

Kritische Beurteilung mikrobiologischer Diagnostik bei marginaler Parodontitis

unter besonderer Berücksichtigung von *Porphyromonas gingivalis*

Zusammenfassung

Eine opportunistische Infektion mit pathogenen Mikroorganismen des oralen Biofilms ist eine *conditio sine qua non*, um eine marginale Parodontitis auszulösen. Inwiefern mikrobiologische Diagnostik zur Diagnose oder Therapieplanung dieser Erkrankung sinnvoll ist, soll in diesem Übersichtsartikel diskutiert werden. Verschiedene Testverfahren stehen zur Analyse der oralen Mikroflora zur Verfügung. Sie basieren auf morphologischen, kulturellen, enzymatischen, genetischen oder antigenetischen speziesspezifischen Merkmalen. Unter den zahlreichen Spezies der mikrobiellen Flora spielen bestimmte Genotypen von *Porphyromonas gingivalis* eine wichtige Rolle in der Ätiologie parodontaler Erkrankungen. Virulenzfaktoren, wie Proteasen oder Lipopolysaccharid, konnten für dieses gram-negative Bakterium nachgewiesen werden. Bis heute ist es jedoch nur unzureichend möglich, einzelne Stämme dieser heterogenen Gruppe hinsichtlich ihrer Virulenz zu charakterisieren oder mit bestimmten parodontalen Krankheitsbildern in Zusammenhang zu bringen. Der klinische Nutzen eines Nachweises dieses Bakteriums ist vor diesem Hintergrund zum gegenwärtigen Zeitpunkt limitiert.

Schlüsselworte: Mikrobiologische Diagnostik, Parodontitis, Virulenzfaktoren, *Porphyromonas gingivalis*

Schweiz Monatsschr Zahnmed 115: 415–424 (2005)

Zur Veröffentlichung angenommen: 11. Februar 2005

Korrespondenzadresse:

Clemens Walter
Klinik für Parodontologie, Endodontologie und Kariologie,
Universität Basel, Hebelstrasse 3, CH-4056 Basel, Schweiz
Tel. ++41-61-2672623, Fax ++41-61-2672659
E-Mail: clemens.walter@unibas.ch

CLEMENS WALTER¹, PETER PURUCKER²,
JEAN-PIERRE BERNIMOULIN², NORBERT SUTTORP³,
JÜRIG MEYER⁴ und ROLAND WEIGER¹

¹ Klinik für Parodontologie, Endodontologie und Kariologie,
Universität Basel, Basel, Schweiz

² Abteilung für Parodontologie und synoptische Zahnmedizin,
Charité, Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland

³ Medizinische Klinik m. S. Infektiologie, Charité,
Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Deutschland

⁴ Institut für Präventivzahnmedizin und Orale Mikrobiologie,
Universität Basel, Basel, Schweiz

Einleitung

Entzündliche parodontale Erkrankungen sind multifaktorielle, chronische Krankheiten. Voraussetzung ist eine meist polymikrobielle Infektion mit pathogenen Mikroorganismen des oralen Biofilms (SOCRANSKY & HAFFAJEE 2002) (Abb. 1). Dabei wirken die Bakterien nicht nur direkt; eine Schädigung des Parodontiums wird vielmehr auch ohne eine bakterielle Invasion in die entsprechenden Kompartimente des Zahnhalteapparates durch die Immunantwort des Wirts auf den bakteriellen Reiz hervorgerufen (MOMBELLI 2003).

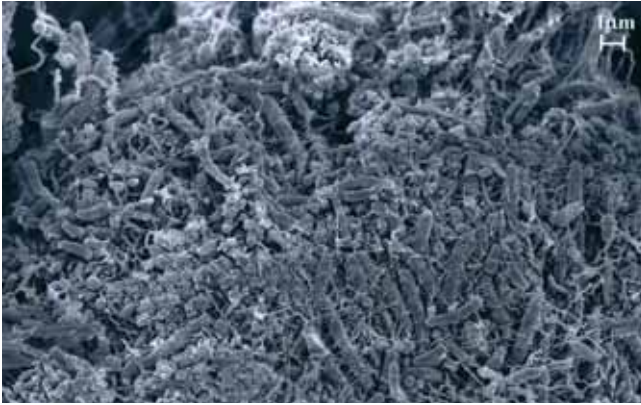


Abb. 1 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines subgingivalen Biofilms (Sondierungstiefe 9 mm) eines Patienten mit aggressiver Parodontitis. Dieser Ausschnitt zeigt neben verstreut liegenden pleomorphen Kurzstäbchen zahlreiche begeißelte Stäbchen in einer Kolonie. Zwischen diesen sind Treponemen in den Biofilm eingeflochten zu sehen (zur Verfügung gestellt von C. Schaudinn, Robert-Koch-Institut, Berlin, Deutschland).

Moduliert werden Entstehung und Progression der Erkrankung durch individuell unterschiedliche, erworbene sowie zahlreiche genetische Faktoren. So scheinen verschiedene hereditäre Einflüsse, wie Funktionsstörungen neutrophiler Granulozyten, Polymorphismen im IL-1 β - oder Fc γ II-Gen oder Mutationen in den Genloci für IgG2, die Anfälligkeit des Organismus für parodontale Erkrankungen zu steigern. Des Weiteren können psychosomatischer Stress, Rauchen, Ernährungsgewohnheiten, Diabetes mellitus oder HIV den Verlauf und den Schweregrad einer Parodontitis modifizieren (KINANE & LAPPIN 2001, KINANE & HART 2003).

Die Diagnose parodontaler Erkrankungen und die Reaktion auf therapeutische Massnahmen können nach wie vor nur anhand des klinischen respektive radiologischen Bildes sicher gestellt werden. Die noch zu Beginn der Neunzigerjahre gehegten Erwartungen, der Nachweis von so genannten Parodontalpathogenen in der subgingivalen Plaque könne differentialdiagnostische oder therapierelevante Aussagen erlauben, erfüllten sich bisher nur in begrenztem Masse (PURUCKER 1991). Zudem ist die Aussagekraft verschiedener gentechnischer Analysen oder die Untersuchung zahlreicher «Laborparameter», ob im Sulkusfluid, im Speichel oder im Blutserum des Patienten erhoben, bis heute limitiert und hauptsächlich der klinischen Forschung vorbehalten (KINANE & HART 2003, AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY 2003).

Ziel dieser Arbeit ist es nun, unter Berücksichtigung des zunehmenden Verständnisses bakterieller Virulenzmechanismen sowie im Lichte der multifaktoriellen Genese der Erkrankung zu diskutieren, inwiefern eine mikrobiologische Untersuchung die Diagnostik erweitern oder die Therapie parodontaler Erkrankungen beeinflussen kann. Am Beispiel des potenziellen oralen Pathogens *Porphyromonas gingivalis* soll der gegenwärtige Wissensstand vertiefend erläutert werden.

Mikrobielle Ätiologie

Die Bedeutung oraler Mikroorganismen bei der Entstehung entzündlicher parodontaler Erkrankungen wurde lange vermutet und nunmehr durch die klassischen Experimente von der

Arbeitsgruppe um Løe und Theilade vor fast 40 Jahren bewiesen (THEILADE et al. 1966).

Kürzlich untersuchte eine Arbeitsgruppe in einer über 26 Jahre laufenden longitudinalen Studie in einer skandinavischen Population, welchen Einfluss mikrobielle Plaque auf den Entzündungsgrad der Gingiva und den Attachmentverlust an den untersuchten Stellen besitzt (SCHÄTZLE et al. 2003). Die klinisch sichtbare Plaqueansammlung an den analysierten Zahnstellen korrelierte mit dem Entzündungsgrad der Gingiva. Darüber hinaus zeigten Zahnstellen, die über den Untersuchungszeitraum immer auf Sondierung geblutet hatten, ca. 70% mehr Attachmentverlust als entzündungsfreie Stellen.

Die Frage, ob Infektionen mit spezifischen Bakterien, opportunistische Infektionen der vermutlich aus über 700 verschiedenen Arten bestehenden oralen Mikroflora oder die akkumulierte Plaque in ihrer Gesamtheit für Entstehung und Progression parodontaler Erkrankungen verantwortlich sind, wird seit nunmehr einem Jahrhundert kontrovers diskutiert (SLOTS 1986, THEILADE 1986, KAZOR et al. 2003).

Da es sich bei Parodontalerkrankungen um opportunistische Infektionen handelt, war es sinnvoll, die Henle-Koch'schen Postulate zu modifizieren. Socransky formulierte für parodontale Erkrankungen folgende Postulate (SOCRANSKY 1979, SLOTS & RAMS 1992):

1. Der Keim muss in höherer Quantität an Stellen mit progressivem Attachmentverlust vorliegen als an solchen, die keinen zunehmenden Verlust an Stützgewebe zeigen.
2. Die Elimination des potenziellen Pathogens beendet das Fortschreiten der Erkrankung.
3. Es besteht eine Immunantwort des Wirtsorganismus auf den bakteriellen Reiz.
4. Die Spezies produziert Virulenzfaktoren, die für die Erkrankung relevant sind.
5. Die Pathogenität der Spezies muss im Tierversuch nachgewiesen sein.

Als Virulenzfaktoren werden solche Strukturelemente und Stoffwechselprodukte von Bakterien bezeichnet, die die krankheits-erregenden Eigenschaften einer bestimmten Spezies bedingen (MIKSITS et al. 1992).

Mikrobiologische Studien zahlreicher Arbeitsgruppen legen die Assoziation einiger so genannter Parodontalpathogene mit unterschiedlichen Formen der marginalen Parodontitis nahe (EZZO & CUTLER, 2003). SOCRAANSKY et al. (1998) zeigten mittels molekularbiologischer Analysen (Checkerboard DNS-Hybridisierungen), dass mehrere, bestimmte orale Mikroorganismen häufig gemeinsam vorkommen, d.h. so genannte Cluster (Komplexe) bilden (Abb. 2). Einige dieser Komplexe sind meist mit parodontalen Erkrankungen vergesellschaftet, andere vorwiegend mit parodontal gesunden Verhältnissen. Bei Vorhandensein von Mitgliedern des so genannten roten Komplexes, *Tannerella forsythia* (= *Bacteroides forsythus*), *Treponema denticola* und *P. gingivalis*, besteht demnach ein signifikant erhöhtes Risiko für Bluten auf Sondieren und erhöhte Sondierungstiefen. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass mittels dieser Technik keine «echten», das heisst in der parodontalen Tasche als Aggregate vorhandene, Komplexe nachgewiesen werden. Es handelt sich vielmehr um mit statistischen Mitteln berechnete «Clusters» von Bakterienarten, welche mit einem klinisch definierten Krankheitsbild assoziiert sind. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* liess sich in dieser Analyse keinem der Komplexe zuordnen. Diese Spezies, insbesondere *A. actinomycetemcomitans* Serotyp b scheint jedoch verstärkt mit aggressiven Formen der Parodontitis («lokalisierte juvenile Parodontitis» gemäss der alten Nomen-



Abb. 2 Schematische Darstellung der Beziehungen der subgingivalen Bakterienkomplexe innerhalb der Komplexe sowie zwischen den mikrobiologischen Komplexen. Das Diagramm wurde mittels statistischer Analysen (multiple cluster-/community ordination analysis) unter Verwendung von 13 261 Plaqueproben von insgesamt 185 Patienten erstellt. Jede Probe wurde auf das Vorhandensein von 40 subgingivalen Spezies analysiert. (Modifizierte Abbildung aus der Originalpublikation von SOCRANSKY et al. [1998], mit freundlicher Genehmigung von A. Haffajee, Forsyth-Institut, Boston, USA.)

klatur) assoziiert zu sein (YANG et al. 2004, BUENO et al. 1998, ZAMBON 1985).

Gängige Methoden mikrobiologischer Diagnostik

An dieser Stelle soll kurz auf einige derzeit verfügbare Methoden eingegangen werden, eine detailliertere Darstellung würde den Rahmen dieses Artikels «sprengen», es sei auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen.

Im Laufe des vergangenen Jahrhunderts wurden verschiedene Analysemethoden zum Nachweis potenzieller Pathogene entwickelt. Zur Differenzierung oraler Mikroorganismen stehen zahlreiche Testverfahren zur Verfügung. Sie basieren auf morphologischen, kulturellen, enzymatischen, genetischen oder antigenen speziesspezifischen Merkmalen. Darüber hinaus kann die humorale Wirtsantwort auf bestimmte Spezies mit serologischen Methoden analysiert werden.

Problem der reproduzierbaren Probenentnahme

Die pathogene Wirkung des Biofilms auf das Parodont weist nur einen Radius von 2–3 mm auf (PAGE et al. 1997). Daher ist für die subgingivale Probenentnahme der apikale Anteil des Biofilms am interessantesten. Die Plaqueproben können mit sterilen Papierspitzen oder mit Küretten entnommen werden. Bei der Probengewinnung mittels der heutzutage am weitesten verbreiteten Papierspitzenmethode ist eine separate Entnahme dieses Bereiches jedoch nicht gewährleistet. Auf ihrem Weg zum Fundus der Tasche kann die Papierspitze schon einen grossen Teil des koronalen und mittleren Anteils des subgingivalen Biofilms aufnehmen (TANNER & GOODSON 1986). Die Flora am Taschenfundus wird daher möglicherweise zu wenig berücksichtigt. Ein weiterer Fehler ergibt sich bei der Papierspitzenmethode durch die Blutung und den unterschiedlichen Gewebedruck in der Tasche. In einer älteren Studie wurde die Gesamtmenge der entnommenen Keime gemessen. Sie schwankte zwischen 7 und 41% der Taschenflora (KIEL & LANG 1983). Obwohl dies bei einer möglichen Taschenpopulation von 10^7 bis 10^8 Bakterien immer noch hohe Keimzahlen repräsentieren würde, sind doch Rück-

schlüsse auf die Menge der Gesamtflora schwierig. Eine zu geringe Probenzahl stellt ein weiteres Problem dar. Wird z. B. nur an der Stelle mit der höchsten Sondierungstiefe eine Probe entnommen, kann eine gesuchte Spezies nur bei ca. 40% der Probanden detektiert werden. Schon bei Entnahme an den vier tiefsten Stellen einer Dentition beträgt die Wahrscheinlichkeit, die gesuchte Spezies nachzuweisen, 75% (HAFFAJEE & SOCRANSKY 1992).

Mikroskopische Techniken

a) *Dunkelfeld-Mikroskopie*: Die orale Mikroflora wurde erstmals von Antoine van Leuwenhook im 17. Jahrhundert mikroskopisch untersucht. Verfahren wie die Phasenkontrast- oder Dunkelfeldmikroskopie spielen heute, da nur eine grobe, unzureichende Einteilung nach Morphotypen (Stäbchen, Filamente, Kokken, Spirochäten, beweglich/unbeweglich) möglich ist (Abb. 3), eine untergeordnete Rolle. Vorteil dieses Verfahrens ist jedoch die Visualisierung der schwer kultivierbaren, oralen Spirochäten.

b) *Immunfluoreszenz*: Bei diesem Verfahren können mit spezifischen mono- oder polyklonalen Antikörpern speziesspezifische Antigene der gesuchten Bakterien nachgewiesen werden. Die Antikörper binden an den entsprechenden Keimen. Durch das Licht einer spezifischen Wellenlänge können Fluoreszenzfarbstoffe, die an die Antikörper gekoppelt sind, angeregt und die gesuchten Mikroorganismen direkt in der entnommenen Plaque sichtbar gemacht werden.

Kulturverfahren und biochemische Identifizierung

Da es sich bei subgingivalen Plaqueproben um eine Mischpopulation aus aeroben und anaeroben Mikroorganismen handelt, ist zunächst eine für die Vitalerhaltung möglichst aller Spezies geeignete Probenentnahme und der Transport in das für die Untersuchung bestimmte Labor notwendig. Die Anzucht erfolgt dann mittels aerober und anaerober Kulturtechniken auf geeigneten Nährböden. Die Identifizierung der subkultivierten Reinkulturen (Abb. 4) erfolgt meist anhand der unterschiedlichen enzymatischen Profile der Mikroorganismen. Das für jede Spezies spezifische Enzymmuster liegt dann in Form einer so ge-



Abb. 3 Dunkelfeld-Aufnahme der subgingivalen Flora eines Patienten mit aggressiver Parodontitis. Vor allem ist – typisch für subgingivale Plaque – auch ein grosses Aggregat zu sehen, das mehr als 90% der in diesem Plaqueausschnitt vorhandenen Zellen beherbergen dürfte, u. a. auch die allenfalls vorhandenen *P. gingivalis*-Zellen.

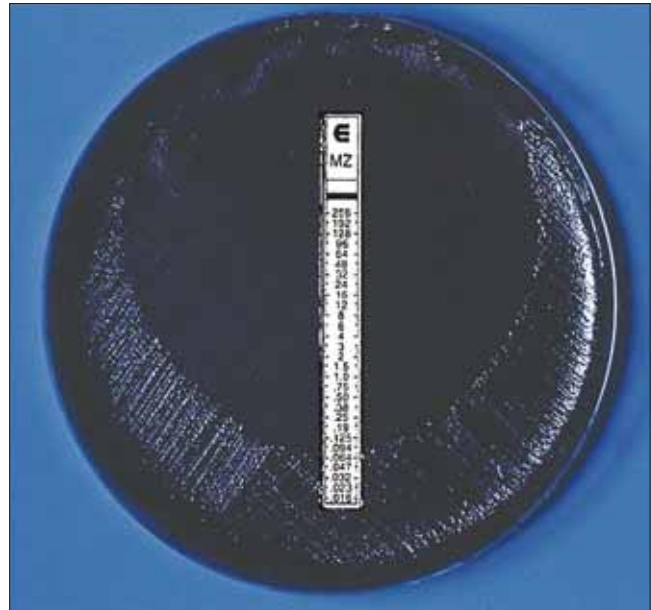


Abb. 6 Antibiotika-Resistenztestung mit dem E-Test. Deutlich zu sehen ist die hohe Empfindlichkeit von *P. gingivalis* gegenüber Metronidazol. Dieses Antibiotikum wäre in diesem Fall das Mittel der Wahl für eine adjunktive antimikrobielle Therapie.

nannten «bunten Reihe» vor (KITCH & APPELBAUM 1989) (Abb. 5). Gegenüber anderen Verfahren erlaubt diese sehr zeitintensive Technik eine beliebig extensive Analyse der kultivierbaren subgingivalen Flora und bietet zudem als bis dato einziges Verfahren die Möglichkeit einer Antibiotika-Resistenztestung (Abb. 6).

Nachweis bakterieller Enzyme bestimmter potenzieller Parodontalpathogene

Ein praktisches, weil direkt am Behandlungsstuhl durchführbares Verfahren war der so genannte BANA-Test. Dieses Verfahren



Abb. 4 *P. gingivalis*-Kultur nach anaerober Inkubation (3d, 7d, 14d) auf mit Schaaf-Blut angereicherten Columbia-Agarplatten. Die deutlich sichtbare zunehmende schwarze Pigmentierung ist bedingt durch die Akkumulation von Häm. Dieses dient als Quelle für Eisen und ist notwendig für Wachstum, die Expression von OMP sowie für die Funktion verschiedener Proteasen.



Abb. 5 Bestimmung von *P. gingivalis* anhand des Enzymmusters («bunte Reihe»). Die charakteristische Kombination der Farbreaktion in den Vertiefungen 1 (farblos zu rot), 3, 9 (beide farblos zu gelb) und C (zu blau) der Reihe 1 und in den Vertiefungen 1 (farblos zu rosa), 2 (zu purpur), 3, 5, A und D (alle zu orange) der Reihe 0 erlauben die Identifikation des isolierten Stammes als *P. gingivalis*. Bei den positiven Merkmalen handelt es sich beispielsweise um die Aktivität charakteristischer Enzyme wie Arginindihydrolase (ADH), Beta-Galactosidase (β Gal), und Glutaminsäuredecarboxylase (GDC) oder um die Produktion von Indol (IND).

zielte auf die Detektion bestimmter eiweiss-spaltender Enzyme, trypsinähnlicher Proteasen, von *T. denticola*, *P. gingivalis* und *T. forsythia*. Durch die Blaufärbung eines Teststreifens konnte das Vorhandensein dieser Enzyme und damit wahrscheinlich eine dieser Spezies nachgewiesen werden. *A. actinomycetemcomitans* liess sich so nicht detektieren, da dieser Keim solche Enzyme nicht aufweist. Ein weiterer Nachteil war die fehlende Spezifität dieses Tests (LOESCHE et al. 1990). Dieser wenig aussagefähige Test ist in der Schweiz kommerziell nicht mehr erhältlich.

Nachweis bakterieller DNA

Neuere, kommerzielle mikrobiologische Tests verwenden gentechnische Methoden. Bei diesen Tests nutzt man die DNA der Bakterien, um nach der Herstellung von DNA-Einzelsträngen charakteristische Sequenzen der gesuchten Mikroorganismen mit spezifischen Gensonden sowie unterschiedlicher Visualisierungsverfahren (z.B. Chemifluoreszenz, Checkerboard-Chemifluoreszenz) nachzuweisen. Diese Verfahren haben neben hoher Sensitivität und Spezifität gegenüber anderen Techniken den Vorteil, dass eine Vitalerhaltung der Mikroorganismen während des Transports für den Nachweis nicht nötig ist. Ein Nachteil ist, dass nur Keime, für die die richtige Gensonde im Testansatz vorhanden ist, gefunden werden können.

Nachweis bakterieller ribosomaler RNA

Ist die Sequenz der ribosomalen 16S rRNA eines Bakteriums bekannt, so können komplementäre Oligonukleotid-Sonden zum Nachweis spezifischer Abschnitte dieser RNA verwendet werden. Mit dieser Methode können anhand einer Computerdatenbank die gewünschten sehr spezifischen Sonden hergestellt werden. Ein elegantes Verfahren, via rRNA-Detektion, Mikroorganismen beispielsweise in Biopsaten zu visualisieren, ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) (SUNDE et al. 2003).

Die Polymerasekettenreaktion (Polymere Chain Reaction, PCR)

Mit dieser Technik können bestimmte Abschnitte der bakteriellen DNA gezielt vermehrt werden. Eine Weiterentwicklung dieser Technik, die Real Time PCR, erlaubt eine quantitative Analyse der bakteriellen DNA-Menge in einer Probe. Bei der DNA-Vermehrung werden Fluoreszenzsignale freigesetzt, die zur Quantifizierung der Bakterienzahl ausgewertet werden (KE et al. 2000, LAU et al. 2004). Da theoretisch gegen jedes Gen eines Bakteriums spezifische Sonden hergestellt werden können, erlaubt diese Methode sowohl den Nachweis potenzieller Virulenzfaktoren (s.u.) als auch deren Quantifizierung in einer Plaqueprobe (VAN DER PLOEG et al. 2004).

DNA-Chips zum quantitativen Nachweis

Die durch die PCR vermehrten Abschnitte könnten auch durch DNA-Chips, auf denen die komplementäre Sequenz fixiert wurde, nach Hybridisierung, semi-quantitativ detektiert werden. Dadurch wäre eine kostengünstigere Methode zum Erfassen einer grossen Anzahl verschiedener Spezies realisierbar. Solche Chips werden derzeit entwickelt, sind momentan jedoch noch nicht verfügbar.

Serologische Verfahren zur Bestimmung der Immunantwort

Mit diesen Verfahren wird mittels spezifischer bakterieller Antigene die Antikörperreaktivität im Serum oder im Sulkusfluid nachgewiesen (GEMMELL et al. 1995). In der Praxis spielen diese Verfahren heute noch keine Rolle. Die Möglichkeit die Immun-

antwort auf einen spezifischen bakteriellen Reiz zu analysieren und damit die Bedeutung eines Pathogens auf Niveau des einzelnen Individuums für die Progression einer Parodontitis zu bestimmen, könnte in Zukunft individuell abgestimmte antimikrobielle Therapien möglich machen.

Porphyromonas gingivalis

Als Mitglied des «roten Komplexes» ist dieses gramnegative, anaerobe Bakterium die wohl meist beachtete Spezies, welche mit dem Auftreten parodontaler Erkrankungen in Zusammenhang gebracht wird. Allein in der Literaturdatenbank Pub-Med sind ca. 2500 Artikel aufgelistet. Eine Kooperation US-amerikanischer Forschungsinstitute unter Federführung des Forsyth-Institutes in Boston versucht zudem im «*Porphyromonas gingivalis* Genome Project» die bisherigen Erkenntnisse zu bündeln und weitere Anhaltspunkte für die pathogenetische Bedeutung dieses Bakteriums zu finden (www.pgingivalis.org).

Anhand dieses potenziellen Pathogens soll exemplarisch die Frage aufgeworfen werden, inwiefern ein mikrobiologischer Nachweis zum gegenwärtigen Zeitpunkt von klinischer oder therapeutischer Relevanz ist.

Erste Hinweise auf eine mögliche Rolle schwarzer pigmentierender Bacteroides-Arten (u.a. *P. gingivalis*) bei der Pathogenese der Parodontitis gehen bereits auf BURDON (1928) zurück (Abb. 4). SOCRANSKY et al. (1998), MOORE & MOORE (1994) und andere zeigten eine Assoziation mit verschiedenen Parodontopathien. Die Untersuchung potenzieller Virulenzfaktoren lassen eine kausale Beziehung zwischen diesem Bakterium und der Ätiologie der Parodontitis plausibel erscheinen. So induziert Lipopolysaccharid, ein wichtiger Bestandteil der äusseren Membran gramnegativer Bakterien, verschiedene biologische Effekte, wie die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine *in-vitro* (OGAWA et al. 1994). COLLINS et al. (1994) demonstrierte in Versuchen an Hamstern neben deutlich erhöhten Serumwerten verschiedener entzündungsfördernder Botenstoffe (PG E2, TNF) auch eine erhöhte embryonale Letalität nach *P. gingivalis*-Exposition.

Als asaccharolytisches Bakterium ist *P. gingivalis* für Wachstum und Proliferation auf freie Peptide in seiner Umgebung angewiesen. Diese Spezies produziert daher zahlreiche Proteasen (Eiweiss-spaltende Enzyme), die entweder auf der Zelloberfläche exprimiert oder in Form von Vesikeln in die Umgebung sezerniert werden. Die Fähigkeit, grosse Proteine in kleine Peptide zu zerlegen, ist einerseits ein wichtiger Mechanismus für Wachstum und Proliferation im Wirtsorganismus. Andererseits scheinen diese Enzyme auch eine direkte Rolle in der Zerstörung des Parodontiums zu spielen. Von besonderer, potenziell pathogenetischer Bedeutung ist eine Gruppe Cystein-Proteasen mit trypsin-ähnlicher Aktivität. Diese so genannten Gingipaine werden entsprechend ihrer Substratspezifität in Arginin- oder Lysin-spezifische Proteasen eingeteilt. Es konnte *in-vitro* gezeigt werden, dass diese Enzymgruppe sowohl Bestandteile des Zahnhalteapparates, wie Kollagen, aber auch proinflammatorische Moleküle, wie verschiedene Zytokine oder Komponenten des Blutgerinnungssystems (z.B. Fibrinogen) spalten können (siehe auch die entsprechenden Übersichtsartikel HOLT et al. 1999, BRIEN-SIMPSON et al. 2003).

Darüber hinaus induziert *P. gingivalis* die Expression zellulärer Rezeptoren, so genannter Adhäsionsmoleküle, auf der Oberfläche von Endothel- und Epithelzellen und spielt somit möglicherweise eine zentrale Rolle bei der transendothelialen Migration von Leukozyten (WALTER et al. 2004). Diese Einwanderung von Entzündungszellen in die Gewebe des Zahnhalteapparates führt zur Ausbildung des parodontaltypischen entzündlichen Infiltra-

tes (KHLGATIAN et al. 2002, PAGE & SCHROEDER 1976). Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor ist die Fähigkeit eines Bakteriums, in die Gewebe des Wirtsorganismus zu invadieren und dort zu überleben. Für *P. gingivalis* konnte sowohl die Invasion als auch das intrazelluläre Überleben in unterschiedlichen, in parodontalen Geweben vorkommenden Zellarten (Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten) demonstriert werden (DESHPANDE et al. 1998, MADIANOS et al. 1996, WALTER et al. 2004).

Obwohl für diese Spezies verschiedene Virulenzfaktoren sowie zahlreiche entzündungsfördernde Effekte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen wurden, konnte *P. gingivalis*, neben anderen potenziellen Pathogenen, auch bei parodontal gesunden Individuen, wenngleich auch weniger häufig und in geringerer Zahl, detektiert werden (GRIFFEN et al. 1998, GMÜR & GUGGENHEIM 1994, DAHLEN et al. 1992, McNABB et al. 1992). Wenn ein potenziell pathogenes Bakterium bei Gesunden und Kranken isoliert wird, kann das bedeuten, dass es innerhalb dieser Bakterien-spezies Unterschiede im pathogenen Potenzial gibt und/oder nicht alle Menschen in gleichem Umfang für eine Infektion mit dieser Spezies empfänglich sind (MOMBELLI et al. 2002).

***P. gingivalis* Virulenzvergleiche**

In den letzten Jahren richtete sich das wissenschaftliche Interesse zunehmend auf die Analyse der bakteriellen Mechanismen und Virulenzfaktoren, die eine entzündliche Reaktion des Wirtsorganismus induzieren. Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigten sich im Tierversuch und *in vitro* deutliche Unterschiede hinsichtlich der pathogenen Aktivität unterschiedlicher *P. gingivalis*-Stämme bzw. eine unterschiedliche Expression potenzieller Virulenzfaktoren.

Parodontalerkrankungen sind gekennzeichnet durch einen Attachmentverlust des Zahnes. Inwiefern und nach welchem Muster *P. gingivalis* die Resorption des Alveolarknochens induziert, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. BAKER et al. (2000) zeigten in einem Mausmodell, dass nur bestimmte Stämme dieser Spezies alveolären Knochenverlust induzieren. Darüber hinaus demonstrierten EVANS et al. (1992) unterschiedliche, *P. gingivalis* vermittelte alveoläre Resorptionsmuster. Ein Stamm verursachte eher einen horizontalen, der andere Stamm jedoch eher einen vertikalen Knochenabbau. EBERSOLE et al. (1995) untersuchten im Maus-Abszessmodell die Virulenz ausgewählter *P. gingivalis*-Stämme. Anhand der Grösse der entzündlichen Läsion sowie der Letalität der Versuchstiere konnte eine Rangfolge der Stämme mit absteigendem Virulenzpotenzial erstellt werden.

Auch die Fähigkeit, in unterschiedliche Zellpopulationen (Epithel-, Endothelzellen) zu invadieren oder entzündliche Reaktionen in diesen Zellen zu induzieren, schwankt teilweise erheblich zwischen den untersuchten Stämmen. So zeigten EICK et al. (2002) in einer Analyse mit 15 verschiedenen *P. gingivalis*-Stämmen, dass die verwendeten Stämme sich hinsichtlich Adhärenz, Invasivität und der Induktion der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in dieser Epithelzelllinie unterscheiden. Andere Autoren beobachteten in unterschiedlichen Modellen ähnliche Differenzen (DESHPANDE et al. 1998, DORN et al. 2000, WALTER et al. 2004).

Folgende weitere Hypothesen, die das Vorhandensein potenzieller Pathogene auch beim parodontal Gesunden erklären könnten, werden diskutiert:

a) Parodontalerkrankungen werden durch eine Mischinfektion mit pathogenen Mikroorganismen hervorgerufen. Inwiefern jedoch synergistische oder additive Interaktionen der Spezies die Virulenz einer Spezies oder des gesamten Biofilms beeinflussen, ist bis heute nicht vollständig geklärt und Gegenstand intensiver

Forschung (KESAVALU et al. 1998). Einen Hinweis auf diese möglichen Wechselwirkungen geben auch die Untersuchungen von SOCRANSKY et al. (1998), die bei Vorhandensein von *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* fortgeschrittene parodontale Symptome zeigten.

b) Darüber hinaus wurde postuliert, dass ein Erreger, bevor er die Exazerbation einer parodontalen Erkrankung auslösen kann, zunächst in ausreichender Menge vorliegen muss. So wurden für *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* Schwellenwerte definiert (SOCRANSKY & HAFFAJEE 2003).

c) Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass potenziell pathogene Spezies nicht immer bzw. nur unter bestimmten Bedingungen ihre Virulenzfaktoren exprimieren. Bedingt durch Änderungen in pH-Wert, Temperatur, Nährstoffangebot oder der Populationsdichte kann es zu ständig wechselnden Expressionsmustern kommen und damit zur Ausbildung mehr oder weniger virulenter Varianten innerhalb eines Genotyps (FORNG et al. 2000, GRENIER et al. 2001, KESAVALU et al. 2003). Ob solche Mechanismen zu akuten Exazerbationen parodontaler Erkrankungen führen können, ist bisher jedoch nicht untersucht worden.

d) Diskrepanzen bezüglich der biologischen Effekte von *P. gingivalis* in *in vitro*-Zellkultursystemen sind möglicherweise bedingt durch die Verwendung von unterschiedlichen Zellarten und *P. gingivalis*-Stämmen, aber auch durch eine grosse Varianz in den verwendeten Zellkulturmedien sowie den Anzuchtbedingungen der Mikroorganismen (KHLGATIAN et al. 2002). Hier wäre zur besseren Vergleichbarkeit der Studien eine Standardisierung wünschenswert.

Relevanz der mikrobiologischen Diagnostik für die Klinik

An aggressiven, unbehandelt zu frühzeitigem Zahnverlust führenden Parodontitiden leiden ca. 6–8% einer Population (LÖE et al. 1986, OLIVER et al. 1998). Bei diesen Patienten ist eine alleinige mechanische Therapie («Scaling und Rootplaning») häufig nicht ausreichend. Empfohlen wird in diesen Fällen eine chirurgische oder eine supportive antimikrobielle Intervention. Von klinischer Relevanz ist daher die Unterscheidung der chronischen von der aggressiven Parodontitis. Ist dies anhand mikrobiologischer Parameter möglich?

In einem systematischen Review wird konstatiert, dass das Vorhandensein der potenziellen Pathogene *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *T. forsythia* oder *Campylobacter rectus* eine Unterscheidung dieser parodontalen Krankheitsbilder nicht erlaubt (MOMBELLI et al. 2002). Allerdings sind in dieser Übersicht quantitative Aspekte der mikrobiologischen Diagnostik nicht berücksichtigt worden.

Bestätigt wird diese Analyse durch eine aktuelle Untersuchung von RADEK et al. (2004). In dieser klinischen Studie fanden sich keine wesentlichen qualitativen und quantitativen Unterschiede hinsichtlich der Verteilungsmuster von *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, *T. denticola*, und *P. gingivalis* bei Patienten mit der klinischen Diagnose einer aggressiven bzw. einer chronischen Parodontitis. Die Differenzialdiagnostik erfolgt daher zuverlässiger anhand klinisch-anamnestischer Parameter.

Patienten mit Parodontitis, bei denen eine konservative Parodontaltherapie, bestehend aus subgingivalen Debridement und einer «engmaschigen unterstützenden Parodontaltherapie» (UPT), nicht erfolgreich ist, sind selten. In dieser Patientengruppe schreitet die parodontale Destruktion weiter voran. SOCRANSKY et al. (2002) untersuchten die subgingivalen mikrobiologischen Profile bei solchen refraktären Parodontitiden.

Bei Patienten mit refraktärer Parodontitis wiesen die subgingivalen Proben hinsichtlich der untersuchten Keimarten heterogene Profile auf. Profile mit einem hohen Anteil an Bakterien aus dem roten und orangen Komplex (Abb. 2) wurden zu vier Gruppen zusammengefasst. Ähnliche Profile wurden bei Probanden mit unbehandelter Parodontitis gefunden. Sie waren aber verschieden bei parodontal Gesunden oder älteren Personen mit guter Mundhygiene. Allerdings wurden drei der vier mikrobiellen Profile, die bei Patienten mit refraktärer Parodontitis beobachtet wurden, in Einzelfällen auch bei parodontal Gesunden oder älteren Patienten mit guter Mundhygiene vorgefunden. Patienten mit einer refraktären Parodontitis stellten also bezüglich ihrer subgingivalen Mikroflora keine einheitliche Population dar. Dies könnte bedeuten, dass zur Eliminierung der jeweiligen Mikroflora eine individuelle Therapie gewählt werden muss.

Schlussfolgerung und kritische Beurteilung

Expression von Fimbrien, Lipopolysaccharid (LPS), Kapselproteine und vor allem Proteasen wurden in experimentellen Studien als potenzielle Virulenzfaktoren von *P. gingivalis* identifiziert (SRISATJALUK et al. 1999, NASSAR et al. 2002, OGAWA et al. 2002). Es ist bisher jedoch nur teilweise gelungen, die einzelnen Stämme entsprechend dieser Faktoren zu charakterisieren oder das Vorkommen des einen oder anderen Genotyps mit einem bestimmten parodontalen Krankheitsbild in Verbindung zu bringen (ÖZMERIC et al. 2000). Darüber hinaus besteht über die Rolle dieser Virulenzfaktoren für die Infektion oder die Aktivierung von Zielzellen nach wie vor Unklarheit (HAJISHENGALLIS et al. 2002, WALTER et al. 2004). Um die Pathogenese parodontaler Erkrankungen besser verstehen zu können, sollten auch andere Spezies des subgingivalen Biofilms sowie die Immunantwort des Wirts weiter analysiert werden. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass potenzielle Pathogene hinsichtlich unterschiedlicher Virulenzkapazitäten eine ähnlich inhomogene Gruppe wie *P. gingivalis* darstellen (EBERSOLE et al. 1995, BUENO et al. 1998).

Eine Vielzahl unterschiedlicher Testverfahren stehen heute zur qualitativen und quantitativen mikrobiologischen Diagnostik der Parodontitis zur Verfügung. Bis jetzt sind jedoch diese Verfahren nicht in der Lage, das pathogene Potenzial einer Taschenflora oder die Virulenz einer *P. gingivalis*-Population und anderer potenzieller Pathogene für seinen Wirt präzise zu bestimmen. Der Beitrag einer Spezies zur Entstehung und Progression der Erkrankung ist somit im Einzelfall nach wie vor schwer abschätzbar. Insofern ist der Nutzen eines solchen Nachweises für die Diagnosefindung und Therapieplanung begrenzt. Darüber hinaus können die Diagnosen «refraktäre», «aggressive» und «chronische» Parodontitis anhand mikrobiologischer Tests nicht gestellt werden. Möglicherweise ist in bestimmten Fällen eher die Menge potenzieller Pathogene als das bloße Vorhandensein dieser Spezies entscheidend für die Progression der Erkrankung. Für die Arten *P. gingivalis* oder auch *A. actinomycetemcomitans* wurden Schwellenwerte, die zur Exazerbation einer Parodontitis führen, publiziert (SOCRANSKY & HAFFAJEE 2003). Diese sollten hinsichtlich der kritischen Höhe dieser Keimzahlen bzw. ihrer diagnostischen Bedeutung für den einzelnen Patienten sowie bezüglich ihrer Reproduzierbarkeit in weiteren klinischen Studien untersucht werden.

Da die bisher vorhandenen mikrobiologischen Tests für ihre klinische Relevanz nicht ausreichend validiert sind (SANZ et al. 2004), können auch die vielfach geforderten evidenzbasierten Therapieempfehlungen zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch

nicht gegeben werden. Eine parodontale Untersuchung sollte sich demzufolge in erster Linie auf die Erhebung anamnestischer Angaben (Alter, zahn- und allgemeinmedizinische Vorgeschichte, Gewohnheiten, frühere und bestehende parodontale Probleme etc.), die Inspektion der Mundhöhle und die Analyse klinischer Zeichen parodontaler Erkrankungen (Plaque/Zahnstein/Pus, gingivale Entzündung, Rezessionen etc.) konzentrieren. Eine Sondierung mittels Parodontometer gibt Auskunft über Sondierungstiefen, Entzündungsgrad (BOP/BAS) sowie den tatsächlichen Verlust an Stützgewebe (ATT) eines jedes Zahnhalteapparates (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY 2003). Zu den Standarduntersuchungen gehört heute auch die Anfertigung eines Einzelbilder-Röntgenstatus.

Neben einer Visualisierung der Infektion mit potenziellen Pathogenen zur Motivation des Patienten kann in einigen wenigen Fällen eine mikrobiologische Analyse zur weiteren Diagnostik und Therapieplanung hilfreich sein. Dies betrifft in erster Linie therapieresistente, so genannte «refraktäre Parodontitiden». Möglicherweise sind hier antibiotikaresistente Varianten oder auch eine ungewöhnliche mikrobielle Flora Ursache für weiteren Attachmentverlust. Empfehlenswert wäre in diesen Fällen die Anzucht des gesamten entnommenen Keimspektrums auf geeigneten Nährböden. Wurde bereits eine bisher erfolglose antibiotische Therapie, beispielsweise mit einer Kombination Metronidazol und Amoxicillin (ROONEY et al. 2002) durchgeführt, sollte zudem ein Antibiotogramm erstellt werden.

Ausblick

Mittels molekularbiologischer Methoden wäre es möglich, die Stämme einer Spezies hinsichtlich ihrer genetischen Ausstattung, d.h. möglicher Antibiotikaresistenzen oder unterschiedlicher Virulenzfaktoren, zu differenzieren. In der mikrobiologischen Diagnostik parodontaler Erkrankungen ist dies zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch nicht praktikabel und, wie das folgende Beispiel zeigt, möglicherweise nur in Beziehung zum Wirts-Genotyp sinnvoll.

In diesem Zusammenhang verdient eine Studie von FRANDSEN et al. (2001) besondere Beachtung. Diese Arbeitsgruppe untersuchte 132 *P. gingivalis*-Stämme unterschiedlichen geografischen Ursprungs. Sie zeigten eine nahezu zufällige Verteilung potenzieller *P. gingivalis* Virulenzgene. Das deutet auf ein Überwiegen von horizontalem Gentransfer (non-clonal population structure) gegenüber der natürlichen Mutationsrate (clonal population structure) hin. Bei der Suche nach Merkmalen virulenter Stämme müsste daher auf einzelne Gene bzw. Gen-Gruppen fokussiert werden.

Nachdem unter anderem die Frage aufgeworfen wurde, ob unter den potenziellen *P. gingivalis* Virulenzfaktoren – Fimbrien – eine wichtige Rolle zukommt, wurden diese isoliert und charakterisiert (LEE et al. 1991). Diese sehr dünnen, filamentösen Oberflächenfortsätze dienen zum einen der Adhäsion an zelluläre Oberflächen und Speichelproteine, andererseits kommt ihnen eine wichtige Funktion in der bakteriellen Koaggregation, der Gewebeinvasion sowie der Modulation der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zu (LAMONT & JENKINSON 1998, NASSAR et al. 2002).

Die «grossen Fimbrien» («major fimbriae») können anhand von Unterschieden im *fimA*-Gen, einer Untereinheit dieser Fimbrien, in sechs Typen (I–V und Ib) eingeteilt werden (AMANO et al., 2004). In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob diese Fimbrientypen (*fimA*) mit parodontaler Gesundheit oder Erkrankung in Verbindung gebracht werden können. So wurde in einer asia-

tischen Population eine Assoziation von *P. gingivalis* mit Fimbrien Typ II mit fortgeschrittenen Parodontitiden demonstriert (AMANO et al. 2004). Im Gegensatz dazu jedoch konnte in zwei kaukasischen Untersuchungsgruppen keine Assoziation dieser *P. gingivalis*-Fimbrientypen mit bestimmten parodontalen Krankheitsbildern nachgewiesen werden (BEIKLER et al. 2003, VAN DER PLOEG et al. 2004). Nach den Ergebnissen dieser Studien ist die Rolle von Fimbrien als Virulenzfaktor nach wie vor unklar. Das Prozedere, zunächst einen Virulenzfaktor zu isolieren, dessen Effekte *in-vitro* zu charakterisieren und hinsichtlich der klinischen Relevanz zu überprüfen, scheint, wenn auch zeitintensiv und teuer, viel versprechend zu sein.

Danksagung und Anmerkungen

Die Autoren bedanken sich bei Herrn H. Hecker, Frau F. Kleinmann und Frau E. Kulik für die Durchsicht des Manuskripts sowie bei Herrn H. Eckert für die freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Abbildungen. Diese Arbeit dient zum Teil der Erlangung des akademischen Titels Dr. med. dent. (Universitätsmedizin Charité Berlin, Deutschland) für Herrn Clemens Walter.

Summary

WALTER C, PURUCKER P, BERNIMOULIN J P, SUTTORP N, MEYER J, WEIGER R: **Critical assessment of microbiological diagnostics in periodontal diseases with special focus on *Porphyromonas gingivalis*** (in German). Schweiz Monatsschr Zahnmed 115: 415–424 (2005)

Periodontitis is caused by an opportunistic infection with pathogenic microorganisms of the oral biofilm. In this paper, we discuss the usefulness of microbial diagnostics with respect to the differential diagnosis or the treatment approaches of periodontal diseases. Several diagnostic techniques, based on morphological, enzymatic, cultural, genetic or antigenetic properties have been established to analyze the microbial flora. Among the bacterial species some virulent genotypes of *P. gingivalis* play an important role in the etiology of periodontitis. Expression of fimbriae or different proteases have been identified as potential virulence factors of this gram negative anaerobic rod. To date a characterization of virulence of specific strains or a correlation between expression of different virulence factors and distinct periodontal conditions, however, is missing. Therefore, the importance of a routine identification of *P. gingivalis* still needs further evaluation.

Résumé

La parodontite est une infection opportuniste causée par des microorganismes pathogènes du biofilm dentaire. Le but de cette revue de la littérature était de déterminer l'intérêt d'une analyse microbiologique dans le diagnostic différentiel ainsi que dans la planification thérapeutique en cas de maladie parodontale. Il existe plusieurs approches diagnostiques, basées sur la morphologie bactérienne, sur les caractéristiques enzymatiques et génétiques des microorganismes, ainsi que sur leurs propriétés lors d'une mise en culture. Parmi les nombreuses espèces bactériennes certains génotypes virulents de *Porphyromonas gingivalis* jouent un rôle important dans l'étiologie des maladies parodontales, ce bâtonnet gram négatif anaérobe, l'expression de *fimbriae* ou de différentes protéases ont été identifiées comme facteurs potentiels de virulence. Cependant, il n'est pas encore possible d'établir une corrélation entre les caractéristiques de virulence de souches spécifiques ou entre l'expression de différents facteurs de virulence et des

conditions parodontales précises. Par conséquent, la question de l'utilité d'une identification de routine de *P. gingivalis* reste controversée et nécessite des études supplémentaires.

Literaturverzeichnis

- AMANO A, NAKAGAWA I, OKAHASHI N, HAMADA N: Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. J Periodontol Res 39: 136–142 (2004)
- AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY: Diagnosis of periodontal diseases (position paper). J Periodontol 74: 1237–1247 (2003)
- BAKER P J, DIXON M, EVANS R T, ROOPENIAN D C: Heterogeneity of *Porphyromonas gingivalis* strains in the induction of alveolar bone loss in mice. Oral Microbiol Immunol 15: 27–32 (2000)
- BEIKLER T, PETERS U, PRAJANEH S, PRIOR K, EHMKE B, FLEMMIG T F: Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in Caucasians. Eur J Oral Sci 111: 390–394 (2003)
- BRIEN-SIMPSON N M, VEITH P D, DASHPER S G, REYNOLDS E C: *Porphyromonas gingivalis* gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire. Curr Protein Pept Sci 4: 409–426 (2003)
- BUENO L C, MAYER M P, DIRIENZO J M: Relationship between conversion of localized juvenile periodontitis-susceptible children from health to disease and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin promoter structure. J Periodontol 69: 998–1007 (1998)
- BURDON K L: *Bacterium melanogenicum* from normal and pathogenic tissues. J Infect Dis 42: 161–171 (1928)
- COLLINS J G, WINDLEY H W, III, ARNOLD R R, OFFENBACHER S: Effects of a *Porphyromonas gingivalis* infection on inflammatory mediator response and pregnancy outcome in hamsters. Infect Immun 62: 4356–4361 (1994)
- DAHLEN G, MANJI F, BAEALUM V, FEJERSKOV O: Putative periodontopathogens in «diseased» and «non-diseased» persons exhibiting poor oral hygiene. J Clin Periodontol 19: 35–42 (1992)
- DESHPANDE R G, KHAN M B, GENCO C A: Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun 66: 5337–5343 (1998)
- DORN B R, BURKS J N, SEIFERT K N, PROGULSKE-FOX A: Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett 187: 139–144 (2000)
- EBERSOLE J L, KESAVALU L, SCHNEIDER S L, MACHEN R L, HOLT S C: Comparative virulence of periodontopathogens in a mouse abscess model. Oral Dis 1: 115–128 (1995)
- EICK S, RODEL J, EINAX J W, PFISTER W: Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. Oral Microbiol Immunol 17: 201–208 (2002)
- EVANS R T, KLAUSEN B, RAMAMURTHY N S, GOLUB L M, SFINTESCU C, GENCO R J: Periodontopathic potential of two strains of *Porphyromonas gingivalis* in gnotobiotic rats. Arch Oral Biol 37: 813–819 (1992)
- EZZO P J, CUTLER C W: Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. Periodontol 2000 32: 24–35 (2003)
- FORNG R Y, CHAMPAGNE C, SIMPSON W, GENCO C A: Environmental cues and gene expression in *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Oral Dis 6: 351–365 (2000)
- FRANDSEN E V G, POULSEN K, CURTIS M A, KILIAN M: Evidence of recombination in *Porphyromonas gingivalis* and random distribution of putative virulence markers. Infect Immun 69: 4479–4485 (2001)
- GEMMELL E, POLAK B, REINHARDT R A, ECCLESTON J, SEYMOUR G J: Antibody responses of *Porphyromonas gingivalis* infected gingivitis and periodontitis subjects. Oral Dis 1: 63–69 (1995)

- GMÜR R, GUGGENHEIM B: Interdental supragingival plaque – a natural habitat of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, and *Prevotella nigrescens*. *J Dent Res* 73: 1421–1428 (1994).
- GRENIER D, GOULET V, MAYRAND D: The capacity of *Porphyromonas gingivalis* to multiply under iron-limiting conditions correlates with its pathogenicity in an animal model. *J Dent Res* 80: 1678–1682 (2001)
- GRIFFEN A L, BECKER M R, LYONS S R, MOESCHBERGER M L, LEYS E J: Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol* 36: 3239–3242 (1998)
- HAFFAJEE A D, SOCRANSKY S S: Effect of sampling strategy on the false-negative rate for detection of selected subgingival species. *Oral Microbiol Immunol* 7: 57–59 (1992)
- HAIJSHENGALLIS G, MARTIN M, SCHIFFERLE R E, GENCO R J: Counteracting interactions between lipopolysaccharide molecules with differential activation of toll-like receptors. *Infect Immun* 70: 6658–6664 (2002)
- HOLT S C, KESAVALU L, WALKER S, GENCO C A: Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 20: 168–238 (1999)
- KAZOR C E, MITCHELL P M, LEE A M, STOKES L N, LOESCHE W J, DEWHIRST F E, PASTER B J: Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol* 41: 558–563 (2003)
- KE D, MENARD C, PICARD F J, BOISSINOT M, OUELLETTE M, ROY P H, BERGERON M G: Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci. *Clin Chem* 46: 324–331 (2000)
- KESAVALU L, HOLT S C, EBERSOLE J L: Virulence of a polymicrobial complex, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*, in a murine model. *Oral Microbiol Immunol* 13: 373–377 (1998)
- KESAVALU L, HOLT S C, EBERSOLE J L: In vitro environmental regulation of *Porphyromonas gingivalis* growth and virulence. *Oral Microbiol Immunol* 18: 226–233 (2003)
- KHLGATIAN M, NASSAR H, CHOU H H, GIBSON F C, III, GENCO C A: Fimbria-dependent activation of cell adhesion molecule expression in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. *Infect Immun* 70: 257–267 (2002)
- KIEL R A, LANG N P: Effect of subgingival sampling techniques on periodontal microbiological culturing. *J Dent Res* 62: 247 (1983)
- KINANE D F, HART T C: Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 14: 430–449 (2003)
- KINANE D F, LAPPIN D F: Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand* 59: 154–160 (2001)
- KITCH T T, APPELBAUM P C: Accuracy and reproducibility of the 4-hour ATB 32A method for anaerobe identification. *J Clin Microbiol* 27: 2509–2513 (1989)
- LAMONT R J, JENKINSON H F: Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 1244–1263 (1998)
- LAU L, SANZ M, HERRERA D, MORILLO J M, MARTIN C, SILVA A: Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 31: 1061–1069 (2004)
- LEE J Y, SOJAR H T, BEDI G S, GENCO R J: *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriillin: size, amino-terminal sequence, and antigenic heterogeneity. *Infect Immun* 59:3 83–389 (1991)
- LÖE 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* 13: 431–445 (1986)
- LOESCHE W J, BRETZ W A, KERSCHENSTEINER D, STOLL J, SOCRANSKY S S, HUJOEL P, LOPATIN D E: Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoyl-DL-arginine-naphthylamide. *J Clin Microbiol* 28: 1551–1559 (1990)
- MADIANOS P N, PAPAPANOU P N, NANNMARK U, DAHLEN G, SANDROS J: *Porphyromonas gingivalis* FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro. *Infect Immun* 64: 660–664 (1996)
- MCNABB H, MOMBELLI A, GMUR R, MATHEY-DINC S, LANG N P: Periodontal pathogens in the shallow pockets of immigrants from developing countries. *Oral Microbiol Immunol* 7: 267–272 (1992)
- MIKSITS K, GROSSGEBAUER K, HAHN H: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag, Berlin (1992)
- MOMBELLI A: Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications. *Oral Dis* 9 Suppl 1: 6–10 (2003)
- MOMBELLI A, CASAGNI F, MADIANOS P N: Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* 29 Suppl 3: 10–21 (2002)
- MOORE W E, MOORE L V: The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5: 66–77 (1994)
- NASSAR H, CHOU H H, KHLGATIAN M, GIBSON F C, III, VAN DYKE T E, GENCO C A: Role of fimbriae and lysine-specific cysteine proteinase gingipain K in expression of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. *Infect Immun* 70: 268–276 (2002)
- OGAWA T, ASAI Y, HASHIMOTO M, TAKEUCHI O, KURITA T, YOSHIKAI Y, MIYAKE K, AKIRA S: Cell activation by *Porphyromonas gingivalis* lipid A molecule through Toll-like receptor 4- and myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway. *Int Immunol* 14: 1325–1332 (2002)
- OGAWA T, UCHIDA H, AMINO K: Immunobiological activities of chemically defined lipid A from lipopolysaccharides of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology* 140 (Pt 5): 1209–1216 (1994)
- OLIVER R C, BROWN L J, LOE H: Periodontal diseases in the United States population. *J Periodontol* 69: 269–278 (1998)
- ÖZMERIC N, PREUS N R, OLSEN I: Genetic diversity of *Porphyromonas gingivalis* and its possible importance to pathogenicity. *Acta Odontol Scand* 58: 183–187 (2000)
- PAGE R C, SCHROEDER H E: Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest* 34: 235–249 (1976)
- PAGE R C, OFFENBACHER S, SCHROEDER H E, SEYMOUR G J, KORNMAN K S: Advances in the pathogenesis of periodontitis: a summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000 14: 216–248 (1997)
- PURUCKER P: Microbiology of periodontitis. 2. Microbiological diagnosis of periodontitis. *Parodontol* 2: 287–298 (1991)
- RADEK M, OBST CH, KRIGAR D, EICKHOLZ P, KIM T S: Charakterisierung der subgingivalen Mikroflora bei aggressiver und schwerer chronischer Parodontitis. *Parodontologie* 15/3: 273–317 (2004)
- ROONEY J, WADE W G, SPRAGUE S V, NEWCOMBE R G, ADDY M: Adjunctive effects to non-surgical periodontal therapy of systemic metronidazol and amoxicillin alone and combined. *J Clin Periodontol* 29: 342–350 (2002)
- SANZ M, LAU L, HERRERA D, MORILLO J M, SILVA A: Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyrom-*

- onas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol* 31: 1034–1047 (2004)
- SCHÄTZLE M, LÖE H, BURGIN W, ANERUD A, BOYSEN H, LANG N P: Clinical course of chronic periodontitis. I. Role of gingivitis. *J Clin Periodontol* 30: 887–901 (2003)
- SLOTS J: Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. *J Clin Periodontol* 13: 912–917 (1986)
- SLOTS J & RAMS T E: Microbiology of periodontal disease. In: Slots J & Taubman M, eds.: *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. St. Louis: Mosby-Year Book: 428ff (1992)
- SOCRANSKY S S: Criteria for the infectious agents in dental caries and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 6: 16–21 (1979)
- SOCRANSKY S S, HAFFAJEE A D, CUGINI M A, SMITH C, KENT R L, JR.: Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25: 134–144 (1998)
- SOCRANSKY S S, SMITH C, HAFFAJEE A D: Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 29: 260–268 (2002)
- SOCRANSKY S S, HAFFAJEE A D: Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 28: 12–55 (2002)
- SOCRANSKY S S, HAFFAJEE A D: Microbiology of periodontal disease. In: Lindhe J, Karring T, Lang N P, eds. *Clinical periodontology and Implant dentistry*. Copenhagen: Munksgaard: 106–1149 (2003)
- SRISATJALUK R, DOYLE R J, JUSTUS D E: Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* inhibit IFN-gamma-mediated MHC class II expression by human vascular endothelial cells. *Microb Pathog* 27: 81–91 (1999)
- SUNDE P T, OLSEN I, GÖBEL U B, THEEGARTEN D, WINTER S, DEBELIAN G J, TRONSTAD L, MOTER A: Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. *Microbiology* 149: 1095–1102 (2003)
- TANNER A C, GOODSON J M: Sampling of microorganisms associated with periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 1: 15–22 (1986)
- THEILADE E: The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 13: 905–911 (1986)
- THEILADE E, WRIGHT W H, JENSEN S B, LOE H: Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontol Res* 1: 1–13 (1966)
- VAN DER PLOEG J R, GIERTSEN E, LÜDIN B, MÖRGLI C, ZINKERNAGEL A S, GMÜR R: Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in dental plaque. *FEMS Microbiol Lett* 232: 31–37 (2004)
- WALTER C, ZAHLTEN J, SCHMECK B, SCHAUDINN C, HIPPENSTIEL S, FRISCH E, HOCKE A C, PISCHON N, KURAMITSU H K, BERNIMOULIN J-P, SUTTORP N, KRÜLL M: *Porphyromonas gingivalis* strain dependent activation of human endothelial cells. *Infect Immun* 72: 5910–5918 (2004)
- YANG H W, ASIKAINEN S, DOGAN B, SUDA R, LAI C H: Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *J Periodontol* 75: 592–599 (2004)
- ZAMBON J J: *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 12: 1–20 (1985)