

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Direktor Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

Die Relevanz parodontopathogener Keime bei endodontischen Misserfolgen und deren Synergismus in der Biofilmbildung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Marie Hannig
aus Hamburg

Hamburg 2012

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.7.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. I. Sobottka

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. P.-M. Kaulfers

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schiffner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	IV
1 Einleitung und Arbeitshypothese	1
2 Literaturübersicht	4
2.1 Erkrankungen der Pulpa	4
2.2 Mikrobiologische Aspekte	5
2.3 Grundlagen der Endodontie	7
2.4 Endodontischer Erfolg und Misserfolg	7
2.4.1 Definition Erfolg und Misserfolg einer endodontischen Behandlung	7
2.4.2 Das Ergebnis der Wurzelkanalbehandlung beeinflussende Faktoren	10
2.5 Revision	18
2.5.1 Indikationen zur Revision	19
2.5.2 Ablauf der Revision	19
2.6 Wurzelspitzenresektion	20
2.6.1 Indikationen zur WSR	21
2.6.2 Erfolgsrate der WSR	22
2.6.3 Alternativen zur WSR	23
2.7 Erkrankungen des Parodonts	24
2.7.1 Das Parodont	24
2.7.2 Definition Parodontopathien	26
2.7.3 Mikrobielle Aspekte bei Parodontopathien	26
2.8 Zusammenhang zwischen endo- und parodontalen Erkrankungen	27
2.8.1 Parodontopathogene Keime bei endodontischen Misserfolgen	30

3	Material und Methode	32
3.1	Studiendesign	32
3.2	Patienten	32
3.3	Mikrobiologische Parameter	32
3.4	Probenentnahme	33
3.4.1	Probenentnahme während WSR	33
3.4.2	Probenentnahme während Revision	33
3.5	Auflistung der notwendigen Untersuchungsmaterialien	34
3.5.1	Geräte	34
3.5.2	Chemikalien/Lösungen	35
3.5.3	Materialien	40
3.6	Methoden	41
3.6.1	Isolation und Reinigung von genomischer DNA aus Bakterien	41
3.6.2	Multiplex-Amplifikation mit biotinmarkierten Primern	43
3.6.3	Reverse Hybridisierung	46
3.7	Auswertung und Interpretation der Ergebnisse	49
3.8	Statistik	50
4	Ergebnisse	52
4.1	Charakteristika der Patientenproben	52
4.2	Molekularbiologischer Nachweis von parodontopathogen Keimen bei chronisch apikaler Parodontitis	52
4.2.1	Ergebnisse der Auszählung der untersuchten Bakterien in absoluten und relativen Werten	52
4.2.2	Auswahl des Signifikanzniveaus	53

4.2.3	Bestimmung des Freiheitsgrades	53
4.2.4	Bestimmung des kritischen Werts c	54
4.2.5	Ergebnisse des Chi-Quadrat-Verteilungstests	54
4.2.6	Ergebnisse des Chi-Quadrat-Vierfeldertests	55
4.2.7	Ergebnisse der logistischen Regression	63
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	64
5	Diskussion	65
5.1	Zielsetzung	65
5.2	Diskussion der Methode	66
5.2.1	Probenauswahl	66
5.2.2	Probenentnahme	66
5.2.3	DNA•STRIP-Technologie	67
5.2.4	Vergleich von micro-IDent® und micro-IDent®plus	68
5.3	Diskussion der Ergebnisse	69
5.4	Schlussfolgerungen	73
6	Zusammenfassung	74
7	Literaturverzeichnis	76
8	Danksagung	90
9	Lebenslauf	91
10	Erklärung	92

Abkürzungen:

<i>A. actinomycetem-</i> <i>comitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
<i>C. rectus</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
CHX	Chlorhexidindigluconat
DGZMK	Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
<i>E. corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. nodatum</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESE	European Society of Endodontology
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
NaOCl	Natriumhypochlorid
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>P. micros</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>
<i>S. sanguis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
WSR	Wurzelspitzenresektion

1 Einleitung und Arbeitshypothese

Die Pulpa und das umliegende Dentin stellen eine Einheit dar, das sogenannte Pulpa-Dentin-System. Schädigungen des Dentins wirken sich auf den Zustand der Pulpa aus. Diese Irritationen können physikalischen, chemischen und toxischen Ursprungs sein. Karies stellt jedoch mit etwa 95% die Hauptursache aller Pulpaerkrankungen dar (SCHÄFER 2001). Wird das kariöse Dentin bei einer reversiblen Pulpitis entfernt und die pulpanahe Dentinwunde adäquat versorgt, kann es zur Ausheilung kommen. Bei einer irreversiblen Pulpitis kann bereits nekrotisches Gewebe vorliegen und eine Wurzelkanalbehandlung ist indiziert. Findet in diesem Stadium der Pulpitis keine Behandlung statt, können sich die bakteriellen Stoffwechselprodukte vom Endodontium auf das Parodontium ausbreiten. Die Pulpa steht über das Foramen apicale (sowie akzessorische, laterale und interradiikuläre Kanäle) mit dem parodontalen Gewebe in Verbindung. Folglich können sich Bakterien in diesem Bereich ausbreiten und eine Parodontitis apicalis hervorrufen. Aber auch auf entgegengesetztem Weg können bakterielle Stoffwechselprodukte aus dem Entzündungsgeschehen einer marginalen Parodontitis in die Pulpa gelangen und eine Entzündung hervorrufen (BERGENHOLTZ und HASSELGREN 2003). Sowohl das Pulpa-Dentin-System als auch das Parodontium besitzen Abwehrfunktionen, die eine Bakterieninfiltration in beide Richtungen verhindern sollen. Bleiben eine Karies oder supragingivale Plaque zu lange unbemerkt, kann das Immunsystem nicht mehr gegen die Mikroorganismen ankämpfen und es entsteht ein Ungleichgewicht zugunsten pathogener Bakterien. Es kommt zu einer bakteriellen Infiltration in die Pulpa (Pulpitis) bzw. in das Parodontium (marginale Parodontitis). Nur eine zeitnahe Eradikation der Keime kann den Erhalt des infizierten Zahns gewährleisten. Mechanische Methoden zur Säuberung des infizierten Gewebes sowie antimikrobielle Spüllösungen sind für den Behandlungserfolg unerlässlich. Trotz einer lege artis durchgeführten Behandlung kommt es in einigen Fällen nicht zur Ausheilung der betroffenen Region. Die Infektion wird chronisch und die Gewebedestruktion nimmt zu. Verantwortlich für diesen Prozess ist unter anderem eine Mikroflora, in der andere Bakterien zu finden sind als im akuten Entzündungsgeschehen. Bei einer chronischen Infektion handelt es sich meistens um Monoinfektionen (MOLANDER et al. 1998, SUNDQVIST et al. 1998), vorwiegend aus gram-positiven fakultativen Anaerobiern bestehend (PINHEIRO et al. 2003b, FIGDOR und SUNDQVIST 2007). Diese Bakterien zeigen eine hohe Resistenz gegenüber antimikrobiellen und mechanischen Behandlungsmethoden. Bei endodontischen Misserfolgen wird *Enterococcus (E.) faecalis*,

ein fakultativer Anaerobier, eine bedeutende Rolle zugesprochen (MOLANDER et al. 1998, SUNDQVIST et al. 1998, HANCOCK et al. 2001, PINHEIRO et al. 2003a).

Die Persistenz pathogener Keime im Wurzelkanal und/oder in der apikalen Region ist einer der wichtigsten Gründe für den Misserfolg einer Wurzelkanalbehandlung (LIN et al. 1992, NAIR et al. 1990, SIQUEIRA 2001, SIQUEIRA und ROCAS 2006, SAITO et al. 2008). In einigen Studien konnten parodontopathogene Keime bei Patienten mit chronisch apikaler Parodontitis nachgewiesen werden (SUNDE et al. 2000, SIQUEIRA et al. 2007, BLOME et al. 2008, SAKAMATO et al. 2008). RUPF et al. (2000) wiesen in einer Studie mittels PCR *Aggregatibacter (A.) actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium (F.) nucleatum*, *Porphyromonas (P.) gingivalis*, *Prevotella (P.) intermedia*, *Treponema (T.) denticola*, *Tannerella (T.) forsythia* und *Eikenella (E.) corrodens* sowohl im Endodont als auch Parodont nach und konnten so eine Paro-Endo-Wechselwirkung als wichtigen Faktor für die Widerstandsfähigkeit parodontaler und/oder endodontaler Erkrankungen nachweisen.

Die Möglichkeit einiger Bakterien Biofilme zu bilden, spielt ebenfalls eine bedeutsame Rolle. So besitzt *F. nucleatum* die Fähigkeit, Koaggregate mit gram-positiven Kokken wie *Streptococcus (S.) sanguis*, *Peptostreptococcus (P.) micros* als auch mit *P. gingivalis* zu bilden (KOLENBRANDER und ANDERSEN 1989, KREMER und VAN STEENBERGEN 2000). *F. nucleatum* ermöglicht ein erweitertes Haftvermögen parodontopathogener Keime wie *P. gingivalis* und *T. denticola* in parodontalen Läsionen (KOLENBRANDER et al. 2000). *F. nucleatum* nutzt Typ-I-Kollagen um sich an die Oberfläche des Dentins zu heften (SAITO et al. 2008). Die Koaggregation zwischen *F. nucleatum* und *P. gingivalis* kommt durch ein Protein-Adhäsion auf *F. nucleatum* und ein galaktoseenthaltenden Kohlenhydratrezeptor auf *P. gingivalis* zustande (KINDER und HOLT 1989, KINDER und HOLT 1993). SOCRANSKY et al. (1998) haben die parodontalen Keime anhand ihrer Pathogenität in unterschiedliche Komplexe eingeteilt. Besonders die zum roten Komplex gehörenden Keime wie *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* werden oft gemeinsam nachgewiesen und treten meist bei tiefen Taschen und endodontischen Misserfolgen auf (RUPF et al. 2000). *P. intermedia*, *P. micros* und *F. nucleatum* gehören zum orangenen Komplex und besitzen die Eigenschaft als sogenannte „Brückenspezies“ zwischen den Frühkolonisierern (grüner bzw. orange-assoziiertes Komplex) und den Keimen des roten Komplexes zu fungieren (DOMBROWA 2007).

Bereits vorliegende Studien konnten eine Interaktion von Bakterien bei Paro-Endo Läsionen zeigen. Vor diesem Hintergrund war die **Hypothese** dieser Untersuchung folgende: Der

Nachweis von parodontopathogenen Keimen bei chronisch apikalen Parodontitiden hat einen Einfluss auf die Persistenz der Infektion.

Das **Ziel** dieser Studie war es, das Vorkommen der 11 häufigsten parodontopathogenen Keime (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *Campylobacter (C.) rectus*, *Eubacterium (E.) nodatum*, *E. corrodens*, *Capnocytophaga* spp.) bei endodontischen Misserfolgen mithilfe der DNA•STRIP-Technologie (micro-IDent[®], micro-IDent[®] plus, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) zu untersuchen, auf ihre Relevanz hin zu prüfen und deren möglichen Synergismus in der Biofilmbildung zu evaluieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Erkrankungen der Pulpa

Das Pulpagewebe ist ein lockeres, spezialisiertes Bindegewebe, das aus Zellen (Odontoblasten, Fibroblasten, Ersatzzellen, Abwehrzellen), einer interzellulären oxytalanartigen Grundsubstanz, retikulären und kollagenen Fasern, sowie aus Gefäßen und Nervenfasern besteht (SCHRÖDER 2000). Die Zahnpulpa steht über das Foramen apicale, über laterale und interradiäre Kanäle mit dem Parodontium und somit dem Gesamtorganismus in Verbindung. Daher ist einerseits bei Erkrankungen der Pulpa häufig auch das Parodontium beteiligt. Andererseits ist bei einer medikamentösen Behandlung der Pulpa auch mit einer systemischen Verteilung des Medikaments zu rechnen (SCHÄFER 2001). Die Pulpa und das umliegende Dentin stellen eine Einheit dar. Die in den Dentinkanälchen gelegenen Odontoblastenfortsätze sind Bestandteil der Zahnpulpa. Treffen pathogene Reize auf das Pulpa-Dentin-System, antwortet es mit Schutzmaßnahmen: Die Odontoblasten der Pulpa verändern vorhandenes Dentin und bilden zusätzlich Dentin, die Pulpa zeigt entzündliche Reaktionen. Das Pulpa-Dentin-System hat vier Funktionen zu erfüllen: die dentinbildende, sensorische, trophische und defensive Funktion (KLIMM 2003). Erlittene Irritationen oder Schädigungen des Dentins wirken sich auf den Zustand der Pulpa aus. Die Ursachen können vielfältig sein. Sie können durch Bakterieninvasion beim kariösen Defekt hervorgerufen werden oder aufgrund von physikalischen, chemischen und toxischen Irritationen entstehen. Dazu zählen iatrogene Faktoren wie mechanische Bearbeitung der Zahnhartsubstanzen sowie die Applikation zahnärztlicher Füllungsmaterialien und Medikamente, aber auch traumatisch bedingte Zahnverletzungen und marginale Parodontopathien. Allerdings stellt Karies mit etwa 95% die Hauptursache aller Pulpaerkrankungen dar (SCHÄFER 2001). Erreichen Bakterien das periphere Ende der Dentintubuli, ist mit einer degenerativen Veränderung der Pulpa zu rechnen (GULDNER und LANGELAND 1993, KLIMM 2003). Ob es sich um eine reversible oder irreversible Pulpitis handelt, lässt sich anhand der Schmerzsymptomatik unterscheiden. Die reversible Pulpitis kann durch provozierte, spontane, manchmal ausstrahlende, meist jedoch lokalisierbare Schmerzen von kurzer Dauer und wechselnder Intensität gekennzeichnet sein. Dabei ist die Schmerzanamnese kurz und die Reaktion auf Kälte und elektrischen Reiz gesteigert (KLIMM 2003). Nach Entfernen des kariösen Dentins und Versorgung der pulpanahen Dentinwunde, kann es zur Ausheilung kommen. Die irreversible Pulpitis kann durch vorwiegend spontane, nachts einsetzende, aber auch provozierte, lokalisierbare oder ausstrahlende, pulsierende,

pochende Schmerzen von längerer Dauer gekennzeichnet sein. Es liegen eine längere Schmerzanamnese und verstärkte Wärmeempfindlichkeit vor (KLIMM 2003). In diesem Fall liegen bereits größere Gewebeschmelzungen und nekrotisches Gewebe vor, es folgt eine medikamentöse Einlage und innerhalb weniger Tage eine Wurzelkanalbehandlung (HEIDEMANN 2001). Verlagert sich das Entzündungsgeschehen in den periapikalen Bereich, spricht man von einer Parodontitis apicalis. Röntgenologisch ist eine Erweiterung des Parodontalspalts und klinisch eine starke Aufbissempfindlichkeit des betroffenen Zahnes zu diagnostizieren (HELLWIG et al. 2003).

2.2 Mikrobiologische Aspekte

In der Mundhöhle kommen über 700 unterschiedliche Bakterien vor, von denen um die 50% nachgewiesen werden können (PASTER et al. 2001, AAS et al. 2005, SIQUEIRA und ROCAS 2005, SOCRANSKY und HAFFAJEE 2005). Im infizierten Wurzelkanal liegt ein sauerstoffarmes Milieu vor, welches das Überleben von Aerobiern erschwert; es können hier nur um die 150 verschiedenen Bakterienarten nachgewiesen werden (SAITO et al. 2006). Dies hängt u. a. mit dem Vorkommen von fakultativ/obligat anaeroben Keimen zusammen, bei dem der Nachweis des Keimspektrums mit mehr methodischen Fehlern verbunden ist. Vor allem schwarzpigmentierte Bakterien der Gattungen Porphyromonas, Prevotella, Actinomyces, Fusobacterien und Veillonella treten im infizierten Wurzelkanal auf (BRAUNER und CONRADS 1995, BAE et al. 1997, DOUGHERTY et al. 1998, BAUMGARTNER et al. 1999, PITT FORD 2004,). Die Anzahl an Mikroorganismen im Wurzelkanal beträgt in der Regel bis zu 10^8 koloniebildenden Einheiten (SUNDQVIST et al. 1989, SOBOTTKA et al. 2002, CACHOVAN et al. 2003). Die primäre endodontische Infektion ist begleitet von einer Mischflora (WITTGOW und SABISTON 1975, BYSTROM und SUNDQVIST 1981, LE GOFF et al. 1997, SJÖRGEN et al. 1997). In Fällen, in denen nach der Wurzelkanalbehandlung keine Ausheilung erfolgt, ist eine andere Flora im Wurzelkanal zu finden. Die Anzahl der Mischinfektionen ist deutlich geringer, dafür sind häufiger Monoinfektionen nachzuweisen (MOLANDER et al. 1998, SUNDQVIST et al. 1998). In infizierten Wurzelkanälen unbehandelter Zähne können gleichermaßen gram-positive sowie gram-negative Anaerobier nachgewiesen werden. Dagegen treten bei Behandlungsmisserfolgen vorwiegend gram-positive fakultative Anaerobier auf (PINHEIRO et al. 2003b, FIGDOR und SUNDQVIST 2007). Dies lässt darauf schließen, dass gram-positive fakultative anaerobe Keime resistenter gegenüber antimikrobiellen und mechanischen Behandlungsmethoden sind als

gram-negative obligate Anaerobier (CHAVEZ DE PAZ et al. 2003, MÖLLER et al. 2004). Als Beispiel ist *E. faecalis* zu nennen, ein gram-positiver fakultativer Anaerobier, welcher zwischen 30% bis 64% bei endodontischen Misserfolgen nachgewiesen wird, bei primären Infektionen dagegen eher selten (MOLANDER et al. 1998, SUNDQVIST et al. 1998, HANCOCK et al. 2001, PINHEIRO et al. 2003a). *E. faecalis* ist in der Lage, tief in die Dentintubuli einzudringen und zeigt so Resistenz gegenüber chemo-mechanischer Aufbereitung und Calciumhydroxid (LOVE 2001). Des Weiteren besitzt er die Fähigkeit auch bei geringer Verfügbarkeit von Nährstoffen zu überleben und zu regenerieren, sobald die Nährstoffquelle wieder vorhanden ist (SIQUERIA 2004).

Die Möglichkeit Biofilme zu bilden, ist ein weiterer wichtiger Resistenzfaktor in der Genese der apikalen Parodontitis wobei die Widerstandsfähigkeit von Keimen gegenüber Phagozytose und Antibiotika verstärkt wird (EICK und PFISTER 2004, HEPPLER und HÜLSMANN 2006, JEFFERSON und CERCA 2006, TAKAHASHI et al. 2006, SAITO et al. 2008). Biofilme werden in apikalen Läsionen gebildet, wie etwa auf der äußeren Oberfläche der Wurzelspitze (LEONARDO et al. 2002, NOIRI et al. 2002). In-vitro-Studien haben gezeigt, dass *F. nucleatum* die Fähigkeit besitzt, Koaggregate mit gram-positiven Kokken (wie *S. sanguis*, *P. micros* als auch mit *P. gingivalis*) und gram-negativen Keimen zu bilden (KOHLENBRANDER und ANDERSEN 1989, KREMER und VAN STEENBERGEN 2000). Der Synergismus zwischen *F. nucleatum* und *P. gingivalis* ist in einigen Studien untersucht worden (KINDER und HOLT 1989, KOLENBRANDER und ANDERSEN 1989, KINDER und HOLT 1993, METZGER et al. 2001). Die Interaktion dieser beiden Keime kommt durch ein galactoseenthaltenden Kohlenhydratrezeptor auf *P. gingivalis* und ein Protein-Adhäsion auf *F. nucleatum* zustande (KINDER und HOLT 1989, KINDER und HOLT 1992). Andere Arten von Zucker wie z.B. Lactose, N-Acetyl-D-Galactosamin und D-Galactose verhindern dagegen die Koaggregation von *F. nucleatum* und *P. gingivalis* (KOLENBRANDER und ANDERSEN 1989). Biofilme werden vielfach aus apikalen Parodontiden isoliert (SUNDE et al. 2000, VIANNA et al. 2005). In Läsionen einer apikalen Parodontitis wird auf der Oberfläche des Dentins sowie im apikalen Gewebe des Öfteren Typ-1-Kollagen gefunden, welches *F. nucleatum* nutzt, um sich daran zu binden (SAITO et al. 2008). NOGUCHI et al. (2005) entdeckten in klinischen Proben *F. nucleatum* mit *T. forsythia* und *P. gingivalis* in extraradikulären Biofilmen. Bakterienmigration zwischen Endo- und Parodontium kann sowohl über Dentin als auch über laterale und akzessorische Wurzelkanäle stattfinden (ADRIAENS et al. 1988, EHNEVID et al. 1995). RUPF et al. (2000) bestätigten in einer Studie, dass die Paro-Endo-Wechselwirkung als ein wichtiger Faktor angesehen werden muss, der zur Widerstandsfähigkeit parodontaler oder endodontaler Erkrankungen beiträgt.

2.3 Grundlagen der Endodontie

Die irreversible Schädigung der Pulpa mit oder ohne Beteiligung des periapikalen Gewebes stellt die häufigste Indikation für eine Wurzelkanalbehandlung dar (LEUENBERG und BARTHEL 2005). Ziel dieser Behandlung ist der langfristige Erhalt des Zahnes die eine vollständige Säuberung des Kanals von infizierten Pulpageweberesten, Bakterien und nekrotischen Gewebeanteilen, die Aufbereitung der Kanäle sowie die anschließende, vollständige Füllung der Wurzelkanäle beinhaltet. Um einen endodontischen Erfolg zu erzielen, müssen wesentliche Behandlungsschritte eingehalten werden. Die Kenntnis über Anatomie der Zähne und speziell des Wurzelkanalsystems ist dabei von großer Bedeutung (HELLWIG et al. 2003). Der apikale Endpunkt der Wurzelkanalbehandlung gilt als wichtiger Faktor für den Behandlungserfolg (GULDENER und LANGELAND 1993). Die Aufbereitung und die spätere Wurzelkanalfüllung sollen an der engsten Stelle des Kanals, dem physiologischen Foramen, abschließen. An dieser Stelle kann die Kontaktfläche zwischen Füllmaterial und vitalem Gewebe kleingehalten werden (HÜLSMANN und WEIGER 2004), wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Irritation im Sinne einer immunologischen Reaktion minimiert wird (MERYON 1987). Um weiteren mikrobiellen Eintritt durch den Speichel zu vermeiden, muss während der Behandlung unter aseptische Bedingungen mit Kofferdam gearbeitet werden (CARROTTE 2004a).

2.4 Endodontischer Erfolg und Misserfolg

2.4.1 Definition Erfolg und Misserfolg einer endodontischen Therapie

Es gibt verschiedene Methoden, um den Erfolg oder Misserfolg einer Wurzelkanalbehandlung zu bestimmen. Es müssen mehrere Kriterien in Betracht gezogen werden und in vielen Fällen ist der Nachweis einer erfolgreichen oder nicht erfolgreichen Wurzelkanalbehandlung nicht einfach zu erbringen (CHANDRA 2009). Grundsätzlich kommen der klinische (Schmerzanamnese, Perkussionsempfindlichkeit usw.), röntgenologische und histologische Befund zum Einsatz (HAMOOD 2001). Aus histologischer Sicht muss die periapikale Region wieder vollständig hergestellt sein ohne Anwesenheit inflammatorischer Zellen (ABBOTT 1991a). Dieses Ziel ist wie BRYNOLF Studie 1967 zeigt, schwierig zu erzielen. Nur 7% der behandelten Zähne konnten eine vollständige Heilung der periapikalen Region aufweisen, in 93% der Fälle verblieb eine chronische Entzündung, die aber klinisch symptomlos war. Aus diesem Grund sind

radiologische und klinische Indikatoren zuverlässiger für den Nachweis erfolgreicher oder nicht erfolgreicher Wurzelkanalbehandlungen (CHANDRA 2009). Nach wissenschaftlicher Stellungnahme der DGZMK und in Anlehnung an die Richtlinien der European Society of Endodontology (ESE) gibt es drei Kategorien in Bezug auf die Ergebnisbeurteilung einer Wurzelkanalbehandlung:

1. Vollständige Heilung:

- klinische Symptomfreiheit
- radiologisch durchgehend verfolgbarer Parodontalspalt normaler Breite (d. h. radiologisch als knöchern beurteilte Regeneration endodontisch bedingter Läsionen)

2. Unvollständige Heilung:

- klinische Symptomfreiheit
- radiologisch verifizierbare Verkleinerung der endodontisch bedingten Läsion

3. Keine Heilung:

- klinische Symptome einer endodontisch bedingten Parodontitis und/oder
- radiologisch erfassbare, externe progressive Resorptionen

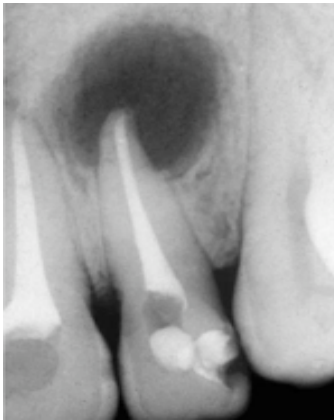


Abb. 1 endodontischer Misserfolg eines oberen zweiten Inzisiven aufgrund einer insuffizienten provisorischen Füllung. 3 Jahre nach der Wurzelkanalfüllung (aus Friedman 2002)

Eine röntgenologisch vollständige Regeneration knöcherner Läsionen wird in einem Zeitraum von maximal 4-5 Jahren erwartet (WEIGER et al. 2000).

In vielen retrospektiven Studien wird der Wurzelkanalbehandlung eine Erfolgsrate von 53-96% zugesprochen (HAMOOD 2001). Diese große Spannweite ist Folge des Fehlens standardisierter Verfahren (HAMOOD 2001). Folgende Faktoren müssen nach FRIEDMAN (2002) bei einer Studie demnach berücksichtigt werden:

- Zahntyp, Anzahl von Wurzeln
- Studiendesign
- Stichprobenumfang
- Auswahlkriterien
- endodontische Techniken
- Qualifikationen / Erfahrung der Behandler
- aseptische Behandlung (Verwendung von Kofferdam)
- Nachweis einer negativen bakteriellen Kultur
- post-endodontische Versorgung
- Komplexität der einzelnen Fälle

- Recall Rate
- Interpretation der Röntgenaufnahme
- nachfolgender Beobachtungszeitraum
- statistische Auswertung
- Auswertungseinheit (z. B. bei einem mehrwurzeligen Zahn wird jede Wurzel als eigenständige Einheit gesehen)
- Kriterien zur Beurteilung des Behandlungsergebnisses

In vielen Fällen bleibt der individuelle, auf den Zahn bezogene Beobachtungszeitraum unberücksichtigt, in dem der Erfolg oder Misserfolg einer Wurzelkanalbehandlung nachgewiesen wird. Das führt zur Verzerrung der tatsächlichen Situation (WEIGER et al. 2000). Aus diesem Grund sind prozentuale Angaben über Erfolg und Misserfolg einer Wurzelkanalbehandlung kritisch zu betrachten.

2.4.2 Das Ergebnis der Wurzelkanalbehandlung beeinflussende Faktoren

Schon am Anfang der Behandlung kann eine falsche Diagnose zum Misserfolg führen (HAMOOD 2001). Eine Fehlinterpretation der klinischen und/oder röntgenologischen Befunde, wie eine Fehldeutung des Schmerzes, des Vitalitätstestes, parodontaler Erkrankungen etc., können zu einer Behandlung des falschen Zahnes führen (HAMOOD 2001).

Es gibt **präoperative, intraoperative** und **postoperative Faktoren** die das Ergebnis der Wurzelkanalbehandlung beeinflussen.

1. Präoperative Faktoren:

- allgemeiner Gesundheitszustand des Patienten
- Zahntyp
- Symptome
- Größe der Läsion
- parodontaler Zustand des Zahnes
- präoperativer Zustand der Pulpa

- Mikroorganismen
- Fremdkörper
- Epithel

Allgemeiner Gesundheitszustand des Patienten: In verschiedenen Studien wurden Patientendaten (Geschlecht, Alter, allgemeiner Gesundheitszustand) erhoben und deren Effekt auf das Ergebnis der endodontischen Behandlung untersucht (CHANDRA 2009). NG et al. (2008) haben herausgefunden, dass der Heilungsprozess geschlechtsunspezifisch ist. Ältere Patienten besitzen aufgrund von Alterung, Malnutrition und/oder häufiger vorkommenden Allgemeinerkrankungen wie Diabetes mellitus eine schlechtere Regenerationsfähigkeit. Die Erfolgsrate sinkt mit zunehmendem Alter der Patienten (NG et al. 2008). Eine Studie von FOUAD und BURLESON (2003) belegt einen Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und einer ebenfalls geringeren Erfolgsrate.

Zahntyp: Ein weiterer Faktor, der in Verbindung mit einem Langzeiterfolg der Wurzelkanalbehandlung steht, ist die unterschiedliche Wurzelkanalanatomie der Zähne. Molaren weisen eine kompliziertere Wurzelkanalmorphologie auf. Nach TRONSTAD (2009) zeigen dagegen mehrere Studien eine höhere Erfolgsrate für Zähne mit drei Wurzeln (90%) als Zähne mit zwei (80%) oder einer Wurzel (70%). Die Ergebnisse werden auf den kleineren Wurzelkanaldurchmesser in mehrwurzeligen Zähnen zurückgeführt, welche gründlicher aufbereitet werden können als einwurzelige Zähne mit größerem Wurzelkanaldurchmesser. Andere klinische Studien belegen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen Zahntyp und Ergebnis der Wurzelkanalbehandlung gibt (CHANDRA 2009).

Symptomatik: Präoperative Symptome können einen Hinweis auf Bakterienart und Anzahl vorkommender Mikroorganismen im Wurzelkanalsystem geben (ØRSTAVIK et al. 1991). Symptomatische wie asymptomatische Zähne zeigen hinsichtlich endodontischer Behandlungen gleiche Erfahrungsraten (SJÖRGEN et al. 1990, ABITBOL 2001).

Größe der Läsion: Kleine apikale Läsionen (von bis zu 5 mm Durchmesser) haben gegenüber größeren Läsionen eine bessere Erfolgsrate (WEIGER et al. 2000). Andere Studien zeigen hinsichtlich der Erfolgsrate keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Wurzelkanalbehandlung und Läsionsdurchmesser (BYSTROM et al. 1987, SJÖRGEN et al. 1990, SJÖRGEN et al. 1997, ABITBOL 2001). Allerdings lässt sich ein Zusammenhang zwischen Größe der Läsion und Anzahl von Mikroorganismen im Wurzelkanal nachweisen (BYSTROM et al. 1987), was wiederum einen Effekt auf das

Resultat der Wurzelkanalbehandlung hat. Die beste Erfolgsrate hat eine infizierte Pulpa ohne apikale Läsion (FRIEDMAN 1998).

Parodontaler Zustand des Zahnes: In einigen Fällen hängt die endodontische Prognose von dem Ergebnis anderer Behandlungsformen ab, wie z. B. bei Paro-Endo-Läsion. Versagt die parodontale Therapie, ist auch mit einem endodontischen Misserfolg zu rechnen (HAMOOD 2001). ABITBOL (2001) hat beobachtet, dass bei einer Gesamtzahl von 21 verlorengangenen Zähnen, 52% aufgrund einer parodontaler Erkrankung extrahiert werden mussten. Daher ist sowohl eine endodontische als auch parodontale Nachkontrolle für das Ergebnis der Wurzelkanalbehandlung von Bedeutung.

Präoperativer Zustand der Pulpa: Der präoperative Zustand der Pulpa (Pulpitis, Nekrobiose, Nekrose und pulpenlose Infektion) hat einen signifikanten Einfluss auf die Erfolgsrate einer Wurzelkanalbehandlung (KOJIMA et al. 2004, NG et al. 2008). Einige Studien zeigen, dass vitale Pulpae bei denen eine Pulpitis diagnostiziert wurde bessere endodontische Heilungsraten aufweisen, als devitale mit einer nachweislichen Nekrose (GRAHNEN und HANSSON 1961). Demgegenüber berichten andere Studien über einen besseren prognostischen Verlauf, wenn die Pulpae nekrotisch sind und keine apikalen Läsionen vorliegen (STRINDBERG 1956). Welcher präoperative Zustand der Pulpa eine bessere Erfolgsrate aufweist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Mikroorganismen: Die Persistenz von Mikroorganismen im Wurzelkanal und/oder in der periapikalen Region ist der ausschlaggebende Faktor für einen endodontischen Misserfolg (NAIR et al. 1990, LIN et al. 1992, SIQUEIRA 2001, SIQUEIRA und ROCAS 2006, SAITO et al. 2008). Der Behandler ist oft fehlgeleitet von der Annahme, dass Verfahrensfehler wie Instrumentenbruch, Perforation, Über- bzw. Unterfüllung usw. die unmittelbare Ursache für den endodontischen Misserfolg ist. In den meisten Fällen gefährdet ein Verfahrensfehler den Erfolg der endodontischen Behandlung nur wenn auch eine Infektion des betroffenen Zahnes vorliegt (SIQUEIRA 2001). Wenn Mikroorganismen zum Zeitpunkt der Wurzelfüllung im Wurzelkanal verbleiben oder sie nach Abschluss der endodontischen Therapie in den Wurzelkanal eindringen, besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit eines Misserfolges (BYSTROM et al. 1987, SJÖRGEN et al. 1997). Wie groß das Risiko einer Reinfektion ist, hängt von der Qualität der Wurzelfüllung und der koronalen Versiegelung ab (SAUNDERS und SAUNDERS 1994). In Studien konnte belegt werden, dass ein Teil des Wurzelkanalsystems während der chemo-mechanischen Präparation unbehandelt bleibt - unabhängig davon, welche Techniken und Instrumente verwendet wurden (SIQUEIRA et al. 1997). Unbehandelte Bereiche enthalten Bakterien und nekrotisches Gewebe, auch wenn

die Wurzelkanalfüllung im Röntgenbild lege artis erscheint (NAIR et al. 1990, LIN et al. 1991). Die Mikroorganismen müssen intrakanalen Desinfektionsmitteln standhalten und sich der Umgebung mit wenig verfügbaren Nährstoffen anpassen, um im Wurzelkanal überleben zu können. (SIQUEIRA 2001). Bakterien siedeln sich am Isthmus, an der Ramifikation, am apikalen Delta und in den Dentintubuli an und bleiben in einigen Fällen von intrakanalen Desinfektionsmitteln unbeeinflusst (LIN et al. 1991). In diesen Bereichen des Wurzelkanalsystems befindet sich wenig Substrat, die Bakterien werden für gewöhnlich von dem Wurzelkanalfüllmaterial eingemauert, sterben oder es wird zumindest ein Zugang zum apikalen Gewebe verhindert (SIQUEIRA 2001). Nur wenige Bakterienarten sind in der Lage, sich der Umgebung mit verändertem Sauerstoffanteil anzupassen und Resistenzen gegenüber intrakanalen Medikamenten zu entwickeln. Wie in Kapitel 2.2 angesprochen, liegt bei endodontischen Misserfolgen ein anderes Keimspektrum vor als bei der primären Infektion. Vor allem sind gram-positive fakultative Anaerobier zu beobachten (PINHEIRO et al. 2003b, FIGDOR und SUNDQVIST 2007). *E. faecalis* wurde in 30%-64% der Fälle einer persistierenden Parodontitis apicalis nachgewiesen. Dieser Keim zeigt eine ausgeprägte Resistenz gegenüber verschiedenen Medikamenten, wie z. B. Calciumhydroxid (SUNDQVIST et al. 1998, LOVE 2001). RUPF et al. (2000) bestätigen die Paro-Endo-Wechselwirkung und deren Einfluss auf die Widerstandsfähigkeit parodontaler und/oder endodontaler Erkrankungen.

Fremdkörper: Mechanische Beschädigung oder die Anwesenheit von Fremdkörpern im apikalen Bereich, schädigen das Gewebe und können zu einer chronischen Entzündung führen (CHANDRA 2009). Als Fremdkörper sind bekannt: Metall, Sealer, Papierspitzen, Zellstoff (INGLE und BAKLAND 2002). Ist das Immunsystem nicht in der Lage, die Fremdkörper abzubauen, kann es zu einer chronischen Infektion kommen (CHANDRA 2009). Wurde z. B. das Wurzelfüllungsmaterial über den Apex hinaus in das apikale Gewebe gepresst, muss mit einer schlechteren Prognose gerechnet werden (SJÖRGEN et al. 1990, ØRSTAVIK und HÖRSTED-BINDSLEV 1993). Wird als Füllungsmaterial gewebeverträgliche Guttapercha verwendet, ist die verringerte Erfolgsrate eher auf die Überinstrumentierung und die damit verbundene Verdrängung der Debris in das apikale Gewebe zurückzuführen als auf das Material an sich (SJÖRGEN et al. 1990). Überpresster Sealer kann während des Heilungsprozesses vom Organismus völlig oder teilweise abgebaut werden (CARROTTE 2004c).

Epithel: Ein weiterer Faktor, der das Ergebnis der Wurzelkanalbehandlung beeinflusst, ist das Epithel (CHANDRA 2009). Wenn die Malassez-Epithelreste bestehen bleiben, kann sich

daraus bei entsprechendem Stimulus eine radikuläre Zyste entwickeln (LOUIS et al. 2011). In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Therapie radikulärer Zysten. Einige befürworten die operative Entfernung, andere ein konservatives Vorgehen.

2. Intraoperative Faktoren:

- Kofferdam
- mechanische Aufbereitung/apikale Erweiterung
- Wurzelkanalspülung und Medikation
- bakterieller Kulturnachweis vor Wurzelfüllung
- Wurzelfüllung: Techniken, Material, apikaler Umfang und Qualität

Kofferdam: Der Gebrauch von Kofferdam ist in der endodontischen Behandlung nicht wegzudenken. Behandler befinden sich ohne den Gebrauch von Kofferdam in einer legalen Gefahr (CHANDRA 2009). Es besteht kein Zweifel daran, dass die Kontamination des Wurzelkanals mit Speichel neuen Mikroorganismen einen Weg in den Wurzelkanal eröffnet, die Behandlungsdauer verlängert und den Erfolg verringert (CARROTTE 2004a). Die Verwendung von Kofferdam vermindert die Gefahr, der Instrumenten- bzw. Fremdkörperaspiration und dass das Weichgewebe durch starke Spüllösungen und Medikamente verletzt wird. Aus diesen Gründen ist der Gebrauch von Kofferdam ein wesentlicher Faktor für den Erfolg einer Wurzelkanalbehandlung (CHANDRA 2009).

Mechanische Aufbereitung/apikale Erweiterung: Eine korrekte Zugangspräparation zur Darstellung aller Wurzelkanäle und späteren Wurzelkanalaufbereitung stellen die mechanischen Ziele einer endodontischen Behandlung dar, welche die Reinigung und Füllung der Wurzelkanäle erst ermöglichen (PETERS und PETERS 2010). Eine falsche Zugangspräparation kann zum Übersehen eines Wurzelkanals und/oder einer insuffizienten Aufbereitung der Kanäle führen, was im weiteren Verlauf zu einer schlechteren Prognose führt. Ein durch die Aufbereitung veränderter Wurzelkanalverlauf oder sogar eine Perforation haben einen großen Einfluss auf das Ergebnis der Behandlung (PETERS und PETERS 2010). Welchen Einfluss die apikale Erweiterung auf das Resultat der Wurzelkanalbehandlung hat, ist in der Literatur stark umstritten. Auf der einen Seite wird von einer höheren Erfolgsrate bei Verwendung von Feilen mit kleineren Durchmessern ausgegangen (HOSKINSON et al. 2002). Nach HOSKINSON et al. (2002) liegt die Erfolgsrate bei der Verwendung kleinerer Feilendurchmesser (ISO-Größe 20-30) bei 77%,

bei größeren Feilendurchmesser (ISO-Größe 35-90) dagegen nur bei 70%. Auf der anderen Seite steht dieses Ergebnis im Widerspruch zu der konzeptuellen Bedeutung einer möglichst vollständigen Entfernung infizierten Dentins während der endodontischen Behandlung (FRIEDMAN 2002). Das Wurzelentin kann von Mikroorganismen bis zu einer Tiefe von 150-250 μm penetriert werden (GUTIERREZ et al. 1990), in der sie Spüllösungen und Medikamente nicht erreichen (OGUNTEBI 1996). Nur eine Erweiterung der Kanalgröße um 300-500 μm gewährleistet die Entfernung des infizierten Dentins (FRIEDMAN 2002). Eine umfangreiche Erweiterung verbessert die Entfernung von infiziertem Dentin und die Desinfektion des Wurzelkanals im apikalen Bereich (ØRSTAVIK et al. 1991).

Wurzelkanalspülung: Trotz einer großen Auswahl an Wurzelspüllösungen, wird in der Literatur eine Kombination aus NaOCl und EDTA empfohlen (CHANDRA 2009). Aktuell wird die Abfolge der zu verwendenden Spüllösungen diskutiert, d.h. ob zuerst in der Kombination EDTA/NaOCl/EDTA oder NaOCl/EDTA/NaOCl gespült werden soll. ABBOTT et al. (1991b) empfehlen zuerst mit EDTA zu spülen, da NaOCl im apikalen Drittel einen intakten smear layer hinterlässt. Andere Autoren weisen auf die Eigenschaft von EDTA hin, einen negativen Einfluss auf den antibakteriellen und gewebeauflösenden Effekt von NaOCl zu haben. Sie fordern, keine Wechselfpülung mit EDTA und NaOCl durchzuführen (ZEHNDER et al. 2005, YOUNG et al. 2007). Es gibt zu diesem Zeitpunkt keine definitive Empfehlung zur Auswahl der ersten Wurzelkanalspülkombination. Allerdings ist unumstritten, dass der gleichzeitige Gebrauch zweier Spüllösungen in der endodontischen Behandlung höhere Erfolgsraten aufweist als eine alleinige Wurzelkanalspüllösung (CHANDRA 2009).

Medikation: Die Verwendung einer medikamentösen Einlage ist ein bedeutender Bestandteil der endodontischen Behandlung. Antibiotische Pasten wie Ledermix® und antiseptische Calciumhydroxidpasten scheinen in der heutigen Zeit die hauptsächlich verwendeten Medikamente bei der Wurzelkanalbehandlung zu sein (CHANDRA 2009). Nach ABBOTT (1991a) erfüllen diese beiden Medikamente die meisten Anforderungen an ein ideales Wurzelkanalmedikament. Des Weiteren hängt der Erfolg der Wurzelkanalbehandlung vom Wissen hinsichtlich der Verwendung der einzelnen Medikamente und über deren Behandlungsreihenfolge ab (CHANDRA 2009).

Bakterieller Kulturnachweis vor Wurzelkanalfüllung: SJÖRGEN et al. (1997) haben nachgewiesen, dass in 94% der Fälle, bei denen vor Wurzelkanalfüllung keine Bakterien kultivierbar waren, eine vollständige Heilung erfolgte. Demgegenüber kommt es nur in 68% der Fälle zu einer vollständigen Heilung, wenn vor endodontischer Therapie ein

Kulturnachweis erfolgte. Diese Ergebnisse machen die Bedeutung nachgewiesener Bakterien auf das Resultat der endodontischen Behandlung deutlich. Dabei beeinflussen die die Wurzelkanäle infizierenden Bakterienarten die Prognose deutlich (SJÖRGEN et al. 1997). Obwohl die Bedeutung über den Nachweis von Bakterienkulturen vor Applikation einer Wurzelkanalfüllung anerkannt ist, finden sich im Praxisalltag nur wenig verfügbare Kulturnachweismethoden (SJÖRGEN et al. 1997), wofür hauptsächlich Kostengründe zu nennen sind.

Wurzelkanalfüllung: Technik /Material /apikaler Abfüllungsbereich und Qualität der Wurzelfüllung

Kein verfügbares Wurzelfüllmaterial erfüllt die Bedingungen an eine ideale Wurzelfüllung, so dass stets verschiedene Materialien zum Einsatz kommen. Die gebräuchlichste Methode ist eine Kombination aus Guttapercha und einem Sealer auf Zementbasis (GUIGAND et al. 2005). Die laterale Kondensationstechnik mit kalter Guttapercha bleibt unangefochten Goldstandard (GUIGAND et al. 2005). Trotzdem ist es nicht möglich, den Wurzelkanal vollständig bakteriendicht zu bekommen (TRONSTAD 2009). Wurzelkanalsealer können eine mikrobielle Invasion nur postoperativ minimieren (CHANDRA 2009). ØRSTAVIK et al. (1987) wiesen darauf hin, dass die Auswahl des Sealers einen Einfluss auf das Ergebnis der Wurzelkanalbehandlung hat. Die Studien von ERIKSEN et al. (1988) und ØRSTAVIK und HÖRSTED-BINDSLEV (1993) zeigen, dass die Auswahl des Sealers keine Auswirkung auf das Ergebnis der endodontischen Therapie hat.

Wenn beim Vorliegen einer apikalen Parodontitis der Abstand der Wurzelfüllung mehr als 2 mm vom radiologischen Apex entfernt ist, sinkt die Erfolgsrate (SJÖRGEN et al. 1990). In diesem Fall ist es nicht möglich, das infizierte Dentin im apikalen Bereich vollständig zu entfernen und es besteht die Gefahr, dass es zu einer persistierenden apikalen Parodontitis kommt (NAIR et al. 1990).

Die Qualität der Wurzelfüllung hat ebenfalls Einfluss auf die Prognose der Wurzelkanalbehandlung. Im Röntgenbild erkennbare Inhomogenitäten der Wurzelkanalfüllung sind mit einer schlechteren Prognose verbunden als eine wandständige Wurzelkanalfüllung (CHANDRA 2009).

3. Postoperative Faktoren:

- koronale Restauration

- vertikale Wurzelfraktur
- Anzahl der Behandlungssitzungen
- Nachkontrolle

Koronale Restauration: Die Qualität der koronalen Restauration und die Versorgung des Zahnes mit einem hochwertigen Sealer sind entscheidend für den Erfolg der Wurzelkanalbehandlung (DIETSCHI et al. 2010). Eine lege artis durchgeführte koronale Restauration verhindert eine Rekontamination durch die in der Mundhöhle vorkommenden Mikroorganismen. Nach SAUNDERS und SAUNDERS (1994) gibt es folgende Möglichkeiten der Rekontamination durch den verschlossenen Wurzelkanal:

1. Nicht zeitnah erfolgte, definitive koronale Restauration nach der Wurzelkanalbehandlung
2. Fraktur der koronalen Restauration und/oder des Zahnes
3. Präparation des Wurzelkanals für die Aufnahme eines Stiftes, wenn der apikale Bereich der Wurzelfüllung undicht und/oder zu kurz/zu lang ist

Vertikale Wurzelfraktur: Eine vertikale Wurzelfraktur kann zum Misserfolg einer endodontischen Behandlung führen (SIGURDSSON et al. 2010). Sie kann z. B. aus einem zu hohen Substanzverlust infolge der Wurzelkanalaufbereitung oder bei der Präparation des Wurzelkanals für die Aufnahme eines Stiftes hervorgehen.

Anzahl der Behandlungssitzungen: In den letzten Jahren gab es kontroverse Diskussionen über die Anzahl der Behandlungssitzungen (CHANDRA 2009). Traditionell wird die Wurzelkanalbehandlung in zwei oder mehr Terminen aufgeteilt, um den verwendeten Medikamenten genügend Zeit für deren Wirkung zu geben sowie den Patienten die Sitzungen kürzer und damit angenehmer zu machen (BERGENHOLTZ und SPANGBERG 2004). Neuesten Untersuchungen zur Folge geht der Trend in Richtung einer einzigen Behandlungssitzung, um Mikroorganismen schnell die nötigen Substrate und ein das Bakterienwachstum förderndes Milieu zu entziehen (FIGINI et al. 2008). FIGINI et al. (2008) folgerten aus ihrer Studie, dass es keinen radiologischen Unterschied hinsichtlich der Qualität der Wurzelfüllung in Bezug auf die Anzahl der Behandlungssitzungen gibt. Nur bei einer chronisch apikalen Parodontitis wird eine vorläufige Wurzelfüllung mit mehreren Sitzungen empfohlen (FIGINI et al. 2008).

Nachkontrolle: Die Nachkontrolle spielt eine große Rolle, um das Ergebnis der Wurzelkanalbehandlung zu evaluieren. Da die Wiederherstellung des apikalen Gewebes ein dynamischer Prozess ist, sollten die Abstände sechs Monate, ein Jahr, zwei Jahre und vier Jahre nach Behandlungsende betragen (HEIDEMANN et al. 2005). Obwohl 90% der Zähne nach einem Jahr schon Zeichen einer Heilung aufweisen (ØRSTAVIK 1996) und 50% sogar vollständig im Sinne einer Restitutio ad integrum geheilt sind (ADENUBI und RULE 1976) kann es 4-5 Jahre dauern, bis das apikale Gewebe vollständig regeneriert (ADENUBI und RULE 1976, BYSTROM et al. 1987, SJÖRGEN et al. 1990, ØRSTAVIK 1996). Dieser Zeitraum sollte eingehalten werden, um den Verlauf der Heilung oder den Misserfolg der Wurzelkanalbehandlung richtig beurteilen zu können.

2.5 Revision

Kommt es nach abgeschlossener Wurzelkanalbehandlung nicht zur erhofften klinischen und röntgenologischen Symptombefreiung, muss eine zweite Wurzelkanalbehandlung durchgeführt werden. Die komplizierte Anatomie des Wurzelkanalsystems, die unvollständige Entfernung von Bakterien im Wurzelkanal, die Rekontamination des Endodonts, die beschränkte Auswahl an Instrumenten, Spüllösungen, Medikamenten und Wurzelkanalbehandlungstechniken sowie Behandlungsfehler können Gründe für einen Misserfolg sein (HÜLSMANN und WEIGER 2004). Die endodontische Revision verfolgt dasselbe Ziel wie die Primärbehandlung: einen bakterienfreien und bakteriedichten Wurzelkanal, eine adäquate koronale Restauration und somit eine Heilung bzw. die Vermeidung einer Reinfektion (CHANDRA 2009). Die größte Schwierigkeit bei der Revision ist es, die Ursache des Misserfolges der Wurzelkanalbehandlung exakt zu evaluieren (VERSÜMER 2007). Generell haben Revisionen eine schlechtere Erfolgsrate als Primärbehandlungen (SELDEN 1974, PEKRUHN 1986, SJÖRGEN et al. 1990, FRIEDMAN et al. 1995). Die Erfolgsrate orthograde Revisionen wird in der Literatur mit 60-80% angegeben (SJÖRGEN et al. 1990). Zähne mit apikalem röntgenologischen Befund haben prinzipiell eine schlechtere Erfolgsprognose (74-86%) als Zähne bei denen keine Parodontitis apicalis vorliegt (92-98%) (FRIEDMAN und MOR 2009). Bei endodontischen Misserfolgen kommen neunmal häufiger resistente Keime vor als bei der Erstbehandlung des Endodonts (ROCAS et al. 2004). Das Keimspektrum umfasst dabei häufig *E. faecalis*. Die Beseitigung dieser Keime ist grundlegend für den Erfolg einer Revision (CHANDRA 2009). Auch das Risiko intraoperativer Zwischenfälle ist höher als bei der Initialbehandlung.

Aufgrund der bereits geschwächten Wurzelkanalwände durch die vorangegangene Aufbereitung, kann es schneller zu Wurzelfraktur, Perforation etc. kommen.

2.5.1 Indikationen zur Revision

Nach der Stellungnahme der DGZMK ist die Revision indiziert:

- Wurzelkanalbehandelte Zähne mit röntgenologischen Symptomen einer persistierenden oder neu entstandenen, endodontisch bedingten Parodontitis apicalis
- Wurzelkanalbehandelte Zähne mit klinischen Symptomen einer endodontisch bedingten Parodontitis apicalis
- Wurzelkanalbehandelte Zähne mit röntgenologisch oder klinisch insuffizienter Wurzelkanalfüllung (z. B. mangelhafte Homogenität der Füllung, nicht gefüllte Areale des endodontischen Systems, fragwürdiges und nicht mehr indiziertes Füllungsmaterial etc.) ohne klinische oder röntgenologische Anzeichen einer Parodontitis apicalis
- Wurzelkanalfüllungen mit Exposition zum Mundhöhlenmilieu
- Wurzelkanalbehandelte Zähne mit progressiv verlaufenden, externen entzündlichen Resorptionen

Tritt ein Misserfolg nach WSR ein, stellt die orthograde Revision eine weitere Möglichkeit dar, den Zahnerhalt zu sichern (APPEL 2011).

Liegt eine nicht-endodontische Ursache für die Persistenz der apikalen Parodontitis vor (z. B. eine parodontale Erkrankung), ist die Erhaltungswürdigkeit des Zahnes fraglich. Ist keine Verbesserung des Ausgangszustandes bzw. die Beseitigung der Ursache zu erwarten, ist eine Revision kontraindiziert (HÜLSMANN und WEIGER 2004).

2.5.2 Ablauf der Revision

Der Ablauf der orthograden Revision beinhaltet die vollständige Entfernung der Primärfüllung bis zum Foramen apicale. Daraufhin folgt Reinigung, Formung und Füllung des Wurzelkanals (STABHOLZ und FRIEDMAN 1988). Das am häufigsten verwendete Material für die Wurzelkanalfüllung ist Guttapercha in Kombination mit einem Sealer (FRIEDMAN et al. 1989). Es ist entscheidend, den Sealer vollständig aus dem Wurzelkanal zu entfernen,

weil Bakterien, die sich möglicherweise hinter dem nicht entfernten Sealer befinden, so zum Misserfolg der Revision führen könnten (INGLE und BAKLAND 2002). Bisherige Studien zeigen, dass die vollständige Entfernung von Debris normalerweise nicht erreicht wird (WILCOX et al. 1987, ZUOLO et al. 1994, IMURA et al. 1996). Nach WILCOX und SWIFT (1991) ist es unwahrscheinlich, dass erstmalig nicht aufbereitete Areale bei der Revision vollständig bearbeitet werden, wenn bei der Revision die gleiche Technik wie bei der Primärbehandlung verwendet wird. Daher ist es nachvollziehbar, dass eine Kombination aus verschiedenen Methoden die Reinigungseffizienz verbessert und damit auch die Erfolgsrate der Revision erhöht (WILCOX und SWIFT 1991). Ist die konservativ-endodontische orthograde Revision nicht erfolgreich, muss auf dem chirurgischen Wege eine retrograde Revision durchgeführt werden.

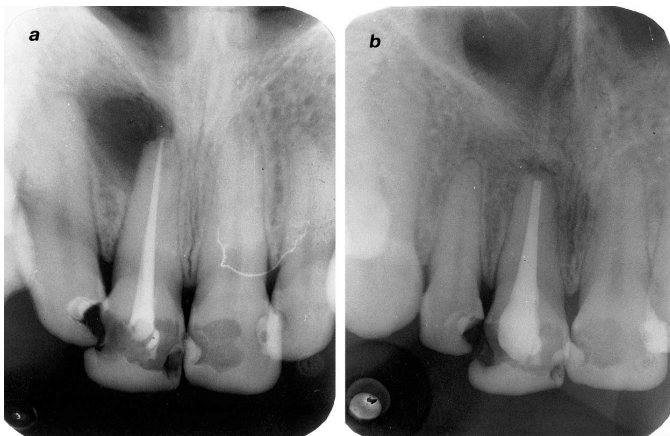


Abb. 2 Bild A zeigt einen Wurzelkanalbehandelten oberen mittleren Inzisiven mit apikaler Aufhellung. Bild B zeigt den selben Zahn 5 Jahre nach durchgeführter Revision (aus CALISKAN 2005).

2.6 Wurzelspitzenresektion

Nach KUNKEL und HÜLSMANN (2007) ist die Wurzelspitzenresektion (WSR) eine chirurgische Kürzung der Wurzelspitze nach operativen Zugang durch den Knochen. Dieser erfolgt mittels Osteotomie bei gleichzeitiger Wurzelfüllung mit bzw. ohne retrograden Verschluss (KUNKEL et al. 2007). Ziele der WSR sind ein bakteriendichter Wurzelkanalabschluss am Resektionsquerschnitt, Regeneration des periapikalen Gewebes und somit der Erhalt der Zahnfunktion (KUNKEL und HÜLSMANN 2007).

2.6.1 Indikationen zur WSR

Die WSR ist heute ein zuverlässiges Verfahren für die Behandlung eines Zahnes mit periapikaler Läsion wenn der konventionell orthograde Zugang problematisch ist (VON ARX et al. 2001). Eine WSR ist nur indiziert, wenn eine orthograde Revision nicht möglich ist oder das Problem auf anderem Wege nicht behoben werden kann (CARROTTE 2005).

Nach KUNKEL und HÜLSMANN (2007) gibt es folgende Indikationen für eine chirurgische Intervention:

- Bei persistierender apikaler Parodontitis mit klinischer Symptomatik oder zunehmender radiologischer Osteolyse nach einer suffizienten oder insuffizienten Wurzelfüllung oder Revisionsbehandlung, falls diese nicht oder nur unter unverhältnismäßigen Risiken entfernt oder verbessert werden kann.
- Nach einer Wurzelkanalbehandlung mit überpresstem Wurzelkanalfüllmaterial und klinischer Symptomatik oder Beteiligung von Nachbarstrukturen (Kieferhöhle, Mandibularkanal).
- Bei konservativ nicht durchführbarer Wurzelkanalbehandlung (obliterierter Wurzelkanal, erheblichen morphologischen Variationen, etc.) mit klinischer und/oder radiologischer Symptomatik.

Nach KUNKEL und HÜLSMANN (2007) gibt es folgende mögliche Indikationen für eine WSR:

- Bei apikaler Parodontitis mit apikaler Läsion ab 4-5 mm als Alternative zur konservativ endodontischen Behandlung (unabhängig von dieser Empfehlung raten die endodontischen Fachgesellschaften, trotz Bestehen apikaler Läsion die größer als 4 mm zuerst eine rein konservativ endodontische Behandlung durchzuführen)
- Bei persistierender apikaler Parodontitis als Alternative zur Revision (auch in diesem Fall raten die endodontischen Fachgesellschaften, zuerst eine rein konservativ endodontische Behandlung durchzuführen)
- Bei einer Fraktur eines Wurzelkanalinstrumentes in Apexnähe, welches orthograd nicht entfernbar ist

- Bei einer Via Falsa in Apexnähe, welche auf orthogradem Wege nicht verschlossen werden kann
- Bei Wurzelfrakturen im apikalen Wurzel Drittel
- Bei persistierender Schmerzsymptomatik trotz klinisch und radiologisch suffizienter Wurzelkanalfüllung
- Bei Freilegung oder Verletzung von Wurzelspitzen im Rahmen chirurgischer Eingriffe
- Bei persistierender apikaler Parodontitis bei bereits resezierten Zähnen

2.6.2 Erfolgsrate der WSR

Die Erfolgsrate der WSR variiert von 44% bis 90%. Dabei sind 81% der Fälle erfolgreich, bei denen neben einer retrograden auch eine orthograde Wurzelfüllung durchgeführt wurde. Im Gegensatz dazu steht eine 59%ige Erfolgsquote ohne zusätzliche orthograde Wurzelfüllung (VON ARX 2005). Ob es sich um einen Therapieerfolg handelt oder nicht, hängt von klinischen, radiologischen und histologischen Gesichtspunkten ab (HUUMONEN und ØRSTAVIK 2002). Klinisch sollte der operierte Zahn keine Symptome wie Perkussionsempfindlichkeit, Spontanschmerz bzw. Fistelbildung aufweisen. Radiologisch stellt sich eine Restitutio ad integrum als vollständige kalkdichte Verschattung mit knöcherner Textur der Resektionshöhle dar. Der histologische Aspekt ist für die Beurteilung des Therapieerfolges bei klinischen Studien unbedeutend, da eine histologische Probe nur bei Extraktion des Zahnes und daher bei einem Misserfolg genommen werden kann. Von wesentlicher Bedeutung ist der Ausgangsbefund vor WSR, wie z. B. der parodontale Zustand und die Ausdehnung der periradikulären Osteolyse. Die größte Bedeutung für den WSR hat der bakteriendichte Wurzelkanalverschluss (LANGER et al. 1981).

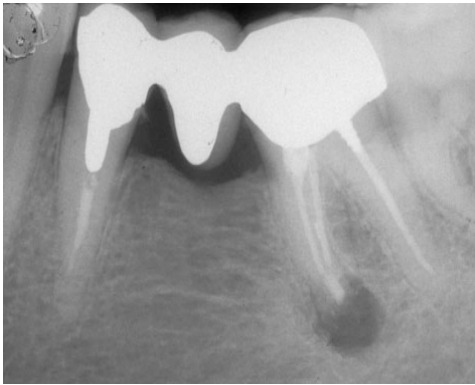


Abb. 3 Röntgenaufnahme von 36 kurz nach WSR (aus GAGLIANI et al. 2005)

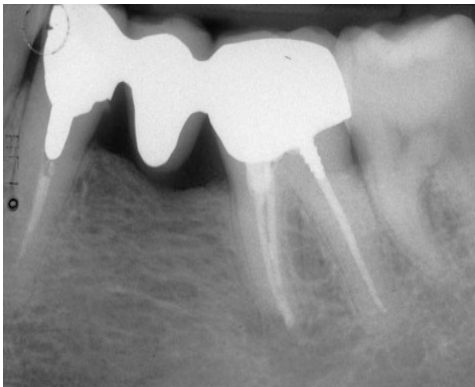


Abb. 4 Röntgenaufnahme von 36 fünf Jahre nach WSR (aus GAGLIANI et al. 2005)

2.6.3 Alternativen zur WSR

Alternative Therapiemöglichkeiten zur WSR sind nach KUNKEL und HÜLSMANN (2007):

- Hemisektion/Wurzelamputation: Entfernen einer oder mehrerer Wurzeln eines mehrwurzeligen Zahnes, um eine oder zwei Wurzeln und einen Teil der Zahnkrone zu erhalten
- Intentionelle Zahnreimplantation
- Knochentrepanation (Schröder`sche Lüftung)
- Extraktion
- Extraktion und Ersatz des Zahnes
- Bei inoperablen Patienten antibiotische Behandlung als Minimaltherapie

2.7 Erkrankungen des Parodonts

2.7.1 Das Parodont

Das Parodont ist ein komplexer Gewebeverbund, welcher aus der Gingiva, dem Wurzelzement, dem Desmodont und dem Alveolarknochen besteht und auch als marginales Parodont bezeichnet wird (LINDHE et al. 1999). Seine Hauptaufgaben sind folgende (Tab.1):

	Hauptaufgaben des Parodonts
1	Verankerung des Zahnes im Knochen
2	Dämpfung der Kaukräfte
3	Abwehr äußerer Noxen
4	Barriere zwischen Mundhöhlenmilieu und Zahnwurzel

Tab. 1 Hauptaufgaben des Parodonts (HELLWIG et al. 2003)

Die Mundschleimhaut wird in mastikatorische (keratinisierte Schleimhaut von Gaumen und Gingiva), spezielle (Schleimhaut des Zungenrückens) und die auskleidende Mukosa (Schleimhaut des Vestibulums, nicht keratinisiert) unterteilt (HELLWIG et al. 2003). Die Gingiva ist Teil der mastikatorischen Mukosa und bedeckt den Alveolarfortsatz. Sie endet am Zahnhals, umschließt die Zähne zervikal (beim gesunden Zahn 2 mm oberhalb der Schmelz-Zement-Grenze) und bildet mithilfe eines epithelialen Rings (Saumepithel) den Epithelansatz. Der erste Widerstand der intakten Bindegewebsfasern des Desmodonts erfolgt beim gesunden Zahn bei maximal 3,5 mm. Die makroskopische Anatomie der Gingiva wird in freie marginale, befestigte und interdentale Gingiva eingeteilt (HELLWIG et al. 2003). Die freie Gingiva ist blassrosa, besitzt eine feste Konsistenz und erscheint bei 40% der Erwachsenen gestipelt, läuft koronal flach aus, ist glatt und 0,8 bis 2,5 mm breit. Die befestigte Gingiva ist ebenfalls blassrosa und besitzt eine feste Konsistenz. Sie ist ca. 1 bis 9 mm breit und über Bindegewebsfasern fest mit dem Alveolarknochen und Wurzelzement verbunden (HELLWIG et al. 2003). Die interdentale Gingiva füllt den Raum zwischen zwei Zähnen aus. Sie besitzt einen oralen und vestibulären Papillenzipfel zwischen denen sich

der Col (sattelförmige Einsenkung) befindet. Die Breite der interdentalen Gingiva wird durch die Form der Zähne vorgegeben. Sie ist zwischen den Frontzähnen schmaler als zwischen den Seitenzähnen (HELLWIG et al. 2003). Die mikroskopische Anatomie der Gingiva wird unterteilt in das dem Zahn zugewandte orale Sulkusepithel (Schleimhaut des Zungenbeins), das der Mundhöhle zugewandte orale Epithel und das Saumepithel (stellt den Kontakt zwischen Gingiva und Zahn her). Die Epithelansätze des Saumepithels sorgen für einen Haftmechanismus an der Zahnoberfläche (epitheliale Haftung). Sie erstreckt sich vom apikalen Rand des Saumepithels (Schmelz-Zement-Grenze) bis hin zum Boden des Sulcus gingivae (schmale, bis zu 0,5 mm tiefe, rinnenartige Vertiefung zwischen Gingivasaum und Zahnoberfläche). Das Saumepithel besteht aus zwei Schichten: dem Stratum basale und dem koronal liegenden Stratum suprabasale. Die Erneuerungsrate des Saumepithels („Turn over“) beträgt 4-6 Tage und ist damit im Vergleich zum oralen Epithel mit 6-12 Tagen und der befestigten Gingiva mit 6-40 Tagen sehr hoch. Das Wurzelzement ist einerseits Teil des Zahnes, andererseits Teil des Parodonts (RATEITSCHAK et al. 2004). Das Zement ist ein spezialisiertes mineralisiertes Bindegewebe. Es ist gefäß- und nervenfrei, erfährt keine Resorption oder Remodellierung (KLIMM 2003). Es werden zwei Zementarten unterschieden: Das azelluläre oder primäre Zement, das beim Zahndurchbruch entsteht, und das zelluläre oder sekundäre Zement, das sich als Antwort auf die funktionellen Anforderungen bildet. Seine Funktion ist zum einen die Befestigung des Zahnes durch die Verankerung der kollagenen Faserbündel des Desmodonts im Zement, zum anderen die Adaptation und Reparatur des Zahnes (KLIMM 2003). Das Desmodont ist ein gut vaskularisiertes, zell- und faserreiches Bindegewebe, welches den Periodontalspalt zwischen Wurzeloberfläche und Alveolarknochen ausfüllt (HELLWIG et al. 2003). Charakteristisch für das Desmodont sind die desmodontalen Fasern, die sogenannten Sharpey-Fasern. Sie ziehen vom Alveolarknochen zum Zement und inserieren dort. Sie sind so angeordnet, dass der Zahn sowohl in vertikaler als auch in horizontaler Richtung trotz ausreichender Beweglichkeit Halt in der Alveole hat (SCHÄFER 2001). Im Alveolarknochen sind die Zähne in sogenannten Alveolen fest verankert. Seine weitere Funktion liegt in der Aufnahme und Verteilung von Belastungen, die auf den Zahn einwirken. Die Alveoleninnenseite wird als Lamina cribiformis bezeichnet. Sie ist an den Spongiosabälkchen des Knochens befestigt und verbindet so das Desmodont und das Knochenmark. Des Weiteren besteht der Alveolarknochen aus äußerer Kortikalis und dem spongiösen Stützknochen (GÄNGLER et al. 2005).

2.7.2 Definition Parodontopathien

Unter dem Begriff Parodontopathien werden entzündlich bedingte und nicht- entzündlich bedingte Erkrankungen der Gingiva und des Zahnhalteapparates (mit Alveolarknochenabbau) zusammengefasst (HELLWIG et al. 2003).

- **Primärer Ursachenkomplex:** dieser beschreibt die im Biofilm und Zahnplaque vorhandenen pathogene und die plaquebedingten entzündlichen Reaktionen des Parodonts
- **Sekundärer Ursachenkomplex:** lokale und systemische Faktoren, die den primären Ursachenkomplex beeinflussen können

2.7.3 Mikrobielle Aspekte bei Parodontopathien

Eine bakterielle Invasion führt zum Abbau epithelialen Gewebes, des Bindegewebes und Alveolarknochens (FLORES DE JACOBY et al. 1996). Bei parodontal gesunden Menschen gibt es in der Mundhöhle ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen pathogenen und apathogenen Mikroorganismen. Kommt es zu einer vermehrten Ansammlung von Mikroorganismen entlang des Gingivalrandes, verschiebt sich das Verhältnis zugunsten der pathogenen Keime und eine Entzündungsreaktion der gingivalen Strukturen kann folgen. Die auf der Zahnoberfläche im Bereich des Gingivalrandes vorhandenen Mikroorganismen in Kombination mit Speichel- und Nahrungsbestandteilen werden als Plaque bezeichnet (RATEITSCHAK et al. 2004). Nur ein kleiner Anteil von Bakterien im supragingivalen Plaque ist in der Lage, das parodontale Gewebe schwerwiegend zu schädigen. Die meisten dieser parodontopathogenen Keime sind gramnegativ und obligat anaerob. Die Pathogenität der Mikroorganismen beschreibt sich über deren Virulenzfaktoren, z. B. Adhäsion an den Geweben des Wirtsorganismus, Umgehung der wirtseigenen Abwehrmechanismen und der aktiven Destruktion des besiedelten Gewebes (MÜLLER 2001). Wird der Biofilm dieser parodontopathogenen Keime nicht durch Prophylaxemaßnahmen entfernt, kann eine Schwellung der Gingiva (Gingivitis) und eine bakterielle Entzündung des parodontalen Stützgewebes folgen (LINDHE et al. 1999). Wie stark die Gewebedestruktion weiter fortschreitet, hängt auch von der Immunstärke des Organismus ab. Systemische Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Osteoporose als auch vermehrte Risikofaktoren wie Tabakkonsum und genetische Faktoren spielen bei der Entwicklung und Progression parodontaler Erkrankungen eine wichtige Rolle (HELLWIG et al. 2003). Bei Ausbreitung supragingivaler Plaque nach subgingival in den Sulcus gingivae, kommt es zur

Taschenbildung. Durch verschiedene Faktoren ändert sich die Zusammensetzung und Struktur der Plaque (HELLWIG et al. 2003). In dieser ökologischen Nische können sich pathogene Mikroorganismen optimal vermehren, was eine Mischinfektion zur Folge haben kann (MÜLLER et al. 1997). Als besonders pathogen gelten *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* und *P. micros* (VAN WINKELHOFF et al. 2002). Keine dieser Bakterien ist allein in der Lage eine Destruktion des parodontalen Gewebes hervorzurufen. Die Kombination ihrer Virulenzfaktoren ermöglicht es jedoch, in Abhängigkeit der Zusammensetzung der mikrobiellen Taschenflora, bestimmte parodontale Erkrankungen hervorzurufen (NONNENMACHER 2003).

2.8 Zusammenhang zwischen endo- und parodontalen Erkrankungen

Zahnpulpa und parodontales Gewebe sind eng miteinander verbunden. Eine Entzündung der Pulpa bleibt so lange auf das Endodont begrenzt, wie die Körperabwehr der Infektion standhält und Reparaturprozesse mit Bildung von irregulären Reizdentin, Fibrose und dystrophischer Mineralisation stattfinden (BERGENHOLTZ und LINDHE 1978, KIM und TROWBRIDGE 1998). Liegt eine rasch fortschreitende Karies oder eine bakteriell infizierte Pulpnekrose vor, können sich die bakteriellen Stoffwechselprodukte über die anatomischen Verbindungen der apikalen und akzessorischen Kanäle vom Endodont auf das Parodont ausbreiten (RUTHERFORD 2002). Röntgenologisch lässt sich dieser Prozess in Form einer apikalen oder periradikulären Transluzenz nachweisen (RATKA-KRÜGER et al. 2000, BERGENHOLTZ und HASSELGREN 2003). Umgekehrt können bakterielle Substanzen bedingt durch Entzündungsprozesse marginaler Parodontitiden die gesunde Pulpa über die apikalen und akzessorischen Kanäle sowie über Dentintubuli erreichen (BERGENHOLTZ und HASSELGREN 2003). Ist die apikale Blutversorgung intakt, kann sich die Pulpa gegen die bakterielle Invasion aus dem Parodont wehren (BERGENHOLTZ und HASSELGREN 2003). Schwieriger wird es in Fällen, in denen eine chronische Parodontitis zur Fibrose und zu verschiedenen Arten der Mineralisation geführt hat, wodurch die Zahl der Blutgefäße und Nervenfasern reduziert sein können (BERGENHOLTZ und HASSELGREN 2003).

Folgende Hauptaustauschwege sind nach ROTSTEIN und SIMON (2006) zwischen Endodont und Parodont vorhanden:

- **Dentintubuli**
- **laterale und akzessorische Kanäle**
- **Foramen apicale**

Dentintubuli: Freiliegende Dentintubuli in einer zementfreien Zone ermöglichen Bakterien und deren Stoffwechselprodukte die Kommunikation zwischen Pulpa und parodontalem Ligament (ROTSTEIN und SIMON 2006). Die exponierten Dentintubuli können durch Entwicklungsdefekte, Erkrankungsprozesse, parodontale oder chirurgische Verfahren entstehen (ROTSTEIN und SIMON 2006). Treffen Zement und Schmelz an der Schmelz-Zement-Grenze nicht zusammen, erzeugen exponierte Dentintubuli Austauschwege zwischen Pulpa und parodontalem Ligament (SCHRÖDER 1991). Nach einer Studie von MÜLLER und VAN WYK (1984) kommen in 18% der Zähne generell und 25% der anterioren Zähne exponierte Dentintubuli an der Schmelz-Zement-Grenze vor.

Laterale und akzessorische Kanäle: Laterale oder akzessorische Kanäle im Wurzel- oder Furkationsbereich stellen eine Verbindung von Pulpa und Desmodont dar. Geschätzt haben 30-40% aller Zähne laterale oder akzessorische Kanäle, sie treten aber gehäuft an oberen dritten Molaren auf, gefolgt von oberen mittleren Schneidezähnen. Die meisten lateralen Kanäle sind mit 17% im apikalen Drittel zu finden, 9% im mittleren Teil und weniger als 2% koronal (ROTSTEIN und SIMON 2006). Das Vorkommen einer parodontalen Erkrankung, die durch Reizstoffe in der Pulpa über laterale Kanäle verursacht worden ist, scheint gering (ROTSTEIN und SIMON 2006). Nach einer Studie von KIRKHAM (1975) sind von 1000 untersuchten Zähnen mit ausgedehnter parodontaler Erkrankung nur 2% in Zusammenhang mit parodontaler Infektion und lateralen Kanälen gebracht worden. Von besonderer Bedeutung sind akzessorische Kanäle an Molaren, die im Bereich der Furkation münden und einen direkten Weg zur Kommunikation zwischen Pulpa und Parodont darstellen (LOWMAN et al. 1973, GUTMANN 1978). Die Häufigkeit von furkalen Kanälen wird in verschiedenen Studien mit 23%-76% angegeben (DE DEUS 1975). Akzessorische Kanäle enthalten Bindegewebe und Blutgefäße, welche den Blutkreislauf der Pulpa mit dem des Parodonts verbinden (ROTSTEIN und SIMON 2006). SELTZER et al. (1963) berichten, dass sich eine primär endodontische Infektion in Furkationen ausbreiten und dann eine Entzündungsreaktion im interradikulären Parodont hervorrufen kann. Dieser

Übertragungsweg wird im Vergleich zu einer apikalen Parodontitis weniger häufiger beobachtet (HIATT und AMEN 1964).

Foramen apicale: Das Foramen apicale ist der Hauptaustauschweg zwischen Endodont und Parodont. Dort tritt die Gefäß- und Nervenversorgung in die Pulpa ein. Bakterielle Nebenprodukte und Entzündungsmediatoren können in einer infizierten Pulpa über das Foramen apicale eine Erkrankung des Parodonts im apikalen Bereich hervorrufen. Eine Pulpitis oder Pulpanekrose kann sich bis in das periapikale Gewebe ausdehnen und dort eine lokale Entzündungsreaktion hervorrufen, die oft mit Knochen- und Wurzelresorption einhergeht (ROTSTEIN und SIMON 2006). Bei Bildung eines Fistelganges kann es auch zu einem Abfluss in die Mundhöhle kommen (LÖST 1994). Ebenso können vom Apex entzündliche Mediatoren aus der parodontalen Tasche zur Pulpa gelangen und dort eine Entzündung hervorrufen (ROTSTEIN und SIMON 2006). Dies wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert (BERGENHOLTZ und NYMAN 1984, DONGARI und LAMBRIANIDIS 1988, MIYASHITA et al. 1998).

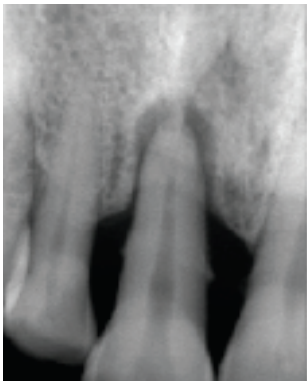


Abb. 5 Paro-Endo-Läsion (aus ROTSTEIN und SIMON 2006)

2.8.1 Parodontopathogene Keime bei endodontischen Misserfolgen:

Sowohl endodontische als auch parodontale bakterielle Erkrankungen sind vorwiegend auf obligat anaerobe Mischinfektionen zurückzuführen (SUNDQVIST 1994). Die meisten Bakterienarten, die in infizierten Wurzelkanälen zu finden sind, lassen sich auch in einer parodontalen Tasche nachweisen (SUNDQVIST 1994). RUPF et al. (2000) wiesen in einer Studie mittels PCR folgende Bakterien sowohl im Endodont als auch im Parodont nach:

- *A. actinomycetemcomitans*
- *F. nucleatum*
- *P. gingivalis*
- *P. intermedia*
- *T. denticola*
- *T. forsythia*
- *E. corrodens*

SOCRANSKY et al. (1998) haben die parodontalen Keime anhand ihrer Pathogenität in unterschiedliche Komplexe eingeteilt. Besonders die zum roten Komplex gehörigen Keime wie *P. gingivalis*, *T. forsythia* und *T. denticola* werden oft gemeinsam nachgewiesen und treten meist bei tiefen Taschen und endodontischen Misserfolgen auf (RUPF et al. 2000). Die Relevanz des orangenen Komplexes mit *P. intermedia*, *P. micros* und *F. nucleatum* liegt in deren Eigenschaft, als sogenannte „Brückenspezies“ zwischen den Frühkolonisierern (grüner bzw. orange-assoziiertes Komplex) und den stark pathogenen Keimen des roten Komplexes zu fungieren (DOMBROWA 2007). Das pathogene Potenzial dieser Markerkeime ist vor allem aufgrund ihres Stoffwechsels bedingt, welcher eine Senkung des Sauerstoff-Partialdruckes hervorruft und dadurch die Besiedlung strikt anaerober Keime ermöglicht (DOMBROWA 2007). Die Vertreter des grünen Komplexes mit *E. corrodens* und *Capnocytophaga spp.* sind in der Lage, Rezeptoren auszubilden, die ihnen ein Andocken an der glatten Zahnoberfläche ermöglichen, womit sie die Besiedlungsgrundlage für die nachfolgenden Spezies bilden (DOMBROWA 2007).



Abb. 6 Darstellung der einzelnen Komplexe (nach SOCRANSKY et al. 1998) und Einteilung der Komplexe nach Besiedlungszeitpunkt und Pathogenität. Die fettgedruckten Erreger wurden in dieser Studie mit dem micro-IDent®/micro-IDent® plus Testkit von Hain Lifescience nachgewiesen.

3 Material und Methode

3.1 Studiendesign

In dieser Studie wird die Relevanz von 11 parodontopathogenen Mikroorganismen bei endodontischen Misserfolgen mithilfe der DNA•STRIP-Technologie (micro-IDent, micro-IDent plus, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) aus Patientenproben und deren Synergismus in der Biofilmformation untersucht. Auf folgende Keime wurden die Proben hin getestet: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens* und *Capnocytophaga* spp..

3.2 Patienten

Insgesamt wurden 103 mikrobielle Proben von Patienten im Alter zwischen 19 und 74 Jahren entnommen. Maßgeblich für die Auswahl der Proben war ein endodontischer Misserfolg, welcher einen primär wurzelkanalbehandelten Zahn mit radiologisch apikaler Aufhellung und/oder Schmerzen voraussetzte. 74 Proben wurden während Revision und 29 Proben während WSR entnommen. Insgesamt stammen 55 der Proben von Frauen, 48 von Männern. Die Probenentnahme erfolgte in zahnärztlich endodontisch ausgerichteten und MKG-Chirurgischen Praxen.

3.3 Mikrobiologische Parameter

Die Mikroorganismen, die sich im Wurzelkanal befanden, wurden mithilfe der DNA•STRIP-Technologie (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) isoliert und quantitativ bestimmt. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens*, *Capnocytophaga* spp. wurden untersucht. Diese 11 Bakterien haben eine entscheidende Bedeutung bei der Entstehung und dem Verlauf von parodontalen Erkrankungen und werden neuerdings auch in Zusammenhang mit endodontischen Misserfolgen gesehen (RUPF et al. 2000).

3.4 Probenentnahme

3.4.1 Probenentnahme während der WSR

Nach Darstellung eines ossären Zugangs und chirurgischer Kürzung der Wurzelspitze wurde eine sterile Papierspitze von retrograd in den Wurzelkanal eingeführt und dort einige Sekunden belassen. Anschließend wurde sie mit einer sterilen Pinzette entnommen und in ein steriles Eppendorfröhrchen gegeben. Die Wurzelspitze wurde mit einer Pinzette ebenfalls aus dem Operationsgebiet entnommen und in das selbe Eppendorfröhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden mit Datum, Art der Behandlung, Patientenummer, Geschlecht, Alter und Zahntyp beschriftet und an das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am UKE weitergegeben und bei -22°C bis zur mikrobiologischen Analyse tiefgefroren.



Abb. 7 Probenentnahme während der WSR

3.4.2 Probenentnahme während der Revision

Nach vollständiger Entfernung der Primärfüllung unter Kofferdam wurde von orthograd eine sterile Papierspitze in den Wurzelkanal bis zur vollen Arbeitslänge (Foramen apicale) eingeführt und einige Sekunden belassen. Anschließend wurde sie mit einer sterilen Pinzette entnommen und in ein steriles Eppendorfröhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden mit Datum, Art der Behandlung, Patientenummer, Geschlecht, Alter und Zahntyp beschriftet und an das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am UKE weitergegeben und bei -22°C bis zur mikrobiologischen Analyse tiefgefroren.

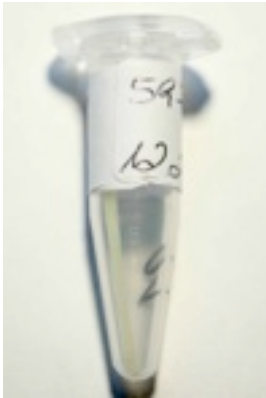


Abb. 8 Probenentnahme während der Revision

3.5 Auflistung der verwendeten Untersuchungsmaterialien

3.5.1 Geräte

<u>Thermocycler:</u>	Primus 25-Personal Thermocycler System, Clemens Labortechnik, Waldbüttelbrunn, Deutschland
<u>Thermomixer:</u>	Mixer Stripe, Thermomixer 5436 Eppendorf, Clemens Labortechnik, Waldbüttelbrunn, Deutschland
<u>Zentrifuge:</u>	Biofuge pico Heraeus, Kendro®, Hanau, Deutschland
<u>Vortexer:</u>	IKA® Model MS1 minishaker, Staufen, Deutschland
<u>Pipetten:</u>	0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<u>Messzylinder:</u>	Blaubrand®, Wertheim, Deutschland
<u>Zeitmesser:</u>	Medchrom, Flörsheim-Dalsheim, Deutschland

3.5.2 Chemikalien/Lösungen

Chemikalien und fertige Lösungen für:

1. Isolierung und Reinigung von genomischer DNA (Geno Type® DNA Isolation Kit Ver.

2.0, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland):

- Ethanol pro analysi (p.a.) 99,8%
- Destilliertes Wasser
- Lysepuffer M (Geno Type® DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland): enthält Guanidinthiocyanat und Detergenzien
- Bindungspuffer B6 (Geno Type® DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland): enthält 2-Propanol
- Elutionspuffer D (Geno Type® DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)



Abb. 9 Lysepuffer M (Geno Type® DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland), Bindungspuffer B6 (Geno Type® DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) und Elutionspuffer D (Geno Type® DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)

2. Multiplex-Amplifikation mit biotinmarkierten Primern:

- Primer-Nukleotid-Mix (PNM) (micro-IDent[®]/ micro-IDent[®] plus, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland): enthält spezifische Primer, Nukleotide, Farbstoff
- Polymerase-Puffer mit KCl (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland)
- MgCl₂-Lösung (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland)
- thermostabile DNA-Polymerase (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland)
- destilliertes Wasser



Abb. 10 DNA-Polymerase (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland), Polymerase-Puffer (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland), MgCl₂-Lösung (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland) und PNM (micro-IDent[®], micro-IDent[®] plus, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)

3. Reverse Hybridisierung:



Abb. 11 HYB (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland), SUB-D (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland), CON-D (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland), RIN (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland), STR (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland), DEN (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland), micro-IDent[®]- und micro-IDent[®] plus-STRIP (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)

- *Denaturierungsreagenz (DEN)*: Enthält <2% NaOH, Farbstoff (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)
- *Hybridisierungspuffer (HYB)*: enthält 8-10% anionisches Tensid, Farbstoff (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)
- *Stringent-Waschlösung (STR)*: enthält >25% einer quartären Ammoniumverbindung, <1% anionisches Tensid (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)
- *Rinse-Lösung (RIN)*: enthält Puffersubstanz, <1% NaCl, <1% anionisches Tensid (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)
- *Konjugat-Konzentrat (CON-C)*: enthält Streptavidinkonjugierte Alkalische Phosphatase, Farbstoff (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)
- *Konjugat-Puffer (CON-D)*: enthält Puffersubstanz, 1% Blocking-Reagenz, <1% NaCl (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)

- *Substrat-Konzentrat (SUB-C)*: enthält Dimethylsulfoxid, Substratlösung (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)
- *Substrat-Puffer (SUB-D)*: enthält Puffersubstanz, <1% MgCl₂, <1% NaCl (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)

Hergestellte Lösungen für:

1. Isolierung und Reinigung von genomischer DNA (Geno Type[®] DNA Isolation Kit, Hain Lifescience)

- *Proteinase K-Lyophilisat (Geno Type[®] DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)* : Für den 48er-Kit (48 Proben) werden 550 µl destilliertes Wasser zum Proteinase K-Lyophilisat geben und ca. 5 sec vorgetextet. Nach Gebrauch bei -20°C lagern.
- *Waschpuffer I (Geno Type[®] DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)*: Zum Waschpuffer I (30 ml) 30 ml 99,8% Ethanol p. a. zugeben und gut mischen. Flasche gut verschlossen bei Raumtemperatur lagern.
- *Waschpuffer II (Geno Type[®] DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)*: Zum Waschpuffer II (18 ml) 42 ml 99,8% Ethanol p. a. zugeben und gut mischen. Flasche gut verschlossen bei Raumtemperatur lagern.



Abb. 12 Waschpuffer I (Geno Type® DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland), Waschpuffer II (Geno Type® DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) und Proteinase K-Lyophilisat (Geno Type® DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)

2. Multiplex-Amplifikation mit biotinmarkierten Primern:

- *Amplifikation:* Für eine amplifizierte Probe werden 5 µl DNA-Lösung (Produkt aus Isolierung und Reinigung der genomischen DNA) zum Amplifikations-Mix (45 µl) dazugegeben.
- Amplifikations-Mix besteht aus:
 - 5 µl Polymerase-Puffer mit KCl (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland)
 - 2 µl MgCl₂-Lösung (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland)
 - 3 µl destilliertes Wasser
 - 35 µl Primer-Nukleotid-Mix (micro-IDent®/micro-IDent® plus, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)
 - 0,2 µl thermostabile DNA-Polymerase (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland)

3.5.3 Materialien

Verbrauchsmaterialien

- sterile 1,5 ml Eppendorfröhrchen (Hamburg, Deutschland)
- sterile Papierspitzen (Dentsply Pro Taper[®], Roeko, Langenau)
- Einmal-Handschuhe (Peha-Soft[®], Hartmann, Heidenheim, Deutschland)
- sterile Einmal-Pinzetten (Büttner-Frank, Erlangen, Deutschland)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter 10µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- PCR-Reaktionsgefäße frei von DNase und RNase (Geno Type[®] Isolation Kit, HAIN Lifescience, Nehren, Deutschland)
- mit spezifischen Gensonden (STRIP) beschichtete Membranstreifen (micro-IDent[®], micro-IDent[®] plus, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)
- Filtersäule (Geno Type[®] Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) inkl. Auffanggefäß (Spin Filter Sets)
- Inkubationswanne (micro-IDent[®], micro-IDent[®] plus, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)
- Auswertungsbogen (micro-IDent[®], micro-IDent[®] plus, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)
- Arbeitsanleitung (micro-IDent[®], micro-IDent[®] plus, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)
- Schablone (micro-IDent[®], micro-IDent[®] plus, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)

3.6 Methoden

Alle Versuchsdurchführungen wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am UKE durchgeführt.

3.6.1 Isolation und Reinigung von genomischer DNA aus Bakterien

Methodik

Mithilfe des **Geno Type® DNA Isolation Kit** (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) kann genomische DNA aus Bakterien für in vitro-diagnostische Untersuchungen in 10-20 Minuten isoliert und gereinigt werden (Arbeitsanleitung für Geno Type® DNA Isolation Kit, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland). Das gesamte Verfahren unterteilt sich in folgende vier Phasen:

1. Lyse der Zellen unter anti-chaotropen Bedingungen und erhöhter Temperatur
2. Bindung der genomischen DNA an die Membran der Filtersäule
3. Waschen der Membran zur Entfernung von Verunreinigungen sowie Ethanolentfernung
4. Elution der gereinigten genomischen DNA

Lagerung und Vorsichtsmaßnahmen

Alle Kitbestandteile sind bei Raumtemperatur (18-25°C) zu lagern. Die rekonstruierte Proteinase K muss bei -20°C aufbewahrt werden. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren sollte vermieden werden. Aus diesem Grund ist ein aliquotieren von Vorteil. Darüber hinaus ist das Tragen von geeigneter Schutzkleidung, Schutzhandschuhen, Mundschutz und ggf. Schutzbrille einzuhalten.

Folgende vier Kitreagenzien sind gesundheitsschädlich und müssen besonders vorsichtig verwendet werden: 1. Lysepuffer M, 2. Bindungspuffer B6, 3. Proteinase K und 4. Waschpuffer I

Durchführung

Vorbereitung:

Der Arbeitsraum muss völlig frei von amplifizierter DNA sein. Der Thermomixer muss auf 70°C vorgeheizt werden. Die benötigte Menge an Elutionspuffer D wird auf 56°C temperiert (je Probe werden 200-400 µl Elutionspuffer benötigt). Bei der ersten Verwendung des Kits Proteinase K-Lyophilisat wird 550 µl destilliertes Wasser zum Proteinase K-Lyophilisat gegeben und ca. 5 sec vorgetextet. Nach Gebrauch wird es bei -20°C gelagert. Bereits hergestellte Proteinase K-Lösung wird aufgetaut. Waschpuffer I und II werden wie folgt hergestellt: Zum Waschpuffer I werden 30 ml 99,8% Ethanol p. a. zugegeben, zum Waschpuffer II werden 42 ml 99,8% Ethanol p. a. zugegeben und gut gemischt.

1. Pro Probe werden 100 µl Lysepuffer und 10 µl Proteinase K in ein Auffanggefäß gegeben und vorgetextet.
2. In jedes Probenröhrchen mit innenliegenden Papierspitzen (Patienten DNA) werden 110 µl der obigen Mischung zugeführt und für mindestens 10 sec vorgetextet.
3. Probe wird für 10 min bei 70°C im Thermomixer inkubiert.
4. 100 µl Bindungspuffer B6 wird hinzugegeben. Probe muss durch viermaliges Auf- und Abpipettieren gemischt werden. Filtersäule wird in einem beschrifteten 2,0 ml Auffanggefäß platziert und Lysat auf die Membran der Filtersäule pipettiert. Der Deckel muss geschlossen werden und das Auffanggefäß mit Filtersäule in einer Standard-Tischzentrifuge (Biofuge pico, Heraeus, Kendro[®], Hanau, Deutschland) 1 min bei 13 000 x g zentrifugiert werden.
5. Deckel wird geöffnet und 300 µl Waschpuffer I auf die Membran der Filtersäule gegeben. Deckel wird geschlossen und 30 sec bei 13 000 x g zentrifugiert.
6. Deckel wird geöffnet und Auffanggefäß mit Filtrat verworfen. Filtersäule wird in ein neues, beschriftetes 2,0 ml Auffanggefäß überführt und 750 µl Waschpuffer II dazugegeben. Deckel wird verschlossen und 30 sec bei 13 000 x g zentrifugiert.
7. Deckel wird geöffnet und Filtrat verworfen. Filtersäule wird wieder im 2,0 ml Auffanggefäß platziert, Deckel geschlossen und 2 min bei 13 000 x g zentrifugiert.

8. Filtersäule wird in ein neues, beschriftetes 1,5 ml Auffanggefäß überführt. Bei 1 oder 2 ursprünglich vorhandenen Papierspitzen werden 200 μ l, bei 3 oder 4 ursprünglich vorhandenen Papierspitzen 400 μ l vorgewärmtes Elutionspuffer D auf die Membran der Filtersäule gegeben, Deckel verschlossen und die Probe 1 min bei Raumtemperatur inkubiert.
9. Zum Eluieren wird 1 min bei 6 000 x g zentrifugiert.
10. 5 μ l DNA-Lösung (Eluat) wird für die PCR eingesetzt (Abb. 13).



Abb. 13 hergestelltes Eluat. DNA wurde isoliert und gereinigt.

3.6.2 Multiplex-Amplifikation mit biotinmarkierten Primern:

Methodik

Die Nukleinsäure wird selektiv vermehrt und im nächsten Schritt werden die Amplifikate chemisch denaturiert, da die Detektion auf dem DNA•STRIP anhand einzelsträngiger DNA erfolgt. Bei der Multiplex-Amplifikation sind multiple Primer-Paare für verschiedene Zielmoleküle in derselben Amplifikationsmischung vorhanden (CONRADS G 1999). Dadurch können in derselben Reaktion alle 11 parodontopathogenen Leitkeime nachgewiesen werden. Lediglich die DNA•STRIPs sind bei micro-IDent® und micro-IDent® plus unterschiedlich und müssen demnach bei der reversen Hybridisierung auch Verwendung finden.

Lagerung und Vorsichtsmaßnahmen

Primer/Nukleotid-Mix (PNM) muss streng getrennt von DNA-haltigen Produkten gelagert werden. Bei kurzzeitiger Lagerung bis zu 4 Wochen kann PNM bei 2-8°C, zur langfristigen Lagerung bei -20°C aufbewahrt werden. Das Tragen geeigneter Schutzkleidung, Schutzhandschuhen, Mundschutz und ggf. Schutzbrille ist obligat. Bei der Durchführung des Tests sind die für die Nukleinsäureamplifikation notwendigen Vorsichtsmaßnahmen zu beachten. Utensilien wie Pipettenspitzen, die mit den Reagenzien in Berührung kommen, müssen frei von DNase sein.

Durchführung

Vorbereitung:

Der Amplifikations-Mix (45 µl) muss in einem Raum hergestellt werden, der garantiert frei von DNA ist. Aus Gründen des Kontaminationsschutzes sollte die zu amplifizierende DNA in einem abgetrennten Bereich zugegeben werden.

Pro Probe werden benötigt:

- 35 µl PNM (micro-IDent[®], micro-IDent[®] plus, Hain Lifescience, Nehren, Deutschland)
- 5 µl Polymersae-Puffer (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland)
- 2 µl MgCl₂-Lösung (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland)
- 3 µl destilliertes Wasser
- 0,2 µl thermostabile DNA-Polymerase (Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland)
- 5 µl DNA-Lösung

Dies gibt ein Endvolumen von 50 µl (ohne Berücksichtigung des Enzymvolumens). Das Amplifikat wird in einen Thermocycler (Primus 25-Personal Thermocycler System, Clemens Labortechnik, Waldbüttelbrunn, Deutschland) gegeben.



Abb. 14 Amplifikat



Abb. 15 In dem Thermocycler (Primus 25-Personal Thermocycler System, Clemens Labortechnik, Waldbüttelbrunn, Deutschland) befindet sich das hergestellte Amplifikat

5 min 95°C	1 Zyklus
30 sec 95°C	10 Zyklen
2 min 58°C	10 Zyklen
25 sec 95°C	20 Zyklen
40 sec 53°C	20 Zyklen
40 sec 70°C	20 Zyklen
8 min 70°C	1 Zyklus

Tab. 2 Programmierungsprotokoll für Thermocycler

3.6.3 Reverse Hybridisierung

Methodik

Im Verlauf der reversen Hybridisierung wird das einzelsträngige Amplifikat spezifisch an die Sonden gebunden, während unspezifisch gebundene Amplifikate in anschließenden Waschschrritten entfernt werden. Das spezifisch gebundene Amplifikat wird während der Konjugat-Reaktion mit dem Enzym alkalische Phosphatase markiert und anschließend in einer enzymatischen Farbreaktion sichtbar gemacht (HAIN Lifescience).

Durchführung

Schüttelwasserbad wird auf 45°C vorgewärmt. Lösungen HYB und STR werden vor Gebrauch auf 37-45°C erwärmt. Alle anderen Reagenzien (außer CON-C und SUB-C) müssen auf Raumtemperatur gebracht werden. Konjugat-Konzentrat (CON-C, orange) und Substrat-Konzentrat (SUB-C, gelb) werden in geeigneten Gefäßen in der benötigten Menge im Verhältnis 1:100 mit dem zugehörigen Puffer verdünnt (CON-C mit CON-D, SUB-C mit SUB-D), gut gemischt und auf Raumtemperatur gebracht. Pro Membranstreifen werden je 10 µl Konzentrat mit jeweils 1 ml des entsprechenden Puffers verdünnt. SUB-C ist lichtgeschützt und bei Raumtemperatur mindestens 4 Wochen stabil.

1. Für jede zu untersuchende Probe wird 20 µl Denaturierungsreagenz (DEN, blau) in die untere Ecke einer Wannenkavität pipettiert.
2. Je 20 µl Amplifikat wird dazugeben, durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dessen wird der Membranstreifen (STRIP) mit einer Pinzette aus dem Röhrchen genommen und mit einem Bleistift unter der Farbmarkierung beschriftet. Membranstreifen darf nur mit Handschuhen berührt werden.
3. Jeweils 1 ml des vorgewärmten und gemischten Hybridisierungspuffers (HYP, grün) wird dazugeben. Die Wanne muss auf einer Unterlage so lange vorsichtig geschwenkt werden, bis die Lösung eine homogene Färbung aufweist. Es darf keine Lösung in benachbarte Kavitäten gelangen.
4. In jede benutzte Kavität wird ein Membranstreifen gelegt. Die Membranstreifen müssen dabei vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein und die beschichtete Seite (kenntlich durch die Farbmarkierung) muss nach oben weisen. Membranstreifen, die sich wenden, werden mit einer Pinzette zurückgedreht. Zur Vermeidung von

Kontaminationen soll die Pinzette nach jeder Benutzung gereinigt werden. Dies gilt auch für alle nachfolgenden Inkubations- und Waschschriffe.

5. Wanne wird für 30 Minuten bei 45°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Schüttelfrequenz des Wasserbads muss so gewählt werden, dass eine stetige Durchmischung der Flüssigkeit erreicht und eine Kontamination benachbarter Kavitäten durch Spritzen vermieden wird. Um eine gute Wärmeübertragung sicherzustellen, muss die Wanne mindestens zu einem Drittel in Wasser eingetaucht sein.
6. Hybridisierungspuffer wird vollständig aus den Kavitäten entfernt. Hierzu wird eine Pasteurpipette mit Vakuumpumpe verwendet.
7. Jeweils 1 ml der vorgewärmten Stringent-Waschlösung (STR, rot) wird in die Kavitäten gegeben und die Wanne 15 Minuten bei 45°C im Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert.
8. Von diesem Schritt an wird bei Raumtemperatur gearbeitet. Stringent-Waschlösung vollständig entfernen. Anschließend werden Flüssigkeitsreste durch Abklopfen der Wanne auf einer saugfähigen Unterlage entfernt. Dies gilt auch für alle anderen Waschschriffe.
9. Membranstreifen wird einmal 1 Min mit 1 ml Rinse-Lösung (RIN) unter stetiger Bewegung auf dem Horizontalschüttler gewaschen (RIN nach Inkubation abschütteln).
10. 1 ml verdünntes Konjugat (s. o.) wird zu jedem Membranstreifen gegeben und 30 Minuten auf dem Horizontalschüttler inkubiert.
11. Lösung abschütteln und jeden Membranstreifen zweimal je 1 Min mit 1 ml Rinse-Lösung (RIN) und einmal mit ca. 1 ml destilliertem Wasser auf dem Horizontalschüttler waschen (Lösung jeweils abschütten). Nach dem letzten Waschschriff Wasser möglichst vollständig entfernen.
12. Je 1 ml verdünntes Substrat (s. o.) wird zu jedem Membranstreifen gegeben und lichtgeschützt ohne Schütteln inkubiert. In Abhängigkeit von den Testbedingungen (z. B. der Raumtemperatur) kann die Substratinkubationszeit zwischen 3 und 20 Min variieren. Eine zu lang andauernde Substratinkubation führt zu einer

Verstärkung der Hintergrundfärbung und kann die Interpretation der Ergebnisse beeinträchtigen.

13. Substratreaktion muss durch zweimaliges kurzes Waschen mit destilliertem Wasser gestoppt werden.
14. Membranstreifen mit einer Pinzette aus den Kavitäten nehmen und zum Trocknen auf saugfähiges Papier legen.



Abb. 16 Membranstreifen im Schüttelwasserbad

3.7 Auswertung und Interpretation der Ergebnisse

Die Membranstreifen werden nach dem Trocknen auf eine geeignete Unterlage geklebt und lichtgeschützt aufbewahrt. Zur Auswertung ist dem Kit eine Schablone beigelegt, die an der Konjugatkontrollbande des Membranstreifens ausgerichtet wird (Abb. 17 und 18).

Auf der Schablone des micro-IDent® Kits sind 7 Reaktionszonen vorhanden.

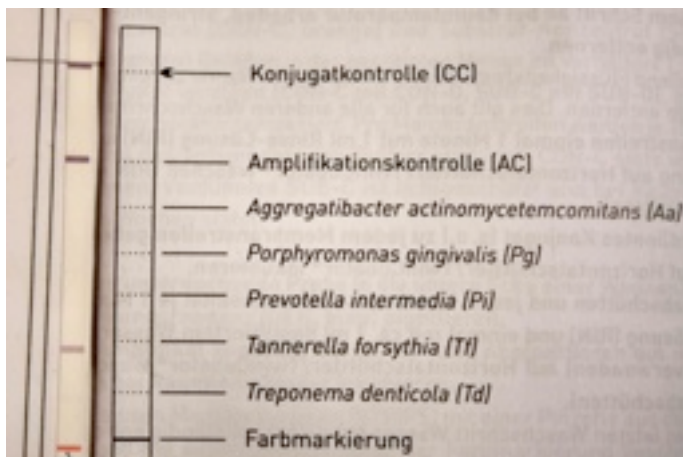


Abb. 17 Auf dem Membranstreifen sind die Konjugatkontrolle, die Amplifikationskontrolle und der Nachweis von *T. forsythia* zu erkennen.

Auf der Schablone des micro-IDent® plus Kits sind 8 Reaktionszonen vorhanden.

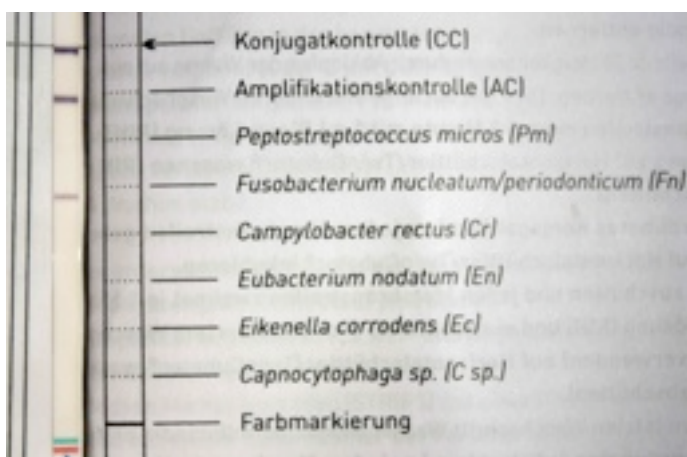


Abb. 18 Auf dem Membranstreifen sind die Konjugatkontrolle, die Amplifikationskontrolle und der Nachweis von *F. nucleatum* zu erkennen.

Konjugatkontrolle (CC):

Diese Reaktionszone dokumentiert die Effizienz von Konjugatbindung und Substratreaktion und muss immer entwickelt sein.

Amplifikationskontrolle (AC)

Das bei korrekter Durchführung während der Amplifikation entstehende Kontrollprodukt bindet sich an die Amplifikationskontrollzone. Ist die Bande entwickelt, kann das Vorhandensein von Hemmstoffen sowie ein Fehler bei Ansatz und Durchführung der Amplifikationsreaktion ausgeschlossen werden. Bei einem positiven Testergebnis kann das Signal der Amplifikationskontrollzone aufgrund von Kompetitionsreaktionen während der Amplifikation abgeschwächt sein und im Extremfall sogar ganz verschwinden. Der Test ist in diesem Falle jedoch ordnungsgemäß durchgeführt worden und eine Wiederholung nicht erforderlich. Eine fehlende Amplifikationskontrolle bei einem negativen Testergebnis ist ein Hinweis auf Fehler bei Ansatz und/oder Durchführung der Amplifikationsreaktion oder das Vorhandensein von Hemmstoffen. Die Probe ist dann als nicht valide zu werten und muss wiederholt werden.

3.8 Statistik

Nach Dokumentation der Keimnachweise wurden diese verglichen und die Angaben auf Signifikanz hin getestet. Die statistische Auswertung erfolgt mittels Chi-Quadrat-Test und logistischer Regression.

Chi-Quadrat-Test:

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests untersucht man Verteilungseigenschaften einer statistischen Grundgesamtheit (BORTZ und SCHUSTER 2010). Folgende Tests sind mit dem Chi-Quadrat möglich:

	Chi-Quadrat-Tests
1	Verteilungstest
2	Unabhängigkeitstest
3	Homogenitätstest
4	Vierfeldertest

Tab. 3 Chi-Quadrat-Tests

Für diese Studie sind der **Verteilungstest** und der **Vierfeldertest** von Bedeutung.

Verteilungstest:

Mit dem Verteilungstest wird geprüft, ob vorliegende Daten auf eine bestimmte Weise verteilt sind (BORTZ und SCHUSTER 2010).

Vierfeldertest:

Mithilfe des Vierfeldertests wird geprüft, ob zwei dichotome Merkmale stochastisch unabhängig voneinander sind bzw. ob die Verteilung eines dichotomen Merkmals in zwei Gruppen identisch ist (BORTZ und SCHUSTER 2010).

logistische Regression:

Mit der logistischen Regression kann der Zusammenhang zweier Variablen geprüft werden. Es werden odds ratios berechnet, welche das Auftreten von A unter der Bedingung von B liefert. Damit kann gezeigt werden, wie häufig Bakterium A unter Anwesenheit von Bakterium B auftritt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Patientenproben

Von insgesamt 103 Proben stammen 55 von weiblichen Personen im Alter von 19 bis 69 Jahren sowie 48 Proben von männlichen Personen im Alter von 27 bis 74 Jahren.

29 Proben wurden während WSR, 74 Proben während Revision entnommen.

Von den Zahngruppen sind mit 39% am häufigsten die oberen Molaren vertreten, gefolgt von den unteren Molaren mit 28%, den oberen Prämolaren mit 13%, den oberen Frontzähnen mit 10% und den unteren Prämolaren/Frontzähnen mit jeweils 5%.

4.2 Molekularbiologischer Nachweis von parodontopathogenen Keimen bei chronisch apikaler Parodontitis

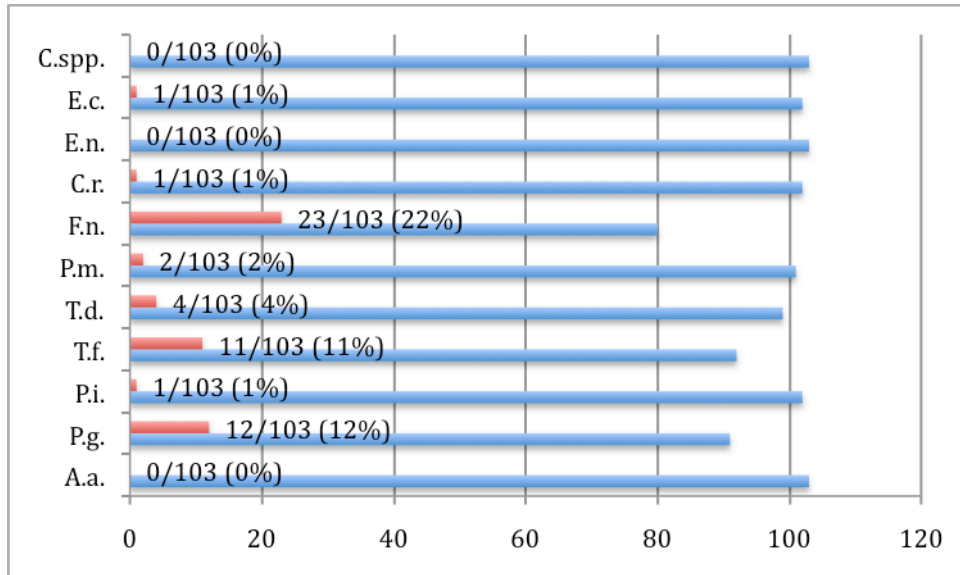
Zum Nachweis der elf parodontopathogenen Bakterien (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens*, *Capnocytophaga* spp.) bei persistierender Parodontitis apicalis wurde die DNA•STRIP-Technologie angewendet (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland). Zuerst wurde das Vorkommen dieser Bakterien in den einzelnen Proben prozentual bestimmt. Dann wurde mithilfe des Chi-Quadrat-Verteilungstests geprüft, ob die nachgewiesenen Bakterien zufällig/nicht zufällig verteilt sind. Weiter wurde der Chi-Quadrat-Vierfeldertest angewendet, um mögliche Abhängigkeiten im Vorkommen der Bakterien zu erkennen. Als letztes wurde aufbauend auf den Chi-Quadrat-Vierfeldertest mithilfe der logistischen Regression bestimmt, mit welcher Wahrscheinlichkeit das Bakterium A unter Einfluss von Bakterium B auftritt.

4.2.1 Ergebnisse der Auszählung der untersuchten Bakterien in absoluten und relativen Werten

Insgesamt ergeben sich aus den 103 untersuchten Proben folgende Ergebnisse:

A. actinomycetemcomitans, *E. nodatum* und *Capnocytophaga* spp. wurden in keiner Probe nachgewiesen. *P. intermedia*, *C. rectus* und *E. corrodens* konnten jeweils in 1 Probe und *P. micros* in 2 Proben festgestellt werden. *T. denticola* wurde bei 4 Proben nachgewiesen und

T. forsythia bei 11 Proben. Am häufigsten konnten *P. gingivalis* (12 von 103 Proben) und *F. nucleatum* (23 von 103 Proben) festgestellt werden.



Tab. 4 Absolute und relative Häufigkeiten der nachgewiesenen Bakterien. rot=Nachweis, blau=kein Nachweis. C.spp.=*Capnocytophaga* spp., E.c.=*E. corrodens*, E.n.=*E. nodatum*, C.r.=*C. rectus*, F.n.=*F. nucleatum*, P.m.=*P. micros*, T.d.=*T. denticola*, T.f.=*T.forsythia*, P.i.=*P. intermedia*, P.g.=*P. gingivalis*, A.a.=*A. actinomycetemcomitans*

4.2.2 Auswahl des Signifikanzniveaus

Für die folgenden beiden Chi-Quadrat-Tests wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ ausgewählt. Das bedeutet, dass eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% vorliegt. Als weiteren Wert wurde für jedes Ergebnis der p-Wert berechnet. Der p-Wert ermöglicht das empirische Ergebnis auf einem anderen Signifikanzniveau zu überprüfen (BORTZ und SCHUSTER 2010). Der auch als „beobachtetes Signifikanzniveau“ bezeichnete p-Wert entspricht dem kleinsten Wert von α , für den das Testergebnis gerade noch Signifikanz erreicht (BICKEL und DOKSUM 2007).

4.2.3 Bestimmung des Freiheitsgrades

Die Anzahl des Freiheitsgrades beim Chi-Quadrat-Test ergibt sich aus der Anzahl vorhandener Parameter abzüglich 1 ($n-1$).

4.2.4 Bestimmung des kritischen Werts c

Der kritische Wert c ist aus der Tabelle der Quantile der Chi-Quadrat-Verteilung abzulesen. Dieser Wert c ist abhängig von der Anzahl der Freiheitsgrade und vom ausgewählten Signifikanzniveau. Ist die Prüfgröße $\chi^2 > c$ wird die Nullhypothese abgelehnt.

4.2.5 Ergebnisse des Chi-Quadrat-Verteilungstests

In dieser Studie wurde mit dem Chi-Quadrat-Verteilungstest überprüft, ob die Verteilung der nachgewiesenen Bakterien zufällig ist oder signifikant abweichende Werte von einer hypothetischen Gleichverteilung vorliegen.

Die Tabelle 5 veranschaulicht den Chi-Quadrat-Verteilungstest.

Nachweis	A.a.	P.g.	P.i.	T.f.	T.d.	P.m.	F.n.	C.r.	E.n.	E.c.	C.spp.	Arithmetischer Mittelwert
0	103	91	102	92	99	101	80	102	103	102	103	98
1	0	12	1	11	4	2	23	1	0	1	0	5

Tab. 5 Nachweis der 11 parodontopathogenen Bakterien. 0=kein Nachweis, 1=Nachweis. A.a.=*A. actinomycetemcomitans*, P.g.=*P. gingivalis*, P.i.=*P. intermedia*, T.f.=*T. forsythia*, T.d.=*T. denticola*, P.m.=*P. micros*, F.n.=*F. nucleatum*, C.r.=*C. rectus*, E.n.=*E. nodatum*, E.c.=*E. corrodens*, C.spp.=*Capnocytophaga* spp.

Ergebnisse des Chi-Quadrat-Verteilungstests:

n=11

n-1=11-1=10 Freiheitsgrade

Signifikanzniveau $\alpha=0,05$

Kritischer Wert c=18,31 (siehe Tabelle der Quantile der Chi-Quadrat-Verteilung)

$\chi^2=113,93$

p=<0,001 (<0,1% Irrtumswahrscheinlichkeit)

$$\chi^2 > c$$

Der χ^2 -Wert liegt deutlich über dem kritischen Wert c für 10 Freiheitsgrade. Damit handelt es sich nicht um eine zufällige Verteilung der Bakterien, sondern um signifikant abweichende Werte von einer hypothetischen Gleichverteilung. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 0,1\%$ ist dieses Ergebnis bewiesen.

4.2.6 Ergebnisse des Chi-Quadrat-Vierfeldertests

In dieser Studie wurde mit dem Chi-Quadrat-Vierfeldertest untersucht, ob einzelne Bakterien in Abhängigkeit von anderen Keimen auftreten.

Der Test wurde nur bei den Bakterienpaaren angewendet, die von den 103 Proben mindestens dreimal zusammen nachgewiesen wurden.

Für alle folgenden Rechnungen des Chi-Quadrat-Vierfeldertests liegt 1 Freiheitsgrad ($n-1=2-1=1$ Freiheitsgrad), ein Signifikanzniveau von 0,05 und ein kritischer Wert $c=3,84$ (siehe Tabelle der Quantile der Chi-Quadrat-Verteilung) vor.

Gemeinsamer Nachweis von *F. nucleatum* und *P. gingivalis*:

In 103 Proben wurden *F. nucleatum* 23-mal, *P. gingivalis* 12-mal und die Kombination beider 4-mal nachgewiesen.

	<i>F.n.</i> =kein Nachweis	<i>F.n.</i> =Nachweis	Gesamt
<i>P.g.</i> =kein Nachweis	72	19	91
<i>P.g.</i> =Nachweis	8	4	12
gesamt	80	23	103

Tab. 6 Vierfeldertafel von *F.n.=F. nucleatum* und *P.g.=P. gingivalis*

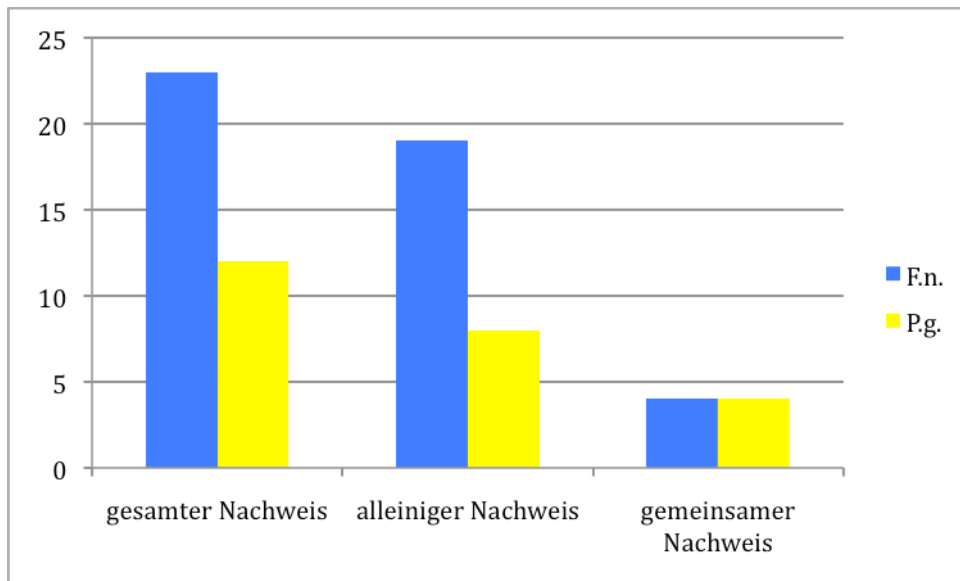


Abb. 19 Säulendiagramm der Vierfeldertafel von *F.n.=F. nucleatum* und *P.g.=P. gingivalis*

Ergebnisse des Chi-Quadrat-Vierfeldertests von *F. nucleatum* und *P. gingivalis*:

$$\chi^2 \approx 0,95$$

$p=0,330$ (33% Irrtumswahrscheinlichkeit)

$$\chi^2 < c$$

Der χ^2 -Wert ist kleiner als der zum gewählten Signifikanzniveau gehörende kritische Wert c . Damit konnte der Test nicht nachweisen, dass ein signifikanter Unterschied besteht. Aus diesem Ergebnis folgt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 33%, dass *F. nucleatum* und *P. gingivalis* unabhängig voneinander auftreten.

Gemeinsamer Nachweis von *F. nucleatum* und *T. forsythia*:

Von den 103 Proben konnten *F. nucleatum* 23-mal, *T. forsythia* 11-mal und beide zusammen 7-mal nachgewiesen werden.

	F.n.=kein Nachweis	F.n.=Nachweis	gesamt
T.f.=kein Nachweis	76	16	92
T.f.=Nachweis	4	7	11
gesamt	80	23	103

Tab. 7 Vierfeldertafel von *F.n.=F. nucleatum* und *T.f.=T. forsythia*

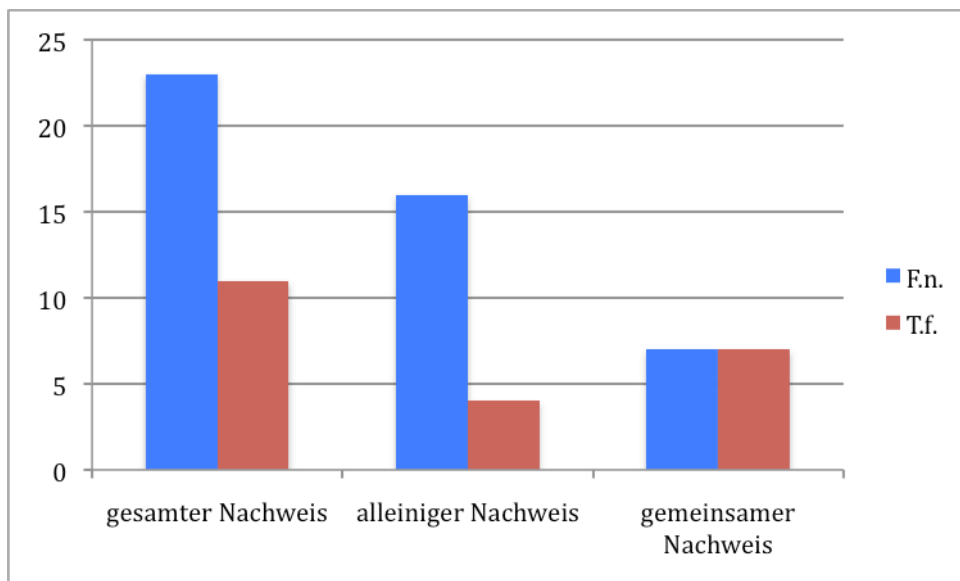


Abb. 20 Säulendiagramm der Vierfeldertafel von *F.n.=F. nucleatum* und *Tf= T. forsythia*

Ergebnisse des Chi-Quadrat-Vierfeldertests von *F. nucleatum* und *T. forsythia*:

$$\chi^2 \approx 12,12$$

$$p = < 0,001 \text{ (} < 0,1\% \text{ Irrtumswahrscheinlichkeit)}$$

$$\chi^2 > c$$

Der χ^2 -Wert ist größer als der zum gewählten Signifikanzniveau gehörende kritische Wert c . Damit konnte der Test nachweisen, dass ein signifikanter Unterschied besteht. Aus diesem Ergebnis folgt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 0,1\%$, dass *F. nucleatum* und *T. forsythia* abhängig voneinander auftreten.

Gemeinsamer Nachweis von *F. nucleatum* und *T. denticola*:

Von den 103 Proben treten *F. nucleatum* 23-mal, *T. denticola* 4-mal auf und in 3 Proben konnten sie gemeinsam nachgewiesen werden.

	<i>F.n.</i> =kein Nachweis	<i>F.n.</i> =Nachweis	Gesamt
<i>T.d.</i> =kein Nachweis	79	20	99
<i>T.d.</i> =Nachweis	1	3	4
gesamt	80	23	103

Tab. 8 Vierfeldertafel von *F.n.*=*F. nucleatum* und *T.d.*=*T. denticola*

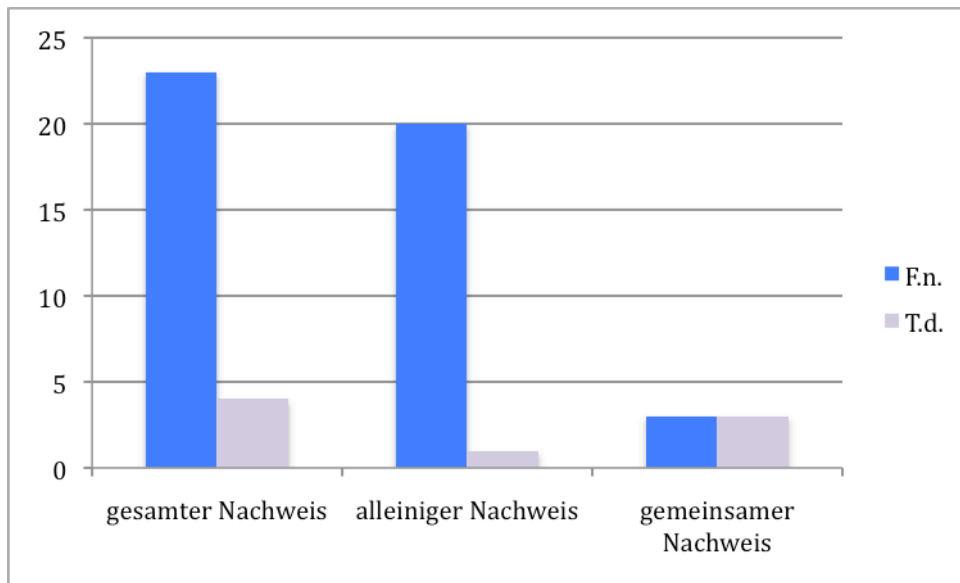


Abb. 21 Säulendiagramm der Vierfeldertafel von *F.n.=F. nucleatum* und *T.d.=T. denticola*

Ergebnisse des Chi-Quadrat-Vierfeldertests von *F. nucleatum* und *T. denticola*:

$$\chi^2 \approx 6,66$$

$p=0,010$ (1% Irrtumswahrscheinlichkeit)

$$\chi^2 > c$$

Der χ^2 -Wert ist größer als der zum gewählten Signifikanzniveau gehörende kritische Wert c . Damit konnte der Test nachweisen, dass ein signifikanter Unterschied besteht. Aus diesem Ergebnis folgt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1%, dass *F. nucleatum* und *T. denticola* abhängig voneinander auftreten.

Gemeinsamer Nachweis von *P. gingivalis* und *T. forsythia*:

Von den 103 Proben konnten *P. gingivalis* 12-mal, *T. forsythia* 11-mal und beide zusammen 3-mal nachgewiesen werden.

	<i>T.f.</i> =kein Nachweis	<i>T.f.</i> =Nachweis	Gesamt
<i>P.g.</i> =kein Nachweis	83	8	91
<i>P.g.</i> =Nachweis	9	3	12
gesamt	92	11	103

Tab. 9 Vierfeldertafel von *T.f.*=*T. forsythia* und *P.g.*=*P. gingivalis*

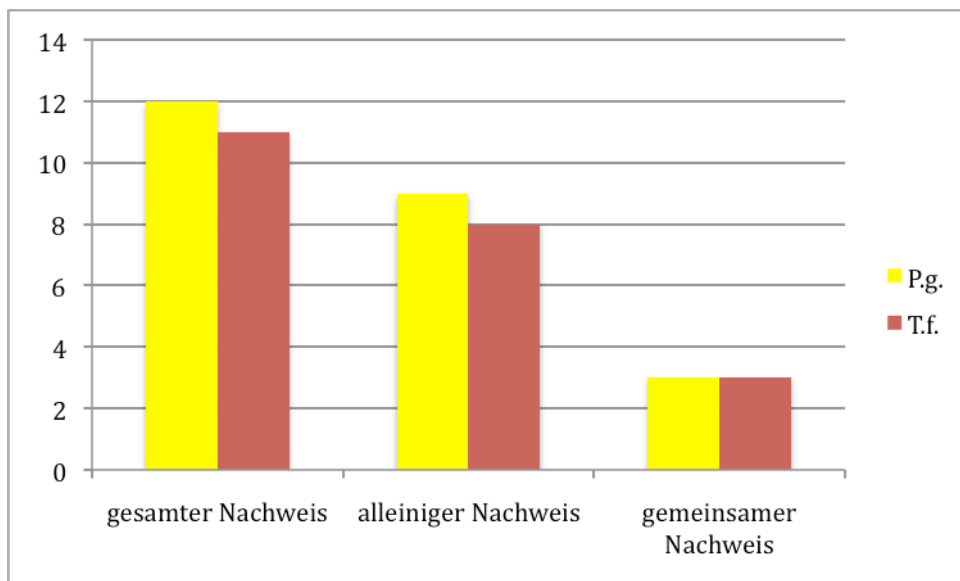


Abb. 22 Säulendiagramm der Vierfeldertafel von *T.f.*=*T. forsythia* und *P.g.*=*P. gingivalis*

Ergebnisse des Chi-Quadrat-Vierfeldertests von *T. forsythia* und *P. gingivalis*:

$$\chi^2 \approx 2,92$$

$$p = 0,087 \text{ (8,7\% Irrtumswahrscheinlichkeit)}$$

$$\chi^2 < c$$

Der χ^2 -Wert ist kleiner als der zum gewählten Signifikanzniveau gehörende kritische Wert c . Damit konnte der Test nicht nachweisen, dass ein signifikanter Unterschied besteht. Aus diesem Ergebnis folgt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 8,7%, dass *P. gingivalis* und *T. forsythia* unabhängig voneinander auftreten.

Gemeinsamer Nachweis von *T. forsythia* und *T. denticola*:

In 103 Proben wurden *T. forsythia* 11-mal, *T. denticola* 4-mal und beide gemeinsam 3-mal nachgewiesen.

	<i>T.d.</i> =kein Nachweis	<i>T.d.</i> =Nachweis	gesamt
<i>T.f.</i> =kein Nachweis	91	1	92
<i>T.f.</i> =Nachweis	8	3	11
gesamt	99	4	103

Tab. 10 Vierfeldertafel von *T.d.*=*T. denticola* und *T.f.*=*T. forsythia*

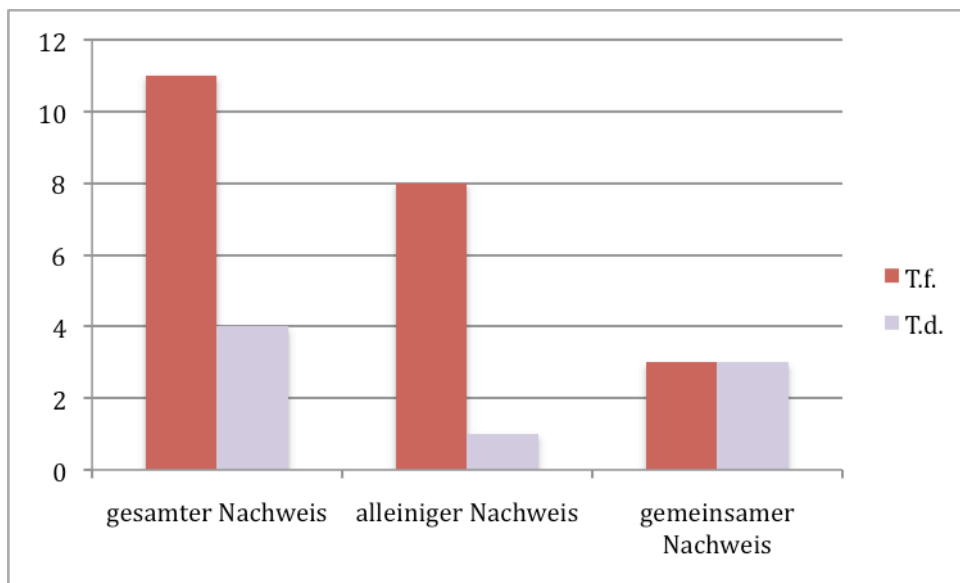


Abb. 23 Säulendiagramm der Vierfeldertafel von *T.d.=T. denticola* und *T.f.=T. forsythia*

Ergebnisse des Chi-Quadrat-Vierfeldertests von *T. denticola* und *T. forsythia*:

$$\chi^2 \approx 18,05$$

$$p = < 0,001 \text{ (} < 0,1\% \text{ Irrtumswahrscheinlichkeit)}$$

$$\chi^2 > c$$

Der χ^2 -Wert ist größer als der zum gewählten Signifikanzniveau gehörende kritische Wert c . Damit konnte der Test nachweisen, dass ein signifikanter Unterschied besteht. Aus diesem Ergebnis folgt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $< 0,1\%$, dass *T. forsythia* und *T. denticola* abhängig voneinander auftreten.

4.2.7 Ergebnisse der logistischen Regression

In dieser Studie wurde anhand der logistischen Regression untersucht, mit welcher Wahrscheinlichkeit das Bakterium A unter dem Einfluss des Bakteriums B nachzuweisen ist.

Odds ratio (Quotenverhältnis) gibt die Stärke des Zusammenhangs zwischen Bakterium A unter dem Einfluss des Bakteriums B an.

Das Konfidenzintervall (Vertrauensbereich) gibt einen Bereich um das Quotenverhältnis an, der mit dem dazu ermittelten p-Wert die wirkliche Lage des Parameters beschreibt.

In Abschnitt 4.2.6 konnte bei den drei folgenden Bakterienpaaren eine **signifikante** Abhängigkeit im Nachweis festgestellt werden.

1. *F. nucleatum* und *T. forsythia*:

T. forsythia tritt in Anwesenheit von *F. nucleatum* 8,3-mal (odds ratio) häufiger mit einem p-Wert=0,002 (Konfidenzintervall: 2,2-35,0) auf als ohne *F. nucleatum*.

2. *F. nucleatum* und *T. denticola*:

T. denticola ist in Anwesenheit von *F. nucleatum* 11,8-mal (odds ratio) häufiger und mit einem p-Wert=0,036 (Konfidenzintervall: 1,4-246,7) vorzufinden als ohne *F. nucleatum*.

3. *T. forsythia* und *T. denticola*:

T. denticola konnte in Anwesenheit von *T. forsythia* 34,1-mal (odds ratio) häufiger und mit einem p-Wert= 0,0036 (Konfidenzintervall: 3,9-736,9) nachgewiesen werden als ohne *T. forsythia*.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die im Abschnitt 4.2.1 vorgestellten Ergebnisse zeigen eine große Spannweite im Nachweis der untersuchten Bakterien. Bei einem Mittelwert von 5 liegen *T. forsythia* 11-mal, *P. gingivalis* 12-mal und *F. nucleatum* 23-mal über diesem Wert. Das Ergebnis des Chi-Quadrat-Verteilungstests schließt eine zufällige Verteilung der nachgewiesenen Bakterien aus. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse des Chi-Quadrat-Vierfeldertests signifikante Abhängigkeiten im gemeinsamen Nachweis von *F. nucleatum* und *T. forsythia*, *F. nucleatum* und *T. denticola*, *T. forsythia* und *T. denticola*. Mit Hilfe der logistischen Regression wurde folgendes belegt:

<i>T. forsythia</i> tritt in Anwesenheit von <i>F. nucleatum</i> 8,3 -mal häufiger auf als ohne <i>F. nucleatum</i>
--

<i>T. denticola</i> ist in Anwesenheit von <i>F. nucleatum</i> 11,8 -mal häufiger vorzufinden als ohne <i>F. nucleatum</i>

<i>T. denticola</i> ist in Anwesenheit von <i>T. forsythia</i> 34,1 -mal häufiger nachgewiesen worden als ohne <i>T. forsythia</i>

Tab. 11 Ergebnisse der logistischen Regression

5. Diskussion

5.1 Zielsetzung

Das Ziel dieser Studie war es, das Vorkommen der 11 häufigsten parodontopathogenen Mikroorganismen (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens*, *Capnocytophaga* spp.) bei endodontischen Misserfolgen mithilfe der reversen Hybridisierung zu untersuchen, auf ihre Relevanz hin zu prüfen und deren Synergismus in der Biofilmbildung zu bestimmen.

In verschiedenen Studien (MOLANDER et al. 1998, SUNDQVIST et al. 1998, HANCOCK et al. 2001, PINHEIRO et al. 2003a, SIQUEIRA und ROCAS 2009) wurde die Bedeutung des Bakteriums *E. faecalis* bei endodontischen Misserfolgen untersucht und nachgewiesen. Die Fähigkeit dieses Keims bei geringem Substratangebot zu überleben (SIQUEIRA und ROCAS 2006) und Resistenzen zu entwickeln (LOVE 2001) sind länger bekannt. Vielmehr spielt bei der chronisch apikalen Parodontitis die Relevanz anderer Mikroorganismen eine wesentliche Rolle, um endodontische Misserfolge erklären zu können. Die Persistenz pathogener Keime im Wurzelkanal und/oder in der apikalen Region stellt den ausschlaggebenden Faktor für einen endodontischen Misserfolg dar (NAIR et al. 1990, LIN et al. 1992, SIQUEIRA 2001, SAITO et al. 2008). In einigen Studien wurden parodontopathogene Keime wie *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *T. denticola*, *P. intermedia* und *T. forsythia* beim Vorliegen einer chronisch apikalen Parodontitis nachgewiesen (SUNDE et al. 2000, SIQUEIRA und ROCAS 2006, BLOME et al. 2008, SAKAMOTO et al. 2008). RUPF et al. (2000) wiesen parodontopathogene Mikroorganismen im Endodontium nach. Der Synergismus zwischen *F. nucleatum* und *P. gingivalis* scheint hierbei wichtig zu sein für die Pathogenität dieser Erreger (METZGER et al. 2001, SAITO et al. 2008).

5.2 Diskussion der Methode

5.2.1 Probenauswahl

Die mikrobiellen Proben stammen von weiblichen sowie männlichen Patienten im Alter von 19-74 Jahren. Voraussetzung für die Auswahl der Proben war ein primär wurzelkanalbehandelter Zahn mit radiologischem Befund (apikale Aufhellung). Unberücksichtigt blieb bei der Auswahl der Proben die Ursache des endodontischen Misserfolges. Es wurde auf einzelne Faktoren wie

- Qualifikation der Behandler
- aseptische Behandlung (unter Kofferdam)
- Ausgangsbefund: irreversibel geschädigte oder nekrotische Pulpa
- endodontische Technik
- verwendete Wurzelkanalspüllösungen
- Nachweis einer negativ bakteriellen Kultur
- post-endodontische Versorgung
- Interpretation der Röntgenaufnahme nach Wurzelfüllung
- Beobachtungszeitraum nach Behandlungsabschluss

nicht weiter eingegangen. Jeder einzelne dieser Faktoren kann alleinige Ursache allein für einen endodontischen Misserfolg sein. Aufgrund dieser Komplexität reichte die Diagnose „chronisch apikale Parodontitis“ für die Auswahl der mikrobiellen Proben in dieser Studie aus.

5.2.2 Probenentnahme

Die Probenentnahme wurde während WSR und Revision mit sterilen Papierspitzen durchgeführt. Sie wurden für 5 Sekunden im Kanal blassen und dann mit einer sterilen Pinzette aus dem Kanal entnommen, in ein steriles Eppendorfröhrchen gegeben und mit Datum, Behandlungsart, Patientenummer, Geschlecht, Alter und Zahntyp gekennzeichnet. Danach wurden die Proben bei -22°C tiefgefroren. Für einen effektiven Keimnachweis wurde empfohlen, die Papierspitze 5-30 Sekunden im Untersuchungsgebiet zu belassen

(HARTROTH et al. 1999). Zugunsten des Patienten wurde die kürzeste Zeit mit noch effektiven Keimnachweis gewählt, um jegliche Verlängerung der Behandlungszeit auf ein Minimum zu beschränken. Bei beiden Verfahren wurden die Kanäle erst nach Probenentnahme mit antibakteriellen Lösungen gespült um ein falsch negatives Testergebnis zu verhindern.

5.2.3 DNA•STRIP-Technologie

Zur Isolierung und quantitativen Bestimmung der 11 Markerkeime wurde die DNA•STRIP-Technologie angewendet (micro-IDent®-Test, micro-IDent®plus-Test). Mithilfe des Geno Type® DNA Isolations Kits (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) wurde die DNA aus den Bakterien isoliert, die Nukleinsäure in einer Amplifikationsreaktion selektiv vermehrt und über eine Hybridisierung auf dem DNA•STRIP detektiert. Vor Durchführung des Tests musste die Vorbereitung der Arbeitsräume, die korrekte Lagerung und Herstellung der Lösungen sichergestellt sein. Die Herstellerangaben (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) wurden strikt eingehalten. Abläufe und Ergebnisse wurden von geschultem Fachpersonal überprüft, die mit mikrobiologischen Verfahren langjährig vertraut waren.

Die DNA-Technik ist eine anerkannte Methode zum Nachweis parodontopathogener Keime (ASAI et al. 2002, BOUTAGA et al. 2006). Sie bietet im Vergleich zur mikrobiologischen Kultur folgende **Vorteile**:

1. Es können neue und/oder mehr Mikroorganismen nachgewiesen werden (SIQUEIRA et al. 2007, BLOME et al. 2008)
 - Der Nährboden bzw. andere Umstände können bei der mikrobiologischen Kultur das Wachstum der fakultativen Anaerobier fördern und dadurch das der obligat anaeroben Keime verhindern oder deren Anwesenheit verbergen (VIANNA et al. 2005).
2. Die mikrobiologische Kultur identifiziert die Bakterien anhand ihrer Erscheinungsformen, es können leichter Missdeutungen erfolgen (SIQUEIRA et al. 2007).
3. Selektion der gesuchten Bakterien durch spezifische Primer, ein Überwuchern wie bei der mikrobiologischen Kultur ist nicht möglich (SIGUSCH 2007).

Die DNA-Technik ist sensitiver, spezifischer, zuverlässiger und präziser für die bakterielle Identifikation als die mikrobiologische Kultur (ASAI et al. 2002, JERVOE-STORM et al. 2005, VIANNA et al. 2005, BOUTAGA et al. 2006, WILLIAMS et al. 2006, SIQUEIRA et al. 2007).

Im Allgemeinen bietet die PCR-Methode auch folgende **Nachteile**:

1. Der Nachweis beinhaltet lebende als auch tote Bakterien
2. Eine sehr hohe Sensitivität (<100 Bakterien) lässt die klinische Relevanz überhaupt in Frage stellen (CONRADS 1999)
3. Sehr teures Diagnostikverfahren, kommt nur für ausgewählte Bereiche der Mikrobiologie zum Einsatz (CONRADS 1999)

Ein Nachteil des micro-IDent[®]-, micro-IDent[®]plus-Test ist der limitierte Nachweis von elf parodontopathogenen Keimen. Die Relevanz anderer Spezies konnte mit diesem Test nicht untersucht werden.

Zu Punkt 1: Der Nachweis von lebenden oder toten Bakterien ist in dieser Studie erwünscht. Jegliches Vorkommen von bakterieller DNA pathogener Bakterien bei chronisch apikaler Parodontitis ist relevant.

Zu Punkt 2: Aufgrund einer hohen Sensitivität wurden mit dem micro-IDent[®]-, micro-IDent[®]plus-Test höhere Nachweisgrenzen für die elf Markerkeime geschaffen. Die Nachweisgrenze für *A. actinomycetemcomitans* liegt bei 10^3 , für *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens*, *Capnocytophaga* spp. liegen die Nachweisgrenzen bei 10^4 Erregern (DERDILOPOULOU 2008). Damit werden nur Keime nachgewiesen, die in signifikanten Mengen auftreten.

5.2.4 Vergleich von micro-IDent[®] und micro-IDent[®]plus

Micro-IDent[®] und micro-IDent[®]plus sind zwei Standardverfahren zum Nachweis von 11 parodontopathogenen Leitkeimen. In einer Studie von URBAN et al. (2010) wurde die mikrobiologische Kultur mit diesen Verfahren verglichen. Das Ergebnis fiel mäßig für *Capnocytophaga* spp. *E. corrodens*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* und schlecht für *F. nucleatum* und *C. rectus* bei der kulturellen und gut bei dem Nachweis aller 11 Keime mittels der micro-IDent[®]-/micro-IDent[®]plus-Verfahrens aus. Aufgrund dieser Ergebnisse empfehlen URBAN et al. (2010) das micro-IDent[®]-/micro-IDent[®]plus-Verfahren dem der

mikrobiologischen Kultur zum Nachweis der 11 Markerkeime vorzuziehen (URBAN et al. 2010).

Bislang wurde in keiner Studie die Fehleranfälligkeit von micro-IDent[®] mit der von micro-IDent[®]plus verglichen. Auch diese Studie hat diese Fragestellung nicht zum Thema. Dessen ungeachtet sind bei der Durchführung von micro-IDent[®]plus mehr Fehler aufgetreten als bei der Durchführung von micro-IDent[®]. Von den während WSR und Revision insgesamt 108 entnommenen Proben mussten 5 Proben verworfen werden. Bei diesen Proben war die Amplifikationskontrollzone nicht zu erkennen. Wenn die Bande nicht entwickelt ist, ist ein Fehler bei Ansatz und/oder Durchführung der Amplifikationsreaktion aufgetreten. Die Probe ist nicht mehr als valide zu werten und muss wiederholt werden. Auch bei erneuter Durchführung dieser 5 Proben ist die Amplifikationskontrollzone bei dem micro-IDent[®]plus-Test ausgeblieben, obwohl sie bei dem micro-IDent[®]-Test entwickelt waren. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl der Amplifikationsansatz bei beiden Tests gleich war, als auch die reverse Hybridisierung in derselben Reaktion stattgefunden hat, kann von einer größeren Fehleranfälligkeit für die DNA•STRIPs von micro-IDent[®]plus ausgegangen werden. Um diesen Eindruck wissenschaftlich absichern zu können, müsste eine Studie diese Fragestellung abklären.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

In einigen Studien konnten parodontopathogene Keime bei Patienten mit chronisch apikaler Parodontitis nachgewiesen werden (SUNDE et al. 2000, SIQUEIRA et al. 2007, BLOME et al. 2008, SAKAMATO et al. 2008). RUPF et al. (2000) konnten zeigen, dass Paro-Endo-Wechselwirkung einen wichtigen Faktor für die Widerstandfähigkeit parodontaler oder endodontaler Erkrankungen darstellen. Die Persistenz pathogener Keime im Wurzelkanal und/oder in der apikalen Region ist einer der wichtigsten Gründe für den Misserfolg einer Wurzelkanalbehandlung (LIN et al. 1992, NAIR et al. 1990, SIQUEIRA 2001, SAITO et al. 2008). Verfahrensfehler während der Wurzelkanalbehandlung gefährden den Erfolg der endodontischen Behandlung nur bei gleichzeitigem Vorliegen einer Infektion des betroffenen Zahnes (SIQUEIRA 2001). Alle Anforderungen an eine erfolgreiche Wurzelkanalbehandlung beinhalten die Eradikation von Mikroorganismen sowie Maßnahmen, die ein erneutes Eindringen der Keime verhindern. Auch eine lege artis durchgeführte Wurzelkanalbehandlung kann zu einem endodontischen Misserfolg führen. Aus diesem Grund liegt der Erfolg der Wurzelkanalbehandlung im Nachweis aller am

Entzündungsprozess beteiligten Bakterien sowie deren vollständiger Eliminierung. Die Relevanz parodontopathogener Keime bei WSR und Revision wurde bisher nicht untersucht bzw. veröffentlicht.

Die im Verlauf der Studie gewonnenen Proben weisen hinsichtlich Alter und Geschlecht keine Prävalenz auf. Lediglich die Molaren sind vom Zahntyp am häufigsten vertreten (67%). Im weiteren Verlauf können die Ergebnisse der WSR mit denen der Revision nicht verglichen werden. Die Ursache liegt im Behandlungsverfahren, welches eine orthograde Revision mit einer zeitgleichen WSR ausschließt. Die bei der Revision bzw. WSR entnommenen Proben, stammen nicht von den selben Zähnen und können daher nicht miteinander verglichen werden. Die Proben der Revision und WSR werden unter „endodontischen Misserfolg“ zusammengefasst.

Von den insgesamt 103 Proben ergaben sich für die 11 untersuchten parodontopathogenen Keime sehr unterschiedliche Ergebnisse. Ein Nachweis von *A. actinomycetemcomitans*, *E. nodatum* und *Capnocytophaga spp.* konnte in keiner der Proben erfolgen. *P. intermedia*, *C. rectus* und *E. corrodens* wurden bei jeweils einer Probe (1%) detektiert. *P. micros* ergab bei 2 (2%), *T. denticola* bei 4 (4%), *T. forsythia* bei 11 (11%), *P. gingivalis* bei 12 (12%) und *F. nucleatum* bei 23 Proben (22%) ein positives Ergebnis. Mithilfe des Chi-Quadrat-Verteilungstests wurde überprüft, ob die Verteilung der nachgewiesenen Bakterien zufällig ist, oder signifikant abweichende Werte von einer hypothetischen Gleichverteilung vorliegen. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $<0,1\%$ kann eine zufällige Verteilung ausgeschlossen werden. Von diesen Ergebnissen ausgehend kann ein relevantes Vorkommen von *A. actinomycetemcomitans*, *E. nodatum*, *Capnocytophaga spp.*, *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. corrodens* und *P. micros* bei endodontischen Misserfolgen in dieser Studie nicht bestätigt werden. Die Bedeutung von *T. denticola*, *T. forsythia* und *P. gingivalis*, welche in 4%, 11% und 12% nachgewiesen wurden, muss diskutiert werden. Bekannt sind diese Keime unter dem Begriff „roter Komplex“ und weisen im Parodont eine hohe Pathogenität auf (SOCRANSKY et al. 1998). Sie besitzen die Fähigkeit mithilfe von Proteasen, Lipopolysacchariden oder Hämaggglutinine in das Gewebe zu infiltrieren und die Destruktion des Weich- und Knochengewebes massiv voranzutreiben (DOMBROWA 2007). Vor allem tritt dieser Bakterienkomplex in Verbindung mit Keimen des sogenannten „orangenen Komplexes“ auf, welche das Andocken des roten Komplexes an die glatte Zahnoberfläche durch Rezeptoren sicherstellt (DOMBROWA 2007). Zum orangenen Komplex gehören *P. intermedia*, *P. micros* und *F. nucleatum*. *P. intermedia* und *P. micros* sind wie oben beschrieben, aufgrund des geringen Nachweises von 1% und 2% nicht als bedeutsam

anzusehen. *F. nucleatum* wurde in dieser Studie in 22% der Proben nachgewiesen und kann als relevanter Keim bei chronisch apikaler Parodontitis angesehen werden. Inwiefern die Anwesenheit von *F. nucleatum* Einfluss auf die Progredienz einer apikalen Infektion hat, kann mit dieser Studie nicht geklärt werden.

Im zweiten Teil wird die Rolle der parodontopathogenen Keime bei endodontischen Misserfolgen im Bezug auf deren Synergismus in der Biofilmformation überprüft.

Nach der Bildung von Biofilmen sind Bakterien in der Lage, gegenüber Phagozytose und antimikrobiellen Spüllösungen besser zu bestehen, als ohne Biofilmformation (SAITO et al. 2008). *F. nucleatum* kann als wichtiger Keim bei der Biofilmformation das Haftvermögen von parodontopathogenen Keimen wie *P. gingivalis* und *T. denticola* in parodontalen (KOLENBRANDER et al. 2000) als auch *P. gingivalis* und *T. forsythia* in extraradikulären Biofilmen verstärken (NOGUCHI et al. 2005). Der mikrobiologische Biofilm wird auch bei persistierenden endodontischen Infektionen als bedeutender Faktor gesehen (EICK 2004, HEPPLER 2006, TAKAHASHI 2006, SAITO et al. 2008). ROCAS et al. (2001) wiesen in ihrer Studie die zum roten Komplex gehörenden Mikroorganismen bei chronisch apikaler Parodontitis nach. Fraglich ist zum einen, ob die zum roten Komplex gehörenden Mikroorganismen bei chronisch apikaler Parodontitis ebenfalls für die Destruktion im Knochen verantwortlich sind und des Weiteren, ob die zum orangenen Komplex gehörenden Keime, insbesondere *F. nucleatum* im Endodont einen ähnlichen Synergismus besitzen wie bei parodontalen Erkrankungen. Mithilfe des Chi-Quadrat-Vierfeldertests wurde untersucht, ob die 11 untersuchten Bakterien in Abhängigkeit voneinander auftreten. Bei *F. nucleatum* und *T. forsythia* wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $<0,1\%$ eine Abhängigkeit im Nachweis festgestellt. *F. nucleatum* und *T. denticola* treten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% in Abhängigkeit voneinander auf. Bei *T. forsythia* und *T. denticola* konnte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $<0,1\%$ eine Abhängigkeit im Nachweis bewiesen werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde mithilfe der logistischen Regression die Wahrscheinlichkeit ermittelt, mit welcher *T. forsythia* unter Einfluss von *F. nucleatum*, *T. denticola* unter Einfluss von *F. nucleatum* und *T. denticola* unter Einfluss von *T. forsythia* nachzuweisen ist.

- *T. forsythia* tritt in Anwesenheit von *F. nucleatum* 8,3-mal häufiger auf als ohne *F. nucleatum*
- *T. denticola* tritt in Anwesenheit von *F. nucleatum* 11,8-mal häufiger auf als ohne *F. nucleatum*

- *T. denticola* tritt in Anwesenheit von *T. forsythia* 34,1-mal häufiger auf als ohne *T. forsythia*

Im Endodont scheint es ebenso einen Zusammenhang zwischen Bakterien des roten Komplexes (*T. forsythia*, *T. denticola*) mit denen des orangenen Komplexes (*F. nucleatum*) zu geben. Die Ergebnisse bestätigen des Weiteren, dass die Mikroorganismen des roten Komplexes innerhalb einer Probe häufiger (34,1-mal) vorkommen als bei solitären Vorkommen. Zu erwarten wäre auch ein Zusammenhang im Nachweis von *P. gingivalis* und *F. nucleatum* bzw. zwischen *P. gingivalis* und *T. forsythia* sowie *P. gingivalis* und *T. denticola*. *P. gingivalis* tritt in dieser Studie unabhängig vom roten sowie orangenen Komplex auf. *F. nucleatum* ist der einzige Vertreter des orangenen Komplexes und der geringe Nachweis von *P. intermedia* und *P. micros* (orangener Komplex) lässt darauf schließen, dass die Relevanz von *F. nucleatum* bei chronisch apikaler Parodontitis nicht auf die Komplexzugehörigkeit zurückzuführen ist, sondern auf seine Eigenschaft, das Haftvermögen parodontopathogener Keime zu erhöhen. Es ist davon auszugehen, dass der Synergismus in der Biofilmbildung von *T. forsythia* und *T. denticola* mit *F. nucleatum* bei endodontischen Misserfolgen eine Rolle spielt, dieser aber nur in gewissen Punkten denen im Parodont gleicht. In der Literatur sind viele Studien zu finden, die sich mit der Koaggregation zwischen *F. nucleatum* und *P. gingivalis* beschäftigen (KOLENBRANDER und ANDERSEN 1989, KINDER und HOLT 1993, METZGER et al. 2001, SAITO et al. 2008). Das Haftvermögen zwischen diesen beiden gram-negativen Mikroorganismen entsteht durch ein Galaktose enthaltenden Kohlenhydratrezeptor auf *P. gingivalis* und ein Protein-Adhäsion auf *F. nucleatum* (KINDER und HOLT 1992). Andere Arten von Zucker wie z.B. Laktose, N-Acetyl-D-Galaktosamine und D-Galaktose verhindern dagegen die Koaggregation von *F. nucleatum* und *P. gingivalis* (KOLENBRANDER und ANDERSEN 1989). Der Nachweis von *E. faecalis* bei endodontischen Misserfolgen wurde in mehreren Studien erbracht (MOLANDER et al. 1998, SUNDQVIST et al. 1998, HANCOCK et al. 2001, PINHEIRO et al. 2003a, SIQUEIRA und ROCAS 2009). Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte sein, ob bzw. inwieweit *E. faecalis* Koaggregate mit *F. nucleatum* oder anderen parodontopathogenen Keimen bilden kann. Der Nachweis solcher Wechselbeziehungen würde ein anderes Behandlungskonzept vorsehen, bei dem im Frühstadium der paro- oder endodontalen Erkrankung die Besiedelung der resistenten Mikroorganismen verhindert werden könnte.

Die Frage, warum in dieser Studie keine Abhängigkeit zwischen *F. nucleatum* und *P. gingivalis* gefunden werden konnte, gilt es ebenfalls in anderen Studien zu prüfen. Eine

Erklärung wäre, dass im Endodont ein anderes Milieu vorzufinden ist als im Parodont und dieses möglicherweise eine Biofilmformation zwischen *F. nucleatum* und *P. gingivalis* nicht ermöglicht. Es könnte aber auch sein, dass der Fehler in der Studie liegt, denn eine Unabhängigkeit zwischen *F. nucleatum* und *P. gingivalis* wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 33% festgestellt.

5.4 Schlussfolgerungen

Eine Relevanz der 11 parodontopathogenen Keime (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens*, *Capnocytophaga* spp.) bei endodontischen Misserfolgen ist lediglich auf bestimmte Bakterien beschränkt und findet ihre Bedeutung in der Biofilmformation und Koaggregation.

A. actinomycetemcomitans, *E. nodatum* und *Capnocytophaga* spp. wurden in keiner, *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. corrodens* lediglich in einer und *P. micros* in zwei Proben nachgewiesen. Eine relevante Bedeutung dieser 7 parodontopathogenen Keime konnte nicht bestätigt werden.

Im Gegensatz dazu können *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* und *F. nucleatum* als bedeutsame Keime bei Patienten mit chronisch apikaler Parodontitis angesehen werden. Der alleinige Nachweis von *P. gingivalis* in 12%, von *T. forsythia* in 11% und von *F. nucleatum* in 22% der Proben kann als relevant betrachtet werden. *P. gingivalis* ist der einzige relevante Keim, der nicht unter Einfluss eines anderen parodontopathogenen Bakteriums häufiger nachgewiesen wurde. Des Weiteren werden die zum roten Komplex gehörenden Keime *T. forsythia* und *T. denticola* unter Einfluss von *F. nucleatum* häufiger detektiert als ohne *F. nucleatum*. *T. denticola* tritt häufiger unter Einfluss von *T. forsythia* auf als ohne *T. forsythia*.

Diese Erkenntnis lässt darauf schließen, dass der Synergismus in der Biofilmformation von parodontopathogenen Keimen auch bei der chronisch apikalen Parodontitis eine Bedeutung besitzt und für die Persistenz der Infektion mitverantwortlich sein kann.

6 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie war das Vorkommen und die Relevanz von 11 parodontopathogenen Keimen (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, *T. denticola*, *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens*, *Capnocytophaga* spp.) bei endodontischen Misserfolgen sowie deren Synergismus in der Biofilmbildung zu evaluieren.

103 mikrobielle Proben wurden während WSR und Revision entnommen. Auswahlkriterium zur Probenentnahme war ein endodontischer Misserfolg bei einem primär wurzelkanalbehandelten Zahn mit chronisch apikaler Parodontitis. Das Alter der Patienten lag zwischen 19 und 74 Jahren, 55 der Proben stammten von Frauen, 48 von Männern. 74 Proben wurden während Revision, 29 während WSR entnommen. 39% der Proben stammten von oberen, 28% von unteren Molaren, 13% von oberen Prämolaren, 10% von oberen Frontzähnen und 5% von jeweils unteren Prämolaren/Frontzähnen. Die Proben wurden bis zur mikrobiologischen Analyse bei -22°C tiefgefroren.

Zur Isolierung der 11 Markerkeime wurde die DNA•STRIP-Technologie angewendet (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland). Für den Nachweis von *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia* und *T. denticola* wurde der micro-IDent® DNA-STRIP® verwendet. Um *P. micros*, *F. nucleatum*, *C. rectus*, *E. nodatum*, *E. corrodens* und *Capnocytophaga* spp. nachweisen zu können, wurde der micro-IDent® plus DNA-STRIP® angewendet. Mithilfe des Geno Type® DNA Isolations Kit (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) wurde die DNA aus den Bakterien isoliert, die Nukleinsäure in einer Amplifikationsreaktion selektiv vermehrt und über eine Hybridisierung auf dem DNA•STRIP detektiert. Mit einer dem Kit zugehörigen Schablone wurden die DNA-STRIPs® verglichen und die nachgewiesenen Bakterien auf einem Auswertungsbogen notiert.

Von insgesamt 103 Proben ergaben sich für die 11 untersuchten parodontopathogenen Keime folgende Ergebnisse:

Ein Nachweis von *A. actinomycetemcomitans*, *E. nodatum* und *Capnocytophaga* spp. konnte in keiner der Proben erfolgen. *P. intermedia*, *C. rectus* und *E. corrodens* wurden in jeweils einer Probe (1%) festgestellt. *P. micros* wurde in 2 (2%), *T. denticola* in 4 (4%), *T. forsythia* in 11 (11%), *P. gingivalis* in 12 (12%) und *F. nucleatum* in 23 Proben (22%) detektiert. Eine zufällige Verteilung der Bakterien konnte ausgeschlossen werden (Chi-Quadrat-Verteilungstest).

Bei *A. actinomycetemcomitans*, *E. nodatum*, *Capnocytophaga* spp., *P. intermedia*, *C. rectus*, *E. corrodens* und *P. micros* konnte keine Relevanz hinsichtlich endodontischer Misserfolge festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu sind *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* und *F. nucleatum* bedeutsame Keime bei Vorliegen einer chronisch apikalen Parodontitis. *P. gingivalis* ist der einzige relevante Keim, der ohne Einfluss eines anderen parodontopathogenen Bakteriums nachgewiesen wurde.

Bei drei Bakterien konnte eine Abhängigkeit festgestellt werden. *T. forsythia* tritt in Anwesenheit von *F. nucleatum* 8,3-mal häufiger auf als ohne *F. nucleatum*. *T. denticola* tritt in Anwesenheit von *F. nucleatum* 11,8-mal häufiger auf als ohne *F. nucleatum*. *T. denticola* tritt in Anwesenheit von *T. forsythia* 34,1-mal häufiger auf als ohne *T. forsythia*.

Die erbrachten Nachweise lassen darauf schließen, dass der Synergismus in der Biofilmbildung von parodontopathogenen Keimen auch bei chronisch apikalen Parodontitiden eine Bedeutung besitzt und für die Persistenz der Infektion mitverantwortlich sein kann.

7 Literaturverzeichnis

Aas JA, Paster BJ, Stokes LN et a. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43:5721-5732

Abbott PV (1991a) Recognition and prevention of failures in clinical dentistry. *Endodontics. Ann R Australas Coll Dent Surg* 11:150-166

Abbott PV, Heijkoop PS, Cardaci SC, Hume WR, Heithersay GS (1991b) An SEM study of the effects of different irrigation sequences and ultrasonics. *Int Endod J* 24:308-316

Abitbol S (2001) Outcome of non-surgical endodontic treatment. MSc Dissertation. Toronto: University of Toronto 1-103

Adenubi JO, Rule DC (1976) Success rate for root fillings in young patients. *Br Dent J* 141:237-241

Adriaens PA, De Boever JA, Loesche WJ (1988) Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J Periodontol* 59:222-230

Appel C (2011) Orthograde Revision bei persistierender periapikaler Parodontitis nach Wurzelspitzenresektion. *Dtsch Zahnärztl Z* 66:196-211

Asai Y, Jinno T, Igarashi H, Ohyama Y, Ogawa T (2002) Detection and quantification of oral treponemas in subgingival plaque by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40:3334-3340

Bae KS, Baumgartner JC, Shearer TR, David LL (1997) Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin. *J Endod* 23:620-623

Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T (1999) Association of black pigmented bacteria with endodontic infections. *J Endod* 25:413-415

Bergenholtz, G. und Hasselgren, G. (2003) Endodontics and periodontics. In: Lindhe, J., Karring., Th. und Lang, N. P. (eds). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4. Aufl., Oxford: Blackwell Munksgaard 318–351

Bergenholtz G, Lindhe J (1978) Effect of experimentally induced marginal periodontitis and periodontal sealing on the dental pulp. *J Clin Periodontol* 5:59

- Bergenholtz G, Nyman S (1984) Endodontic complications following periodontal and prosthetic treatment of patients with advanced periodontal disease. *J Periodontol* 55:63
- Bergenholtz G, Spangberg L (2004) Controversies in endodontics. *Crit Rev Oral Biol Med* 15:99-114
- Bickel PJ, Doksum KA (2007) *Mathematical statistics: Basic ideas and selected topics*. 2. Aufl., Bd. 1, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, Pearson 221
- Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S (2008) Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 23:384-390
- Bortz J, Schuster C (2010) *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. 7. Aufl., Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 74-76, 106-107
- Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH (2006) The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 33:427-433
- Brauner AW, Conrads G (1995) Studies into the microbial spectrum of apical periodontitis. *Int J Endod* 28:244-248
- Brynolf I (1967) A histological and roentgenological study of the periapical region of human upper incisors. *Odontol Revy Suppl* 18:1-176
- Bystrom A, Happonen RP, Sjörgen U, Sundqvist G (1987) Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol* 3:58-63
- Bystrom A, Sundqvist G (1981) Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 89:321-328
- Cachovan G, Ahlers MO, Platzer U, Mack D, Sobottka I (2003) Antimikrobielle Empfindlichkeit parodontopathogener und anderer Keime gegenüber Moxifloxacin und anderen Antibiotika. *Dtsch Zahnärztl Z* 58:298-301
- Caliskan KM (2005) Nonsurgical retreatment of teeth with periapical lesions previously managed by either endodontic or surgical intervention. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100:242-8

Carrotte P (2004a) Endodontics: Part 1. The modern concept of root canal treatment. Br Dent J 197:181-183

Carrote P (2004c) Endodontics: Part 8. Filling the root canal system. Br Dent J 197:667-672

Carrotte P (2005) Surgical endodontics. Br Dent J 198:71-79

Chandra A (2009) Discuss the factors that affect the outcome of endodontic treatment. Aust Endod J 35:98-107

Chavez De Paz LE, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G (2003) Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. Int Endod J 36:500-508

Conrads G (1999) Molekularbiologische Verfahren in der Anaerobier-, speziell Parodontitiserreger-Diagnostik. Der Mikrobiologe 9:165-169

De Deus QD (1975) Frequency, location and direction of the lateral, secondary and accessory canals. J Endod 1:361-366

Derdilopoulou FV (2008) Auswirkungen von vier unterschiedlichen Behandlungsmethoden auf fünf parodontopathogene Keime bei der Parodontaltherapie. Diss, Charite-Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin 1-118.

Dietschi D, Bouillaguet S, Sadan A (2010) Restoration of the endodontically treated tooth. In: Cohen S, Hargreaves M: Cohen's pathways of the pulp. 10. Aufl., Mosby, St. Louis, Missouri 777-807

Dombrowa S (2007) 5 oder 11 Markerkeime? (Online im URL) http://www.heicodent.ch/download/microident/5_oder_11_Markerkeime.pdf (Stand 21.06.2011 08:29 Uhr)

Dongari A, Lambrianidis T (1988) Periodontally derived pulpal lesions. Endod Dent Traumatol 4:49

Dougherty WJ, Bae KS, Watkins BJ, Baumgartner JC (1998) Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. J Endod. 24:356-8

Ehnevid H, Jansson L, Lindskog S, Weintraub A, Blomlof C (1995) Endodontic pathogens: propagation of infection through patent dentinal tubules in traumatized monkey teeth. Endod Dent Traumatol 11:229-234

- Eick S, Pfister W (2004) Efficacy of antibiotics against periodontopathogenic bacteria within epithelial cells: an in vitro study. *J Periodontol* 75:1327-1334
- Eriksen HM, Ørstavik D, Kerekes K (1988) Healing of apical periodontitis after endodontic treatment using three different root canal sealers. *Endod Dent Traumatol* 4:114-117
- European Society of Endodontology (2006) Quality guidelines for endodontic treatment consensus report of the European Society of Endodontology. *Int Endod J* 39:921-930
- Fabricius L, Dahlin G, Holm SE, Möller AJR (1982) Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 90:200-206
- Figdor D, Sundqvist G (2007) A big role for the very small – understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J* 52:538-551
- Figini L, Lodi G, Gorni F, Gagliani M (2008) Single versus multiple visits for endodontic treatment of permanent teeth: a Cochrane systematic review. *J Endod* 34:1041-1047
- Flores-de-Jacoby L, Tsalikis L, Voganatsi A (1996) *Atlas der parodontalen Mikrobiologie*. 1. Aufl. Quintessenz Verlags GmbH Berlin. 11-13,61-64,111-138
- Fouad AF, Burleson J (2003) The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. *J Am Dent Assoc* 134:43-51:quiz 117-118
- Friedman S, Rotstein I, Shar-Lev S (1989) Bypassing gutta-percha root fillings with an automated device. *J Endod* 15:432-437
- Friedman S, Löst C, Zarrabian M, Trope M (1995) Evaluation of success and failure after endodontic therapy using glass ionomer cement sealer. *J Endod* 21:384-390
- Friedman S (1998) Treatment outcome and prognosis of endodontic therapy. In: Ørstavik D, Pitt Ford TR, *Essential endodontology: Prevention and treatment of apical periodontitis*. Blackwell Science Oxford 367-402
- Friedman S (2002) Prognosis of initial endodontic therapy. *Endodontic Topics* 2:59-88
- Friedman S, Mor C (2009) The success of endodontic therapy-healing and functionality. *J Calif Dent Assoc* 32:493-503
- Gagliani MM, Gorni FGM, Strohmenger L (2005) Periapical resurgery versus periapical surgery: a 5-year longitudinal comparison. *Int Endod J* 38:320–327

Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B, Schwenzer N, Ehrenfeld M (2005) Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie. 2. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 56

Grahnén H, Hansson L (1961) The prognosis of pulp and root canal therapy: A clinical and radiographic follow-up examination. *Odontol Revy Suppl* 12:146-165

Guigand M, Giez D, Sibayan E, Cathelineau G, Vuicain JM (2005) Comparative study of two canal obturation technique by image analysis and EDS microanalysis. *Br Dent J* 2005 198:707-711:discussion 695

Guldener PHA, Langeland K (1993) Endodontologie: Diagnostik und Therapie, 3. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 176-186

Gutierrez JH, Jofre A, Villena F (1990) Scanning electron microscope study on the action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 69:491-501

Gutmann JL (1978) Prevalence, location and patency of accessory canals in the furcation region of permanent molars. *J Periodontol* 49:21-26

Hain Lifescience (Online im URL Internet) <http://www.hain-lifescience.de/technologie/dnastrip.html> (Stand:28.07.11 20:08)

Hamood E (2001) The Evaluation of success and failure of endodontic treatments. *Aust Dent J* 27:80-84

Hancock HH 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J (2001) Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91:579-586

Harthroth B, Seyfahrt I, Conrads G (1999) Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol* 14:326-330

Heidemann D (2001) Praxis der Zahnheilkunde. Bd. 3 Endodontie, Urban & Fischer, München, Jena 30-37

Heidemann D, Hülsmann M, Petschelt A, Raab WHM, Schäfer E, Weiger R (2005) Die Maschinelle Wurzelkanalaufbereitung. *Dtsch Zahnärztl Z* 60:1-10

Hellwig E, Klimek J, Attin TH (2003) Einführung in die Zahnerhaltung, 3. Aufl., Urban & Fischer, München 245-337, 341-350

- Heppeler J, Hülsmann M (2006) *Enterococcus faecalis* – ein Problemkeim. *Endodontie* 15:137-144
- Hiatt WH, Amen CR (1964) Periodontal Pocket Elimination by combined Therapy. *Dent Clin N Amer* 133
- Hoskinson SE, Ng YL, Hoskinson AE, Moles DR, Gulabivala K (2002) A retrospective comparison of outcome of root canal retreatment using two different protocols. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 93:705-715
- Hülsmann M, Weiger R (2004) Revision einer Wurzelkanalbehandlung. *Dtsch Zahnärztl Z* 59:1-4
- Huumonen S, Ørstavik D (2002) Radiological aspects of apical periodontitis. *Endodontic Topics* 1:3-25
- Imura N, Zuolo ML, Ferreira MO, Novo NF (1996) Effectiveness of the Canal Finder and hand instrumentation in removal of gutta-percha root fillings during root canal retreatment. *Int Endod J* 29:382-386
- Ingle JI, Bakland LK (2002) *Endodontics*. 5. Aufl. London: BC Decker Inc 328-334
- Jefferson KK, Cerca N (2006) Bacterial-bacterial cell interactions in biofilms: detection of polysaccharide intercellular adhesins by blotting and confocal microscopy. *Methods Mol Biol* 341:119-12
- Jervoe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dorfler A, Jepsen S (2005) Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 32:778-783
- Kim S, Trowbridge HO (1998) Pulpal reactions to caries and dental procedures. In: Cohen S, Burns RC: *Pathways of the Pulp* 7. Aufl., Mosby, St. Louis, Missouri 531
- Kinder SA, Holt SC (1989) Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18. *Infect Immun* 57:3425-3433
- Kinder SA, Holt SC (1993) Localization of the *Fusobacterium nucleatum* T18 adhesin activity mediating coaggregation with *Porphyromonas gingivalis* T22. *J Bacteriol* 175:840-850
- Kirkham DB (1975) The location and incidence of accessory pulpal canals in periodontal pockets. *J Am Dent Assoc* 91:353-356

Klimm W (2003) Endodontologie: Grundlagen und Praxis. Dtsch Ärzteverlag Köln 17-40

Kojima K, Inamoto K, Nagamatsu K et al. (2004) Success rate of endodontic treatment of teeth with vital and nonvital pulps. A meta-analysis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 97:95-99

Kolenbrander PE, Andersen RN (1989) Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by lactose and related sugars. Infect Immun 57:3204-3209

Kolenbrander PE, Palmer JP jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NJ, Diaz PJ (2000) Bacterial interactions and successions during plaque development. Periodontology 42:47-79

Kremer BH, van Steenberg TJ (2000) Peptostreptococcus micros coaggregates with *Fusobacterium nucleatum* and non-encapsulated *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol Lett 182:57-62

Kunkel M, Hülsmann M (2007) Leitlinie Wurzelspitzenresektion. Mund- Kiefer- Gesichtschirurgie 11:251-257

Langer B, Stein SD, Wagenberg B (1981) An evaluation of root resections. A ten-year study. J Periodontol 52:719-722

Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M (1997) Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. Oral Microbiol Immunol 12:318-322

Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifacio KC (2002) EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. J Endod 28:815-815

Leuenberg A, Barthel C (2005) Retrospektive Studie zum 10-Jahres-Erfolg endodontischer Behandlungen. Zahn Prax 8:82-88

Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K (1991) Clinical, radiographic and histopathological study of endodontic treatment failures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 71:603-611

Lin LM, Skribner JE, Gaengler P (1992) Factors associated with endodontic treatment failures. J Endod 18:625-627

Lindhe J, Karring T, Lang NP (1999) Klinische Parodontologie und Implantologie. Quintessenz-Verlag Berlin 99-124

Löst C (1994) Differentialdiagnostik bei Erkrankungen des Parodonts / der Pulpa. Dtsch Zahnärztl Z 49:301

Louis M, T-J Huang L, T-J Huang G (2011) Pathobiology of the periapex. In: Cohen S, Hargreaves M: Cohen`s pathways of the pulp. 10. Aufl., Mosby, St. Louis, Missouri 545-551

Love RM (2001) Enterococcus faecalis: a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J 34:399-405

Lowman JV, Burke RS, Pellea GB (1973) Patent accessory canals: incidence in molar furcation region. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 36:580-584

Meryon SD (1987) The influence of surface area on the in vitro cytotoxicity of a range of dental materials. J Biomed Mater Res 21:1179-1186

Metzger Z, Featherstone LG, Ambrose WW, Trope M, Arnold RR (2001) Kinetics of coaggregation of Porphyromonas gingivalis with Fusobacterium nucleatum using an automated microtiter plate assay. Oral Microbiol Immunol 16:163-169

Miyashita H, Bergenholtz G, Gröndahl K, Wennström JL (1998) Impact of endodontic conditions on marginal bone loss. J Periodontol 69:158

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T (1998) Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J 31:1-7

Möller AJR, Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP (2004) Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. Eur J Oral Sci 112:207-215

Müller CJ, van Wyk CW (1984) The amelo-cemental junction. J Dent Assoc S Africa 39:799-803

Müller HP, Heinecke A, Borneff M, Knopf A, Klencke C, Poll S (1997) Microbial ecology of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Eikenella corrodens and Capnocytophaga spp in adult Periodontitis. J Periodontal Res. 32:530-542

Müller HP (2001) Parodontologie. 2.Aufl. Georg Thieme, Stuttgart. 13-25

Nair PNR, Sjørgen U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G (1990) Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 16:580-588

Ng YL, Mann V, Rahbaran S, Lewsey J, Gulabivala K (2008) Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature- part 2. Influence of clinical factors. *Int Endod J* 41:6-31

Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S (2005) Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens. *Appl Environ Microbiol* 71:8738-8743

Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S (2002) Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 28:679-683

Nonnenmacher C (2003) Diagnostik von entzündlichen parodontalen Erkrankungen. *Hessisches Zahnärzte Magazin* 4-11

Oguntebi BR (1996) Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. *Int Endod J* 27:218-222

Ørstavik D, Kerekes K, Eriksen HM (1987) Clinical performance of three endodontic sealers. *Endod Dent Traumatol* 3:178-186

Ørstavik D, Kerekes K, Molven O (1991) Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *Int Endod J* 24:1-7

Ørstavik D, Hörsted-Bindslev P (1993) A comparison of endodontic treatment results at two dental schools. *Int Endod J* 26:348-354

Ørstavik D (1996) Time-course and risk analysis of the development and healing of chronic apical periodontitis in man. *Int Endod J* 29:150-155

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183:3770-3783

Pekruhn RB (1986) The incidence of failure following single-visit endodontic therapy. *J Endod* 12:68-72

- Peters OA, Peters CI (2010) Cleaning and shaping of the root canal system. In: Cohen S, Hargreaves M: Cohen`s pathways of the pulp. 10. Aufl., Mosby, St. Louis, Missouri 283-348
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2003a) Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 36:1-11
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2003b) Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 18:100-103
- Pitt Ford TR (2004) Harty`s endodontics in clinical practice. 5th edition, Wright, Edinburgh 3-4
- Rateitschak EM, Rateitschak KH, Wolf HF (2004) Parodontologie. 3. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 14-29
- Ratka-Krüger P, Haueisen H, Schacher B, Neukranz E (2000) Verlust endodontaler Integrität als Ursache für lokalisierte parodontale Läsionen. *Dtsch Zahnärztl Z* 55:417
- Rocas IN, Siqueira JF jr, Santos KR et al. (2001) „Red complex“ (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*) in endodontic infections: A molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91:468-471
- Rocas IN, Siqueira JF jr, Santos KR (2004) Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 30:315-320
- Rotstein I, Simon JH (2006) The endo-perio lesion: a critical appraisal of the disease condition. *Endodontic Topics* 13:34-56
- Rupf S, Kannengießer S, Merte K, Pfister W, Sigusch B, Eschrich K (2000) Comparison of profiles of key periodontal pathogens in periodontium and endodontium. *Endod Dent Traumatol* 16:269-275
- Rutherford RB (2002) Interrelationship of Pulpal and Periodontal Diseases. In: Hargreaves KM, Goodis HE: Seltzer and Bender`s Dental Pulp. Quintessence Chicago. 411
- Saito D, Leonardo R, Rodrigues et al. (2006) Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16s rDNA clone libraries. *J Med Microbiol* 55:101-107

Saito Y, Fujii R, Nakagawa KI, Kuramitsu HK, Okuda K, Ishihara K (2008) Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 23:1-6

Sakamoto M, Siqueira JF jr, Rocas IN, Benno Y (2008) Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol* 23:275-281

Saunders WP, Saunders EM (1994) Coronal leakage as a cause of failure in root canal therapy: a review. *Endod Dent Traumatol* 10:105-108

Schäfer E (2001) Struktur der Pulpa und ihre Erkrankungsformen. In: Heidemann D: *Endodontie*, Urban & Fischer München, Jena 1-24

Schröder HE (1991) Die Auswirkungen der Furkationsmorphologie auf den Parodontitisbefall. *Dtsch Zahnärztl Z* 46:324

Schröder HE (2000) *Orale Strukturbiologie*. 4. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart 140-152

Selden HS (1974) Pulpoperiapical disease: diagnosis and healing. A clinical endodontic study. *J Oral Surg* 27:271-283

Seltzer S, Bender IB, Ziontz M (1963) The interrelationship of pulp and periodontal disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 16:1474-1490

Sigurdsson A, Trope M, Chivian N (2010) The role of endodontics after dental traumatic injuries. In: Cohen S, Hargreaves M: *Cohen's pathway of the pulp*. 10. Aufl., Mosby, St. Louis, Missouri 620-654

Sigusch BW (2007) *Mikrobiologische Diagnostik in der Parodontologie*. ZWP Online

Siqueira JF jr (2001) Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 34:1-10

Siqueira JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M (1997) Evaluation of the effectiveness of sodiumhypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal. *Int Endod J* 30:279-282

Siqueira JF jr, Rocas IN (2005) Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2-Redefining the endodontic microbiota. *J Endod* 31:488-498

Siqueira JF, Rocas IN (2006) Mikrobiologie endodontischer Infektionen. *Endodontie* 15:109-121

Siqueira JF, Rocas IN, Paiva SSM, Magalhaes KM, Guimaraes-Pinto T (2007) Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol* 22:266-271

Siqueira JF jr, Rocas IN (2009) Molecular analysis of endodontic infections. In: *Endodontic microbiology*. Fouad AF, 1. Aufl., Wiley-Blackwell, Iowa, USA 96-98

Sjörögen U, Hägglund B, Sundqvist G, Wing K (1990) Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 16:498-504

Sjörögen U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 30:297-306

Sobottka I, Cachovan G, Stürenburg E, Ahlers MO, Platzer U, Mack D (2002) In vitro activity of Moxifloxacin against bacteria isolated in odontogenic abscesses. *Antimicrob Agents Chemother* 46:4019-4021

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25:134-144

Socransky SS, Haffajee AD (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 38:135-187

Stabholz A, Friedman S (1988) Endodontic retreatment-case selection and technique. Part 2: Treatment planning for retreatment. *J Endod* 14:607-614

Strindberg LZ (1956) The dependance of the results of pulp therapy on certain factors. An analytical study based on radiographic and clinical follow-up examinations. *Acta Odontol Scand* 14:1-175

Sunde PT, Tronstad L, Eribe ER, Lind PO, Olsen I (2000) Assessment of periradicular microbiota by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* 16:191-196

Sundqvist G, Johansson E, Sjörögen U (1989) Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J Endod* 15:18-19

Sundqvist G (1994) Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 78:522-530

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjörgen U (1998) Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85:86-93

Takahashi N, Ishihara K, Kimizuka R, Okuda K, Kato T (2006) The effects of tetracycline, minocycline, doxycycline and of loxacin on *Prevotella intermedia* biofilm. *Oral Microbiol Immunol* 21:366:371

Tronstad L (2009) *Clinical Endodontics: A Textbook*. 3. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 190-201

Urban E, Terhes G, Radnai M, Gorzo I, Nagy E (2010) Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant woman by traditional anaerobic culture method and by a commercial molecular genetic method. *Anaerobe* 16:283-288

Van Winkelhoff AS, Loos BG, van der Reijden WA, van der Velden U (2002) *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destructions. *J Clin Periodontol* 29:1023-1028

Versümer J (2007) Endodontische Revisionsbehandlung eines Oberkiefermolaren – Dokumentation eines Misserfolges. *Endodontie* 16(2):135-140

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G (2005) Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 20:253-258

Von Arx T, Gerber C und Hardt N (2001) Periradicular surgery of molars: a prospective clinical study with a one-year follow-up. *Int Endod J* 34:520-5

Von Arx T (2005) Failed root canals: The case for apicoectomy (periradicular Surgery). *J Oral Maxillofac Surg* 63:832-837

Weiger R, Geurtsen W, Heidemann D, Löst D, Petschelt A, Raab W, Schäfer E, Hicke R (2000) Zur Prognose der Wurzelkanalbehandlung. *Dtsch Zahnärztl Z* 56:1-4

Wilcox LR, Krell KV, Madison S, Rittman B (1987) Endodontic retreatment: Evaluation of guttapercha and sealer removal and canal reinstrumentation. *J Endod* 13:453-457

Wilcox LR, Swift M (1991) Endodontic retreatment in small and large curved canals. J Endod 17:313-315

Williams JM, Trope M, Caplan DJ, Shugars DC (2006) Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. J Endod 32:715-721

Wittgow WC jr, Sabiston CB jr (1975) Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. I Endod 1:168-171

Young GR, Parashos P, Messer HH (2007) The principle of technique for cleaning root canals. Aust Dent J 52:52-63

Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T (2005) Chelation in root canal therapy reconsidered. J Endod 31:817-820

Zuolo ML, Imura N, Ferreira MOF (1994) Endodontic retreatment of thermafil or lateral condensation obturation in post space prepared teeth. J Endod 20:9-1

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir während der Verfassung der Dissertation zur Seite gestanden haben.

Ganz besonders danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Ingo Sobottka für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine tatkräftige und freundliche Unterstützung.

Dr. Georg Cachovan, meinem Betreuer, möchte ich für seine große Hilfsbereitschaft bei Fragen und für seine engagierte und persönliche Begleitung bedanken.

Dr. Andreas Schult, Dr. Clemens Bargholz, Dr. Marc Hannemüller und Dr. Thomas Pakusa danke ich für die Gewinnung der mikrobiellen Proben.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Martin Aepfelbacher, dem Direktor des mikrobiologischen Instituts der Universität Hamburg, für die Ermöglichung der Durchführung meiner Versuche an seinem Institut.

Bei Marianne Strinz und Petra Schillemeit möchte ich mich ganz herzlich dafür bedanken, dass sie mich geduldig in die Abläufe im Labor eingewiesen haben, mir bei Fragen und Problemen so unermüdlich zur Seite gestanden haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Gerhard Schön, Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Hamburg, für die statistische Beratung und für die großartigen Hilfestellungen bei der statistischen Auswertung.

Des Weiteren danke ich Volkmar Nerreter von Hain Lifescience für die finanzielle Unterstützung der Studie.

Mein Dank gilt Marlon Sdun, der mir bei statistischen Fragen auch zur Seite stand sowie Nele Hannig und Na-Hyun Kim für die Überprüfung der Rechtschreibung.

9 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

10 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, 04.01.2012

Marie Hannig