotika in Tablettenform zum Einsatz („systemische Antibiotikatherapie“). Die Auswahl des Antibiotikums richtet sich dabei nach dem Vorhandensein bestimmter Bakterien, welche vor der Therapie mit einem Keimtest nachgewiesen werden.

Dieser Keimtest wird derzeit nicht von der gesetzlichen Krankenversicherung übernommen, stellt aber einen wichtigen Pfeiler für die Wahl des passenden Antibiotikums dar. Ein Nachteil des derzeit eingesetzten Verfahrens ist, dass nur Bakterien nachgewiesen werden können, die auch in der Probe vermutet werden und somit auch gesucht werden

---

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Anschrift: Goethestr. 70, D-80336 München, Telefon (089)5160-9301  
Verkehrsverbindung: U3, U6 oder Bus 58 bis Haltestelle Goetheplatz

(„geschlossenes System“). Ein neues mikrobiologisches Untersuchungsverfahren ermöglicht die Bestimmung eines größeren Bakterienspektrums (MALDI-TOF-MS). In dieser Studie soll nun untersucht werden, ob und wie gut sich MALDI-TOF-MS zur Diagnostik von Parodontitis-auslösenden Bakterien eignet.

Nach einer parodontologischen Untersuchung mit Messung der Tiefe der Zahnfleischtaschen soll für diese Studie bei Ihnen eine mikrobiologische Probe an vier verschiedenen Stellen aus vier verschiedenen Zahnfleischtaschen entnommen werden. Dazu wird der behandelnde Zahnarzt eine ca. 1 mm dicke sterile Papierspitze in die Zahnfleischtasche einführen und diese dort 10 Sekunden belassen. In dieser Zeit wird die Flüssigkeit in der Zahnfleischtasche mit den darin enthaltenen Bakterien aufgesaugt und steht in der Folge für Untersuchungen der Bakterien zur Verfügung. Im Anschluss daran erfolgt die Anzucht der Bakterien und die Bestimmung der genauen Bakterienspezies mittels MALDI-TOF-MS sowie dem derzeit gängigen klinischen Keimtest zur Kontrolle.

Die Probeentnahme mit der Papierspitze ist für Sie schmerzfrei und es kommt dadurch für Sie zu keiner Verzögerung oder Einschränkung der weiteren Behandlung. Wenn Sie dies wünschen können wir Ihnen das Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung mitteilen und ggf. die Therapie mit einem Antibiotikum einleiten, wenn entsprechende Bakterien nachgewiesen wurden. Es werden im Rahmen dieser Studie keine zahnärztlich-invasiven Maßnahmen durchgeführt. Somit entstehen keine studienspezifischen zusätzlichen Belastungen für Sie.

Eine Probandenversicherung oder Wegeversicherung wurde nicht abgeschlossen, da keine studienspezifische Belastungen bzw. Klinikbesuche anfallen.

**Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode, weitergegeben.**

**Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Daten in irreversibel anonymisierter Form weiter verwendet.**

**Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiterin (OÄ Prof. Dr. K. Huth) und ihrem Stellvertreter (ZA M. Kollmuß) Die Unterlagen werden 10 Jahre verschlossen in den Räumen der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universität München aufbewahrt.**

**Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“).**

**Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.“**

Die Teilnahme an dieser Studie erfolgt freiwillig. Sie können jederzeit und ohne Angabe von Gründen ihr Einverständnis zur Teilnahme an dem Forschungsvorhaben zurücknehmen, ohne dass Ihnen hieraus Nachteile entstehen.

Aufklärender Zahnarzt: \_\_\_\_\_

## **II. Einwilligungserklärung**

Studientitel:

### **Evaluation der Eignung von MALDI-TOF/MS zur mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie**

Hiermit willige ich in die Teilnahme an der oben genannten klinischen Studie mit den dazugehörigen Probenentnahmen nach Maßgabe der Patienteninformation ein.

Die Teilnahme erfolgt freiwillig.

Es wurde keine besondere Probanden-/Wegeunfallversicherung abgeschlossen.

**Bei dieser Studie werden die Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz eingehalten. Es werden persönliche Daten und Befunde über Sie erhoben, gespeichert und verschlüsselt (pseudonymisiert), d.h. weder Ihr Name noch Ihre Initialen oder das exakte Geburtsdatum erscheinen im Verschlüsselungscode, weitergegeben. Im Falle des Widerrufs Ihrer Einwilligung werden die pseudonymisiert gespeicherten Datenin irreversibel anonymisierter Form weiter verwendet.**

**Der Zugang zu den Originaldaten und zum Verschlüsselungscode ist auf folgende Personen beschränkt: Studienleiterin (OÄ Prof. Dr. K. Huth) und ihrem Stellvertreter (ZA M. Kollmuß) Die Unterlagen werden 10 Jahre verschlossen in den Räumen der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universität München aufbewahrt. Eine Entschlüsselung erfolgt lediglich in Fällen, in denen es Ihre eigene Sicherheit erfordert („medizinische Gründe“) oder falls es zu Änderungen in der wissenschaftlichen Fragestellung kommt („wissenschaftliche Gründe“). Im Falle von Veröffentlichungen der Studienergebnisse bleibt die Vertraulichkeit der persönlichen Daten gewährleistet.“**

Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen das Einverständnis zur Teilnahme an dem Forschungsvorhaben zurücknehmen, ohne dass mir hieraus Nachteile entstehen.

**Ich bin mit der Erhebung und Verwendung persönlicher Daten und Befunddaten nach Maßgabe der Patienteninformation einverstanden.**

**München, \_\_\_\_\_**

**Unterschrift Patient: \_\_\_\_\_**

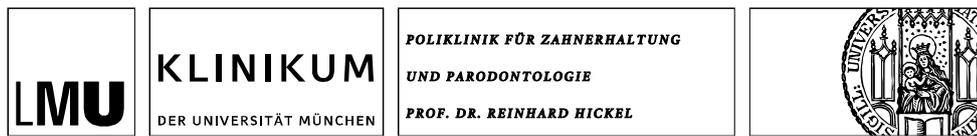
**Unterschrift Zahnarzt: \_\_\_\_\_**

---

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Anschrift: Goethestr. 70, D-80336 München, Telefon (089)5160-9301  
Verkehrsverbindung: U3, U6 oder Bus 58 bis Haltestelle Goetheplatz

## Anhang 2: Anamnese- und Befundbogen



Evaluation der Eignung von MALDI-TOF/MS zur  
mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie

**Anamnesebogen**

Patienten-Verschlüsselung: \_\_\_\_\_ (CODEAUFKLEBER)

Datum: \_\_\_\_\_

**1.) Konnten bei Familienmitgliedern Erkrankungen des Zahnfleisches und des Zahnhalteapparates beobachtet werden?**

nein                      ja

falls ja,  
bei welchen Familienmitgliedern? \_\_\_\_\_

**Eigenanamnese**

**2.) Nehmen Sie derzeit Medikamente ein?**

nein                      ja

falls ja,  
welche Medikamente und seit wann? \_\_\_\_\_

**3.) Leiden Sie an Diabetes mellitus, Osteoporose, einer Herz-Kreislaufferkrankung, oder Bluterkrankung?**

nein                      ja

falls ja,  
unter welcher Erkrankung bzw. Erkrankungen? \_\_\_\_\_

**4.) Konsumieren Sie derzeit Zigaretten bzw. haben Sie in der Vergangenheit geraucht?**

nein                      ja

falls ja,  
wie viele Zigaretten rauchen Sie aktuell pro Tag? \_\_\_\_\_

wann haben Sie angefangen zu rauchen? \_\_\_\_\_

wie viele Zigaretten haben Sie früher pro Tag geraucht? \_\_\_\_\_

falls Sie nicht mehr rauchen, wann haben Sie aufgehört? \_\_\_\_\_

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Anschrift: Goethestr. 70, D-80336 München, Telefon (089)5160-9301  
Verkehrsverbindung: U3, U6 oder Bus 58 bis Haltestelle Goetheplatz

**5.) Wurde bei Ihnen bereits eine parodontologische Behandlung durchgeführt?**

nein ja

falls ja,  
welche Behandlungsmaßnahmen wurden ergriffen? \_\_\_\_\_

wann wurden diese durchgeführt? \_\_\_\_\_

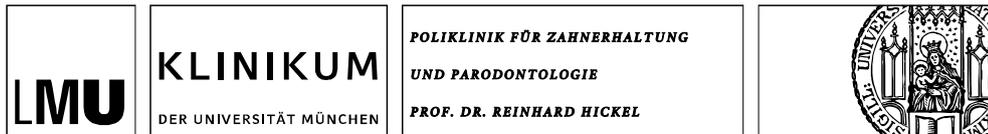
**6.) Haben Sie im Moment oder in den letzten 2 Wochen Symptome wie Zahnfleischbluten oder Zahnlockerung wahrgenommen?**

nein ja

falls ja,  
welche Symptome? \_\_\_\_\_**7.) Wurden Ihnen in der Vergangenheit Zähne gezogen aufgrund zu starker Lockerung?**

nein ja

falls ja,  
welche Zähne? \_\_\_\_\_



Evaluation der Eignung von MALDI-TOF/MS zur mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie

**Befundbogen**

Patienten-Verschlüsselung:

(CODEAUFKLEBER)

Datum: \_\_\_\_\_

**Zahnärztlicher Befund**

Perkussion																
Sensibilität																
Befund																
Zahnersatz																
	<b>18</b>	<b>17</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>14</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>11</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>
	<b>48</b>	<b>47</b>	<b>46</b>	<b>45</b>	<b>44</b>	<b>43</b>	<b>42</b>	<b>41</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>
Zahnersatz																
Befund																
Sensibilität																
Perkussion																

Das Klinikum der Universität München ist eine Anstalt des öffentlichen Rechts

Anschrift: Goethestr. 70, D-80336 München, Telefon (089)5160-9301  
 Verkehrsverbindung: U3, U6 oder Bus 58 bis Haltestelle Goetheplatz



## Anhang 3: Ethikvotum



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

ETHIKKOMMISSION BEI DER LMU MÜNCHEN



Ethikkommission · Pettenkoferstr. 8 · 80336 München

Herrn  
Prof. Dr. med. dent. Karin Huth  
Klinikum der Universität München  
Zahnklinik  
Goethestr. 70  
80336 München

Vorsitzender:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Telefon+49 (0)89 440055191  
Telefax+49 (0)89 440055192  
Ethikkommission@  
med.uni-muenchen.de  
[www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de](http://www.ethikkommission.med.uni-muenchen.de)

Anschrift:  
Pettenkoferstr. 8a  
D-80336 München

18.05.2016/sc

Unser Zeichen: **178-16** (bitte bei Schriftwechsel angeben)

**Beratung nach geltendem Fakultätsrecht  
Ergänzung zum Votum vom 18.04.2016**

Studientitel: Evaluation der Eignung von MALDI-TOF/MS zur mikrobiologischen Diagnostik in der Parodontologie  
Antragsteller: Prof. Dr. med. dent. Karin Huth, Klinikum der Universität München, Zahnklinik, Goethestr. 70, 80336 München

Sehr geehrte Frau Prof. Dr. Huth,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 25.04.2016 mit der Beantwortung unserer Fragen bzw. Erfüllung der Auflagen und den noch ausstehenden bzw. überarbeiteten Unterlagen

- Antragsformular
- Studienprotokoll
- Patienteninformation u. Einverständniserklärung
- CD mit allen genannten Dokumenten.

Die Ethikkommission (EK) kann Ihrer Studie nun die ethisch-rechtliche Unbedenklichkeit zuerkennen.

Vorsorglich möchte ich darauf hinweisen, dass auch bei einer positiven Beurteilung des Vorhabens durch die EK die ärztliche und juristische Verantwortung für die Durchführung des Projektes uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern verbleibt.

Allgemeine Hinweise:

- Änderungen im Verlauf der Studie sind der EK zur erneuten Prüfung vorzulegen.
- Schwerwiegende unerwartete Ereignisse im Rahmen der Studie sind der EK mitzuteilen.
- Das Ende der Studie ist anzuzeigen und das Ergebnis vorzulegen.
- Die ärztliche und juristische Verantwortung bei der Durchführung der Studie verbleibt uneingeschränkt bei Ihnen und Ihren Mitarbeitern.

Für Ihre Studie wünsche ich Ihnen viel Erfolg.

Mitglieder der Kommission:  
Prof. Dr. W. Eisenmenger (Vorsitzender), Prof. Dr. E. Held (stellv. Vorsitzender), Prof. Dr. C. Bausewein, PD Dr. Th. Beinert, Prof. Dr. B. Emmerich, Prof. Dr. H. U. Gallwas, Prof. Dr. K. Hahn, Dr. B. Henrikus, Dr. V. Mönch, Prof. Dr. D. Nowak, Prof. Dr. R. Penning, Prof. Dr. K. Pfeifer, Dr. A. Yassouridis, Dr. Ch. Zach

178-16 2  
18.05.2016

SEITE 2 VON 2

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. W. Eisenmenger  
Vorsitzender der Ethikkommission

## Anhang 4: Liste Parodontalpathogener Keime aus MALDI-TOF-MS

Neue Nummer	Alte Nummer	<u>Parodontalpathogene Keime aus MALDI-PA</u>	Neue Nummer	Alte Nummer	<u>Parodontalpathogene Keime aus MALDI-PA</u>
1	20 / 14.1	Abiotrophia defectiva	27	28 / 3	Fusobacterium naviforme
2	34 / 7.1	Aggregatibacter segnis	28	19 / 8	Fusobacterium naviforme / nucleatum
3	25 / 3	Atopobium parvulum	29	01 / 3	Fusobacterium nucleatum
4	03 / 5	Atopobium rimae	30	34 / 8.2.1	Fusobacterium nucleatum / naviforme
5	21 / 9	Atopobium rimae	31	05 / 6	Fusobacterium nucleatum
6	34 / 3.2	Atopobium rimae	32	07 / 2	Fusobacterium nucleatum
7	09 / 4.1	Bacteroides ovatus	33	09 / 1	Fusobacterium nucleatum
8	24 / 11.1	Bifidobacterium dentinum	34	09 / 2	Fusobacterium nucleatum
9	21 / 5	Bifidobacterium dentium	35	14 / 10.3	Fusobacterium nucleatum
10	03 / 7	Campylobacter rectus	36	16 / 6.1	Fusobacterium nucleatum
11	10 / 8	Dialister pneumosintes	37	19 / 6	Fusobacterium nucleatum
12	33 / 3.2	Dialister pneumosintes	38	19 / 9	Fusobacterium nucleatum
13	09 / 5	Dialister pneumosintas	39	20 / 2	Fusobacterium nucleatum
14	24 / 6.1	Eggerthia cateniformis	40	21 / 12	Fusobacterium nucleatum
15	11 / 5	Eggerthia cateniformis	41	21 / 14	Fusobacterium nucleatum
16	07 / 3.1	Eikenella corrodens	42	27 / 2	Fusobacterium nucleatum
17	10 / 2.2	Eikenella corrodens	43	27 / 3	Fusobacterium nucleatum
18	10 / 9	Eikenella corrodens	44	28 / 5	Fusobacterium nucleatum
19	12 / 2	Eikenella corrodens	45	30 / 3	Fusobacterium nucleatum
20	14 / 3	Eikenella corrodens	46	30 / 6.1	Fusobacterium nucleatum
21	15 / 5.1	Eikenella corrodens	47	33 / 5.1	Fusobacterium nucleatum
22	16 / 6.2	Eikenella corrodens	48	33 / 5.2	Fusobacterium nucleatum
23	21 / 7	Eubacterium brachy	49	35 / 4	Fusobacterium nucleatum
24	41 / 2	Eubacterium brachy	50	04 / 6	Fusobacterium nucleatum / naviforme
25	20 / 14.2	Eubacterium yurii	51	15 / 6	Fusobacterium nucleatum / naviforme
26	41 / 8	Filifactor aloocis	52	18 / 2	Fusobacterium nucleatum / naviforme

53	22 / 2	Fusobacterium nucleatum / naviforme	80	03 / 6	Parvimonas micra
54	27 / 9	Fusobacterium nucleatum / naviforme	81	04 / 7	Parvimonas micra
55	22 / 7	Fusobacterium nucleatum / sp	82	05 / 2	Parvimonas micra
56	06 / 4.1	Fusobacterium sp	83	06 / 7	Parvimonas micra
57	06 / 4.2	Fusobacterium sp	84	07 / 3.2	Parvimonas micra
58	23 / 5.1	Fusobacterium sp	85	07 / 5	Parvimonas micra
59	24 / 3.1	Fusobacterium sp	86	10 / 6	Parvimonas micra
60	21 / 2	Fusobacterium sp / nucleatum	87	11 / 11	Parvimonas micra
61	41 / 7.2	Fusobacterium sp / nucleatum	88	12 / 3	Parvimonas micra
62	15 / 3.1	Fusobacterium spp.	89	20 / 6	Parvimonas micra
63	27 / 10	Fusobacterium spp.	90	21 / 8	Parvimonas micra
64	41 / 1	Fusobacterium spp.	91	22 / 8	Parvimonas micra
65	32 / 3	Gamella morbillorum	92	23 / 3.1	Parvimonas micra
66	32 / 6.2	Gamella morbillorum	93	24 / 12.1	Parvimonas micra
67	35 / 5	Gamella morbillorum	94	24 / 7.1	Parvimonas micra
68	38 / 4	Gamella morbillorum	95	24 / 7.2	Parvimonas micra
69	38 / 6	Gamella morbillorum	96	26 / 4	Parvimonas micra
70	40 / 8	Gamella morbillorum	97	27 / 4	Parvimonas micra
71	05 / 1	Gemella morbillorum	98	28 / 1	Parvimonas micra
72	05 / 5	Gemella morbillorum	99	28 / 2	Parvimonas micra
73	16 / 7	Gemella morbillorum	100	29 / 10	Parvimonas micra
74	17 / 2.2	Gemella morbillorum	101	30 / 5	Parvimonas micra
75	22 / 5	Gemella morbillorum	102	32 / 6.1	Parvimonas micra
76	33 / 4	Granulicatella adiacens	103	34 / 8.1	Parvimonas micra
77	04 / 9	Granulicatella adiacens	104	34 / 8.2.2	Parvimonas micra
78	20 / 15	Granulicatella adiacens	105	41 / 3	Parvimonas micra
79	07 / 6	Leptotrichia goodfellowii	106	41 / 5	Porphyromonas gingivalis

107	03 / 2	Prevotelle nigrescens
108	11 / 4	Prevotella baroniae
109	33 / 6	Prevotella baroniae
110	34 / 5	Prevotella baroniae
111	11 / 8	Prevotella buccae
112	12 / 4	Prevotella buccae
113	12 / 7	Prevotella buccae
114	34 / 6	Prevotella buccae
115	20 / 10	Prevotella denticola
116	21 / 15	Prevotella denticola
117	24 / 10.1	Prevotella denticula
118	28 / 7	Prevotella denticula
119	22 / 9	Prevotella intermedia
120	06 / 2	Prevotella intermedia
121	11 / 3	Prevotella intermedia
122	22 / 6	Prevotella intermedia
123	16 / 1	Prevotella intermedia
124	18 / 10.1	Prevotella loeschii
125	28 / 8	Prevotella maculosa
126	01 / 4	Prevotella nigrescens
127	02 / 2	Prevotella nigrescens
128	02 / 7	Prevotella nigrescens
129	10 / 7.2	Prevotella nigrescens
130	20 / 11	Prevotella nigrescens
131	23 / 4.1	Prevotella nigrescens
132	24 / 9.1	Prevotella nigrescens
133	41 / 6	Prevotella nigrescens

134	07 / 4	Prevotella oris
135	30 / 4	Prevotella oris
136	13 / 1	Prevotella salivae
137	01 / 8	Prevotella sp
138	15 / 7	Prevotella sp
139	04 / 5	Selenomonas infelix
140	32 / 5	Slackia exigua
141	04 / 8	Solobacterium moorei
142	06 / 10.1	Veillonella parvula
143	06 / 11	Veillonella parvula
144	08 / 1	Veillonella parvula
145	10 / 5	Veillonella parvula
146	11 / 9	Veillonella parvula
147	14 / 2	Veillonella parvula
148	15 / 4	Veillonella parvula
149	18 / 3	Veillonella parvula
150	18 / 5	Veillonella parvula
151	18 / 7	Veillonella parvula
152	19 / 5	Veillonella parvula
153	25 / 5	Veillonella parvula
154	26 / 7	Veillonella parvula
155	35 / 3	Veillonella parvula
156	33 / 2	Veillonella parvula
157	29 / 13.1	Veillonella dispar
158	15 / 3.2	Veillonella parvula
159	29 / 2	Veillonella parvula

## Anhang 5: Ergebnisse E-Test

Neue Nr.	Alte Nr.	Bakterienname	Amox I	Amox II	Mittelwert Amox I+II	Metro I	Metro II	Mittelwert Metro I+II	Clinda I	Clinda II	Mittelwert Clinda I+II
30	01 / 3	Fusobacterium nucleatum	>	>	>	0,125	0,094	0,1095	0,032	0,023	0,0275
51	04 / 6	Fusobacterium nucleatum / naviforme	8	6	7	3	2	2,5	0,047	0,032	0,0395
33	07 / 2	Fusobacterium nucleatum	96	96	96	0,094	0,125	0,1095	0,023	0,016	0,0195
34	09 / 1	Fusobacterium nucleatum	256	256	256	0,023	0,032	0,0275	0,016	0,016	0,016
35	09 / 2	Fusobacterium nucleatum	0,19	0,25	0,22	0,064	0,047	0,0555	0,023	0,016	0,0195
63	15 / 3.1	Fusobacterium spp.	4	4	4	0,38	0,38	0,38	<	<	<
52	15 / 6	Fusobacterium nucleatum / naviforme	0,047	0,047	0,047	0,094	0,094	0,094	0,032	0,032	0,032
37	16 / 6.1	Fusobacterium nucleatum	0,064	0,064	0,064	0,19	0,019	0,1045	0,023	0,016	0,0195
53	18 / 2	Fusobacterium nucleatum / naviforme	0,094	0,125	0,1095	0,094	0,125	0,1095	0,047	0,047	0,047
38	19 / 6	Fusobacterium nucleatum	1	1	1	0,5	0,5	0,5	0,064	0,047	0,0555
29	19 / 8	Fusobacterium naviforme / nucleatum	>	>	>	0,19	0,19	0,19	0,016	0,023	0,0195
39	19 / 9	Fusobacterium nucleatum	64	48	56	0,125	0,125	0,125	0,19	0,19	0,19
41	21 / 12	Fusobacterium nucleatum	0,75	1	0,875	0,125	0,19	0,1575	0,016	0,023	0,0195
42	21 / 14	Fusobacterium nucleatum	0,064	0,064	0,064	0,25	0,25	0,25	0,016	0,016	0,016
61	21 / 2	Fusobacterium sp / nucleatum	2	1,5	1,75	0,38	0,38	0,38	0,016	0,016	0,016
54	22 / 2	Fusobacterium nucleatum / naviforme	24	24	24	0,5	0,5	0,5	<	<	<
59	23 / 5.1	Fusobacterium sp	0,094	0,094	0,094	0,023	0,023	0,023	<	<	<
60	24 / 3.1	Fusobacterium sp	0,094	0,094	0,094	0,5	0,75	0,625	<	<	<
64	27 / 10	Fusobacterium spp.	>	>	>	0,047	0,047	0,047	0,023	0,023	0,023
43	27 / 2	Fusobacterium nucleatum	>	>	>	0,125	0,19	0,1575	0,032	0,032	0,032
44	27 / 3	Fusobacterium nucleatum	>	>	>	0,25	0,19	0,22	0,016	0,016	0,016
55	27 / 9	Fusobacterium nucleatum / naviforme	>	>	>	0,125	0,125	0,125	0,016	0,016	0,016
28	28 / 3	Fusobacterium naviforme	0,25	0,19	0,22	>	>	>	0,094	0,094	0,094
45	28 / 5	Fusobacterium nucleatum	>	>	>	>	>	>	0,023	0,023	0,023

46	30 / 3	Fusobacterium nucleatum	>	>	>	>	0,25	0,38	0,315	<	<	<	<
47	30 / 6.1	Fusobacterium nucleatum	>	>	>	0,38	0,5	0,44	0,064	0,047	0,0555		
31	34 / 8.2.1	Fusobacterium nucleatum / naviforme	1,5	1	1,25	0,125	0,125	0,125	0,125	0,094	0,125	0,1095	
57	06 / 4.1	Fusobacterium sp	0,38	0,5	0,44	0,047	0,047	0,047	0,064	0,064	0,064	0,064	
127	01 / 4	Prevotella nigrescens	0,032	0,032	0,032	0,019	0,25	0,1345	<	<	<	<	
138	01 / 8	Prevotella sp	0,19	0,19	0,19	2	2	2	<	<	<	<	
128	02 / 2	Prevotella nigrescens	0,047	0,047	0,047	0,19	0,25	0,22	<	<	<	<	
129	02 / 7	Prevotella nigrescens	0,064	0,125	0,0945	0,016	<	<	<	<	<	<	
108	03 / 2	Prevotalle nigrescens	0,032	0,032	0,032	0,19	0,19	0,19	<	<	<	<	
121	06 / 2	Prevotella intermedia	1	1	1	4	8	6	<	<	<	<	
122	11 / 3	Prevotella intermedia	0,064	0,064	0,064	12	12	12	<	<	<	<	
109	11 / 4.1	Prevotella baroniae	0,125	0,094	0,1095	8	8	8	<	<	<	<	
	11 / 4.2	Prevotella spp.	0,064	0,125	0,0945	8	12	10	<	<	<	<	
112	11 / 8	Prevotella buccae	0,25	0,25	0,25	0,75	1	0,875	0,016	0,016	0,016	0,016	
113	12 / 4	Prevotella buccae	0,094	0,094	0,094	0,75	0,75	0,75	0,016	0,016	0,016	0,016	
114	12 / 7	Prevotella buccae	0,125	0,094	0,1095	0,75	0,5	0,625	<	<	<	<	
137	13 / 1	Prevotella salivae	0,094	0,125	0,1095	1	1	1	0,016	0,016	0,016	0,016	
116	20 / 10	Prevotella denticola	0,016	0,016	0,016	>	>	>	<	<	<	<	
117	21 / 15	Prevotella denticola	0,32	0,48	0,4	4	6	5	<	<	<	<	
132	23 / 4.1	Prevotella nigrescens	0,064	0,064	0,064	>	>	>	<	<	<	<	
118	24 / 10.1	Prevotella denticula	0,016	0,016	0,016	<	<	<	>	>	>	>	
133	24 / 9.1	Prevotella nigrescens	<	<	<	0,125	0,125	0,125	<	<	<	<	
119	28 / 7	Prevotella denticula	0,032	0,032	0,032	196	196	196	<	<	<	<	
126	28 / 8	Prevotella maculosa	0,19	0,19	0,19	0,064	0,064	0,064	<	<	<	<	
136	30 / 4	Prevotella oris	2	4	3	>	>	>	0,094	0,094	0,094	0,094	
110	33 / 6	Prevotella baroniae	0,125	0,125	0,125	48	64	56	0,125	0,125	0,125	0,125	
115	34 / 6	Prevotella buccae	0,5	0,38	0,44	256	256	256	0,047	0,047	0,047	0,047	

81	03 / 6	Parvimonas micra	>	>	>	>	3	6	4,5	0,25	0,25	0,25	0,25
82	04 / 7	Parvimonas micra	2	1,5	1,75	0,064	0,064	0,064	0,064	0,25	0,25	0,25	0,25
83	05 / 2	Parvimonas micra	0,75	0,75	0,75	0,125	0,125	0,125	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25
84	06 / 7	Parvimonas micra	0,75	0,75	0,75	>	>	>	>	0,094	0,125	0,1095	0,1095
85	07 / 3.2	Parvimonas micra	3	3	3	>	>	>	>	1	1	1	1
86	07 / 5	Parvimonas micra	>	>	>	0,25	0,19	0,22	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094
87	10 / 6	Parvimonas micra	128	128	128	0,125	0,125	0,125	0,125	0,032	0,032	0,032	0,032
88	11 / 11	Parvimonas micra	>	>	>	0,125	0,094	0,1095	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
89	12 / 3	Parvimonas micra	>	>	>	1	0,75	0,875	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064
90	20 / 6	Parvimonas micra	0,094	0,19	0,142	1	0,75	0,875	0,023	0,023	0,023	0,023	0,023
91	21 / 8	Parvimonas micra	0,25	0,25	0,25	1	0,75	0,875	0,25	0,25	0,19	0,22	0,22
92	22 / 8	Parvimonas micra	>	>	>	1	1	1	1	0,125	0,125	0,125	0,125
93	23 / 3.1	Parvimonas micra	>	>	>	<	<	<	<	0,016	0,064	0,04	0,04
94	24 / 12.1	Parvimonas micra	>	>	>	0,25	0,25	0,25	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064
95	24 / 7.1	Parvimonas micra	0,75	0,75	0,75	0,094	0,094	0,094	0,129	0,19	0,19	0,1595	0,1595
96	24 / 7.2	Parvimonas micra	0,94	0,94	0,94	0,047	0,047	0,047	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
97	26 / 4	Parvimonas micra	<	<	<	0,125	0,125	0,125	0,19	0,125	0,125	0,1575	0,1575
98	27 / 4	Parvimonas micra	<	<	<	0,064	0,064	0,064	0,047	0,047	0,047	0,047	0,047
99	28 / 1	Parvimonas micra	0,25	0,19	0,22	0,047	0,064	0,0555	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032
100	28 / 2	Parvimonas micra	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,032	0,047	0,047	0,0395	0,0395
101	29 / 10	Parvimonas micra	0,094	0,094	0,094	0,125	0,125	0,125	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
102	30 / 5	Parvimonas micra	4	3	3,5	0,5	0,5	0,5	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094
103	32 / 6.1	Parvimonas micra	0,19	0,125	0,1575	0,25	0,25	0,25	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064
104	34 / 8.1	Parvimonas micra	>	>	>	0,19	0,19	0,19	0,19	0,125	0,094	0,1095	0,1095
106	41 / 3	Parvimonas micra	0,19	0,19	0,19	0,5	0,5	0,5	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
143	06 / 10.1	Veillonella parvula	0,75	0,75	0,75	>	>	>	>	0,094	0,094	0,094	0,094
144	06 / 11	Veillonella parvula	4	6	5	<	<	<	<	0,19	0,19	0,19	0,19



## Anhang 6: SPSS-Output

### a) Amoxicillin

#### Explorative Datenanalyse

##### Tests auf Normalverteilung

Wert	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
	,432	81	,000	,267	81	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

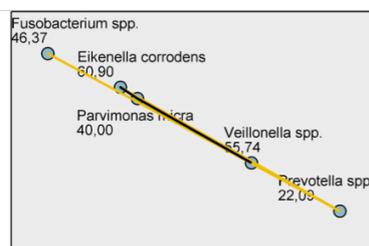
#### Nicht parametrische Tests

##### Hypothesentestübersicht

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von Wert ist über die Kategorien von Bakterium identisch.	Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben	,000	Nullhypothese ablehnen

Asymptotische Signifikanz werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

##### Paarweise Vergleiche von Bakterium



Jeder Knoten enthält den durchschnittlichen Stichprobenra...

Stichprobe1-Stichprobe2	Test-statistik	Std.-Fehler	Standardtest-statistik	Sig.	Angep. Sig.
Prevotella spp.-Veillonella spp.	-33,648	7,519	-4,475	,000	,000
Prevotella spp.-Eikenella corrodens	-38,813	11,599	-3,346	,001	,008
Prevotella spp.-Fusobacterium spp.	24,281	7,288	3,332	,001	,009
Prevotella spp.-Parvimonas micra	-17,913	7,519	-2,382	,017	,172
Parvimonas micra-Veillonella spp.	-15,735	8,063	-1,952	,051	,510
Parvimonas micra-Eikenella corrodens	-20,900	11,959	-1,748	,081	,805
Parvimonas micra-Fusobacterium spp.	6,368	7,848	,811	,417	1,000
Fusobacterium spp.-Veillonella spp.	-9,367	7,848	-1,194	,233	1,000
Fusobacterium spp.-Eikenella corrodens	-14,532	11,815	-1,230	,219	1,000
Veillonella spp.-Eikenella corrodens	-5,165	11,959	-,432	,666	1,000

Jede Zeile testet die Nullhypothese, dass die Verteilungen von Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanz (2-seitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## b) Metronidazol

### Explorative Datenanalyse

#### Tests auf Normalverteilung

Wert	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
	,393	81	,000	,351	81	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

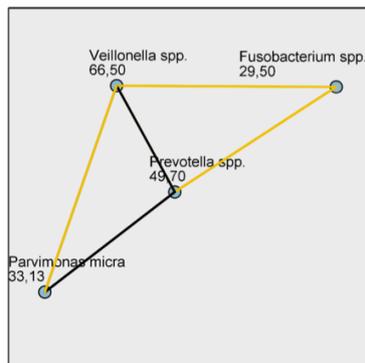
### Nicht parametrische Tests

#### Hypothesentestübersicht

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von Wert ist über die Kategorien von Bakterium identisch.	Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben	,000	Nullhypothese ablehnen

Asymptotische Signifikanzwerte werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

#### Paarweise Vergleiche von Bakterium



Jeder Knoten enthält den durchschnittlichen Stichprobenrang Bakterium.

Stichprobe1-Stichprobe2	Test-statistik	Std.-Fehler	Standardtest-statistik	Sig.	Angep. Sig.
Fusobacterium spp.-Parvimonas micra	-3,630	6,729	-,540	,590	1,000
Fusobacterium spp.-Prevotella spp.	-20,200	6,991	-2,889	,004	,023
Fusobacterium spp.-Veillonella spp.	-37,000	8,203	-4,510	,000	,000
Parvimonas micra-Prevotella spp.	16,570	7,187	2,306	,021	,127
Parvimonas micra-Veillonella spp.	-33,370	8,371	-3,986	,000	,000
Prevotella spp.-Veillonella spp.	-16,800	8,583	-1,957	,050	,302

Jede Zeile testet die Nullhypothese, dass die Verteilungen von Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanzwerte (2-seitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

### c) Clindamycin

#### Explorative Datenanalyse

##### Tests auf Normalverteilung

Wert	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistik	df	Signifikanz	Statistik	df	Signifikanz
	,272	94	,000	,570	94	,000

a. Signifikanzkorrektur nach Lilliefors

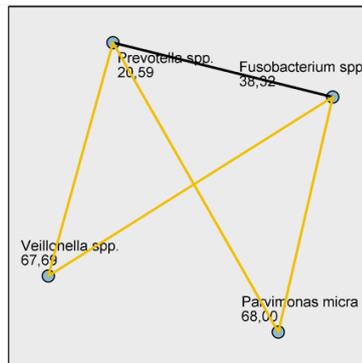
#### Nicht parametrische Tests

##### Hypothesentestübersicht

	Nullhypothese	Test	Sig.	Entscheidung
1	Die Verteilung von Wert ist über die Kategorien von Bakterium identisch.	Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben	,000	Nullhypothese ablehnen

Asymptotische Signifikanz werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05.

##### Paarweise Vergleiche von Bakterium



Jeder Knoten enthält den durchschnittlichen Stichproben...

Stichprobe1-Stichprobe2	Test-statistik	Std.-Fehler	Standardtest-statistik	Sig.	Angep. Sig.
Preotella spp.-Fusobacterium spp.	17,734	7,617	2,328	,020	,119
Preotella spp.-Veillonella spp.	-47,107	8,518	-5,531	,000	,000
Preotella spp.-Parvimonas micra	-47,413	7,820	-6,063	,000	,000
Fusobacterium spp.-Veillonella spp.	-29,373	8,177	-3,592	,000	,002
Fusobacterium spp.-Parvimonas micra	-29,679	7,448	-3,985	,000	,000
Veillonella spp.-Parvimonas micra	,306	8,367	,037	,971	1,000

Jede Zeile testet die Nullhypothese, dass die Verteilungen von Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind. Asymptotische Signifikanz (2-seitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist ,05. Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

## **12 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank an alle Personen richten, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Übergeordnet möchte ich besonders meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Karin Christine Huth für das Überlassen dieses interessanten und bedeutsamen Themas, für die herausragende Betreuung und fachliche Unterstützung auf dem Weg zu dieser Arbeit sowie für die stetig lehrreiche Zusammenarbeit danken.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Reinhard Hickel, Direktor der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und Dekan der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Hause und unter ausgezeichneten Arbeitsbedingungen durchführen zu dürfen.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinem Mitbetreuer, Herrn Dr. Maximilian Kollmuß aussprechen. Er stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und hat mich kontinuierlich bei der Durchführung meiner Arbeit ermutigt und unterstützt.

Ein großer Dank gilt auch Frau MTA Brigitte Hackl für die fachliche Unterstützung im Forschungslabor.

Nicht zuletzt richte ich meinen außerordentlichen Dank an meine Eltern, ohne deren umfangreiche moralische und finanzielle Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre sowie an meine Familie und Freunde, die stets ermutigende Worte für mich fanden und mich auch auf diesem Weg begleitet haben.

## 13 Eidesstattliche Versicherung

Wirsing, Theresa

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Untersuchung des in-vitro Resistenzverhaltens parodontalpathogener Keime gegenüber Amoxicillin, Metronidazol und Clindamycin**

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 25.10.2019

---

Ort, Datum

Theresa Wirsing

---

Unterschrift Doktorandin