

Molekularbiologische Verfahren in der Anaerobier-, speziell Parodontitiserreger-Diagnostik

G. Conrads

Institut für Medizinische Mikrobiologie sowie Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde, Universitätsklinikum, RWTH Aachen

Schlüsselwörter: Gensonden, Polymerase-Kettenreaktion, Anaerobier-Diagnostik, Parodontitis-Diagnostik, DNA-Chips.

Einleitung

Dieser Beitrag soll den Leser über aktuelle und zukünftige Entwicklungen in der molekulargenetischen Diagnostik anaerober Infektionen und deren Erreger informieren, wobei die vorgestellten Methoden bislang nur für die Diagnostik der Leitkeime einer marginalen Parodontitis zu Routinetests ausgereift wurden. Gerade diese Diagnostik wird zur Zeit propagiert und stellt eine Erweiterung des konventionellen Spektrums für mikrobiologische Laboratorien dar.

Die Molekularbiologie hat in den letzten Jahren viele Gebiete der Medizin revolutioniert. Speziell in der medizinischen Mikrobiologie wird ein breites Spektrum von Verfahren eingesetzt, um zum Beispiel nicht oder schwer zu kultivierende Mikroorganismen, darunter obligat anaerob-lebende Bakterien, nachzuweisen. Zudem dienen diese Verfahren der Typisierung anzüchtbarer Bakterien und der Aufklärung epidemiologischer Zusammenhänge. Nukleinsäure-Hybridisierungstechniken unter Verwendung von genomischen oder Oligonukleotid-Sonden stellen wesentliche Verfahren in der molekularen Medizin dar. Eine Sonde ist dabei eine Sequenz einzelsträngiger Nukleinsäure, die in der Lage ist, mit ihrer komplementären Zielsequenz über Nukleinsäure-Basenpaarungen sehr spezifisch zu hybridisieren. Sonden können eingesetzt werden zum Nachweis der DNA oder RNA von Mikroorganismen. DNA-Sonden können aus nur 18 bis 35 Nukleotiden oder, bei genomischen DNA-Sonden, aus mehreren tausend Nukleotiden bestehen. Das Basisprinzip der DNA-Sonden-Technologie ist dabei die Hybridisierung, die eine Denaturierung der doppelsträngigen DNA, bzw. doppelsträngiger Bereich der RNA, zu Einzelsträngen und den Nachweis dieser Einzelstränge mit markierter, komplementärer Sonden-DNA einschließt. Die

Sonden-Hybridisierung kann genutzt werden, um genetische Verwandtschaft in der DNA / RNA verschiedener Organismen nachzuweisen. Dazu kann mittlerweile ein ganzer Satz von Sonden eingesetzt werden, die gegen verschieden konservierte Bereiche, zumeist der 16S rRNA/DNA, gerichtet sind (1). Im mikrobiologisch-diagnostischen Laboratorium können DNA-Sonden bereits routinemäßig eingesetzt werden zur taxonomisch exakten Bestätigung der Identität von wichtigen klinischen Isolaten, zum Beispiel *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, Mykobakterien, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* oder *Streptococcus pneumoniae* (2, 3; Gen-Probe Inc., St. Diego, USA). Weiterhin werden DNA-Sonden und PCR-Technologie zunehmend von Routinelaboratorien genutzt, um kulturell anspruchsvolle Organismen und damit auch obligat anaerob lebende Bakterien direkt im klinischen Material nachzuweisen.

Gensonden zur Diagnostik anaerober Infektionen

Zur Unterstützung der Diagnostik allgemeiner anaerober Infektionen haben Gensonden bislang nur ein geringes Einsatzgebiet gefunden. So haben Greisen und Mitarbeiter (1) eine Gensonde entwickelt, um die *Bacteroides-Flavobacterium*-Gruppe gegenüber anderen pathogenen Bakterienarten abzugrenzen. In unserer Arbeitsgruppe wurde eine *Actinomycetales*-Gruppe spezifische Sonde publiziert, um die Diagnostik der Aktinomykose, verursacht durch eine Vielzahl verschiedener, fermentierender Aktinomyzeten, zu unterstützen (4). Weiterhin werden Gensonden eingesetzt, um Resistenz- oder Virulenzgene bei obligat anaeroben Bakterien zu detektieren. Lacroix et al. analysierten die Tetrazyklin-Resistenz bei *Prevotella*- bzw. *Bacteroides*-Spezies über den Nachweis des TetQ-Gens (5) und Daube et al. haben Sonden entwickelt, um die Toxingene bei *Clostridium perfringens* zu differenzieren (6). Den größten Einsatzbereich haben die Gensonden aber im Bereich der Parodontitiserreger-Diagnostik gefunden. Die marginale Parodontitis wird nach dem heutigen Stand der Wissenschaft als eine odontogene Infektion mit einem typischen (meist anaeroben) Leitkeimspektrum betrachtet, dessen Zusammensetzung für die Prognose der Erkrankung wesentlich ist. Die hier seit einigen Jahren etablierten Verfahren sollen im folgenden ausführlicher beschrieben werden, da sie in Zukunft auch breitere Anwendung in der medizinischen Mikrobiologie finden werden.

Genomische DNA-Sonden und Plasmid-Sonden: French und Mitarbeiter führten 1986 den ersten Nachweis der Parodontitis-Erreger *Prevotella intermedia* und *Porphyromonas gingivalis* mit Hilfe gereinigter gesamtgenomischer DNA der beiden Spezies, die im Nick-

Translationsverfahren radioaktiv mit ^{32}P bzw. nicht radioaktiv mit Biotin-11-dUTP markiert wurde (7). Die Sensitivität der Sonden lag zwischen 10^2 und 10^3 Bakterienzellen pro Probe. In der Folge wurden diese Versuche von verschiedenen Autoren (8-12) 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 ausgeweitet wurde (genomische Sonden für *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Treponema denticola*; klonierte Plasmidsonden: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Bacteroides forsythus*). Dieses Testverfahren ist registriert und in Teilen durch die Firma OmniGene patentiert. Die Sonden werden von den ANAWA-Laboratorien AG (Wangen, Schweiz) auch zur Routineuntersuchung subgingivaler Plaque bei der Fragestellung einer Parodontopathie eingesetzt. Der Vertrieb entsprechender Probeentnahmekits (meridol-DNS-Sondentest) an interessierte Zahnarztpraxen erfolgt in Deutschland durch die Firma Wybert GmbH (Lörrach). Die Proben werden über die Wybert GmbH als Zwischenstation den ANAWA-Laboratorien zugesandt und dort zentral bearbeitet.

Bei dem meridol-DNS-Sondentest sind folgende Einschränkungen zu beachten:

- a) Kreuzreaktivität einiger Sonden mit Spezies, die in enger Verwandtschaft zum Zielorganismus stehen. Mit ca. 1 Prozent ist die Reaktion im allgemeinen jedoch von geringer klinischer Relevanz.
- b) Das Verfahren ist seit der Etablierung Mitte der achtziger Jahre wenig geändert worden; so detektiert die gegen *P. intermedia* gerichtete Sonde auch den Genotyp II, der mittlerweile als *Prevotella nigrescens* reklassifiziert wurde und bei marginalen Parodontitiden wohl von geringer ätiologischer Bedeutung ist (13, 14).

Insgesamt gibt es aber mit dieser Verfahrensweise die bislang größten Erfahrungen, und es hat weltweit – und so auch im deutschsprachigen Bereich – die größte Verbreitung zur Untersuchung von Routineproben, eingesandt durch niedergelassene Zahnärzte und Universitätszahnkliniken, gefunden.

Oligodeoxynukleotid-Sonden: Chuba in der Arbeitsgruppe von Göbel setzte 1988 als erster Oligodeoxynukleotid-Sonden, die sich gegen die 16S rRNA richteten, ein, um die Parodontitis-Erreger *P. gingivalis* und *A. actinomycetemcomitans* nachzuweisen (15). 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 Prozent angegeben (unter optimalen Hybridisierungsverhältnissen), die Sensitivität der mit ^{32}P markierten Sonden lag bei der Nukleinsäuremenge von 1 bis 5×10^3 Zellen / Dot. Dix und Moncla entwickelten 1990 artspezifische, gegen 16S rRNA gerichtete DNA-Sonden (Länge 24 Basen, ^{32}P markiert) zur Erfassung von *A. actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* Genotypen I und II, *E. corrodens*, *F. nucleatum* und *C. rectus* (16). Zudem zeigten sie, daß es mit diesen Sonden prinzipiell möglich ist, einzelne Bakterienarten in der extrem heterogenen Plaque der betroffenen Parodontalbereiche spezifisch nachzuweisen. Die Spezifität und Sensitivität ihrer DNA-Sonden war vergleichbar mit den Werten der Göbel-Gruppe.

Das Verfahren der Oligodeoxynukleotid-Sondendiagnostik wird exemplarisch in der **Abbildung 1** dargestellt.

Mittlerweile werden ähnlich Oligonukleotidsonden zur Detektion von Parodontopathogenen auch von Routine-Laboratorien eingesetzt. So benutzt die Firma IAI (Institut für Angewandte Immunologie, Zuchwil, Schweiz) selbstentwickelte Oligonukleotidsonden zur Untersuchung der subgingivalen Plaque (IAI PadoTest 4.5[®]). Der Vertrieb für Deutschland geschieht durch Identis Dentalprodukte GmbH, Heidelberg. Die Untersuchung der Proben wird hierbei ebenfalls zentral in der Schweiz durchgeführt.

Einschränkungen bei dem PadoTest bestehen bezüglich folgender Gesichtspunkte:

- a) 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.
- b) Das Verfahren berücksichtigt nicht die Art *P. intermedia* sensu stricto. Der Nachweis von *E. corrodens* und *F. nucleatum* ist prinzipiell zwar möglich, wurde aber aufgrund der unklaren klinischen Relevanz dieser Spezies nicht in das Standardprogramm aufgenommen.
- c) Die Spezifität der kommerziell verwendeten 16S-rRNA-gerichteten DNA-Sonden ist zwar anzunehmen, exakte Daten zur diagnostischen Sensitivität und Spezifität des PadoTests wurden jedoch bislang nicht publiziert.

Oligonukleotidsonden zeichnen sich durch eine hohe Stabilität aus. Ihre Spezifität läßt sich, im Gegensatz zu genomischen Sonden, nicht nur empirisch ermitteln, sondern auch durch

16S-rRNA / DNA-Sequenzvergleich mit Datenbanken (z. B. *Ribosomal Database Project*, Illinois, USA oder *arb*, Institut für Mikrobiologie der Universität München) absichern.

Auf der Basis des 16S-rRNA-Nachweises wurde auch der LCL[®] Parodontitis-Test der Firma LCL biokey GmbH (Medizintechnisches Zentrum, Aachen) aufgebaut. Die Sensitivität dieses DNA-Sondentests wird mit 10^2 bis 10^3 Zellen pro Dot angegeben und dürfte somit ausreichend für die Diagnostik der Parodontitis sein. Dieses Verfahren berücksichtigt auch die Art *P. intermedia*, was einen Vorteil gegenüber dem IAI-Verfahren darstellt. Die Proben werden von LCL zentral in Aachen untersucht, wobei zur Verkürzung der Proben-Transportzeiten eine Kooperation mit niedergelassenen Mikrobiologen angestrebt wird.

Neben dem direkten Nachweis von obligat anaeroben Bakterien in klinischen Materialien, finden Oligonukleotide zur Differenzierung nah verwandter Bakterienarten zunehmendes Interesse. Es sind DNA-Sonden publiziert zur Differenzierung von *Prevotella*- (13), *Capnocytophaga*- (17), *Peptostreptococcus*- (18), oder *Clostridium*-Spezies (19). Die **Abbildung 2** beschreibt beispielhaft die Differenzierung von *Prevotella intermedia* und *Prevotella nigrescens* mit Hilfe von DNA-Sonden. Diese beiden Spezies werden in dem rapid ID32A-Detektionssystem (bioMérieux) beide als "*Prevotella intermedia*" diagnostiziert, können aber auf genetischer Ebene mit Hilfe der DNA-Sonden klar unterschieden werden, was auch durch Multilocus-Enzym-Elektrophorese oder Ribotypisierung bestätigt wird. Die Differenzierung beider Bakterienarten ist aufgrund ihrer unterschiedlichen klinischen Bedeutung relevant (14).

PCR-Diagnostik bei anaeroben Infektionen

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction, PCR*) ist eine hoch sensitive Technik, mit der geringste Mengen von spezifischen DNA- oder RNA-Sequenzen nach enzymatischer Amplifikation auf eine genügend hohe Menge angereichert werden können, so daß eine Detektion möglich wird (20). Der Ursprung dieser Entwicklung liegt in der Grundlagenforschung von Mullis und Mitarbeitern an der Cetus Corporation und dem Department of Human Genetics, Emeryswill, USA (21-23). Die Technik kann eingesetzt werden, um spezifische Nukleinsäure auch in klinischen Materialien, in denen bakterielle, virale- oder eumyzetische Erreger als Ursache vermutet werden, nachzuweisen. Das Fundament der Technologie sind wiederum Signatursequenzen innerhalb der DNA- oder RNA-Komposition, durch die jeglicher Organismus detektiert oder differenziert werden kann.

In der PCR-Methodik wird ein von spezifischen Oligonukleotiden flankierter DNA-Bereich durch wiederholte Denaturierung der Ziel-DNA (*Target, Template*), Anlagerung der Oligonukleotide und Polymerisation über 20 bis 35 Zyklen hinweg amplifiziert und dadurch sichtbar gemacht. Verschiedene Modifikationen der ursprünglichen PCR-Technik sind mittlerweile beschrieben worden. In der Applikation der *Multiplex-PCR* werden multiple Primer-Paare für verschiedene Zielmoleküle in derselben Amplifizierungsmixtur eingesetzt. Dadurch können in ein- und derselben Reaktion verschiedene (pathogene) Mikroorganismen nachgewiesen werden. Eine solche Multiplex-PCR auf dem Gebiet der Anaerobier-Diagnostik wurde zum Beispiel eingeführt zum simultanen Nachweis der *Clostridium difficile*-Toxingene A und B (24). Weitere PCR-Anwendungen betreffen den Nachweis des Hämolysin-Gens von *Clostridium septicum* (25), *Clostridium botulinum*-Toxin-Gene in Nahrungsmitteln (26) sowie *Bacteroides fragilis*-Enterotoxin-Gene im Stuhl (27). Interessant erscheint die PCR-Technologie auch, um in primär sterilen Materialien nach Spuren bakterieller DNA zu fahnden. Kane und Mitarbeiter haben in ihrer 1998 veröffentlichten Studie Blutproben von Patienten nach gastrointestinalen Operationen auf das Vorhandensein von intestinalen Bakterien hin untersucht, die für die Komplikation des multiplen systemischen Organversagens verantwortlich gemacht werden (28). Dazu extrahierten sie aus dem Blut von 40 chirurgisch behandelten Patienten und 20 gesunden Kontrollindividuen die DNA und führten eine 16S rRNA gerichtete PCR, spezifisch für die Leitkeime *Escherichia coli* und *Bacteroides fragilis* sowie für Eubakterien i. allgem. durch. Während bei der Kontrollgruppe keine der PCR-Reaktionen positiv wurde, zeigten 64% der Blutkulturen von kritisch erkrankten Patienten mikrobielle DNA, wohingegen nur 14% ihrer konventionellen Blutkulturen positiv wurden. Die PCR-Methode kann also zum Nachweis bakterieller DNA in Blutproben genutzt werden. Dabei ist jedoch die daraus folgende therapeutische Konsequenz sehr umstritten, denn der alleinige Nachweis der DNA kann nicht als Beweis für das Vorhandensein vermehrungsfähiger Bakterien gelten. Weiterhin wird die PCR-Diagnostik im Bereich der Anaerobier-Diagnostik zum Nachweis von veterinärmedizinisch relevanten Isolaten genutzt. So wurde der Nachweis von *Clostridium chauvoei* bei Rindern mit "blackleg-disease" im nekrotischen Gewebe eingesetzt (29) und zum Nachweis von *Clostridium perfringens*-Enteritis in Schweinen (30, 31).

Auch für das Verfahren der PCR finden sich auf dem Gebiet der anaeroben Infektionen die größten Einsatzgebiete in der Parodontitis-Diagnostik. Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ist es möglich, für die Parodontitis-Grundlagenforschung bedeutsame Fragen

zu beantworten, zum Beispiel nach der Erstbesiedlung der Mundhöhle mit den Leitkeimen (32) oder aber auch die Frage nach den Habitat-Nischen der obligat anaeroben Leitkeime in der Mundhöhle (33). Zudem wird die PCR zum Monitoren des Parodontitis-Therapieverlaufs eingesetzt und zur Evaluation neuer Therapieverfahren. Die **Abbildung 3** zeigt exemplarisch den Einsatz der Polymerase-Kettenreaktion in einer Multiplexvariante zum Nachweis der Parodontitis-Erreger *Prevotella intermedia* und *Bacteroides forsythus*. Hierbei zeigen *Prevotella intermedia*-positive-Proben ein 660 bp- und *B. forsythus*-haltige Proben ein 840 bp-Amplifikat. Mit Hilfe dieser Multiplex-PCR wurde nicht nur subgingivale Plaque der Parodontitis-Patienten, sondern auch ihre Zungen-, Buccal- und Tonsillen-Abstriche untersucht, wodurch die Habitate einzelner Bakterienarten in der Mundhöhle sichtbar werden (33). Bei den Parodontal-Erkrankungen ist die Quantifizierung der anaeroben Erreger von entscheidender Bedeutung. Durch die allgemein sehr hohe Sensitivität (≤ 100 Bakterienarten) der PCR können auch noch deutlich positive Signale auf der Basis von zum Beispiel 5 bis 10 *P. gingivalis*-Zellen in einer Probe subgingivaler Plaque auftreten, wobei die Frage zu stellen wäre, ob solche Ergebnisse klinisch überhaupt relevant sind. Das Verfahren hat daher eher seinen Platz in der Grundlagenforschung als zum Routinenachweis der Bakterien in klinischen Materialien. Die Firma Hain-Diagnostika GmbH (Nehren) nutzt eine speziell wenig empfindlich (10^4 Keime pro Probe) eingestellte PCR-Reaktion in Kombination mit reverser Hybridisierung zum hochspezifischen Nachweis von parodontopathogenen Bakterien in Routineproben. Der Test wird an niedergelassene Mikrobiologen vertrieben, um für Zahnärzte die Parodontitis-Leitkeimdiagnostik bei besonders progressiven und refraktären Formen dieser Erkrankung durchzuführen.

Zukunftsperspektiven für den Einsatz von DNA-Sonden und PCR im Bereich der Anaerobier-Infektionen

Während zum jetzigen Zeitpunkt die DNA-Sonden und PCR-Diagnostik aufgrund der überdurchschnittlich hohen Kosten nur für ausgewählte Bereiche der medizinischen Infektiologie zum Einsatz kommen, werden mit zunehmender Automatisierung und Miniaturisierung dieser Verfahren in Zukunft auch breitere Einsatzbereiche möglich. Aus den Fragestellungen der Genomforschung heraus wurden DNA-Chips (microarrays) entwickelt, auf denen -nach PCR-Amplifikation und Fluoreszenzmarkierung der Template-DNA- bis zu 400.000 Hybridisierungsreaktionen auf der Fläche von weniger als $2 \times 2 \text{ cm}^2$ durchgeführt und

über Laserscanner analysiert werden können (Übersicht: 34, ausführliche Informationen sind dem Januar (1999)-Supplement von *Nature Genetics* zu entnehmen). Diese Technik, hat im Ansatz bereits Einzug gehalten in die medizinische Mikrobiologie und ist hier für den Bereich schwer zu kultivierender Bakterien sowie für Resistenz- und Expressionsanalysen interessant (35-37). Während diese mit hohen Anfangsinvestitionen verbundene Technik bislang nur sehr wenigen Laboratorien weltweit zur Verfügung steht, ist aufgrund zukünftiger Preissenkungen (ähnlich wie bei der Microchip-Technologie in der Vergangenheit ?!) eine rasante Verbreitung wahrscheinlich. Die DNA- und PCR-Technologie könnte somit innerhalb der nächsten Dekade viele der konventionellen medizinisch-diagnostischen Methoden ersetzen.

Korrespondenzadresse:

Privatdozent Dr. rer. nat. Georg Conrads
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Universitätsklinikum, RWTH Aachen
Pauwelsstraße 30
52057 Aachen
Tel.: 0241 / 80 89787, FAX: 0241 / 8888 483
E-mail: gconrads@post.klinikum.rwth-aachen.de.

Literatur

1. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1994;**32**(2):335-51.
2. Daly JA, Clifton NL, Seskin KC, Gooch WM. Use of rapid, nonradioactive DNA probes in culture confirmation tests to detect *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, and *Enterococcus* spp. from pediatric patients with significant infections. *J Clin Microbiol* 1991;**29**(1):80-2.
3. Lewis JS, Kranig-Brown D, Trainor DA. DNA probe confirmatory test for *Neisseria gonorrhoeae*. *J Clin Microbiol* 1990;**28**(10):2349-50.
4. Conrads G, Moonen I, Seyfarth I, Bottenberg P, Haase G. Oligonucleotides facilitating the diagnosis of oral and odontogenic infections. *Rev Med Microbiol* 1997;**8**:S18.
5. Lacroix JM, Walker CB. Detection and prevalence of the tetracycline resistance determinant TetQ in the microbiota associated with adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1996;**11**(4):282-8.
6. Daube G, Simon P, Limbourg B, Manteca C, Mainil J, Kaeckenbeeck A. Hybridization of 2,659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins (alpha, beta, epsilon, iota, theta, mu, and enterotoxin) and for sialidase. *Am J Vet Res* 1996;**57**(4):496-501.
7. French CK, Savitt ED, Simon SL, et al. DNA probe detection of periodontal pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 1986;**1**:58-62.
8. Murray PA, French CK. DNA probe detection of periodontal pathogens. (*Series Ed: Meyers, WM. New biotechnology in oral research.*) 1989;**Karger**:Basel. pages 33-53.
9. Murray PA, Winkler LR, Peros WJ, French CK, Lippke JA. DNA probe detection of periodontal pathogens in HIV-associated periodontal lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1991;**6**:34-40.
10. Lippke JA, Peros PJ, Keville MW, Savitt ED, French CK. DNA probe detection of *Eikenella corrodens*, *Wolinella recta* and *Fusobacterium nucleatum* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 1991;**6**:81-7.

11. Albandar JM, Olsen I, Gjermo P. Associations between six DNA probe-detected periodontal bacteria and alveolar bone loss and other clinical signs of periodontitis. *Acta Odontol Scand* 1990;**48**:415-23.
12. Haffalee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S. The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. *J Periodontol* 1992;**19**:84-91.
13. Conrads G, Pelz K, Hughes B, Seyfarth I, Devine DA. Optimized oligonucleotides for the differentiation of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol* 1997;**12**(2):117-20.
14. Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN, et al. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol* 1994;**65**:56-61.
15. Chuba PJ, Pelz K, Krekeler G, De Isele TS, Göbel U. Synthetic oligodeoxynucleotide probes for the rapid detection of bacteria associated with human periodontitis. *J Gen Microbiol* 1988;**134**:1931-8.
16. Dix K, Watanabe SM, McArdle S, et al. Species-specific oligodeoxynucleotide probes for the identification of periodontal bacteria. *J Clin Microbiol* 1990;**28**(Suppl. 2):319-23.
17. Conrads G, Mutters R, Seyfarth I, Pelz K. DNA-probes for the differentiation of *Capnocytophaga* species. *Mol Cell Probe* 1997;**11**(5):323-28.
18. Conrads G, Soffner J, Pelz K, Mutters RR. Taxonomic update and clinical significance of species within the genus *Peptostreptococcus*. *Clin Infect Dis* 1997;**25**(Suppl. 2):S94-S97.
19. Hofstad T. Utility of newer techniques for classification and identification of pathogenic anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* 1994;**18** (Suppl 4):S250-2.
20. Persing DH. Polymerase chain reaction: trenches to benches. *J Clin Microbiol* 1991;**29**(7):1281-5.
21. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;**155**:335-50.
22. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;**262**(4):56-61, 64-5.
23. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;**239**(4839):487-91.

24. Lou Q, Chong SK, Fitzgerald JF, Siders JA, Allen SD, Lee CH. Rapid and effective method for preparation of fecal specimens for PCR assays. *J Clin Microbiol* 1997;**35**(1):281-3.
25. Takeuchi S, Hashizume N, Kinoshita T, Kaidoh T, Tamura Y. Detection of *Clostridium septicum* hemolysin gene by polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci* 1997;**59**(9):853-5.
26. Meng X, Karasawa T, Zou K, et al. Characterization of a neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism. *J Clin Microbiol* 1997;**35**(8):2160-2.
27. Pantosti A, Malpeli M, Wilks M, Menozzi MG. Detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* by PCR. *J Clin Microbiol* 1997;**35**(10):2482-6.
28. Kane TD, Alexander JW, Johannigman JA. The detection of microbial DNA in the blood: a sensitive method for diagnosing bacteremia and/or bacterial translocation in surgical patients. *Ann Surg* 1998;**227**(1):1-9.
29. Kuhnert P, Krampe M, Capaul SE, Frey J, Nicolet J. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR. *Vet Microbiol* 1997;**57**(2-3):291-8.
30. Kanakaraj R, Harris DL, Songer JG, Bosworth B. Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. *Vet Microbiol* 1998;**63**(1):29-38.
31. Buogo C, Capaul S, Hani H, Frey J, Nicolet J. Diagnosis of *Clostridium perfringens* type C enteritis in pigs using a DNA amplification technique (PCR). *Zentralbl Veterinärmed* 1995;**42**(1):51-8.
32. Conrads G, Muters 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* 1996;**67**:994-1003.
33. Conrads G, Flemmig TF, Seyfarth I, Lampert F, Lütticken R. Simultaneous detection of *Bacteroides forsythus* and *Prevotella intermedia* by 16S rRNA gene-directed multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1999;**37**(5):1621-4.
34. Kurian KM, Watson CJ, Wyllie AH. DNA chip technology. *J Pathol* 1999;**187**(3):267-271.
35. Head SR, Parikh K, Rogers YH, Bishai W, Goelet P, Boyce-Jacino MT. Solid-phase sequence scanning for drug resistance detection in tuberculosis. *Mol Cell Probes* 1999;**13**(2):81-7.

36. Troesch A, Nguyen H, Miyada CG, et al. *Mycobacterium* species identification and rifampin resistance testing with high-density DNA probe arrays. *J Clin Microbiol* 1999;**37**(1):49-55.
37. de Saizieu A, Certa U, Warrington J, Gray C, Keck W, Mous J. Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1998;**16**(1):45-8.

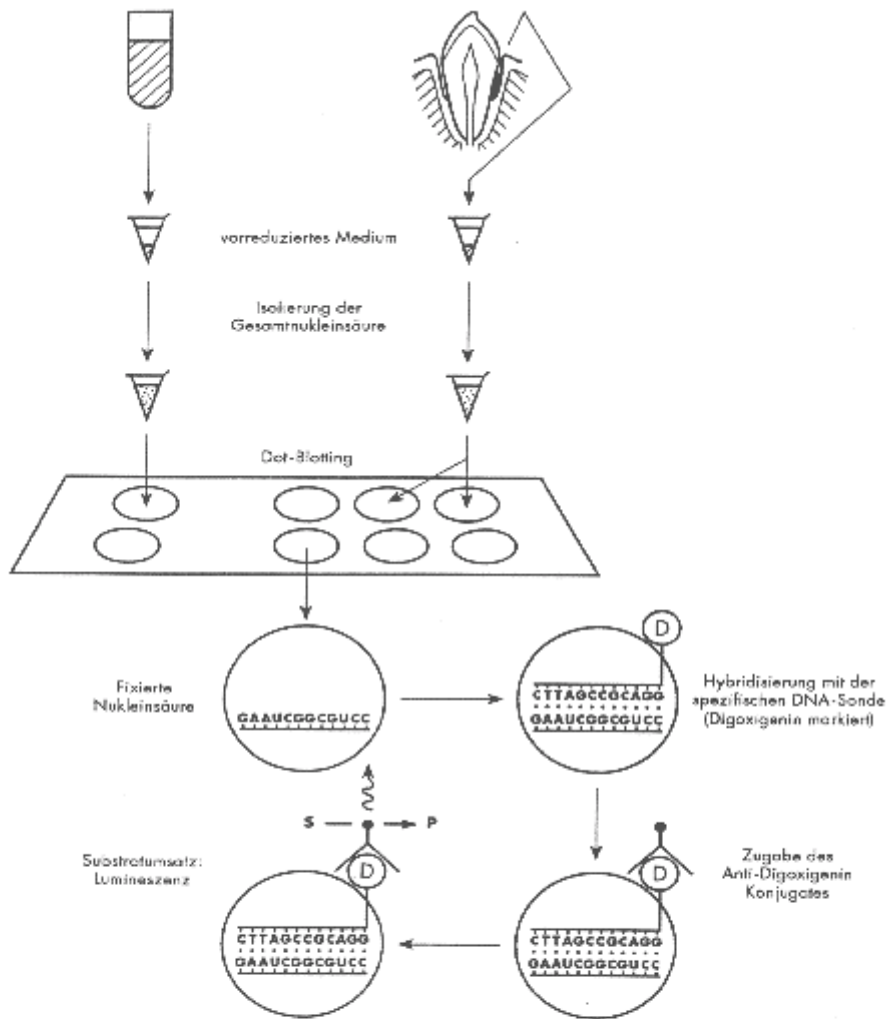


Abbildung 1:

Nachweis von Parodontitis-Leitkeimen m.H. von DNA-Sonden

Nach Entnahme subgingivaler Plaque durch den Parodontologen, werden die Nukleinsäuren der Probe im Labor isoliert und auf einer Nylonfolie immobilisiert (Dot-Blotting). Nach der Fixierung erfolgt die Hybridisierung des genetischen Materials mit z.B. Digoxigenin markierten DNA-Sonden. Die Detektion erfolgt in diesem Fall über Zugabe eines monoklonaler Antikörpers, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist. Das Enzym setzt

anschließend ein Chemilumineszenz-Substrat um 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. Bei radioaktiv markierten Sonden schwärzt die γ -Strahlung der Isotope direkt den Film.

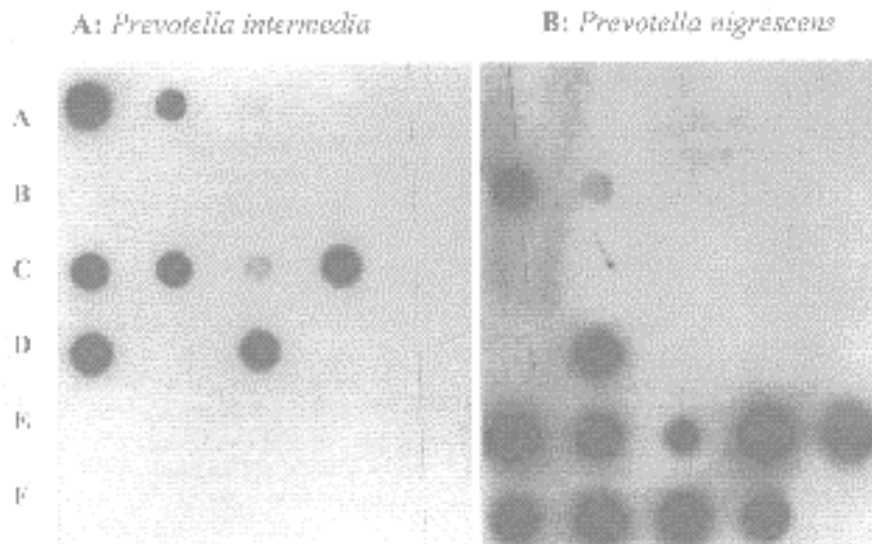


Abbildung 2:

Repräsentative Dot-Blot-Hybridisierung zur Differenzierung von *Prevotella intermedia* und *P. nigrescens*-Isolaten. Reihe A: ATCC 25611 (10^5 , 10^4 und 10^3 Zellen), **Reihe B:** ATCC 33563 (10^5 , 10^4 und 10^3 Zellen), **Reihe C-F:** Klinische Isolate (13). In **Blot A** wurde die Pi-Sonde (*P. intermedia*-spezifisch) und in **Blot B** die Pn-Sonde (*P. nigrescens*-spezifisch) verwendet. Stämme dieser nah verwandten *Prevotella*-Arten lassen sich danach eindeutig differenzieren.

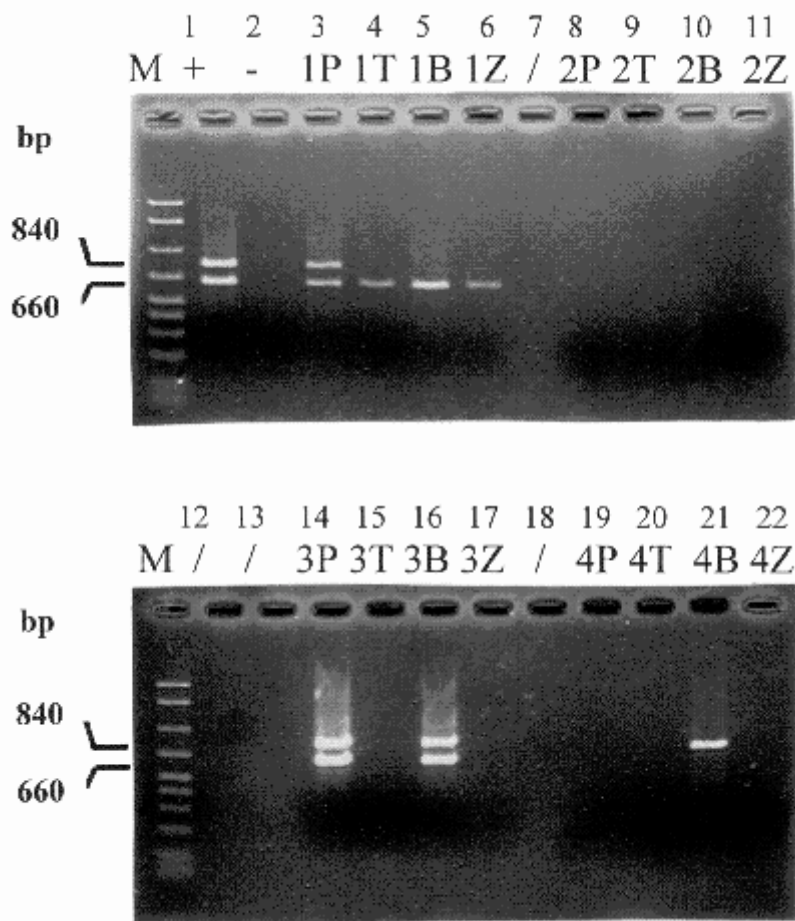


Abbildung 3:

Multiplex-PCR zum Nachweis der Parodontitis-Erreger *Prevotella intermedia* und *Bacteroides forsythus* in subgingivaler Plaque (1P-4P), Tonsillen- (1T-4T), Wangen- (1B-4B) und Zungen-(1Z-4Z)-Abstrichen: M: 50-2.000 bp-Marker; 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. Die Methode weist Nischen mit Besiedlung obligat anaerober Bakterien in der Mundhöhle nach.