

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Poliklinik für Parodontologie, Präventive Zahnmedizin und Zahnerhaltung

Direktor: Prof. Dr. Dr. Thomas Beikler

**Eradikation parodontal pathogener Keime bei parodontal  
Gesunden:  
Variabilität des oralen Mikrobioms bei parodontal Gesunden in  
Abhängigkeit von *Porphyromonas gingivalis***

## **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Anna Helena van den Brand  
Moers

Hamburg 2022

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.10.2022**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dr. Thomas Renné**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. Thomas Beikler**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Parodontitis</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Neue Klassifikation der Parodontitis .....	1
1.1.2	Epidemiologie .....	8
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese.....	9
<b>1.2</b>	<b>Mikrobiologie</b> .....	<b>11</b>
1.2.1	Das orale Mikrobiom.....	11
1.2.2	Porphyromonas gingivalis - Virulenzfaktoren.....	14
<b>1.3</b>	<b>Therapie</b> .....	<b>17</b>
1.3.1	Luft-Pulver-Wasserstrahlgerät .....	19
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Studiendesign</b> .....	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Ethikantrag</b> .....	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>Proband:innen</b> .....	<b>23</b>
2.3.1	Einschlusskriterien.....	23
2.3.2	Ausschlusskriterien.....	24
2.3.3	Abbruchkriterien.....	24
<b>2.4</b>	<b>Studienablauf</b> .....	<b>24</b>
<b>2.5</b>	<b>Funktionsprinzip der Luft-Pulver-Wasserstrahlgeräte</b> .....	<b>26</b>
<b>2.6</b>	<b>Klinische Diagnostik</b> .....	<b>27</b>
2.6.1	Parodontaler Screening Index .....	27
2.6.2	Mundhygieneindizes.....	28
2.6.3	Mikrobielle Probenentnahme .....	30
<b>2.7</b>	<b>Molekularbiologische Untersuchungen</b> .....	<b>30</b>
2.7.1	Identifizierung der Versuchsgruppen .....	30
2.7.2	Gelelektrophorese .....	32

2.7.3	16S Sequenzierung des oralen Mikrobioms .....	33
2.8	<b>Datenerfassung</b> .....	34
2.9	<b>statistische Auswertung</b> .....	34
3	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
3.1	<b>Demographie</b> .....	36
3.2	<b>klinische Ergebnisse</b> .....	39
3.3	<b>mikrobiologische Ergebnisse</b> .....	43
4	<b>Diskussion</b> .....	<b>55</b>
4.1	<b>Fragestellung</b> .....	55
4.2	<b>Material und Methoden</b> .....	56
4.2.1	Probanden.....	56
4.2.2	Studiendesign.....	58
4.2.3	Erhebung klinischer Parameter.....	58
4.2.4	Erhebung mikrobiologischer Parameter.....	60
4.3	<b>Ergebnisse</b> .....	61
4.4	<b>Schlussfolgerung</b> .....	65
5	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>67</b>
6	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>69</b>
7	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>71</b>
8	<b>Danksagung</b> .....	<b>83</b>
9	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>84</b>
10	<b>Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>85</b>

## Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Parodontitis gehört zu den am häufigsten vorkommenden oralen Pathologien. Schon lange werden die Mikroorganismen des „roten Komplexes“ als die sogenannten Leitkeime der Parodontitis bezeichnet (Socransky et al., 1998). Darunter auch der Keim *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*). Bekannt ist, dass er mit einer erhöhten parodontalen Taschentiefe assoziiert ist, also in einem erkrankten oralen Mikrobiom gehäuft vorkommt und dort die Progression der pathologischen Vorgänge begünstigt. *P.g.* kann aber auch einem gesunden subgingivalen Biofilm vorliegen.

Therapie und Präventionsmaßnahmen zur Verhinderung der Progression einer Parodontitis bei Erkrankten sind bereits bekannt und im zahnmedizinischen Behandlungsalltag etabliert. Hier hat sich das Luft- Pulver- Wasserstrahlgerät (LPW) schon als sinnvoll erwiesen. Da es jedoch keine kurativen Maßnahmen zur Behandlung einer Parodontitis gibt, sondern nur stabilisierende Behandlungsmethoden, liegt die Aufmerksamkeit in den letzten Jahren auf der Prävention bei parodontal Gesunden mit dem Nachweis von parodontalen Leitkeimen und somit einem Risikofaktor für eine Parodontitis. Hierzu wurde untersucht, dass eine Reduktion der parodontopathogenen Keime beim Gesunden durch Prophylaxemaßnahmen und das Bestrahlen aller oralen Habitate mittels niedrigabrasiven Glycin Pulver möglich ist.

Da orale Erkrankungen wie die Parodontitis nicht durch einzelne Erreger verursacht werden, sondern aus der Zusammenarbeit einer Gruppe von Erregern und der dadurch verursachten Dysbiose, bedarf es bezüglich des orale Mikrobioms und seine Funktion in Gesundheit und Krankheit an weiterer Forschungsarbeit.

Bekannt ist, dass *P.g.* das Wachstum und die Entwicklung der mikrobiellen Flora im erkrankten Zustand fördert. Aber genauso wie ein Interesse an dem orale Mikrobiom in pathologischen Vorgängen besteht, ist es auch interessant zu untersuchen, wie es sich im gesunden Zustand in Abhängigkeit von Pathogenen verändert. Daher stellt sich die Frage, in wie weit sich das orale Mikrobiom in Abhängigkeit vom Vorhandensein von *P.g.* nach einem supragingivalen Debridement und dem Abstrahlen aller Bereich der Mundhöhle mittels des Luft-Pulver- Wasserstrahlgeräts entwickelt.

Die Hypothesen lauten:

1. In Abhängigkeit des Leitkeims *Porphyromonas gingivalis* liegt beim Gesunden eine andere Zusammensetzung des oralen Mikrobioms vor als ohne den Nachweis von *P.g.*.
2. Mit dem Nachweis von *P.g.* und nach einem supragingivalen Debridement inklusive der Bearbeitung aller oralen Habitate mittels des LPWs entwickelt sich das orale Mikrobiom beim Gesunden anders als ohne den Nachweis von *P.g.*.

# 1 Einleitung

## 1.1 Parodontitis

### 1.1.1 Neue Klassifikation der Parodontitis

Für eine adäquate Diagnostik und Therapie von parodontalen Erkrankungen ist eine allgemeingültige Klassifikation wichtig. Aufgrund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse fand im November 2017 in Chicago der World Workshop zur Erarbeitung einer neuen Klassifikation parodontaler und periimplantärer Erkrankungen statt. Der „2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions“ wurde in Kooperation von der AAP (American Academy of Periodontology) und der EFP (European Federation of Periodontology) ausgerichtet. Das Ziel war ein Update der Klassifikation parodontaler Erkrankungen von 1999 (Armitage, 1999) und ein ähnliches Schema für periimplantäre Erkrankungen anhand von dafür in Auftrag gegebene Review Papers und Consensus Reports über relevante Bereiche der Parodontologie und Implantologie zu erarbeiten. Außerdem lag die Aufgabe der vier Arbeitsgruppen darin, relevante Falldefinitionen und diagnostische Kriterien zu Verfügung zu stellen, um Kliniker:innen bei der Anwendung der neuen Klassifikation zu unterstützen (Caton et al., 2018). Bei dem Workshop befassten sich die Arbeitsgruppen mit einigen ungelösten Problemen der vorherigen Klassifikation und erstellten so eine neue Unterteilung der parodontalen und periimplantären Erkrankungen und Zustände.

Die Klassifikation parodontaler und peri-implantärer Erkrankungen und Zustände wird in insgesamt vier Hauptgruppen unterteilt. Wie in Abbildung 1 dargestellt beschreiben die ersten drei Hauptgruppen die parodontalen Erkrankungen und Zustände. Die vierte Hauptgruppe definiert die peri-implantären Erkrankungen und Zustände.

## Klassifikation Parodontaler und Periimplantärer Erkrankungen und Zustände 2017

Parodontale Erkrankungen und Zustände										
<b>Parodontale Gesundheit, Gingivale Erkrankungen und Zustände</b>  Chapple, Mealey et al. 2018 Konsensusbericht Trombelli et al. 2018 Falldefinitionen			<b>Parodontitis</b>  Papapanou, Sanz et al. 2018 Konsensusbericht Jespen, Caton et al. 2018 Konsensusbericht Tonetti, Tonetti, Greenwell & Kornman 2018 Falldefinitionen			<b>Andere das Parodont betreffende Zustände</b>  Jespen, Caton et al. 2018 Konsensusbericht Papapanou, Sanz et al. 2018 Konsensusbericht				
Parodontale Gesundheit und gingivale Gesundheit	Gingivitis: plaqueinduziert	Gingivale Erkrankungen: nichtplaqueinduziert	Nekrotisierende parodontale Erkrankungen	Parodontitis	Parodontitis als Manifestation einer systemischen Erkrankung	Systemische Erkrankungen oder Zustände mit Einfluss auf das Parodont	Parodontale Abszesse und Endo-Paro-Läsionen	Mukogingivale Deformitäten und Zustände	Traumatische Okklusale Kräfte	Zahn- und zahnersatzbezogene Faktoren
Periimplantäre Erkrankungen und Zustände Berglundh, Armitage et al. 2018 Konsensusbericht										
Periimplantäre Gesundheit			Periimplantäre Mukositis			Periimplantitis			Periimplantäre Weich- und Hartgewebsdefekte	

Abbildung 1: Klassifikation parodontaler und periimplantärer Erkrankungen und Zustände (nach Caton, 2017)

Die erste Hauptgruppe ist die Klassifizierung der „Parodontale Gesundheit, Gingivale Erkrankungen und Zustände“. Hierbei werden erstmals auch Zustände im intakten, gesunden oder reduzierten Parodontium nach Abschluss der erfolgreichen Behandlung eines Patienten mit Parodontitis beleuchtet. Hierfür wurden die Blutung auf Sondierung (=BAS, engl. BOP) und die Messung der verbleibenden parodontal Tasche als spezifische Parameter zur Identifikation einer Gingivitis oder eines Entzündungszustandes nach einer abgeschlossenen Parodontitistherapie vereinbart (Caton et al., 2018). Diese Unterscheidung wurde gemacht, um die Notwendigkeit einer umfassenderen Überwachung des/der erfolgreich behandelten Patient:in mit Parodontitis hervorzuheben. Ein/Eine Patient:in mit Gingivitis kann in einen Gesundheitszustand zurückkehren. Ein/Eine Patient:in mit Parodontitis hingegen erhält nach erfolgter Therapie eine lebenslange unterstützende Behandlung, um ein Wiederauftreten der Krankheit zu verhindern (Chapple et al., 2018). Der Workshop reorganisierte auch das breite Spektrum von nicht-Plaque-induzierten gingivalen Erkrankungen und Erkrankungen basierend auf primärer Ätiologie (Holmstrup et al., 2018).

Die zweite Hauptgruppe der neuen Klassifikation befasst sich mit den „Formen der Parodontitis“. In der 1999 erarbeiteten Klassifikation der Parodontitis wurde diese in chronisch, aggressiv, nekrotisierend und als Manifestation einer systemischen Erkrankung klassifiziert (Armitage, 1999). Viele neue Informationen aus Bevölkerungsstudien, Grundlagenforschung und Erkenntnisse prospektiver Studien zur Beurteilung von Umwelt- und systemischen Risikofaktoren, waren Veranlassung für eine neue Klassifikation der Parodontitis. Nach heutiger Kenntnis der Pathophysiologie werden drei Formen der Parodontitis unterschieden: nekrotisierende Parodontitis (Herrera et al., 2018), Parodontitis als Manifestation einer systemischen Erkrankung (Albandar et al., 2018), und die Formen der Erkrankung, die zuvor als chronisch oder aggressiv erkannt wurden, werden jetzt unter einer einzigen Kategorie zusammengefasst (Papapanou et al., 2018, Needleman et al., 2018, Fine et al., 2018, Billings et al., 2018, Tonetti et al., 2018). Die Klassifikation der Formen der Parodontitis werden auf der Grundlage eines multidimensionalen Staging- und Grading-Systems eingeteilt (Tonetti et al., 2018). Die Einteilung in die vier Stages (=Parodontitis-Stadium) erfolgt nach dem Schweregrad der Parodontitis sowie der Komplexität

und dem Ausmaß der Behandlung und wird durch die Angabe ergänzt, ob es sich um eine lokalisierte, generalisierte oder eine Form der Molaren-Inzisiven-Beteiligung handelt (Tonetti et al., 2018, Papapanou et al., 2018). Zur Einteilung werden mehrere Variablen einschließlich dem klinischen Attachmentverlust, prozentualem Knochenverlust, Taschensondierungstiefe, Fukationsbeteiligung, Zahnlockerung und der Zahnverlust hinzugezogen.

Das Grading (=Parodontitis-Grad) gibt ergänzende Informationen hinsichtlich biologischer Merkmale und Progressionsrate. Bei der Einstufung werden Aspekte, die im Zusammenhang mit der Parodontitis Progression stehen beurteilt. Dabei handelt es sich zum Beispiel um den allgemeinen Gesundheitszustand, Expositionen wie das Rauchen oder der Level der metabolischen Kontrolle bei Diabetes. Somit können individuelle Patientenfaktoren in die Diagnose einbezogen werden, die für eine umfassende Therapieplanung wichtig sind (Caton et al., 2018). Die Einteilungen nach Parodontitis-Stadien und -Graden sind nochmals in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Tabelle 1: Parodontitis Stadien Einteilung

Parodontitis-Stadium		Stadium I	Stadium II	Stadium III	Stadium IV
<b>Schweregrad</b>	Interdentaler KAV an der Stelle mit dem höchsten Verlust	1 – 2mm	3 – 4mm	≥ 5mm	≥ 5mm
	röntgenologischer Knochenabbau	Koronales Wurzel Drittel (<15%)	Koronales Wurzel Drittel (15-33%)	Ausdehnung bis ins mittlere Wurzel Drittel oder darunter	Ausdehnung bis ins mittlere Wurzel Drittel oder darunter
	Zahnverlust	Kein Zahnverlust aufgrund von Parodontitis		Zahnverlust aufgrund von Parodontitis von ≤ 4 Zähnen	Zahnverlust aufgrund von Parodontitis von ≥ 5 Zähnen
<b>Komplexität</b>	Lokal	Maximale Sondierungstiefe von ≤ 4mm, meist horizontaler Knochenabbau	Maximale Sondierungstiefe von ≤ 5mm, meist horizontaler Knochenabbau	Zusätzlich zur Stadium II-Komplexität: Sondierungstiefe ≥ 6mm Vertikaler Knochenabbau ≥ 3mm Furkationsbeteiligung Grad II oder III Moderater Kieferkammdefekt	Zusätzlich zur Stadium III-Komplexität: Notwendigkeit für komplexe Rehabilitation aufgrund von: Mastikatorischer Dysfunktion, Sekundärem okklusalem Trauma (Zahnlockerungsgrad ≥ 2) Schwere Kieferkammdefekte, Bisskollaps, Zahnwanderung, Auffächerung, Weniger als 20 verbleibende Zähne (10 gegenüberliegende Paare)
<b>Ausmaß und Verteilung</b>	Als Deskriptor zum Stadium hinzufügen	Für jedes Stadium Beschreibung des Ausmaßes als lokalisiert (<30% der Zähne betroffen), generalisiert oder Molaren-Inzisiven-Beteiligung			

Parodontitis-Stadium: KAV = klinischer Attachmentverlust (Papapanou et al., 2018)

Tabelle 2: Parodontitis Grad Einteilung

Parodontitis-Grade			Grad A Langsame Progression	Grad B Moderate Progression	Grad C Schnelle Progression
<b>Primäre Kriterien</b>	Direkte Evidenz für Progression	Longitudinale Daten (röntgenologischer Knochenabbau oder KAV)	Keine Evidenz für Knochenabbau in 5 Jahren	Evidenz für < 2mm Knochenabbau in 5 Jahren	Evidenz für ≥ 2mm Knochenabbau in 5 Jahren
	Indirekte Evidenz für Progression	% Knochenabbau/Alter	< 0,25	0,25 – 1,0	> 1,0
Fall-Phänotyp		Viel Biofilmlagerungen mit wenig parodontaler Destruktion	Parodontale Destruktion im gleichen Ausmaß wie Biofilmlagerungen	Parodontale Destruktion überschreitet die Erwartungen angesichts der Biofilmlagerungen; spezifische klinische Muster hinweisende auf Perioden schneller Progression und/oder früher Ausbruch der Erkrankung (z.B. Molaren-Inzisiven- Beteiligung, Therapieresistenz bei antibakterieller Standardtherapie	
<b>Grad- Modifikatoren</b>	Risikofaktoren	Rauchen	Nichtraucher	Raucher < 10 Zigaretten/Tag	Raucher ≥ 10 Zigaretten/Tag
		Diabetes	Normoglykämisch/ keine diagnostizierte Diabetes	HbA1c < 7,0% bei Diabetes-Patienten	HbA1c ≥ 7,0% bei Diabetes-Patienten

Parodontitis-Grade: KAV = klinischer Attachmentverlust (Papapanou et al., 2018)

Unter der dritten Hauptgruppe „Parodontale Manifestation bei systemischen Erkrankungen sowie entwicklungsbedingte und erworbene Zustände“ werden systemische Störungen, die im Allgemeinen zu einer frühen Manifestation einer schweren Parodontitis führen, zusammengefasst (Albandar et al., 2018). Darunter fallen neben genetischen Erkrankungen, wie zum Beispiel das Papillon Lefèvre Syndrom, auch ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus (Caton et al., 2018), denn auch diese kann einen schlechten Einfluss auf den Verlauf einer Parodontitis haben (Wu et al., 2020). Zusätzlich werden alle weiteren Zustände aufgezeigt, die das Parodont negativ beeinträchtigen, somit auch die Mukogingivale Deformationen. In deren Einteilung werden klinische Parameter einschließlich des gingivalen Phänotyps sowie Merkmale der freiliegenden Wurzeloberfläche berücksichtigt (Jepsen et al., 2018). Betreffend der okklusalen Traumata gab es Erneuerungen bezüglich der Begrifflichkeiten. Die Bezeichnung „übermäßige okklusale Kraft“ wird durch „traumatische okklusale Kraft“ ersetzt. Es gibt jedoch keine Belege aus Studien, die ein okklusales Trauma bei der Progression des Attachmentverlustes bei einer Parodontitis verantwortlich machen (Fan and Caton, 2018).

Der Abschnitt prothesenbezogene Faktoren wurde in der neuen Klassifikation erweitert. Der Begriff der biologischen Breite wurde durch suprakrestale Gewebe ersetzt (Jepsen et al., 2018). Klinische Verfahren zur Herstellung indirekter Restaurationen wurden aufgrund neuer Daten hinzugefügt, die darauf hindeuten, dass diese Verfahren eine Rezession und den Verlust der klinischen Attachments verursachen können (Ercoli and Caton, 2018).

Neu hinzugefügt zu der Klassifizierung für parodontale Erkrankungen wurden als vierte Hauptgruppe die „Peri-implantären Erkrankungen und Zustände“. Hierbei werden alle Zustände von Gesundheit bis zu einer Erkrankung des das Implantat umgebenden Gewebes zusammengefasst. Klinisch ist die periimplantäre Gesundheit durch das Fehlen visueller Entzündungszeichen und BAS gekennzeichnet. Bei den Erkrankungen unterscheidet man zwischen der periimplantäre Mukositis die durch von Plaque ausgelöste BAS und visuelle Entzündungszeichen gekennzeichnet ist (Heitz-Mayfield and Salvi, 2018) und der Periimplantitis welche als ein Plaque-assoziiertes pathologischer Zustand, der im Gewebe um Zahnimplantate herum auftritt, gekennzeichnet durch eine Entzündung in der periimplantären Mukosa und einen nachfolgenden

fortschreitenden Verlust von Stützgewebe definiert wurde (Schwarz et al., 2018). Es wird davon ausgegangen, dass Periimplantäre Mukositis der Periimplantitis vorausgeht. Der Beginn einer Periimplantitis kann bereits früh nach der Implantation auftreten. Eine Periimplantitis scheint in Abwesenheit einer Behandlung in einem nichtlinearen und beschleunigenden Muster aufzutreten (Schwarz et al., 2018).

### 1.1.2 Epidemiologie

Laut der 2016 veröffentlichten 5. Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS V) nimmt die Zahl der an Parodontitis erkrankten Menschen in Deutschland ab. Jedoch ist für die Zukunft aufgrund des demographischen Wandels und der Verlagerung chronischer oraler Erkrankungen in ein höheres Lebensalter ein steigender parodontaler Behandlungsbedarf zu prognostizieren. Seit dem Jahr 2005, dem Jahr, in dem die 4. Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV) erhoben wurde, hat sich die Anzahl der jüngeren Erwachsenen (35-44-Jährige), die an einer schweren Parodontitis erkrankt sind um die Hälfte reduziert (DMS IV 17,4%, DMS V 8,2%). Ebenfalls bei den Senior:innen hat sich die Anzahl der an einer schweren Parodontitis Erkrankten deutlich reduziert. 2005 waren noch 64,1% betroffen, 2014 bei der 5. Deutschen Mundgesundheitsstudie nur noch 19,8% (Jordan and Micheelis, 2016, Hoffmann et al., 2006). Unter den jüngeren Senior:innen sind 65% an einer Parodontitis erkrankt. Davon 44,8% an einer moderaten und 19,8% an einer schweren (Jordan and Micheelis, 2016). Bei den 75- bis 100-Jährigen, also den älteren Senior:innen liegt der Anteil der an einer Parodontitis Erkrankten sogar noch deutlich höher. Es weisen 9 von 10 Patient:innen eine moderate oder schwere Parodontitis auf (Jordan and Micheelis, 2016).

Die Prognose zeigt, wie in Abbildung 2 zu sehen, dass durch den demographischen Wandel und der Parodontitis als eine altersassoziierte Erkrankung mit einem steigenden Behandlungsbedarf zu rechnen ist (Jordan and Micheelis, 2016).

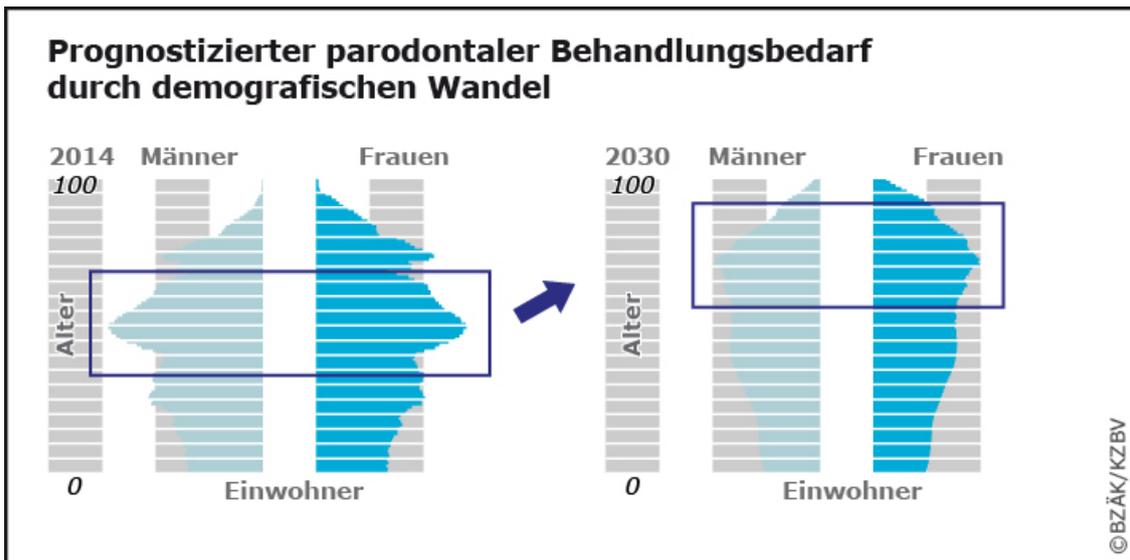


Abbildung 2: Parodontale Erkrankungen sind altersassoziiert. Moderat und schwere Parodontalerkrankungen bei 35- bis 44-Jährigen 2014: 51,6 Prozent und bei 65- bis 74- Jährigen 2014: 64,6 Prozent. Im Jahre 2030 wird der Großteil der Bevölkerung Senior:innen sein. Trotz abnehmender Prävalenzen ist mit einer Zunahme des parodontalen Behandlungsbedarfs zu rechnen (Jordan and Micheelis, 2016).

Umso wichtiger werden präventive Maßnahmen. Menschen, die regelmäßig präventive Maßnahmen treffen, sind weniger häufig und weniger schwer von parodontalen Erkrankungen betroffen (Jordan and Micheelis, 2016). Unerlässlich als präventive Maßnahme sind die konventionelle professionelle Zahnreinigung (PZR) und für parodontal erkrankte Patienten die unterstützende Parodontitistherapie (UPT).

### 1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Die Parodontitis ist eine komplexe, polymikrobielle Infektionskrankheit mit mehreren ätiologischen Faktoren. Diese meist chronisch verlaufende Schädigung des Zahnhalteapparats führt unbehandelt durch Zahnfleischtaschenbildung, Verlust des Alveolarknochens und Zahnlockerung letztendlich zum Zahnverlust. Ihre Kausalität entsteht aus Wechselwirkungen zwischen den polymikrobiellen Erregern des oralen Biofilms und den Wirtsreaktionen, die durch genetische, umweltbedingte und erworbene Risikofaktoren beeinflusst werden können (Zee, 2009). Für die Entstehung und das Fortschreiten der Parodontitis ist die qualitative und quantitative Zusammensetzung der subgingivalen Plaque (van Winkelhoff et al., 2002), sowie die individuelle Immunantwort des Wirtes (Michalowicz et al., 2000) und

Risikofaktoren wie körperlicher und psychischer Stress, eine genetische Prädisposition, hormonelle Schwankungen, Tabakabusus und Diabetes mellitus verantwortlich (Van Dyke and Sheilesh, 2005, Goyal et al., 2013, Meng et al., 2011). Bakterien besiedeln die Mundhöhle von Geburt an. Sie besiedeln die Weichteile inklusive der Gingiva, der Wangenschleimhaut, dem Gaumen, die Tonsillen und die Zunge, sowie die Zähne und die Zahnfleischtaschen (Socransky and Haffajee, 1994). Von den über 700 identifizierten Bakterienarten ist die Anzahl der Arten, die eine destruktive Parodontalerkrankung auslösen können auf einige wenige begrenzt. Die Verteilung dieser Pathogene betrifft aber gleichermaßen alle Habitate der Mundhöhle (Beikler et al., 2004, Paster et al., 2006). Zu den Hauptvertretern der parodontopathogenen Keime gehören *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), *Tannerell forsynthia* (T.f.), *Treponema denticila* (T.d.), *Prevotella intermedia* (P.i.), *Eikenella corrodens* (E.c.) und *Porphyromonas gingivalis* (P.g.) (Socransky et al., 1998, Socransky and Haffajee, 1994, van Winkelhoff et al., 2002). Da bei 20-40% der parodontal gesunden Menschen auch die mit einer Parodontitis assoziierten Keime nachgewiesen werden können, bedeutet die reine Anwesenheit der parodontopathogenen Keime nicht zwangsläufig die Entstehung einer Parodontitis, sie gelten aber als Risikofaktoren dafür (Ximenez-Fyvie et al., 2000, Feng and Weinberg, 2006).

Bei der Parodontitis handelt es sich um eine opportunistische Infektion. So kommt es erst bei bestimmten Dispositionen wie den bereits erwähnten Risikofaktoren zu einer Vermehrung der parodontopathogenen Bakterien und somit zu einer Infektion (Wolf et al., 2004). Das destruktive Potential der Bakterien ist abhängig von der vorliegenden Menge und den Virulenzfaktoren der Keime. Dabei handelt es sich zum Beispiel um Toxine, Enzyme oder die Fähigkeit zur Invasion in die Wirtszelle (Wolf et al., 2004).

Das Saumepithel stellt aufgrund seiner strukturellen und funktionellen Einzigartigkeit eine sehr wirksame Sperre gegen Parodontalpathogene und ihre Virulenzfaktoren dar. Es synthetisiert eine Vielzahl von Molekülen, die zum einen direkt an der Bekämpfung von Bakterien und deren Produkten beteiligt sind und zum anderen die Wanderung polymorphkerniger Leukozyten in Richtung des Gingivasulkus vermitteln. Parodontale Pathogene, insbesondere *P.g.*, können jedoch das Widerstandsvermögen des Epithels beeinträchtigen und die

subgingivale Verbreitung von Bakterien und ihren Antigenen ermöglichen (Kadowaki and Yamamoto, 2003, Potempa and Travis, 1996, NM et al., 2003, Bosshardt and Lang, 2005). Die darauffolgende entzündungshemmende Reaktion führt zum Abbau des unter dem Saumepithel liegendem Bindegewebe, was zum strukturellen und funktionellen Zerfall der Gingiva führt. Eine der ersten Veränderungen der Parodontitis ist die Migration des Saumepithels entlang der Wurzeloberfläche, was zur Bildung eines langen Saumepithels und einer Gingivatasche, sowie auf Dauer zur Zerstörung des gesamten parodontalen Gewebes und somit zum Zahnverlust führt (Nanci and Bosshardt, 2006, Kinane et al., 2008).

## **1.2 Mikrobiologie**

### **1.2.1 Das orale Mikrobiom**

Das menschliche orale Mikrobiom besteht aus allen Mikroorganismen, die sich in der menschlichen Mundhöhle und den weiterführenden benachbarten Strukturen befinden, darunter Viren, Pilze, Protozoen, Archaeen und Bakterien (Wade, 2013, Mosaddad et al., 2019). Die Mundhöhle bietet viele verschiedene Lebensräume für Mikroorganismen. Dazu gehören die Zähne, der Sulkus gingivae, die Zunge, die Mundschleimhaut des planum buccale, der harte und weiche Gaumen und die Tonsillen. Weiterführende Strukturen sind der Oro- und Nasopharynx, Oesophagus, Trachea, Tuba auditivae und die Sinuse. Die im Mund gefundenen Bakteriengemeinschaften sind mit über 700 vorkommenden Spezies hoch komplex und nach dem Colon das zweit umfangreichste Mikrobiom (Dewhirst et al., 2010, Human Microbiome Project, 2012, Belibasakis, 2018, Verma et al., 2018) aber auch eins der am besten charakterisierten humanen Mikrobiome (Solbiati and Frias-Lopez, 2018). Erste Erkenntnisse über die Zusammensetzung des oralen Mikrobioms stammen aus der Mikroskopie und den Beobachtungen von Leeuwenhoek (Porter, 1976), die eine vielfältige Sammlung von Bakterienmorphotypen in Zahnplaque zeigten. Die Entwicklung bakterieller Kulturmedien ermöglicht die Charakterisierung der kultivierbaren Komponenten der Microbenflora des Mundes und es wurde eine vielfältige Ansammlung von Organismen gefunden, die obligatorisch aerob, fakultativ und obligatorisch anaerob sind, sowie ein breites Spektrum des metabolischen

Potenzials entdeckt (Wade, 2013). Bis heute kann ein erheblicher Teil des Bakterienlebens nicht im Labor kultiviert werden (Amann et al., 1995, Krishnan et al., 2017). Etwa die Hälfte der im Mund vorhandenen Bakterien ist bis jetzt kultiviert worden (Wade, 2004). Komplexe Bakteriengemeinschaften wie die orale Mikroflora wurden durch kulturunabhängige Methoden charakterisiert, welche auf der Analyse der Sequenzen von konservierten Haushaltsgenen aus Speichelproben oder oralem Biofilm basieren. Das für diesen Zweck am häufigsten verwendete Gen ist das für die 16S-rRNA kodierende Gen (Pace et al., 1986, Krishnan et al., 2017).

Die Datenbank zum humanen oralen Mikrobiom (HOMD, [www.homd.org](http://www.homd.org)) bietet einen umfassenden Bestand, der aus Beschreibungen oraler bakterieller Taxa, einem 16S-rRNA-Identifizierungswerkzeug und einem Depot an oraler bakterieller Genomsequenzen besteht (Wade, 2013). Derzeit umfasst HOMD insgesamt 770 mikrobielle Arten, basierend auf öffentlich verfügbaren Daten über die Mikroflora des Verdauungstrakts. Von allen Arten sind 70% kultivierbar und 30% gehören zu den nichtkultivierbaren Klassen der Mikroorganismen (Verma et al., 2018). 57% der kultivierbaren Mikroorganismen wurden offiziell benannt, 13% unbenannt aber kultiviert und 30% sind nur als nicht kultivierte Phylotypen bekannt (Chen et al., 2010).

Es hat sich gezeigt, dass Mikroorganismen aus der Mundhöhle eine Reihe oraler Infektionskrankheiten verursachen können. Einschließlich Karies, Parodontitis endodontische Infektionen, Alveolitis und Tonsillitis. Es häufen sich Hinweise, die die oralen Bakterien mit einer Reihe systemischer Erkrankungen (Seymour et al., 2007) in Verbindung bringen. Darunter Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Beck and Offenbacher, 2005, Joshipura et al., 1996), Schlaganfall (Joshipura et al., 2003), Frühgeburten (Offenbacher et al., 1998, Verma et al., 2018), Diabetes (Genco et al., 2005, Verma et al., 2018) und Lungenentzündungen (Awano et al., 2008).

Obwohl Karies und Parodontitis eindeutig bakterielle Erkrankungen sind, sind sie keine Infektionskrankheiten im klassischen Sinne, da sie aus einer komplexen Wechselwirkung zwischen der jeweiligen Mikroflora, der Empfänglichkeit des Wirtes und Umweltfaktoren wie unter anderem Ernährung und Rauchen resultieren.

Die bakterielle Gemeinschaft wird von den Stämmen Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochates und Fusobacteria dominiert, diese

machen 96% der nachgewiesenen Arten aus (Dewhirst et al., 2010, Lynch and Pedersen, 2016, Siqueira et al., 2012, Shade and Handelsman, 2012, Jiang et al., 2014, Xu et al., 2014). Die Bestimmung der genauen Zusammensetzung des oralen Mikrobioms und die Bestimmung langfristiger Besiedlungen einer Art ist schwierig, da der Mund ein offenes System ist das häufig exogenen Bakterien aus der Nahrung, Wasser und Luft, sowie der normalen mikrobiellen Besiedelung anderer Säugetiere einschließlich des Menschen durch soziale Kontakte ausgesetzt ist. Die meisten nicht oralen Bakterien werden jedoch nicht routinemäßig aus der Mundhöhle isoliert. Es wird vermutet, dass exogenen Bakterien Adhäsine und Rezeptoren fehlen mit denen sie an intraoralen Oberflächen oder dortigen Bakterien aggregieren können (Wade, 2013). Es könnte auch einen Immunausschluss geben. Dafür spricht, dass Darmkoliforme selten bei gesunden Menschen, häufig aber bei immungeschwächten Personen mit geringem Speichelfluss gefunden werden (Jobbins et al., 1992, MacFarlane and Mason, 1974).

Funktionell arbeitet die Gemeinschaft des oralen Mikrobioms zusammen, z.B. bei der Ernährung. Die Substrate für das Wachstum im Mund stammen nicht aus der vom menschlichen Wirt aufgenommenen Nahrung, da diese durch die kombinierte Wirkung von Speichelfluss und Schlucken schnell entfernt wird, sondern aus Speichel und Sulkusflüssigkeit in Form von Glykoproteinen. Ein einzelnes Bakterium wäre wahrscheinlich nicht in der Lage die oralen Glykoproteine zu verstoffwechseln. Ganzheitlich können aber Bakterinkonsortien zusammenarbeiten, um komplexe Substrate zum Nutzen der Gemeinschaft abzubauen (Wickstrom et al., 2009, Darrene and Cecile, 2016). So wurde zum Beispiel gezeigt, dass bestimmte Streptokokken sowohl glykosidische Aktivität als auch Endopeptidaseaktivität aufweisen und somit sowohl Oligosaccharid-Seitenketten entfernen als auch den Proteinkern von Glykoproteinen angreifen (Homer et al., 1990, Byers et al., 1999). Viele gramnegative anaerobe Bakterien wie *Prevotella* und *Porphyromonas* haben auch Endopeptidaseaktivität, was zur Spaltung von Proteinen in Peptide führt (Jie Bao et al., 2008).

Unter atmosphärischen Bedingungen arbeitet die Bakteriengemeinschaft zusammen, um sich gegenseitig zu schützen. So unterscheiden sich orale Bakterien stark in der Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff. Es gibt nur wenige

obligate Aerobier unter ihnen. Die wichtigsten sind Neisseria und Rothia, die zu den frühesten Besiedlern von Zahnoberflächen zählen (Diaz et al., 2006). Viele sind fakultative Anaerobier, wie Streptokokkus und Actinomyces. Wenn sich der orale Biofilm entwickelt, wird er schnell anaerob. Aber es hat sich gezeigt, dass das Vorhandensein des obligat aeroben Neisserias es obligatorischen Anaeroben ermöglicht, in einem gemischten Biofilm unter aeroben Bedingungen zu wachsen (Bradshaw et al., 1996). Obwohl orale Bakterien nach ihrer Funktion gruppiert werden können, muss es einen Grund für die extreme Vielfalt und Variabilität geben. Diese Vielfalt wird dem oralen Mikrobiom wohl die Fähigkeit verleihen auf Umweltänderungen flexibel zu reagieren. So werden auch Krankheiten, die mit den im Mikrobiom vorhandenen Erregern im Zusammenhang stehen, nicht durch einen einzelnen verursacht, sondern resultieren aus der Zusammenarbeit einer Gruppe von Erregern und der dadurch verursachten Dysbiose (Wade, 2013).

### 1.2.2 Porphyromonas gingivalis - Virulenzfaktoren

*Porphyromonas gingivalis* ist ein gramnegativer oraler Anaerobier, der an der Pathogenese der Parodontitis als Leitkeim beteiligt ist und ein Mitglied von mehr als 700 Bakterien, die in der Mundhöhle leben. Er ist ein erfolgreicher Kolonisator des oralen Epithels (Yilmaz, 2008). Die Störung der Epithelzellen durch Bakterien ist der erste Schritt bei der Einleitung von Entzündungs- und Immunprozessen, die letztendlich zur Zerstörung des den Zahn umgebenden und stützenden Gewebes zum Zahnverlust führen (Kinane et al., 2008). *T.f.*, *P.g.* und *T.d.* sind mit ca. 80%, 60% und 55% die am häufigsten vorkommenden Bakterien bei Patient:innen mit chronischer Parodontitis (Puig-Silla et al., 2017). Bei Gesunden wird *P.g.* seltener bzw. in geringerer Zahl nachgewiesen (Bostanci and Belibasakis, 2012). Zudem kommt *P.g.* nicht nur in parodontalen Taschen, sondern auch auf der gesamten Mundschleimhaut einschließlich der Tonsillen, der Zunge, dem Speichel und der sub- und supragingivalen Plaque vor (Beikler et al., 2004). *P.g.* verfügt über verschiedene Virulenzfaktoren. Darunter Fimbrien, LPS und Cysteineproteasen, sogenannte Gingipaine (Bostanci and Belibasakis, 2012). *P.g.* kann lokal in das Parodontalgewebe eindringen und den Wirtsabwehrmechanismen ausweichen. Dabei wird eine Reihe von Virulenzfaktoren verwendet, die eine Deregulierung des angeborenen

Immunsystems und der Entzündungsreaktion bewirken (Bostanci and Belibasakis, 2012). So bald *P.g.* sich in der Mundhöhle ansiedelt, haftet es mit Hilfe von Fimbrien an Oberflächenmolekülen und an Membranbestandteilen von Wirtszellen (Lamont and Jenkinson, 1998). Fimbrien sind ungefähr 0,3 bis 3,0 µm lange und 5 nm breite Ausstülpungen der Zellwand, die bei fast allen Stämmen von *P.g.* vorkommen (Lamont and Jenkinson, 1998). Sie adhären über Adhäsion-Proteine an Speichelmolekülen, extrazellulären Matrixproteinen, Epithelzellen und frühen Plaquepionieren wie oralen Streptokokken (*S. gordonii*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis* und *S. cristatus*) oder an später besiedelnden Spezies (*T. forsythensis*, *T. denticola* und *F. nucleatum*) (Lamont and Jenkinson, 1998). Neben der Adhärenzvermittlung haben Fimbrien eine Vielzahl anderer Eigenschaften, z.B. chemotaktische und Cytokininduktion, die auch an der Pathogenität von *P.g.* beteiligt sind. Fimbrien sind in der Lage, Speichelenzyme, extrazelluläre Matrixproteine und Bakterien zu binden sowie stark an  $\alpha 5\beta$ -Integrin zu haften (Amano, 2007). Nach der Adhäsion an  $\alpha 5\beta$ -Integrin wird *P.g.* durch zelluläre Pseudopodien eingefangen, die die Invasion über einen Aktin vermittelten Weg ermöglichen. Nach dem Passieren der Epithelbarriere beeinträchtigt *P.g.* die Zellfunktion (Mysak et al., 2014). Der Keim aktiviert die zelluläre Autophagozytose, um eine Nische zu schaffen und gleichzeitig die Apoptose zu unterdrücken und somit das Überleben der Wirtszelle zu fördern. Die Vakuole enthält von der Autophagozytose gelieferte Wirtsproteine, die von dem Erreger für seinen asaccharolytischen Stoffwechsel genutzt und zur Replikation innerhalb der Wirtszelle verwendet wird. Wenn die Autophagozytose unterdrückt wird, wird internalisiertes *P.g.* durch das Phagolysosom zerstört und abgebaut. Somit hängt das Überleben von *P.g.* von der Aktivierung der Autophagozytose und dem Überleben der endothelialen Wirtszelle ab (Belanger et al., 2006).

Hämagglutinine sind weitere wichtige Adhäsions- und Pathogenitätsfaktoren. *P.g.* produziert mindestens fünf hämagglutinierende Moleküle. Durch die Adhäsion an Erythrozyten verursachen sie eine Hämagglutination d.h. eine Verklumpung von Erythrozyten welche der Beschaffung des für *P.g.* essentiellen Häms dient (Okuda et al., 1986). Hämin ist nicht nur für das Wachstum von entscheidender Bedeutung, sondern reguliert auch verschiedene mit Virulenz in Verbindung stehende Aktivitäten von *P.g.* Die vermehrte Blutung bei vorliegender

Gingivitis oder Parodontitis hat eine erhöhte Eisenkonzentration zur Folge und somit einen positiven Einfluss für *P.g.* (Lewis, 2010). Außerdem kann durch Membran gebundenes Hämin Sauerstoff binden und die Aufrechterhaltung einer anaeroben Umgebung unterstützen (Smalley et al., 1998).

*P.g.* ist ein asaccharolytischer Organismus, d.h. dass er keinen Zucker verwerten kann. Er ist energetisch von stickstoffhaltigen Substraten abhängig. Peptide können zum Beispiel effizient für das Wachstum genutzt werden (Shah and Gharbia, 1989). Somit scheint die Wirkung von proteolytischen Enzymen, die von *P.g.* produziert werden, zusammen mit anderen bakteriell und vom Wirt abgeleitete Proteasen im proteinreichen subgingivalen Milieu entscheidend für die Nährstoffgewinnung für *P.g.* zu sein.

*P.g.* produziert Virulenzfaktoren, die als Gingipain bekannt sind. Dabei handelt es sich um Cysteinproteasen, bestehend aus Lysin-Gingipain, Arginin-Gingipain A und Arginin-Gingipain B. Gingipains werden sezerniert, zu den äußeren bakteriellen Membranoberflächen transportiert und teilweise in das extrazelluläre Milieu in löslicher und mit äußeren Membranvesikeln assoziierter Form freigesetzt (Guo et al., 2010, Grenier et al., 2003, Gui et al., 2016). Lysin-Gingipain und Arginin-Gingipain sind essentiell für das Überleben und die Pathogenität von *P.g.* und spielen eine entscheidende Rolle bei der Kolonisierung des Wirts, der Inaktivierung der Wirtsabwehr, der Eisen- und Nährstoffaufnahme und der Gewebeerstörung (Guo et al., 2010, Grenier et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass Gingipains die Toxizität von *P.g.* in Endothelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen vermitteln (Stathopoulou et al., 2009, Sheets et al., 2005, Kinane et al., 2012). Die Gingipaine von *P.g.* können die Zusammensetzung polymikrobieller Biofilme qualitativ und quantitativ beeinflussen (Bao et al., 2014).

Zu weiteren Virulenzfaktoren des *P.g.* gehören die Lipopolysaccharide (LPS). LPS sind bakterielle Endotoxine und Bestandteile der äußeren Membran der Zellwand von gramnegativen Bakterien (Wolf et al., 2004). Durch die LPS wird die bakterielle Membran relativ undurchlässig (z.B. für Antibiotika). Bei dem in der äußeren Membran verankerten LPS-Anteil handelt es sich um das Lipid A. Es besteht aus bis zu sechs variablen Fettsäuren, Diglukosamin und Phosphat. Lipid A ist hauptsächlich für die Toxizität und die Aktivierung der Immunreaktion über Stimulierung von Makrophagen und die daraus resultierende Produktion von

Mediatoren z.B Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und IL-6, Prostaglandine, Sauerstoffradikale und bioaktive Lipide verantwortlich (Wolf et al., 2004). Die LPS von *P.g.* induzieren größere Mengen an Zytokinen als andere Parodontitis assoziierte Keime. Neben den Makrophagen stimulieren Lipopolysaccharide auch Endothelzellen und Fibroblasten zur vermehrten MMP-Synthese (Wolf et al., 2004). Matrixmetalloproteinasen (MMP) sind zinkabhängige proteolytische Enzyme, die die Spaltung von Peptidbindungen katalysieren und somit an dem Abbau von extrazellulärer Matrix des Bindegewebes beteiligt sind.

Mehrere Mitglieder der MMP-Familie sind an der Zerstörung parodontaler Gewebe beteiligt. Dazu gehören MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 und MMP-13 (Zhou and Windsor, 2006). Durch *P.g.* wird die Freisetzung von MMP-1, MMP-3, MMP-14 gefördert (Pattamapun et al., 2003, DeCarlo et al., 1998) und der Gegenspieler von MMPs (TIMPs) inhibiert. Die Folge ist ein gesteigerter Kollagenabbau und somit die Gewebeerstörung.

Alle Virulenz Faktoren im Zusammenspiel steigern das pathogene Potential von *P.g.* und fördern durch vermehrte Entzündungen, erhöhte Blutung, Ödembildung und Knochenabbau die parodontale Zerstörung.

### **1.3 Therapie**

Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats, die vorwiegend bakteriell verursacht wird und Infolge dessen ist die antiinfektiöse Therapie der aktuelle Goldstandard zur Behandlung von Parodontopathien. Das Ziel der Parodontitistherapie ist die Herstellung einer klinischen Stabilität und die Progression der Erkrankung zu stoppen bzw. zu verlangsamen.

Die konventionelle Parodontaltherapie wird in zwei Phasen eingeteilt. In der ersten Phase, der Initialtherapie, findet zunächst die ausführliche Erhebung der Anamnese und des Befundes statt. Relevant sind vor allem Fragestellungen wie: Sind parodontale Erkrankungen in der Familie bekannt? Leidet der/die Patient:in unter Stoffwechselerkrankungen/Diabetes mellitus, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Infektionserkrankungen? Welche Medikamente werden regelmäßig eingenommen? Auch wenn die Parodontitis eine auf das Parodont lokal begrenzte Entzündung ist, so besteht ein Zusammenhang zwischen der Parodontitis und anderen systemischen Erkrankungen wie dem Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen (Jepsen et al., 2011).

Am Anfang der Initialphase steht sowohl die Motivation, Instruktion und Kontrolle der Mundhygiene als auch die Herstellung der Hygienefähigkeit. Die Patient:innen sind nur in der Lage eine gute Mundhygiene aufrechtzuerhalten, wenn die Voraussetzungen dafür geschaffen sind und sie die richtige Instruktion bekommen haben. Insbesondere sollten Plaqueretentionsstellen wie z.B. insuffiziente Füllungs- und Kronenränder eliminiert werden und eine professionelle Zahnreinigung durchgeführt werden. Je nach Schweregrad und der Parodontitis kann eine mikrobiologische Diagnostik zusätzlich sinnvoll sein. Nach dem alle Voraussetzungen für eine suffiziente Therapie geschaffen sind, kann die konventionelle Parodontalbehandlung, ein profundes subgingivales Debridement, wobei Plaque und Zahnstein mechanisch entfernt werden, durchgeführt werden. Hierfür finden üblicherweise Küretten, Schallgeräte und Luft-Pulver- Wasserstrahlgeräte Anwendung. Ziel ist es die akute Entzündung zu bekämpfen und die Progression der Parodontitis einzudämmen. Unterstützend können hierbei antiseptisch und antimikrobielle Pharmaka eingesetzt werden (Page, 2004, Beikler et al., 2003). Sofern sich nach einer gründlichen Reevaluation des Befundes ein chirurgisches Vorgehen als sinnvoll und notwendig erweist, kann die Parodontalchirurgie noch als korrektive Maßnahme durchgeführt werden. Hierbei ist sehr wichtig, dass der/die Patient:in motiviert ist und in der Lage ist eine adäquate Mundhygiene aufrecht zu erhalten. Alle vorherigen Maßnahmen der Initialphase müssen einem chirurgischen Vorgehen unbedingt vorangehen, da nach umfangreichen Vorbehandlungen meist schon eine zufriedenstellende und stabile Situation für den/die Patient:in geschaffen werden kann und man so unnötige chirurgische Eingriffe verhindert. Ziel der Parodontalchirurgie ist die Entfernung von tiefen Parodontaltaschen und die Herstellung physiologischer Knochenarchitektur, die durch die konservative Therapie nicht erreicht wurde. Eine Indikation für die chirurgische Parodontitistherapie sind Taschentiefen von  $\geq 6\text{mm}$ , intraossäre Defekte und Fukationsbeteiligungen.

Einer abgeschlossenen Initialtherapie folgt die unterstützende Parodontitistherapie. Langzeiterfolge in der Parodontitistherapie sind abhängig von der Compliance des Patienten und einer überwachten und regelmäßigen Nachsorge, um die parodontopathogenen Keime möglichst zu supprimieren (Costa et al., 2014, Trombelli et al., 2015). Das Recallintervall muss individuell

nach dem 2018 entwickeltem Grading bestimmt werden. Zu den individuellen bestimmten Abständen sollte dann ein regelmäßiger Recall mit supra- und subgingivaler Reinigung und Überprüfung des parodontalen Status erfolgen, um die Progression der Erkrankung und den drohenden Zahnverlust aufzuhalten.

### 1.3.1 Luft-Pulver-Wasserstrahlgerät

Der erste Einsatz des Luft-Pulver-Wasserstrahlgerätes erfolgte 1945 durch Dr. Black zur Präparation von Kavitäten (Chinelatti et al., 2007). Damals wurden Aluminiumoxidpartikel mit einer Größe von 5-50 µm verwendet. Durch die Größe und Beschaffenheit waren sie sehr abrasiv und für die Abtragung von Zahnhartsubstanz gut geeignet. Diese Technik zur Präparation war in den 1950er und 60er Jahren als „kinetic cavity preparation“ bekannt und bei den Patient:innen sehr beliebt, da es häufig ohne Anästhesie durchgeführt werden konnte (Epstein, 1951, Morrison and Berman, 1953). Der massige Pulverausstoß in die Mundhöhle erwies sich jedoch als nachteilig für die Lungen und Augen der Patient:innen und der Behandler:innen. Die Einführung von high-speed Winkelstücken Ende der 1950er Jahre verdrängte die Technik wieder (Freedman, 1994, Goldstein and Parkins, 1994, Moritz et al., 1996).

In den 1980er und 90er Jahren entwickelte sich wieder ein größeres Interesse für die Luft-Pulver-Wasserstrahlgeräte und die Hersteller:innen brachten verschiedene Modelle mit einem breiten Spektrum von Funktionen auf den Markt (Berry et al., 1999).

Seit dieser Zeit wird Natriumbicarbonat in Luftpulverwasserstrahlgeräten eingesetzt. Natriumbicarbonat galt als ideales Schleifmittel für die intraorale Anwendung, da es ungiftig und wasserlöslich ist (Petersilka, 2011). Mit der mittleren Teilchengröße von 250 µm erwies sich Natriumbicarbonat als sicher und effizient für das Entfernen von supragingivaler Plaque und Verfärbungen auf intakten Schmelzoberflächen (Berkstein et al., 1987, Horning et al., 1987, Kontturi-Narhi et al., 1990, Weeks et al., 1984, Barnes et al., 1990). Es konnten keine signifikanten Oberflächenveränderungen oder Substanzverluste nachgewiesen werden (Mahlendorff, 1989).

Im Vergleich zu Handinstrumenten oder rotierenden Gummikelchen mit Polierpaste, die zum Entfernen von Biofilm und Verfärbungen verwendet werden, ist das Bearbeiten mit Natriumbicarbonat um ein Drittel weniger zeitaufwändig

(Berkstein et al., 1987, Weeks et al., 1984). Auf demineralisierten Schmelzoberflächen sollte Natriumbicarbonat mit Vorsicht eingesetzt werden. Es wurde beobachtet, dass es dort zu Erosion der Schmelzprismen führen kann (Kontturi-Narhi et al., 1990) und bei weicheren Zahnschmelzen wie Dentin oder Wurzelzement es sogar zu erheblichem Substanzverlust kommen kann und deshalb auf diesen Oberflächen nicht verwendet werden soll (Petersilka, 2011). Auch auf Füllmaterialien wie Amalgam, Gold, Kunststoff und auf Glasionomer- und Zinkphosphatzementen kann es zu Erosions- oder Mattierungseffekten kommen (Barnes et al., 1990, Cooley et al., 1986, Jost-Brinkmann, 1998, Lubow and Cooley, 1986). Daher sollte die Verwendung von Natriumbicarbonat auf Füllmaterialien nach Möglichkeit vermieden werden. Einige Autor:innen empfehlen, die Restaurationen mit Gummikelchen und Polierpaste nach zu polieren (Arabaci et al., 2007). Bei keramischen Restaurationen scheinen jedoch Oberflächenveränderungen nach der Bearbeitung mit Natriumbicarbonat weniger signifikant zu sein (Eliades et al., 1991, Liebenberg and Crawford, 1997, Lubow and Cooley, 1986).

Während des supragingivalen Debridements treffen Teile des Strahlstroms unvermeidlich die den Zahn umgebenden Weichgewebe. Es hat sich gezeigt, dass die Exposition von Natriumbicarbonat auf die Gingiva schwere Verletzungen des Epithels mit Exposition des Bindegewebes verursachen kann (Hunter et al., 1989, Kontturi-Narhi et al., 1989, Kozlovsky et al., 2005, Newman et al., 1985, Petersilka et al., 2008, Weeks et al., 1984). Obwohl diese Läsionen reversibel sind und oft komplikationslos abheilen, sollte die Anwendung von Natriumbicarbonat auf der Gingiva vermieden werden, um bleibende Schäden wie Rezessionen zu verhindern (Petersilka, 2011).

Heutzutage findet das Luft-Pulver-Wasserstrahlgerät vor allem bei der professionellen Zahnreinigung und seit dem Jahre 2003 mit der Einführung des Glycin-Pulvers auch in subgingivalen Bereichen während der Parodontitistherapie Anwendung (Flemmig et al., 2007).

Glycin ist eine nicht essentielle Aminosäure und ein wichtiger Bestandteil der meisten Polypeptide. Die Substanz ist geruchlos, farblos und sehr wasserlöslich. Da Glycin eine sehr geringe Toxizität aufweist und bei einem leichten, süßen Geschmack nicht allergisch ist, wird es auch als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie verwendet. Glycin wird auch eine antiinflammatorische,

immunmodulierende und zytoprotektive Wirkung zugesprochen (Petersilka, 2011). Die Substanz weist eine Korngröße von durchschnittlich 45 µm und einer maximalen Größe von 60 µm auf. Somit ist die Teilchengröße des Glycin-Pulvers ungefähr viermal kleiner als die des Natriumbicarbonat-Pulvers und auch weniger abrasiv (Petersilka, 2011).

Im Vergleich zum konventionellen Debridement liegt bei der subgingivalen Anwendung von Glycin-Pulver mit dem Luftpulverwasserstrahlgerät unmittelbar nach dem Debridement und auch 10 Tage später eine signifikant niedrigere Gesamtkeimbelastung in mittleren bis tiefen Parodontaltaschen vor. *P.g.* war sogar noch 90 Tage nach der Behandlung signifikant reduziert (Flemmig et al., 2012). Glycin-Pulver ist bei der Entfernung von Zahnbelag sehr wirksam und weist eine geringe Abrasivität gegenüber Wurzelzement und Dentin auf (Petersilka et al., 2003a). Auch Füllungsmaterialien wurden durch die Bearbeitung mit Glycin-Pulver gar nicht oder nur gering verändert (Frankenberger et al., 2007, Pelka et al., 2010).

Glycin-Pulver kann auch zum Entfernen von Biofilm und zur Vorbeugung oder Behandlung von Periimplantatinfektionen verwendet werden. Es stehen In-vitro-Studien zur Verfügung, aus denen hervorgeht, dass das wenig abrasive Glycin-Pulver keine bedeutsamen Veränderungen an der Implantatoberfläche oder deren Beschichtung verursacht, während der Biofilm effektiv entfernt wird (Schwarz et al., 2009).

#### **1.4 Fragestellung und Zielsetzung**

In dieser Studie soll die Entwicklung des oralen Mikrobioms anhand von genommenen Abstrichen der Zunge, Wange und Tonsillen sowie supragingivaler Plaqueproben der Zähne nach der Reinigung mittels supragingivalen Debridements und des Luft- Pulver- Wasserstrahl- Gerätes, sowie dem Abstrahlen aller Bereiche der Mundhöhle in Abhängigkeit vom Vorhandensein des parodontalepathogenen Leitkeims *Porphyromonas gingivalis* untersucht werden.

Hypothesen:

1. In Abhängigkeit des Leitkeims *P.g.* liegt beim Gesunden eine andere Zusammensetzung des oralen Mikrobioms vor als ohne den Nachweis von *P.g.*.

2. Mit dem Nachweis von *P.g.* und nach einem supragingivalen Debridement inklusive der Bearbeitung aller oralen Habitate mittels des LPWs entwickelt sich das orale Mikrobiom beim Gesunden anders als ohne den Nachweis von *P.g.*.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Studiendesign**

Dieser Studie ist eine kontrollierte, prospektive klinische Interventionsstudie. Es handelt sich um ein Nachfolgeprojekt der Pulverstahlstudie (Studiennummer 3519, Ethikvotum vom 05.04.2011 der Heinrich-Heine-Universität). Hier wurde gezeigt, dass bei parodontal und systemisch Gesunden ein supragingivales Debridement und zusätzliche Bearbeitung der Mundschleimhaut mittels niedrigabrasiven Pulverstrahlgerätes, zu einer signifikanten Reduktion des sogenannten roten Komplexes über den Untersuchungszeitraum Baseline bis 9 Tage nach Therapie führt. Da die Keime des roten Komplexes *P.g.*, *T.f.*, *T.d.* maßgeblich an der Entstehung einer Parodontitis beteiligt sind, scheint es sinnvoll, die genaue Entwicklung der oralen Flora intensiver zu betrachten und mittels Mikrobiomsequenzierung insbesondere in Abhängigkeit des Leitkeims *P.g.* zu untersuchen. Die klinische Untersuchung und Behandlung erfolgte an dem Universitätsklinikum der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf. In die Studie wurden parodontal und systemisch gesunde Patient:innen mit dem gesicherten Nachweis (Testgruppe) oder Ausschluss (Kontrollgruppe) von *P.g.* (Screening) aufgenommen. Bei den Proband:innen wurde eine konventionelle zahnmedizinische Prophylaxemaßnahme, bestehend aus supragingivalem Debridement mittels Schallscaler, Handscaler, Zahnseide sowie einer Politur der Zähne und die zusätzliche Bearbeitung der Mundschleimhäute mittels niedrigabrasivem Pulverstrahls durchgeführt. Zur Feststellung der Keime, wurden bei den Proband:innen vor der Therapie (Baseline = BL), 12-16 Tage (V1) und 8 Wochen (V2) nach der Therapie intraorale Proben bestehend aus supragingivalen Zahnplaque und Schleimhautabstrich von Wange, Zunge, Gaumen und Rachen genommen.

## 2.2 Ethikantrag

Der Antrag zur Durchführung dieser klinischen Interventionsstudie wurde mit der Studiennummer 5869R am 06.04.2017 von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität als Nachfolgeantrag der Pulverstahlstudie mit der Studiennummer 3519 genehmigt.

## 2.3 Proband:innen

In die Studie eingeschlossen wurden 41 parodontal und systemisch gesunde Proband:innen. 21 Proband:innen bei denen *P.g.* mit spezifischer PCR nachgewiesen wurde, sind der Testgruppe zugeordnet worden und 20 Proband:innen bei denen *P.g.* nicht nachgewiesen wurde sind der Kontrollgruppe zugeordnet worden. In der ersten Sitzung wurden die Interessent:innen mit Hilfe des Aufklärungsbogens über den Ablauf der Studie sowie Ein- und Ausschlusskriterien und Risiken aufgeklärt. Die Anamnese wurde mit Hilfe eines standardisierten Anamnesebogens erhoben, auf dem auch der Tabakkonsum sowie die Antibiotika Einnahme in den letzten sechs Monaten festgehalten wurden. Nach der Klärung von offenen Fragen fand die erste Untersuchung statt. In diesem ersten Screening wurde bei den Proband:innen zur Feststellung der parodontalen Gesundheit der Parodontale Screening Index (PSI) bestimmt. Für den Nachweis von *P.g.* wurden eine intraorale Probe der supragingivalen Plaqueprobe sowie ein Schleimhautabstrich genommen und diese mittels PCR im Hauslabor auf *P.g.* untersucht. Nach der Feststellung ob *P.g.* vorliegt, folgte die Einteilung von 21 *P.g.* positiven Proband:innen in die Testgruppe und 20 *P.g.* negativen Proband:innen in die Kontrollgruppe (Tabelle 3).

Tabelle 3: Teilnehmerzahl von Test- und Kontrollgruppe

Testgruppe	Kontrollgruppe
n = 21	n = 20

### 2.3.1 Einschlusskriterien

Für die Studie wurden folgende Einschlusskriterien festgelegt:

- Parodontale und systemische Gesundheit
- Die Probanden:innen müssen älter als 18 Jahre sein
- PSI (parodontaler Screening Index)  $\leq 2$  in allen Sextanten

### 2.3.2 Ausschlusskriterien

Folgende Ausschlusskriterien wurden für die Studie festgelegt:

- Personen, die entmündigt sind oder bei denen berechtigte Zweifel an Einsichts- oder Geschäftsfähigkeit besteht
- Proband:innen mit einem PSI > 2
- Endokarditisrisiko
- Antibiotikaeinnahme bis zu 6 Monate vor der Untersuchung
- Erkrankungen die eine regelmäßige Antibiotikaeinnahme bei invasiven Maßnahmen voraussetzten
- Jede Erkrankung, bei deren Verlauf und/oder durch deren Therapie potentielle Störungen der Immunantwort zu erwarten oder zu vermuten sind
- Angeborene oder erworbene Störungen der Blutgerinnung
- Bestehende Mundschleimhauterkrankungen
- Schwangerschaft und Stillzeit
- Proband:innen unter 18 Jahren

### 2.3.3 Abbruchkriterien

Die Proband:innen nahmen an der Studie freiwillig teil und konnten die Teilnahme jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für zukünftige Behandlungen befürchten zu müssen am Universitätsklinikum Düsseldorf beenden. Das Auftreten von Nebenwirkungen wie z.B. starke Erosionen der Mundschleimhaut, Blutungen oder Emphysem Bildungen waren sofortige Abbruchkriterien. Bei keinem der Proband:innen traten jedoch Nebenwirkungen auf.

## 2.4 Studienablauf

Nach dem ersten Termin, der zur Aufklärung und zum Screening (SC) der interessierten Proband:innen diente, folgte nach der Einverständniserklärung und der festgestellten Eignung der Patient:innen mittels Parodontalem Screening Index, bei dem alle Sextanten  $\leq 2$  sein mussten, die entsprechende Zuordnung der *P.g.* positiven Proband:innen in die Testgruppe und der *P.g.* negativen

Proband:innen in die Kontrollgruppe. In der zweiten Sitzung (BL) wurden vor der Therapie die Mundhygieneindizes Approximalraum-Plaque-Index und Papillen-Blutungs-Index bestimmt und die ersten intraoralen Proben der Zahnplaque und Schleimhaut gewonnen. Danach folgte bei allen in der Studie eingeschlossenen Patient:innen die gleiche Therapie. Sie erhielten eine konventionelle zahnmedizinische Prophylaxemaßnahme, die aus einem supragingivalem Debridement mit einem Schall-Scaler (SONICflex 2003, Ansätze 61 und 62, KaVo, Biberbach/Deutschland), einer Reinigung der Interdentalräume mittels einem Handscaler (S204s, Hu-Friedy, Chicago/USA) und Zahnseide (Oral-B Essentialfloss, ungewachst, Schwalbach/Deutschland) bestand. Anschließend erfolgte das supragingivale Abstrahlen der Zähne, Mundschleimhäute, Zunge, Gaumen, Mundboden und Wangeninnenflächen mittels eines Luft-Pulver-Wasserstrahlgerätes (AIR-FLOW Master, EMS, Nyon/Schweiz). Mit diesem Gerät wurde ein für die Anwendung auf Schleimhäuten geeignetes niedrigabrasives Glycin-Pulver (AIR-FLOW subgingival Perio Powder, EMS, Nyon/Schweiz) verwendet.

Der Therapie folgten zwei Sitzungen, die erste Untersuchungssitzung 12-16 Tage (V1) und die zweite Untersuchungssitzung 8 Wochen (V2) nach Therapie. Beide Sitzungen liefen gleich ab. Als erstes wurden erneut die Mundhygieneindizes bestimmt, danach intraorale Proben der supragingivalen Zahnplaque und Mundschleimhautabstriche genommen. Der zeitliche Ablauf der Studie wird nochmals in Tabelle 4 dargestellt. Die Auswertung der bei BL, V1 und V2 gewonnen Proben erfolgte in einem Labor der Universität Hong Kong (Dr. Rory M. WATT, Applied Oral Sciences & Community Dental Care Faculty of Dentistry, University of Hong Kong) statt. Hier wurde das gesamte orale Mikrobiom sequenziert.

Tabelle 4: Zeitliche Darstellung des Studienablaufs

Screening (SC)	Baseline (BL)	V1	V2
Probenentnahme vor Studienbeginn, zur Feststellung ob <i>P.g.</i> vorhanden ist	Probenentnahme vor Therapie	Probenentnahme 12-16 Tage nach Therapie	Probenentnahme 8 Wochen nach Therapie

## 2.5 Funktionsprinzip der Luft-Pulver-Wasserstrahlgeräte

In der Pulverkammer des Luft-Pulver-Wasserstrahlgerätes befindet sich das Abrasivmedium. Durch einen Schlauch gelangt Druckluft in die Kammer und wirbelt das Pulver bei ca. 3-7 bar auf. Das Pulver gelangt dann durch ein Leitungssystem zur Handstückspitze. Wasser wird getrennt von dem Pulver zur Austrittsdüse am Handstück geleitet. Bei den meisten Luft-Pulver-Wasserstrahlgeräten sind an der Austrittsdüse zwei kreisförmige Öffnungen vorhanden. Aus der zentralen Öffnung tritt das Luft-Pulver-Gemisch aus. Diese Öffnung wird von der zweiten peripheren Öffnung umschlossen, aus der das Wasser austritt. Durch die Umhüllung des Luft-Pulver-Gemisches mit Wasser entsteht ein präziser Strahl, der zur Bearbeitung der gewünschten Zahnoberfläche genutzt werden kann. In Abbildung 3 wird das Funktionsprinzip des LPW- Gerätes schematisch dargestellt.

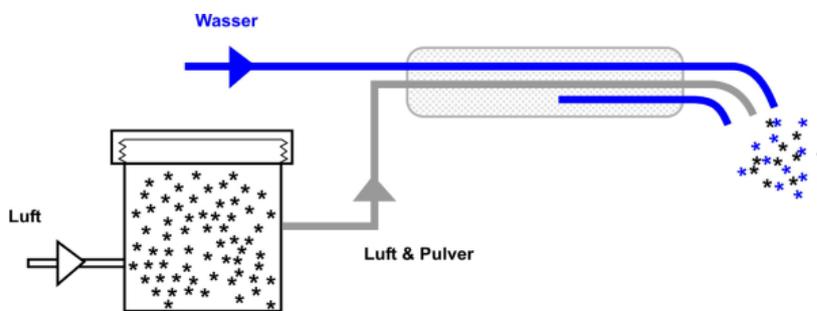


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaues eines LPW-Gerätes

Die Fähigkeit des Luft-Pulver-Wasserstrahls zur Entfernung von Biofilm und Verfärbungen ist abhängig von der Abrasivität des Gemisches. Je größer die

Pulvermenge, die Partikelgröße und der Härtegrad, desto höher die Abrasivität des Luft-Pulver-Wassergemisches (Petersilka, 2011). Auch der verwendete Luft- und Wasserdruck beeinflusst die Wirksamkeit der Biofilm Entfernung. Je höher der Druck, desto höher ist die Wirksamkeit des Luft-Pulver-Wasserstrahls (Petersilka, 2011). Auch individuelle Parameter des/der Behandler:innen beeinflussen die Abrasivität des Luft-Pulver-Wasserstrahls. Dazu gehören die Angulation des Strahls auf der Oberfläche, die Bestrahlungsdauer und der Abstand den der/die Behandler:in zwischen der Austrittsdüse und der zu bearbeitenden Zahnoberfläche einhält, je größer der Abstand, desto kleiner die Abrasivität (Petersilka et al., 2003b).

In Abbildung 4 ist das LPW- Gerät zu sehen, welches in dieser Studie verwendet wurde.



Abbildung 4: LPW- Gerät mit Abrasivmedium

## 2.6 Klinische Diagnostik

### 2.6.1 Parodontaler Screening Index

Da die parodontale Gesundheit eine Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie war, wurde der Parodontale Screening Index (PSI) in der ersten Screening Sitzung erhoben. Der PSI ist ein weitverbreiteter und anerkannter Index zur Identifizierung einer parodontalen Erkrankung und gibt einen ersten Aufschluss über den aktuellen parodontalen Zustand. Die Einteilung des PSI erfolgt wie in Tabelle 5 dargestellt von Grad 0 bis Grad 4 und wird pro Sechstant erhoben. Bei der Graduierung werden BAS, vorhanden sein von Plaque und Zahnstein, insuffiziente Füllungs- und Kronenränder sowie die Taschensondierungstiefen (TST) an sechs Stellen pro Zahn (mesiovestibulär, vestibulär, distovestibulär,

mesiooral, oral und distooral), beurteilt. Der schwerwiegendste Befund gibt die Einteilung des Grades für den ganzen Sextanten an.

Tabelle 5: PSI Einteilung

Grad 0	Grad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
TST <= 3,5 mm	TST <= 3,5 mm	TST <= 3,5mm	TST 3,5 - 5,5 mm	TST > 5,5 mm
Kein BAS	BAS	BAS	BAS möglich	BAS möglich
Keine Plaque	Keine Plaque	Plaque möglich	Plaque möglich	Plaque möglich
Kein Zahnstein	Kein Zahnstein	Zahnstein möglich	Zahnstein möglich	Zahnstein möglich
Keine defekten Restaurationsränder	Keine defekten Restaurationsränder	Defekte Restaurationsränder möglich	Defekte Restaurationsränder möglich	Defekte Restaurationsränder möglich
Keine Behandlung notwendig	Mundhygieneinstruktionen	Mundhygieneinstruktionen, Professionelle Zahnreinigung	Parodontale Behandlung	Parodontale Behandlung

Bei einer Einteilung von Grad 0 bis Grad 2 in allen Sextanten sind die Patient:innen parodontal gesund, es bedarf keiner parodontalen Therapie. Bei Grad 1 und 2 sollten jedoch Mundhygieneinstruktionen und eine professionelle Zahnreinigung durchgeführt werden. Die Proband:innen mit der Einteilung von Grad 0 bis Grad 2 konnten in die Studie einbezogen werden. Wenn ein oder mehrere Sextanten mit Grad 3 oder größer beurteilt wurden, konnten die Proband:innen nicht an der Studie teilnehmen und es musste eine parodontale Behandlung erfolgen. In diesem Fall wurden die Patient:innen über eine Behandlungsbedürftigkeit aufgeklärt und eine Empfehlung zu Vorstellung bei ihrem behandelnden Zahnarzt oder ihrer Zahnärztin ausgesprochen. Üblicherweise wird dann durch eine parodontale Vorbehandlung mit Erhebung eines parodontalen Zahnstatus, der die Taschensondierungstiefen, Rezessionen, Lockerungsgrade, Furkationsbeteiligung, Sensibilität und okklusale Dysfunktion beinhaltet, die parodontale Situation genau beurteilt und die weitere Therapie geplant.

## 2.6.2 Mundhygieneindizes

Die Mundhygieneindizes dienen der Beurteilung der Zahn- und Gingivagesundheit der Patient:innen und geben damit Auskunft über den individuellen Mundhygieniezustand. Im Rahmen der Studie wurde zum einen der API (nach Lange, 1977) bestimmt. Der API dient der Beurteilung des

Plaquebefalls in den schwer zu reinigenden Interdentalräumen der Zähne. Die Beurteilung erfolgt nach einem dichotomen Muster. Hierzu werden die Zähne mit einem Anfärbemittel benetzt und die Beurteilung visuell durchgeführt. In dieser Studie wurde das Beurteilungsverfahren modifiziert und nach der Trocknung der Zähne taktil durch Ausstreichen der Approximalräume mit einer stumpfen Sonde alternierend im I und III Quadranten bukkal, im II und IV Quadranten oral durchgeführt. Die Interdentalräume in denen Plaque vorhanden war, wurden mit einem +, die in denen keine Plaque nachzuweisen war, mit einem – gekennzeichnet. Die Angabe der mit Plaque belasteten Interdentalräume erfolgt in Prozent. Hierzu werden die belasteten Interdentalräume in Relation zu allen vorhandenen Interdentalräumen gesetzt ( $API = \frac{\text{Summe der positiv bewerteten Flächen} \times 100}{\text{Summe aller bewerteten Flächen}} = \%$ ).

Zum anderen wurde der PBI (nach Saxer und Mühlemann, 1975) erhoben. Dieser Mundhygieneindex dient zur Beurteilung des Schweregrads einer Gingivitis. Die Interdentalpapille wird nach mesial und distal mit einer stumpfen Parodontalsonde ausgestrichen und das Auftreten einer Blutung beobachtet und dem entsprechenden Grad von 0 bis 4 zugeordnet (siehe Tabelle 6). Zur Bewertung wird die Summe der erhobenen Grade durch die Zahl der bewerteten Papillen dividiert.

*Tabelle 6: PBI Einteilung*

Grad 0	Gerad 1	Grad 2	Grad 3	Grad 4
Keine Blutung	Blutungspunkt	Blutungslinie	Interdentales Dreieck von Blut ausgefüllt	Profunde Blutung

Auch dieser Index wurde alternierend im I und III Quadranten oral und im II und IV Quadranten bukkal erhoben.

Beide Hygieneparameter wurden jeweils vor der zahnmedizinischen Prophylaxe in der BL-, V1- und V2- Sitzungen erhoben.

### 2.6.3 Mikrobielle Probenentnahme

Die erste mikrobielle Probenentnahme erfolgte beim SC der Proband:innen und diente zur Feststellung, ob der Keim *P.g.* vorliegt. Hierfür wurde mit einem sterilen Watteträger ein Abstrich der Mundschleimhaut (Wange, Gaumen, Rachen, Zunge) und mit einem Scaler supragingivale Plaqueproben der Zahnzwischenräume genommen. Dieses Entnahmeverfahren macht es möglich Keime aus dem Speichel, der Epithelschicht und der Plaque zu gewinnen. Die Watteträger wurden in einem Eppendorf Safe-Lock Tube (Eppendorf Biopur farblos, Hamburg/Deutschland) kühl und luftdicht bis zur Auswertung verwahrt. Bei den in der Studie eingeschlossenen Proband:innen wurden noch drei (BL, V1, V2) weitere mikrobielle Proben entnommen. Alle Probenentnahmen erfolgten auf die gleiche Art und Weise, nur mit dem Unterschied, dass bei den BL-, V1-, V2- Proben vier Watteträger pro Entnahme benutzt wurden, um mehr Material zur Verfügung zu haben. Die Eppendorf Tubes wurden jeweils mit der Studiennummer des/der Proband:innen und der Visitnummer versehen und bei -20 °C gelagert.

## 2.7 Molekularbiologische Untersuchungen

### 2.7.1 Identifizierung der Versuchsgruppen

Die bei dem SC von der supragingivalen Plaque und den Mundschleimhautabstrichen auf den Watteträgern gesammelte DNA wurde vor den molekularbiologischen Untersuchungen aus den Proben isoliert. Danach wurde die isolierte DNA mit Hilfe der PCR (Polymerase-Kettenreaktion) mit einem spezifischen Primerpaar (Tabelle 7) auf das Bakterium *P.g.* untersucht und durch Gelelektrophorese ausgewertet. Die DNA Isolierung erfolgt in dieser Studie mit dem innuPREP DNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Jena/Deutschland) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die isolierte DNA wurde bis zum weiteren Einsatz bei – 20 °C eingelagert.

Tabelle 7: Primersequenzen

Primersequenzen	
Coll1	ACAATCCACGAGACCATC
Coll2	GATTCCCTTGCCTACATA
poly 16-F	GATACCCTGGTAGTCCACCG
poly 16S-R	GTGTACAAGGCCCGGGAACG

Zur Kontrolle des bakteriellen DNA-Gehaltes der Proben wurde parallel eine PCR mit einem universalen 16s-rRNA Primerpaar durchgeführt, während *P.g.* mit spezifischen Primern für prtC nachgewiesen wurde. Für die PCR wurde ein 25 µl Ansatz aus folgenden Standardsubstanzen zusammengesetzt (Tabelle 8). Bei jeder PCR wurde eine Positivkontrolle mit *P.g.*-DNA und eine Negativ No-Template Kontrolle mitgeführt.

Tabelle 8: PCR Substanzen

Puffer	2,5 µl	Qiagen, Hilden, Deutschland
Primer F	1,0 µl	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
Primer R	1,0 µl	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland
H2O	17,3 µl	
dNTP	1,0 µl	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Taq	0,2 µl	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNA	2,0 µl	

Diese Substanzen wurden in ein Multiply µStrip Tube (Sarstedt AG&Co., Nümbrecht/deutschland) gegeben. In einem Thermo-Cycler (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg/ Deutschland) wurde die DNA dann nach dem folgenden Protokoll in 35 Zyklen vervielfältigt (Tabelle 9).

Tabelle 9: Vervielfertigungsprotokoll

Denaturierung	95 °C	3 min	35 Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 sec	35 Zyklen
Annealing	55 °C	15 sec	35 Zyklen
Elongation	72 °C	30 sec	35 Zyklen
Ende	12 °C	1 min	

### 2.7.2 Gelelektrophorese

Zu dem 1,5% Agarose Gel in TRIS- Borat- EDTA- Puffer (TBE) wurden 12 µl Ethidiumbromidlösung hinzugegeben und das Gemisch in eine Gelkammer (Sub Cell-GT, Bio- Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gefüllt. 25 µl jedes PCR Produktes wurden mit 5 µl 6x Ladepuffer (30% Glycerin mit Bromphenolblau) versetzt und davon jeweils 12 µl in die Geltaschen pipettiert. Um die Größe des PCR Produktes in Basenpaaren zu bestimmen wurde zusätzlich 7,5 µl eines DNA-Leiter-Makers (Fast Ruler Low Range DNA-Ladder, 50-1500bp/Thermo Scientific) hinzugegeben. Gelkammer (Bio-Rad Power Pac Basic, Bio-Rad Laboratories GmbH, München/Deutschland), Ladepuffer 1,5 l 0,5 x TBE, 150V, 45 min.

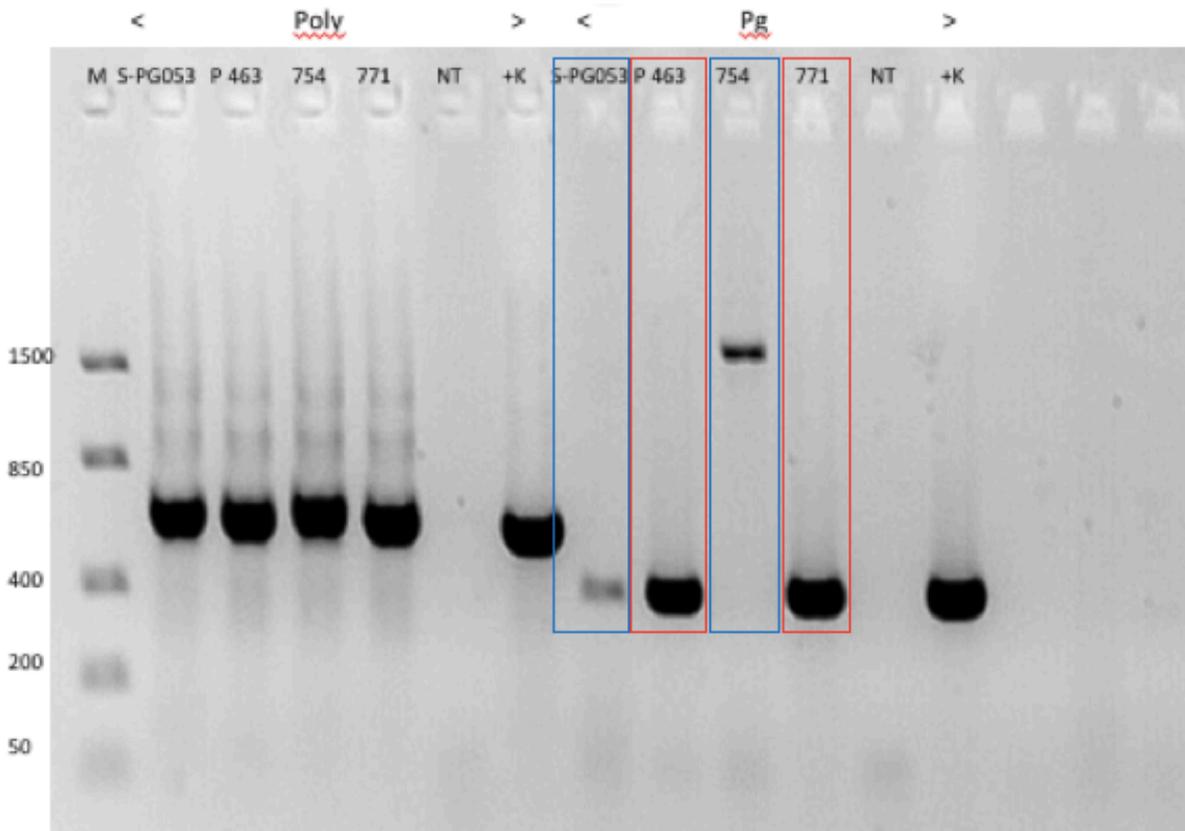


Abbildung 5: Gelelektrophorese mit *P.g.* positiven und negativen Proben.

*M* = Marker, *+K* = Positivkontrolle, *NT* = Negativkontrolle, Proben 463 und 771 mit roter Umrahmung *P.g.* positiv, Proben S-PG053 und 754 mit blauer Umrahmung *P.g.* negativ

### 2.7.3 16S Sequenzierung des oralen Mikrobioms

Die gesamte DNA wurde aus  $n=123$  Proben unter Verwendung von QIAamp DNA Mini-Kits (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Diese Proben entsprechen 41 Proband:innen zu je drei Zeitpunkten der Probenentnahme (BL, V1, V2). Die PCR-Amplifikation der hypervariablen V3-V4-Region der 16SrRNA-Gene wurde unter Verwendung der universellen bakteriellen Primerpaare 341F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') und 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') durchgeführt. Die PCR-Amplifikation und die Vorbereitung der 16S Metagenomic Sequencing Library wurden gemäß dem Standardprotokoll von Illumina (Teilenr. 15044223 Rev. B) umgesetzt. Die Paired-End-Sequenzierung wurde auf der Illumina MiSeq-Plattform (300PE) in einem Labor der Universität Hong Kong (Dr. Rory M. WATT, Applied Oral Sciences & Community Dental Care Faculty of Dentistry, University of Hong Kong), absolviert.

Die DNA-Sequenz-Reads wurden durch die DADA2-Pipeline in Amplikon-Sequenzvarianten (ASV) umgewandelt und die repräsentierten Spezies wurden jedem ASV unter Verwendung des R-Pakets dada2 zugeordnet (Callahan et al., 2016). Alle Zahlen wurden mit dem R-Paket ggplot2 (Wickham, 2009) aufgetragen, das im Softwarepaket GenePiper implementiert wurde (Tong and Chan, 2020). R ist ein frei verfügbares Softwareprogramm (<https://www.r-project.org/>).

## **2.8 Datenerfassung**

Alle für diese Studie notwendigen Patientendaten und Ergebnisse der Untersuchungen wurden EDV-technisch erfasst und verarbeitet. Die Datenschutzrichtlinien und die Schweigepflicht wurden stets beachtet. Die den Proband:innen betreffenden Daten wurden anonymisiert, in dem jedem/jeder Proband:in entsprechend der chronologischen Reihenfolge nach der Vorstellung zur SC Untersuchung eine Nummer zugeteilt wurde (z.B. S-PG001). Diese Nummer wurde mit einer Abkürzung entsprechend des jeweiligen Untersuchungszeitpunktes ergänzt (z.B. S-PG001-BL). Ergänzend zu jeder Probandennummer wurden auch, das Alter, das Geschlecht, die Anamnese und Medikation, der Raucherstatus und die Hygieneindizes, sowie die Testergebnisse aller Untersuchungen erfasst. Die Untersuchungsergebnisse und Daten wurden mit Hilfe des Programmes Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Remond, W.A., U.S.A.) in tabellarischer Form zusammengefasst.

## **2.9 statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der populationsbezogenen Daten fand mit Hilfe des Programmes IBM SPSS Statistics 21 (IBM, Armonk, N.Y., U.S.A.) unter der fachlichen Anleitung von Diplom-Psychologe Sebastian Ullrich, .05 Statistikberatung (Düsseldorf, Deutschland), statt. Mit der Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde hier die Geschlechterverteilung in den beiden Gruppen verglichen. Generell können mit dem Chi-Quadrat-Test die Häufigkeitsverteilungen zwischen zwei kategorialen Variablen miteinander verglichen werden. Auf diese Weise lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob es einen signifikanten Zusammenhang zwischen den beiden betrachteten Variablen gibt. Das wie in

diesem Fall nicht signifikante Ergebnis bedeutet eine Gleichverteilung der Geschlechter in der Test- und Kontrollgruppe.

Zur Untersuchung der Gleichverteilung des Alters und der Zahnanzahl zwischen den beiden Gruppen wurde der Mann-Whitney U Test genutzt. Mit Hilfe des Mann-Whitney U Tests kann man prüfen, ob und in welcher der beiden Gruppen signifikant höhere beziehungsweise niedrigere Werte vorhanden sind. Hinsichtlich des Alters und der Zahnanzahl zeigte sich kein signifikanter Unterschied und somit eine Gleichverteilung in beiden Gruppen.

Die Hygieneindizes API und PBI wurden mittels Friedmann- Test auf Mittelwertsunterschiede untersucht. Aufgrund eines signifikanten Ergebnisses, das zeigte, dass es zwischen den Werten Unterschiede gibt aber nicht genau zwischen welchen, folgten weitere Tests. Bei den nachfolgenden Wilcoxon Tests handelt es sich um unkorrigierte post hoc Tests zu dem zuvor durchgeführten Friedman Test. Bei dem unter Verwendung eines Bonferroni- korrigierten-  $\alpha$ - Fehler- Niveaus das Testergebnis analysiert wurde um festzustellen, welche Messungen sich genau unterscheiden. Für die Prüfung der Daten galt das  $\alpha$ - Fehler Niveau von 5 %.

Für die statistische Auswertung der sequenzierten Daten wurden multivariate Teststatistiken mit dem R-Paket GenePiper durchgeführt (Tong and Chan, 2020). Die Rarefaction-Kurven (Heck Jr et al., 1975) wurden für die Darstellung der Probertiefe mit dem R-Paket vegan erstellt (Oksanen et al., 2020). Für mikrobiologische Daten wurden Alpha-Diversitäts-Messungen mit dem Alpha-Diversitäts-Modul berechnet und mit dem Wilcoxon Test analysiert. Die relativen Häufigkeiten der zu jedem Stamm gehörenden Taxa wurden nach ihrem *P.g.* Status sowie nach dem Zeitpunkt der Probenentnahme gruppiert. Die Ergebnisse wurden mit dem R-Paket ggplot2 dargestellt (Wickham, 2011). Um die statistische Signifikanz bezüglich der Unterschiede zwischen den Mikrobiomproben der beiden Gruppen zu analysieren wurde die permutative multivariate Varianzanalyse (PERMANOVA) mit der Adonis (Legendre, 1999) Funktion im R-Paket vegan genutzt. Die Entfernungsmetrik des Mikrobioms wurde mit der nicht-metrischen multidimensionalen Skalierung (NMDS) (Minchin, 1987) basierend auf Unifrac mit dem R-Paket vegan visualisiert. Die 3D-Graphic zeigt die dreidimensionale Verteilung der Probe auf drei NMDS-Achsen mit dem

R-Package-Plot plotly. Die Analyse der Principle Response Curve (PRC) wurde unter Verwendung der Standardparameter durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Demographie

Von den 44 in die Studie inkludierten Proband:innen, wurden zwei Probandinnen aus der Studie wieder ausgeschlossen, da sie zu den nach der Baseline-Untersuchung folgenden Terminen nicht erschienen sind. Eine weitere Probandin musste ausscheiden, da sie sich nach dem SC Termin einer langandauernden oralen Antibiotikatherapie unterziehen musste. So verblieben 41 Proband:innen die in die Studie aufgenommen wurden. Davon befinden sich 20 Proband:innen in der Kontrollgruppe mit einem *P.g.* negativen Befund und 21 Proband:innen in der Test Gruppe mit einem durch PCR gesicherten Nachweis von *P.g.* aus den oral genommenen Abstrichen der Mundschleimhaut und supragingivalen Plaqueproben der Zähne (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Demographie der Test- und Kontrollgruppe (MW  $\pm$  SD)

	Testgruppe ( <i>P.g.</i> positiv)	Kontrollgruppe ( <i>P.g.</i> negativ)
N	21	20
Alter	48,05 $\pm$ 15,90	38,6 $\pm$ 14,46
Frauen	13	15
Anzahl der Zähne	26,52 $\pm$ 1,99	26,8 $\pm$ 1,63

Durch die zur Hilfenahme des Chi-Quadrat- Tests wurde die Häufigkeitsverteilung zwischen den Geschlechtern als Variable miteinander verglichen. In Tabelle 11 werden in einer Kreuztabelle die Unterschiede bezüglich der Verteilung von Frauen und Männern dargestellt. Durch den Chi-Quadrat-Test wurde ermittelt, dass sich hinsichtlich der Geschlechterverteilung kein signifikanter Unterschied zwischen der Test- und der Kontrollgruppe zeigt ( $p = 0,368$ ).

Tabelle 11: Kreuztabelle Geschlechterverteilung

			Gruppe		Total
			P.g. positiv	P.g. negativ	
Geschlecht	männlich	Anzahl	5	8	13
		% innerhalb Gruppe	25,0%	38,1%	31,7%
	weiblich	Anzahl	15	13	28
		% innerhalb Gruppe	75,0%	61,9%	68,3%
Total		Anzahl	20	21	41
		% innerhalb Gruppe	100,0%	100,0%	100,0%

Hinsichtlich des Alters als untersuchten Parameter zeigte der Mann-Whitney U Test keinen signifikanten Unterschied zwischen der Test- und Kontrollgruppe (mann-Whitney U = 146,00, z = -1,67, p = 0,095). Dies ist in Tabelle 12 und Abbildung 6 dargestellt.

Tabelle 12: Altersverteilung der Test- und Kontrollgruppe (MW  $\pm$  SD)

Alter (bis 30.3.18)								
Gruppe	N	$\bar{x}$	Median	Std. Deviation	Min.	Max.	Percentiles	
							25	75
P.g. neg.	20	40,15	37,00	12,06	27,00	66,00	31,25	51,50
P.g. pos.	21	48,05	51,00	16,30	22,00	75,00	33,00	61,00

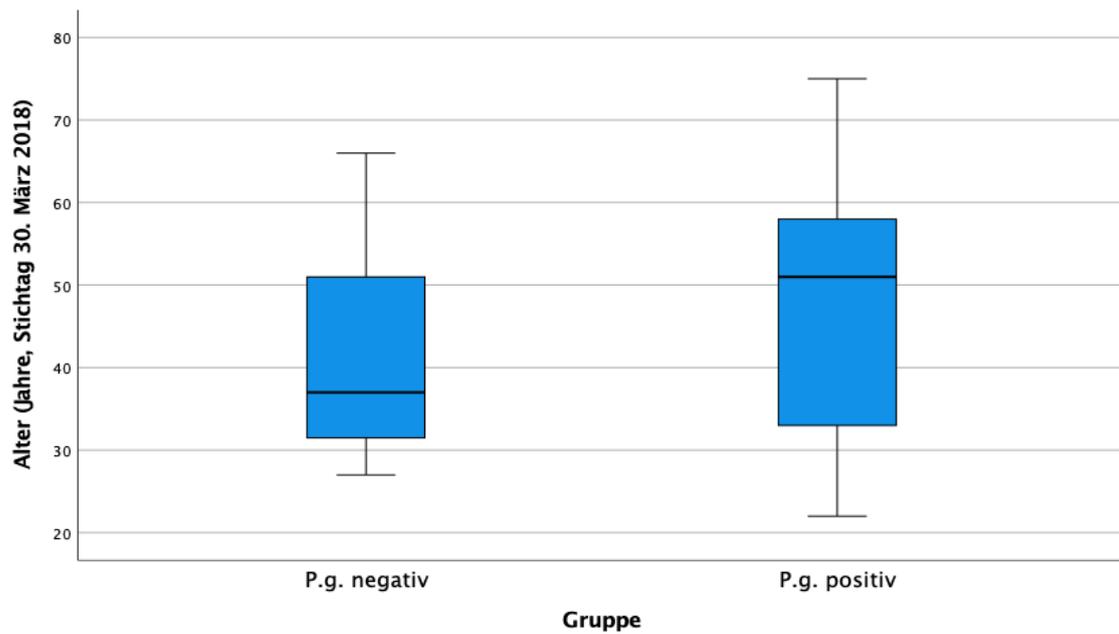


Abbildung 6: Altersverteilung der Kontroll- und Testgruppe. P.g. negative = Kontrollgruppe, P.g. positiv= Testgruppe

In Tabelle 13 und Abbildung 7 wird die Zahnanzahl als untersuchter Parameter dargestellt. Auch in diesem Fall zeigt der Mann-Whitney U-Test keinen signifikanten Unterschied bezüglich der beiden Gruppen ( $U = 198,00$ ,  $z = -0,38$ ,  $p = 0,726$ ).

Tabelle 13: Zahnanzahl der Teilnehmer von Test- und Kontrollgruppe ( $MW \pm SD$ )

Zahnanzahl								
Gruppe	N	$\bar{x}$	Median	Std. Deviation	Min.	Max.	Percentiles	
	Valid						25	75
P.g. neg.	20	26,80	28,00	1,67	23,00	28,00	26,00	28,00
P.g. pos,	21	26,52	28,00	2,04	22,00	28,00	25,00	28,00

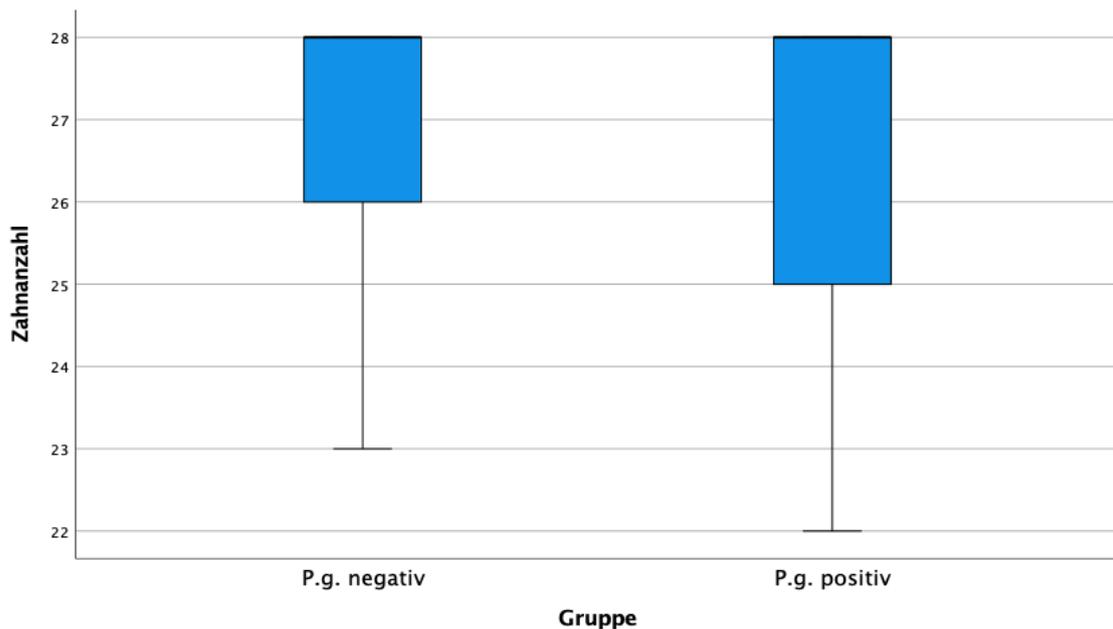


Abbildung 7: Zahnanzahl der Teilnehmer von Kontroll- und Testgruppe. P.g. negativ = Kontrollgruppe, P.g. positiv = Testgruppe.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die beiden Gruppen bezüglich der Gruppengröße, des Geschlechtes, des Alters und der Zahnanzahl gleich verteilt sind.

### 3.2 klinische Ergebnisse

Die Werte des klinischen Mundhygieneindizes API, werden in Tabelle 14 und in der Abbildung 8 in Prozent dargestellt. Wie Tabelle 12 zu entnehmen ist, lag der API bei der Kontrollgruppe initial bei  $32,05 \% \pm 17,76$  (MW  $\pm$  SD) und bei der Testgruppe initial bei  $22,05\% \pm 12,18$ . Die Werte der V1 Untersuchung zeigen einen reduzierten API. Durch einen Friedmann- Test wird deutlich, dass es in der Kontrollgruppe und in der Testgruppe einen signifikanten Unterschied in den API-Werten der drei Untersuchungszeitpunkte gibt (Kontrollgruppe: chi- quadrat = 13,03; df = 2; p = 0,001) (Testgruppe: chi-quadrat = 7,70; df = 2,00; p = 0,021). In beiden Gruppen zeigt sich durch einen Wilcoxon- Test nach Anpassung der p-Werte zur Korrektur der  $\alpha$ -Fehler-Kumulierung, dass es nur eine signifikante Reduktion der API- Werte je Gruppe gibt. Dieser liegt jeweils zwischen der Baseline und V1 Untersuchung (Kontrollgruppe: z = -3,24; p = 0,003) (Testgruppe: z = -2,79; p = 0,015). Bezüglich der Messpunkte V1 und V2 sowie V2 zu Baseline gab es in beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied.

Vergleicht man die verschiedenen Messzeitpunkte des API zwischen den Gruppen mittels eines Mann-Whitney U-Test zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied.

Tabelle 14: Approximaler Plaque-Index (API) in der Kontroll- und Testgruppe an drei Untersuchungszeitpunkten

Gruppe		N	Ø	Std. Deviation	Min.	Max.	Percentiles		
							25th	50th (Median)	75th
P.g. negativ	API Baseline (%)	20	32,05	17,76	12,00	82,00	16,00	28,50	38,75
	API V1 (%)	20	19,65	11,02	4,00	41,00	9,75	19,00	26,75
	API V2 (%)	20	25,30	13,86	0,00	58,00	18,00	23,00	35,00
P.g. positiv	API Baseline (%)	21	22,05	12,18	0,00	44,00	13,00	21,00	33,00
	API V1 (%)	21	16,33	9,97	0,00	35,00	10,00	15,00	23,00
	API V2 (%)	21	21,67	11,95	0,00	46,00	12,50	24,00	29,00

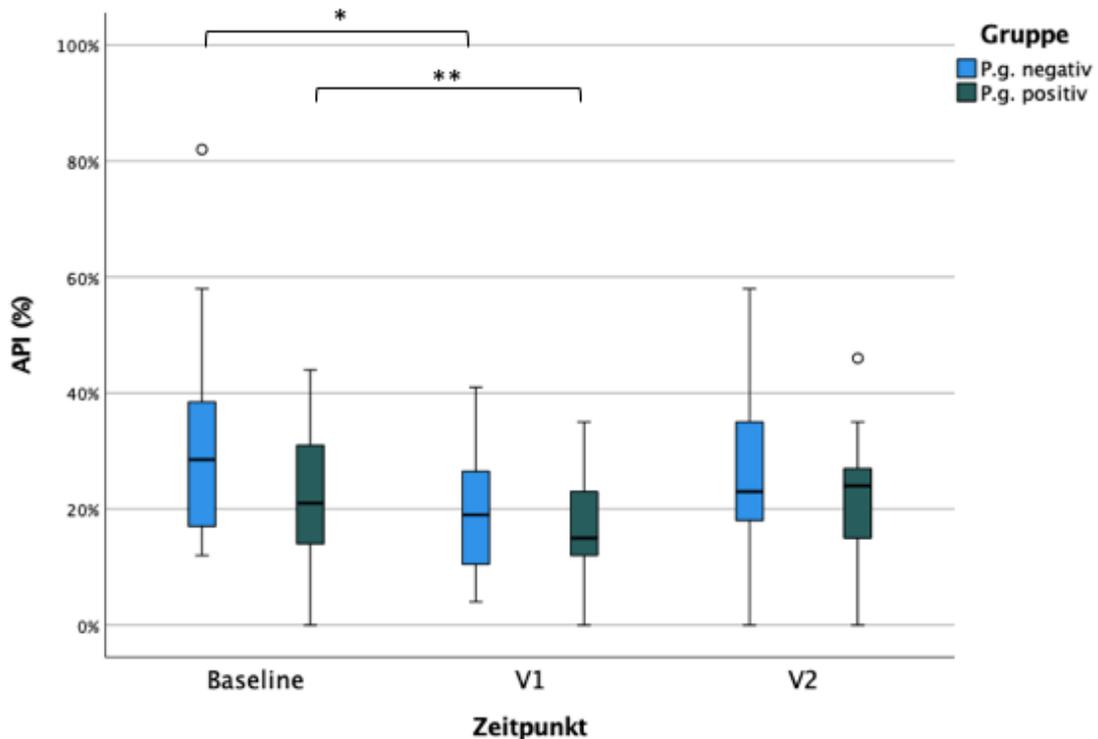


Abbildung 8: Boxplot- Diagramm mit Darstellung des API in Prozent der Kontroll- und Testgruppe an drei Untersuchungszeitpunkten. V1 = 1. Visite nach BL Untersuchung, V2 = 2. Visit nach BL Untersuchung. P.g. negativ = Kontrollgruppe, P.g. positive = Testgruppe. Signifikanter Unterschied zwischen BL und V1 der Kontrollgruppe \* $p=0,003$ , Baseline und V1 der Testgruppe \*\* $p=0,015$ .

In Tabelle 15 und Abbildung 9 sind die erhobenen Daten zu dem Papillen-Blutungs- Index dargestellt. Initial wurde der PBI bei der Baseline Untersuchung erhoben. Hier betrug der Wert in der Testgruppe  $0,19 \pm 0,19$  und in der Kontrollgruppe  $0,25 \pm 0,19$ . Bei dem nächst folgenden Untersuchungstermin V1, stellte sich in beiden Gruppen ein niedrigerer Wert des PBI dar. Acht Wochen nach der Therapie bei der V2 Untersuchung, nähert sich der Wert in beiden Gruppen jedoch dem Ausgangswert wieder an. Das wird durch den Friedman-Test dargestellt und zeigt für die Kontrollgruppe (chi- quadrat = 11,86; df = 2,00;  $p = 0,003$ ) und die Testgruppe (chi- quadrat = 14,00; df = 2,00;  $p = 0,001$ ) jeweils einen signifikanten Unterschied bezüglich der verschiedenen Untersuchungstermine. Auch bezüglich des PBI zeigte sich durch Wilcoxon-Tests nach Anpassung der p-Werte zur Korrektur der  $\alpha$ -Fehler-Kumulierung, dass es nur eine signifikante Reduktion der PBI- Werte je Gruppe gibt. In beiden Gruppen liegt der signifikante Unterschied zwischen der BL- und der V1- Untersuchung (Testgruppe:  $z = -3,13$ ,  $p = 0,006$ ) (Kontrollgruppe:  $z = -3,00$ ,  $p = 0,009$ ). Beim Vergleich der anderen Messzeitpunkte konnte bei beiden Gruppen

kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch beim Vergleich der Messzeitpunkte zwischen der Test- und Kontrollgruppe mittels des Mann-Whitney U-Test konnte kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden.

Tabelle 15: Papillen- Blutungs- Index (PBI) der Kontroll- und Testgruppe an drei Untersuchungszeitpunkten

Gruppe		N	Ø	Std. Deviation	Min.	Max.	Percentiles		
							25th	50th (Median)	75th
P.g. negativ	PBI Baseline	20	0,25	0,19	0,00	0,77	0,11	0,21	0,38
	PBI V1	20	0,14	0,12	0,00	0,38	0,05	0,11	0,24
	PBI V2	20	0,26	0,25	0,00	0,79	0,04	0,17	0,45
P.g. positiv	PBI Baseline	21	0,19	0,19	0,00	0,82	0,05	0,11	0,30
	PBI V1	21	0,08	0,07	0,00	0,21	0,00	0,07	0,15
	PBI V2	21	0,16	0,20	0,00	0,89	0,02	0,08	0,21

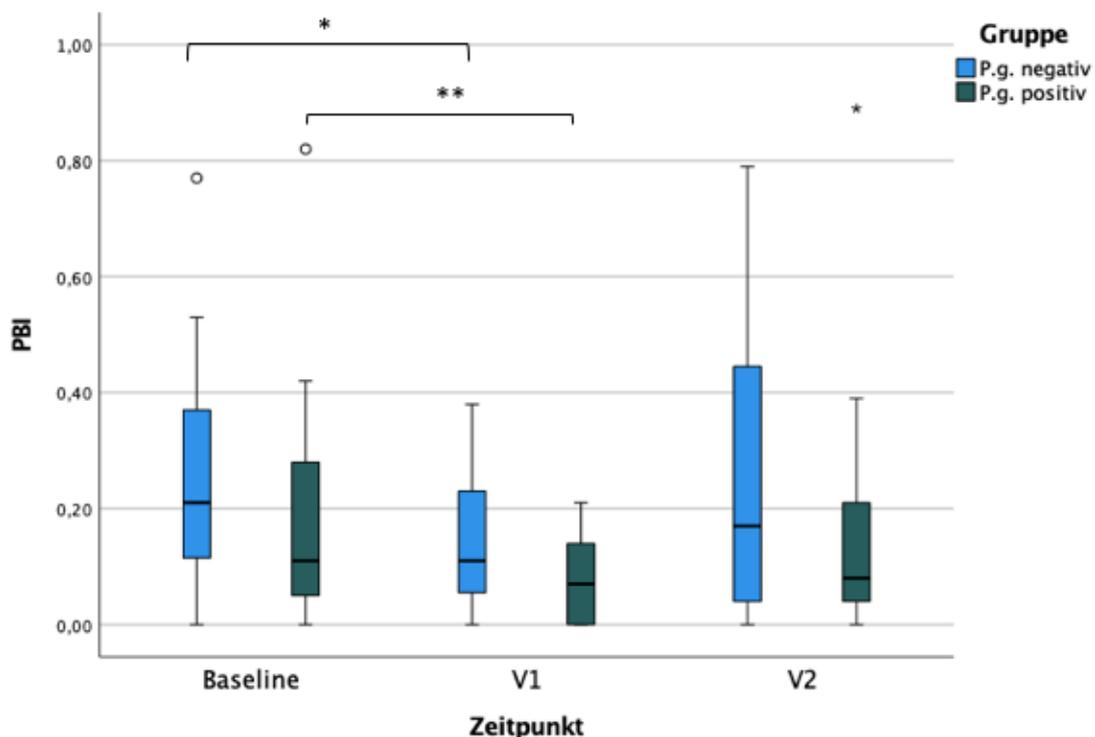


Abbildung 9: Boxplot- Diagramm mit Darstellung des PBI der Kontroll- und Testgruppe an drei Untersuchungszeitpunkten. V1 = 1. Visite nach BL Untersuchung, V2 = 2. Visit nach BL Untersuchung. P.g. negativ = Kontrollgruppe, P.g. positive = Testgruppe. Signifikanter Unterschied zwischen BL und V1 der Kontrollgruppe \* $p=0,009$ , BL und V1 der Testgruppe \*\* $p=0,006$ .

### 3.3 mikrobiologische Ergebnisse

Die hier aufgeführte Untersuchung der Ergebnisse bezieht sich auf die Analyse der Proben des oralen Mikrobioms. Der Datensatz enthält 41 Proband:innen mit den Untersuchungszeitpunkten (BL, V1, V2).

Der Artenreichtum und die Probentiefe der Proben in dieser Untersuchung werden durch die Rarefaction-Kurve dargestellt. Die Rarefaction-Kurven (Heck Jr et al., 1975) wurden mit dem R-Paket `vegan` erstellt (Oksanen et al., 2020). Für jede der Proben erreichten die Kurven ein Plateau, wenn die Probengröße > ca. 5000 war, was darauf hinweist, dass die Sequenzierungstiefe für alle Proben ausreichend ist.

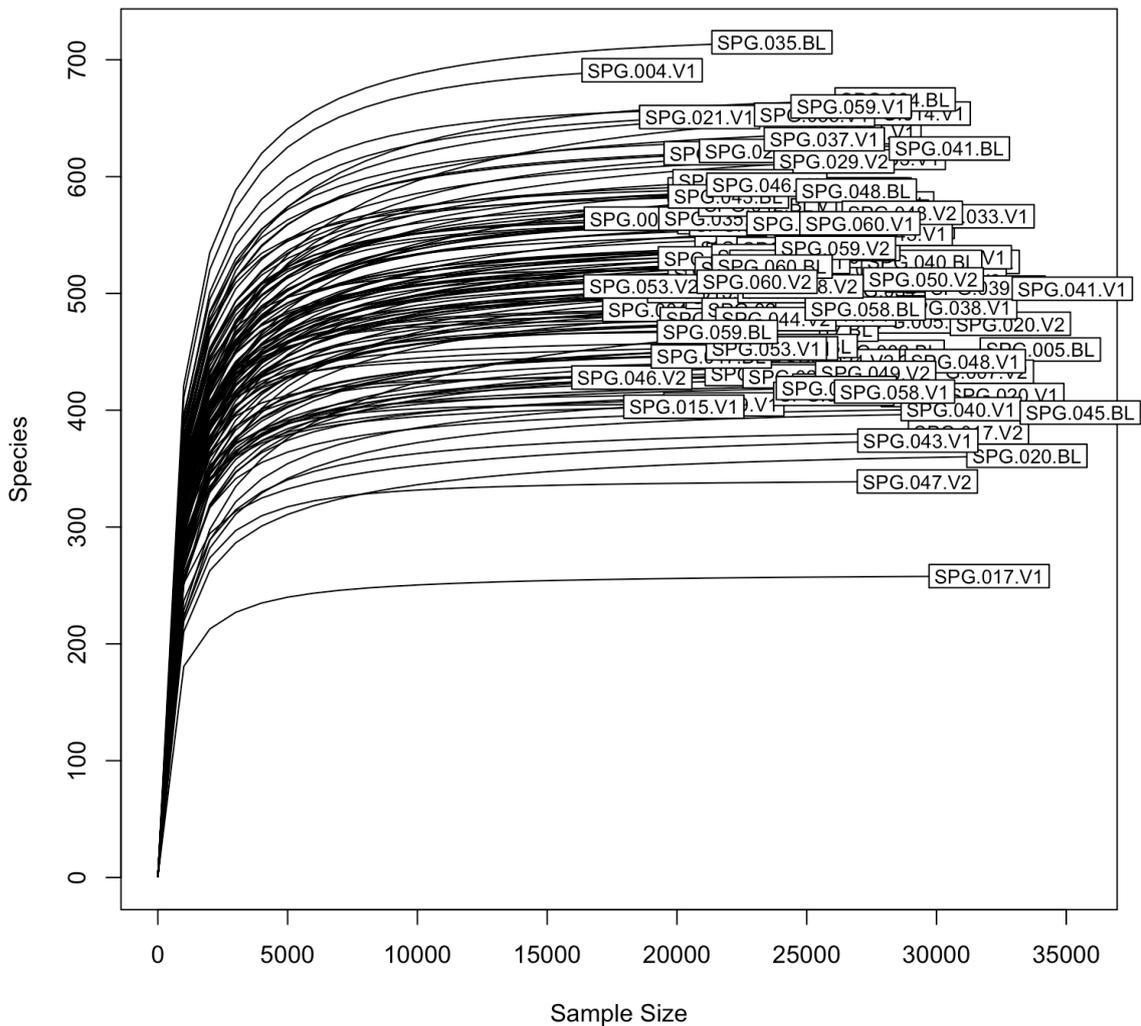


Abbildung 10: Rarefaction-Kurve. Die Kurve zeigt einen ausreichenden Probentiefe für die Profilerstellung des oralen Mikrobioms.

Die Alpha-Diversität beschreibt die Anzahl der Arten in einem Habitat. Hier handelt es sich bei dem Lebensraum um die Mundhöhle. Das Ausmaß der Alpha-Diversität innerhalb der klinischen Proben wurde mit zwei unterschiedlichen Ansätzen bewertet. Die Abbildung 11 zeigt die Bewertung der Anzahl der ASVs (amplicon sequence variants, beobachtete Anzahl der Arten; Observed) für jede Probe sowie die Bewertung anhand des Shannon-Index (Shannon). Der Shannon Index beschreibt unter Berücksichtigung der Artenzahl und der Anzahl der Individuen je Art, die Vielfalt der auszuwertenden Daten. Es wurden die Alpha-Diversitätsniveaus innerhalb der Test- und Kontrollgruppe verglichen bzw. anhand des Wilcoxon-Rank-Test abgeleitet. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Alpha-Diversitäten. Die Proben wurden auch nach Zeitpunkt gruppiert: BL, V1, V2 wie in Abbildung 12 für die *P.g.* negative Kontrollgruppe und in Abbildung 13 für die *P.g.* positive Testgruppe dargestellt. Zwischen den drei Zeitpunkten wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet.

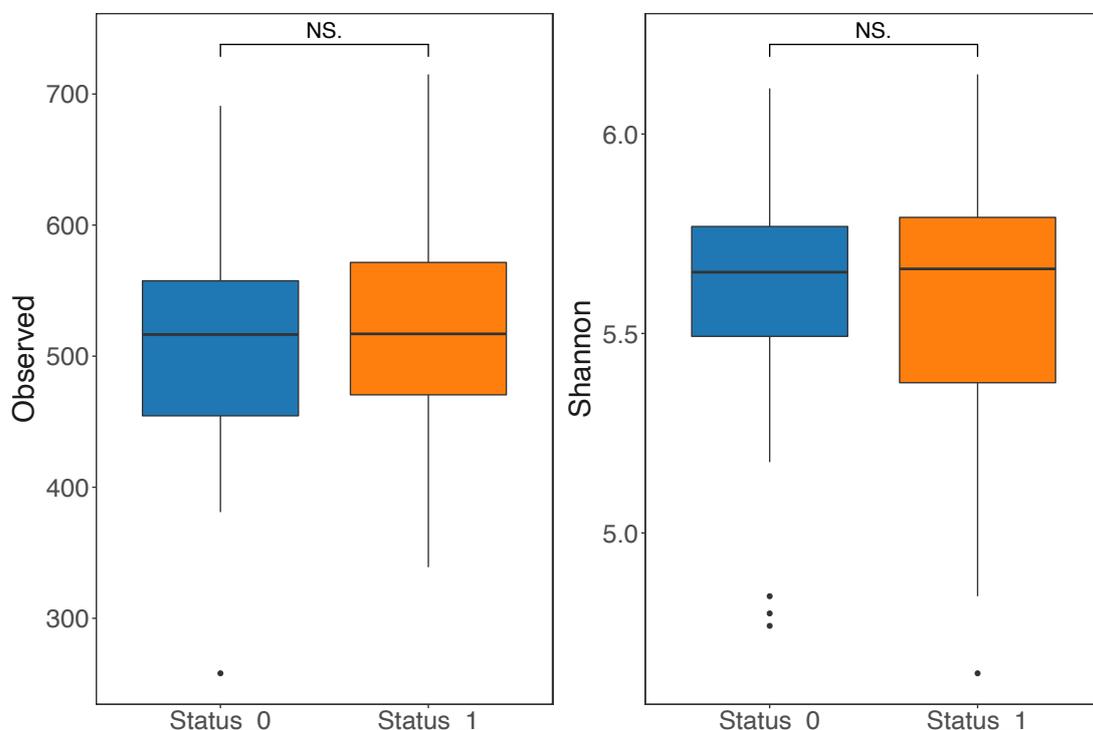


Abbildung 11: Vergleich der Alpha-Diversität der beiden Studiengruppen, gemessen beobachteten Artenreichtum (The number of ASVs, links im Bild) und dem Shannon Index (rechts im Bild); NS zeigt keinen signifikanten Unterschied an. Status\_0 = *P.g.* negative Kontrollgruppe, Status\_1 = *P.g.* positive Testgruppe.

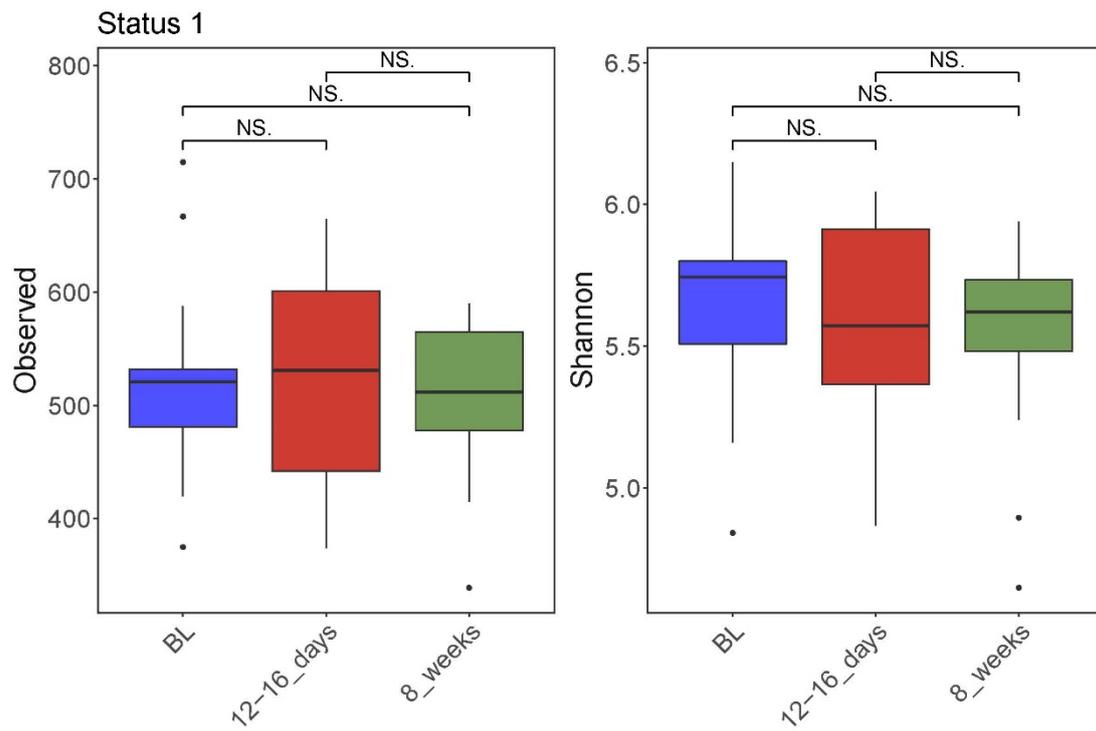


Abbildung 12: Vergleich der Alpha-Diversität an drei Versuchszeitpunkten der P.g. positiven Gruppe, gemessen an dem beobachteten Artenreichtum (The number of ASVs, links im Bild) und dem Shannon Index (rechts im Bild); NS zeigt keinen signifikanten Unterschied an. Status\_1 = P.g. positive Testgruppe, BL = Baseline Untersuchung, 12-16\_days = V1, 8\_weeks = V2t.

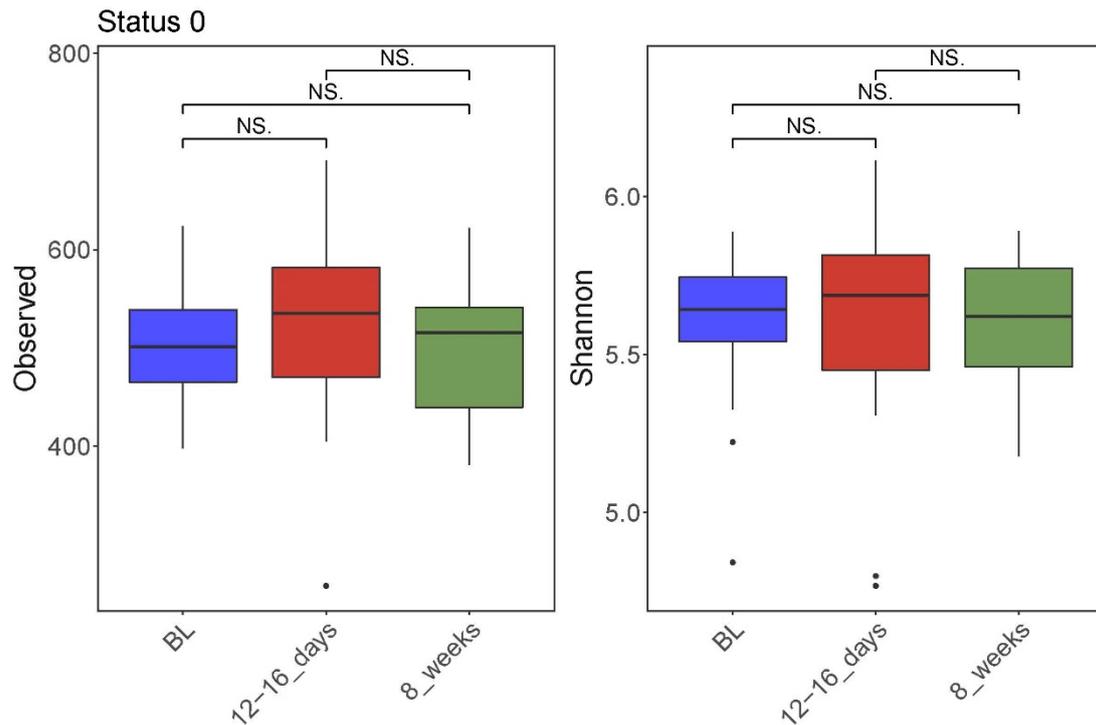


Abbildung 13: Vergleich der Alpha-Diversität an drei Versuchszeitpunkten der P.g. negativen Gruppe, gemessen an dem beobachteten Artenreichtum (The number of ASVs, links im Bild) und dem Shannon Index (rechts im Bild); NS zeigt keinen signifikanten Unterschied an. Status\_0 = P.g. negative Kontrollgruppe, BL = Baseline Untersuchung, 12-16\_days = V1t, 8\_weeks = V2.

Die Profile wurden unter Verwendung von Ordinationsverfahren weiter analysiert, wobei die Ergebnisse in nicht metrischen mehrdimensionalen Skalierungsdiagrammen (NMDS) visualisiert wurden. Die NMDS-Analyse wird häufig verwendet, um Ähnlichkeiten/Unterschiede in der jeweiligen taxonomischen Zusammensetzung verschiedener Mikrobiomproben aufzuzeigen, basierend auf der Beta-Diversität jeder Probe. Die Beta-Diversität beschreibt den Unterschied in der Artenvielfalt von Gemeinschaften. Die Unterschiede in den Proben über die drei Versuchszeitpunkte in jeder Gruppe wurden durch permutative multivariate Varianzanalyse (PERMANOVA) getestet. Bei der Unterteilung der Daten nach Untersuchungszeitpunkten zeigte sich keine statistische Signifikanz. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefasst und grafisch in dem Streudiagramm Abbildung 15 dargestellt.

Tabelle 16: PERMANOVA-Statistikprüfung

Status	Time1	Time2	p value	R2
Satus_0	BL	12-16_days	0,757	0,021024
Status_0	BL	8_weeks	1	0,010128
Status_0	12-16_days	8_weeks	0,868	0,019004
Status_1	BL	12-16_days	0,987	0,014442
Status_1	BL	8_weeks	1	0,011101
Satus_1	12-16_days	8_weeks	0,993	0,012836

PERMANOVA Statistik identifiziert keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungszeitpunkten der Gruppen.

BL = Baseline Untersuchung, 12-16\_days = 1. Visit, 8\_weeks = 2. Visit.

In dem Streudiagramm (Abb. 15) werden die Daten der Proben mittels NMDS (Non-metric Multi-dimensional Scaling) dargestellt. Jeder Punkt stellt eine Probe dar. Der relative Abstand zwischen den Punkten stellt den Unterschied in den Mikrobiom Profilen dar. Die Verteilung zeigt keine zu beobachtende Gruppierung bezüglich der Untersuchungszeitpunkte oder des *P.g.* Status auf den NMDS Ordinationen.

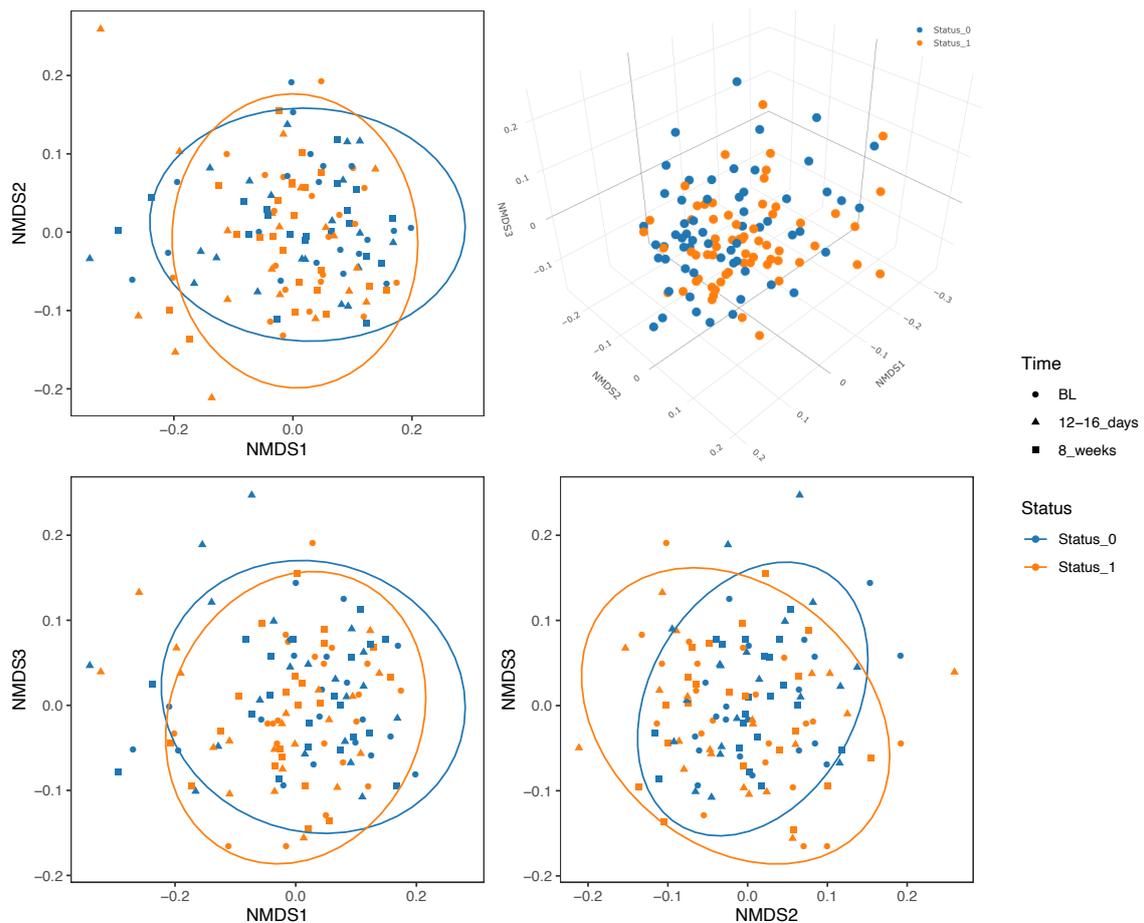


Abbildung 15: NMDS Analyse, die Verteilung des oralen Mikrobioms aller Proben aus dieser Studie wurden visualisiert und damit die Beziehung zwischen den Proben in diesem Diagramm dargestellt.

BL = Baseline Untersuchung, 12-16\_days = 1. Visit, 8\_weeks = 2. Visit, Status\_0 = P.g. negative Kontrollgruppe, Status\_1 = P.g. positive Testgruppe.

Zur Bestimmung der Phylumverteilung wurde die relativen Häufigkeiten von Taxa, die zu jedem Phylum gehören nach ihrem *P.g.* Status, sowie nach dem Zeitpunkt der Probenahme (BL, V1, V2) gruppiert und in Abbildung 16 und 17 dargestellt. Wobei die Ergebnisse mit dem R-Paket ggplot2 gezeichnet wurden (Wickham, 2011). Firmicutes war das am häufigsten nachgewiesene Phylum, entsprechend ca. 40% der Sequenzen in allen Proben. Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria und Fusobacteria waren jeweils bei ca. 9-17% in jeder Probe. Es gab keine signifikanten Unterschiede in den relativen Häufigkeiten der Phyla zwischen den drei Probenentnahmezeitpunkten oder zwischen den beiden *P.g.* -Statusgruppen.

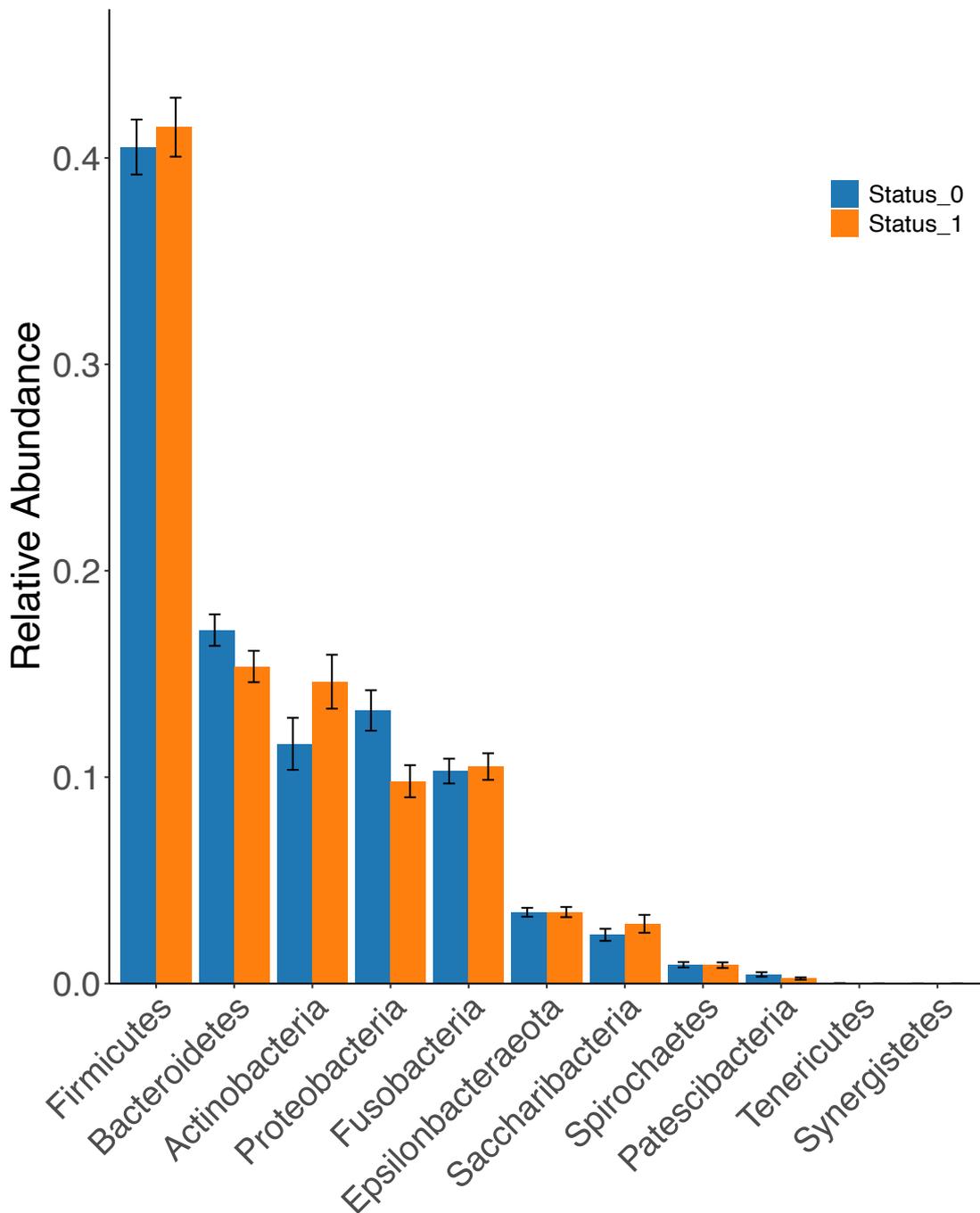


Abbildung 16: Phylumverteilung. Es zeigt sich keinen signifikanten Unterschied bei der Phylumverteilung zwischen der Kontroll- und Testgruppe. Status\_0 = P.g. negative Kontrollgruppe, Status\_1 = P.g. positive Testgruppe.

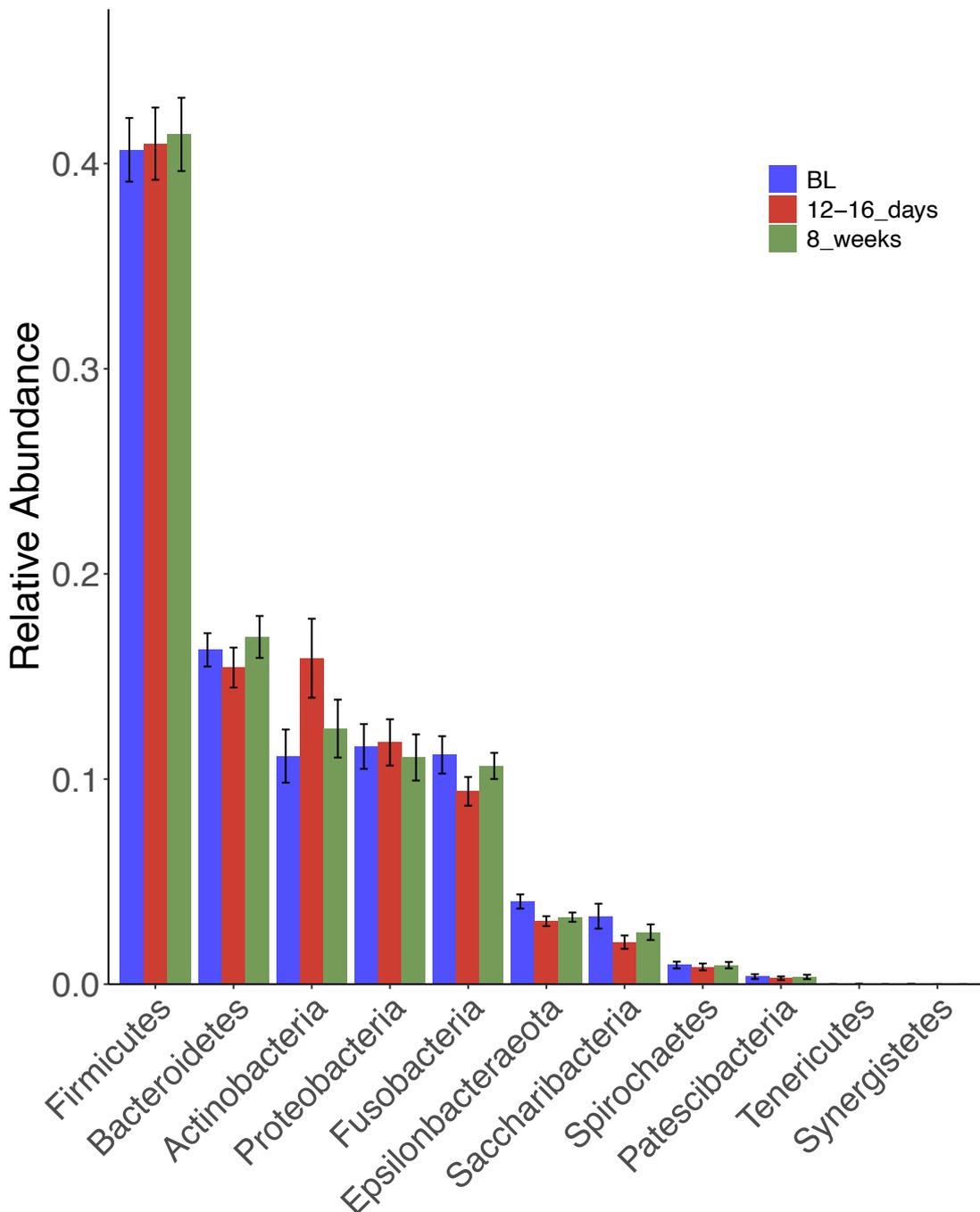


Abbildung 17: Phylumverteilung. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei der Phylumverteilung zwischen den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. BL = Baseline Untersuchung, 12-16\_days = 1. Visit, 8\_weeks = 2. Visit.

Das Kernmikrobiom beschreibt das am wenigsten variable Mikrobiom eines Biotops. Es wurde nach zwei Grenzwerten, der Abundanz und Prävalenz gefiltert. Verschiedene Kombinationen der beiden Grenzwerte wurden getestet. Schließlich wurde der Abundanz-Grenzwert auf 0,05%, welcher nur Taxa umfasst, deren relative Häufigkeit mehr als 0,05% der Gesamtmenge ausmacht

und der Prävalenz Grenzwert auf 50%, d.h. das jeweilige Taxon erscheint in 50% aller Proben, gesetzt.

Wie in Abbildung 18 und 19 dargestellt, waren im Allgemeinen die Zusammensetzungen der 30 am häufigsten vorkommenden Taxa und der Top 30 des Kernmikrobioms in den beiden Gruppen ähnlich. Einige Arten (ASVs) weisen Unterschiede in ihren jeweiligen relativen Häufigkeiten zwischen den beiden *P.g.* Statusgruppen auf, zum Beispiel *Haemophilus parainfluenzae* und *Rotharia mucilaginoso*.

Der *Streptococcus oralis dentasani* (HMT-058) kam in den Mundhöhlen aller Probanden sehr häufig vor (ca. 2 %). Wenn man sich die Anordnung der nachgewiesenen Arten ansieht, erscheint sie für das orale Mikrobiom des Menschen ziemlich typisch zu sein.

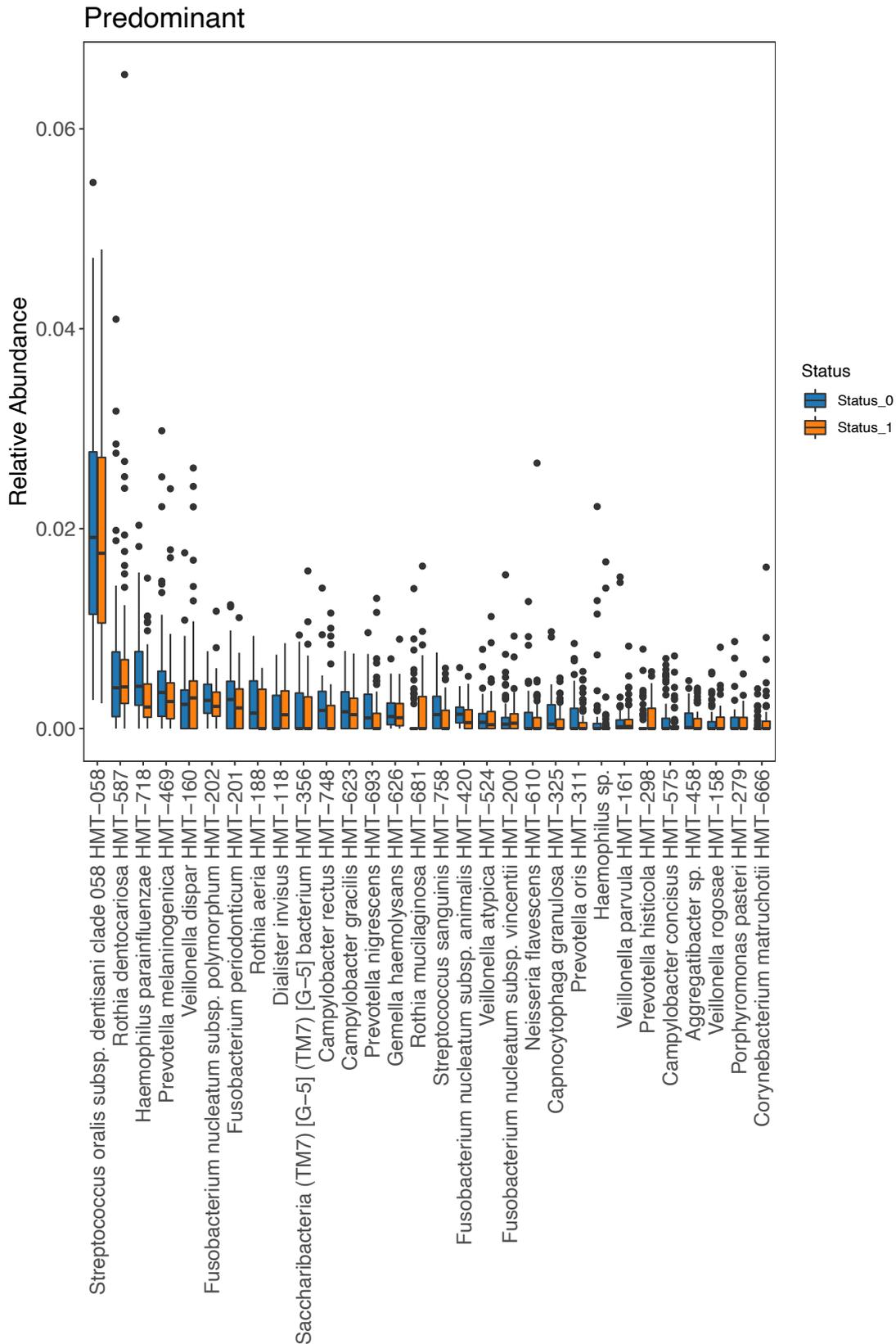


Abbildung 18: Taxa mit der höchsten relativen Häufigkeit in Prozent. Status\_0 = P.g. negative Kontrollgruppe, Status\_1 = P.g. positive Testgruppe.

## Core Microbiota

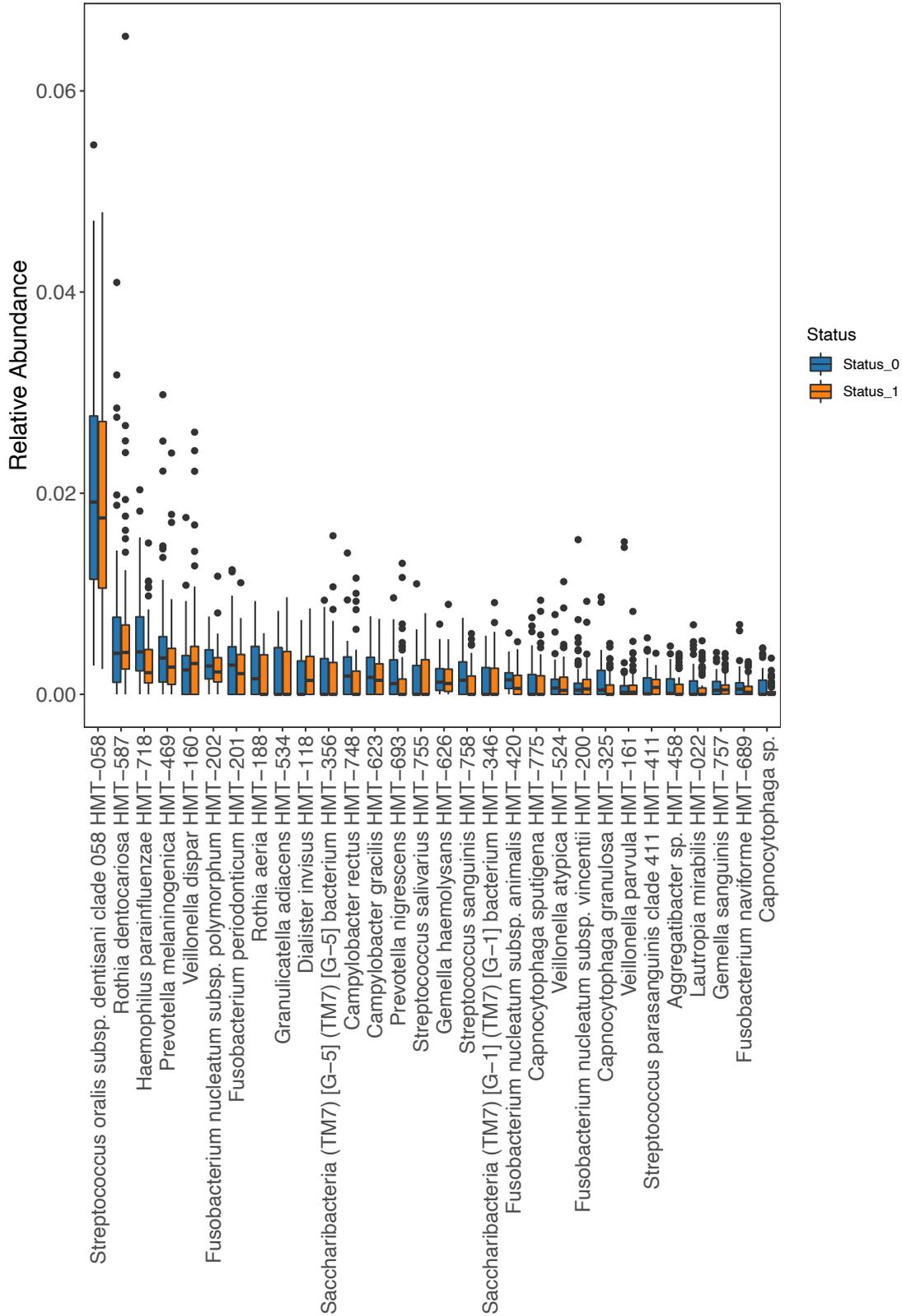


Abbildung 19: Top 30 Stämme des Kernmikrobioms in Prozent. Status\_0 = P.g. negative Kontrollgruppe, Status\_1 = P.g. positive Testgruppe.

Die Principal-Response- Kurve (Van den Brink and Braak, 1999) (Abbildung 20) wurde mit dem R-Paket vegan geplottet. Die PRC-Methode destilliert die Komplexität der zeitabhängigen Auswirkungen von Behandlungseffekten heraus und stellt diese in einer grafischen Form dar. Die PRC-Methode ermöglicht auch eine quantitative Interpretation der Effekte auf Artenebene (Van den Brink and Braak, 1999).

Die Ergebnisse zeigen, dass *P.g.* der deutlichste Indikator für den Unterschied zwischen den beiden *P.g.*-Statusgruppen ist. Dies ist zu erwarten und stimmt mit der ursprünglichen Klassifizierung überein.

*Rothia mucilaginosa* und *Leptotrichia wadei* zeigen große Unterschiede zwischen den beiden Statusgruppen. *Rothia mucilaginosa*, ein gram-positiver Kokkus aus der Familie der Micrococcaceae, gilt als Teil der normalen Mikroflora des menschlichen Mundes und der oberen Atemwege. Obwohl dieser Organismus als wenig virulent gilt, wird er zunehmend als opportunistisches Pathogen erkannt das vor allem immungeschwächte Wirte befällt (Maraki and Papadakis, 2015). *Leptotrichia*-Arten sind unbewegliche fakultativ anaerobe Bakterien, die hauptsächlich in der Mundhöhle und einigen anderen Teilen des menschlichen Körpers vorkommen. *Leptotrichia wadei* gehört unter anderen zu den gültigen Arten der *Leptotrichiaceae*. Einige Arten benötigen für ihr Wachstum Serum oder Blut. Alle Arten fermentieren Kohlenhydrate und produzieren Milchsäure, die mit Karies in Verbindung gebracht werden kann. Als opportunistische Krankheitserreger sind sie an einer Vielzahl von Krankheiten beteiligt und wurden sowohl von immungeschwächten als auch von immunkompetenten Personen isoliert. Mukositis, orale Läsionen, Wunden und Abszesse können für eine *Leptotrichia*-Septikämie prädisponieren (Eribe and Olsen, 2017).

Das Vorhandensein beider Keime ist mit einem *P.g.* positiven Status verbunden. Dieser Effekt ist zum Untersuchungszeitpunkt V1 am höchsten. Bei V2 ähnelt der Wert von *Rothia mucilaginosa* und *Leptotrichia wadei* wieder dem Ausgangswert von der BL- Untersuchung, wie durch die umgekehrte V-Form angezeigt. Wobei der Peak dem V1 Zeitpunkt entspricht.

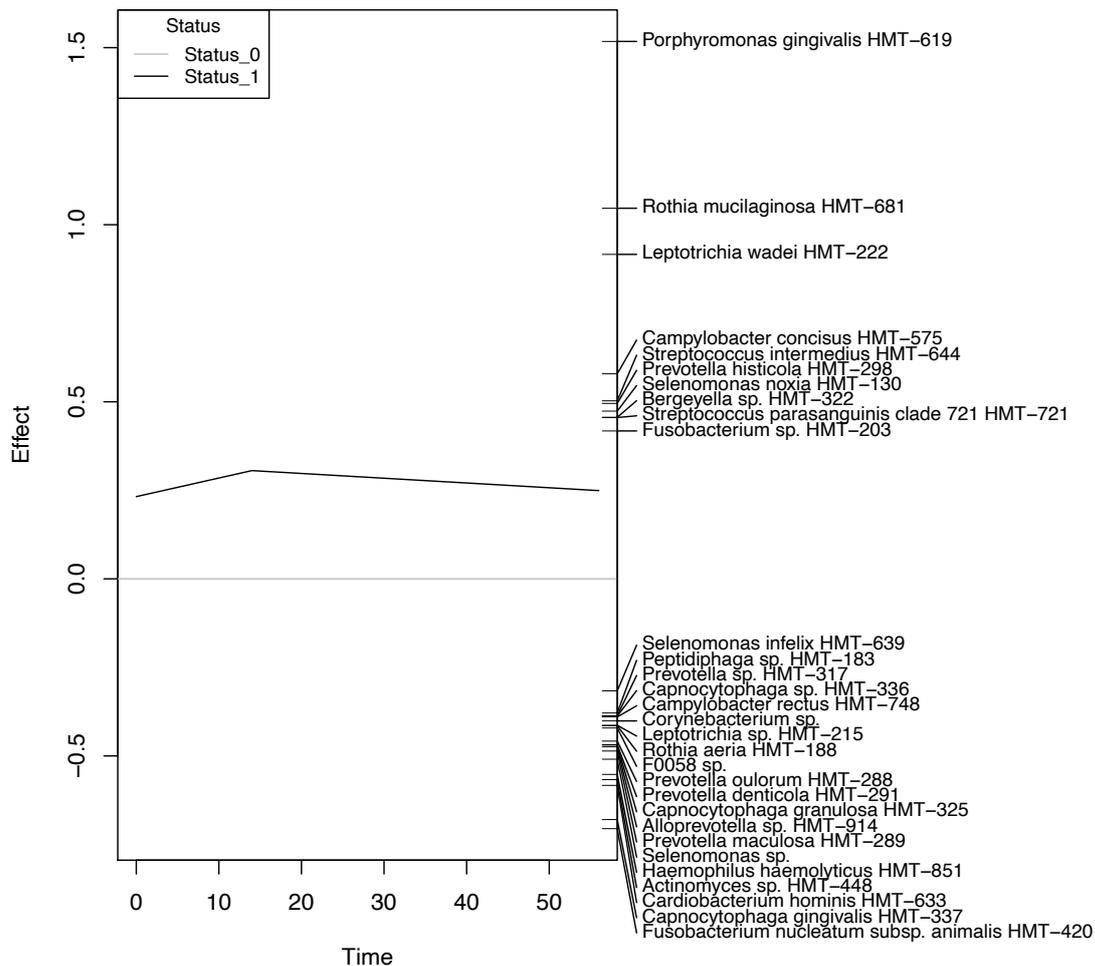


Abbildung 20: Die Principal-Response-Kurve zeigt, dass der deutlichste Indikator für einen Unterschied zwischen den beiden Gruppen *P.g.* ist. Die Zeit in Tagen ist auf der x-Achse dargestellt. Auf der y-Achse wird der Unterschied zwischen den beiden Gruppen dargestellt. Je weiter von der x-Achse entfernt, desto stärker unterscheiden sich die Testgruppen von der Kontrollgruppe. Status\_0 = *P.g.* negative Kontrollgruppe, Status\_1 = *P.g.* positive Testgruppe.

## 4 Diskussion

### 4.1 Fragestellung

Die hier vorliegende Studie befasst sich mit der Entwicklung des oralen Mikrobioms in Abhängigkeit von *Porphyromonas gingivalis*. Alle intraoralen Flächen und Nischen stellen Lebensräume für Mikroorganismen dar. Bei *P.g.* positiven und *P.g.* negativen parodontal gesunden Proband:innen findet eine intensive Reinigung dieser oralen Habitate statt. Verglichen wird die Entwicklung

des Mikrobioms vor und nach der Prophylaxemaßnahme in Bezug auf die verschiedenen *P.g.* Status.

Eine vorangegangene Studie hat bereits gezeigt, dass die intensive Reinigung mit dem Pulver-Wasser-Strahl- Gerät, als Ergänzung zum supragingivalem Debridement mittels Handinstrumenten zur besseren Unterdrückung des Roten Komplexes führt (Reinhardt et al., 2019).

## **4.2 Material und Methoden**

### **4.2.1 Probanden**

65 Proband:innen ließen sich aus eigenem Antrieb für diese Studie anhand der Ein- und Ausschlusskriterien screenen. Davon nahmen schlussendlich 41 Proband:innen an allen Untersuchungen teil und wurden in die Studie aufgenommen. Primär lag das Interesse bei der Auswahl von geeigneten Proband:innen auf der parodontalen und allgemeinanamnestischen Gesundheit der Studienteilnehmer:innen. Der parodontale Gesundheitsstatus wurde dabei durch den Parodontalen Screening Index (PSI) und die systemische Gesundheit durch eine anamnestische Abfrage sichergestellt.

Da im Laufe der Jahre viele Studien den Nachweis erbracht haben, dass parodontale Erkrankungen mit einigen systemischen Erkrankungen wie z.B. Herz-Kreislauf Erkrankungen, Diabetes Typ II, Krebs Erkrankungen und Alzheimer in Verbindung stehen (Bui et al., 2019, Whitmore and Lamont, 2014, Kim and Amar, 2006), wurde darauf geachtet hauptsächlich systemisch gesunde Patient:innen an der Studie teilnehmen zu lassen. Der Ausschluss von Bluthochdruck Patient:innen ist auf Grund des hohen Aufkommens jedoch nicht in Gänze gelungen, somit wurde auch die Einnahme von Antihypertensiva in Kauf genommen. Laut der Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1), leiden ca. ein Drittel der Erwachsenen in Deutschland an Hypertonie. In der höchsten untersuchten Altersgruppe von 70-79 Jahren sind es sogar bis zu 75% (Neuhauser et al., 2013).

Raucher:innen wurden nicht explizit von der Studie ausgeschlossen, jedoch ergab es sich zufällig, dass keine Raucher:innen an der Studie teilgenommen haben. Das kann dadurch begründet sein, dass nach dem Tabakatlas Deutschland 2015 und 2020 seit Jahren die Anzahl der Raucher:innen in

Deutschland rückläufig ist. Außerdem haben Raucher:innen ein erwiesenermaßen höheres Risiko an einer Parodontitis zu erkranken und sind deshalb oft nicht für diese Studie geeignet (Bosco et al., 2007, Bergstrom, 1989). Die Altersgruppe mit dem höchsten Anteil von Raucher:innen liegt zwischen 18 und 25 Jahren. Ende der 1990er Jahre rauchte in dieser Gruppe jede zweite, 2015 nur noch jede dritte Person. Auch im Vergleich ab einem Alter von 15 Jahren und älter zeigen sich sinkende Zahlen bei den Rauchenden. 1992 waren es 28,8% der Deutschen, 2017 waren es nur noch 22,4%.

Das durchschnittliche Alter lag in der *P.g.* positiven Testgruppe bei 48,5 Jahren und bei der *P.g.* negativen Kontrollgruppe bei 40,15 Jahren

Nur 5 der insgesamt 41 Probanden gehören der Altersgruppe der jüngeren Senior:innen (65 bis 74-Jährige) an. Dies kann ursächlich darin begründet sein, dass das prozentuale Vorkommen einer Parodontalerkrankung mit dem Alter steigt und damit ältere Probanden für diese Studie öfter nicht in Frage kamen. In der Gruppe der jüngeren Erwachsenen (35 bis 44- Jährige) liegt das Vorkommen von Parodontalerkrankungen bei 52% bei den jüngeren Senioren (65-72-jährige) bei 65% (Jordan et al., 2014).

Das Alter spielt auch eine Rolle bei der Verteilung der Senior:innen in die *P.g.* Statusgruppen. Mit dem Alter steigt die Prävalenz des Keimvorkommens. Dies erklärt, warum nur einer der jüngeren Senior:innen der *P.g.* negativen Gruppe angehört. Bereits 1998 wurde das Alter als Risikofaktor für den Nachweis von *P.g.* erkannt (Umeda et al., 1998). 2007 veröffentlichte eine Studie die Erkenntnis, dass das Alter ein signifikanter Faktor für die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens von *P.g.* ist (Könönen et al., 2007).

Nur ca. 30% der Proband:innen, die an der Studie teilgenommen haben sind männlich. Das mag daran liegen, dass Männer ein höheres Risiko haben an einer chronischen Parodontitis zu erkranken. Zahlreiche epidemiologische Studien haben das gezeigt (Albandar, 2002, Burt, 2005, Corbet et al., 2001, Mack et al., 2004, Susin et al., 2005).

Die Verteilung der Proband:innen in die Test- und Kontrollgruppe erfolgte anhand des *P.g.* Status, der durch die Testung der bei der Screening Untersuchung genommenen Proben verifiziert wurde. Da der Fokus dieser Studie auf den Entwicklungszusammenhängen des oralen Mikrobioms in Abhängigkeit von *P.g.* liegt, wurde auf weitere Gruppenzuweisungen nach Alter, Geschlecht,

Mundhygienestatus etc. verzichtet. Bei 61 der gescreeenten Proband:innen wurde der *P.g.* Status erhoben. Vier Proband:innen stellten sich bereits durch andere Ausschlusskriterien als nicht geeignet für die Studie heraus. Von den 61 getesteten Personen war bei 23 parodontal gesunden Proband:innen *P.g.* nachweisbar, somit lag das *P.g.* Vorkommen bei 37,7%. Im Gegensatz zu den in der Literatur angegebenen Prävalenzen ist die Zahl mit 37,7% etwas höher. Bei Griffen et al. (1998) wurde *P.g.* nur bei 25% der gesunden Probanden, aber bei 79% der parodontal erkrankten Probanden nachgewiesen (Griffen et al., 1998). Puig-Silla et al. (2012) beschreibt mit einer 27% igen *P.g.* Prävalenz bei parodontal gesunden in ähnlicher Höhe wie Griffen et al. (1998).

#### 4.2.2 Studiendesign

Bei der hier vorliegenden Studie handelt es sich um eine nicht-randomisierte, kontrollierte, klinische Interventionsstudie. Die klinische Intervention besteht aus einer konventionellen zahnmedizinischen Prophylaxemaßnahme mit dem Einsatz eines niedrigabrasiven Luft-Pulver-Wasserstrahls, die bei beiden Studiengruppen gleichermaßen durchgeführt wurde. Nicht-randomisiert ist diese Studie, da die Proband:innen nicht durch das Zufallsprinzip der Prüf- oder Vergleichsgruppe zugeteilt wurden, sondern dass der im Screening getestete *P.g.* Status über die Gruppenzugehörigkeit entschieden hat. Um die Fragestellung dieser Studie zu beantworten, war es notwendig die Proband:innen anhand des *P.g.* Status in zwei parallele Gruppen einzuteilen, beide Gruppen erfuhren die gleiche Intervention. Somit soll dem Entwicklungszusammenhang des oralen Mikrobioms in Abhängigkeit von *P.g.* durch die Probenentnahme und mikrobielle Auswertung nachgegangen werden. Da keine unterschiedlichen Behandlungsmethoden durchgeführt wurden und der Unterschied der Gruppen in dem Vorhandensein eines Keims liegt, können die Proband:innen auch nicht als ihre eigene Kontrolle dienen. Somit ist weder das cross-over-, noch das split-mouth-Design zur Anwendung geeignet.

#### 4.2.3 Erhebung klinischer Parameter

Die parodontale Gesundheit der teilnehmenden Personen wurde anhand des PSI überprüft. Nur Personen mit einen PSI Code von  $\geq 2$  wurden als parodontal gesund diagnostiziert und konnten an der Studie teilnehmen. Allen Patient:innen

mit einer höheren PSI Bewertung wurden darüber aufgeklärt, dass eine Vorstellung und Abklärung des Befundes durch ihren Hauszahnarzt bzw. ihre Hauszahnärztin notwendig sei. Seit 2002 wird der PSI von der Deutschen Gesellschaft für Parodontologie für das parodontale Screening bei der zahnärztlichen Routineuntersuchung zur Früherkennung einer Parodontitis empfohlen (Wolf et al., 2004). Vorteile des PSI sind die relativ schnelle, einfache Aufnahme und die Einbeziehung aller Zähne in die Beurteilung. Zusätzlich gibt der PSI für die entsprechende Codierung je eine Therapieempfehlung an. Als nachteilig erweist sich jedoch, dass durch die Beurteilung eines Sextanten mit einer Codierung nicht unterschieden werden kann, ob es sich um lokalisierte oder generalisierte parodontale Problematiken handelt. Außerdem können Pseudotaschen, die durch das Vorliegen einer Gingivitis entstehen können zu einer falschen PSI Codierung führen (Cutress et al., 1978).

Patient:innen, die sich freiwillig für die Teilnahme an einer zahnmedizinischen Studie melden, kann man eventuell auch ein höheres Interesse an der eigenen Mundhygiene unterstellen. Daher geht es bei der Plaquekontrolle im Zusammenhang mit der Studie eher nicht darum, dass man die Patient:innen zu einer guten Mundhygiene motivieren muss, sondern, dass man die Bereiche, die schwer zu erreichen sind auf das Vorhandensein von Plaque kontrolliert. Somit hat sich der Approximale-Plaque-Index nach Lange als gut geeignet für diese Studie erwiesen. Es werden die schwerer zugänglichen Approximalräume bewertet und der Index ist schnell zu erheben, da man die zu überprüfenden Bereiche dichotom bewertet. Die prozentuale Berechnung vereinfacht die Bewertung des Indexes. Außerdem korreliert der API durch die Bewertung der Approximalräume nur von der fazialen oder oralen Zahnseite mit dem PBI nach Saxer und Mühlemann. Der PBI wird graduell erhoben und als durchschnittlicher Schweregrad angegeben und ist deswegen für die Praxis auf Grund des Aufwandes eher ungeeignet. Ein entzündliches Vorgehen der Gingiva lässt sich aber mit dem PBI so gut wie mit den üblichen anderen Indizes wie z.B. dem Sulcus Blutungs Index (SBI) darstellen. Das zeigt eine Studie in der positive, offensichtliche und statistisch hoch signifikante Korrelationen zwischen dem PBI und SBI aufgezeigt wurden. Darüber hinaus ergab der Vergleich des PBI mit der histologischen Bestimmung der Entzündung einen deutlichen Anstieg der Menge an entzündlichem Infiltrat, wenn die PBI -Werte anstiegen (Engelberger et al.,

1983). Dadurch wird der Zusammenhang zwischen steigendem PBI Grad und steigendem Entzündungsgrad der Gingiva verdeutlicht und die Eignung des PBIs zur Darstellung des Entzündungszustandes der Gingiva gerechtfertigt.

#### 4.2.4 Erhebung mikrobiologischer Parameter

Um den Nachweis von *P.g.* bei den Patient:innen zu erbringen, erfolgte die mikrobiologische Probenentnahme durch eine kombinierte Probe von supragingivaler Plaque und einem Abstrich der Mundschleimhaut. Zur ausreichenden Bakteriengewinnung aus allen oralen Habitaten haben sich solche zweizeitigen Probenentnahmen bereits als effektiv bewiesen (Beikler et al., 2006).

Die beim SC der Proband:innen gewonnenen Proben wurden im Labor für experimentelle Parodontologie der Uniklinik Düsseldorf analysiert.

Zur Identifikation von *P.g.* in den Proben wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt. Mittels der PCR wurden die Proben dichotom nach dem Vorhandensein von dem Parodontalkeim *P.g.* bewertet. Die PCR ermöglicht also eine Aussage darüber ob der Keim *P.g.* vorliegt oder nicht. Über die Anzahl der detektierten Keime kann nur über die Intensität der entstandenen Banden eine Aussage getroffen werden. Zur quantitativen Bestimmung der Keime wäre eine Weiterführung der PCR, die quantitative real-time-PCR geeignet. Für das erste Screening der Proband:innen war die Untersuchung mit der konventionellen PCR ausreichend, da es um den Beweis des Vorliegens von *P.g.* ging. Alternativ zur PCR hätte die Kultivierung der Bakterien genutzt werden können, welche seit langem als Referenzdiagnostik in der mikrobiellen Diagnostik gilt und aus der ein großer Teil unseres Wissens zur parodontalen Mikrobiologie ursprünglich stammt (Sanz et al., 2004). Die PCR ist der bakteriellen Kultivierung jedoch in Bezug auf die Sensitivität und Spezifität überlegen (Suzuki et al., 2005, Riggio et al., 1996). Die DNA aus den in den nachfolgenden Behandlungen (BL, V1, V2) gewonnenen Proben wurden zur Weiterverarbeitung und Analyse an ein Labor der Universität Hong Kong (Dr. Rory M. WATT, Applied Oral Sciences & Community Dental Care Faculty of Dentistry, University of Hong Kong) geschickt. Die Sequenzierung der bakteriellen DNA erfolgt anhand der vom Hersteller Illumina entwickelten Methode, welche zur Sequenzierung der nächsten Generation (NGS) gehört.

Es existieren diverse Methoden zur Definition eines Mikrobioms. Darunter die Technik der Kultivierung und die Techniken des Next Generation Sequencing (NSG).

Kulturabhängige Methoden sind um die Antibiotikaempfindlichkeit oraler Mikroben zu bestimmen und die Pathogenität einzelner Spezies zu beurteilen äußerst nützlich (Genco, 1991, Slots and Jorgensen, 2000). Jedoch für andere diagnostische Zwecke stellen sie sich als arbeitsintensiv, kostspielig und nicht so umfassend wie die molekularen DNA-basierten Technologien dar, die die Notwendigkeit einer Kultur umgehen (Krishnan et al., 2017).

NGS haben in den letzten Jahren die Erforschung der mikrobiellen Vielfalt revolutioniert. Es gibt eine Reihe verschiedener NGS-Plattformen, die unterschiedliche Sequenzierungstechnologien verwenden. Darunter Roche/454 (Roche 454 Life Sciences, Branford, CT), Applied Biosystems / SOLiD (Life Technologies, Carlsbad, CA) und das hier verwendete Illumina/Solexa (Illumina, San Diego, CA). Alle NGS-Plattformen führen die Sequenzierung von Millionen kleiner DNA-Fragmente parallel und in kurzer Zeit durch.

Die 454 Pyrosequenzierung wurde 2013 eingestellt (Slatko et al., 2018).

Einer der Schwächen des SOLiD-Systems ist die lange Laufzeit von ca. 6 Tagen (Pozhitkov et al., 2011).

In den letzten Jahren hat sich Illumina mit einer Reihe von Instrumenten wie HiSeq, HiSeq X, NextSeq 500 und dem hier verwendeten MiSeq mit unterschiedlichen Fähigkeiten für die Sequenzierungslänge und Anzahl der Reads zum Marktführer entwickelt (Krishnan et al., 2017). Ein einzelner Lauf kann in nur 4 h Laufzeit Ausgabedaten von bis zu 15 Gb erzeugen und bis zu 25 Mio. Single-Reads und 50 Mio. Paired-End-Reads ausgeben. Somit bietet MiSeq eine ideale Plattform für schnelle Durchlaufzeiten. MiSeq ist auch ein kostengünstiges Werkzeug für verschiedene Analysen, die sich auf die gezielte Gensequenzierung (Amplikonsequenzierung und Zielanreicherung), Metagenomik und Genexpressionsstudien konzentrieren (Ravi et al., 2018).

### **4.3 Ergebnisse**

Bekannt ist, dass das Parodontitis assoziierte Mikrobiom eine höhere Artenvielfalt und Bakterienreichtum als das Mikrobiom einer gesunden Person aufweist (Yamashita and Takeshita, 2017, Costalonga and Herzberg, 2014,

Abusleme et al., 2013, Shi et al., 2018). Es kommen trotzdem auch Keime, die mit einer Parodontitis in Verbindung gebracht werden bei Gesunden vor, wie in dieser Studie der Keim *P.g.*. Eine vorangegangene Studie hat gezeigt, dass sich durch die adjuvante Luft-Pulver-Wasserstrahl-Behandlung, besonders in den ersten Tagen nach Behandlungsbeginn eine erkennbare Reduktion von *P.g.* erreichen lässt. Somit scheint diese Art der Behandlung einen Effekt auf die Keimreduktion zu haben. Die Beobachtungen von Reinhardt et al. zeigten, dass das LPW in der Lage ist, die in den intraoralen Habitaten befindlichen Keime im Gegensatz zur alleinigen professionellen Zahnreinigung zu erreichen und somit eine stärkere Reduktion der Keime zu bewirken (Reinhardt et al., 2019). Lu et al. zeigten, dass durch die Behandlung mit Ultraschallscaler und dem LPW die Pathogenität des subgingivalen Mikrobioms reduziert wurden. Das erfolgt durch die Reduzierung der mikrobiellen Diversität und damit dem Anteil der Parodontitis-assoziierten Keime und des pathogenen Metabolismus. Es half, eine ausgewogene subgingivale Gemeinschaft und einen stabilen parodontalen Zustand über einen Zeitraum von 3 Monaten aufrecht zu erhalten (Lu et al., 2019). Damit hat sich die Behandlungsmethode mit dem LPW als geeignet zur Anwendung in dieser Studie erwiesen, um die Entwicklung des oralen Mikrobioms in Abhängigkeit von *P.g.* nach der Anwendung dieser Behandlungsmethode zu untersuchen. Aber die Hypothese, dass eine intensive Reinigung aller intraoralen Habitate mittels des LPWs zu einer signifikanten Reduktion der sich in der Mundhöhle befindlichen Keime und zu einer Veränderung des Mikrobioms in Abhängigkeit von *P.g.* führen würde, hat sich nicht bestätigt. Im Gegensatz zur Erwartung, resultierte die Zahnreinigung inklusive des Abstrahlens aller intraoralen Habitate mit dem LPW in beiden Gruppen nicht in einem signifikant reduzierten Level der Alpha Diversität und führte zu keiner Veränderung der jeweiligen Mikrobiomzusammensetzung. Bei dem Vergleich der Alpha Diversitäten zwischen den beiden Gruppen und zwischen den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten ist kein signifikanter Unterschied erkennbar. Daraus erfolgt die Annahme, dass sich die Anzahl der Arten in den Habitaten durch die vorangegangene Behandlung nicht in aussagekräftiger Größe verändert hat. Basierend auf der Beta Diversität zeigt die NMDS Analyse in dieser Studie keine erkennbare Häufung in Bezug auf die Untersuchungszeitpunkte oder den *P.g.* Status, was ebenso für keine

unterschiedliche Entwicklung bzw. keine Unterschiede in Bezug auf die Artenvielfalt bei den verschiedenen Proben spricht.

Kato et al. zeigten in einer Studie, bei der Mäusen lebende *P.g.* Stämme zweimal die Woche für fünf Wochen verabreicht wurden, dass sich durch die orale Verabreichung von *P.g.* eine Veränderung in dem Darmmikrobiom der Mäuse induzierte, jedoch war der Unterschied zwischen den beiden getesteten Mäusegruppen auch hier nicht signifikant (Kato et al., 2018). Somit lässt sich eventuell die These aufstellen, dass *P.g.* bei Gesunden mit einem sich in einer Eubiose befindenden Mikrobiom keinen großen Effekt auf die Zusammensetzung hat und auch die Behandlung mittels LPW bei gesunden Proband:innen für keine Veränderung in der Artenvielfalt sorgt. Im Falle einer Erkrankung mit einer Parodontitis ist es ja auch so, dass diese Erkrankung nicht durch eine einzelne Spezies verursacht wird, sondern durch ein Konsortium von Spezies, die wahrscheinlich in sehr geringer Anzahl harmlos in der Mundhöhle leben. Im Wesentlichen sind orale bakterielle Erkrankungen wie die Parodontitis opportunistische Infektionen, die unter geeigneten Umständen und bestimmten Bedingungen auftreten (Krishnan et al., 2017). Das heißt, dass die Pathogenese der Parodontitis polymikrobielle Synergie und Dysbiose umfasst (Hajishengallis and Lamont, 2012). Die Dysbiose des parodontalen Mikrobioms bedeutet eine Veränderung der relativen Häufigkeit einzelner Komponenten der bakteriellen Gemeinschaft im Vergleich zu ihrer Häufigkeit im gesunden Zustand, was zu Veränderungen im Wirts-Mikroben-Crosstalk führt, und somit zu destruktiven parodontalen Veränderungen (Hajishengallis et al., 2012, Abusleme et al., 2013). Ein Mikroorganismus, der für die Auslösung des Dysbiose-Phänomens verantwortlich ist, ist das gramnegative asaccharolytische Bakterium *P.g.* (Costalonga and Herzberg, 2014).

Die mikrobielle Diversität der Mundhöhle wurde in den Jahren 2005 bis 2010 durch traditionelle Sanger-basierte Sequenzierung umfassend untersucht (Aas et al., 2005, de Lillo et al., 2006, Sakamoto et al., 2008, Faveri et al., 2008, Ribeiro et al., 2011, Keijser et al., 2008, Bik et al., 2010, Dewhirst et al., 2010). Diese Studien kamen zu dem Schluss, dass eine gesunde Mundhöhle eine Vielzahl von Mikroorganismen beherbergt, wobei die folgenden sechs Stämme die ständigen Besiedler und damit das Kernmikrobiom sind: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Spirochaetes und Fusobacteria (Siqueira et al.,

2012, Shade and Handelsman, 2012, Jiang et al., 2014, Xu et al., 2014). Diese Mikroorganismen machen 96% der gesamten oralen Bakterien aus (Zaura et al., 2009, Bik et al., 2010, Palmer, 2014).

Das stimmt mit der hier untersuchten Studie überein. Auch in diesem Fall waren diese sechs Bakterienstämme nachweisbar, wobei Firmicutes mit ca. 40% der Sequenzen der häufigste Stamm ist. Aber auch hier gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten und Gruppen.

Laut Dewhirst et al. tragen Firmicutes mit insgesamt 36,7% zum Maximum bei, gefolgt von Bacteroidetes (17,1%), Proteobakterien (17,1%), Actinobakterien (11,6%), Spirochaeten (7,9%) und Fusobakterien (5,2%) (Dewhirst et al., 2010).

Bei der Auswertung der klinischen Ergebnisse lag der Medianwert des API initial bei den Untersuchungsgruppen bei 28,50% und 21,00% und sprach somit für einen mäßigen bis guten Zustand der Mundhygiene (Lange et al., 1977). Beide Gruppen zeigten zur V1 Behandlung, die 12 bis 16 Tage nach der Baseline Untersuchung mit anschließender Zahnreinigung eine deutliche Verbesserung des API, was wahrscheinlich auf die Zahnreinigung zurück zu führen ist.

Der Ausgangswert des Papillen-Blutungs-Index nach Saxer und Mühlemann lag in der Testgruppe bei  $0,19 \pm 0,19$  und in der Kontrollgruppe bei  $0,25 \pm 0,19$ . 12 bis 16 Tage später bei der V1 Untersuchung lagen die Werte in beiden Gruppen unter dem Ausgangswert, auch hier kann man die im zeitlichen Zusammenhang liegende Zahnreinigung als Ursache für die Verbesserung der Werte vermuten. Entsprechend den Werten vom API näherten sich auch die Werte des PBI bei der V2 Untersuchung den initialen Werten wieder an. Ursächlich für den Anstieg der Werte könnte der zeitlich größer werdende Abstand zur Zahnreinigung, oder auch eine unzureichende Mundhygiene während des Beobachtungszeitraumes sein. Einige Patient:innen gaben sogar an mit Absicht auf die Zahnpflege vor der Untersuchung verzichtet zu haben, damit Plaque für die Probenentnahme vorhanden sei. Sreenivasan und Prasad unterzogen 41 (n=41) gesund erwachsene Probanden einer zahnmedizinischen Untersuchung auf Zahnplaque mit Hilfe des Quigley-Hein-Index und Gingivitis anhand des Löe-Silness-Index, gefolgt von einer professionellen Zahnreinigung. Nach dieser Baseline Untersuchung folgten noch zwei weitere Erhebungen der Indizes, 15 Tage und 30 Tag nach der professionellen Zahnreinigung. Bei dem Vergleich der Plaque

Index Werte des Quigley-Hein-Indexes zeigte sich von Baseline zu 15 Tage post Zahnreinigung eine signifikante Reduktion, was der Autor auf die Auswirkung der Prophylaxemaßnahme zurückführt. 30 Tage nach der Baseline Untersuchung entsprachen die Werte des Plaque Index aber auch hier wieder den Ausgangswerten (Sreenivasan and Prasad, 2017). Somit stellt sich in Bezug auf die Plaqueentwicklung ein ähnliches Bild zu der hier durchgeführten Studie dar.

#### **4.4 Schlussfolgerung**

In einer vorangegangenen Studie wurde beschrieben, dass durch den Einsatz des LPW eine erkennbare Keimreduktion bei parodontal gesunden Träger:innen von parodontalpathogenen Keimen erzielt werden konnte, jedoch keine vollständige und langfristige Eradikation der Keime möglich war (Reinhardt et al., 2019). Die hier beschriebene klinische Studie befasst sich daraufhin mit der Entwicklung des oralen Mikrobioms, bei parodontal gesunden Proband:innen, nach der Reinigung mittels supragingivalen Debridements und dem LPW- Gerät inklusive Abstrahlens aller oralen Nischen in Abhängigkeit von dem parodontalpathogenem Leitkeim *P.g.*.

Schon lange gilt *P.g.* mit anderen Keimen, die als der „Rote Komplex“ definiert werden, als einer der am meisten mit einer Parodontitis assoziierten Mikroorganismen. Auch bekannt ist, dass sich die Zusammensetzung des oralen Mikrobioms in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen erheblich verändern kann. Im parodontal erkrankten Zustand fördert *P.g.* das Wachstum und die Entwicklung der mikrobiellen Gemeinschaft. Tatsächlich beeinträchtigt *P.g.* die Abwehrkräfte des Wirts in einer Weise, die das Wachstum und die Entwicklung der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft erleichtert. Die Fähigkeit von *P.g.*, die Ernährungsgrundlage für die mikrobielle Gemeinschaft zu verändern, fördert signifikante Veränderungen in der Zusammensetzung der Gemeinschaft. Diese Merkmale definieren *P.g.* als Keystone-Erreger, einen Mikroorganismus, der die Umgebung verändern kann, um die Anteile anderer Mikroorganismen innerhalb der ökologischen Nische zu verändern. Die damit einhergehende Störung des proportionalen Verhältnisses zwischen strengen Symbionten und Pathobionten löst die destruktive Kaskade aus, die zur Entzündungsaktivierung und anschließenden Parodontalenzerstörung führt (Hajishengallis and Lamont, 2012). Von Interesse ist daher, ob sich das orale Mikrobiom auch bei parodontal

Gesunden in Abhängigkeit von *P.g.* verändert. Um das zu untersuchen, wurden eine Testgruppe von parodontal gesunden Proband:innen mit dem durch PCR gesicherten Nachweis von *P.g.* und eine Kontrollgruppe ohne *P.g.* mittels supragingivalen Debridement und Abstrahlung aller oralen Habitate mit Glycin-Pulver behandelt. Danach mit den in gleichen Abständen gewonnenen supragingivale Plaqueproben und Abstriche der Mundschleimhaut verglichen. Die mikrobiologischen Ergebnisse der Studie zeigten, dass keine Reduzierung der Artenvielfalt und keine Veränderung der jeweiligen Mikrobiom Zusammensetzung beim Vergleich zwischen den beiden Gruppen und den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten festzustellen war.

## 5 Zusammenfassung

**Fragestellung und Ziele.** Diese Studie soll die Entwicklung des oralen Mikrobioms nach einer professionellen Zahnreinigung und der zusätzlichen Bestrahlung der oralen Schleimhäute mit einem niedrigabrasiven Glycin Pulver in Abhängigkeit vom Vorhandensein des parodontopathogenen Keims *Porphyromonas gingivalis* in zwei Probandenkollektiven untersuchen.

**Methodik.** Für die Studie wurden 65 Proband:innen gescreent, davon erwiesen sich 41 Proband:innen als geeignet und wurden in die Studie aufgenommen. Es handelte sich um parodontal und allgemeinanamnestisch gesunde Patient:innen. Davon 21 Teilnehmer:innen mit einem durch PCR gesichertem positivem (Testgruppe) und 20 Proband:innen mit einem negativen (Kontrollgruppe) Nachweis von *P.g.*. Alle erhielten eine professionelle Zahnreinigung und die zusätzliche Bearbeitung aller intraoralen Habitate wie Gingiva, Wange, Zunge, Mundboden, Gaumen und Rachen mittels des Luft-Pulver-Wasserstrahl- Geräts (LPW) und niedrigabrasiven Glycin Pulver. Zur späteren Analyse wurden vor der Behandlung (Baseline, BL), 12-16 Tage (V1) und 8 Wochen (V2) nach der Behandlung supragingivale Plaqueproben aus den Approximalräumen sowie Schleimhautabstriche von Wange, Zunge, Gaumen und Rachen genommen. Die Auswertung der Proben erfolgte mittels Next Generation Sequencing.

**Ergebnisse und Diskussion.** Die Untersuchung des Artenreichtums zeigte eine ausreichende Sequenzierungstiefe aller 123 Proben (>ca.5000 Sample Size). Bezüglich der Alpha Diversität und der relativen Häufigkeit der Bakterienstämme zwischen den beiden Gruppen und bei dem Vergleich der Untersuchungszeitpunkte konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Das Kern Mikrobiom aller Proben zeigte ein „typisches“ Bild für ein humanes orales Mikrobiom. Übereinstimmend mit der ursprünglichen Klassifizierung stellte sich *P.g.* als deutlichster Indikator zwischen den beiden Statusgruppen dar.

**Schlussfolgerung.** Es ist keine Reduzierung der Artenvielfalt und keine Veränderung der jeweiligen Mikrobiom Zusammensetzung beim Vergleich zwischen den beiden Gruppen und den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten festzustellen.

## 5 Summary

**Purpose and Objectives.** The purpose of this study is to investigate the development of the oral microbiome after professional tooth cleaning and additional irradiation of the oral mucosa with a low-abrasive glycine powder in relation to the presence of the periodontopathogenic germ *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) in two subject collectives.

**Methodology.** Sixty-five subjects were screened for the study, of which 41 subjects were found to be eligible and were included in the study. These were periodontally and generally healthy patients. Of these, 21 participants had PCR confirmed positive (test group) and 20 subjects had negative (control group) evidence of *P.g.*. All received professional tooth cleaning and additional treatment of all intraoral habitats such as gingiva, cheek, tongue, floor of mouth, palate and pharynx using the air-powder waterjet (LPW) device and low-abrasive glycine powder. For subsequent analysis, plaque samples were taken from the proximal spaces before treatment (baseline, BL), 12-16 days (V1), and 8 weeks (V2) after treatment, as well as mucosal swabs from the cheek, tongue, palate, and pharynx. The samples were analyzed using next generation sequencing.

**Results and Discussion.** The study of species richness showed sufficient sequencing depth of all 123 samples (>ca.5000 sample size). No significant difference was found in terms of alpha diversity and relative abundance of bacterial strains between the two groups and when comparing the study time points. The core microbiome of all samples showed a "typical" picture for a human oral microbiome. Consistent with the original classification, *P.g.* emerged as the most distinct indicator between the two status groups.

**Conclusion.** There is no reduction in species diversity and no change in the respective microbiome composition when comparing the two groups and the respective study time points.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

A.a.	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
AAP	American Academy of Periodontology
Abb.	Abbildung
API	Approximaler Plaque Index
ASV	amplicon sequence variants
BAS	Blutung auf Sondierung
BL	Baseline
BGI	Beijing Genom Institute
BOP	Bleeding on probing
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
DEGS1 Deutschland	Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland
DMS IV	4. Deutsche Mundgesundheitsstudie
DMS V	5. Deutsche Mundgesundheitsstudie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EFP	European Federation of Periodontology
engl.	englisch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
E.c.	Eikenella corrodens
F.n.	Fusobacterium nucleatum
HOMD	Human Oral Microbiome Database
IL	Interleukin
KAV	klinischer Attachmentverlust
LPS	Lipopolysaccharid
LPW	Luft-Pulver-Wasserstrahlgerät
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter

MMP	Matrix-Metallproteasen
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
PBI	Papillen Blutungs Index
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P.g.	Porphyromonas gingivalis
P.i.	Prevotella intermedia
PSI	Parodontaler Screening Index
PZR	Professionelle Zahnreinigung
rpm	revolutions per minute
SC	Screening
S. cristatus	Streptococcus cristatus
sec	Sekunden
S. gordonii	Streptococcus gordonii
S. mitis	Streptococcus mitis
S. oralis	Streptococcus oralis
S. sanguinis	Streptococcus sanguinis
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS- Borat- EDTA- Puffer
T.d.	Treponema denticola
T.f.	Tannerella forsythia
TiMPS	tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor
TST	Tachensondierungstiefe
UPT	unterstützende Parodontaltherapie
UV	Ultraviolett
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vs.	Versus
V1	Visit 1: 12-16 Tage nach BL
V2	Visit 2: 8 Wochen nach BL

## 7 Literaturverzeichnis

- AAS, J. A., PASTER, B. J., STOKES, L. N., OLSEN, I. & DEWHIRST, F. E. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43, 5721-32.
- ABUSLEME, L., DUPUY, A. K., DUTZAN, N., SILVA, N., BURLESON, J. A., STRAUSBAUGH, L. D., GAMONAL, J. & DIAZ, P. I. 2013. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *Isme j*, 7, 1016-25.
- ALBANDAR, J. M. 2002. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000*, 29, 177-206.
- ALBANDAR, J. M., SUSIN, C. & HUGHES, F. J. 2018. Manifestations of systemic diseases and conditions that affect the periodontal attachment apparatus: Case definitions and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol*, 45 Suppl 20, S171-S189.
- AMANN, R. I., LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K. H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59, 143-69.
- AMANO, A. 2007. Disruption of epithelial barrier and impairment of cellular function by *Porphyromonas gingivalis*. *Front Biosci*, 12, 3965-74.
- ARABACI, T., CICEK, Y., OZGOZ, M., CANAKCI, V., CANAKCI, C. F. & ELTAS, A. 2007. The comparison of the effects of three types of piezoelectric ultrasonic tips and air polishing system on the filling materials: an in vitro study. *Int J Dent Hyg*, 5, 205-10.
- ARMITAGE, G. C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*, 4, 1-6.
- AWANO, S., ANSAI, T., TAKATA, Y., SOH, I., AKIFUSA, S., HAMASAKI, T., YOSHIDA, A., SONOKI, K., FUJISAWA, K. & TAKEHARA, T. 2008. Oral health and mortality risk from pneumonia in the elderly. *J Dent Res*, 87, 334-9.
- BAO, K., BELIBASAKIS, G. N., THURNHEER, T., ADUSE-OPOKU, J., CURTIS, M. A. & BOSTANCI, N. 2014. Role of *Porphyromonas gingivalis* gingipains in multi-species biofilm formation. *BMC Microbiol*, 14, 258.
- BARNES, C. M., RUSSELL, C. M., GERBO, L. R., WELLS, B. R. & BARNES, D. W. 1990. Effects of an air-powder polishing system on orthodontically bracketed and banded teeth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 97, 74-81.
- BECK, J. D. & OFFENBACHER, S. 2005. Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol*, 76, 2089-100.
- BEIKLER, T., ABDEEN, G., SCHNITZER, S., SALZER, S., EHMKE, B., HEINECKE, A. & FLEMMIG, T. F. 2004. Microbiological shifts in intra- and extraoral habitats following mechanical periodontal therapy. *J Clin Periodontol*, 31, 777-83.
- BEIKLER, T., KARCH, H. & FLEMMIG, T. 2003. Adjuvante antibiotika in der parodontitistherapie. *Dtsch Zahnärztl*, 58, 263-265.
- BEIKLER, T., SCHNITZER, S., ABDEEN, G., EHMKE, B., EISENACHER, M. & FLEMMIG, T. F. 2006. Sampling strategy for intraoral detection of periodontal pathogens before and following periodontal therapy. *J Periodontol*, 77, 1323-32.
- BELANGER, M., RODRIGUES, P. H., DUNN, W. A., JR. & PROGULSKE-FOX, A. 2006. Autophagy: a highway for *Porphyromonas gingivalis* in endothelial cells. *Autophagy*, 2, 165-70.

- BELIBASAKIS, G. N. 2018. Microbiological changes of the ageing oral cavity. *Arch Oral Biol*, 96, 230-232.
- BERGSTROM, J. 1989. Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 17, 245-247.
- BERKSTEIN, S., REIFF, R. L., MCKINNEY, J. F. & KILLOY, W. J. 1987. Supragingival root surface removal during maintenance procedures utilizing an air-powder abrasive system or hand scaling. An in vitro study. *J Periodontol*, 58, 327-30.
- BERRY, E. A., 3RD, EAKLE, W. S. & SUMMITT, J. B. 1999. Air abrasion: an old technology reborn. *Compend Contin Educ Dent*, 20, 751-4, 756, 758-9 passim; quiz 764.
- BIK, E. M., LONG, C. D., ARMITAGE, G. C., LOOMER, P., EMERSON, J., MONGODIN, E. F., NELSON, K. E., GILL, S. R., FRASER-LIGGETT, C. M. & RELMAN, D. A. 2010. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *Isme j*, 4, 962-74.
- BILLINGS, M., HOLTFRETER, B., PAPAPANOU, P. N., MITNIK, G. L., KOCHER, T. & DYE, B. A. 2018. Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S140-s158.
- BOSCO, A. F., BONFANTE, S., DE ALMEIDA, J. M., LUIZE, D. S., NAGATA, M. J. & GARCIA, V. G. 2007. A histologic and histometric assessment of the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. *J Periodontol*, 78, 527-32.
- BOSSHARDT, D. D. & LANG, N. P. 2005. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res*, 84, 9-20.
- BOSTANCI, N. & BELIBASAKIS, G. N. 2012. Porphyromonas gingivalis: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiol Lett*, 333, 1-9.
- BRADSHAW, D. J., MARSH, P. D., ALLISON, C. & SCHILLING, K. M. 1996. Effect of oxygen, inoculum composition and flow rate on development of mixed-culture oral biofilms. *Microbiology*, 142 ( Pt 3), 623-9.
- BUI, F. Q., ALMEIDA-DA-SILVA, C. L. C., HUYNH, B., TRINH, A., LIU, J., WOODWARD, J., ASADI, H. & OJCIUS, D. M. 2019. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J*, 42, 27-35.
- BURT, B. 2005. Position paper: epidemiology of periodontal diseases. *J Periodontol*, 76, 1406-19.
- BYERS, H. L., TARELLI, E., HOMER, K. A. & BEIGHTON, D. 1999. Sequential deglycosylation and utilization of the N-linked, complex-type glycans of human alpha1-acid glycoprotein mediates growth of Streptococcus oralis. *Glycobiology*, 9, 469-79.
- CALLAHAN, B. J., MCMURDIE, P. J., ROSEN, M. J., HAN, A. W., JOHNSON, A. J. & HOLMES, S. P. 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*, 13, 581-3.
- CATON, J. G., ARMITAGE, G., BERGLUNDH, T., CHAPPLE, I. L. C., JEPSEN, S., KORNMAN, K. S., MEALEY, B. L., PAPAPANOU, P. N., SANZ, M. & TONETTI, M. S. 2018. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S1-S8.
- CHAPPLE, I. L. C., MEALEY, B. L., VAN DYKE, T. E., BARTOLD, P. M., DOMMISCH, H., EICKHOLZ, P., GEISINGER, M. L., GENCO, R. J., GLOGAUER, M., GOLDSTEIN, M., GRIFFIN, T. J., HOLMSTRUP, P., JOHNSON, G. K., KAPILA, Y., LANG, N. P., MEYLE, J., MURAKAMI, S., PLEMONS, J., ROMITO, G. A., SHAPIRA, L., TATAKIS, D. N., TEUGHELS, W., TROMBELLI, L., WALTER, C., WIMMER, G., XENOUDI, P. &

- YOSHIE, H. 2018. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol*, 45 Suppl 20, S68-S77.
- CHEN, T., YU, W. H., IZARD, J., BARANOVA, O. V., LAKSHMANAN, A. & DEWHIRST, F. E. 2010. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)*, 2010, baq013.
- CHINELATTI, M. A., CORONA, S. A., BORSATTO, M. C., RIBEIRO, L. F., ROCHA, R. A. & PALMA-DIBB, R. G. 2007. Analysis of surfaces and adhesive interfaces of enamel and dentin after different treatments. *J Mater Sci Mater Med*, 18, 1465-70.
- COOLEY, R. L., LUBOW, R. M. & PATRISSI, G. A. 1986. The effect of an air-powder abrasive instrument on composite resin. *J Am Dent Assoc*, 112, 362-4.
- CORBET, E. F., WONG, M. C. & LIN, H. C. 2001. Periodontal conditions in adult Southern Chinese. *J Dent Res*, 80, 1480-5.
- COSTA, F. O., LAGES, E. J., COTA, L. O., LORENTZ, T. C., SOARES, R. V. & CORTELLI, J. R. 2014. Tooth loss in individuals under periodontal maintenance therapy: 5-year prospective study. *J Periodontal Res*, 49, 121-8.
- COSTALONGA, M. & HERZBERG, M. C. 2014. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett*, 162, 22-38.
- CUTRESS, T. W., HUNTER, P. B., BECK, D. J. & DE SOUZA, P. 1978. A comparison of WHO periodontal status index with the periodontal and oral hygiene indices. *Community Dent Oral Epidemiol*, 6, 245-52.
- DARRENE, L. N. & CECILE, B. 2016. Experimental Models of Oral Biofilms Developed on Inert Substrates: A Review of the Literature. *Biomed Res Int*, 2016, 7461047.
- DE LILLO, A., ASHLEY, F. P., PALMER, R. M., MUNSON, M. A., KYRIACOU, L., WEIGHTMAN, A. J. & WADE, W. G. 2006. Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets. *Oral Microbiol Immunol*, 21, 61-8.
- DECARLO, A. A., GRENETT, H. E., HARBER, G. J., WINDSOR, L. J., BODDEN, M. K., BIRKEDAL-HANSEN, B. & BIRKEDAL-HANSEN, H. 1998. Induction of matrix metalloproteinases and a collagen-degrading phenotype in fibroblasts and epithelial cells by secreted Porphyromonas gingivalis proteinase. *J Periodontal Res*, 33, 408-20.
- DEWHIRST, F. E., CHEN, T., IZARD, J., PASTER, B. J., TANNER, A. C., YU, W. H., LAKSHMANAN, A. & WADE, W. G. 2010. The human oral microbiome. *J Bacteriol*, 192, 5002-17.
- DIAZ, P. I., CHALMERS, N. I., RICKARD, A. H., KONG, C., MILBURN, C. L., PALMER, R. J., JR. & KOLENBRANDER, P. E. 2006. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol*, 72, 2837-48.
- ELIADES, G. C., TZOUTZAS, J. G. & VOUGIOUKLAKIS, G. J. 1991. Surface alterations on dental restorative materials subjected to an air-powder abrasive instrument. *J Prosthet Dent*, 65, 27-33.
- ENGELBERGER, T., HEFTI, A., KALLENBERGER, A. & RATEITSCHAK, K. H. 1983. Correlations among Papilla Bleeding Index, other clinical indices and histologically determined inflammation of gingival papilla. *J Clin Periodontol*, 10, 579-89.

- EPSTEIN, S. 1951. Analysis of airbrasive procedures in dental practice. *J Am Dent Assoc*, 43, 578-82.
- ERCOLI, C. & CATON, J. G. 2018. Dental prostheses and tooth-related factors. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S223-s236.
- ERIBE, E. R. K. & OLSEN, I. 2017. Leptotrichia species in human infections II. *J Oral Microbiol*, 9, 1368848.
- FAN, J. & CATON, J. G. 2018. Occlusal trauma and excessive occlusal forces: Narrative review, case definitions, and diagnostic considerations. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S214-s222.
- FAVERI, M., MAYER, M. P., FERES, M., DE FIGUEIREDO, L. C., DEWHIRST, F. E. & PASTER, B. J. 2008. Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiol Immunol*, 23, 112-8.
- FENG, Z. & WEINBERG, A. 2006. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000*, 40, 50-76.
- FINE, D. H., PATIL, A. G. & LOOS, B. G. 2018. Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S103-s119.
- FLEMMIG, T. F., ARUSHANOV, D., DAUBERT, D., ROTHEN, M., MUELLER, G. & LEROUX, B. G. 2012. Randomized controlled trial assessing efficacy and safety of glycine powder air polishing in moderate-to-deep periodontal pockets. *J Periodontol*, 83, 444-52.
- FLEMMIG, T. F., HETZEL, M., TOPOLL, H., GERSS, J., HAEBERLEIN, I. & PETERSILKA, G. 2007. Subgingival debridement efficacy of glycine powder air polishing. *J Periodontol*, 78, 1002-10.
- FRANKENBERGER, R., LOHBAUER, U., TAY, F. R., TASCHNER, M. & NIKOLAENKO, S. A. 2007. The effect of different air-polishing powders on dentin bonding. *J Adhes Dent*, 9, 381-9.
- FREEDMAN, G. 1994. MICROABRASIVE TECHNOLOG I ES: ADVANCED HARD TISSUE PREPARATION TECHNIQUES.
- GENCO, R. J. 1991. Using antimicrobial agents to manage periodontal diseases. *J Am Dent Assoc*, 122, 30-8.
- GENCO, R. J., GROSSI, S. G., HO, A., NISHIMURA, F. & MURAYAMA, Y. 2005. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J Periodontol*, 76, 2075-84.
- GOLDSTEIN, R. E. & PARKINS, F. M. 1994. Air-abrasive technology: its new role in restorative dentistry. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 125, 551-557.
- GOYAL, S., GUPTA, G., THOMAS, B., BHAT, K. M. & BHAT, G. S. 2013. Stress and periodontal disease: The link and logic!! *Ind Psychiatry J*, 22, 4-11.
- GRENIER, D., ROY, S., CHANDAD, F., PLAMONDON, P., YOSHIOKA, M., NAKAYAMA, K. & MAYRAND, D. 2003. Effect of inactivation of the Arg- and/or Lys-gingipain gene on selected virulence and physiological properties of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 71, 4742-8.
- GRIFFEN, A. L., BECKER, M. R., LYONS, S. R., MOESCHBERGER, M. L. & LEYS, E. J. 1998. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol*, 36, 3239-42.
- GUI, M. J., DASHPER, S. G., SLAKESKI, N., CHEN, Y. Y. & REYNOLDS, E. C. 2016. Spheres of influence: *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Mol Oral Microbiol*, 31, 365-78.

- GUO, Y., NGUYEN, K. A. & POTEPA, J. 2010. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. *Periodontol* 2000, 54, 15-44.
- HAIJSHENGALLIS, G., DARVEAU, R. P. & CURTIS, M. A. 2012. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*, 10, 717-25.
- HAIJSHENGALLIS, G. & LAMONT, R. J. 2012. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*, 27, 409-19.
- HECK JR, K. L., VAN BELLE, G. & SIMBERLOFF, D. 1975. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology*, 56, 1459-1461.
- HEITZ-MAYFIELD, L. J. A. & SALVI, G. E. 2018. Peri-implant mucositis. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S257-s266.
- HERRERA, D., RETAMAL-VALDES, B., ALONSO, B. & FERES, M. 2018. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *J Clin Periodontol*, 45 Suppl 20, S78-S94.
- HOFFMANN, T., JOHN, M., KERSCHBAUM, T., MICHEELIS, W., POTTHOFF, P., REICH, E., REIS, U., REITER, F., SCHIFFNER, U. & SCHROEDER, E. 2006. Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV). Köln. *Mikrozensus: Fragen zur Gesundheit (2009a): Verteilung der Bevölkerung auf Body-Mass-Index-Gruppen in*, 31.
- HOLMSTRUP, P., PLEMONS, J. & MEYLE, J. 2018. Non-plaque-induced gingival diseases. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S28-s45.
- HOMER, K. A., WHILEY, R. A. & BEIGHTON, D. 1990. Proteolytic activity of oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett*, 55, 257-60.
- HORNING, G. M., COBB, C. M. & KILLOY, W. J. 1987. Effect of an air-powder abrasive system on root surfaces in periodontal surgery. *J Clin Periodontol*, 14, 213-20.
- HUMAN MICROBIOME PROJECT, C. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 207-14.
- HUNTER, K. M., HOLBOROW, D. W., KARDOS, T. B., LEE-KNIGHT, C. T. & FERGUSON, M. M. 1989. Bacteraemia and tissue damage resulting from air polishing. *Br Dent J*, 167, 275-8.
- JEPSEN, S., CATON, J. G., ALBANDAR, J. M., BISSADA, N. F., BOUCHARD, P., CORTELLINI, P., DEMIREL, K., DE SANCTIS, M., ERCOLI, C., FAN, J., GEURS, N. C., HUGHES, F. J., JIN, L., KANTARCI, A., LALLA, E., MADIANOS, P. N., MATTHEWS, D., MCGUIRE, M. K., MILLS, M. P., PRESHAW, P. M., REYNOLDS, M. A., SCULEAN, A., SUSIN, C., WEST, N. X. & YAMAZAKI, K. 2018. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S237-s248.
- JEPSEN, S., KESCHULL, M. & DESCHNER, J. 2011. [Relationship between periodontitis and systemic diseases]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 54, 1089-96.
- JIANG, W., LING, Z., LIN, X., CHEN, Y., ZHANG, J., YU, J., XIANG, C. & CHEN, H. 2014. Pyrosequencing analysis of oral microbiota shifting in various caries states in childhood. *Microb Ecol*, 67, 962-9.

- JIE BAO, G., KARI, K., TERVAHARTIALA, T., SORSA, T. & MEURMAN, J. H. 2008. Proteolytic Activities of Oral Bacteria on ProMMP-9 and the Effect of Synthetic Proteinase Inhibitors. *Open Dent J*, 2, 96-102.
- JOBINS, J., BAGG, J., PARSONS, K., FINLAY, I., ADDY, M. & NEWCOMBE, R. G. 1992. Oral carriage of yeasts, coliforms and staphylococci in patients with advanced malignant disease. *J Oral Pathol Med*, 21, 305-8.
- JORDAN, A. R. & MICHEELIS, W. 2016. *Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie-(DMS IV)*, Deutscher Zahnärzte Verlag DÄV Köln.
- JORDAN, R. A., BODECHTEL, C., HERTRAMPF, K., HOFFMANN, T., KOCHER, T., NITSCHKE, I., SCHIFFNER, U., STARK, H., ZIMMER, S. & MICHEELIS, W. 2014. The Fifth German Oral Health Study (Funfte Deutsche Mundgesundheitsstudie, DMS V) - rationale, design, and methods. *BMC Oral Health*, 14, 161.
- JOSHIPURA, K. J., HUNG, H. C., RIMM, E. B., WILLETT, W. C. & ASCHERIO, A. 2003. Periodontal disease, tooth loss, and incidence of ischemic stroke. *Stroke*, 34, 47-52.
- JOSHIPURA, K. J., RIMM, E. B., DOUGLASS, C. W., TRICHOPOULOS, D., ASCHERIO, A. & WILLETT, W. C. 1996. Poor oral health and coronary heart disease. *J Dent Res*, 75, 1631-6.
- JOST-BRINKMANN, P. G. 1998. The influence of air polishers on tooth enamel. An in-vitro study. *J Orofac Orthop*, 59, 1-16.
- KADOWAKI, T. & YAMAMOTO, K. 2003. Suppression of virulence of Porphyromonas gingivalis by potent inhibitors specific for gingipains. *Curr Protein Pept Sci*, 4, 451-8.
- KATO, T., YAMAZAKI, K., NAKAJIMA, M., DATE, Y., KIKUCHI, J., HASE, K., OHNO, H. & YAMAZAKI, K. 2018. Oral Administration of Porphyromonas gingivalis Alters the Gut Microbiome and Serum Metabolome. *mSphere*, 3.
- KEIJSER, B. J., ZAURA, E., HUSE, S. M., VAN DER VOSSSEN, J. M., SCHUREN, F. H., MONTIJN, R. C., TEN CATE, J. M. & CRIELAARD, W. 2008. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res*, 87, 1016-20.
- KIM, J. & AMAR, S. 2006. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. *Odontology*, 94, 10-21.
- KINANE, D. F., GALICIA, J. C., GORR, S. U., STATHOPOULOU, P. G. & BENAKANAKERE, M. 2008. P. gingivalis interactions with epithelial cells. *Front Biosci*, 13, 966-84.
- KINANE, J. A., BENAKANAKERE, M. R., ZHAO, J., HOSUR, K. B. & KINANE, D. F. 2012. Porphyromonas gingivalis influences actin degradation within epithelial cells during invasion and apoptosis. *Cell Microbiol*, 14, 1085-96.
- KÖNÖNEN, E., PAJU, S., PUSSINEN, P. J., HYVÖNEN, M., DI TELLA, P., SUOMINEN-TAIPALE, L. & KNUUTTILA, M. 2007. Population-based study of salivary carriage of periodontal pathogens in adults. *J Clin Microbiol*, 45, 2446-51.
- KONTTURI-NARHI, V., MARKKANEN, S. & MARKKANEN, H. 1989. The gingival effects of dental airpolishing as evaluated by scanning electron microscopy. *J Periodontol*, 60, 19-22.
- KONTTURI-NARHI, V., MARKKANEN, S. & MARKKANEN, H. 1990. Effects of airpolishing on dental plaque removal and hard tissues as evaluated by scanning electron microscopy. *J Periodontol*, 61, 334-8.
- KOZLOVSKY, A., ARTZI, Z., NEMCOVSKY, C. E. & HIRSHBERG, A. 2005. Effect of air-polishing devices on the gingiva: histologic study in the canine. *J Clin Periodontol*, 32, 329-34.

- KRISHNAN, K., CHEN, T. & PASTER, B. J. 2017. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis*, 23, 276-286.
- LAMONT, R. J. & JENKINSON, H. F. 1998. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62, 1244-63.
- LANGE, D. E., PLAGMANN, H. C., EENBOOM, A. & PROMESBERGER, A. 1977. [Clinical methods for the objective evaluation of oral hygiene]. *Dtsch Zahnarztl Z*, 32, 44-7.
- LEWIS, J. P. 2010. Metal uptake in host-pathogen interactions: role of iron in *Porphyromonas gingivalis* interactions with host organisms. *Periodontol 2000*, 52, 94-116.
- LIEBENBERG, W. H. & CRAWFORD, B. J. 1997. Subcutaneous, orbital, and mediastinal emphysema secondary to the use of an air-abrasive device. *Quintessence Int*, 28, 31-8.
- LU, H., ZHAO, Y., FENG, X., HE, L. & MENG, H. 2019. Microbiome in maintained periodontitis and its shift over a single maintenance interval of 3 months. *J Clin Periodontol*, 46, 1094-1104.
- LUBOW, R. M. & COOLEY, R. L. 1986. Effect of air-powder abrasive instrument on restorative materials. *J Prosthet Dent*, 55, 462-5.
- LYNCH, S. V. & PEDERSEN, O. 2016. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med*, 375, 2369-2379.
- MACFARLANE, T. W. & MASON, D. K. 1974. Changes in the oral flora in Sjogren's syndrome. *J Clin Pathol*, 27, 416-9.
- MACK, F., MOJON, P., BUDTZ-JØRGENSEN, E., KOCHER, T., SPLIETH, C., SCHWAHN, C., BERNHARDT, O., GESCH, D., KORDASS, B., JOHN, U. & BIFFAR, R. 2004. Caries and periodontal disease of the elderly in Pomerania, Germany: results of the Study of Health in Pomerania. *Gerodontology*, 21, 27-36.
- MAHLENDORFF, M. 1989. [Evaluation of the relationships between abrasion and surface alterations after professional tooth cleaning]. *Dtsch Zahnarztl Z*, 44, 203-4.
- MARAKI, S. & PAPADAKIS, I. S. 2015. *Rothia mucilaginosa* pneumonia: a literature review. *Infect Dis (Lond)*, 47, 125-9.
- MENG, H., REN, X., TIAN, Y., FENG, X., XU, L., ZHANG, L., LU, R., SHI, D. & CHEN, Z. 2011. Genetic study of families affected with aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*, 56, 87-101.
- MICHALOWICZ, B. S., DIEHL, S. R., GUNSOLLEY, J. C., SPARKS, B. S., BROOKS, C. N., KOERTGE, T. E., CALIFANO, J. V., BURMEISTER, J. A. & SCHENKEIN, H. A. 2000. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*, 71, 1699-707.
- MINCHIN, P. R. 1987. An evaluation of the relative robustness of techniques for ecological ordination. *Theory and models in vegetation science*. Springer.
- MORITZ, A., GUTKNECHT, N., SCHOOP, U., GOHARKHAY, K., WERNISCH, J. & SPERR, W. 1996. Alternatives in enamel conditioning: a comparison of conventional and innovative methods. *Journal of clinical laser medicine & surgery*, 14, 133-136.
- MORRISON, A. H. & BERMAN, L. 1953. Evaluation of the airdent unit: preliminary report. *J Am Dent Assoc*, 46, 298-303.
- MOSADDAD, S. A., TAHMASEBI, E., YAZDANIAN, A., REZVANI, M. B., SEIFALIAN, A., YAZDANIAN, M. & TEBYANIAN, H. 2019. Oral microbial biofilms: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 38, 2005-2019.

- MYSAK, J., PODZIMEK, S., SOMMEROVA, P., LYUYA-MI, Y., BARTOVA, J., JANATOVA, T., PROCHAZKOVA, J. & DUSKOVA, J. 2014. Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res*, 2014, 476068.
- NANCI, A. & BOSSHARDT, D. D. 2006. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*, 40, 11-28.
- NEEDLEMAN, I., GARCIA, R., GKRIANAS, N., KIRKWOOD, K. L., KOCHER, T., IORIO, A. D., MORENO, F. & PETRIE, A. 2018. Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S120-s139.
- NEUHAUSER, H., THAMM, M. & ELLERT, U. 2013. [Blood pressure in Germany 2008-2011: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56, 795-801.
- NEWMAN, P. S., SILVERWOOD, R. A. & DOLBY, A. E. 1985. The effects of an airbrasive instrument on dental hard tissues, skin and oral mucosa. *Br Dent J*, 159, 9-12.
- NM, O. B.-S., VEITH, P. D., DASHPER, S. G. & REYNOLDS, E. C. 2003. Porphyromonas gingivalis gingipains: the molecular teeth of a microbial vampire. *Curr Protein Pept Sci*, 4, 409-26.
- OFFENBACHER, S., JARED, H. L., O'REILLY, P. G., WELLS, S. R., SALVI, G. E., LAWRENCE, H. P., SOCRANSKY, S. S. & BECK, J. D. 1998. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol*, 3, 233-50.
- OKSANEN, J., BLANCHET, F. G., FRIENDLY, M., KINDT, R., LEGENDRE, P., MCGLINN, D., MINCHIN, P. R., O'HARA, R., SIMPSON, G. & SOLYMOS, P. 2020. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5-6. 2019.
- OKUDA, K., YAMAMOTO, A., NAITO, Y., TAKAZOE, I., SLOTS, J. & GENCO, R. J. 1986. Purification and properties of hemagglutinin from culture supernatant of Bacteroides gingivalis. *Infect Immun*, 54, 659-65.
- PACE, N. R., OLSEN, G. J. & WOESE, C. R. 1986. Ribosomal RNA phylogeny and the primary lines of evolutionary descent. *Cell*, 45, 325-6.
- PAGE, R. C. 2004. The microbiological case for adjunctive therapy for periodontitis. *J Int Acad Periodontol*, 6, 143-9.
- PALMER, R. J., JR. 2014. Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontol 2000*, 64, 20-39.
- PAPAPANOU, P. N., SANZ, M., BUDUNELI, N., DIETRICH, T., FERES, M., FINE, D. H., FLEMMIG, T. F., GARCIA, R., GIANNOBILE, W. V., GRAZIANI, F., GREENWELL, H., HERRERA, D., KAO, R. T., KEBSCHULL, M., KINANE, D. F., KIRKWOOD, K. L., KOCHER, T., KORNMAN, K. S., KUMAR, P. S., LOOS, B. G., MACHTEI, E., MENG, H., MOMBELLI, A., NEEDLEMAN, I., OFFENBACHER, S., SEYMOUR, G. J., TELES, R. & TONETTI, M. S. 2018. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S173-S182.
- PASTER, B. J., OLSEN, I., AAS, J. A. & DEWHIRST, F. E. 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*, 42, 80-7.
- PATTAMAPUN, K., TIRANATHANAGUL, S., YONGCHAITRAKUL, T., KUWATANASUCHAT, J. & PAVASANT, P. 2003. Activation of MMP-2 by Porphyromonas gingivalis in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*, 38, 115-21.

- PELKA, M. A., ALTMAIER, K., PETSCHT, A. & LOHBAUER, U. 2010. The effect of air-polishing abrasives on wear of direct restoration materials and sealants. *J Am Dent Assoc*, 141, 63-70.
- PETERSILKA, G., FAGGION, C. M., JR., STRATMANN, U., GERSS, J., EHMKE, B., HAEBERLEIN, I. & FLEMMIG, T. F. 2008. Effect of glycine powder air-polishing on the gingiva. *J Clin Periodontol*, 35, 324-32.
- PETERSILKA, G. J. 2011. Subgingival air-polishing in the treatment of periodontal biofilm infections. *Periodontol 2000*, 55, 124-42.
- PETERSILKA, G. J., BELL, M., HABERLEIN, I., MEHL, A., HICKEL, R. & FLEMMIG, T. F. 2003a. In vitro evaluation of novel low abrasive air polishing powders. *J Clin Periodontol*, 30, 9-13.
- PETERSILKA, G. J., BELL, M., MEHL, A., HICKEL, R. & FLEMMIG, T. F. 2003b. Root defects following air polishing. *J Clin Periodontol*, 30, 165-70.
- PORTER, J. R. 1976. Antony van Leeuwenhoek: tercentenary of his discovery of bacteria. *Bacteriol Rev*, 40, 260-9.
- POTEMPA, J. & TRAVIS, J. 1996. Porphyromonas gingivalis proteinases in periodontitis, a review. *Acta Biochim Pol*, 43, 455-65.
- POZHITKOV, A. E., BEIKLER, T., FLEMMIG, T. & NOBLE, P. A. 2011. High-throughput methods for analysis of the human oral microbiome. *Periodontol 2000*, 55, 70-86.
- PUIG-SILLA, M., MONTIEL-COMPANY, J. M., DASI-FERNANDEZ, F. & ALMERICH-SILLA, J. M. 2017. Prevalence of periodontal pathogens as predictor of the evolution of periodontal status. *Odontology*, 105, 467-476.
- RAVI, R. K., WALTON, K. & KHOSROHEIDARI, M. 2018. MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform for Genomic Analysis. *Methods Mol Biol*, 1706, 223-232.
- REINHARDT, B., KLOCKE, A., NEERING, S. H., SELBACH, S., PETERS, U., FLEMMIG, T. F. & BEIKLER, T. 2019. Microbiological dynamics of red complex bacteria following full-mouth air polishing in periodontally healthy subjects-a randomized clinical pilot study. *Clin Oral Investig*.
- RIBEIRO, A. C., MATARAZZO, F., FAVERI, M., ZECELL, D. M. & MAYER, M. P. 2011. Exploring bacterial diversity of endodontic microbiota by cloning and sequencing 16S rRNA. *J Endod*, 37, 922-6.
- RIGGIO, M. P., MACFARLANE, T. W., MACKENZIE, D., LENNON, A., SMITH, A. J. & KINANE, D. 1996. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis in subgingival plaque samples. *J Periodontol Res*, 31, 496-501.
- SAKAMOTO, M., SIQUEIRA, J. F., JR., RÔÇAS, I. N. & BENNO, Y. 2008. Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol*, 23, 275-81.
- SANZ, M., LAU, L., HERRERA, D., MORILLO, J. M. & SILVA, A. 2004. Methods of detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis and Tannerella forsythensis in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol*, 31, 1034-47.
- SCHWARZ, F., DERKS, J., MONJE, A. & WANG, H. L. 2018. Peri-implantitis. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S267-s290.
- SCHWARZ, F., FERRARI, D., POPOVSKI, K., HARTIG, B. & BECKER, J. 2009. Influence of different air-abrasive powders on cell viability at biologically contaminated

- titanium dental implants surfaces. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 88, 83-91.
- SEYMOUR, G. J., FORD, P. J., CULLINAN, M. P., LEISHMAN, S. & YAMAZAKI, K. 2007. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect*, 13 Suppl 4, 3-10.
- SHADE, A. & HANDELSMAN, J. 2012. Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol*, 14, 4-12.
- SHAH, H. N. & GHARBIA, S. E. 1989. Ecological events in subgingival dental plaque with reference to *Bacteroides* and *Fusobacterium* species. *Infection*, 17, 264-8.
- SHEETS, S. M., POTEMPA, J., TRAVIS, J., CASIANO, C. A. & FLETCHER, H. M. 2005. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 induce cell adhesion molecule cleavage and apoptosis in endothelial cells. *Infect Immun*, 73, 1543-52.
- SHI, M., WEI, Y., HU, W., NIE, Y., WU, X. & LU, R. 2018. The Subgingival Microbiome of Periodontal Pockets With Different Probing Depths in Chronic and Aggressive Periodontitis: A Pilot Study. *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 124.
- SIQUEIRA, J. F., JR., FOUAD, A. F. & RÔÇAS, I. N. 2012. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol*, 4.
- SLATKO, B. E., GARDNER, A. F. & AUSUBEL, F. M. 2018. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*, 122, e59.
- SLOTS, J. & JORGENSEN, M. G. 2000. Efficient antimicrobial treatment in periodontal maintenance care. *J Am Dent Assoc*, 131, 1293-304.
- SMALLEY, J. W., SILVER, J., MARSH, P. J. & BIRSS, A. J. 1998. The periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* binds iron protoporphyrin IX in the mu-oxo dimeric form: an oxidative buffer and possible pathogenic mechanism. *Biochem J*, 331 (Pt 3), 681-5.
- SOCRANSKY, S. S. & HAFFAJEE, A. D. 1994. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*, 5, 7-25.
- SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., CUGINI, M. A., SMITH, C. & KENT, R. L., JR. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, 25, 134-44.
- SOLBIATI, J. & FRIAS-LOPEZ, J. 2018. Metatranscriptome of the Oral Microbiome in Health and Disease. *J Dent Res*, 97, 492-500.
- SREENIVASAN, P. K. & PRASAD, K. V. V. 2017. Distribution of dental plaque and gingivitis within the dental arches. *J Int Med Res*, 45, 1585-1596.
- STATHOPOULOU, P. G., GALICIA, J. C., BENAKANAKERE, M. R., GARCIA, C. A., POTEMPA, J. & KINANE, D. F. 2009. *Porphyromonas gingivalis* induce apoptosis in human gingival epithelial cells through a gingipain-dependent mechanism. *BMC Microbiol*, 9, 107.
- SUSIN, C., VALLE, P., OPPERMANN, R. V., HAUGEJORDEN, O. & ALBANDAR, J. M. 2005. Occurrence and risk indicators of increased probing depth in an adult Brazilian population. *J Clin Periodontol*, 32, 123-9.
- SUZUKI, N., YOSHIDA, A. & NAKANO, Y. 2005. Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan Real-Time PCR. *Clin Med Res*, 3, 176-85.
- TONETTI, M. S., GREENWELL, H. & KORNMAN, K. S. 2018. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S159-S172.
- TONG, W. M. & CHAN, Y. 2020. GenePiper, a Graphical User Interface Tool for Microbiome Sequence Data Mining. *Microbiol Resour Announc*, 9.

- TROMBELLI, L., FRANCESCHETTI, G. & FARINA, R. 2015. Effect of professional mechanical plaque removal performed on a long-term, routine basis in the secondary prevention of periodontitis: a systematic review. *J Clin Periodontol*, 42 Suppl 16, S221-36.
- UMEDA, M., CHEN, C., BAKKER, I., CONTRERAS, A., MORRISON, J. L. & SLOTS, J. 1998. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J Periodontol*, 69, 1111-8.
- VAN DEN BRINK, P. J. & BRAAK, C. J. T. 1999. Principal response curves: Analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18, 138-148.
- VAN DYKE, T. E. & SHEILESH, D. 2005. Risk factors for periodontitis. *J Int Acad Periodontol*, 7, 3-7.
- VAN WINKELHOFF, A. J., LOOS, B. G., VAN DER REIJDEN, W. A. & VAN DER VELDEN, U. 2002. Porphyromonas gingivalis, Bacteroides forsythus and other putative periodontal pathogens in subjects with and without periodontal destruction. *J Clin Periodontol*, 29, 1023-8.
- VERMA, D., GARG, P. K. & DUBEY, A. K. 2018. Insights into the human oral microbiome. *Arch Microbiol*, 200, 525-540.
- WADE, W. G. 2004. Non-culturable bacteria in complex commensal populations. *Adv Appl Microbiol*, 54, 93-106.
- WADE, W. G. 2013. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*, 69, 137-43.
- WEAKS, L. M., LESCHER, N. B., BARNES, C. M. & HOLROYD, S. V. 1984. Clinical evaluation of the Prophy-Jet as an instrument for routine removal of tooth stain and plaque. *J Periodontol*, 55, 486-8.
- WHITMORE, S. E. & LAMONT, R. J. 2014. Oral bacteria and cancer. *PLoS Pathog*, 10, e1003933.
- WICKHAM, H. 2009. Elegant graphics for data analysis. *Media*, 35, 10.1007.
- WICKHAM, H. 2011. ggplot2. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, 3, 180-185.
- WICKSTROM, C., HERZBERG, M. C., BEIGHTON, D. & SVENSATER, G. 2009. Proteolytic degradation of human salivary MUC5B by dental biofilms. *Microbiology*, 155, 2866-72.
- WOLF, H. F., RATEITSCHAK, E. M. & RATEITSCHAK, K. H. 2004. *Parodontologie*, Georg Thieme Verlag.
- WU, C. Z., YUAN, Y. H., LIU, H. H., LI, S. S., ZHANG, B. W., CHEN, W., AN, Z. J., CHEN, S. Y., WU, Y. Z., HAN, B., LI, C. J. & LI, L. J. 2020. Epidemiologic relationship between periodontitis and type 2 diabetes mellitus. *BMC Oral Health*, 20, 204.
- XIMENEZ-FYVIE, L. A., HAFFAJEE, A. D. & SOCRANSKY, S. S. 2000. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol*, 27, 648-57.
- XU, H., HAO, W., ZHOU, Q., WANG, W., XIA, Z., LIU, C., CHEN, X., QIN, M. & CHEN, F. 2014. Plaque bacterial microbiome diversity in children younger than 30 months with or without caries prior to eruption of second primary molars. *PLoS One*, 9, e89269.
- YAMASHITA, Y. & TAKESHITA, T. 2017. The oral microbiome and human health. *J Oral Sci*, 59, 201-206.
- YILMAZ, O. 2008. The chronicles of Porphyromonas gingivalis: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology*, 154, 2897-903.

- ZAURA, E., KEIJSER, B. J., HUSE, S. M. & CRIELAARD, W. 2009. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol*, 9, 259.
- ZEE, K. Y. 2009. Smoking and periodontal disease. *Aust Dent J*, 54 Suppl 1, S44-50.
- ZHOU, J. & WINDSOR, L. J. 2006. Porphyromonas gingivalis affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *J Periodontal Res*, 41, 47-54.

## **8 Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Thomas Beikler für das Überlassen dieses Dissertationsthemas und das mir entgegengebrachte Vertrauen und die Freiheit bei der Gestaltung und Durchführung dieser Dissertationsschrift.

Einen herzlichen Dank möchte ich gegenüber Frau Dr. rer. medic. Ulrike Peters für die stets geduldige Unterstützung und Betreuung bei fachlichen Fragen und die eingebrachte konstruktive Kritik aussprechen.

Aufgrund ihrer immerwährenden liebevollen Unterstützung meines beruflichen Werdegangs bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern.

## **9 Lebenslauf**

Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

## 10 Eidesstattliche 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....