

Mikrobiologische Diagnostik bei Periimplantitis

Autor: Dr. rer. nat. Georg Conrads

1 Inhalt

1 Inhalt

2 Einleitung

3 Wissenschaftliche Grundlagen

**3.1 Aktuelle Studien zur Spezifizierung der Periimplantitis
Erreger**

**3.2 Die periimplantäre Mikroflora von Implantaten mit
verschraubten oder zementierten Rekonstruktionen**

**3.3 Mikrobielle Dichtigkeit als Problem der
Prothetikpfosten- Implantat-Verbindung**

3.4 Rauchen als ein Risikofaktor der Periimplantitis

4 Die Diagnostik der bakteriell bedingten Periimplantitis

4.1 Mikroskopische Methoden

4.2 Kulturverfahren

4.3 Enzymtests

4.4 Immunoassays

4.5 DNS-Sonden

4.5.1 Genomische DNS-Sonden und Plasmid-Sonden

4.5.2 Oligodeoxynukleotid-Sonden

4.5.3 Sonstige Nukleinsäure-Nachweistechiken

5 Zusammenfassung

6 Literaturverzeichnis

2 Einleitung

Neben der Implantatform/Implantatoberfläche, einem mangelhaften periimplantären Weichteilabschluß und einer biomechanischen Überbelastung der Implantate, wird die „bakterielle Infektion“ als ein Hauptgrund der periimplantären Entzündung diskutiert. Die Quelle Parodontitis-/Periimplantitis-erregender Mikroorganismen stellt die (subgingivale) Plaque dar, wenn diese über einen längeren Zeitraum akkumulieren kann. Es kann davon ausgegangen werden, daß mit abnehmendem Anteil natürlicher Zähne in der Mundhöhle das Risiko für eine Plaqueakkumulation und das entzündliche Potential der (subgingivalen) Plaque, ebenfalls abnimmt. Dies erklärt warum die Zahl der Implantatmißfolge mit bakterieller Ursache bei partieller Zahnlosigkeit größer (20%) als bei totaler Zahnlosigkeit (9%) ist (Davarpanah et al. 1997). Der Sulcus gingivae bzw. die parodontale Tasche der natürlichen Zähne stellt also die Hauptquelle für Periimplantitis-Erreger dar, wenn daneben auch die Mundschleimhaut als ein Reservoir dienen kann (Conrads et al. 1999).

Die Anatomie der periimplantären Gewebe zeigt starke Ähnlichkeiten mit dem Parodontalgewebe (Listgarten 1992; Baumann 1993). Daher ist es nicht verwunderlich, daß die bakteriell bedingte Periimplantitis ein ähnliches Leitkeimspektrum wie die marginale Parodontitis aufweist (Meffert 1996, Soehren 1996, Mombelli 1997, Augthun und Conrads 1997). Vergleichende Tierexperimente mit gingivalem Gewebe und Plaque-Akkumulation an den eingesetzten Implantaten oder natürlichen Zähnen unterstützen diese Hypothese (Eke et al. 1996, Lindhe et al. 1992, Berglundh et al. 1992).

Durch mangelhafte Plaquekontrolle im Bereich der durch die Schleimhaut verlaufenden Pfeiler entwickelt sich eine als implantäre Mukositis bezeichnete Entzündung. Das Vorhandensein eines Knochenverlustes in Verbindung mit einer

bestimmten Flora definiert die Periimplantitis (Mombelli et al. 1987). Diese periimplantäre Alveolyse kann die Ursache für den sekundären Verlust des Implantates sein (Rosenberg et al. 1991; Sanz et al. 1991). Die Vermehrung von Spirochäten und eine starke Konzentration von gram-negativen Stäbchen (*Prevotella*-Spezies, *Fusobacterium* spp.) wird in den periimplantären Taschen beobachtet.

Das der bakteriell bedingte Implantatmißerfolg sowohl mit einer quantitativen Erhöhung von Mikroorganismen, als auch mit einer qualitativen Veränderung zugunsten von gram-negativen, obligat-anaerob lebenden Bakterien zusammenhängt, ist bereits länger bekannt (Mombelli et al. 1987).

Im folgenden Kapitel werden Art und Eigenschaften der Periimplantitis-Mikroflora anhand ausgewählter Publikationen zusammengefaßt, die Abutment-Implantat-Verbindung als Reservoir für Problemkeime diskutiert und die Wirkung des Rauchens auf die lokale Immunantwort unter Stärkung der Überlebenschance pathogener Bakterien zusammengefaßt.

3 Wissenschaftliche Grundlagen

3.1 Aktuelle Studien zur Spezifizierung der Periimplantitis Erreger

In einem Übersichtsartikel (1997) faßt Mombelli die bakterielle Ätiologie der Periimplantitis zusammen. Allgemein spielen danach gram-negative, anaerobe Bakterien, speziell Fusobakterien, Spirochäten und die schwarz-pigmentierten Mikroorganismen, besonders die bereits aus der Parodontitis-Forschung bekannte Art *Prevotella intermedia* eine große Rolle an den betroffenen Stellen. In einem Tierexperiment wurde von der Arbeitsgruppe um Eke et al. (1996) die Mikroflora im Bereich der experimentellen Periimplantitis bei erwachsenen *Macaca mulatta*-Affen über zwölf

Monate nach Implantation untersucht. Die Plaque wurde dabei mittels Dunkelfeld-Mikroskopie und Kulturverfahren analysiert. Klassische Parodontitis-Erreger (siehe **Tabelle 1**) wurden als ein Hauptbestandteil der Mikroflora in der Plaque bei dieser experimentellen Periimplantitis nachgewiesen. Nur die Anzahl anaerober Aktinomyzeten und der Spirochäten war signifikant höher an Periimplantitis-Stellen gegenüber Parodontitis-Stellen. Die Anzahl der Spirochäten korrelierte weiterhin signifikant mit der Taschentiefe und dem Verlust an Knochenmaterial an den Periimplantitis-Stellen. Auch Meffert stellt in seiner Studie (1996) einen Vergleich zwischen der Parodontitis und der Periimplantitis an. Nach seiner Konklusion ist die Mikroflora des natürlichen Zahnes bzw. der korrespondierenden Sulci und Taschen ähnlich der im Spaltenbereich des Implantates und zwar sowohl im gesunden als auch im erkrankten Zustand. Unter gesunden Verhältnissen dominieren kokkoide Mikroorganismen im periimplantären und Sulcus-Bereich, während im Falle der Erkrankung eine wachsende Anzahl an gram-negativen Pathogenen mit dem Zahn bzw. dem Implantat assoziiert sind. In der Studie von George (1994) wird betont, daß die Ätiologie und Pathogenese der Periimplantitis noch zu wenig verstanden wird. Es wurden daher bei 24 Patienten mit 98 osseointegrierten Implantaten klinische Parameter und auch mikrobiologische Daten erhoben. Die Bakterien *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* und *P. intermedia* wurden in subgingivaler Plaque im Periimplantitis-Bereich mittels Latex-Agglutination erfaßt. Wenn der periimplantäre Sulcus-Bereich einen der drei klassischen Parodontitis-Erreger beinhaltet, so korrelierte dies mit verschlechterten klinischen Parametern und somit auch mit einer schlechteren Prognose für das Implantat. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, daß klassische Parodontitis-Pathogene häufiger auch im Bereich der Implantate zu finden sind und speziell dann, wenn eine Mukositis/Periimplantitis vorliegt.

Damit stellen diese Mikroorganismen einen wichtigen Risikofaktor für Implantate dar.

Zur Klärung der Periimplantitis-Flora wurden in einer Studie unserer Arbeitsgruppe (Augthun und Conrads, 1997) 18 Titanimplantate (Typ IMZ) von 10 zahnlosen Patienten ausgewählt, mit einem periimplantären Einbruch des Alveolarknochens von >5 mm. Es wurde in unserer Studie nicht Plaque, sondern das Bakterien-infiltrierte Gewebe aus den Knochendefekten entnommen. Nach operativer Eröffnung der Defekte sowie Entnahme, Zerkleinerung und Suspendierung des entzündeten Gewebes, wurde ein Aliquot der Suspension auf verschiedene selektive und nicht-selektive Kulturmedien ausplattiert. Die quantitative und qualitative Verteilung der Bakterien, bezogen auf Gramm-Gewebegewicht, wurde ermittelt. Die mittlere bakterielle Zellzahl dieser Proben lag bei $6,7 \times 10^4$ Zellen pro mg Trockengewicht. Die folgenden Bakterien konnten biochemisch nachgewiesen und molekulargenetisch (DNS-Sondenhybridisierung) bestätigt werden: Arten aus der Familie der *Bacteroidaceae* (Spezies: *P. intermedia*, *P. buccae*, *P. oralis*, *P. melaginogenica* und *P. denticola*); *A. actinomycetemcomitans*; *F. nucleatum*; *Capnocytophaga* spp. und *Eikenella corrodens*. Am häufigsten wurden dabei *A. actinomycetemcomitans* und die Vertreter der Familie der *Bacteroidaceae* nachgewiesen (**Tabelle 2**). Insgesamt zeigte das bakterielle Spektrum bei der Periimplantitis auch in unserer Studie eine ähnliche Zusammensetzung, wie sie aus Formen der fortgeschrittenen parodontalen Destruktion bekannt ist.

Zusammenfassend läßt sich aus den jüngsten Studien zu den bakteriologischen Hintergründen der Periimplantitis sagen, daß es hochwahrscheinlich ist, daß Fälle der Periimplantitis mit obligat anaeroben Bakterienspezies, speziell aus der Familie der *Bacteroidaceae* sowie mit Spezies der Arten *A. actinomycetemcomitans* und *E. corrodens* assoziiert sind. Die Vielfalt der bedeutsamen Bakterienspezies ist möglicherweise

größer als bei der marginalen Parodontitis, was eine hinreichende Diagnostik mittels z.B. DNS-Sonden erschwert. Die **Tabelle 1** gibt zu den potentiellen Erregern der Periimplantitis einige mikrobiologische Basisdaten an.

3.2 Die periimplantäre Mikroflora von Implantaten mit verschraubten oder zementierten Rekonstruktionen

In einer Studie von Keller (1998) war das Ziel, die klinischen und mikrobiologischen Besonderheiten in der periimplantären Umgebung von Implantaten, welche entweder verschraubte oder zementierte Rekonstruktionen tragen, zu vergleichen und die Beziehung zwischen der periimplantären Mikroflora, den Mikroorganismen auf der inneren Oberfläche von abnehmbaren Rekonstruktionen und der parodontalen Mikroflora im selben Patienten zu untersuchen. Bei 15 teilbezahnten Patienten mit auf ITI-Implantaten befestigten, festsitzenden Rekonstruktionen wurden mikrobiologische Proben a) von der tiefsten parodontalen Tasche jedes Quadranten, b) vom Sulkus der Implantate und c) von der inneren Oberfläche der verschraubten Rekonstruktionen genommen. Die Proben wurden unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Bei 5 Patienten wurden sowohl verschraubte (S) als auch zementierte (Z) Rekonstruktionen vorgefunden.

Bei diesen Individuen waren die mittleren, totalen kultivierbaren Bakterien-Zellzahlen in den periimplantären Proben von Gruppe „Z“ signifikant höher als in den Proben von „S“. Des weiteren zeigten die periimplantären Proben von Gruppe „S“ im Dunkelfeld-Mikroskop größere Proportionen an kokkoiden Zellen (synonym für physiologische Flora) und es konnten keine großen Spirochäten gefunden werden. *P. gingivalis*, als einer der wichtigsten Parodontitis (Periimplantitis) -Erreger konnte bei den 15 Patienten in 10% der parodontalen Proben und nur in einer

periimplantären Probe gefunden werden. *P. intermedia* wurde in 33% der parodontalen und in 30% der periimplantären Proben gefunden. *Fusobacterium* spp. hatte eine Prävalenz von 58% in den parodontalen Proben und konnte in 50% der periimplantären Proben nachgewiesen werden. Die lineare Regressionsanalyse zeigte eine signifikante Beziehung zwischen der Frequenz von Mikroorganismen in den periimplantären Proben von Gruppe S und in Proben von der inneren Oberfläche der Rekonstruktionen. Desweiteren bestand eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorkommen von Mikroorganismen in den parodontalen Proben und in den periimplantären Proben der Gruppe S sowie in Proben von der inneren Oberfläche der Rekonstruktionen.

Diese Resultate zeigen eindeutig, daß

- 1) die dentale Mikroflora einen enormen Einfluß auf die mikrobielle Besiedlung von Implantaten hat, unabhängig von der Art der Befestigung der Rekonstruktion.
- 2) das mikrobiologische Leck, bedingt durch den Randspalt zwischen Rekonstruktion und dem Sekundärteil, eine wichtige Rolle bei der bakteriellen Kolonisation der inneren Oberfläche von verschraubten Rekonstruktionen spielt.

Dies wirft Fragen zur Dichtigkeit der Implantat-Prothetikpfosten-Verbindung auf, die im folgenden anhand von zwei weiteren aktuellen Studie diskutiert werden soll.

3.3 Mikrobielle Dichtigkeit als Problem der Prothetikpfosten-Implantat-Verbindung

Um das Problem der Abutment-Implantat (A-I)-Verbindungsregion (Interface) bei osseointegrierten Implantaten aufzuzeigen, können die folgenden zwei Studien als repräsentativ gelten.

In einer Studie von Gross et al. (1999) wurde das Mikroleck an der A-I-Verbindungsstelle von fünf Implantat-Systemen verglichen. Es wurden Farblösungen verwendet und das Eindringen über Spektrophotometrie bestimmt. Mikro-Leckagen wurden bei allen

A-I-Interfacestellen, unabhängig von der Implantatart, beobachtet. Die Ergebnisse zeigen eindringlich, daß Flüssigkeiten, aber auch kleinere Moleküle in der Lage sind, die Verbindungsfront der beiden Implantatteile zu passieren. Daraus folgern die Autoren, daß auch bakterielle Bestandteile und Nährsubstanzen, die für das bakterielle Wachstum benötigt werden, das A-I-Interface durchdringen können. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die bakterielle Kontamination der inneren Bereiche der Implantate, die wiederum zu einer Periimplantitis und 'malodor' führen können. Noch eindringlicher beschreibt eine Studie aus unserer Arbeitsgruppe (Jansen et al., 1995) die Potenz von Bakterien, den A-I-Interfacespalt passieren zu können. In dieser Studie wurden 13 verschiedene Kombinationen von Implantaten und Prothetikpfosten einer mikrobiologischen *in vitro* Testung unterzogen, indem an je 10 Exemplaren der betreffenden Implantate die mögliche Passage eines Testkeims (*Escherichia coli*-Typstamm) durch den Spaltraum hindurch beobachtet wurde. Nach dieser Studie ließen alle Systeme den Testkeim prinzipiell passieren, allerdings zeigten sich Unterschiede im Anteil der 'dichten Exemplare'. Besonders eindrucksvoll war in dieser Studie der weitaus seltenere Bakterien-Durchtritt bei dem Frialit-2-Implantat, das über einen speziellen Silikondichtring verfügt. Bei der Vermessung der Fügezone im Rasterelektronenmikroskop wurden zwischen den präfabrizierten Teilen Randspaltenbreiten von maximal 10 µm auch bei strikter Einhaltung der empfohlenen Verschraubungskräfte gemessen. Bei einem Durchmesser der bakteriellen Zelle zwischen 0,1 und 1,2 µm, bietet dieser Randspalt kein größeres Hindernis für das Eindringen von Bakterien. Die Autoren appellieren in ihrer Diskussion an die Herstellerfirmen, verbesserte Dichtungssysteme zwischen Implantat und prothetischem Aufbauteil zu entwickeln, um dadurch das potentielle Reservoir im Inneren der Implantate für die Bakterien zu eliminieren und die Wahrscheinlichkeit einer Periimplantitis herabzusetzen.

3.4 Rauchen als ein Risikofaktor der Periimplantitis

Ähnlich wie bei der Parodontitis scheint auch das Rauchen ein Risikofaktor der Periimplantitis zu sein. In der Studie von Haas et al. (1996) wurden klinische und radiologische Untersuchungen an 366 Implantaten bei 107 Raucher-Patienten sowie an 1000 Implantaten bei 314 Nichtraucher-Patienten verglichen. Die Gruppe der Raucher zeigte durchschnittlich höhere Werte für den Blutungsindex, die mittlere Taschentiefe, den Grad der periimplantären Zahnfleischentzündung und den Grad der radiologisch ermittelten Knochenresorption mesial und distal zum Implantat. Neben systemischen Auswirkungen des Zigarettenkonsums scheinen lokale Kofaktoren (speziell gefunden im Oberkieferbereich) für die höhere Inzidenz der Periimplantitis eine Rolle zu spielen. Aus dem Reviewartikel von Bouclin et al. 1997, wiederum am Beispiel der Parodontitis untersucht, ist bekannt, daß nicht die Anzahl pathogener Bakterien erhöht, sondern die lokale Immunfunktion der Raucher (Chemotaxis, Kapazität der Neutrophilen Granulozyten, Titer für IgA, IgG, IgM sowie der Suppressor CD8 Lymphozyten) herabgesetzt ist. Demnach haben Raucher ein höheres Risiko ein zahnärztliches Implantat durch eine Periimplantitis zu verlieren als Nichtraucher.

4 Die Diagnostik der bakteriell bedingten Periimplantitis

Da das Bakterienspektrum bei der Periimplantitis dem Erregerspektrum einer marginalen Parodontitis ähnlich ist, können prinzipiell für die Diagnostik auch ähnliche Methoden genutzt werden:

4.1 Mikroskopische Methoden

Mit mikroskopischen Verfahren (Dunkelfeld-, Phasenkontrastmikroskopie) konnten die Veränderungen der Mikroflora beim Auftreten einer bakteriell bedingten parodontalen Entzündung zuerst demonstriert werden (Rosebury et al. 1950). Mit Hilfe der mikroskopischen Plaquekontrolle konnten einige Morphotypen der parodontopathogenen Flora wie Spirochäten von unterschiedlicher Länge und "bewegliche Stäbchen" bzw. "Vibrionen" und "Filamente" beschrieben werden. Mit Weiterentwicklung der Anaerobier-Kulturtechniken ließ sich die Veränderung der Mikroflora auch kulturell bestätigen und eine Artdifferenzierung der Morphotypen in *Treponema denticola*, *Campylobacter rectus* (alte Nomenklatur *Wolinella recta*), *Fusobacterium nucleatum* und *Bacteroidaceae* vornehmen, wozu die Mikroskopie nicht in der Lage war. Die mikroskopische Kontrolle erfordert daneben einen höheren Arbeitsaufwand, ist subjektiv in der Auswertung und es wird häufig nur ein kleiner Bereich des Mikro-Ökosystems "subgingivale Plaque" mikroskopiert bzw. die Untersuchung nur an gepoolter Plaque vorgenommen, um den Aufwand zu verringern.

Es muß jedoch erwähnt werden, daß die mikroskopische Erfassung aufgrund der Einbeziehung aller Spirochäten-Arten, die sich kulturell größtenteils noch nicht anzüchten lassen, den stärksten Unterschied zwischen gesunden und erkrankten

Parodontien/Periimplantatbereichen und behandelten bzw. nicht behandelten Fällen ersichtlich macht. Auf dieses Verfahren kann daher bis heute nicht verzichtet werden und findet daher auch in aktueller Literatur zur Grundlagenforschung bei der Periimplantitis rege Anwendung (Keller et al. 1998, Eke et al. 1996).

4.2 Kulturverfahren

Bakteriologische Kulturverfahren werden in weiten Bereichen der mikrobiologischen Diagnostik und auch zum Nachweis von Parodontitis-/Periimplantitis-Leitkeimen als Referenzmethode betrachtet, obwohl sie einige offensichtliche Nachteile besitzen. Sobald eine Probe subgingivaler/periimplantärer Plaque für die Diagnostik entnommen, transportiert und suspendiert wird, steigt das Redoxpotential in der Probe an und die meist obligat anaeroben Bakterien sterben teilweise ab, wodurch sie einer kulturellen Anzucht entzogen sind.

Die überlebenden Bakterien bilden häufig nach anaerober Anzucht bei 37°C (in 2 - 6 Tagen) nur sehr langsam größere und charakteristische Kolonien aus. Nach der primären Anzucht müssen Subkultivierungen verdächtiger Bakterienkolonien für biochemische Differenzierungen vorgenommen werden. Ein endgültiges Ergebnis liegt also erst nach frühestens 4, meist aber erst nach 14 Tagen vor. Um den Aufwand zu verringern, werden häufig Selektivmedien mit Antibiotika zur Anzucht bestimmter Arten (z.B. bei *A. actinomycetemcomitans*) eingesetzt. Dies beinhaltet jedoch die Gefahr, daß auch der zu isolierende Keim in seinem Wachstum inhibiert wird und einige besonders sensible Stämme einer Art auf dem Selektivmedium nicht wachsen und so der Diagnostik entgehen (Übersichtsartikel: Slots 1986). Die aufwendige Anzucht und Differenzierung rechtfertigt einen hohen Preis für diese Untersuchung. Vorteilhaft ist die enorme Flexibilität des Verfahrens, da nicht nur die bereits gut beschriebenen Leitkeime

(nach **Tabelle 1**) nachzuweisen sind, sondern alle (kultivierbaren) Bakterienarten, die in auffällig hoher Proportion wachsen und so am Entzündungsgeschehen beteiligt sein können. Desweiteren stehen die isolierten Bakterien auch für Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfungen zur Verfügung. Die Untersuchung wird z.B. durch die Firmen LCL biokey GmbH (Medizintechnisches Zentrum Aachen) oder laboral diagnostics (Amsterdam, Niederlande) angeboten.

4.3 Enzymtests

Ein vielversprechendes und sehr schnelles Verfahren zum Nachweis einiger weniger Leitkeime ist der sogenannte "BANA-Test". In diesem Test wird das Vorhandensein von Trypsin-ähnlichen Proteasen, wie sie von den Bakterien *T. denticola*, *P. gingivalis* und *Bacteroides forsythus* gebildet werden, nachgewiesen. Diese Proteasen hydrolysieren das synthetische Trypsinsubstrat Benzoyl-DL-Arginin- β -Naphthylamid (BANA), was man durch eine Farbreaktion auf einem mit subgingivaler Plaque beimpften Papierstreifen sichtbar machen kann. Vergleichende Tests bei der Parodontitis (Loesche et al. 1992) konnten zeigen, daß dieses Verfahren eine Sensitivität von 90 bis 96% und eine Spezifität von 83 bis 92% besitzt.

Ein großer Vorteil des Verfahrens ist, daß das Ergebnis im Gegensatz zu allen anderen Verfahren -mit Ausnahme des als ungenauer zu bezeichnenden mikroskopischen Verfahrens- bereits in derselben zahnärztlichen Sitzung ("chairside-diagnostic") vorliegt. Nachteilig ist, daß mit Hilfe des "BANA-Tests" Trypsin-Protease-negative Bakterien, wie speziell *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens* oder Fusobakterien, nicht erfaßt werden, so daß er für die Periimplantitis eine geringere Aussagekraft bietet als für die Parodontitis. Der Test (Dentocheck®) wird durch die Firma Butler (Kriftel, Ansprechpartner: Herr R. Mrugalski) angeboten und für

niedergelassene Zahnärzte vertrieben durch die Identis Dentalprodukte GmbH (Heidelberg, Ansprechpartner Dr. M. Leiple).

4.4 Immunoassays

Zum Nachweis der Bakterien wurden eine Reihe von polyklonalen (zum Beispiel Anti-*A. a.*, Anti-*T. denticola*) und monoklonalen (zum Beispiel Anti-*A. a.*, Anti-*P. g.*, Anti-*P. i.*) Antikörpern in Immunoassays eingesetzt. So lassen sich die Erreger mikroskopisch im direkten oder indirekten Immunofluoreszenztest unmittelbar aus der Plaque nachweisen. Diese Tests können auch quantitativ ausgewertet werden, was von großer Bedeutung ist, da diese potentiell pathogenen Keime auch physiologischerweise in geringen Mengen in subgingivaler Plaque und auch in der gesamten Mundhöhle vertreten sind. Nachteilig bei diesen Methoden ist, daß die Auszählung der "positiven", fluoreszierenden Keime subjektiv ist (zum Beispiel unterschiedliche Wertung verschiedener Fluoreszenzstärken) und zudem bei großen Probenkollektiven zeitlich und personell aufwendig ist. Abhilfe könnte hier der Einsatz eines FACS (Fluorescence activated cell sorter) liefern. Weiterhin ist nachteilig, daß monoklonale Antikörper häufig zu spezifisch reagieren und nicht alle Stämme einer Art erfassen, während die polyklonalen Antiseren durch Kreuzreaktionen zu falsch positiven Signalen neigen. Spezifische Antikörper lassen sich jedoch auch in ELISA-Verfahren (Di Murro et al. 1997) oder Latexagglutinationstests einsetzen, was zu einem schnellen und relativ sensitiven Nachweis der Erreger führen kann (Nachweisgrenze: 10^4 - 10^5 Bakterien/ Probe). Die Routine-Nutzung dieses Verfahrens (z.B. EvalusiteTM, Kodak, Schweiz) hat wenig Verbreitung gefunden (Übersichtsartikel: Zambon 1986, Anwendung in der Periimplantitis: George et al. 1994).

4.5 DNS-Sonden

Seit Mitte der 80iger Jahre wurde mit DNS-Sonden zum Nachweis parodontopathogener Keime experimentiert. Es handelt sich dabei um radioaktiv oder Enzym-markierte gesamt-genomische DNS, rekombinante (Plasmid-gebundene) genomische DNS oder synthetische Oligodeoxynukleotide.

4.5.1 Genomische DNS-Sonden und Plasmid-Sonden

French und Murray (BioTechnica Diagnostics [jetzt: OmniGene], Cambridge, Massachusetts, USA) führten 1986 den ersten Nachweis von *P. intermedia* und *P. gingivalis* mit Hilfe gereinigter gesamt-genomischer DNS der beiden Spezies, die im Nick-Translationsverfahren radioaktiv mit ^{32}P bzw. nicht radioaktiv mit Biotin-11-dUTP markiert wurde. Die Sensitivität der Sonden lag bei 10^2 Bakterienzellen (radioaktiv nachgewiesen, nach 18-stündiger Exposition) bzw. 10^3 (nicht radioaktiv nachgewiesen, nach 60 min. Entwicklungszeit). Für *A. actinomycetemcomitans* erwiesen sich gesamt-genomische Sonden als ungeeignet, da sie eine hohe Kreuzhybridisierung, speziell mit *Haemophilus*-Spezies zeigten. Daher klonierten die Autoren Bruchstücke genomischer DNS in einen Vektor (Plasmid) und mischten alle rekombinanten Vektoren, die keine Kreuzhybridisierung mit *Haemophilus*-Spezies zeigten, zu einer Gesamt-A.a. -Sonde zusammen. Die Sensitivität dieser geklonten Sondenmischung lag bei dem Nukleinsäureäquivalent von 10^3 bis 10^4 Zellen/Probe bei einer Spezifität von nahe 100%.

In der Folge wurden diese Versuche von verschiedenen Autoren (Murray und French 1989, Smith et al. 1989, Albandar et al. 1990, Murray et al. 1991, Lippke et al. 1991, Haffalee et al. 1992) wiederholt und bei verschiedenen Fragestellungen (zum Beispiel

HIV-Parodontitis, Korrelation der Mikroorganismen mit den klinischen Symptomen) angewendet, wobei das Spektrum der genomischen Sonden auf alle bislang bedeutsam erscheinenden Parodontopathogene und die meisten Periimplantitiserreger ausgeweitet wurde (genomische Sonden: *P. g.*, *P. i.*, *T. denticola*; klonierte Plasmid-Sonden: *A. a.*, *F. nucleatum*, *E. corrodens*, *C. rectus*, *B. forsythus*).

Das Testverfahren ist registriert und in Teilen patentiert durch die Firma OmniGene. Die Sonden werden von den ANAWA-Laboratorien AG (Wangen bei Zürich, Schweiz, wissenschaftliche Leitung für DMDx®/PathoTek®-Analysen: Dr. A. Glauser) zur Routineuntersuchung von Plaqueproben eingesetzt. Der Vertrieb entsprechender Probe-Entnahmekits erfolgt in Deutschland durch die Firma Wybert GmbH (Lörrach, Information: Frau Dipl.-Biochem. B. Kiene).

Zu beachten bei der Verwendung von Nachweisverfahren mittels genomischer und Plasmid-Sonden sind die folgenden Einschränkungen:

- Kreuzreaktivität einiger Sonden mit Spezies, die in enger Verwandtschaft zum Zielorganismus stehen. Mit $\leq 1\%$ ist diese Reaktion im allgemeinen jedoch von geringer klinischer Relevanz.
- Zudem führen die amerikanischen Patente, resultierende Lizenzgebühren sowie die Splittung von Labor und Vertrieb zu einem relativ hohen Preis des Untersuchungsverfahrens, zumal im Testkit für 3 Leitkeime nur *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* und *P. gingivalis* überprüft werden, was für die Periimplantitis sicherlich nicht ausreichend ist.

Insgesamt gibt es aber mit dieser Verfahrensweise bislang große Erfahrungen und es hat weltweit -und so auch im deutschsprachigen Bereich- die wohl größte Verbreitung zur Untersuchung von Routineproben gefunden. Die Ausweitung des Tests auf 8 Keime (plus *B. forsythus*, *T. denticola*, *C. rectus*, *F. nucleatum* und *E. corrodens*) unter Erfassung der wesentlichen Periimplantitis-Leitkeime ist möglich.

4.5.2 Oligodeoxynukleotid-Sonden

Chuba in der Arbeitsgruppe von Göbel setzte 1988 als Erster Oligodeoxynukleotid-Sonden, die sich gegen die 16S rRNA richteten, ein, um *P. gingivalis*, *P. intermedia* Genotyp II (reklassifiziert als *Prevotella nigrescens*), *Prevotella asaccharolytica* und *A. actinomycetemcomitans* nachzuweisen. Die 16S rRNA (small subunit RNA) ist ein Teil der kleinen Untereinheit der bakteriellen Ribosome. Sie besitzt Signatursequenzen für die verschiedenen Taxa (z.B. Bakteriengattung oder Spezies) und der Sequenzvergleich dieser RNA dient in zunehmendem Maße der exakten taxonomischen Eingruppierung von Bakterienisolaten.

Die Spezifität der 16S rRNA-gerichteten Sonden wurde mit 100% angegeben (unter optimalen Hybridisierungsverhältnissen), die Sensitivität der mit ^{32}P markierten Sonden lag bei der Nukleinsäuremenge von $1\text{-}5 \times 10^3$ Zellen/Dot. Dix und Moncla entwickelten 1990 artspezifische, gegen 16S rRNA gerichtete DNS-Sonden (Länge 24 Basen, ^{32}P markiert) zur Erfassung von *A. a.*, *B. forsythus*, *P. g.*, *P. i.* Genotyp I und II, *E. corrodens*, *F. nucleatum* und *C. rectus* (veraltete Nomenklatur: *Wolinella recta*). Zudem zeigten sie, daß es mit diesen Sonden prinzipiell möglich ist, einzelne Bakterienarten in der extrem heterogenen Plaque spezifisch nachzuweisen. Die Spezifität und Sensitivität ihrer DNS-Sonden war vergleichbar mit den Werten der Göbel-Gruppe. Oligonukleotid-Sonden zeichnen sich durch eine hohe Stabilität aus. Ihre Spezifität läßt sich nicht nur -wie der Fall bei genomischen DNS-Sonden- empirisch ermitteln, sondern auch durch 16S rRNA/DNS-Sequenzvergleich mittels Datenbanken (z.B. Ribosomal Database Project, Michigan University, USA) absichern (Conrads et al. 1997).

Mittlerweile werden solche Oligonukleotid-Sonden zur Detektion von Parodontopathogenen und Periimplantitis-Erregern auch kommerziell eingesetzt.

So benutzt die Firma IAI (Institut für Angewandte Immunologie, Zuchwil, Schweiz, Managing Director: H. Wolf) selbstentwickelte Oligonukleotid-Sonden zur Untersuchung der subgingivalen Plaque (IAI PadoTest 4.5®). Der Vertrieb für Deutschland geschieht durch Identis Dentalprodukte GmbH (früher: Guidor), Heidelberg.

Einschränkungen bei diesem Testverfahren bestehen zu folgenden Gesichtspunkten:

- Die Sensitivität mit einem Limit von 5×10^3 Zellen pro Dot ist relativ gering, da Bakterienarten wie *A. actinomycetemcomitans* oder *P. gingivalis* auch noch unterhalb dieser Nachweisgrenze von Bedeutung sind.
- Das Verfahren berücksichtigt nicht die Arten *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. corrodens* oder Fusobakterien.
- Die Spezifität zu diesen kommerziell verwendeten 16S rRNA-gerichteten DNS-Sonden ist zwar anzunehmen, exakte Daten dazu wurden jedoch bislang nicht publiziert.

Das kommerzielle Verfahren besticht durch die detaillierten und klaren Therapie-Empfehlungen auf der Basis der mikrobiologischen Ergebnisse. Es wurden durch verschiedene Feldstudien in der Schweiz und in Deutschland fünf „Taschentypen“ mit spezifischer mikrobieller Flora und resultierenden therapeutischen Konsequenzen definiert.

Ernstzunehmender Konkurrent für die etablierten DNS-Sondendiagnostik-Anbieter könnte der LCL® Parodontitis-Test der Firma LCL biokey GmbH (Medizintechnisches Zentrum, Aachen) werden. Der Vertrieb für Deutschland wird durch die Firma LCL selbst organisiert, was den günstigen Preis erklären dürfte. Die Sensitivität dieses 16S rRNA gerichteten DNS-Sondentests wird mit 10^2 bis 10^3 Zellen pro Dot angegeben und dürfte somit

ausreichend sensitiv für die Diagnostik der Parodontitis/Periimplantitis sein. Dieses Verfahren berücksichtigt die Art *P. intermedia* als einen Vorteil gegenüber dem IAI-Verfahren. Der Nachweis von *E. corrodens*, Fusobakterien und Spirochäten wurde bislang nicht ins Standard-Programm aufgenommen, ist aber auf spezielle Anfrage bereits möglich, wobei dazu DNS-Sonden und Kulturverfahren kombiniert verwendet werden. Die Spezifität der LCL 16S rRNA-gerichteten DNS-Sonden ist gewährleistet, da die Sondensequenzen empirisch und durch Datenbank-Recherchen in ihrer Spezifität validiert wurden (entsprechende Ergebnisse wurden dem Autor vorgelegt). Das Risiko für den Verlust von Stützgewebe wird bei dem LCL-Parodontitis- bzw. Periimplantitis-Test in 4 Gruppen definiert, aus denen unterschiedliche therapeutische Konsequenzen abgeleitet werden.

Ein weiterer Anbieter bakteriologischer Testverfahren im Bereich der Parodontitis und Periimplantitis ist explore-Research in Nijmegen in den Niederlanden, die ihren Test auch für deutsche Zahnärzte mit entsprechend verfaßten Beipackzetteln anbieten. Bei dem Paro-Bakterien-Test der explore Laboratories werden die Bakterienarten *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *B. forsythus* und *T. denticola* untersucht, jedoch nicht die Art *P. intermedia*, die bei der Periimplantitis von Bedeutung ist. Auch dieses Verfahren macht sich 16S rRNA-gerichtete Oligonukleotid-Sonden zu Nutzen und ist in Sensitivität und Spezifität vergleichbar mit dem LCL-Verfahren.

Synthetische Oligonukleotide besitzen den zukunftsgerichteten Vorteil, daß Detektionsverfahren leichter automatisierbar gemacht werden können. So ist auf dem amerikanischen Markt bereits ein semi-automatisierter "chair-side"-Test verfügbar (Affirm™ DP Test, MicroProbe Co., Bothell, WA) bei dem die wichtigsten Leitkeime über Oligonukleotid-Hybridisierung bereits am

Behandlungsstuhl sichtbar gemacht werden können. Mit der sehr hohen Nachweisgrenze von 5×10^5 bis 10^6 Zellen werden jedoch nur Fälle der sehr starken „Infektion“ erkannt (Ali et al. 1996). Weiterhin ist an der automatisierten Befundung in der Zahnarzt-Praxis zu kritisieren, daß keine Validation der mikro-/molekularbiologischen Ergebnisse durch einen Mikrobiologen/Laboratoriumsmediziner stattfindet, was aber zur guten medizinischen Praxis gehören sollte.

4.5.3 Sonstige Nukleinsäure-Nachweistechiken

Für den qualitativen Nachweis einiger Parodontitis-/Periimplantitis-Markerbakterien wird auch die Polymerase-Kettenreaktion angewendet. Dabei wird ein Art-spezifischer Genbereich durch die Auswahl von zwei flankierenden Primer-Molekülen in einer in-vitro Amplifikation (enzymatisch katalysiert durch eine hitzestabile Polymerase) vermehrt und schließlich sichtbar gemacht. Bei dem Spezies-spezifischen Genbereich kann es sich ebenfalls um die Signatursequenz der 16S rDNS handeln (Conrads et al. 1999; Slots et al. 1995, Ashimoto et al. 1996), es kommen aber auch andere Matrizen wie z.B. das Leukotoxin-Gen von *A. actinomycetemcomitans* (Tonjum und Haas 1993, Goncharoff et al. 1993) oder das Fimbrien-Gen (Watanabe und Frommel 1993) bzw. das Kollagenase-Gen von *P. gingivalis* infrage. Durch die allgemein sehr hohe Sensitivität (≤ 100 Bakterienzellen) können auch noch deutlich positive Signale auf der Basis von z.B. 5-10 *P. g.*-Zellen in einer Plaqueprobe auftreten, wobei die Frage der klinischen Relevanz solcher Ergebnisse gestellt werden muß. Das Verfahren hat daher sicherlich eher seinen Platz in der Grundlagenforschung als zum Routine-Nachweis der Bakterien. Es kann z.B. zuverlässig die Frage nach der zeitlichen Erstbesiedlung der Mundhöhle mit putativen Parodontopathogenen klären.

Die Firma Hain-Diagnostika GmbH (Nehren) nutzt eine speziell wenig empfindlich (10^4 Keime/Probe) eingestellte PCR-Reaktion in Kombination mit Reverser Hybridisierung zum hochspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien. Der Test wird von niedergelassenen Laboratoriumsmediziner genutzt, um für die einsendenden Zahnärzte die Parodontitis-/Periimplantitis-Leitkeimdiagnostik durchzuführen.

5 Zusammenfassung

Es stehen dem Parodontologen/Implantologen eine Auswahl von Nachweisverfahren für Parodontitis/Periimplantitis-Markerbakterien zur Verfügung. Eine genügend hohe Spezifität und Sensitivität in Verbindung mit Praktikabilität haben dabei bislang nur Tests zum Nachweis der Bakterien-Nukleinsäure über genomische oder synthetische DNS-Sonden. Da das Spektrum der Periimplantitis-assoziierten Bakterien größer als bei der marginalen Parodontitis erscheint, dürfte der „negative prediktive Wert“ der DNS-Tests für die Periimplantitis-Diagnostik leider deutlich geringer sein. Eine Kombination von DNS-Tests (schnelle, kostengünstige Erfassung der Standardkeime) und Kulturverfahren (Erfassung der Gesamtflora und der „Exoten“, nur bei negativem DNS-Ergebnis, zeitaufwendig, kostenintensiv) könnte hier Sicherheit bieten. Wenn auch bei der Periimplantitis die klinische Situation ausschlaggebend bleibt für die Diagnosestellung, so ist nach guter medizinischer Praxis vor jeder (systemischen) antimikrobiellen Therapie die mikrobiologische Untersuchung anzuraten. Eine Resistenztestung der verantwortlichen Bakterienarten erscheint nach der heutigen Situation i. allgem. noch nicht notwendig, da die Antibiotikaempfindlichkeit dieser Bakterienarten noch gut vorhersagbar ist (Mombelli und Lang 1998).

**Abbildung 1 (nur als Hardcopy dem Manuskript beigelegt),
Bild liegt Ihrem Verlag als Druckvorlage vor, z.B. wurde es im
„Aktuellen Stand der Parodontologie“ bereits verwendet.**

Abbildung 1:

Beispiel zum Nachweis von Parodontitis-Leitkeimen m.H. von DNS-Sonden (hier: 16S rRNA gerichtete Oligonukleotide).

Nach Entnahme subgingivaler Plaque durch den Parodontologen, werden die Nukleinsäuren der Probe im Labor isoliert und auf einer Nylonfolie immobilisiert (Dot- bzw. Slot-Blotting). Nach der Fixierung erfolgt die Hybridisierung des genetischen Materials mit radioaktiv oder z.B. Digoxigenin markierten DNS-Sonden. Die Detektion erfolgt dementsprechend direkt über Autoradiographie oder über Zugabe monoklonaler Antikörper, die mit dem Enzym alkalische Phosphatase konjugiert sind. Das Enzym spaltet anschließend ein Chemilumineszenz-Substrat und das emittierte Licht schwärzt einen Radiofilm. Durch Vergleich der Signalintensitäten von Probe und Referenz läßt sich die Art und die ungefähre Zellzahl der Bakterien in der Probe bestimmen.

Tabelle 1: Charakteristika designierter Periimplantitis/Parodontitis-Leitkeime.

Art	Bakterien- "Familie"	Erst- beschreibung	Gramverhalten, Morphologie	O ₂ -Ansprüche	Oxi- dase	Kata- lase	Signifikanz (+ - + + +)
<i>Actinobacillus actinomycetem.</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	Klinger 1912	negativ, Stäbe	fakultativ anaerob	-	+	Parodontitis + + +, Periimplantitis ++
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	Coykendall et al. 1980	negativ, pleomorphe Stäbe	obligat-anaerob	-	-	Parodontitis + + + Periimplantitis +
<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	Johnson et al. 1983	negativ, pleomorphe Stäbe	obligat-anaerob	-	-	Parodontitis ++ Periimplantitis + + +
<i>Treponema</i> spp.	<i>Spirochaetaceae</i>	Brumpt 1922	negativ, Spirochäten	obligat-anaerob	-	-	Parodontitis ++ Periimplantitis + + +
<i>Bacteroides forsythus</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	Tanner et al. 1986	negativ, fadenförmige Stäbe	obligat-anaerob	-	-	Parodontitis + + + Periimplantitis +
<i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>Cytophagaceae</i>	Leadbetter et al. 1979	negativ, Stäbe	fakultativ- anaerob, capnophil	-	-	Parodontitis + Periimplantitis +
<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Campylobacteraceae</i>	Tanner et al. 1981	negativ, Stäbe	obligat-anaerob	-	-	Parodontitis + Periimplantitis + + +
<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Pasteurellaceae</i>	Jackson und Goodman 1972	negativ, Stäbe	fakultativ-anaerob	+	+	Parodontitis + Periimplantitis ++
<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>Bacteroidaceae</i>	Knorr 1991	negativ, fusiforme Stäbe	obligat-anaerob	-	-	Parodontitis + Periimplantitis + + +
<i>Peptostreptococcus micros</i>	<i>Peptococcaceae</i>	Rogosa 1971	positiv, Kokken	obligat-anaerob	-	-	Parodontitis + Periimplantitis ?
<i>Eubacterium</i> spp.		Prévot 1938	positiv (-labil), Stäbe	obligat-anaerob	-	-	Parodontitis + Periimplantitis ?

Tabelle 2: Häufigkeit und maximaler Anteil von Bakterientaxa, die in Fällen von Periimplantitis dominierend im entzündeten Gewebe nachzuweisen waren (Augthun und Conrads 1997).

Bakterien-Taxon	Nachweis in n von 18 Materialien	Maximaler Anteil an der Gesamtpopulation [%]
<i>Bacteroidaceae</i> spp.	15	10,5
<i>Actinobacillus</i>		
<i>actinomycetemcomitans</i>	16	60
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	4	20
<i>Capnocytophaga</i> spp.	5	5,9
<i>Eikenella corrodens</i>	3	74,1

Tabelle 3: Anbieter einer bakteriologischen Diagnostik bei Parodontitis/Periimplantitis.

Firma	Adresse	Programm	Preis für Einzeltest (unverbindl.)
Labor und Vertrieb in Deutschland:			
Hain Diagnostika GmbH	72147 Nehren	DNS-Test (PCR + reverse Hybridisierung)	85 DM, Abweichungen durch GOÄ-Abrechnungen der Laboratoriumsmediziner möglich
LCL biokey GmbH	Pauwelsstraße 19, 52074 Aachen	DNS-Test (16S Sonden), Kultur	48 DM (DNS-Sonden), Preis für Kultur ist individuell
Labor in der Schweiz, deutscher Vertrieb:			
Identis Dentalprodukte GmbH	Am Taubenfeld 25/1, 69123 Heidelberg	DNS-Test (16S Sonden), Enzymtest	65 DM (DNS-Sonden), 55 DM (Enzymtest)
Wybert GmbH Elmex Forschung	Berner Weg 7, 79539 Lörrach	DNS-Test (genomische Sonden)	94,80 DM
Labor und Vertrieb in den Niederlanden:			
Laboral diagnostics	de Boelelaan 589, 1082 RM Amsterdam	Kultur	130 DM
Explore Research Lab.	PO Box 1476, 6501 BL Nijmegen	DNS-Test (16S Sonden)	94,50 DM

6 Literaturverzeichnis

1. ALBANDAR, J.M.; OLSEN, I.; GJERMO, P.: Associations between six DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica*. 48, 415-423 (1990)
2. ALI, R.W.; VELCESCU, C; JIVANESCU, M. C.; et al. : Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. *J Clin. Periodontol*. 23, 133-139 (1996)
3. ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER I.; et al.: Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol*. 11, 266-273 (1996)
4. AUGTHUN, M.; CONRADS, G.: Microbial findings of deep peri-implant bone defects. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants*. 12, 106-112 (1997)
5. BAUMAN, G.; RAPLEY, J.; HALLMON, W., et al.: The peri-implant sulcus. *Int. J. Oral. Maxillofac. Implants*. 8, 273-280 (1993)
6. BERGLUNDH, T.; LINDHE, J.; MARINELLO, C., et al.: Soft tissue reaction to de novo plaque formation on implants and teeth. An experimental study in the dog. *Clin. Oral. Implants. Res*. 3, 1-8 (1992)
7. BOUCLIN, R.; LANDRY, R. G.; NOREAU, G.: The effects of smoking on periodontal structures: a literature review. *J. Can. Dent. Assoc*. 63, 356, 360-353 (1997)
8. CONRADS, G.; FLEMMIG, T.; SEYFARTH, I., et al.: Simultaneous detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16S rRNA gene-directed multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol*. 37, 1621-1624 (1999)
9. CONRADS, G.; PELZ, K.; HUGHES, B.; et al.: Optimized oligonucleotides for the differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol. Immunol*. 12, 117-120 (1997)

10. DAVARPANA, M.; MARTINEZ, H.; KEBIR, F., et al.: Komplikationen und Mißerfolge bei der Osseointegration. *Parodontologie*. 3, 233-254 (1997)
11. DI MURRO, C.; PAOLANTONIO, M.; PEDRAZZOLI, V., et al.: Occurrence of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, and *Treponema denticola* in periodontally healthy and diseased subjects as determined by an ELISA technique. *J. Periodontol.* 68, 18-23 (1997)
12. EKE, P. I.; BRASWELL, L. D.; FRITZ, M. E.: Microbiota associated with consecutively placed loaded root-form and plate-form implants in adult *Macaca mulatta* monkeys. *J. Periodontol.* 67, 1329-1334 (1996)
13. FRENCH, C.K., SAVITT, E. D.; SIMON, S. L.; et al.: DNA probe detection of periodontal pathogens. *Oral Microbiol. Immunol.* 1, 58-62 (1986)
14. GEORGE, K.; ZAFIROPOULOS, G. G.; MURAT, Y., et al.: Clinical and microbiological status of osseointegrated implants. *J. Periodontol.* 65, 766-770 (1994)
15. GONCHAROFF, P.; FIGURSKI, D.H.; STEVENS, R.H.; et al.: Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: polymerase chain reaction amplification of *lktA*-specific sequences. *Oral Microbiol. Immunol.* 8, 105-110 (1993)
16. GROSS, M.; ABRAMOVICH, I.; WEISS, E.: Microleakage at the abutment-implant interface of osseointegrated implants: a comparative study. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 14, 94-100 (1999)
17. HAAS, R.; HAIMBOCK, W.; MAILATH, G., et al.: The relationship of smoking on peri-implant tissue: a retrospective study. *J. Prosthet. Dent.* 76, 592-596 (1996)
18. HAFFALEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.; et al.: The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. *J. Clin. Periodontol.* 19, 84-91 (1992)
19. JANSEN, V. K.; CONRADS, G.; RICHTER, E. J.: Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 12, 527-540 (1997)

20. KELLER, W.; BRAGGER, U.; MOMBELLI, A.: Peri-implant microflora of implants with cemented and screw retained suprastructures. *Clin. Oral Implants. Res.* 9, 209-217 (1998)
21. LINDHE, J.; BERGLUNDH, T.; ERICSSON, I., et al.: Experimental breakdown of peri-implant and periodontal tissues. A study in the beagle dog. *Clin. Oral. Implants Res.* 3, 9-16 (1992)
22. LIPPKE, J.A.; PEROS, P.J.; KEVILLE, M.W.; et al.: DNA probe detection of *Eikenella corrodens*, *Wolinella recta* and *Fusobacterium nucleatum* in subgingival plaque. *Oral Microbiol. Immunol.* 6, 81-87 (1991)
23. LISTGARTEN, M. A.; BUSER, D.; STEINEMANN, S. G., et al.: Light and transmission electron microscopy of the intact interfaces between non-submerged titanium-coated epoxy resin implants and bone or gingiva. *J. Dent. Res.* 71, 364-371 (1992)
24. LOESCHE, W. J.: DNA Probe and Enzyme Analysis in Periodontal Diagnostics. *J. Periodontol.* 63, 1102-1109 (1992)
25. LOESCHE, W. J.; LOPATIN, D. E.; GIORDANO, J., et al.: Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 427-433 (1992)
26. LOESCHE, W. J.; LOPATIN, D. E.; STOLL, J., et al.: Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: Can culture be considered the primary reference standard. *J. Clin. Microbiol.* 30, 418-426 (1992)
27. MEFFERT, R. M.: Periodontitis vs. peri-implantitis: the same disease? The same treatment? *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 7, 278-291 (1996)
28. Mombelli, A.; Lang, P. L.: The diagnosis and treatment of peri-implantitis. *Periodontology* 2000. 17, 63-76 (1998)

29. MOMBELLI, A.: Etiology, diagnosis, and treatment considerations in peri-implantitis. *Curr. Opin. Periodontol.* 4, 127-136 (1997)
30. MOMBELLI, A.; VAN OOSTEN, M. A.; SCHURCH, E., JR., et al.: The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol. Immunol.* 2, 145-151 (1987)
31. MURRAY, P.A.; FRENCH, C.K.: DNA probe detection of periodontal pathogens. (Series Ed: Meyers, WM New biotechnology in oral research) (Karger), Basel. 33-53 (1989)
32. MURRAY, P.A.; WINKLER, L.R.; PEROS, W.J.; et al.: DNA probe detection of periodontal pathogens in HIV-associated periodontal lesions. *Oral Microbiol. Immunol.* 6, 34-40 (1991)
33. ROSEBURY, T.; McDONALD, J. B.; CLARK, A. R.: A bacteriologic survey of gingival scrapings from periodontal infections by direct examination, guinea pig inoculation and anaerobic cultivation. *J. Dent. Res.* 29, 718-731 (1950)
34. ROSENBERG, E. S.; TOROSIAN, J. P.; SLOTS, J.: Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin. Oral Implants Res.* 2, 135-144 (1991)
35. SANZ, M.; ALANDEZ, J.; LAZARO, P., et al.: Histo-pathologic characteristics of peri-implant soft tissues in Branemark implants with 2 distinct clinical and radiological patterns. *Clin. Oral Implants Res.* 2, 128-134 (1991)
36. SLOTS, J.; ASHIMOTO, A.; FLYNN, M.J.; et al.: Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Clin. Infect. Dis.* 20, 304-307 (1995)
37. SLOTS, J.: Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol. Immunol.* 1, 48-55 (1986)

38. SMITH, G.L.F.; SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.M.: Non-isotopic DNA probes for the identification of subgingival microorganisms. *Oral Microbiol. Immunol.* 4, 41-46 (1989)
39. SOEHREN, S. E.: Similarities between the development and treatment of plaque-induced peri-implantitis and periodontitis. *J. Mich. Dent. Assoc.* 78, 32-36 (1996)
40. TONJUM, T.; HAAS, R.: Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by leukotoxin gene-specific hybridization and polymerase chain reaction assays. *J Clin. Microbiol.* 31, 1856-1859 (1993)
41. WATANABE, K.; FROMMEL, T.O.: Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the Polymerase Chain Reaction. *J. Dent. Res.* 6, 1040-1044 (1993)
42. ZAMBON, J. J.: Immunologic assays for putative periodontal pathogens. *Oral Microbiol. Immunol.* 1, 39-44 (1986)