

K.-L. Ackermann, N. Reichenbach, H. Lorenz, R. Roessler

# Mikrobiologische und genetische Diagnostik als erweiterte Risikoprofile

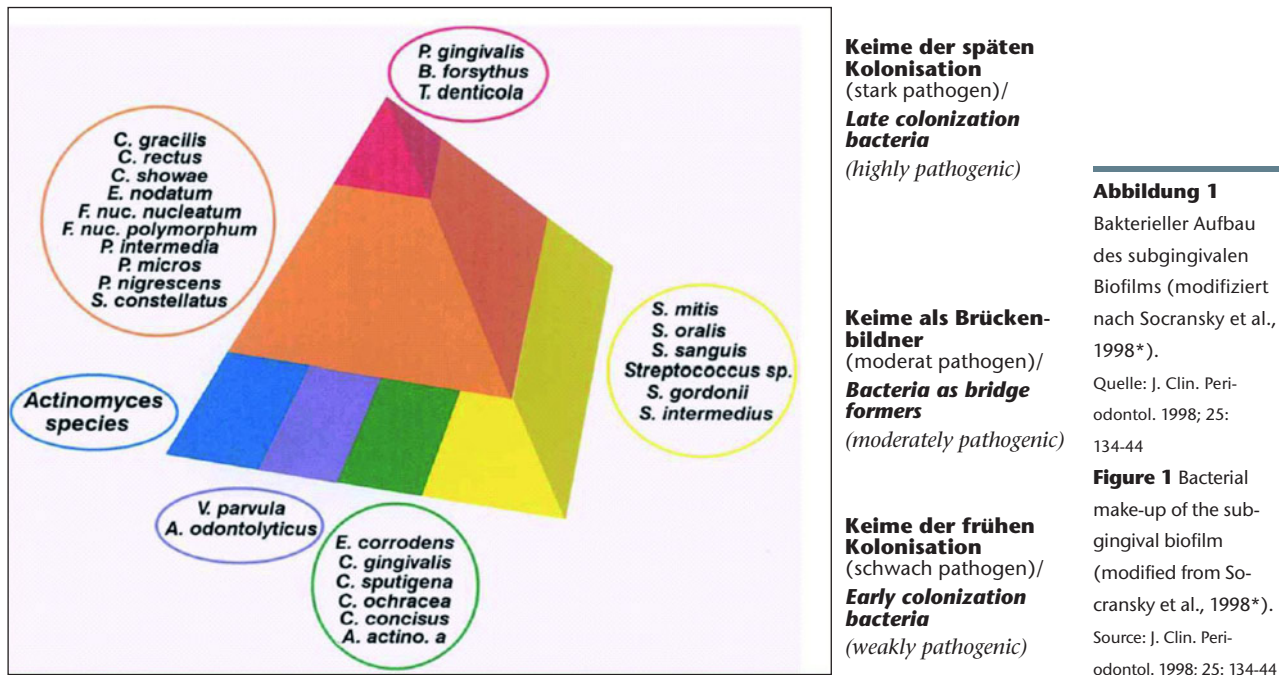
## *Microbiological and genetical diagnostics for advanced risk profiles*

Orale Biofilme sind Beläge im Mund, in denen verschiedene Organismen in einer Matrix von extrazellulären polymeren Substanzen eingebettet sind und synergistisch zusammenleben. Bei Störungen des „oralen“ Ökosystems vermehren sich vor allem die Bakterien, die Sauerstoff nur bedingt oder nicht tolerieren, wodurch eine Infektionserkrankung, die Parodontitis oder bei Implantaten die Periimplantitis, entstehen kann. Neben den konventionellen Diagnoseverfahren ist die mikrobiologische Diagnostik für die Beurteilung der Erkrankung und für therapeutische Entscheidungen ein wichtiger Bestandteil, wenn neben der Standardtherapie eine Indikation zur systemischen adjuvanten Antibiotikagabe besteht. Zur Bestimmung aktuell vorhandener Erreger stehen heute molekularbiologische Methoden als zuverlässige Diagnostikverfahren zum Nachweis parodontopathogener Keime zur Verfügung. Mehrheitlich erfolgt der Bakteriennachweis auf DNA-Ebene. Eine bedeutende Rolle spielt die genetische Komponente im Krankheitsverlauf, weshalb eine Evaluation der Interleukinpolymorphismen sinnvoll erscheint. Aktuelle Studienergebnisse zum Nachweis der aktiven Matrix-Metalloproteinase-8 (aMMP-8) deuten darauf hin, dass es im Sinne einer erweiterten PA-Diagnostik möglich ist zu erkennen, ob ein Gewebe biologisch gesund ist oder ob eine aktive Phase eines kollagenolytischen Gewebeabbaus vorliegt.

*Schlüsselwörter:* Biofilm; Parodontitis; Periimplantitis; Interleukin-1; aMMP-8; Markerkeime

Oral biofilms are deposits in the mouth in which various organisms are embedded in a matrix of extracellular polymer substances where they live together synergistically. Disturbances of the "oral" ecosystem are accompanied by proliferation primarily of bacteria that are intolerant or not readily tolerant of oxygen, which can lead to periodontitis or – in the case of implants – periimplantitis. In addition to conventional diagnostic methods, microbiological diagnostics are an important element in the assessment of the disease and in therapeutic decision-making when adjuvant systemic antibiotics are indicated alongside standard therapy. For identification of the causative microorganisms, we now have at our disposal molecular biological techniques as reliable diagnostic methods for the detection of periodontal pathogens. In the majority of cases, bacteria are detected at the DNA level. A key role is played by the genetic component of the clinical picture, which suggests that evaluation of interleukin polymorphism would be a good approach. Findings from recent studies on the detection of active matrix metalloproteinase-8 (aMMP-8) suggest that it is possible to identify – in the sense of expanded PA diagnostics – whether a tissue is biologically healthy or if collagenolytic tissue breakdown is actively occurring.

*Keywords:* Biofilm; periodontitis; periimplantitis; interleukin-1; aMMP-8; marker bacteria



\*Socransky, S. S.; Haffajee, A. D.; Cugini, M. A.; Smith, C. & Kent, R. L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. J. Clin. Periodontol., 25:134-44, 1998.

Orale Biofilme sind Beläge im Mund, in denen verschiedene Organismen in einer Matrix von extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingebettet sind und synergistisch zusammenleben [3]. Sobald eine gesäuberte Oberfläche mit Speichel in Kontakt kommt, bildet sich innerhalb kurzer Zeit ein Schmelzhäutchen (erworbenes Pellikel) aus Glykoproteinen und Antikörpern des Speichels. Dieses hydrophile viskoelastische Gel, hauptsächlich bestehend aus fadenartigen MG1-Muzinen, bildet eine 0,7–2 µm dicke Schutzschicht über den Schmelz. Bakterien wie auch Zahnoberflächen sind negativ elektrisch geladen. Die Bakterien überwinden diese elektrostatischen Kräfte durch Protonen und Kationen, um sich an der Zahnoberfläche anzuheften. Die Adhäsion der Bakterien an Zahnoberflächen erfolgt spezifisch durch lektinartige Adhäsine (Proteine, die die Kohlenhydratstruktur des Pellikels erkennen) oder hydrophobe Adhäsine (Erkennung über Rezeptormoleküle), die ebenfalls elektrostatische Kräfte überwinden können [10]. Das Pellikel ändert die Oberflächenenergie und die Ladung des Schmelzes. Darüber hinaus bildet das Pellikel die Grundlage für eine weitere Besiedlung der Zahnoberfläche. Die Mehrzahl der Bakterien, die sich in vorderster Front an das Pellikel anheften, ist bereits tot. Daran docken weitere Bakterien an und vermehren sich. Die primäre Kolonisation erfolgt durch fakultativ anaerobe grampositive Bakterien, vor allem Streptokokken (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*) und Actinomyceten (*Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*) [3].

Eine Matrix aus Kapselpolysacchariden und Glykokalix, die von vielen Streptokokken sezerniert wird, umgibt die Bakteriengemeinschaft und schützt sie vor äußeren Einflüssen und gegen Biozide (Abb. 1). Außerdem wirkt die extrazelluläre polymere Matrix als Trägersubstanz für Nährstoffe, hält Exoenzyme zurück und hat eine in sich geschlossene Funktion als eine Art Recycling-system für Zellbestandteile und Nährstoffe. Der Anteil der anaeroben Bakterien nimmt stetig zu. Zwischen den verschiedenen Bakterien bestehen vielfältige Nahrungsketten. Deshalb organi-

Oral biofilms are deposits in the mouth in which various organisms are embedded in a matrix of extracellular polymer substances (EPS) where they live together synergistically [3]. As soon as a cleaned surface comes in contact with saliva, an acquired pellicle forms on the enamel, consisting of glycoproteins and antibodies from the saliva. This hydrophilic viscoelastic gel, consisting mainly of filamentous MG1 mucins, forms a protective layer of 0.7–2 µm over the enamel. Both bacteria and tooth surfaces have a negative electric charge. The bacteria overcome these electrostatic forces by means of protons and cations in order to adhere to the tooth surface. Bacterial adhesion to tooth surfaces takes place through specific lectin-like adhesins (proteins that recognize the carbohydrate structure of the pellicle) or hydrophobic adhesins (recognition through receptor molecules), which can likewise overcome electrostatic forces [10]. The pellicle alters the surface energy and the charge of the enamel. Moreover, the pellicle forms the foundation for further colonization of the tooth surface. The majority of bacteria adhering to the pellicle at the forefront are already dead. Further bacteria dock onto this and multiply. Primary colonization is by facultative anaerobic gram-positive bacteria, especially streptococci (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*) and actinomycetes (*Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*) [3].

A matrix of capsule polysaccharides and glycocalyx, which is secreted by many streptococci, surrounds the bacterial colony and protects it from external influences and biocides (Fig. 1). Moreover, the extracellular polymer matrix acts as a carrier for nutrients, holds back exo-enzymes and functions as a kind of closed recycling system for cell components and nutrients. The proportion of anaerobic bacteria increases steadily. There are diverse food chains between the different bacteria. The microorganisms are therefore organized into a highly complex *biofilm* and communicate through a specific circulation system. This information exchange by the bacterial cells is called

Therapierbarkeit/ <i>Treatability</i>  Erreichbare Wirkstoffkonzentration in Gingivalflüssigkeit/ <i>Achievable drug concentration in gingival fluid</i>  +: zehnfache MHK; ++: 100-fache MHK/ +: <i>ten times MIC</i> ; ++: <i>100 times MIC</i>  Spezies/ <i>Species</i>	Antibiotikum / <i>Antibiotic</i>							
	Amoxi- cillin	Metro- nidazol	Cipro- floxacin	Doxy- cyclin	Tetra- zyklin	Clinda- mycin	Metron. + Amox.	Metron. + Cipro.
Aggregatibac. actinomycetemcomitans (A.a.)	+		+		+		+	+
Porphyromonas gingivalis (P.g.)	++	+			+		++	+
Tannerella forsythia (T.f.)	+	++		+	+	++	++	+
früher: Bacteroides forsythus (B.f.)								
Prevotella intermedia (P.i.)		+					+	+
Treponema denticola (T.d.)								
Campylobacter rectus (C.r.)								
Fusobacterium nucleatum (F.n.)								
Peptostreptococcus micros (P.m.)								
Eikenella corrodens (E.c.)			+	+				+
Selemonas species (S.ssp.)								
Streptococcus intermedius (S.i.)								
Prevotella nigrescens (P.n.)		++				+	++	++

Tabelle 1 Antibiotikakonzentrationen in der Gingivalflüssigkeit bei systemischer Verabreichung. Quelle: Wiss. Stellungnahme der DGZMK 2003

**Table 1** Antibiotic concentrations in the gingival fluid after systemic administration. Source: Scientific opinion of the DGZMK [German Society of Dental, Oral and Craniomandibular Sciences] 2003

sieren sich die Mikroorganismen zu einem hochkomplexen *Biofilm* und kommunizieren über ein spezifisches Zirkulationssystem. Dieser Informationsaustausch der Bakterienzellen wird *Quorum sensing* genannt [4]. Der Biofilm, in dem Bakterien zu hoch organisierten Strukturen heranwachsen können, ist 1000-mal resistenter gegen Medikamente und die Immunabwehr als in planktonischer Form. Ein Grund für die erhöhte Resistenz der Keime, z. B. gegen Antibiotika, ist gerade die Polysaccharidmatrix, die die Keime wie ein Schutzfilm umgibt. Nur bedingt können Antibiotika durch diese Matrix hindurch diffundieren, so dass die minimale Hemmkonzentration nicht so leicht erreicht werden kann, als wenn sie in planktonischer Form vorliegen (Tab. 1). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass innerhalb des Biofilms die Übertragung von Virulenzfaktoren durch Gentransfer erfolgt, so dass ein avirulenter Keim virulent werden kann oder ein nicht resistenter Keim gegen ein Antibiotikum resistent wird. Im subgingivalen Biofilm wurden bisher bis zu 500 verschiedene Keimspezies nachgewiesen, von denen jedoch nicht alle gleich pathogen sind [4]. Die wichtigsten sind: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* und *Prevotella nigrescens*.

Bei Störungen des „oralen“ Ökosystems vermehren sich vor allem die Bakterien, die Sauerstoff nur bedingt oder nicht tolerieren (fakultative oder strikte Anaerobier). Folge ist eine Infektionserkrankung: die *Parodontitis* (Tab. 2) oder bei Implantaten die *Periimplantitis*. Sie führt, beeinflusst durch die Abgabe von Toxinen, zur Schädigung des Zahnhalteapparates bis zum Totalverlust der Zähne oder Implantate.

*quorum sensing* [4]. The biofilm, in which bacteria can grow into highly organized structures, is 1000 times more resistant to medications and the immune response than in plankton form. One reason for the increased resistance of the bacteria, for example against antibiotics, is the polysaccharide matrix itself, which surrounds the bacteria like a protective film. Diffusion of antibiotics through this matrix is limited so that the minimum inhibitory concentration cannot be reached as easily as when the bacteria are present in plankton form (Table 1). It is also possible that transmission of virulence factors by gene transfer is enabled within the biofilm so that an avirulent microorganism can become virulent or a nonresistant microorganism becomes resistant to an antibiotic. Up to 500 different bacterial species have so far been detected in the subgingival biofilm, though not all of these are equally pathogenic [4]. The most important are: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*.

Disturbances of the “oral” ecosystem are accompanied by proliferation primarily of bacteria that are intolerant or not readily tolerant of oxygen (facultative or strict anaerobes). The result is an infectious disease, namely *periodontitis* (Table 2) or – in the case of implants – *periimplantitis*. Influenced by the release of toxins, it leads to damage to the periodontal ligament and can result in total loss of the teeth or implants.

According to Socransky four factors have to come together in order to provoke or maintain periodontal processes: a host with inadequate oral hygiene and thus a favorable local en-

Spezies/Species	Bedeutung/Importance
<b>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</b> (A.a.)	+++
<b>Porphyromonas gingivalis</b> (P.g.)	+++
<b>Tannerella forsythia</b> (T.f.) früher/formerly: <i>Bacteroides forsythus</i> (B.f.)	++(+)
<b>Prevotella intermedia</b> (P.i., als sog. „Frühmarker“/as so-called “early marker”)	++
<b>Treponema denticola</b> (T.d.)	+(+)
<b>Campylobacter rectus</b> (C.r.)	+(+)
<b>Fusobacterium nucleatum</b> (F.n.)	+(+)
<b>Peptostreptococcus micros</b> (P.m.)	+(+)
<b>Eikenella corrodens</b> (E.c.)	+(+)
<b>Selemonas species</b> (S. ssp.)	+
<b>Streptococcus intermedius</b> (S.i.)	+

**Tabelle 2** Parodontitisassoziierte Bakterien.

Quelle: Compend Contin Educ Dent 1997, 18(9):  
 861-4, 866-7, 871-2 passim; quiz 87

**Table 2** Bacteria associated with periodontitis.

Source: Compend.Contin.Educ.Dent. 1997, 18(9):  
 861-4, 866-7, 871-2 passim; quiz 87

Gemäß *Socransky* müssen vier Faktoren zusammenkommen, um parodontale Prozesse zu provozieren oder aufrechtzuhalten: ein Wirt mit insuffizienter Mundhygiene und damit ein günstiges lokales Umfeld, ein defizitäres Immunsystem, eine erhöhte Anzahl von pathogenen Bakterien sowie eine reduzierte Anzahl „nichtpathogener“ Arten von Keimen. Der bakterielle Faktor spielt folglich eine entscheidende Rolle in der Krankheitsentstehung und hat den großen Vorteil, dass er „messbar“ und somit für die therapeutische Planung verwertbar ist [1, 2].

Daher ist die *mikrobiologische Diagnostik* für die Beurteilung der Erkrankung und die therapeutische Entscheidung ein wichtiger Bestandteil, wenn neben der Standardtherapie eine Indikation zur systemischen adjuvanten Antibiotikagabe besteht [5, 9, 14].

## Indikationen der Antibiotikatherapie

Für die unterstützende systemische Antibiotikagabe zur Therapie von Parodontitiden soll eine niedrige Risiko- und günstige Kosten-Nutzen-Relation gewahrt bleiben. Deshalb beschränkt sich die Indikation zur unterstützenden Antibiotikatherapie in der Regel nur auf folgende Erkrankungen:

- aggressive Parodontitis (AAP, 2001)
- schwere chronische Parodontitis
- Parodontitiden, die trotz vorangegangener Therapie progrediente Attachment-Verluste aufweisen (AAP, 2001)
- Parodontalabszess mit Tendenz zur Ausbreitung in die benachbarten Logen, Fieber und/oder ausgeprägter Lymphadenopathie (AAP, 2001, Dahlen, 2002)
- nekrotisierende ulzerierende Gingivitis oder Parodontitis mit ausgeprägter Allgemeinsymptomatik (Fieber und/oder ausgeprägte Lymphadenopathie) (AAP, 2001)
- mittelschwere bis schwere Parodontitis bei systemischen Erkrankungen oder Zuständen, die die Funktion des Immunsystems beeinträchtigen. Hierbei ist besonders auf eine potenzielle antibiotika-induzierte Superinfektion durch andere Erreger, z. B. *Candida*, zu achten (AAP, 2001)

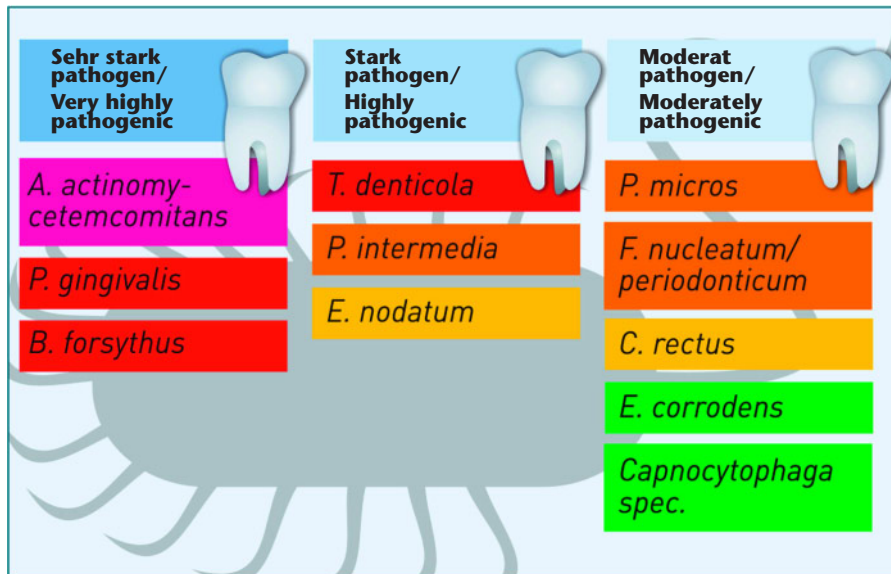
environment, a defective immune system, an increased number of pathogenic bacteria and a reduced number of “nonpathogenic” species of microorganisms. This demonstrates that the bacterial factor plays a crucial part in the development of the disease and has the great advantage of being “measurable” so that it can be utilized for planning therapy [1, 2].

*Microbiological diagnostics* are therefore an important element in the assessment of the disease and in therapeutic decision-making when adjuvant systemic antibiotics are indicated alongside standard therapy [5, 9, 14].

## Indications for antibiotic therapy

Supportive systemic antibiotic therapy of periodontitis should be low-risk and cost-effective. Antibiotic therapy is therefore usually limited to the following diseases only:

- aggressive periodontitis (AAP, 2001)
- severe chronic periodontitis
- periodontitis that demonstrates progressive loss of attachment despite previous therapy (AAP, 2001)
- periodontal abscess with a tendency to spread into the neighboring compartments, fever and/or marked lymphadenopathy (AAP, 2001, Dahlen, 2002)
- necrotizing ulcerating gingivitis or periodontitis with marked general symptoms (fever and/or marked lymphadenopathy) (AAP, 2001)
- moderate to severe periodontitis with systemic diseases or conditions that impair the function of the immune system. In particular, the potential for antibiotic-induced superinfection by other pathogens, e.g. *Candida*, should be noted (AAP, 2001)



**Abbildung 2** Elf Markerkeime nach Slots et al.

Quelle: Compend Contin Educ Dent 1997, 18(9): 861-4, 866-7, 871-2 passim; quiz 87  
**Figure 2** Eleven marker bacteria according to Slots et al.

Source: Compend Contin Educ Dent 1997, 18(9): 861-4, 866-7, 871-2 passim; quiz 87

Im Laufe der Zeit haben molekularbiologische Methoden die Kulturmethode als Standardverfahren für den Nachweis parodontopathogener Bakterien abgelöst. Mindestforderung an die Diagnostik ist es, semiquantitative Ergebnisse zur Keimbelastung mit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sowie *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* und *Tannerella forsythia* zu liefern. Wünschenswert wären die von Slots et al. definierten elf „Markerkeime“ (Abb. 2) [14].

Molecular biological techniques have now become standard diagnostic methods for the detection of periodontal pathogens. Providing semiquantitative results for the levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* along with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* is the minimum diagnostics requirement. The eleven “marker bacteria” defined by Slots et al. would be desirable (Fig. 2) [14].

### Probenentnahme der subgingivalen Plaque

Es existieren zwei allgemein verwendete Techniken zur Gewinnung von dentaler Plaque. Eine Kürette kann zur Entnahme des Biofilms verwendet werden. Das ist hilfreich zur Gewinnung supragingivaler Plaque, hat aber Nachteile für die subgingivale Plaque, denn mit dieser Methode wird Plaque nur maximal bis zu einer Sondierungstiefe von 6 mm entnommen. Mehrheitlich wird für die Gewinnung subgingivaler Plaque die Verwendung von endodontischen Papierspitzen empfohlen. Sterile endodontische Papierspitzen werden bis zum Taschenfundus vorgeschoben und verbleiben dort 10–30 Sekunden (Abb. 3). Danach werden sie entnommen und in ein entsprechendes Labor versandt. Im Allgemeinen erfolgt der Versand

### Obtaining samples of subgingival plaque

There are two generally employed techniques for obtaining dental plaque. A curette can be used to remove the biofilm. This is useful for obtaining supragingival plaque but has disadvantages for subgingival plaque, as this method allows removal of plaque only from a probing depth of up to 6 mm. The use of endodontic paper tips is mostly recommended for obtaining subgingival plaque. Sterile endodontic paper tips are advanced as far as the bottom of the pocket, where they remain for 10–30 seconds (Fig. 3). They are then removed and sent to a suitable laboratory. They are usually sent dry but for culture they should be sent in an appropriate transport medium, which is provided by the majority of laboratories.

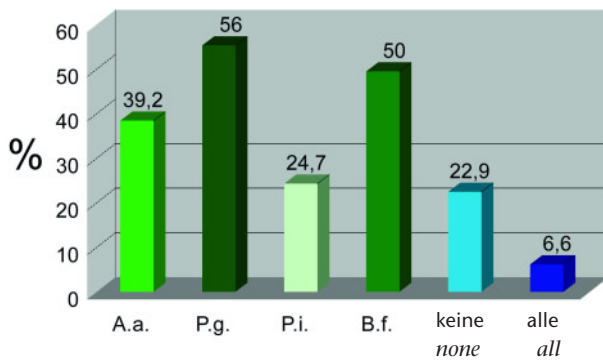


**Abbildung 3** Probenentnahme subgingivaler Plaque.

Quelle: Praxis Dr. Kirsch/Dr. Ackermann, Filderstadt

**Figure 3** Collection of subgingival plaque samples.

Source: Practice of Dr. Kirsch/Dr. Ackermann, Filderstadt



**Abbildung 4** Häufigkeit des Nachweises der Erreger.

Quelle: Pia-Merete Jervøe-Storm: Parodontitis – Diagnostik und Therapie  
[http://www.spitta.de/Produktfamilien/Fachinformationen/Parodontologie/81\\_index+M55f3a674cf2.html](http://www.spitta.de/Produktfamilien/Fachinformationen/Parodontologie/81_index+M55f3a674cf2.html)

**Figure 4** Detection frequency of causative microorganisms.

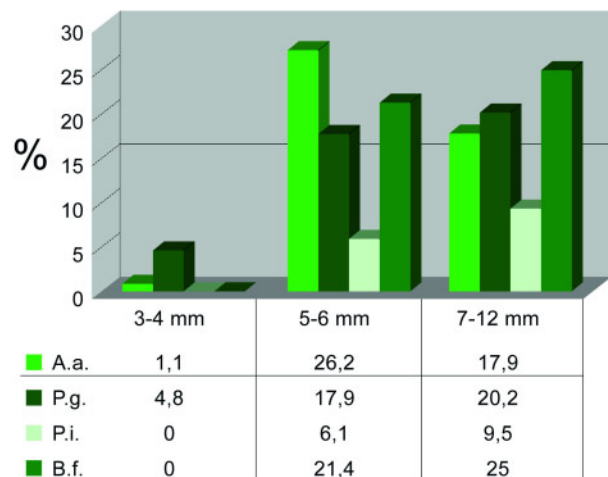
Source: Pia-Merete Jervøe-Storm: Parodontitis – Diagnostik und Therapie  
[http://www.spitta.de/Produktfamilien/Fachinformationen/Parodontologie/81\\_index+M55f3a674cf2.html](http://www.spitta.de/Produktfamilien/Fachinformationen/Parodontologie/81_index+M55f3a674cf2.html)

trocken, nur bei Anwendung der Kulturtechnik sollte der Versand in einem entsprechenden Transportmedium erfolgen, als im Allgemeinen vom Labor zur Verfügung gestellt wird.

Die Frage, ob supragingivale Plaque zuvor entfernt werden soll, lässt sich nicht eindeutig beantworten. Einerseits können Bakterienspezies, die sich nur im oberen bzw. mittleren Drittel einer Tasche befinden, teilweise mit entfernt werden, andererseits ist bei Belassen der supragingivalen Plaque die Menge der nicht parodontopathogenen Bakterien, die mit dem Nachweis der relevanten Bakterien interferieren, sehr groß (Abb. 4). Da die mikrobiologische Diagnostik vor allem im Hinblick auf eine systemische Antibiotikatherapie durchgeführt wird, ist das Poolen von Proben Grundvoraussetzung. Es ist weniger die Keimbelastung einer einzelnen Tasche von Interesse als vielmehr die Gesamtzahl der jeweiligen Mikroorganismen in allen tiefen Taschen (Abb. 5). Es können zum einen aus jeder tiefsten Tasche eines Quadranten die Proben entnommen werden, oder aber es werden alle Taschen ab einer bestimmten Sondierungstiefe erfasst. Bei „mikrobiologischer“ Therapiekontrolle sollten zur Vergleichbarkeit die Proben an den gleichen Stellen wie zur Ausgangsuntersuchung entnommen werden.

### Nachweis parodontopathogener Bakterien

Die Quantität und Qualität der diagnostizierten Erreger, deren Kombination sowie das klinische Bild sind die richtungweisenden Faktoren für die Entscheidung über die notwendigen und Erfolg versprechenden Therapiemaßnahmen. Die chemischen und physikalischen Methoden der zahnärztlichen Behandlung sorgen für die Beseitigung der Erreger, die sich in



**Abbildung 5** Abhängigkeit zwischen nachgewiesenen Keimen und Sondierungstiefen.

Quelle: Pia-Merete Jervøe-Storm: Parodontitis – Diagnostik und Therapie; [http://www.spitta.de/Produktfamilien/Fachinformationen/Parodontologie/81\\_index+M55f3a674cf2.html](http://www.spitta.de/Produktfamilien/Fachinformationen/Parodontologie/81_index+M55f3a674cf2.html)

**Figure 5** Relationship between the bacteria detected and probing depth.

Source: Pia-Merete Jervøe-Storm: Parodontitis – Diagnostik und Therapie  
[http://www.spitta.de/Produktfamilien/Fachinformationen/Parodontologie/81\\_index+M55f3a674cf2.html](http://www.spitta.de/Produktfamilien/Fachinformationen/Parodontologie/81_index+M55f3a674cf2.html)

Whether supragingival plaque should be removed beforehand cannot be answered with certainty. On the one hand, bacterial species located only in the upper or middle third of a pocket are partially removed at the same time, but on the other hand, when the supragingival plaque is left, the quantity of non-periodontal pathogens that interfere with detection of the relevant bacteria is very large (Fig. 4). Since microbiological diagnostics are performed mainly with a view to systemic antibiotic therapy, sample pooling is a fundamental requirement. The bacterial level in an individual pocket is less of interest than the total number of the respective microorganisms in all deep pockets (Fig. 5). The samples can be taken from the deepest pocket of each quadrant or all pockets over a certain probing depth can be sampled. When monitoring “microbiological” therapy, the samples should be taken from the same sites as for the initial examination to allow comparison.

### Detection of periodontal pathogens

The quantity and quality of diagnosed pathogens, the combination of these and the clinical picture are the determining factors when deciding on which treatment measures are necessary and likely to be successful. Chemical and physical dentistry measures ensure elimination of the pathogens that have colonized the exposed root surfaces in the periodontal

den parodontalen Taschen an die exponierten Wurzeloberflächen angelagert haben. Oft reichen diese Maßnahmen nicht aus, so dass insbesondere bei bestimmten parodontopathogenen Bakterien, die das umliegende Gewebe infiltrieren, eine lokale oder/und systemische Antibiotikatherapie indiziert ist.

Zur Diagnostik der vorhandenen Erreger stehen heute molekularbiologische Methoden als zuverlässige Diagnostikverfahren zum Nachweis parodontopathogener Bakterien zur Verfügung. Hier erfolgt der Bakteriennachweis auf DNA-Ebene. Somit spielt die Lebensfähigkeit der Erreger, die bisher den Einsatz der Erregerdiagnostik in der Zahnmedizin so problematisch gemacht hat, beim Transport der Proben ins Labor keine Rolle mehr. Dank der Stabilität der DNA ist sogar der Proben-transport im Hochsommer unproblematisch, solange die Probe keiner direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt ist. Das Ergebnis liegt bereits nach 1–4 Tagen vor. Bei garantierter reproduzierbarer Qualität bildet diese Diagnostik die wichtigste Grundlage für eine individuelle und gezielte Antibiotikatherapie.

Die klassischen Methoden der mikrobiologischen Diagnostik finden zwar in der mikrobiologischen Routine der Allgemeinmedizin ihre tägliche Anwendung, jedoch nicht in der Diagnostik parodontopathogener Bakterien. Da es sich hierbei um Erreger handelt, die bei den klassischen Methoden besondere und kostspielige Voraussetzungen beim Transport und der Kultur benötigen, finden wir diese nur noch bei speziellen Fragestellungen der Forschung und bei Therapieversagen. Falls in Sonderfällen, wie wiederholtem Therapieversagen, eine kulturelle Methode eingesetzt werden muss, ist eine individuelle Planung mit dem Labor notwendig. Nur in Absprache mit diesem kann über den Transport und die richtige kulturelle Untersuchung entschieden werden. Im klinischen Alltag ist dies nur in Ausnahmefällen notwendig.

## Genetische Komponente

Eine bedeutende Rolle hat die genetische Komponente im Krankheitsverlauf. Sie kann den Verlauf der Parodontitis deutlich beeinflussen. Durch eine Disposition des Interleukin-1 (IL-1)-Genkomplexes kommt es zu einer verminderten Entzündungshemmung. Das Zytokin IL-1 wird von Makrophagen und Fibroblasten sezerniert. Dieser proinflammatorische Marker Zytokin IL-1 spielt eine entscheidende Rolle im Immunsystem. Zytokin IL-1 ist an Entzündungsreaktionen der Immunantwort und an der Aktivierung von Osteoklasten beteiligt. Zu den Funktionen dieses Zytokins, während der Entzündung gehört die Proliferation aktivierter B- und T-Zellen, die Induktion der PGE- und Zytokinproduktion der Makrophagen, die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, die Induktion der Produktion von IL-6, INF- $\beta$ 1, GM-CSF und die Induktion von Fieber, Akute-Phase-Protein und der Osteoklastenaktivität. Die proentzündlichen Effekte des IL-1 werden durch Bindung der beiden Isoformen IL-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) und IL-1 $\beta$  an den IL-1-Rezeptor vermittelt. Der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA) ist ein ebenfalls von Immunzellen freigesetzter endogener Antagonist von IL-1. Er hemmt die Wirkung von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  kompetitiv, indem er an den IL-1-Rezeptor bindet und diesen blockiert. IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  können somit nicht mehr andocken und ihre proentzündlichen Effekte vermitteln. Der IL-1-RA ist also der „Gegenspieler“ des IL-1. Er wird zeitversetzt ebenfalls

pockets. These measures often do not suffice so that local and/or systemic antibiotic therapy is indicated especially in the case of certain periodontal pathogens that infiltrate the surrounding tissue.

For identification of the causative microorganisms, we now have at our disposal molecular biological techniques as reliable diagnostic methods for the detection of periodontal pathogens. The bacteria are detected at the DNA level. The viability of the pathogens, which has made the use of microbiological diagnostics so problematic in dentistry in the past, is no longer significant when transporting samples to the laboratory. Due to the stability of the DNA, sample transport is no longer a problem even at the height of summer, provided the sample is not exposed to direct sunlight. The result is available after just 1–4 days. As the quality is guaranteed to be reproducible, these diagnostics provide the most important foundation for individual and targeted antibiotic therapy.

The classical methods of microbiological diagnosis are still used routinely in general medicine but not in the diagnosis of periodontal pathogens. Since these are microorganisms with special and costly requirements in transport and culture using the classical methods, we now only find them in special research studies and in the event of treatment failure. If a culture method has to be used in special cases, such as repeated treatment failure, individual planning with the laboratory is necessary. This is the only way to decide on transport and the correct culture method. In routine clinical practice, this is necessary only in exceptional cases.

## Genetic components

A key role in the clinical picture is played by the genetic component. It can have a clear influence on the course of periodontitis. Due to a disposition of the interleukin-1 (IL-1) gene complexes, there is reduced inhibition of inflammation. The proinflammatory marker cytokine IL-1, which is secreted by macrophages and fibroblasts, plays a crucial part in the immune system. IL-1 is involved in inflammatory reactions of the immune response and in osteoclast activation. The functions of this cytokine during inflammation included proliferation of activated B- and T-cells, induction of PGE and cytokine production by the macrophages, expression of endothelial adhesion molecules, induction of the production of IL-6, INF- $\beta$ 1, GM-CSF and the induction of fever, acute phase proteins and osteoclast activity. The proinflammatory effects of IL-1 are mediated by binding of the two isoforms IL-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) and IL-1 $\beta$  to the IL-1 receptor. The IL-1 receptor antagonist (IL-1 RA) is an endogenous antagonist of IL-1, also released by immune cells. It inhibits the action of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  competitively by binding to the IL-1 receptor and blocking it. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  can therefore no longer dock on and mediate their proinflammatory effects. IL-1 RA is therefore an “opponent” of IL-1. It is also released by macrophages and monocytes after a delay, in order to halt the inflammatory response. The biological activity of IL-1 thus represents in essence the net effect of the two

von Makrophagen und Monozyten freigesetzt, um die entzündliche Antwort zu bremsen. Die biologische Aktivität des IL-1 stellt somit im Wesentlichen den Netto-Effekt der beiden Agonisten (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) und des Antagonisten (IL-1-RA) dar. Mit welcher Intensität beide Zytokine (IL-1 und IL-1-RA) nach Makrophagenaktivierung freigesetzt werden, wird durch die genetische Konstellation im Interleukin-1-Gencluster bestimmt.

Somit ergeben sich anhand dieser Polymorphismen folgende genetische Interleukin-Konstellationen für Normo- und Highresponder:

- **Grad 1: kein Polymorphismus:** IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$ /IL-1-RA normal oder lediglich **ein Polymorphismus im IL-1 $\alpha$ - oder IL-1 $\beta$ -Gen**, aber IL-1-RA normal. Patient mit normaler Entzündungsreaktion (*Normoresponder*).
- **Grad 2: ein Polymorphismus im IL-1-RA-Gen** (IL-1-RA vermindert), aber IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  normal. Patient mit verminderter Entzündungshemmung bei normaler IL-1-Produktion (*moderater Highresponder*).
- **Grad 3: mindestens je ein Polymorphismus im IL-1 $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Gen** (IL-1 erhöht), aber IL-1-RA normal. Patient mit starker IL-1-Produktion bei normaler Entzündungshemmung (*deutlicher Highresponder*).
- **Grad 4: mindestens drei Polymorphismen (je ein Polymorphismus in jedem Gen), d. h., IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-1-RA sind betroffen** (IL-1 erhöht und IL-1-RA vermindert). Patient zeigt starke IL-1-Produktion bei verminderter Entzündungshemmung (*sehr starker Highresponder*).

Liegt bei einem Patienten eine derartige Disposition vor, bedeutet es, dass eine geringe Bakterienanzahl, geringe Plaquemenge und niedrige Pathogenität eine starke, überschießende Entzündungsreaktion hervorrufen können. Jeder Wirt hat eine rasche und individuelle Immunabwehr und kann eindringende Bakterien bis zu einer bestimmten Resistenzschwelle abwehren und ihre Anzahl dezimieren. Wird diese Schwelle überschritten, können die Bakterien sich überproportional vermehren und die Erkrankung (Parodontitis, Periimplantitis) auslösen.

### Genotypisierung und ihr Nutzen für die Parodontitis

Das Testergebnis bietet Patienten, Zahnärzten und Dentalhygienikerinnen wichtige Informationen für die Therapieplanung und die Beurteilungsmöglichkeit der zu erwartenden Progredienz der Parodontitis und Periimplantitis [6, 7]. Durch ein positives Testergebnis wird darüber hinaus die Motivation des Patienten zu einer optimalen Mundhygiene, die zur Prävention beziehungsweise zum Stillstand des Krankheitsverlaufs unerlässlich ist, bedeutend verstärkt.

Das Testergebnis nimmt Einfluss auf Art und Weise und Intensität der Therapie. Somit kann im Fall der „positiven Genotypisierung“ durch verstärkte Aufklärung der Patienten über korrekte Mundhygiene und über das zusätzliche Risiko des starken Rauchens schon im prophylaktischen Bereich Einfluss genommen werden.

agonists (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) and the antagonist (IL-1 RA). The genetic constellation in the interleukin-1 gene cluster determines the intensity with which the two cytokines (IL-1 and IL-1 RA) are released following macrophage activation.

Thus, the following genetic interleukin polymorphism constellations are found for normal and high responders:

- **Grade 1: no polymorphism:** IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$  /IL-1 RA normal or only **one polymorphism in the IL-1 $\alpha$  or IL-1 $\beta$  gene** but IL-1 RA normal. Patient with normal inflammatory reaction (*normal responder*).
- **Grade 2: one polymorphism in the IL-1 RA gene** (IL-1 RA diminished) but IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  normal. Patient with reduced inhibition of inflammation with normal IL-1 production (*moderately high responder*).
- **Grade 3: at least one polymorphism in the IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  gene** (IL-1 raised) but IL-1 RA normal. Patient with high IL-1 production with normal inhibition of inflammation (*marked high responder*).
- **Grade 4: at least three polymorphisms (one polymorphism in each gene), that is, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-1 RA are affected** (IL-1 raised and IL-1 RA diminished). Patient exhibits high IL-1 production with diminished inhibition of inflammation (*very high responder*).

If a patient has such a disposition, this means that a small number of bacteria, a small quantity of plaque and low pathogenicity can cause a strong and excessive inflammatory reaction. Each host has a rapid and individual immune response and can resist penetrating bacteria up to a certain resistance threshold and decimate their number. If this threshold is crossed, the bacteria can multiply disproportionately and cause disease (periodontitis, periimplantitis).

### Genotyping and its usefulness for periodontitis

The test result provides patients, dentists and dental hygienists with important information for planning treatment and assessing the expected progression of periodontitis and periimplantitis [6, 7]. Moreover, a positive test result markedly increases the patient's motivation for optimal oral hygiene, which is essential for preventing or halting the disease.

The test result influences the manner and intensity of therapy. In the case of “positive genotyping”, increased education of the patient with regard to correct oral hygiene and about the additional risk of heavy smoking can have an influence even at the preventive stage.





**Abbildung 6** Probenentnahme Wangenschleimhaut für Genotypisierung.

Quelle: Praxis Dr. Kirsch/Dr. Ackermann, Filderstadt

**Figure 6** Collection of buccal mucosa samples for genotyping.

Source: Practice of Dr. Kirsch/Dr. Ackermann, Filderstadt

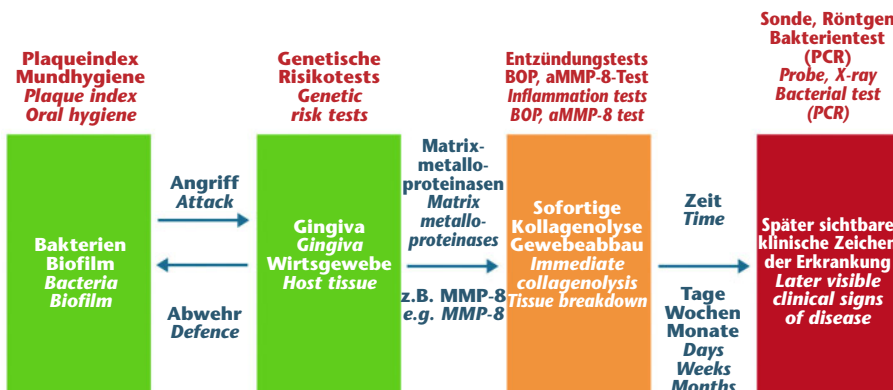
**Wann sollten die Genotypisierungen geplant werden?**

- Bei Patienten mit refraktärer therapieresistenter Parodontitis würde ein positives Testergebnis bisherige Misserfolge erklären und stellt eine Indikation für eine alternative Therapieplanung dar.
- Bei Patienten mit fortgeschrittener Parodontitis würde ein positives Testergebnis gegebenenfalls eine aufwändigere Therapieform und kürzere Recall-Intervalle notwendig machen.
- Bei Patienten mit beginnenden Parodontalerkrankungen würde der Test helfen, vor Behandlungsbeginn ein individuell auf den Patienten abgestimmtes Therapieschema zu erstellen, so dass einem Fortschreiten der Krankheit Einhalt geboten werden kann, ohne eine Überbehandlung zu riskieren.
- Bei Familienmitgliedern von Genotyp-positiven Patienten könnte die Genotypisierung bei noch nicht erkrankten Risikopatienten eine Etablierung der Erkrankung durch intensive Prophylaxemaßnahmen aufhalten bzw. verhindern.
- Bei Neupatienten erleichtert die Bestimmung des Genotyps als Teil der Anamnese die Einschätzung des Patienten sowie die Zuordnung zu Recallintervallen und Therapiemaßnahmen.
- Schließlich würde die Genotypisierung die Risikoeinschätzung vor aufwändigen Sanierungen erleichtern.

**When should genotyping be planned?**

- In patients with treatment-refractory periodontitis, a positive test result would explain previous failures and represents an indication for planning alternative therapy.
- In patients with advanced periodontitis, a positive test result might necessitate a more complex form of therapy and shorter recall intervals.
- In patients with early periodontitis, the test would help in producing an individually tailored therapy plan prior to the start of treatment so that progression of the disease can be arrested without risking over-treatment.
- In family members of genotype-positive patients, genotyping of as yet undiseased risk patients could delay or prevent establishment of the disease by intensive preventive measures.
- In new patients, determination of the genotype as part of the history facilitates assessment of the patient and allocation of recall intervals and therapeutic measures.
- Finally, genotyping would facilitate risk assessment prior to complex restorations.

For the test, only a swab from the buccal mucosa is required. To obtain a sample, the buccal mucosa is rubbed firmly several times with a cotton bud (Fig. 6). Let the cotton bud dry for approx. 20 seconds and then send it to the laboratory in a special test tube.



**Abbildung 7** Klassisches Pathogeneschema (umgezeichnet und erweitert nach Page & Kornman 1997).

Quelle: Page RC, Kornman KS: The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000 1997; 14: 9–11

**Figure 7** Classical pathogenesis diagram (adapted and expanded from Page and Kornman 1997).

Source: Page RC, Kornman KS: The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000 1997; 14: 9–11

Für die Untersuchung wird nur ein Abstrich der Wangenschleimhaut benötigt. Zur Probengewinnung mit einem sterilen Abstrichtupfer einige Male kräftig über die Wangenschleimhaut reiben (Abb. 6). Den Tupfer ca. 20 Sekunden trocknen lassen und anschließend in einem Spezialröhrchen ins Labor versenden.

### **aMMP-8 – Ein Parameter zur Früherkennung von Parodontitis und Periimplantitis**

Als Frühwarnsystem für das Einsetzen zerstörerischer Prozesse in der Parodontologie und/oder Implantologie eignen sich Röntgen und Sonde nicht. Auch PCR-Bakterientest, Interleukin-Test und „Bleeding on Probing“ (BOP) sind für eine frühzeitige Diagnostik ungeeignet. Nach aktuellen Studienergebnissen scheint dies durch den Nachweis der aktiven Matrix-Metalloproteinase-8 (aMMP-8) möglich zu sein. Sie zeigt, ob ein Gewebe stabil ist oder ob die Phase eines kollagenolytischen Gewebeabbaus vorliegt (Abb. 7) [11, 12].

### **aMMP-8 – Wissenschaftlicher Status**

Durch zahlreiche internationale Publikationen [13, 15] ist klar belegt, dass durch die Ermittlung von aMMP-8 im Sulkusfluid (GCF) die Patientenkollektive Gesund – Gingivitis – Parodontitis differenziert werden können. Die aMMP-8-Konzentrationen gehen nach einer Parodontitisbehandlung, z. B. Scaling/Root-Planing, zum Teil wieder in den gesunden Bereich zurück [8]. Somit kann, im positiven Normalfall, bereits nach zwei bis drei Wochen der Therapieerfolg belegt werden. Im negativen Fall einer refraktären Situation bleiben die aMMP-8-Messwerte demgegenüber auf hohem Niveau. Hier kann ebenfalls bereits nach der kurzen Zeit von zwei bis drei Wochen abgeklärt werden, ob weitere Behandlungsschritte eingeleitet werden müssen, ehe ein weiterer Gewebeverlust eingetreten ist.

**Acknowledgement:** Wir danken Frau Birgit Mützel für ihre Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts.

**Interessenskonflikt:** keine vorhanden.

### **aMMP-8 – a parameter for early detection of periodontitis and periimplantitis**

X-raying and probing are not suitable early warning systems for the onset of destructive processes in periodontology and/or implantology. The PCR bacterial test, interleukin test and bleeding on probing (BOP) are also unsuitable for early diagnosis. According to the results of recent studies, this appears to be possible by detection of the active matrix metalloproteinase-8 (aMMP-8). It shows whether a tissue is stable or whether collagenolytic tissue breakdown is actively occurring (Fig. 7) [11, 12].

### **aMMP-8 – scientific status**

It has been shown clearly by numerous international publications [13, 15] that measurement of aMMP-8 in the sulcus fluid (GCF) permits differentiation of patients into healthy, gingivitis and periodontitis. The aMMP-8 concentrations partially revert to the healthy range after periodontitis treatment, e.g., scaling/root planing [8]. Thus, the success of treatment can be confirmed after just two to three weeks in a positive normal case. In the negative case of a refractory situation, in contrast, the aMMP-8 levels remain high. In this case, after the short period of two to three weeks, it is possible to find out whether further treatment must be instituted before further tissue loss has occurred.

**Acknowledgement:** We thank Ms Birgit Mützel for her assistance in producing the manuscript.

**Conflict of interest:** none stated.

#### **Korrespondenzadresse**

Dr. Karl-Ludwig Ackermann  
Talstr. 23  
70794 Filderstadt  
Tel.: 07 11 / 7 08 81-66  
Fax: 07 11 / 7 08 81-69  
E-Mail: kl.ackermann@kirschackermann.de

**Literatur**

1. Beikler T, Schnitzer S, Abdeen G, Ehmke B, Eisenacher M, Flemmig TF: Sampling strategy for intraoral detection of periodontal pathogens before and following periodontal therapy. *J Periodontol* 2006;77:1323–1332
2. Eickholz P: Glossar der Grundbegriffe für die Praxis: Unterstützende Parodontitistherapie(UPT) Teil 2: Individuelles Parodontitisrisiko und Bestimmung der UPT Intervalle. *Parodontologie* 2007; 18:239–245
3. Flemming HC, Wingender J: Biofilme – die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. *Biologie in unserer Zeit* 2001;31: 169–180
4. Flemming HC, Wingender J: Was Biofilme zusammenhält: Proteine, Polysaccharide. *Chemie in unserer Zeit* 2002;36:30–42
5. Haffajee AD, Socransky SS: Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 1994;5:78–111
6. Huynh-Ba G, Lang NP, Tonetti MS, Salvi GE: The association of the composite IL-1 genotype with periodontitis progression and/or treatment outcomes: a systematic review. *J Clin Periodontol*. 2007 Apr;34(4):305–317
7. Huynh-Ba G, Lang NP, Tonetti MS, Zwahlen M, Salvi GE: Association of the composite IL-1 genotype with peri-implantitis: a systematic review. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Nov;19(11): 1154–1162
8. Kinane DF, Darby IB, Said S, et al.: Changes in gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8 levels during periodontal treatment and maintenance. *J Periodont Res* 2003;38: 400–404
9. Lang N, Tonetti MS: Periodontal diagnosis in treated periodontitis. Why, when and how to use clinical parameters. *J Clin Periodontol* 1996;23: 240–250
10. Müller H-P, Rateitschak KH: *Parodontologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag 2001, 5–79
11. Netuschil L: Parodontitis- und Periimplantitis-Frühwarnung: Welcher diagnostische Test bringt welche Aussage? *Plaque&care Frühjahr* 2009,5–9
12. Page RC, Kornman KS: The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000 1997; 14:9–11
13. Prescher N, Maier K, Munjal S, et al.: Rapid quantitative chairside test for active MMP-8 in gingival crevicular fluid – first clinical data. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:493–495
14. 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
15. Sorsa T, Mäntylä P, Rönkä H, et al.: Scientific basis of a matrix metalloproteinase-8 specific chairside test for monitoring periodontal and peri-implant health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:130–140