

Die Mundschleimhaut als Reservoir für Parodontitis-Erreger - eine PCR-Studie

¹Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde (Direktor: Universitätsprofessor Dr. F. Lampert), ²Institut für Medizinische Mikrobiologie (Direktor: Universitätsprofessor Dr. R. Lütticken), Universitätsklinikum der RWTH Aachen; ³Abteilung für Parodontologie, Julius Maximilian Universität, Würzburg sowie Poliklinik für Parodontologie der Westfälischen Wilhelmsuniversität Münster.

*Während das Verteilungsmuster obligat anaerober Parodontitis-Erreger im Sulkus oder in der parodontalen Tasche gut beschrieben ist, interessierte in dieser Studie die Fähigkeit dieser Bakterien die oralen Mucosae als ökologische Nische (Reservoir) zu nutzen. Wir haben daher eine Multiplex-PCR evaluiert zum simultanen Nachweis von *Bacteroides forsythus* und *Prevotella intermedia* in vitro und in Abstrichen der Tonsillen-, Wangen-, bzw. Zungenmucosa. Bei dieser Methode wurden zwei Spezies-spezifische 16S rDNA-gerichtete Reverse Primer mit einem einzelnen konservierten Forward Primer kombiniert, um ein 660 bp (*P. intermedia*) bzw. ein 840 bp (*B. forsythus*) 16S rDNA-Fragment spezifisch mit einer Nachweisgrenze von 50-500 Zellen zu amplifizieren.*

- *4 (10,5 %) der 38 Tonsillen-Abstriche waren positiv für *P. intermedia* und ein Abstrich beinhaltete beide Spezies.*
- *Von den 38 untersuchten Wangenschleimhaut-Abstrichen war ein Material positiv für beide Spezies, 6 Materialien (15,8 %) positiv für *P. intermedia* und 4 (10,5 %) für *B. forsythus*.*
- *Bei der Untersuchung von 38 Zungenabstrichen ergaben sich 26,3 % positive Reaktionen-ausschließlich für *P. intermedia*.*

Die hier evaluierte Multiplex-PCR erscheint geeignet das Verteilungsmuster schwer zu kultivierender, obligat anaerober Bakterien in der Mundhöhle zu bestimmen. Die oralen Mucosae sind offensichtlich auch für sehr Sauerstoff-intolerante Spezies ein geeigneter Lebensraum.

*Schlüsselwörter: Parodontitis-Leitkeime, Multiplex-PCR, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus**

Oral mucosae as a reservoir for periodontopathic bacteria - a PCR study. *The distribution pattern of obligate anaerobic periodontopathic bacteria in the subgingival sulcus or in the deep periodontal pocket is well defined. The aim of our study was to clarify if these bacteria could in addition use oral mucosae as an ecological niche (reservoir). Therefore, we have evaluated a multiplex PCR for the simultaneous detection of Bacteroides forsythus and Prevotella intermedia in vitro and in swabs of tonsils-, buccal-, or tongue-mucosae. In this method we combined two species specific 16S rDNA directed reverse primers with a single conserved forward primer. A 660-bp (P. intermedia) and a 840-bp (B. forsythus) 16S rDNA-fragment were amplified with a detection limit of 50-500 cells per sample.*

- *4 (10,5 %) of 38 tonsils swabs were positive for P. intermedia only, and one specimen harbored both species.*
- *Of the 38 buccal mucosa swab samples, one was positive for both species, 6 (15,5 %) were positive for P. intermedia, and 4 (10,5 %) for B. forsythus.*
- *Investigating 38 tongue swabs, 26,3 % demonstrated P. intermedia but none was positive for B. forsythus.*

The multiplex PCR evaluated in the present study may assist to clarify the distribution pattern of obligate anaerobic and thus difficult to culture bacteria in the oral cavity. The oral mucosae seem to be an appropriate niche for highly oxygen-intolerant bacterial species.

Keywords: periodontitis marker, multiplex PCR, Prevotella intermedia, Bacteroides forsythus

1 Einleitung

In den letzten Jahren wurde eine zunehmende Anzahl von PCR-basierten Methoden etabliert zum entweder separaten oder simultanen Nachweis von anaeroben Parodontitis-Bakterien in der Mundhöhle, konzentriert auf die Arten *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *E. corrodens*, *P. gingivalis* und *P. intermedia* [1-8]. Dabei wurden vorzugsweise 16S rDNA-gerichtete Primer ausgesucht zum direkten Nachweis verschiedener Spezies in einer einzigen PCR-Reaktion (Multiplex-Variante). Aufgrund der universellen Verbreitung dieses Gens innerhalb der Bakterien kann ein universeller Primer mit verschiedenen Spezies-spezifischen Partner-Primern kombiniert werden. Aus diesem Grunde läßt sich die Anzahl der notwendigen Primer auf die Zahl $n + 1$ (n = Anzahl der Spezies) reduzieren, wodurch auch die Komplexität und damit Oligonukleotid-Interaktionen und -Inhibitionen reduziert werden.

Diese PCR-Variante spart Zeit, Personal und Kosten und macht weiterhin durch den simultanen Nachweis Studien zur Ko-Prävalenz der verschiedenen Bakterienarten einfacher und zuverlässiger. Es wurden solche Multiplex-PCR-Varianten bereits etabliert zum Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* simultan zu *P. gingivalis* [9, 10] oder simultan zu *E. corrodens* [11]. Die hier publizierte simultane PCR-Detektion von *B. forsythus* und *P. intermedia* ergänzt die bereits etablierten Tests.

2 Material und Methode

2.1 Patientenkollektiv

Die 152 klinischen Proben (Abstriche der Wangen-, Zungen-, Tonsillen-Mucosae, subgingivale Plaque) von 38 AP-Patienten (unbehandelt), wurden konsekutiv in der Abteilung für Parodontologie, Julius Maximilian Universität, Würzburg, entnommen. Das Alter der Patienten betrug 51.8 ± 11.0 ; die Geschlechtsverteilung Frauen: Männer betrug 21:17. Klinische Parameter: periodontal probing depth: PPD 4-6 mm: $31.4\% \pm 11.9$, PPD ≥ 7 mm: $4.5\% \pm 6.3$; bleeding on probing (BOP): $53.8\% \pm 32.3$. Patienten mit einer systemischen Antibiotika-Therapie in den letzten 6 Monaten vor dem Untersuchungszeitraum wurden aus der Studie ausgeschlossen.

2.2 Bakterienstämme

Als Positivkontrolle dienten die Stämme *Bacteroides forsythus* ATCC 43037^T, FR 001/12-3, FR 002/23-2, FR 004/13-4, FR 007/24-6, FR 009/11-6; *Prevotella intermedia* ATCC 25611^T, A735, FR 023/26, FR 028/11, H91-360/1, H91-1880/2, Hg404, Hg1103, Hg1269, MH6; als Negativkontrolle wurden weiterhin die Stämme *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ATCC 33384^T, *Actinomyces israelii* ATCC 12102^T, *A. gerencseriae* ATCC 23860^T, *A. odontolyticus* DSM 43331, *Capnocytophaga gingivalis* ATCC 33624^T, *C. granulosa* ATCC 51502^T, *C. haemolytica* ATCC 51501^T, *C. ochracea* ATCC 33596, *C. sputigena* ATCC 33612^T, *Eikenella corrodens* ATCC 23834^T, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586^T, *Haemophilus aphrophilus* ATCC 33894^T, *Peptostreptococcus micros* ATCC 33270^T, *Porphyromonas asaccharolytica* ATCC 25260^T, *P. gingivalis* ATCC 33277^T, *Prevotella corporis* A350, *P. nigrescens* ATCC 33563^T, *Propionibacterium propionicum* NCTC 12967,

Rothia dentocariosa GH 399, *Stomatococcus mucilaginosus* MCCM 00557, *Streptococcus intermedius* DSM 20573, *S. mutans* NCTC 11060, und *S. salivarius* DSM 20068 verwendet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Bei der hier vorgestellten Multiplex-PCR-Methode wurden zwei Spezies-spezifische 16S rDNA-gerichtete Reverse Primer in Kombination mit einem einzelnen konservierten Forward Primer genutzt, um ein 660 bp (*P. intermedia*) bzw. ein 840 bp (*B. forsythus*) 16S rDNA-Fragment der Bakterien (Genetischer Fingerabdruck) in den klinischen Proben nachzuweisen.

Primersequenzen:

pA: Forward Primer als universeller Primer zur Amplifizierung des 16S rRNA-Gens bei Eubakterien:

5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3'

Pi: Reversed Primer als spezifischer Primer zum Nachweis von *P. intermedia*:

5' GTT GCG TGC ACT CAA GTC CGC C 3' [12]

BFV530: Reversed Primer als spezifischer Primer zum Nachweis von *B. forsythus*:

5' GTA GAG CTT ACA CTA TAT CGC AAA CTC CTA 3' for the detection of *B. forsythus* [13]

Alle weiteren Details zur Durchführung der Multiplex-PCR ist einer früheren Publikation unserer Arbeitsgruppe zu entnehmen [14].

3 Ergebnisse

Für die Sensitivität und Spezifität der Multiplex-PCR wurden folgende Werte ermittelt: Bei Verwendung einer 1:1 Mischung reiner Kulturen von *B. forsythus* und *P. intermedia* konnte die Multiplex-PCR noch 50 bis 500 CFU (Colony forming units) jeder Spezies nachweisen. Das Detektionslimit wurde leicht erhöht durch Zusatz von Nukleinsäure aus subgingivaler Plaque (auf 100 bis 1.000 CFU). Ein 660 bp Amplifikat wurde nachgewiesen für alle 10 Stämme von *P. intermedia* bzw. ein 840 bp Amplifikat für alle 6 Stämme von *B. forsythus*, die als Positiv-Kontrolle in dieser Studie verwendet wurden. Keine Amplifikation wurde sichtbar nach Verwendung von 100 ng Nukleinsäure, isoliert aus 23 repräsentativen Stämmen anderer oraler Bakterien-Spezies.

Die so evaluierte Multiplex-PCR wurde eingesetzt, um in den insgesamt 152 klinischen Materialien die Prävalenz von *B. forsythus* und/oder *P. intermedia* zu untersuchen (Repräsentatives Ergebnis in Abb. 1) und es wurde das folgende Ergebnis ermittelt (Tab. 1): a) In fünf der subgingivalen Plaque-Proben (13,2%) der Individuen mit parodontalen Entzündungen konnten beide Spezies nachgewiesen werden; elf Materialien (28,9%) wiesen nur *B. forsythus* und eine Probe (2,6%) nur *P. intermedia* auf. b) Vier der 38 Tonsillen-Abstriche (10,5%) waren positiv für *P. intermedia* und ein Abstrich beinhaltete *B. forsythus* und *P. intermedia*. c) Von den untersuchten Wangenschleimhaut-Abstrichen, war ein Material positiv für *B. forsythus* und *P. intermedia*, sechs Materialien (15,8%) waren positiv für *P. intermedia* allein und vier (10,5%) positiv für *B. forsythus* allein. d) Bei der Untersuchung der Zungenabstriche ergaben sich 10 positive Reaktionen (26,3%) für die *P. intermedia*-spezifische Amplifikation; *B. forsythus* wurde in keinem der Zungenabstriche nachgewiesen. Keine der beiden untersuchten parodontopathogenen Spezies wurde nachgewiesen in 21 der 38 Proben subgingivaler Plaque, in 33 der 38 untersuchten Tonsillen-Abstriche, in 27 der 38 Wangenschleimhaut-Abstriche, und in 26 der 38 Zungenabstriche. Um den Einfluß inhibitorischer Bestandteile als eine Hauptursache für eine negative Reaktion auszuschließen, wurde eine universelle 16S rDNA-gerichtete PCR (pA/pR1) durchgeführt und war in allen Fällen positiv. Die Nachweisgrenze für Bakterien in klinischem Material konnte verbessert werden durch Zusatz von Chelex 100 Harz zu den klinischen Materialien vor der Aufbereitung. Dieses Harz akkumuliert störende Kationen, so daß die Sensitivität für die PCR um ca. eine Zehnerpotenz erhöht werden konnte.

4 Diskussion

In der hier beschriebenen Studie stellte sich die Sensitivität der Multiplex-PCR mit zunächst 500-1.000 CFU als niedriger heraus, als sie von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde. Die meisten der klinischen Materialien wurden in dieser Studie über die einfache Aufkoch-Methodik aufbereitet. Eine weitere Erhöhung der Sensitivität ließ sich primär durch Erniedrigung der Annealing-Temperatur und Erhöhung der Magnesium-Konzentration, als die kritischen Faktoren in der PCR-Reaktion, erreichen. So konnte durch Modulation dieser Faktoren die beschriebene Multiplex-PCR zum Nachweis von *B. forsythus* und *P. intermedia* tatsächlich auf 1 bis 5 bakterielle Zellen herabgesetzt werden, was jedoch auf Kosten einer erniedrigten Spezifität geschah. Speziell bei Untersuchungen so gemischter Populationen, wie

sie in der subgingivalen Plaque vorkommen, ist eine hohe Spezifität der hohen Sensitivität vorzuziehen. Aus diesem Grunde wurde die Annealing-Temperatur bei 55 °C und die MgCl₂-Konzentration bei 1,5 mM belassen. Unter Verwendung der Multiplex-PCR zeigten sich 111 der 152 untersuchten Proben subgingivaler Plaque und Schleimhautabstriche (73,0%) als negativ für die beiden untersuchten Spezies. Aufgrund der Tatsache, daß diese Materialien zwischen 30 und 100 verschiedene Spezies enthalten, unterstreicht dieses Ergebnis zunächst die hohe Spezifität der Multiplex-PCR. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß in Materialien mit sehr geringer Konzentration der Zielgruppen-Bakterien und/oder bei Vorhandensein inhibitorischer Bestandteile, wie zum Beispiel Kationen, falsch-negative Ergebnisse die Folge sind [15, 16]. Kürzlich wurde der Einfluß des Harzes Chelex 100 zur Verbesserung der PCR-Sensitivität beschrieben [3]. Dieses Chelex 100-Processing wird vor dem Aufkochen des klinischen Materials durchgeführt. Zur Klärung des Einflusses dieses Harzes wurde unsere Studie erweitert durch die Untersuchung von jeweils drei weiteren Proben subgingivaler Plaque und von Schleimhautabstrichen, wobei diese Abstriche mit je 10-1000 *B. forsythus* und *P. intermedia*-CFU angereichert wurden. Die Verwendung des Chelex 100-Harzes vor dem Aufkochen der Probe erhöhte nachweislich die Sensitivität der PCR um eine Zehnerpotenz, so daß noch 50 CFU pro klinischem Material nachzuweisen waren. Zur Erhöhung der Sensitivität bei der beschriebenen Multiplex-Variante zum PCR-Nachweis von *B. forsythus* und *P. intermedia* sollte das Chelex 100 zukünftig regulär eingesetzt werden.

Aus den Ergebnissen unserer Studie lassen sich weitere interessante Aspekte für die Verbreitung von Parodontitis-Bakterien innerhalb der Mundhöhle ableiten. Frühere Studien [2, 13] untersuchten die Anwesenheit von *B. forsythus* nur für subgingivale Plaque. Die hier publizierte Studie ist die erste ihrer Art, die die Lokalisation dieses obligat-anaeroben Bakteriums in anderen ökologischen Nischen der Mundhöhle nachweist. Die Wangenschleimhaut stellt offensichtlich eine geeignete Nische für *B. forsythus* dar. In 13,1% der buccalen Schleimhautabstriche konnte dieser Keim nachgewiesen werden. *B. forsythus* war in der Tonsillen-Schleimhaut sehr selten und in der Zungen-Schleimhaut nicht nachweisbar, auch bei Patienten mit unbehandelter Parodontitis. Erstaunlicherweise war die Prävalenz von *P. intermedia* besonders hoch auf den dorsalen Flächen der Zunge (26,3%). Wir konnten bestätigen, daß *B. forsythus* und auch *P. intermedia* in der subgingivalen Plaque bei Parodontitis-Patienten zu finden sind (42,1 und 15,8%), wobei als Nachweisgrenze wieder 500 CFU anzusetzen ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die hier vorgestellte Multiplex-PCR ein rasches Verfahren darstellt, um relevante Zellzahlen der putativen parodontopathogenen Spezies *B. forsythus* und *P. intermedia* in verschiedenen klinischen Materialien nachzuweisen. Der Nachweis dieser spezifischen Bakterien bei der zahnärztlichen Behandlungsplanung erscheint hilfreich. Aus diesem Grunde wurden bereits verschiedene Laboratorien eingerichtet, um die mit der Post versandten klinischen Materialien der Patienten auf das Vorhandensein der Parodontitis-Leitkeime zu untersuchen. Weiterhin sind bereits eine Reihe von ‘chairside-tests’ auf dem Markt [17, 18]. Diese Tests beruhen jedoch hauptsächlich auf Dot-Blot-Hybridisierungsmethoden unter Verwendung genomischer oder Oligonukleotid-basierender DNA-Sonden. Die in dieser Studie evaluierte PCR-Methode kann dazu beitragen, die Notwendigkeit einer begleitenden Antibiotika-Therapie bei einer aggressiven Parodontalerkrankung abzuschätzen. Darüber hinaus könnte das Risiko für die Progression einer Parodontalerkrankung, auch nach Behandlung, durch die Persistenz der betrachteten Leitkeime [19] mit Hilfe der Multiplex-PCR abgeschätzt werden. Obwohl schon länger bekannt ist, daß obligat anaerobe Bakterien die oralen Schleimhäute besiedeln und dort sogar eine Schutzfunktion ausüben (Aufbau einer Redoxpotential-Barriere zur Vermeidung der Besiedlung durch fakultativ bzw. aerobe Pathogene), zeigt diese Studie, daß die Mucosae sogar für extrem anaerob lebende Bakterien ein geeigneter Lebensraum darstellen und daher nach „Eradikation“ der Parodontitis-Leitkeime in der subgingivalen Zahnfleischtasche als Reservoir für eine Rekolonisation fungieren können.

Korrespondenzadresse:

Priv.-Doz. Dr. Georg Conrads

Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde

Universitätsklinikum der RWTH in Aachen

Pauwelsstraße 30, D-52057 Aachen

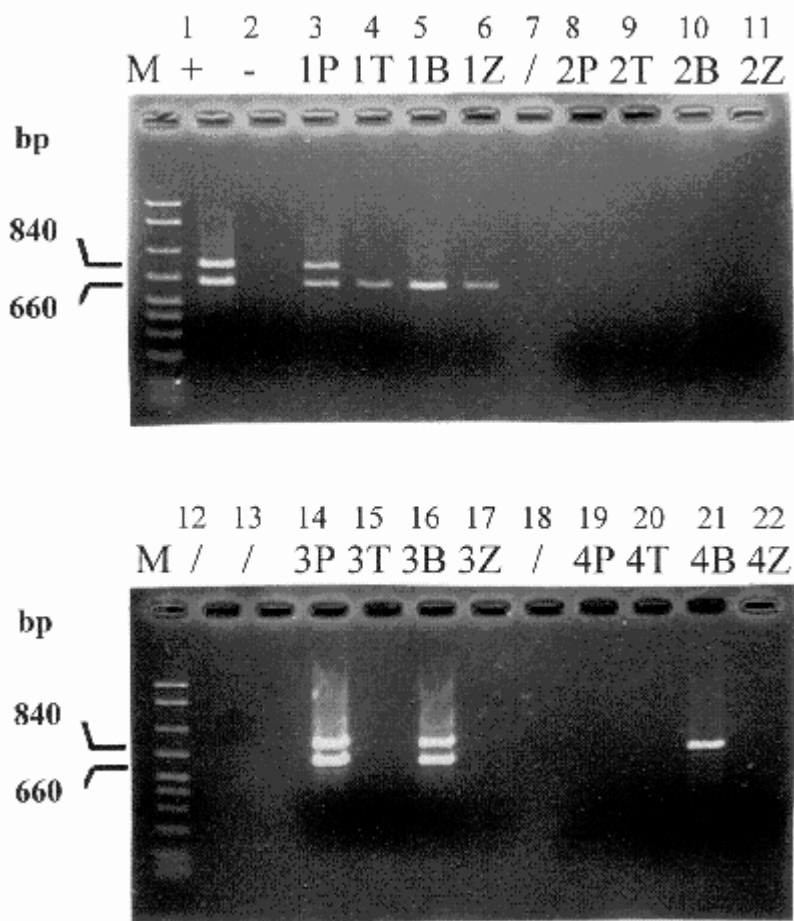


Abbildung 1: Multiplex-PCR Analyse der subgingivalen Plaque (1P-4P), Tonsillen- (1T-4T), Wangen- (1B-4B) und Zungen-(1Z-4Z)-Abstriche: M: 50-2.000 bp ladder; Spur 1: Positivkontrolle mit jeweils 100 ng *B. forsythus* bzw. *P. intermedia*-DNA; Spur 2: Negativkontrolle ohne Template-DNA; Spur 3-6: Patient 1 zeigt beide Spezies in subgingivaler Plaque (1P), während in den drei Abstrichen nur *P. intermedia*-DNA zu finden war; Spur 8-11: Patient 2 ist negativ für beide Parodontopathogene in allen Materialien; Spur 14-17: Patient 3: In subgingivaler Plaque, aber auch auf der Wangenschleimhaut sind beide Spezies nachweisbar; Spur 19 bis 22: Patient 4 ist mit *B. forsythus* in der Wangenschleimhaut besiedelt.

Tabelle 1: Nachweis von *B. forsythus* und *P. intermedia* mittels Multiplex-PCR in Proben subgingivaler Plaque (P) sowie in Abstrichen der Tonsillen (T), Wangenschleimhaut (B) und Zunge (Z) bei 38 Parodontitis-Patienten.

Patient	<i>B. forsythus</i> ohne <i>P. intermedia</i>	<i>P. intermedia</i> ohne <i>B. forsythus</i>	<i>B. forsythus</i> mit <i>P. intermedia</i>
1	-	+ (T, B, Z)	+ (P)
2	-	-	-
3	-	-	+ (P, B)
4	+ (B)	-	-
5	-	+ (Z, P)	-
6	-	+ (B)	-
7	+ (P)	-	-
8	-	-	-
9	+ (P)	-	-
10	+ (B)	-	-
11	+ (P)	+ (B)	-
12	-	-	-
13	-	-	-
14	-	-	-
15	-	-	-
16	-	+ (Z)	-
17	+ (P)	-	-
18	-	+ (T, B, Z)	-
19	-	+ (T)	-
20	-	+ (B)	+ (P)
21	+ (P)	-	-
22	-	+ (T, Z)	-
23	+ (P, B)	-	-
24	-	-	-
25	+ (B)	+ (Z)	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	+ (P)	+ (Z)	-
30	-	+ (B, Z)	-
31	+ (P)	+ (Z)	-
32	-	-	-
33	-	-	-
34	+ (P)	+ (Z)	+ (T)
35	-	-	+ (P)
36	+ (P)	-	-
37	-	-	+ (P)
38	+ (P)	-	-

Literatur

1. Leys, E. J., Griffen, A. L., Strong, S. J., Fuerst, P. A.: Detection and strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by nested PCR. Clin. Microbiol. Rev. 32, 1288 (1994).
2. Meurman, J. H., Wahlfors, J., Korhonen, A., Alakuijala, P., Vaisanen, P., Torkko, H.; Janne, J.: Identification of *Bacteroides forsythus* in subgingival dental plaque with the aid of a rapid PCR method. J Dent Res 76, 1376 (1997).
3. Mättö, J., Saarela, M., Alaluusua, S., Oja, V., Jousimiessomer, H.; Asikainen, S.: Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. J Clin Microbiol 36, 157 (1998).
4. Guillot, E.; Mouton, C.: A PCR-DNA probe assay specific for *Bacteroides forsythus*. Mol Cell Probes 10, 413 (1996).
5. Guillot, E.; Mouton, C.: PCR-DNA probe assays for identification and detection of *Prevotella intermedia* sensu stricto and *Prevotella nigrescens*. J Clin Microbiol 35, 1876 (1997).
6. Wittstock, M., Flemmig, T. F., Schmidt, H., Mutters, R.; Karch, H.: Serodiagnosis of *Porphyromonas gingivalis* infection by immunoblot analysis with recombinant collagenase. J Clin Microbiol 34, 2411 (1996).
7. Flemmig, T. F., Rüdiger, S., Hofmann, U., Schmidt, H., Plaschke, B., Strätz, A., Klaiber, B.; Karch, H.: Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. J Clin Microbiol 33, 3102 (1995).
8. Conrads, G., Mutters, R., Fischer, J., Brauner, A., Lütticken, R., Lampert, F.: PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals. J Periodontol 67, 994 (1996).
9. Tran, S. D., Rudney, J. D.: Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. J Clin Microbiol 34, 2674 (1996).
10. Wahlfors, J., Meurman, J. H., Vaisanen, P., Alakuijala, P., Korhonen, A., Torkko, H.; Janne, J.: Simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* by a rapid PCR method. J Dent Res 74, 1796 (1995).
11. Furcht, C., Eschrich, K., Merte, K.: Detection of *Eikenella corrodens* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by use of the polymerase chain reaction (PCR) in vitro and in subgingival plaque. J Clin Periodontol 23, 891 (1996).

12. *Conrads, G., Pelz, K., Hughes, B., Seyfarth, I., Devine, D. A.:* Optimized oligonucleotides for the differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol* 12, 117 (1997).
13. *Gersdorf, H., Pelz, K., Krekeler, G., Göbel, U. B.:* Identification of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque from patients with advanced periodontitis. *J Clin Microbiol* 31, 941 (1993).
14. *Conrads, G., Flemmig, T. F., Seyfarth, I., Lampert, F, Lütticken, R.:* Simultaneous detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16S rRNA gene-directed multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 37, 1621 (1999).
15. *Amicosante, M., Richeldi, L., Trenti, G., Paone, G., Campa, M., Bisetti, A., Saltini, C.:* Inactivation of polymerase inhibitors for *Mycobacterium tuberculosis* DNA amplification in sputum by using capture resin. *J Clin Microbiol* 33, 629 (1995).
16. *Johnson, S. R., Martin, D. H., Cammarata, C, Morse, S. A.:* Alterations in sample preparation increase sensitivity of PCR assay for diagnosis of chancroid. *J Clin Microbiol* 33, 1036 (1995).
17. *Van Arsdell, S. W., DiFronzo, F., Backman, K. C., Mahler, P. H.:* Selling biotechnology in the dental medicine marketplace: the OmniGene Diagnostics DNA probe tests for periodontal pathogens. *Technol Health Care* 4, 339 (1996).
18. *Yano, K., Takamatsu, N., He, T., Umeda, M., Ishikawa, I.:* Evaluation of non radioactive DNA probe (Affirm DP) for detecting periodontopathic bacteria. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 63, 482 (1996).
19. *Machtei, E. E., Dunford, R., Hausmann, E., Grossi, S. G., Powell, J., Cummins, D., Zambon, J. J., Genco, R. J.:* Longitudinal study of prognostic factors in established periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 24, 102 (1997).