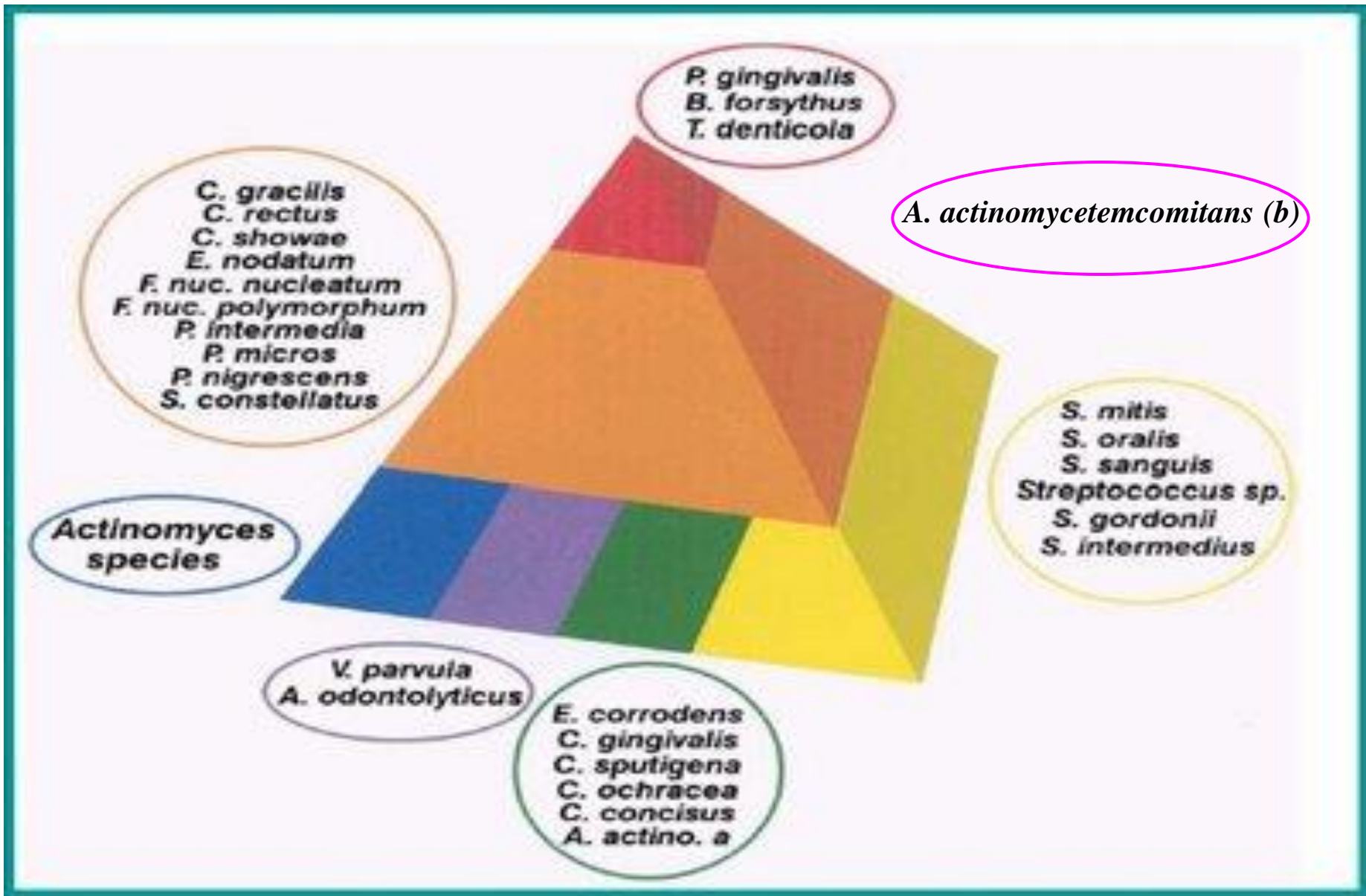


Parodontopathogene Bakterien

- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- *Porphyromonas gingivalis*
Tannerella forsythia
Treponema denticola
- *Prevotella intermedia* / *Prevotella nigrescens*
Micromonas micros
Fusobacterium nucleatum / *Fusobacterium periodonticum*
- *Campylobacter rectus*
Eubacterium nodatum
- *Eikenella corrodens*
Capnocytophaga spp. (*gingivalis*, *sputigena*, *ochracea*)
Streptococcus constellatus u.a.
Actinomyces spp.

Parodontopathogene Bakterien



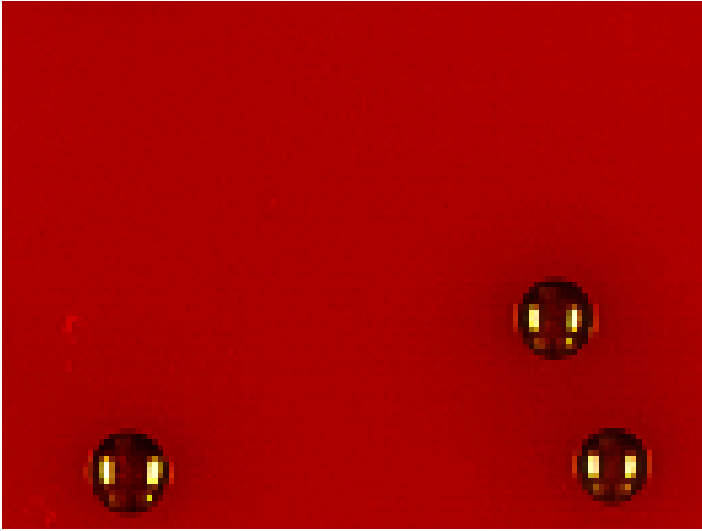
Wann ist eine Spezies parodontopathogen ?

- Gehäuftes Vorkommen der Bakterien in progressiven Taschen, geringes oder kein Auftreten in gesunden sites
- Expression von Virulenzfaktoren
- Eliminierung oder Modulation der Virulenzfaktoren führt zu klinischer Besserung

Genco et al. 1996

Aggressive Parodontitis



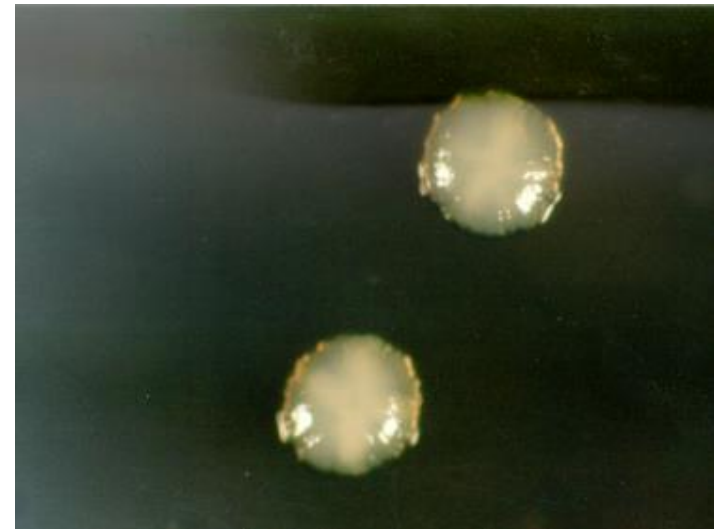
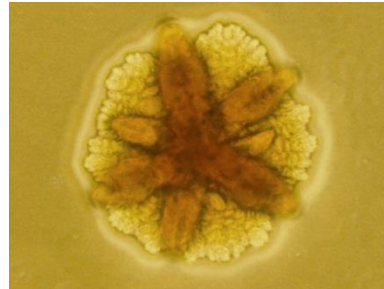


Porphyromonas gingivalis

schwarz-grün gefärbte Kolonien
auf bluthaltigen Nährmedien

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

typische Sternfigur der
Kolonien auf TSBV-Agar

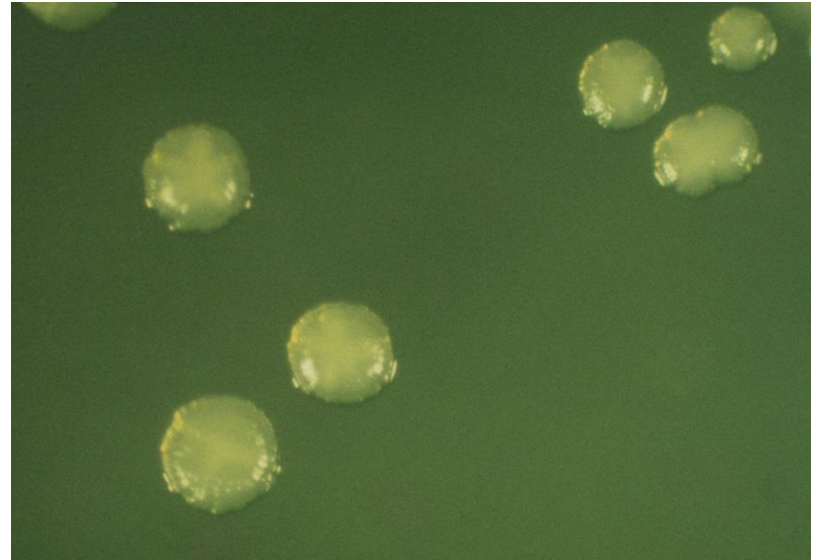


Aggregatibacter actinomycetemcomitans

- 1912 erstmals als Begleitkeim bei Aktinomykose beschrieben - *Bacterium actinomycetemcomitans* (Klinger)
- 1929 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Toplay, Wilson)
- 1979 Slots - TSBV-Agar (Tryptic soy agar with bacitracin and vancomycin)
- 5 Serotypen: a, b, c, d, e → Klinische Isolate meist b
- 2006 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Genus beinhaltet auch *A. aphrophilus* und *A. paraphrophilus* - bis jetzt zu *Haemophilus* gehörend)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

- kapnophil (5 - 10% CO₂-Atmosphäre) wachsendes gramnegatives Stäbchen
- hohe Nachweisfrequenz bei aggressiver Parodontitis, auch bei rekurrierenden Verläufen der chron. Parodontitis
- Elimination bei erfolgreicher Therapie
- erhöhte AK-Titer im Serum und Sulkusfluid bei lokalisierter aggressiver Parodontitis



A. actinomycetemcomitans - Virulenzfaktoren

- Faktoren, die die Kolonisierung fördern
 - Adhäsine (Fimbrien, Vesikel, Glykoprotein)
 - Invasine
 - Bacteriocin (Actinobacillin)
- Faktoren, die mit der Wirtsabwehr interferieren
 - Leukotoxin** (Hemmung d. Phagozytose u. Chemotaxis)
 - Immunsuppressive Proteine
- Faktoren, die Gewebe zerstören
 - Zytotoxin, Kollagenase, Knochenresorptionsstoffe, Stimulation von Entzündungsmediatoren und MMPs (Stimulation von IL 1 α , IL 1 β , IL 6, IL 8 und TNF α durch LPS)
- Faktoren, die die Regeneration von Gewebe hemmen
 - Hemmung der Fibroblastenproliferation
 - Hemmung der Knochenneubildung

A. actinomycetemcomitans - Pathogene Bedeutung



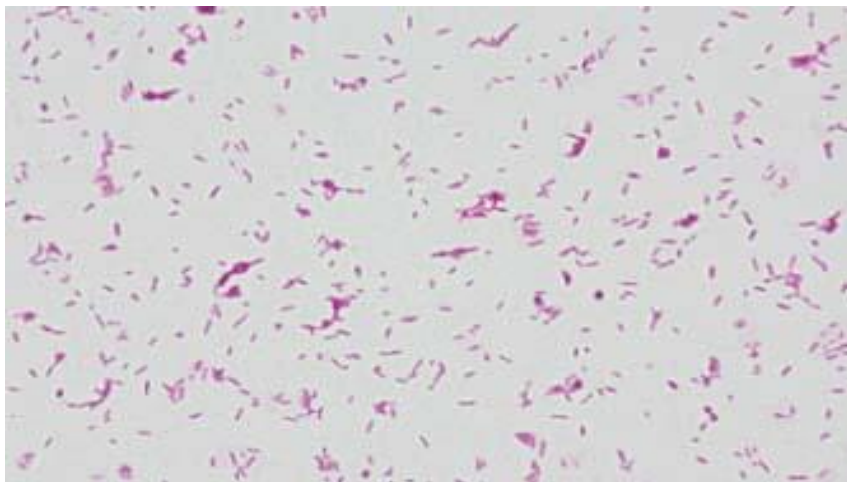
- Aggressive Parodontitis
vorwiegend lokalisiert, aber auch generalisierte Form
Eradikation anstreben! → Kontrolle!
- Extraorale Infektionen
Septikämie, Endokarditis (HACEK-Gruppe), Abszesse
des Gesichts, des Gehirns, der Schilddrüse, des
Bauchraumes

Porphyromonas gingivalis

→ früher als black pigmented bacteroides bezeichnet
dann *B. melaninogenicus ssp. asaccharolyticus*
jetzt *P. gingivalis*



Porphyromonas gingivalis



gramneg. anaerobes Stäbchen
besitzt Fimbrien und Kapsel
benötigt Hämin und Vitamin K1
grün-schwarze Kolonien nach 7 d

Porphyromonas gingivalis

- anaerob wachsendes, gramnegatives Stäbchen
- hohe Nachweisfrequenz bei chronischer Parodontitis
- erhöhte AK-Titer im Serum und Sulkusfluid bei Patienten mit Parodontitis



Porphyromonas gingivalis - Virulenzfaktoren

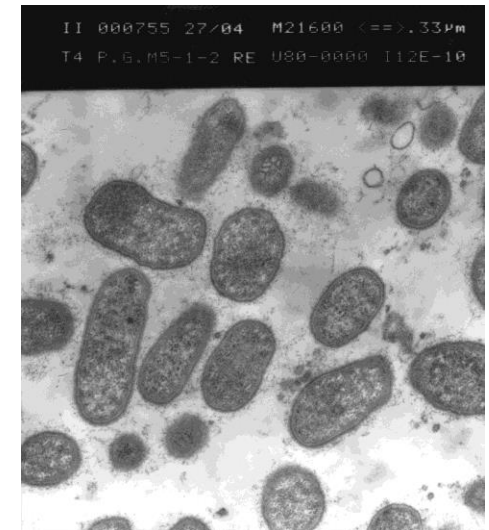
- Kapsel - Phagozytoseschutz
- Fimbrien - Adhäsine
 - 5 Hämagglutinine
 - wichtig für Interaktionen mit Epithelzellen (dabei Persistenz in Epithelzellen möglich)
 - Expression von IL 6, IL8, TGF β
- Arginin- und Lysin-spezifische Proteinasen
 - = Cysteinproteinasen
 - = trypsin like enzymes
 - = Gingipaine
 - = Gingivaine



Porphyromonas gingivalis - Virulenzfaktoren

- Gingipaine - Stimulierung der Freisetzung von MMP (Matrix-Metall-Proteinase)
 - Spaltung von Ig G und Ig A
 - Stimulierung der Freisetzung von IL 1, IL 6 und IL 8 aus Fibroblasten
 - Abbau von IL 6 und IL 8 in Epithelzellen (wichtig für Persistenz)

- Endotoxin (LPS)



Porphyromonas gingivalis - Pathogene Bedeutung

→ Chronische und aggressive Parodontitiden

→ Übertragung durch infizierte Personen

→ Patient ist meist Träger nur eines Genotyps

→

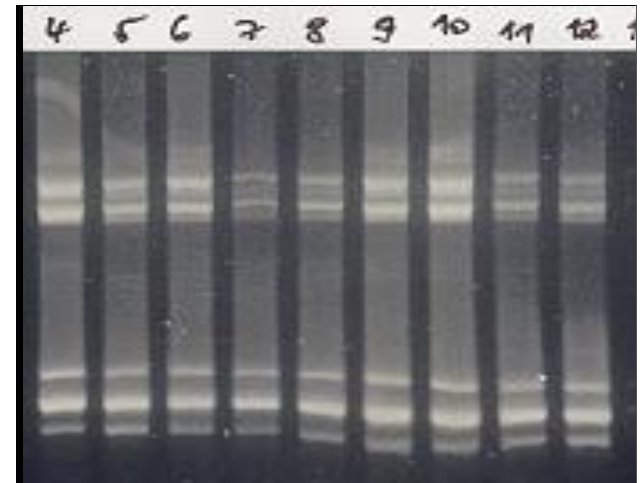


Persistenz von *P. gingivalis*

- *P. gingivalis* - kulturell nachgewiesen
- Geringe genetische Diversität bei einem Patienten



RAPD
von *P. gingivalis*
bei einer Patientin



- Persistenz in Epithelzellen
- Ausschalten der lokalen Immunantwort - Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL 1 β , IL 6, IL 8 und TNF α
- Chronizität der Parodontitis ?

Tannerella forsythia

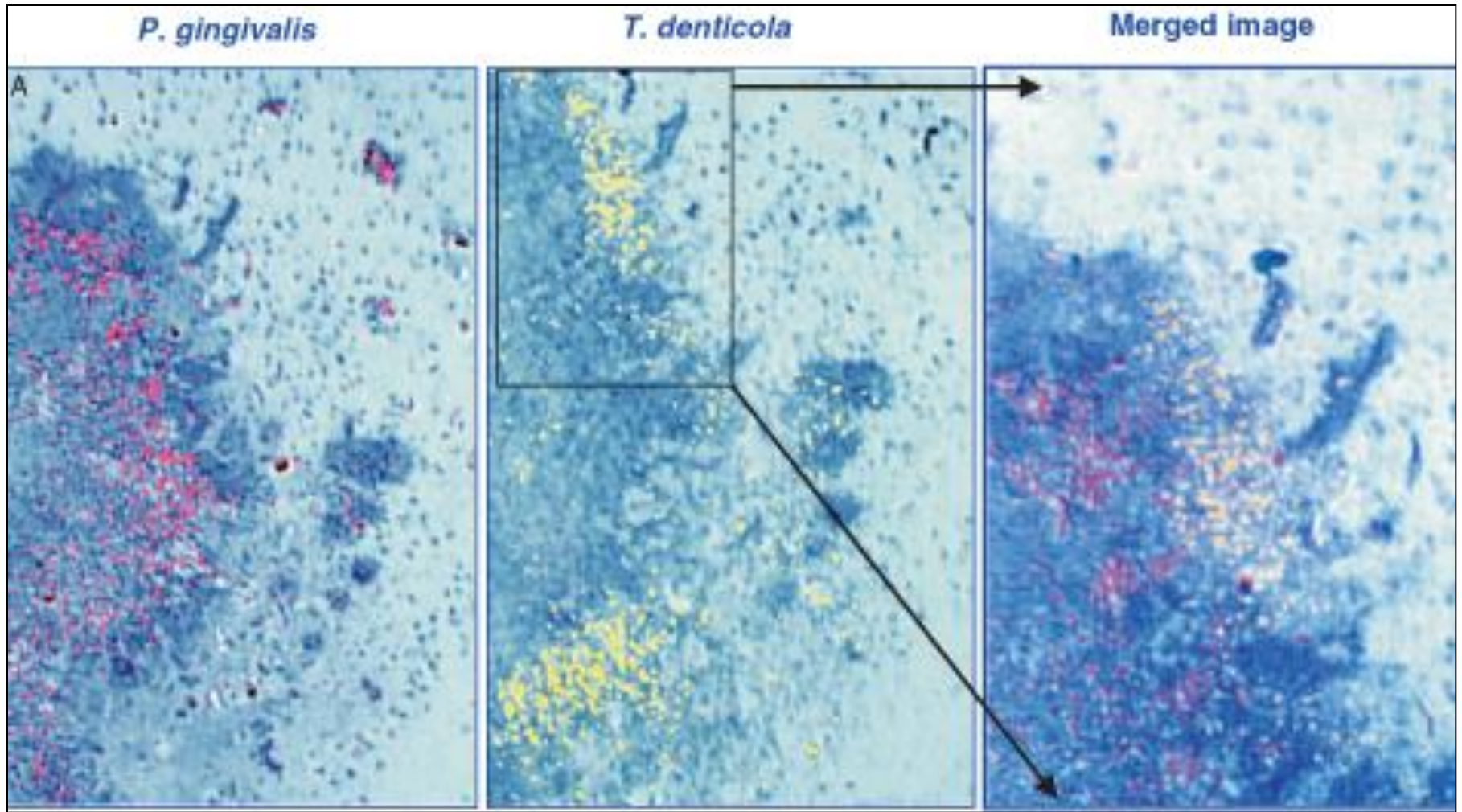
- fusiformes Stäbchen, anaerob, schwer kultivierbar
 - Proteasenaktivität
 - persistiert häufig bei nicht erfolgreich behandelten Patienten
-

Treponema denticola

- Spirochäte, anaerob, sehr schwer kultivierbar
- Proteasenaktivität
- Zytotoxine
- Penetration in Epithel

TREPONEMA DENTICOLA

- Mitglied der Spirochäten, anaerob, schwierig zu kultivieren
- Wahrscheinlich oft Resistenzen gegenüber Antibiotika: Gene für Effluxfunktionen, Integrons
- Virulenz: Proteasen (Zerstörung Epithelbarriere), hohe Beweglichkeit (Invasion in das Gewebe)



Wann ist die mikrobiologische Diagnostik sinnvoll?

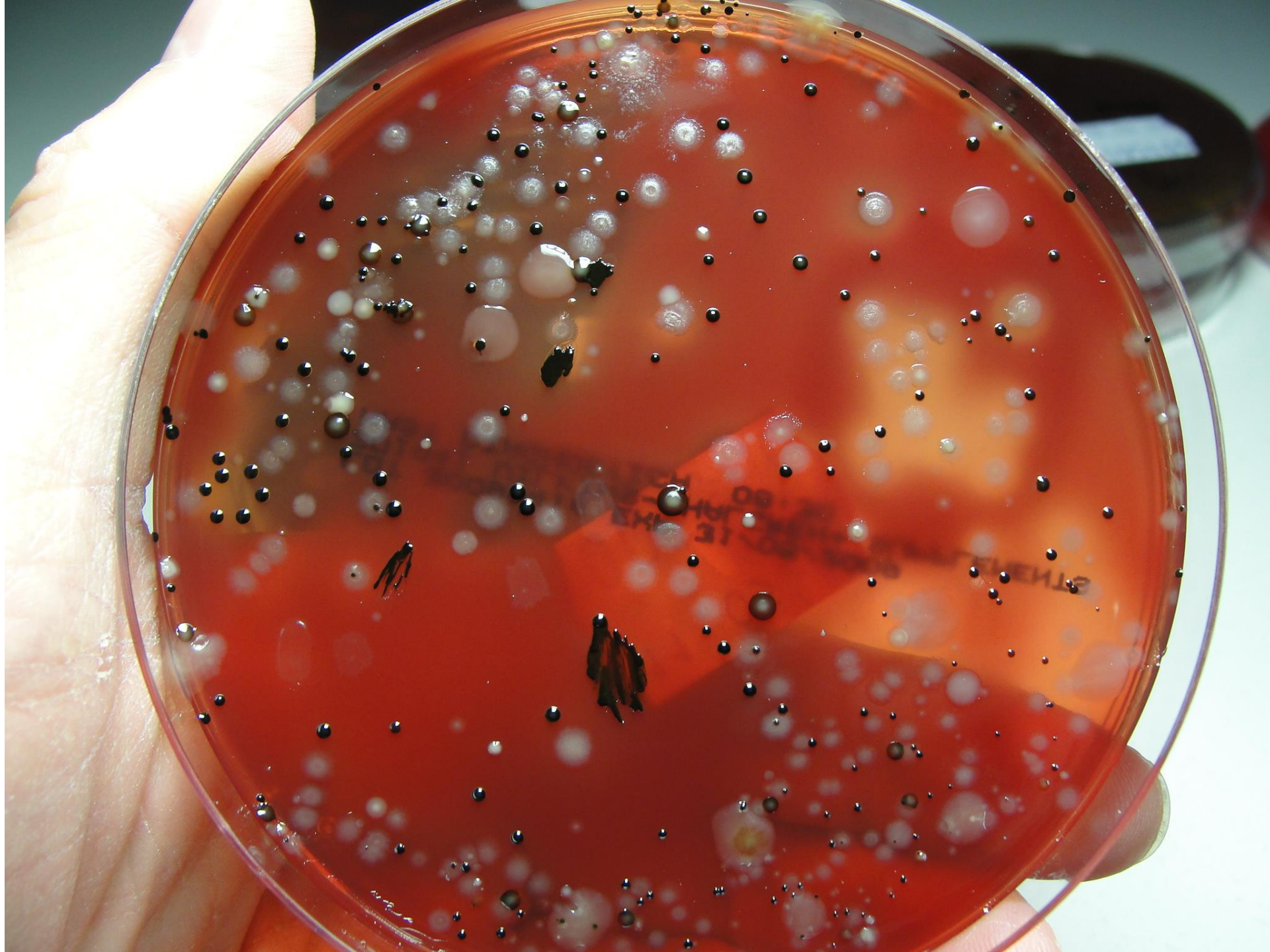
- - Aggressive Parodontitis
 - Vor Beginn einer Antibiotikatherapie
 - Therapierefraktäre Parodontitis
 - Parodontitis bei systemischen Erkrankungen
 - Beurteilung der Rekolonisierung nach abgeschlossener komplexer Parodontitisbehandlung
 - Periimplantitis
 - Kenntnis der parodontopathogenen Flora für eine individuelle Therapieentscheidung

- Frage: Kann die Mikrobiologie Auswahl einer geeigneten individuellen Therapie unterstützen ?

Materialentnahme mittels saugender Papierspitzen



KLASSISCHE VERFAHREN



Mikroskopie und Kultur

Mikroskopische Originalpräparate

- Zellmorphologie der in der Plaque vorkommenden Bakterien
- Nativpräparate sowie verlängert nach Gram gefärbte Präparate: Spirochäten (nur schwer oder nicht kultivierbar)

Anaerobe Kultur

- Lebende Keime sind erforderlich
- Aufwendige Diagnostik => bis zum endgültigen Ergebnis zumeist mehrere Wochen

- Vorteile: Erfassen eines breiten Spektrums an Mikroorganismen
- Möglichkeit der Prüfung der antimikrobiellen Empfindlichkeit der vermeintlichen Erreger.

Differenzierung von Bakterien an Hand verschiedener Merkmale

Merkmale

Kriterien

physiologisch

spezifisches Enzymmuster, Nachweis durch Substratabbau („Bunte Reihe“)



Laborautomat Vitek 2



KULTURVERFAHREN

Vorteile

- Guter Überblick über Gesamtflora (auch Staphylokokken, Enterobakterien)
- Resistenzbestimmung möglich
- Bakterien zur weiteren Charakterisierung vorhanden

Nachteile

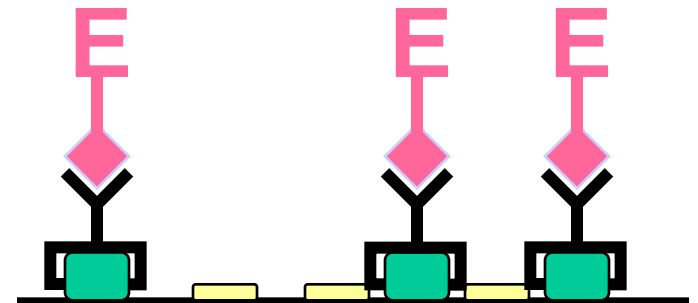
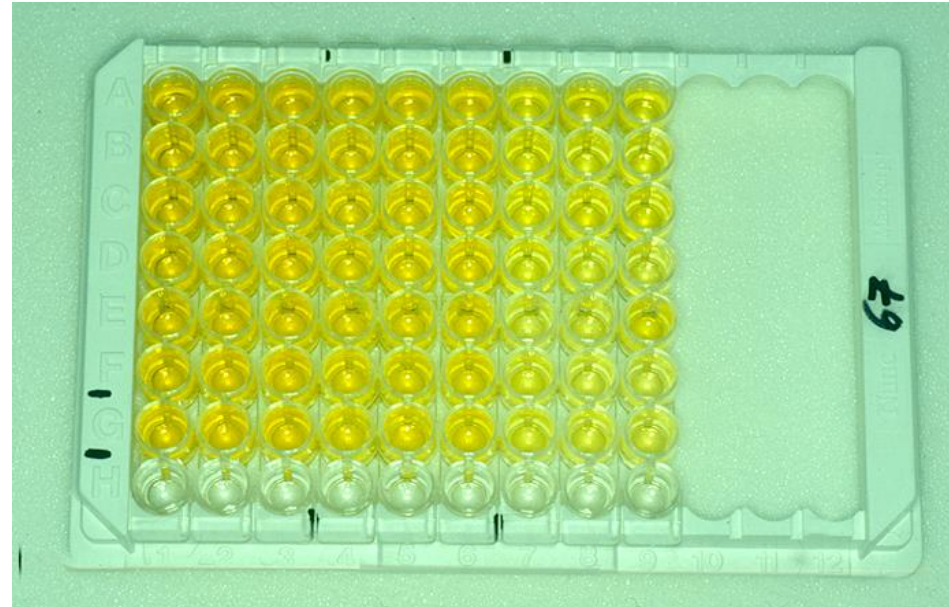
- Aufwändig
- Langer Zeitraum bis endgültiges Ergebnis
- Erfordert optimale Bedingung für Entnahme, Transport
- Nicht kultivierbare Spezies nicht detektierbar
- Grosse Erfahrung notwendig

Nachweis bakterieller Antigene oder Antikörper

ELISA-Techniken

Immunfluoreszenz-Techniken

auch zum Nachweis
humoralen Antikörper genutzt



Andere Möglichkeiten der mikrobiologische Diagnostik

- Nachweis bakterieller Enzyme
- BANA-Test: **B**enzoyl-DL-**A**rginin- α -**N**aphthylamid („Trypsinähnliche Aktivität“)
- *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*,
(*Capnocytophaga* sp.)

(BANA®Test, Oratec, Manassas, VA)



SUBGINGIVALE MICROBIOTA

- Human Oral Microbiome Database (HOMD)
- Auflistung der nachgewiesenen Taxa (kultivierbar und nicht kultivierbar)



From: [J Bacteriol. 2010 October; 192\(19\): 5002–5017.](#)
 Published online 2010 July 23. doi: 10.1128/JB.00542-10.
[Copyright/License](#)

TABLE 1. Phylogenetic distribution of 619 taxa in HOMD version 10

SUBGINGIVALE MICROBIOTA HOMD

- 65% kultivierbar

Phylum	No. (%) of:			
	Taxa ^a	Named species ^b	Unnamed cultivated taxa ^c	Unnamed uncultivated taxa ^d
<i>Bacteria</i>				
<i>Firmicutes</i>	227 (36.7)	120 (52.9)	45 (19.8)	62 (27.3)
<i>Bacteroidetes</i>	107 (17.3)	39 (36.4)	27 (25.2)	41 (38.3)
<i>Proteobacteria</i>	108 (17.1)	70 (66.0)	9 (8.5)	27 (25.5)
<i>Actinobacteria</i>	72 (11.6)	37 (51.4)	25 (34.7)	10 (13.9)
<i>Spirochaetes</i>	49 (7.9)	11 (22.4)	3 (6.1)	35 (71.4)
<i>Fusobacteria</i>	32 (5.2)	12 (37.5)	4 (12.5)	16 (50.0)
TM7	12 (1.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (100.0)
	10 (1.6)	2 (20.0)	0 (0.0)	8 (80.0)
<i>Synergistetes</i>				
<i>Chlamydiae</i>	1 (0.2)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Chloroflexi</i>	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
SR1	1 (0.2)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)
<i>Archaea</i>				
<i>Euryarchaeota</i>	1 (0.2)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total	619 (100)	293 (47.3)	113 (18.3)	213 (34.4)

^aTaxa refer to named species and to phylotypes with or without cultivable members. Phylotypes are defined as clusters whose members have 98.5% full 16S rRNA sequence similarity. The data in this table are based on those in HOMD version 10.

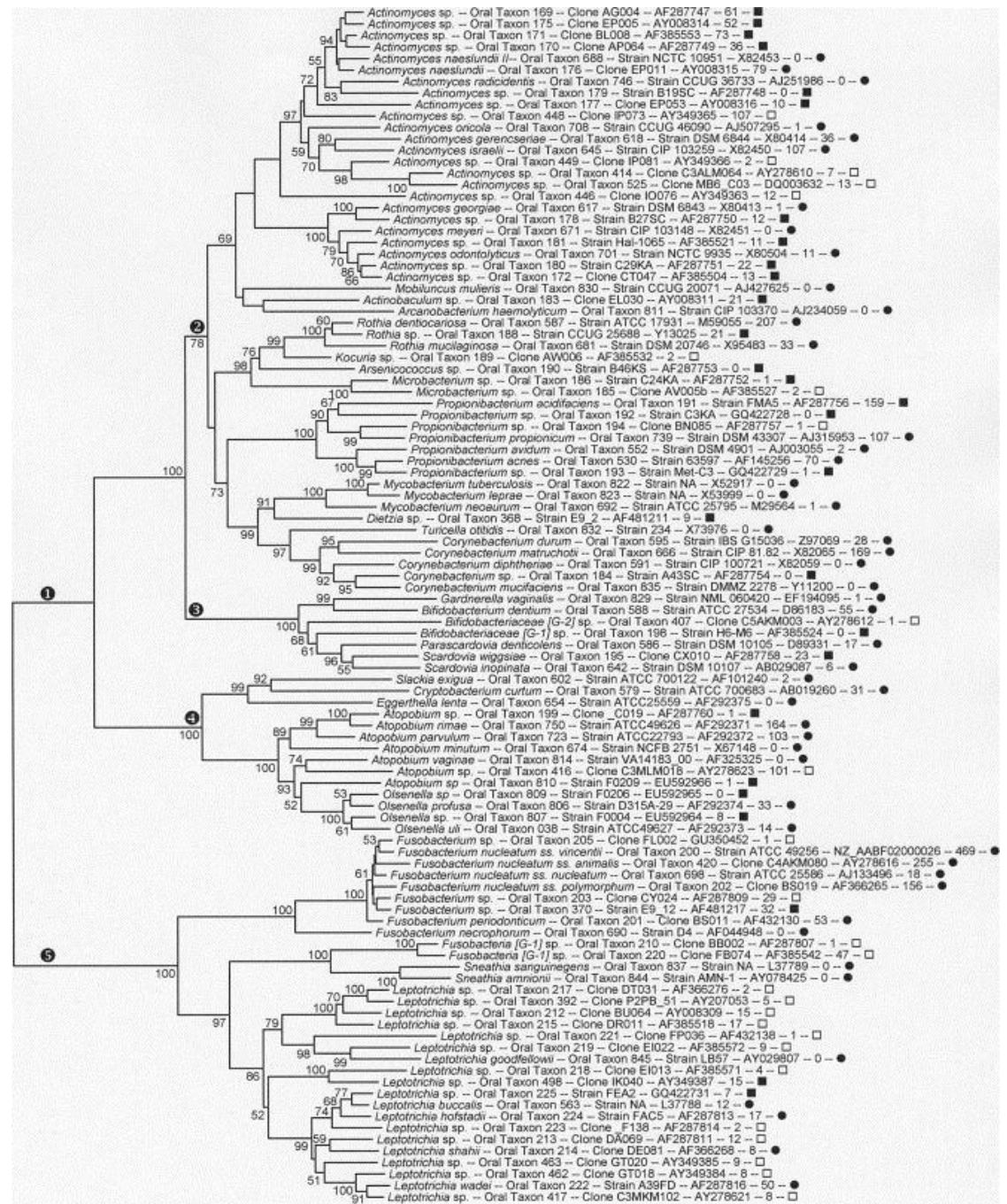
^bNamed species are those with validly published names.

^cUnnamed cultivable taxa are phylotypes that have at least one extant isolate.

^dUncultivated taxa are phylotypes known only from clone sequences.

aus Dewhirst FE et al. J Bacteriol, 2010;192:5002-17)

SUBGINGIVALE MICROBIOTA HOMD



aus Dewhirst FE et al. J Bacteriol, 2010;192:5002-17)

0.05

BEISPIEL DATENBANK

LOCUS NC_002950 **2343476 bp DNA** circular BCT 17-MAR-2011 DEFINITION
Porphyromonas gingivalis W83 chromosome, complete genome. **ACCESSION**
NC_002950 VERSION NC_002950.2 GI:34539880 DBLINK Project: [57641](#)
KEYWORDS . SOURCE Porphyromonas gingivalis W83 ORGANISM
[Porphyromonas gingivalis W83](#) Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales;
Porphyromonadaceae; Porphyromonas. REFERENCE 1 (bases 1 to 2343476)
AUTHORS Nelson,K., Fleishmann,R., DeBoy,R., Paulsen,I., Fouts,D., Eisen,J.,
Daugherty,S., Dodson,R., Durkin,A., Gwinn,M., Haft,D., Kolonay,J., Nelson,W.,
White,O., Mason,T., Tallon,L., Gray,J., Granger,D., Tettelin,H., Dong,H., Galvin,J.,
Duncan,M., Dewhirst,F. and Fraser,C. TITLE Complete Genome Sequence of the Oral
Pathogenic Bacterium Porphyromonas gingivalis Strain W83 JOURNAL J. Bacteriol.
185 (18), 5591-5601 (2003) PUBMED [12949112](#)

**NUKLEINSÄUREBASIERTE
VERFAHREN
GRUNDLAGEN**

Einsatz molekularer Methoden in der Mikrobiologie

- Nachweis und Identifizierung von Bakterienspezies und Varietäten
- Nachweis und Identifizierung schwer anzüchtbarer, nicht anzüchtbarer oder unbekannter Krankheitserreger
- Nachweis von Antibiotikaresistenzdeterminanten
- Epidemiologische Untersuchungen (Differenzierung von Stämmen)

Nachweis genotypischer Merkmale

Plasmide

Bakteriophagen

Spezies-spezifische Gene

Varietäten-spezifische
Gene

Virulenzgene

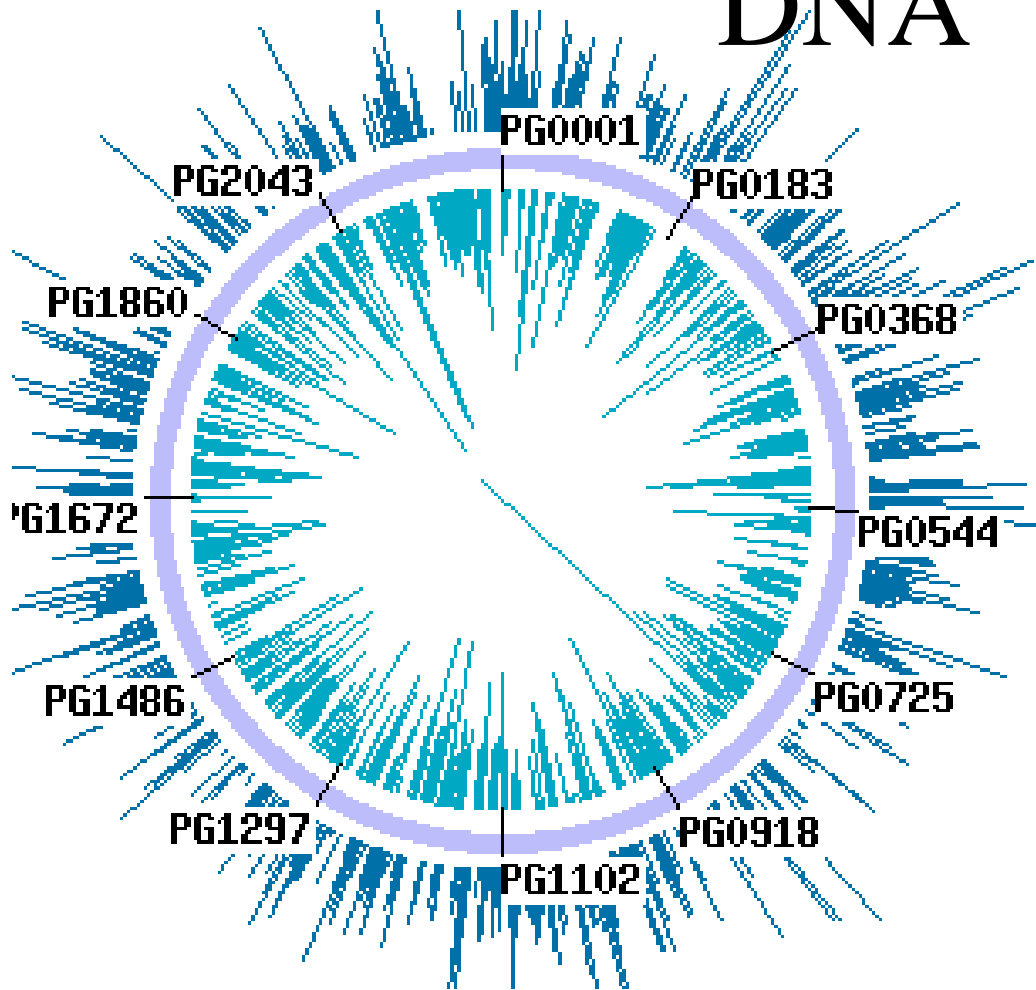
Resistenzgene

DNA-Polymorphismen

Testverfahren auf Nukleinsäureebene

- Seit einigen Jahren in großem Umfang angewendet
Vorteile: keine lebenden Keime sind erforderlich,
Nachweis geringer Keimmengen
- Nachteile: Nachweis nur der Keime, gegen die
Primer eingesetzt werden, Nachweis auch toter
Keime

DNA



16S RDNA

- Kodiert für 16S rRNA (Bestandteil der 30S Untereinheit der Ribosomen)
- Sehr konservative Abschnitte (d.h. nur wenig Variation innerhalb einer Spezies)
- Abschnitte, die bei nahezu allen Bakterien gleich sind
- Andere Abschnitte sind gruppen- und speziesspezifisch

BSP. *PORPHYROMONAS* *GINGIVALIS*

LOCUS POYRR16SC 1474 bp DNA linear BCT 29-JAN-2001

DEFINITION *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 16S ribosomal RNA gene, complete sequence.

ACCESSION L16492

VERSION L16492.1 GI:294288

KEYWORDS . SOURCE *Porphyromonas gingivalis* ORGANISM [Porphyromonas gingivalis](#) Bacteria; Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Porphyromonadaceae; *Porphyromonas*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1474) AUTHORS Paster,B.J., Dewhirst,F.E., Olsen,I. and Fraser,G.J. TITLE Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria JOURNAL J. Bacteriol. 176 (3), 725-732 (1994) PUBMED [8300528](#) FEATURES Location/Qualifiers source 1..1474 /organism="*Porphyromonas gingivalis*" /mol_type="genomic DNA" /db_xref="taxon:[837](#)" /tissue_lib="ATCC 33277"

1 acagtggaga gtttgatcct ggctcaggat naacgctage gataggctna acacatgcaa
61 gtcgaggggc agcatgatct tagcttgcta aggttgatgg cgaccggcgc acgggtgcgt
121 aacgcgtatg caacttgctt tacagagggg gataaccctg tgaagacgg actnaaacg
181 catacacttg tattattgca tgatattaca aggaaatatt tatagctgta agataggcat
241 gcgtcccatt agctagttgg tgaggtaacg gtcaccaag gcgacgatgg gtaggggaac
301 tgagaggttt atccccaca ctggtactga gacacggacc agactcctac gggaggcagc
361 agtgaggaat attggtaaat gggcgagagc ctgaaccagc caagtcgcgt gaaggaagac
421 agtectaagg attgtaaact tcttttatac gggaataacg ggcgatacga gtattgcatt
481 gaatgtaccg taagaataag catcggctaa ctccgtgcca gcagccgcgg tnatacggag
541 natgcnagcg ttatccggat ttattgggtt taaagggtgc gtaggttggt cggtaagtca
601 gcggtgaaac ctgagcgcctc aacgttcagc ctgccgttga aactgccngg cttgagttca
661 gcggcggcag gcggaattcg tgggtgtagcg gtgaaatgca tagatatcac gaggaactcc
721 gattgcgaag gcagcttgcc atactgcgac tgacactgaa gcacgaagc gtgggtatca
781 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc agtaaacgat gattactagg agtttgcgat
841 atacgtcaa gcttccacag cgaaagcgtt aagtaatcca cctggggagt acgccggcaa
901 cggtgaaact caaaggaatt gacgggggccc cgcacaagcg gaggaacatg tggtttaatt
961 cgatgatacg cgaggaacct taccgggat tgaatgtag atgactgatg gtgaaaaccg
1021 tcttccttcg gggcttctat gtaggtgctg catgggtgct gtcagctcgt gccgtgaggt
1081 gtcggcttaa gtgccataac gagegcaacc cacatcggta gttgctaaca gttttcgtc
1141 aggactctac cgagactgcc gtcgtaagc gtgaggaagg tgtggatgac gtcaaatcag
1201 cacggcctt acatccgggg cgacacacgt gttacaatgg gagggacaaa gggcagctac
1261 cgggcgaccg gatgcgaatc tetaaacct tcccagttc ggateggagt ctgcaactcg
1321 actccgtgaa gctggattcg ctagtaatcg cgcatcagcc atggcgcggt gaatacgttc
1381 ccgggccttg tacacaccgc ccgtcaagcc atgggagtcg ggggtacctg aagggcgtaa
1441 ccgcaagggg cgactaggg taataccggt gact

NACHWEIS VON DNA - SONDEN

- komplementär zu DNA
- markiert radioaktiv oder mit Enzym

CHECKERBOARD

CHECKERBOARD

- Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1997 24:324-34.
- Suche im PubMed nach periodontal und Checkerboard ergibt 173 Arbeiten.
- Patientenproben werden auf Membran gebracht und mit der gesamten genomischen DNA ausgewählter Bakterienstämme gekreuzt.

CHECKERBOARD

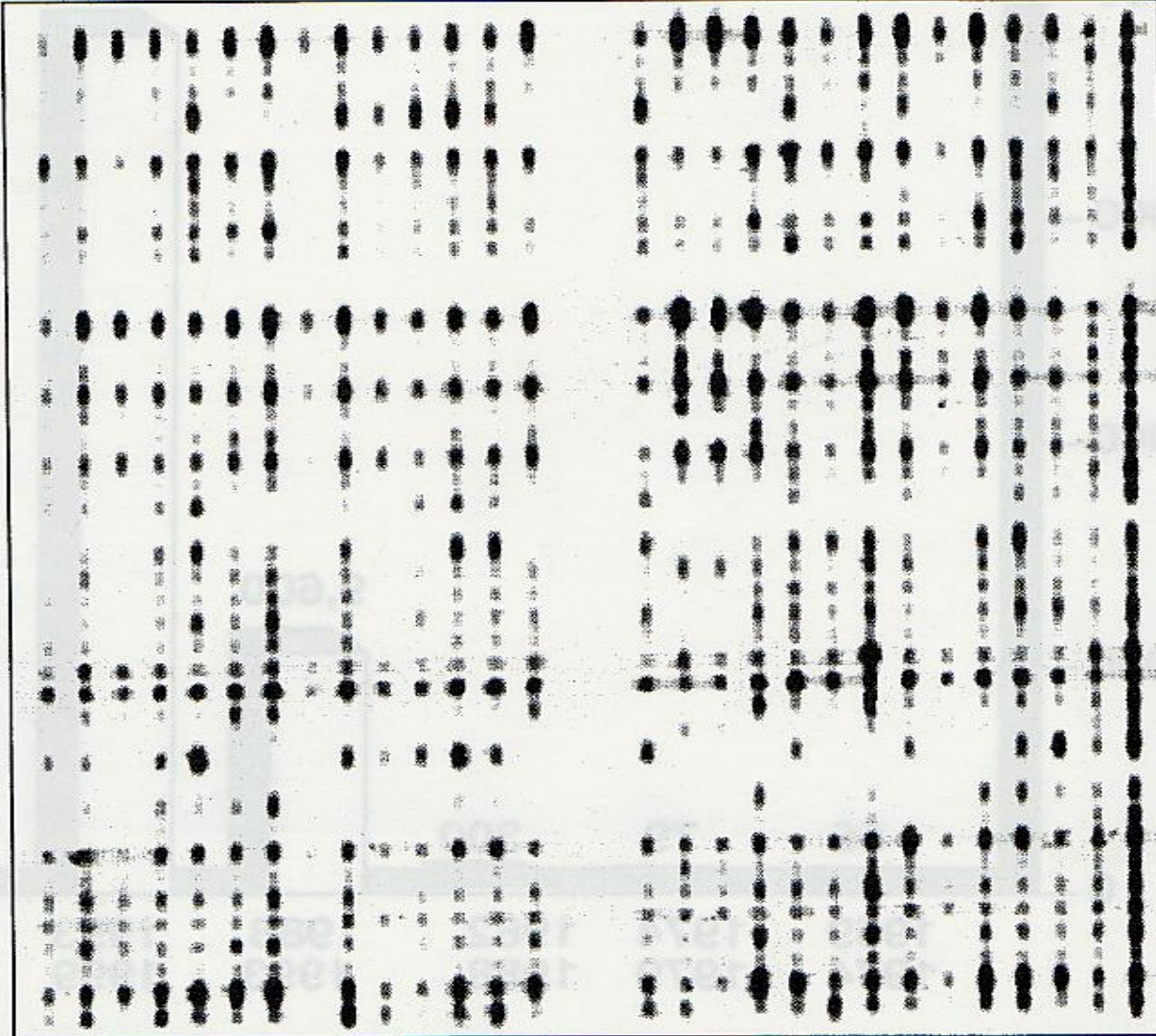
- Aufreinigen bakterieller DNA für «Sonden», Markieren mit Digoxigenin (gesamte genomische DNA einer Bakterienspezies)
- Vorbereitung der Plaqueproben und Standards
- Membran in MiniSlot, Einbringen der aufgearbeiteten Plaqueproben und Standards in horizontale Schlitze des MiniSlots
- Arbeitsschritte zum Anlagern der DNA an Membran
- Entfernen des Minislots und Aufbau des Blotters (Schlitze sind senkrecht zu vorherigen Schlitzen)
- Sonden in Schlitze einbringen

CHECKERBOARD

- Hybridisieren, Waschen, Blocken
- Zugabe von Enzymgekoppelten AK (gegen Dioxigenin)
- Zugabe von Substrat (ECF = enhanced chemofluorescent)
- Messen des Signals mit Fluoreszenz-Scanner und Auswertung mittels Software

CHECKERBOARD

11 12 13 14 15 16 17 21 22 23 24 25 26 27 31 32 33 34 35 36 37 41 42 43 44 45 46 47 10⁵ 10⁶

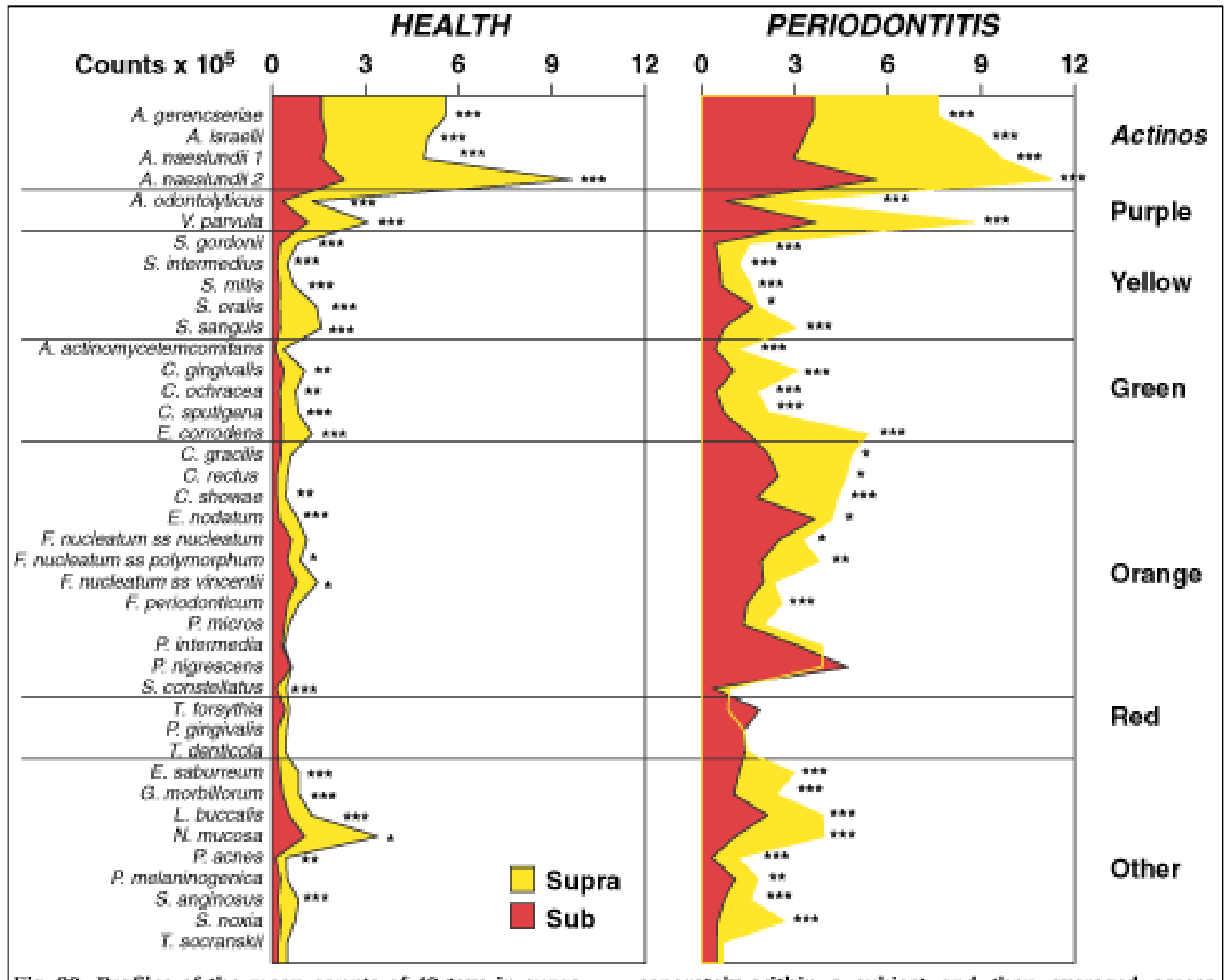


A. naeslundii 1
S. constellatus
E. nodatum
P. gingivalis
A. actinomycetem.
F. nuc. ss vincentii
C. rectus
T. socranskii
E. saburreum
P. micros

V. parvula
A. naeslundii 2
S. anginosus
S. sanguis
A. gerencseriae
S. oralis
C. ochracea
A. israelii
S. intermedius
T. denticola

P. nigrescens
A. odontolyticus
F. nuc. ss polymorphum
C. showae
F. periodonticum
N. mucosa
F. nuc. ss nucleatum
C. gingivalis
S. gordonii
B. forsythus

S. noxia
P. acnes
P. melaninogenica
S. mitis
E. corrodens
G. morbillorum
C. sputigena
L. buccalis
C. gracilis
P. intermedia



aus Socransky & Haffajee. Periodontol 2000,2005;135-187

REALTIME PCR – CHECKERBOARD (STUDIE M. PIETKIEWICZ)

	Negativ beide	Positiv beide	Negativ real-time positiv Checkerb.	Positiv real-time negativ Checkerb.
<i>A. actinom.</i>	35	5	57	2
<i>P. gingivalis</i>	89	1	8	1
<i>T. forsythia</i>	74	5	16	3
<i>T. denticola</i>	61	3	26	9
<i>S. aureus</i>	58	1	27	13

CHECKERBOARD

Vorteile

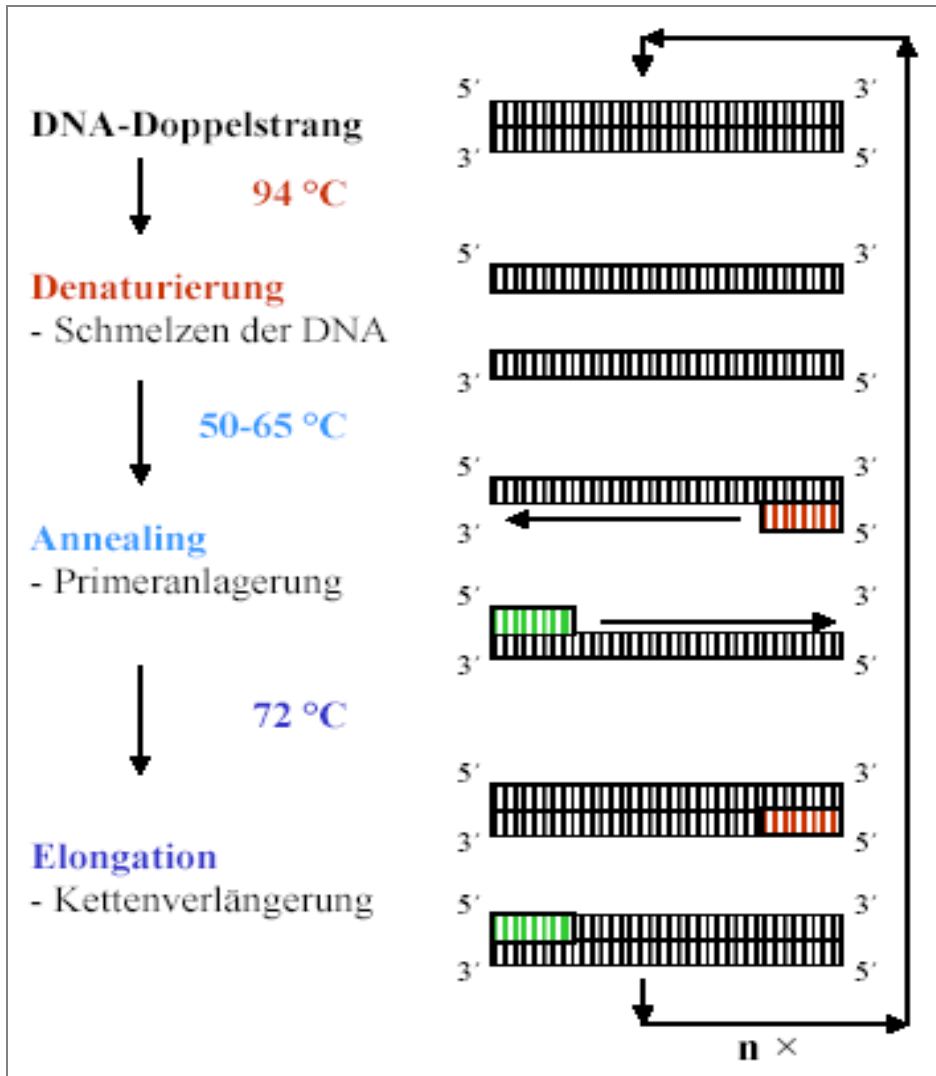
- Keine lebenden Keime erforderlich
- Gleichzeitiger Nachweis von 40-80 Spezies
- Moderater Aufwand und Kosten

Nachteile

- Kreuzreaktionen zwischen ähnlichen Mikroorganismen
- Nachweis nur höherer Keimzahlen
- Nachweis nur der Spezies, gegen die die Sonde gerichtet ist
- Grosse Erfahrung notwendig

**PCR-BASIERTE
METHODEN
(MICROIDENT, REAL-
TIME PCR)**

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.* 1985)



Notwendige Reagenzien

thermostabile DNA-Polymerase

Puffer

Oligonukleotide (*Primer*)

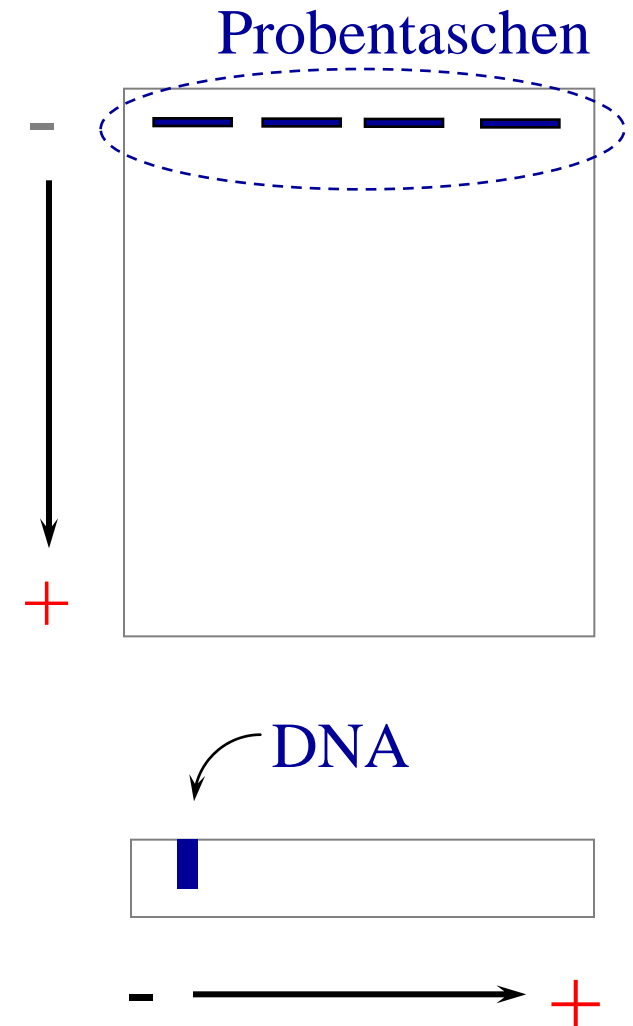
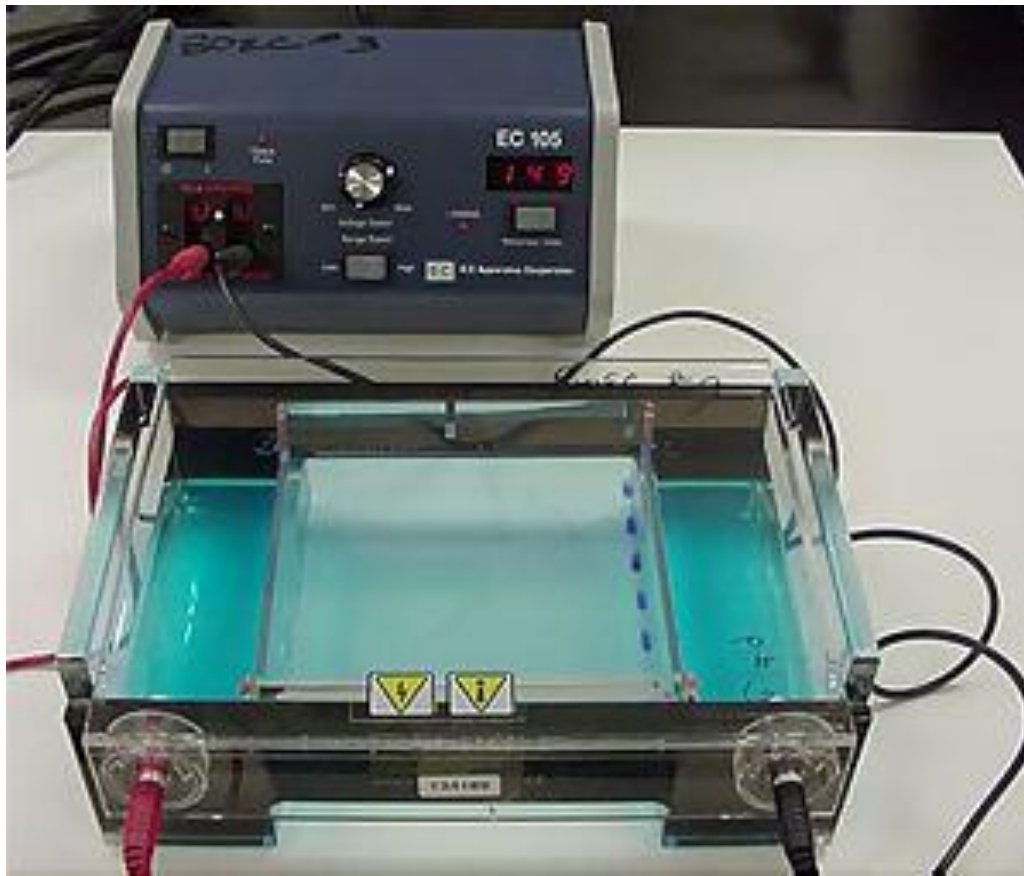
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

DNA als *template*

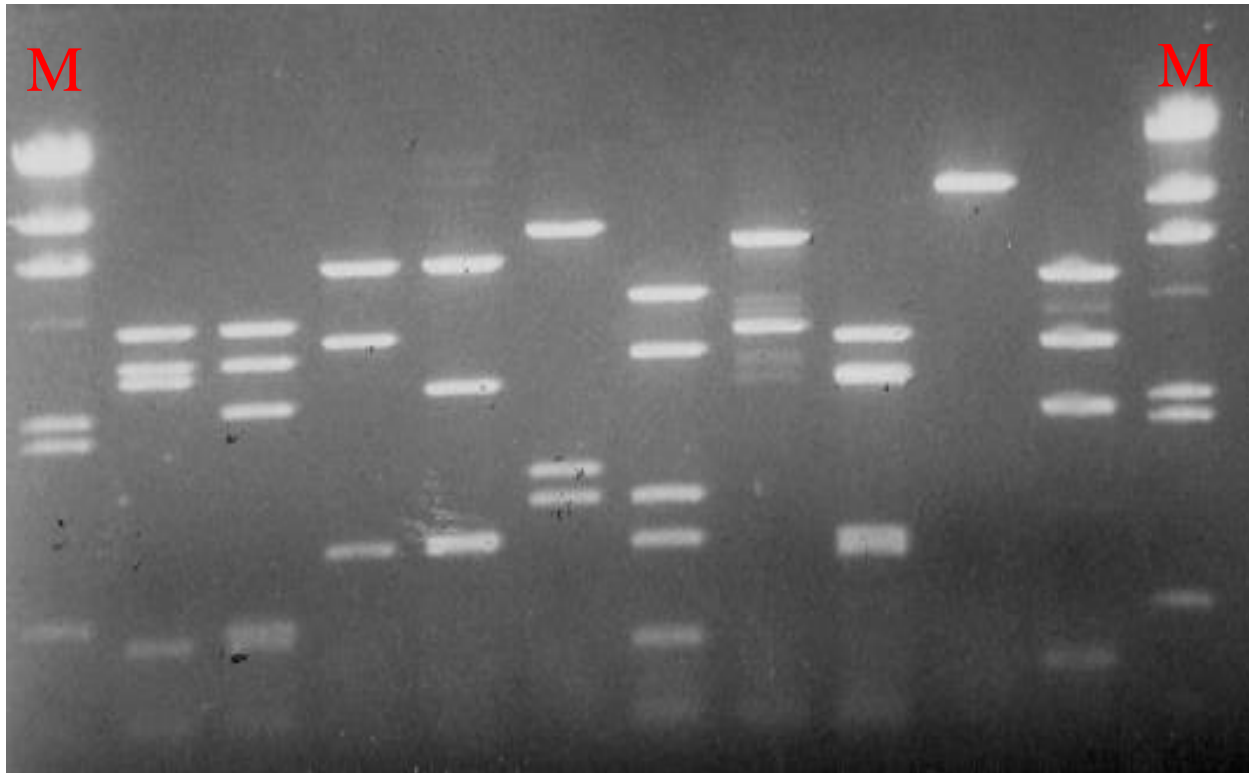
Typisches PCR-Programm

Schritt 1:	Denaturierung	94 °C	5 min	1 ×
Schritt 2:	Denaturierung	94 °C	1 min	} ca. 30 ×
	Annealing	55 °C	1 min	
	Elongation	72 °C	1 min	
Schritt 3:	Elongation	72 °C	5 min	1 ×

Agarose-Gelelektrophorese

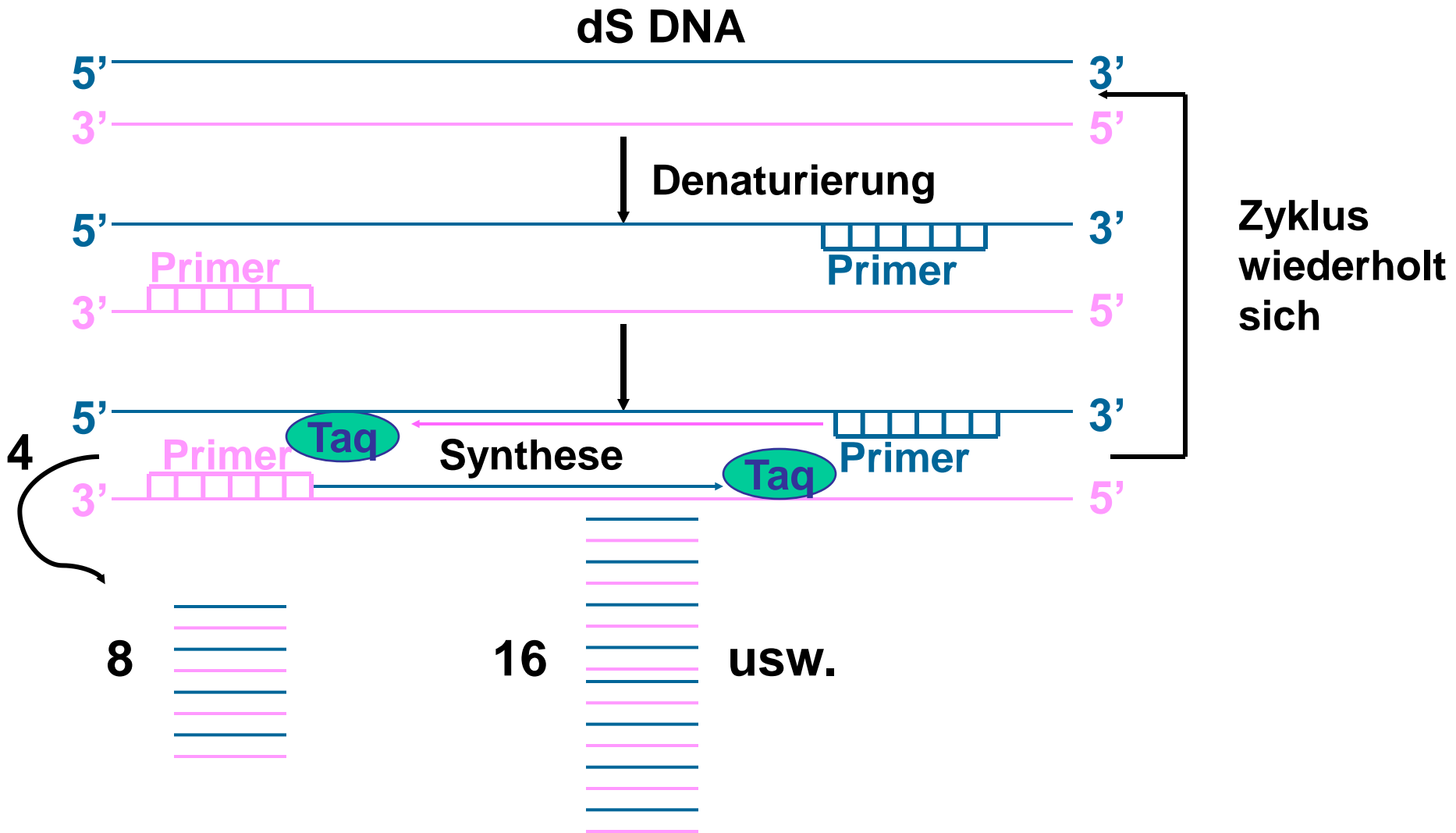


Agarose-Gelelektrophorese



mit Ethidiumbromid gefärbtes Agarose-Gel

Nachweis von DNA - PCR



MicroIdent®

Plaueprobe



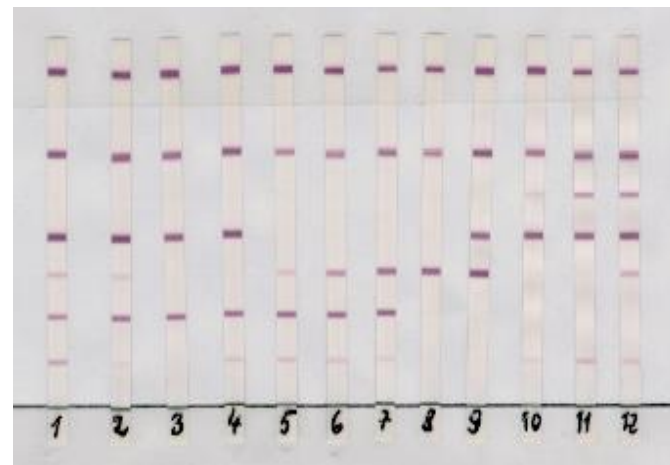
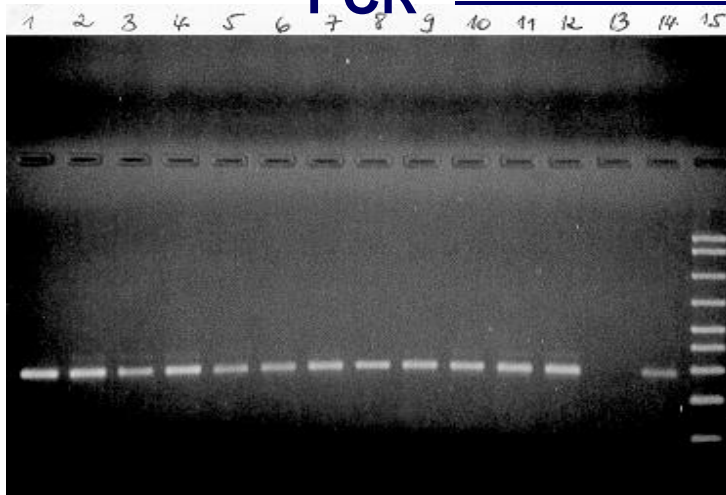
DNA-Extraktion



PCR



reverse Hybridisierung



Hybr.-Kontr.

PCR-Kontr.

A. actinom.

P. gingivalis

P. intermed.

T. forsythia

T. denticola

Vergleich *P. gingivalis*: Kultur - microIDent®

Kultur

microIDent

kein Nachweis

$\leq 10^3$

$\geq 10^4$

gesamt

kein Nachweis

71

10

13

94

$\leq 10^3$

2

1

0

3

$\geq 10^4$

2

2

21

25

75

13

34

122

Sensitivität: 86 %

Spezifität: 76 % ?

Vergleich *A. actinomycetemcomitans*: Kultur - microDent®

Kultur

microDent

kein Nachweis

$\leq 10^3$

$\geq 10^4$

gesamt

kein Nachweis

69

8

3

80

$\leq 10^3$

9 (7)

5 (7)

0

14

$\geq 10^4$

12 (3)

5 (9)

11 (16)

28

90 (79)

18 (24)

14 (19)

122

Sensitivität: 50 % (76 %)

(2. Version microDent)

Spezifität: 86 %

MICROIDENT® EINSCHL. MICROIDENT®PLUS

Vorteile

- Kommerzielles System (CE)
- Einzeldiagnostik durchführbar
- Cut-off
- wenig störanfällig

Nachteile

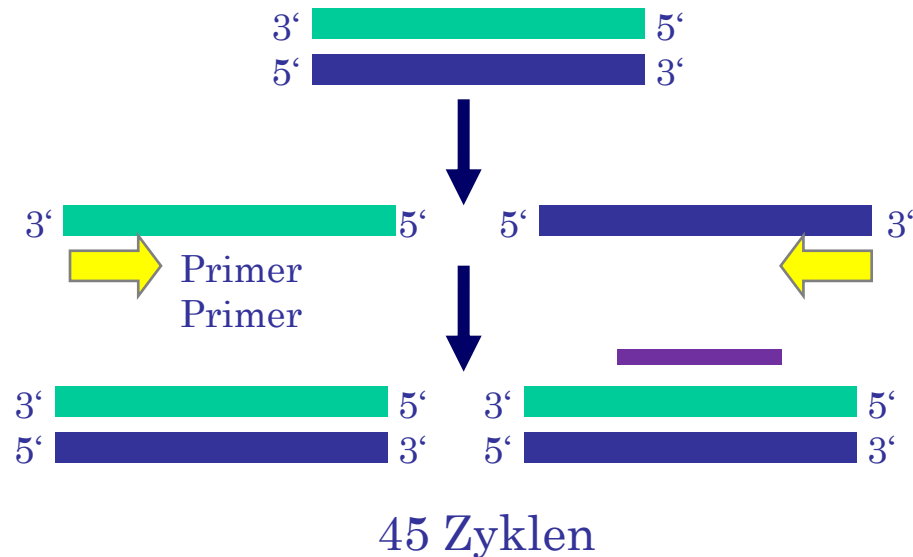
- Kommerzielles System (Kosten)
- Nachweis nur höherer Keimzahlen
- Nachweis nur der Spezies, gegen die Sonde
- Nicht flexibel

real time-PCR (Higuchi *et al.* 1992)

- PCR mit Quantifizierung der Menge des PCR-Produktes, die direkt proportional zur *template*-Menge ist
- Quantifizierung mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen während jedes PCR-Zyklus, dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produktes zu
- Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR

REAL-TIME PCR

DNA-Template + Mastermix (Taq-Polymerase, Nukleotide, Primer, MgCl₂, SybrGreen)

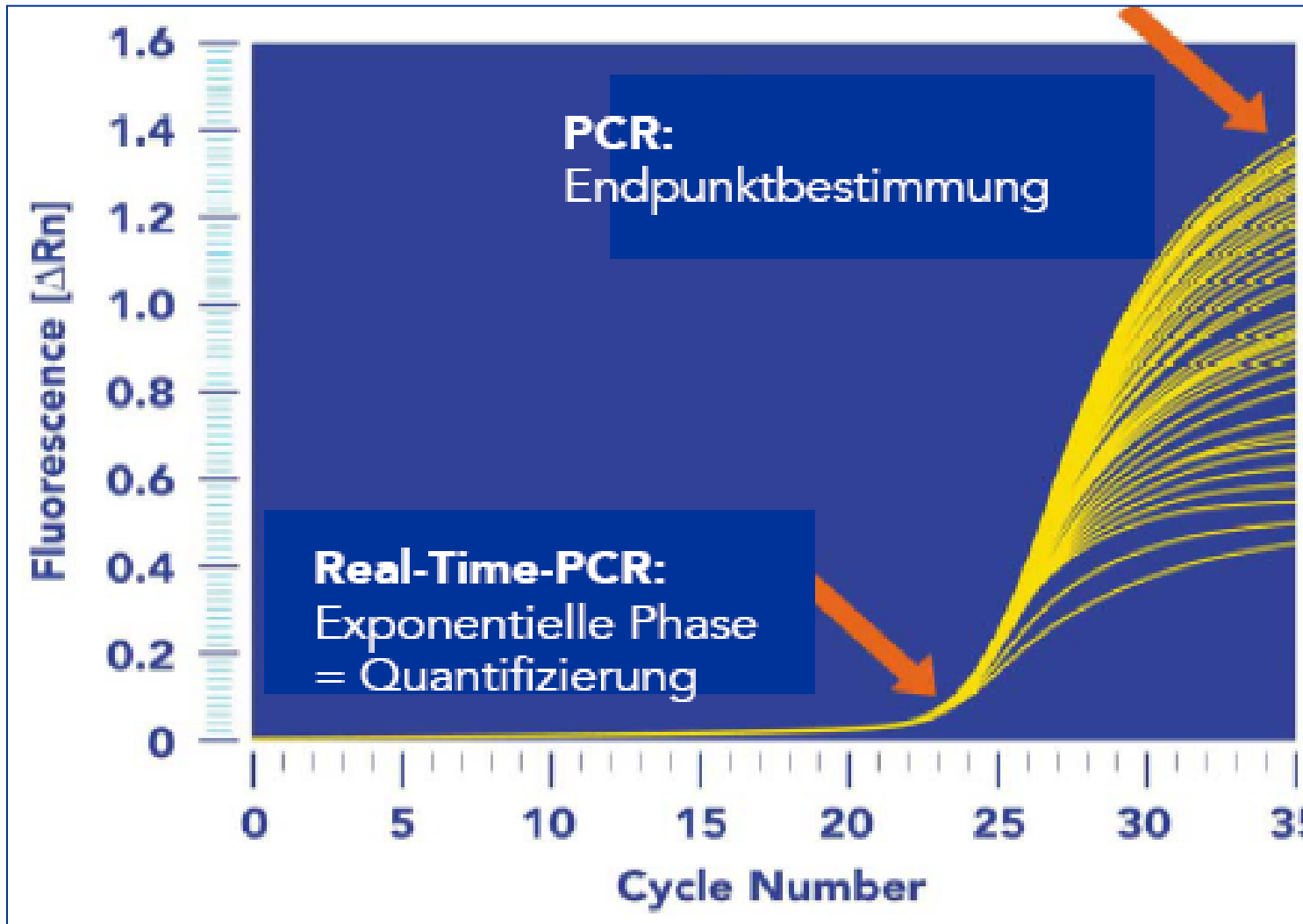


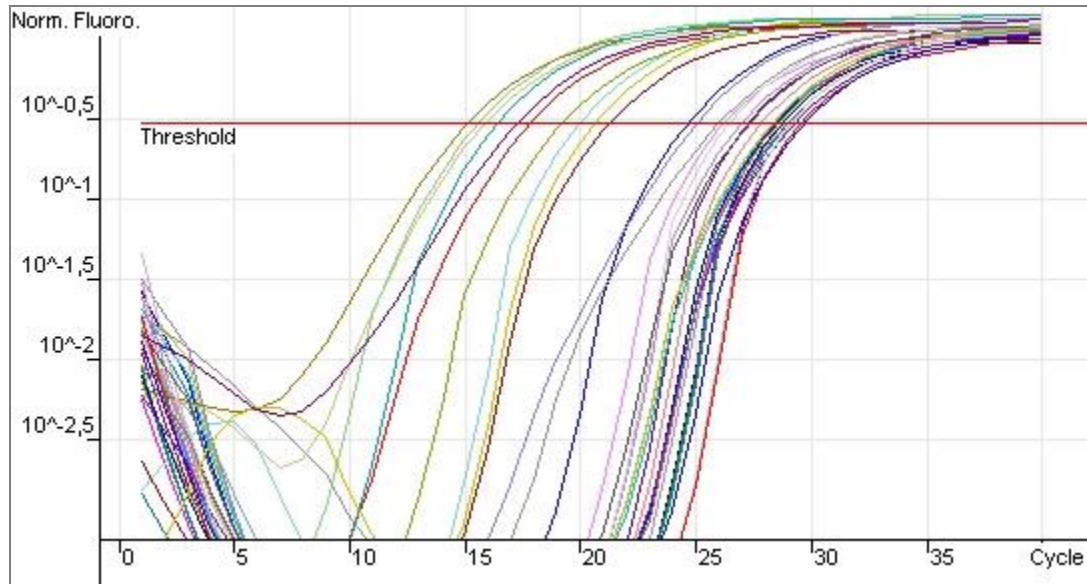
- Denaturierung der dS-DNA
- Annealing der Primer
- Synthese neuer dS-DNA
und Anlagerung von
Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen

Zugabe einer Sonde, die bei Bindung fluoreszierendes Signal abgibt

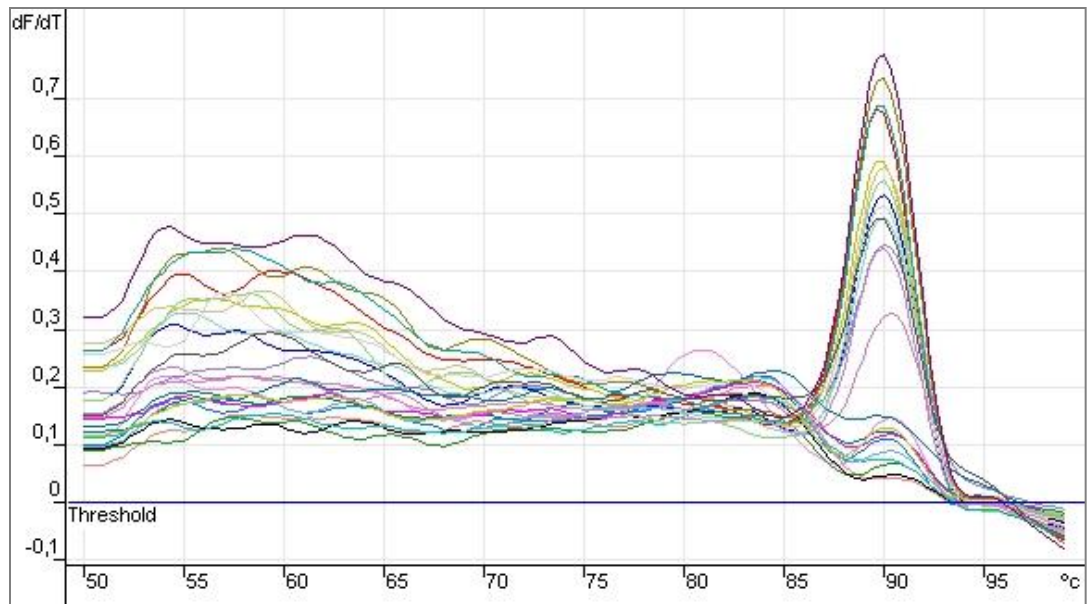
- Fluoreszenzsignal bei Anregung mit Licht $\lambda=470\text{nm}$ und Emission bei $\lambda=510\text{nm}$

real time-PCR (Higuchi et al. 1992)



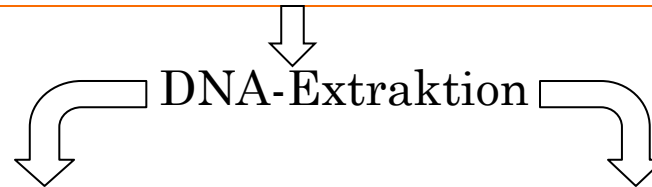


Porphyromonas gingivalis



- 25 Patienten mit schwerer chronischer Parodontitis (Alter: 31-55 Jahre)
- 300 subgingivale Plaqueproben

Gewinnung subgingivaler Plaque mit Paperpoints in je drei Taschen



Real-time PCR (In-Haus)

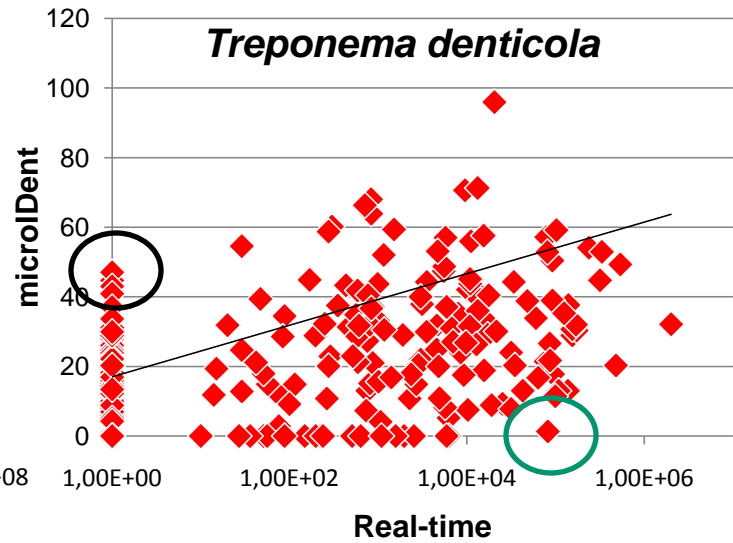
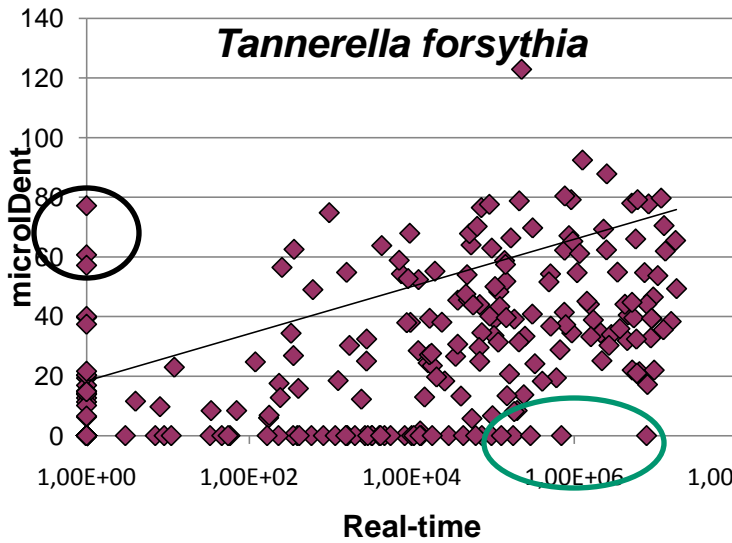
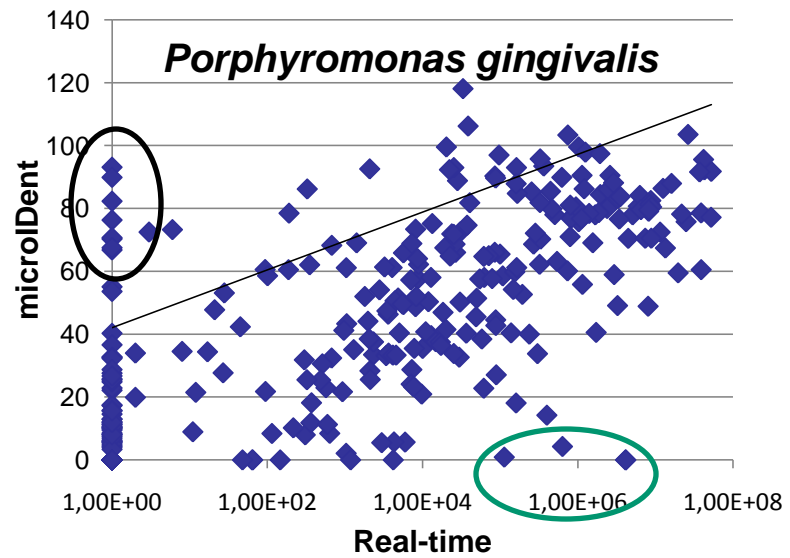
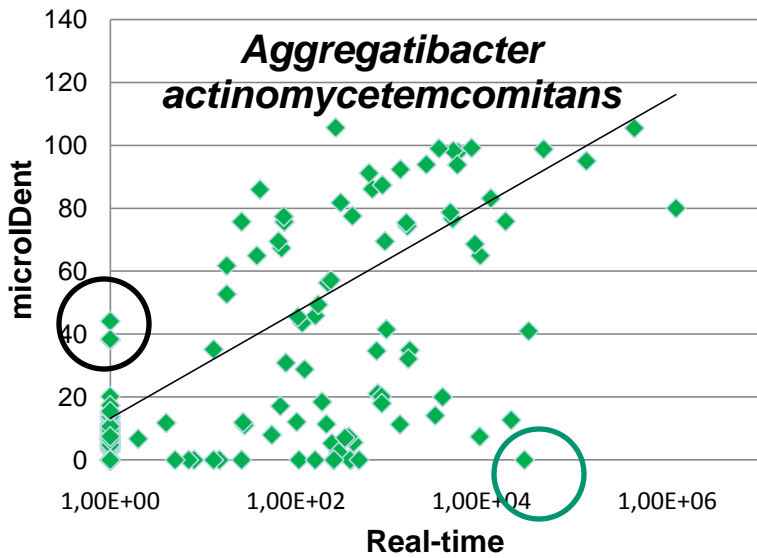
- *A. actinomycetemcomitans*¹
- *P. gingivalis*²
- *T. forsythia*²
- *T. denticola*²
- *P. intermedia*²
- *P. micra* (Accession AF542231)
- *F. nucleatum*³
- *C. rectus*²
- *E. nodatum* (Accession U134041)
- *E. corrodens*²
- *C. gingivalis*⁴ (und Accession AF543295)
- *C. ochracea*⁴ (und Accession U41350)
- *C. sputigena*⁴ (und Accession L14636)

microIdent® einschl. microIdent®plus

- *A. actinomycetemcomitans*
- *P. gingivalis*
- *T. forsythia*
- *T. denticola*
- *P. intermedia*
- *P. micra*
- *F. nucleatum / periodonticum*
- *C. rectus*
- *E. nodatum*
- *E. corrodens*
- Capnocytophaga sp.

(Primer: ¹Rudney et al., 2001; ²Ashimoto et. al, 1996; ³Fouad et al., 2002;

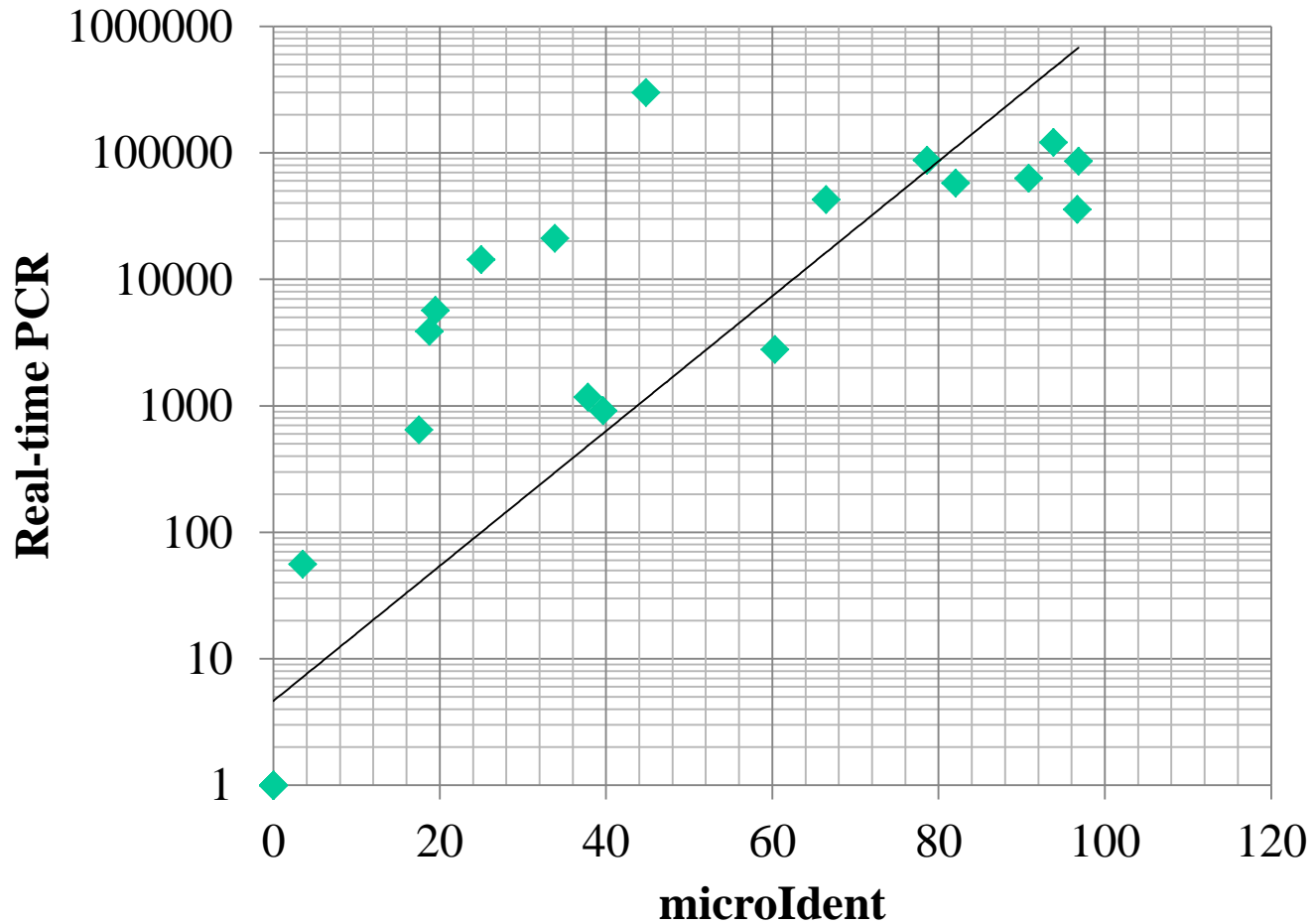
⁴Hayashi et al., 2001)



Korrelation zwischen Real-time PCR and microIdent

	Spearman	
	R	P
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0,683	<0,001
<i>P. gingivalis</i>	0,735	<0,001
<i>P. intermedia</i>	0,640	<0,001
<i>T. forsythia</i>	0,691	<0,001
<i>T. denticola</i>	0,622	<0,001
<i>P. micra</i>	0,525	<0,001
<i>F. nucleatum</i>	0,594	<0,001
<i>C. rectus</i>	0,630	<0,001
<i>E. corrodens</i>	0,590	<0,001
<i>E. nodatum</i>	0,593	<0,001
Capnocytophaga sp.	0,331	<0,001

VERGLEICH REAL-TIME PCR – MICROIDENT (STUDIE ELAFIN)



(n=31)

R=0.952, p<0.001 (Spearman)

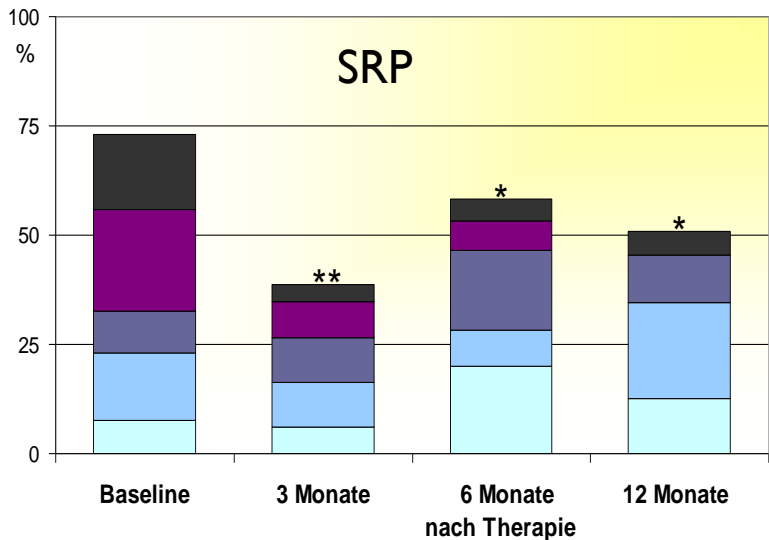
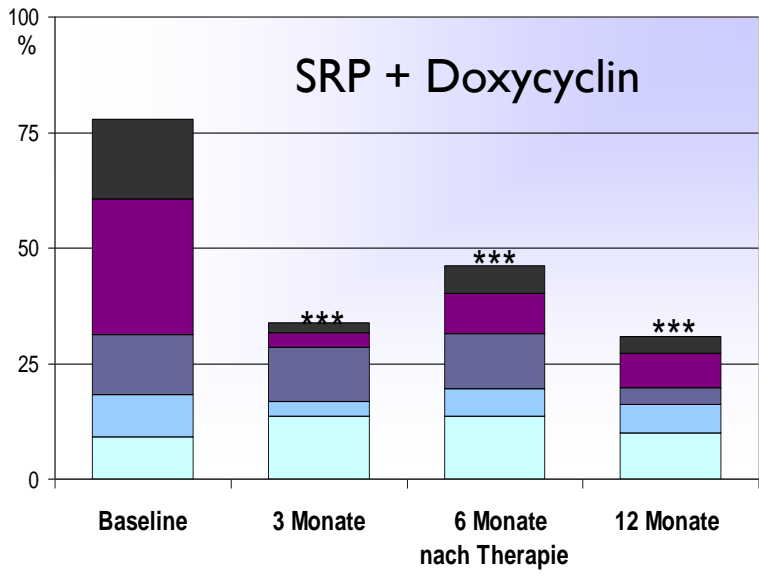
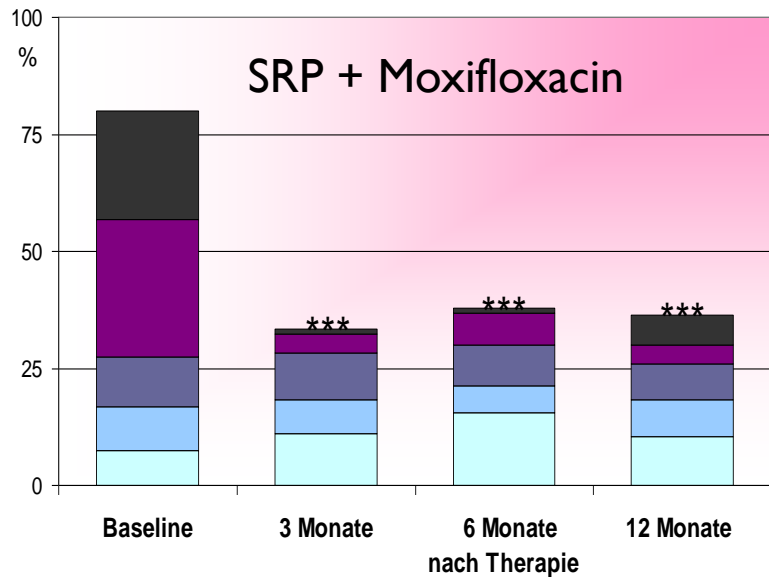
WEITERE ÄHNLICHE VERFAHREN

- Markierte Sonden (z.B. IAI Pado-Test)
- Real-time PCR mit taqMan-Probes
 - kommerziell: Carpegen, MPI
 - In House: ACTA, (wir im Versuchsstadium)

ANWENDUNG VON PCR- VERFAHREN

- Studien zur Evaluierung von
Therapieverfahren
- Diagnostik im weitesten Sinne für
Einzelpatienten und bei Studien
- Nachweis von Virulenzmarkern in
Plaqueproben => Bedeutung in vivo

WIRKUNG VON SRP UND ANTIBIOTIKA AUF *PORPHYROMONAS GINGIVALIS*

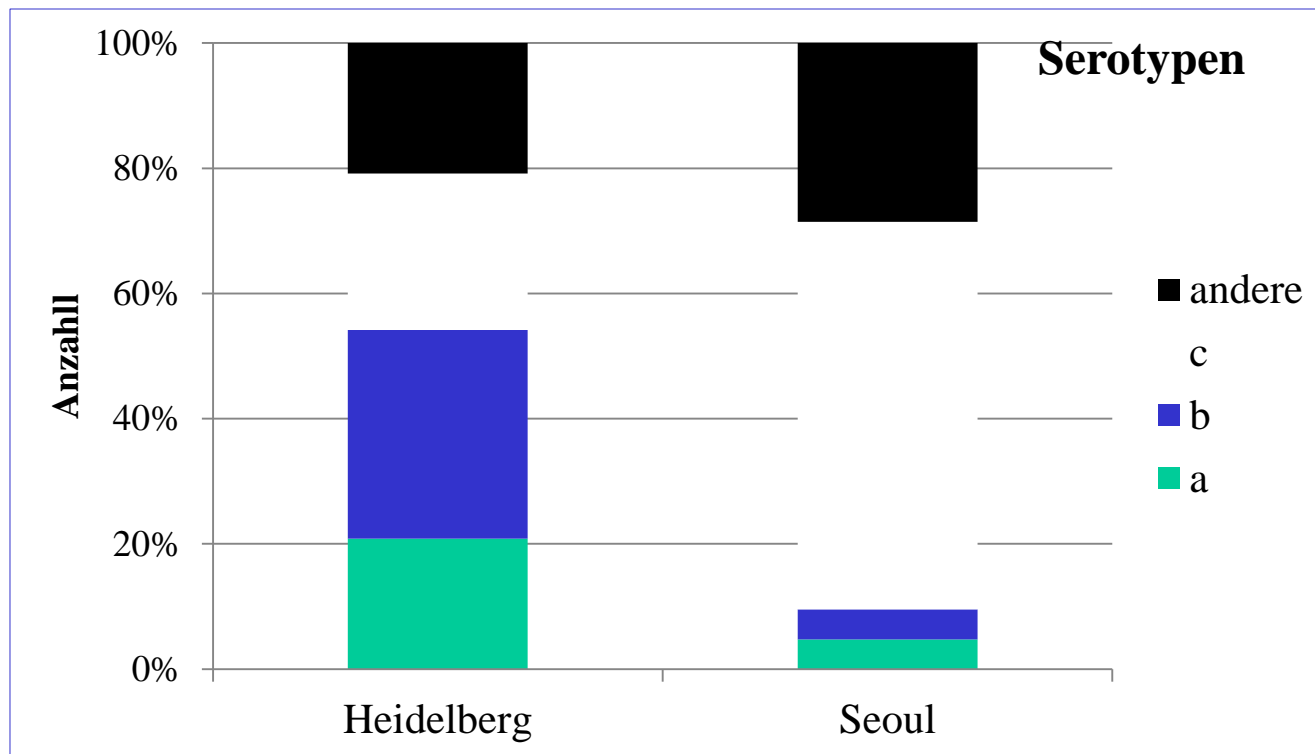


10^3
 10^4
 10^5
 10^6
 $\geq 10^7$

* $p < 0,05$
 ** $p < 0,01$
 *** $p < 0,001$
 (Im Vergleich mit Baseline)

AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS VERGLEICH HEIDELBERG - SEOUL

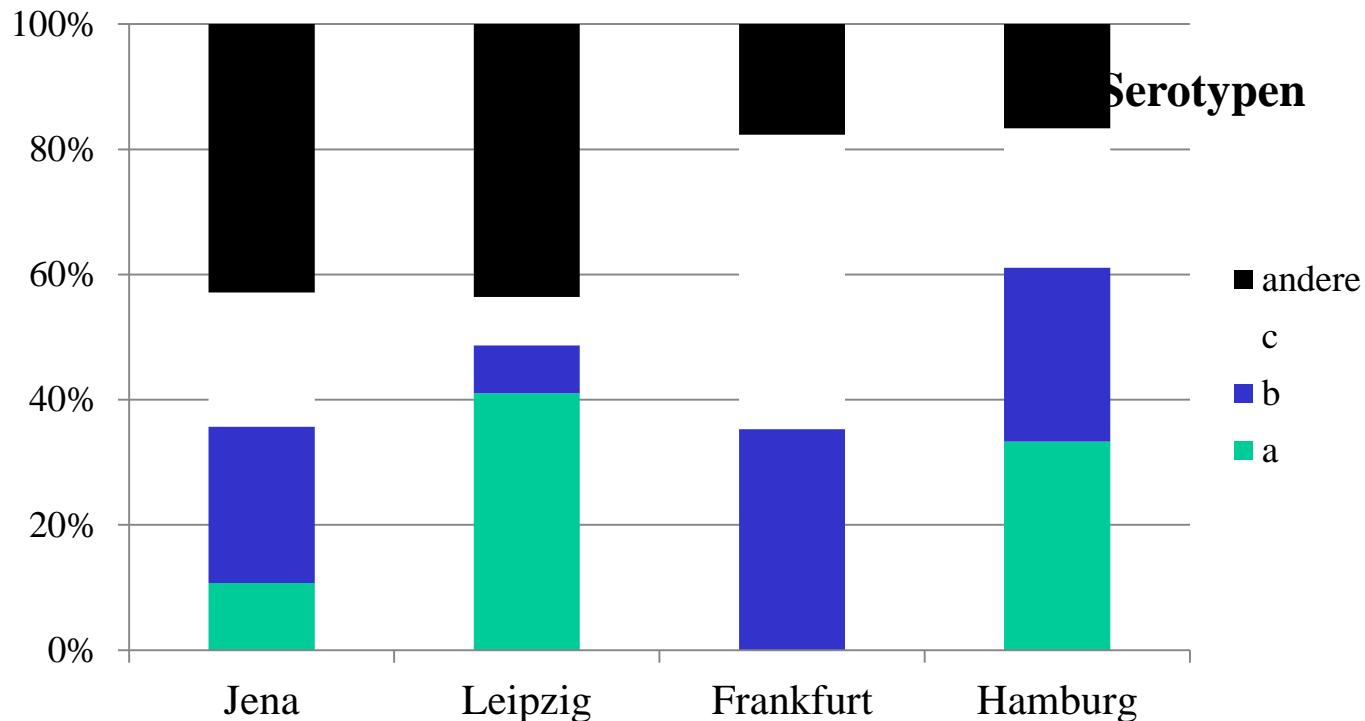
- Aggressive oder schwere chronische Parodontitis
- 21 Patienten Korea, 24 Patienten Deutschland



Kein Nachweis des JP2-Klons

AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS IN DEUTSCHLAND

- 28 Jena, 36 Leipzig, 17 Frankfurt, 18 Hamburg
- Aggressive oder schwere chronische Parodontitis



Zwei Nachweise des JP2-Klons in Frankfurt mit ethnischem Hintergrund

PCR

Vorteile

- Relativ kostengünstig bei vorhandenem Gerät
- Niedrige Nachweisgrenze
- Flexibel
- Quantifizierbarkeit bei Real-time PCR

Nachteile

- Kleine Probenzahl ungünstig (Kosten, Aufwand, da jede Spezies einzeln)
- Gewisse Störanfälligkeit
- Erfordert Kenntnisse der Molekularbiologie
- Nachweis nur einzelner Spezies jeweils

SEQUENZIERUNG

SEQUENZIEREN

- 16SrDNA-Bereiche werden aus gesamter Probe bestimmt
- Sonden in entsprechende Bereiche, Amplifikation der Bereiche, Trennen der unterschiedl. Amplifikate
- Sequenzieren
- Kenntnis über neue, unkultivierbare Spezies

SEQUENZANALYSE DER ORALEN MICROBIOTA GESUNDER ERWACHSENER

Keijser et al. J Dent Res, 2008;87:1016-20

- Speichelproben (n=71)
- Plaqueproben (n=98)
- 3621 Spezies im Speichel
- 6888 Spezies in der Plaque



SUBGINGIVALE MICROBIOTA

- 67% unkultivierbar

From: [J Bacteriol. 2010 October; 192\(19\): 5002–5017.](#)
 Published online 2010 July 23. doi: 10.1128/JB.00542-10.
[Copyright/ license](#)

TABLE 2.
 Phylogenetic distribution of 34,753 oral clones

Phylum	No. of taxa (%)	% of taxa that represent:			No. of clones (%)	% of clones that represent:		
		Named species	Unnamed isolates	Uncultivated phylotypes		Named species	Unnamed isolates	Uncultivated Phylotypes
<i>Firmicutes</i>	494 (41.9)	20.6	8.7	70.6	23,354 (67.212)	78.7	7.3	14.1
<i>Proteobacteria</i>	237 (20.1)	33.3	3.0	63.7	3,909 (11.250)	72.7	3.8	23.6
<i>Bacteroidetes</i>	153 (13.0)	19.0	16.3	64.7	2,571 (7.403)	58.6	24.1	17.3
<i>Actinobacteria</i>	133 (11.3)	35.3	14.3	50.4	2,641 (7.572)	55.7	20.3	24.0
<i>Spirochaetes</i>	73 (6.2)	9.6	2.7	87.7	577 (1.671)	33.8	4.3	61.9
<i>Fusobacteria</i>	42 (3.6)	23.8	7.1	69.0	1,356 (3.893)	76.6	4.0	19.4
<i>Synergistetes</i>	18 (1.5)	11.1	0.0	88.9	209 (0.605)	12.4	0.0	87.6
TM7	15 (1.2)	0.0	0.0	100.0	85 (0.244)	0.0	0.0	100.0
<i>Tenericutes</i>	4 (0.3)	75.0	0.0	25.0	10 (0.028)	90.0	0.0	10.0
<i>Deinococcus</i>	3 (0.2)	0.0	0.0	100.0	13 (0.037)	0.0	0.0	100.0
SR1	1 (0.1)	0.0	0.0	100.0	7 (0.020)	0.0	0.0	100.0
<i>Chloroflexi</i>	1 (0.1)	0.0	0.0	100.0	1 (0.003)	0.0	0.0	100.0
<i>Acidobacteria</i>	1 (0.1)	0.0	0.0	100.0	1 (0.003)	0.0	0.0	100.0
<i>Cyanobacteria</i>	1 (0.1)	0.0	0.0	100.0	1 (0.003)	0.0	0.0	100.0
Plant chloroplast	4 (0.3)	100.0	0.0	0.0	19 (0.054)	100.0	0.0	0.00
Total	1,179 (100)	24.0	8.4	67.7	34,753 (100.000)	73.3	8.8	17.8

aus Dewhirst FE et al. J Bacteriol, 2010;192:5002-17)

MIKROFLORA UND MUNDHÖHLE

Ledder et al. Appl Environ Microbiol. 2007;73:516-23.

- 47 Personen, 29 CP, 18 parodontal gesund
- PCR in 16S rDNA-Region, anschl. Sequenzierung und auch gezielt mit Multiplex-PCR gegen wesentliche parodontopathogene Bakterien
- Relativ geringer Nachweis von T.f., A.a. und P.g.
- *Treponema socranskii* und *Pseudomonas* sp. mehr bei Gesunden

SEQUENZANALYSEN

Vorteile

- Nachweis von nicht kultivierbaren Taxa
- Kenntnis über Komplexität der Microbiota der Mundhöhle im Zusammenhang mit Erkrankungen usw.

Nachteile

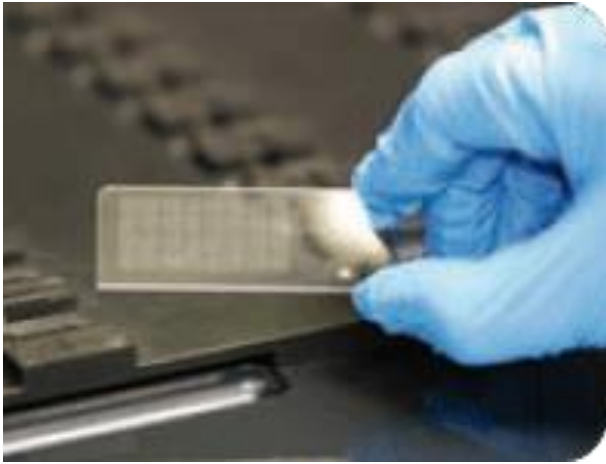
- Kosten
- Nur in speziellen Laboratorien
- Quantifizierbarkeit ?

MICROARRAYS

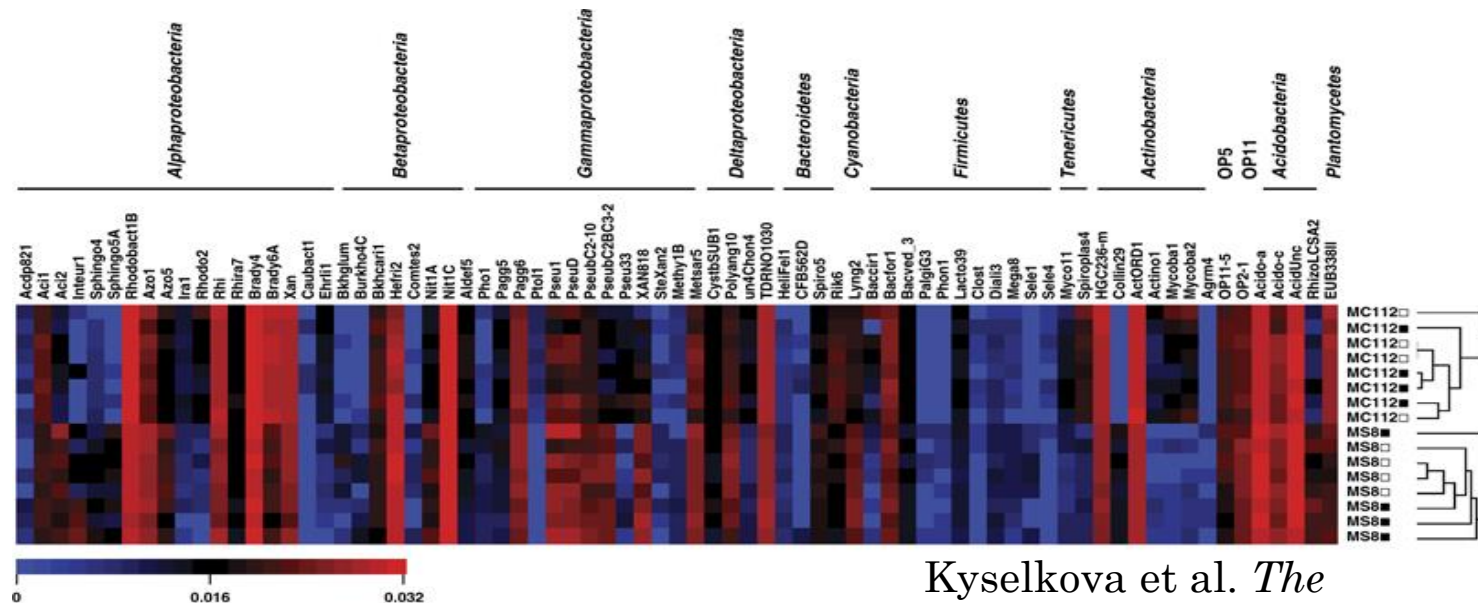
MICROARRAYS

- Chips, auf denen mehrere Hundert DNA-Sequenzen (Sonden) vorhanden sind
- Probe bindet entsprechend an komplementären Basen
- Waschschrirte
- Sichtbarmachen und Quantifizierung anhand eines Fluoreszenzsignals
- Erfordert spezielle Geräte
- Auswertung über Bioinformatik

MICROARRAYS

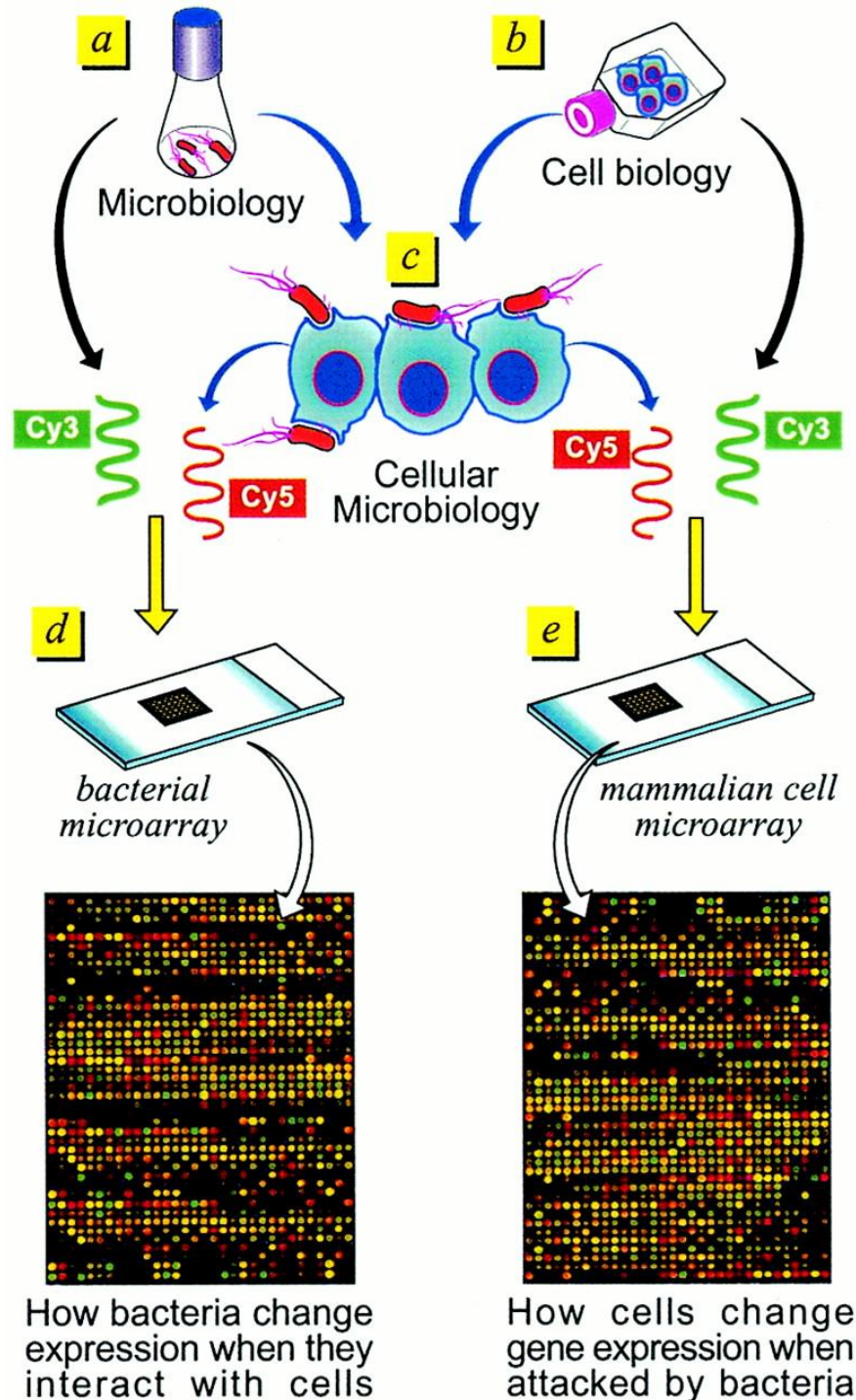


<http://www.biotech.or.th/microarray/images/stories/pic.gif>



Kyselkova et al. *The ISME Journal* (2009) 3, 1127–1138

MICROARRAYS



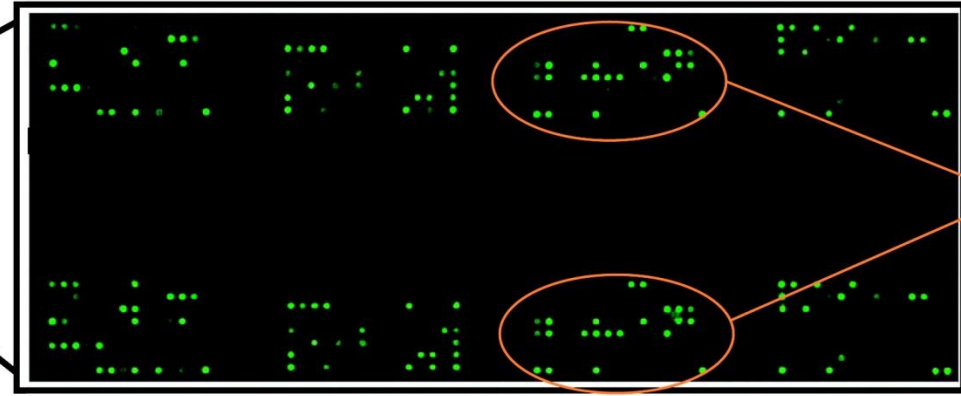
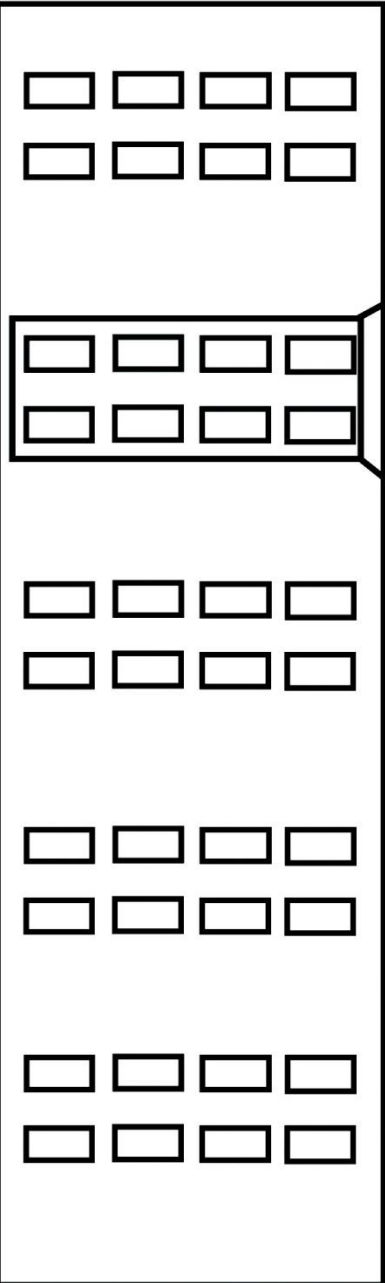
MICROARRAYS FÜR PARODONTOPATHOGENE MIKROORGANISMEN

- ParoCheck: Testsystem für 20 Bakterien (Greiner bio-one)
 - 20 Bakterien
 - Chip-System
 - benötigt Gerät
 - Fortschritt gegenüber bekannten Verfahren?
- Forsyth-Center

MIKROFLORA UND MUNDHÖHLE

- Colombo AP, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, Socransky SS, Hasturk H, Van Dyke TE, Dewhirst F, Paster BJ. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. J Periodontol. 2009;80:1421-32.
- 47 Personen, davon 20 gesund, 17 refraktäre Parodontitis, 20 „Good responders“
- PCR in 16S rDNA-Region, anschliessend Microarray
- 400 Spezies

Published in *Journal of Periodontology* 2009;80:1421-1432.
DOI: 10.1902/jop.2009.090185
© 2009 American Academy of Periodontology. All rights reserved.



**Duplicate
Subarrays**

↓	↓	↓	↓
Subarray 1	Subarray 2	Subarray 3	Subarray 4
Phyla	Phyla	Phyla	Phyla
Bacteroides Proteobacteria (alpha, beta, gamma, epsilon)	Proteobacteria (beta, delta, epsilon) SRI SSV Firmicutes	Firmicutes Synergistes Fusobacteria	Spirochaetes TM7 Actinobacteria

Figure 1. Schematic layout of a HOMIM slide. Five identical arrays containing four 8 × 15 duplicate subarrays were printed on an aldehyde-coated glass slide. Probes are organized phylogenetically on each subarray (subarrays 1 to 4). Up to five samples can be hybridized simultaneously against probes to 300 different species per slide.

MIKROFLORA UND MUNDHÖHLE – ZUSAMMENHANG REFRAKTÄRE PARODONTITIS ZUSAMMENHANG ATTACHMENTVERLUST

Qualitative Angaben

- Parodontopathogene Bakterien: *Parvimonas micra*, *T. forsythia*, *Prevotella* spp., *Eubacterium nodatum*, *Selenomonas noxia*, *P. gingivalis*, *Treponema* spp., *E. corrodens*, *Campylobacter* spp.
- Andere Spezies: versch. Streptokokken sp., *Filifactor alocis*, **TM7** spp. 346/356/437, Bacteroides sp. OT 274/272 u.a.

MICROARRAYS

Vorteile

- Nachweis von nicht kultivierbaren Taxa
- Analyse einer komplexen Microbiota
- Neue Kenntnisse über Bedeutung einzelner Spezies

Nachteile

- Entwicklung sehr aufwändig
- Nur in speziellen Laboratorien
- Spezifität?
- Quantifizierbarkeit?
- Information für klinisch tätigen Zahnarzt?

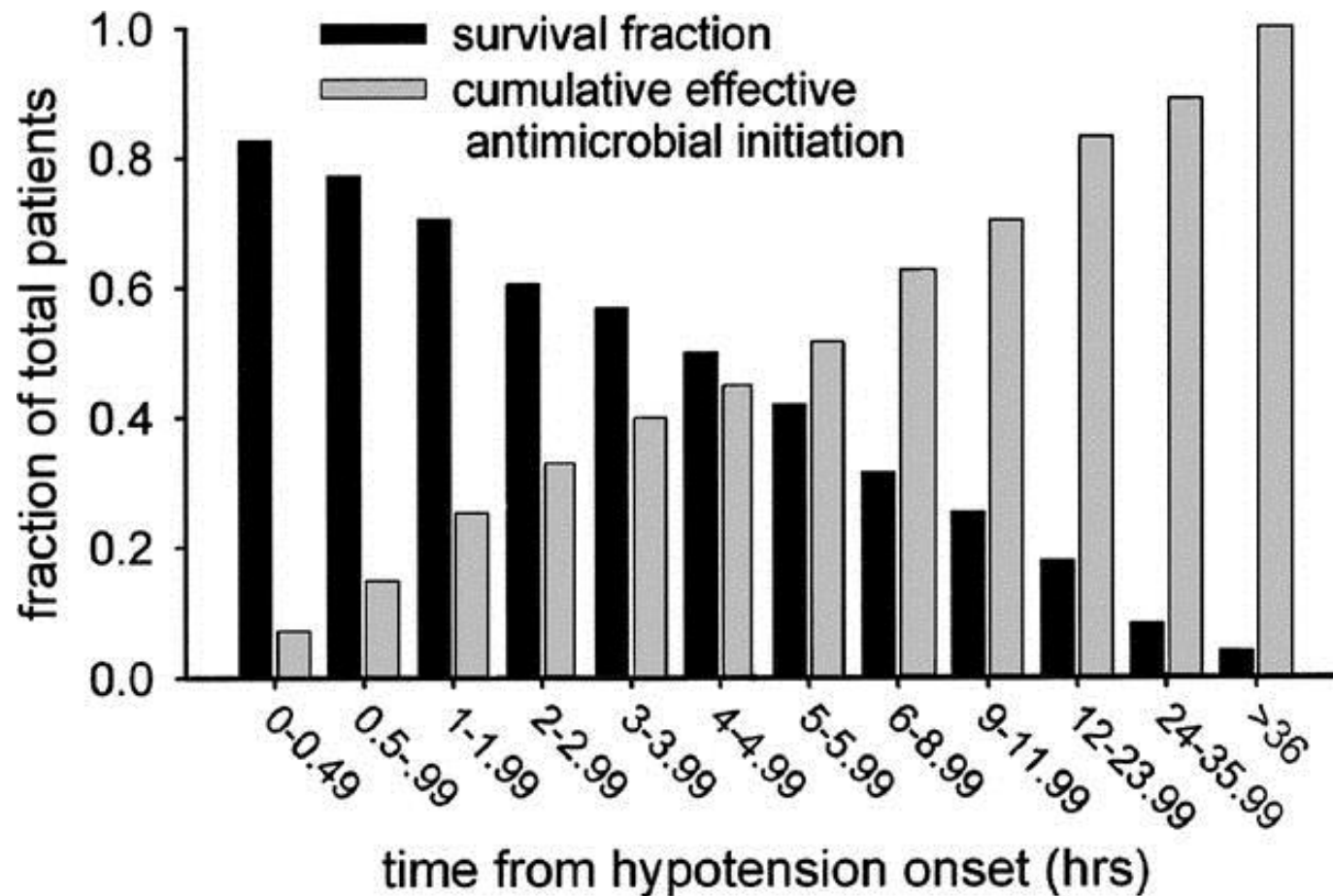
Typische Situation

- Patient mit diversen Vorkrankheiten
- elektiver chirurgischer Eingriff
- perioperative Antibiotika-Prophylaxe ist erfolgt oder eine sonst indizierte Antibiotika-Therapie läuft noch
- Patient entwickelt Pneumonie oder wird septisch
- Verlegung auf die Intensivstation oder
- Patient entwickelt auf der Intensivstation eine Sepsis







- Krankheitsbild ist verschleiert
- Mikrobiologische Diagnostik wird durch laufende Antibiotikatherapie gestört

Bei Sepsis entscheidet der Zeitpunkt des Beginns der Antibiotikatherapie !

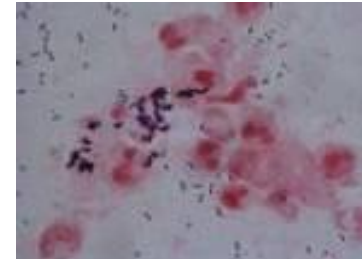


Blutkultur - “Goldstandard” bei Sepsis oder schweren Infektionen

- Identifikation des relevanten Erregers 
- Ausschluß von Kontaminationen 
- Anwendbar nur für den Nachweis kultivierbarer Mikroorganismen 
- Zeitbedarf der Untersuchung mindestens 2 Tage 

Verfügbare Schnellmethoden

- Primärpräparat → erfordert $>10^4$ Erreger/ml

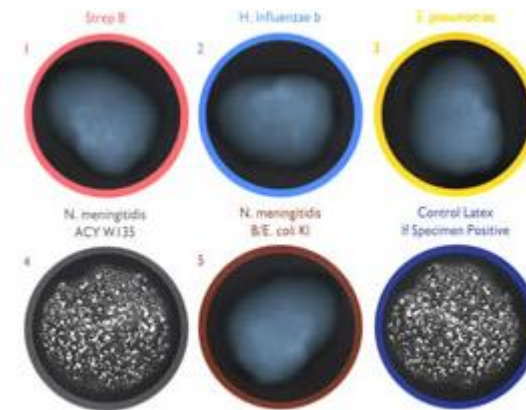


- Antigennachweise aus Liquor (Blut) für:

- Meningokokken,
- Pneumokokken,
- *Haemophilus influenzae* Typ B,
- B-Streptokokken,
- *Escherichia coli* K1

- Antigennachweis aus Urin für:

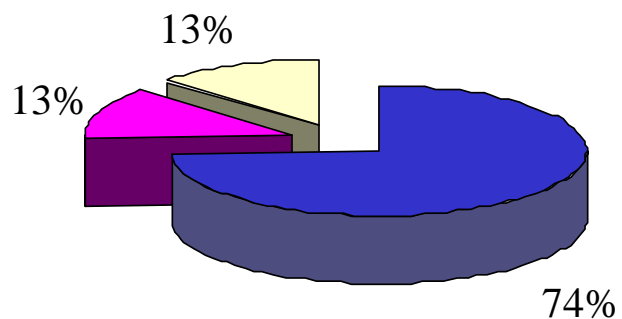
- Pneumokokken,
- Legionellen



- Eingeschränkte Erregerpalette!
- Erforderliche Antigenmenge oft nicht vorhanden!

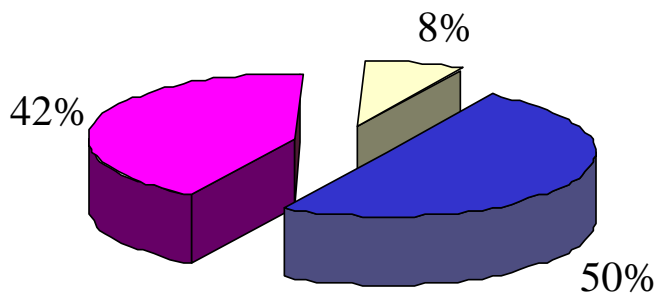
Erregerspektrum bei 226 Patienten

316 Blutkulturen
45 Isolate



■ Gram-pos. ■ Gram-neg. ■ Pilze

316 Multiplex-PCR
104 DNA-Nachweise



■ Gram-pos. ■ Gram-neg. ■ Pilze

Bedarf an innovativen und schnellen Verfahren in der klinischen Mikrobiologie

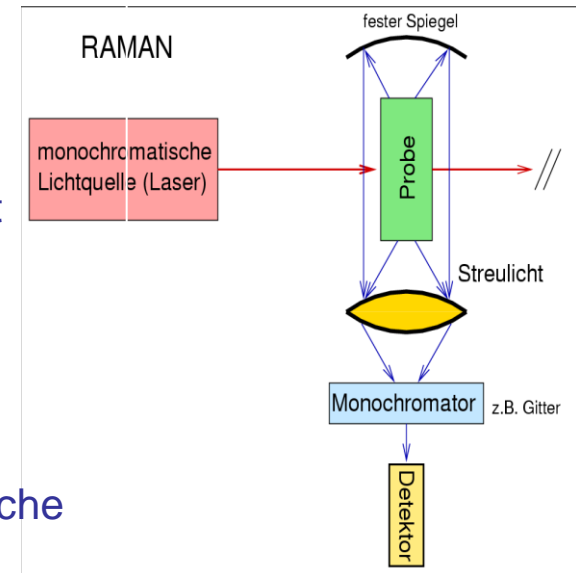
- Schwere systemische Infektionen und Sepsis
- Infektionen bei immunkompromittierten Patienten
- Infektionen mit hoch virulenten Erregern
- Infektionen durch Erreger mit besonderer Resistenz
- Nachweis bislang unbekannter Infektionserreger
- Sichere Aufklärung von Infektketten
- Standardisierung
- Automatisierung

Nicht bzw. schwer anzüchtb. Sepsis-/Endokarditiserreger

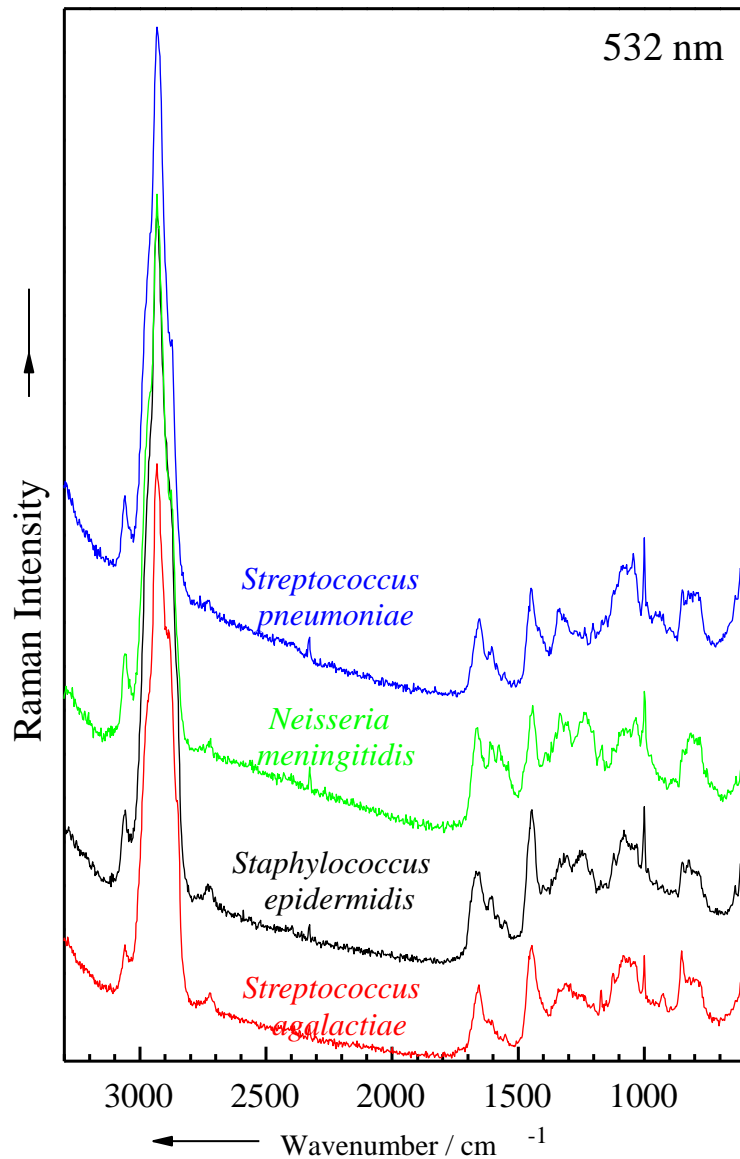
- small colony variants von *Staphylococcus aureus*
- **Brucella** melitensis, *Brucella abortus*
- **Legionella** pneumophila
- **Bartonella** henselae, *Bartonella quintana*
- **Borrelia** burgdorferi sensu lato
- **Leptospira** interrogans
- atypische Mykobakterien (**MOTT**)
- **Tropheryma** whippelii
- **Coxiella** burnetii
- **Ehrlichia** chaffeensis
- **Chlamydia** psittaci, *Chlamydia pneumoniae*

Raman-Spektroskopie

- Der indische Physiker Chandrasekhara Venkata Raman entdeckte 1928, dass im Streulicht eines monochromatisch beleuchteten Objektes zusätzliche Spektrallinien auftreten.
- Raman-Streuung von biologisch bedeutenden Molekülen werden durch Anregung in unterschiedlichen Spektralbereichen resonant verstärkt.
- Raman-Spektren von RNA, DNA und Proteinen können durch Verwendung von Lasern, die im ultravioletten Spektralbereich emittieren, verstärkt werden.
- Komplexe Objekte, z. B. Zellen, ergeben komplexe, aber spezifische Raman-Spektren.
- Das Objekt, z. B. eine Bakterienzelle muss fokussiert und direkt bestrahlt werden.
- Wasser hat wenig, komplexe Medien haben großen Einfluss auf die Spezifität von Raman-Spektren.
- Raman-Spektren von Mikroorganismen sind innerhalb weniger Sekunden messbar, können nur an Hand von Datenbanken zugeordnet werden.



Identifizierung einzelner Bakterien im Liquor



- Bakterien 18 h auf Columbia-Blutagar kultiviert
- in Phosphat-gepufferter Salzlösung aufgeschwemmt, verdünnt (ca. 500 – 1000 Keime pro Objektträger)
- in sterilem Liquor suspendiert
- mittels Zytozentrifugation Objektträger beschickt
- Hitze-fixierung (10 min, 110 °C)



S. epidermidis in CSF artifizuell



S. agalactiae in CSF artifizuell



N. meningitidis in CSF nativ

Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)

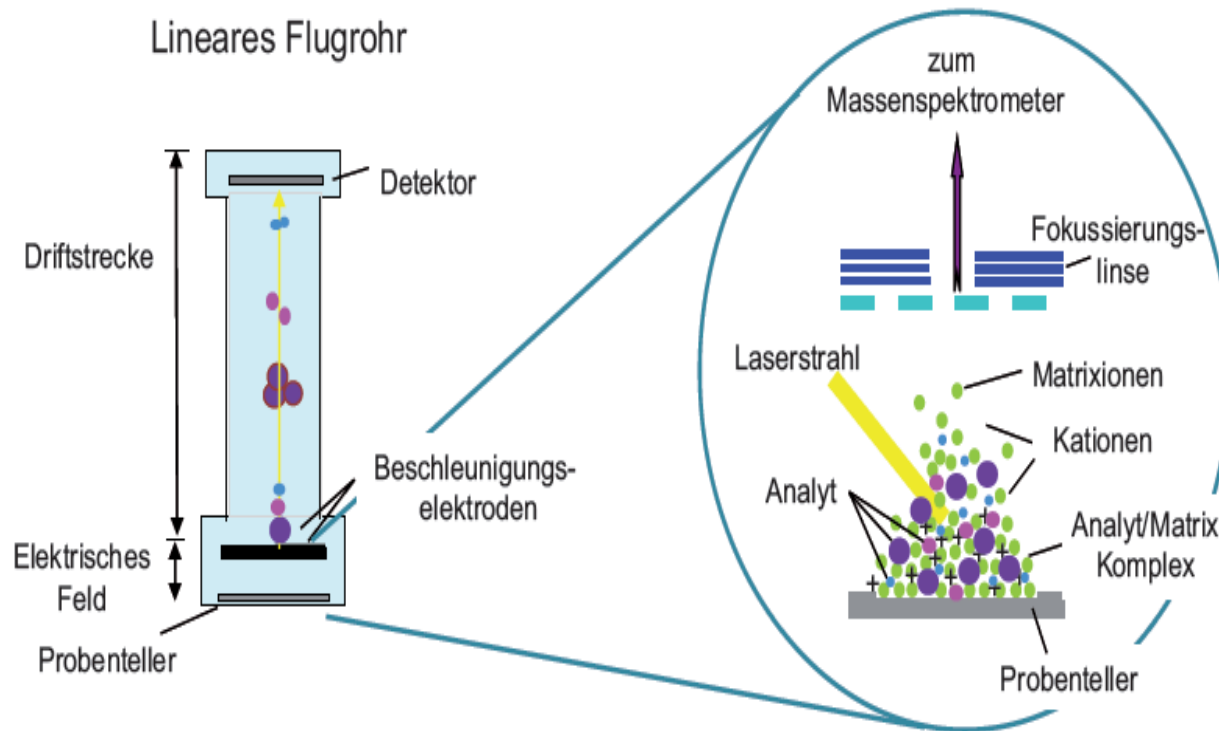


Abbildung 1 Prinzip der MALDI-TOF MS-basierten Identifikation von Proteinen und Peptiden.

Die Probe bzw. die Bakterien- oder Pilzkultur mit den darin befindlichen Proteinen (Analyte, dargestellt als blaue, rosa und lila Kugeln) wird zusammen mit der Matrix (grüne Kugeln) auf die Targetplatte gebracht. Nach Laserbeschuss werden die desorbierten Proteine im elektrischen Feld beschleunigt. Die Analyte trennen sich dann in der Driftstrecke gemäß ihrer Ladung und Masse auf. Durch die Bestimmung der Flugzeit der einzelnen Analyte entstehen charakteristische Massenspektren.

Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (*MALDI-TOF MS*)

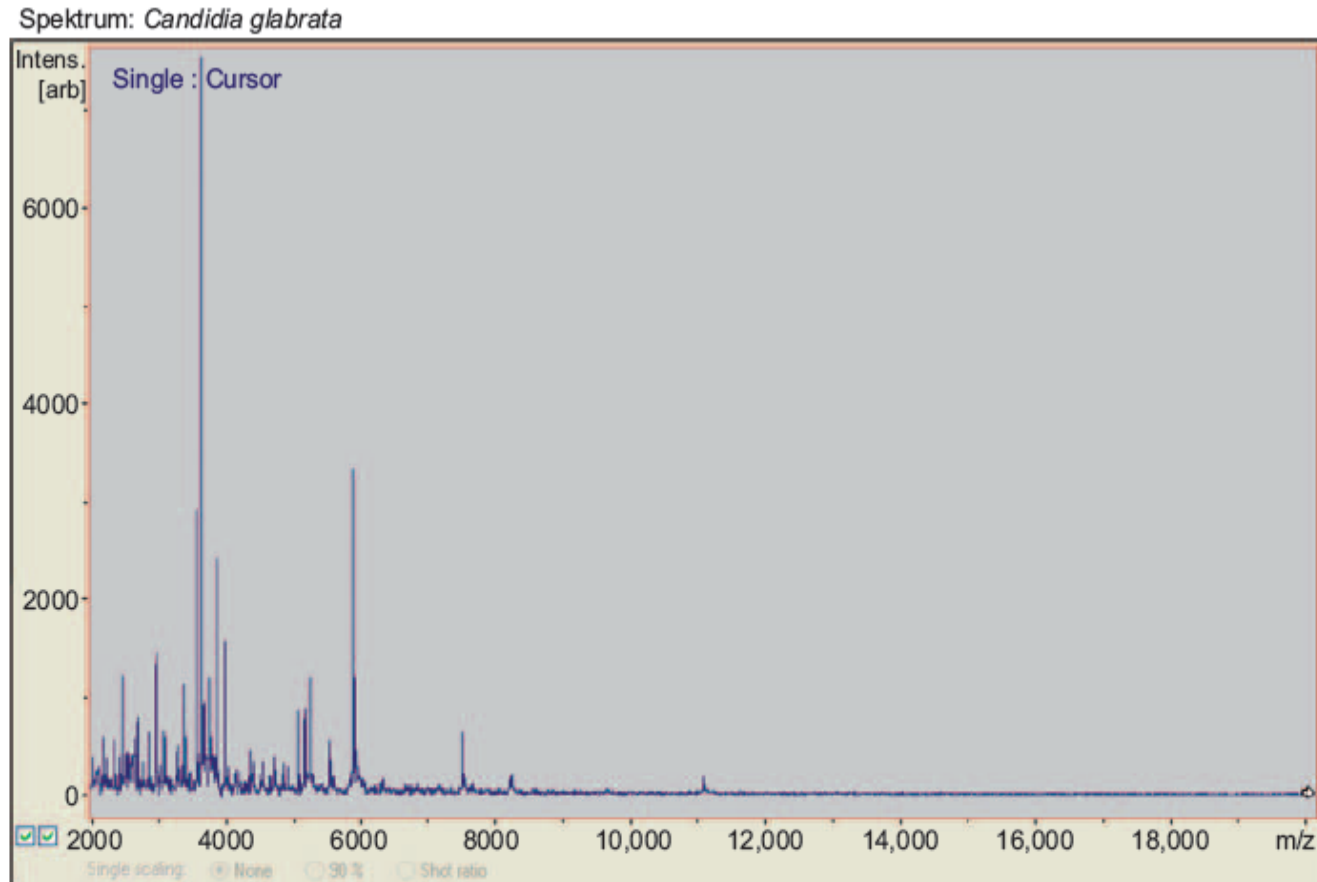
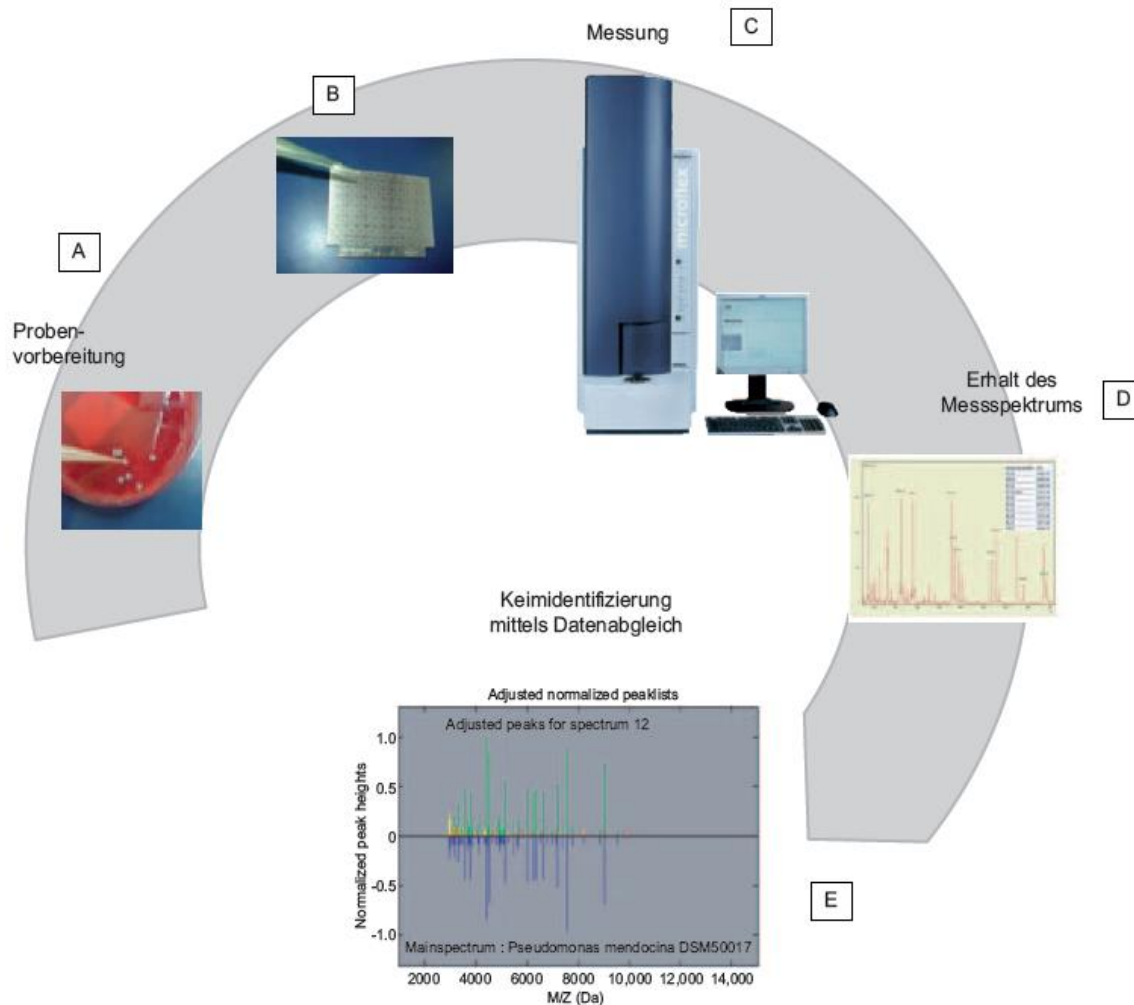


Abbildung 3 Massenspektrum einer *Candida glabrata*-Probe.

Im Messbereich von 4000 bis 8000 Da sind charakteristische Massenspitzen („peaks“) zu erkennen, die überwiegend ribosomale Proteine darstellen. Das Muster eines solchen Spektrums wird mit Hilfe der MALDI-Auswertungssoftware mit entsprechenden Datenbankeinträgen verglichen.

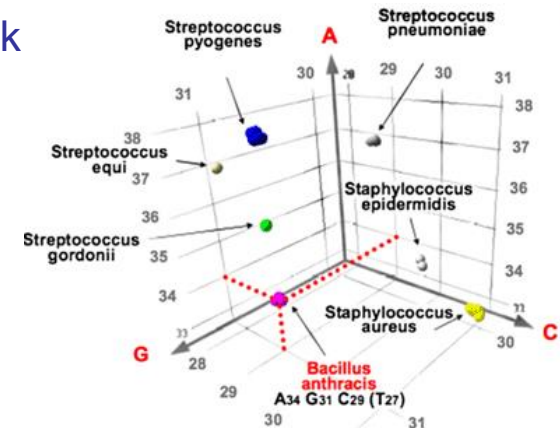
Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)

Arbeitsablauf



PCR + ElektroSpray-Ionisierungs-Time-Of-Flight Massen Spektrometrie (IBIS-Technologie / Plex-ID)

- Nukleinsäure-Isolierung: DNA/RNA; ggfs. Herstellung der c-DNA aus RNA
- PCR mit Primern, die häufig in konservierten Regionen hybridisieren
- Amplifikate sind bis zu 100 Basen groß
- Entsalzung
- Ionisierung der einzelsträngigen Amplifikate
- Bestimmung der Massen der einzelsträngigen Amplifikate mittel Massenspektroskopie
- Kalkulation der Zusammensetzung mit den Nukleotiden A, T, C und G der einzelnen Amplifikate
- Vergleich der Nukleotid-Zusammensetzung mit einer Datenbank
- Nachweis von:
 - Bakterien,
 - Viren
 - Pilzen
 - Parasiten
 - Antibiotika-Resistenz-Genen
 - bestimmter Virulenz-, Toxingene
- Molekulare Typisierung von Erregern
 - Infektionsepidemiologie
 - Mikrobiologische Forensik



Analysedauer: 6-8 Stunden
Sensitivität entsprechend PCR
bislang keine IVD-Zulassung



→ [Overview](#)

→ [JCVI's JumpStart Strains](#)

HUMAN MICROBIOME PROJECT (HMP)

Overview

The NIH Human Microbiome Project (HMP) was initiated to help determine the core human microbiome, to understand the changes in the human microbiome that can be correlated with changes in human health, to develop new technological and bioinformatics tools to support these goals and to address the ethical, legal, and social issues raised by human microbiome research.

JumpStart

HMP sequencing efforts are underway to provide key data needed for scaling up HMP efforts and to "jumpstart" the HMP with available 2008 funding. This Jumpstart component of the HMP produces initial key data that are needed for the design of a cost effective large scale HMP, and as such, the four large NHGRI/NIAID-funded sequencing centers, including JCVI, have been selected as HMP Jumpstart participants. Sequencing during the Jumpstart will include 200 reference genomes, as well as significant shotgun metagenomics and 16S rRNA sequencing. Sequencing during the Jumpstart will include 200 microbial reference genomes as well as significant shotgun metagenomics and 16S rRNA sequencing. As part of the JumpStart, JCVI will produce annotated genome sequences for 50 microbial strains representing a broad distribution of phylotypes in different niches of the human body and produce small-subunit (SSU/16S) rRNA sequences from metagenomic specimens.

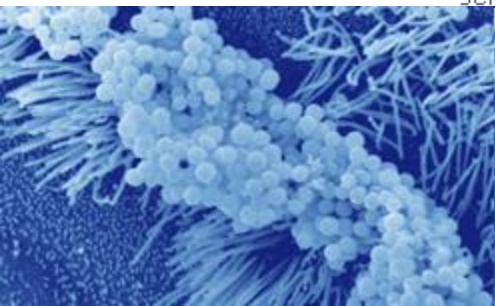
OTHER HMP JUMPSTART SEQUENCING CENTERS

[Broad Institute](#)

[Baylor College of Medicine](#)

[Washington University of St. Louis](#)

Reference Genome
16S Analyses
Metagenome Whole Genome Sequencing



Molekulare Typisierungsverfahren

Verfahren ohne DNA-Sequenzierung

DNA-Isolierung

DNA-Amplifizierung = PCR / *real time* PCR

Restriktionsmusteranalysen

Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

DNA-DNA-Hybridisierung / *array*-Technologie

DNA-Sequenz basierte Typisierungsverfahren

Einzelgensequenzierung

Multilocus-Sequenztypisierung (MLST)

Whole genom Sequencing

Restriktionsspaltung von DNA

Restriktionsenzyme (= Endonukleasen) spalten DNA an spezifischen Erkennungssequenzen, die meist und 4 – 8 Basenpaare umfassen. Je länger die Erkennungssequenz ist, desto seltener erfolgt eine Spaltung mit dem entsprechenden Enzym.

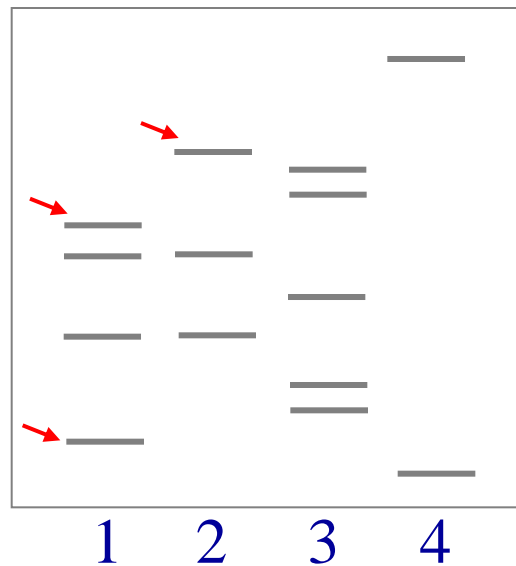
Beispiele:	<i>Cl</i> I	(<i>Caryophanon latum</i>)	AT/CGAT
	<i>Eco</i> RI	(<i>Escherichia coli</i>)	G/AATTC
	<i>Pst</i> I	(<i>Providencia stuartii</i>)	CTGCA/G
	<i>Sma</i> I	(<i>Serratia marcescens</i>)	CCC/GGG

Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RLFP)

Stamm 1



Stamm 2



Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Restriktionsanalyse des Gesamtgenoms von Bakterien

Die chromosomale DNA wird mit einem selten schneidenden Restriktionsenzym zerkleinert.

Die resultierenden großen DNA-Fragmente (100 kb - 1000 kb) werden im Agarosegel zwischen zwei wechselnden elektrischen Feldern aufgetrennt.



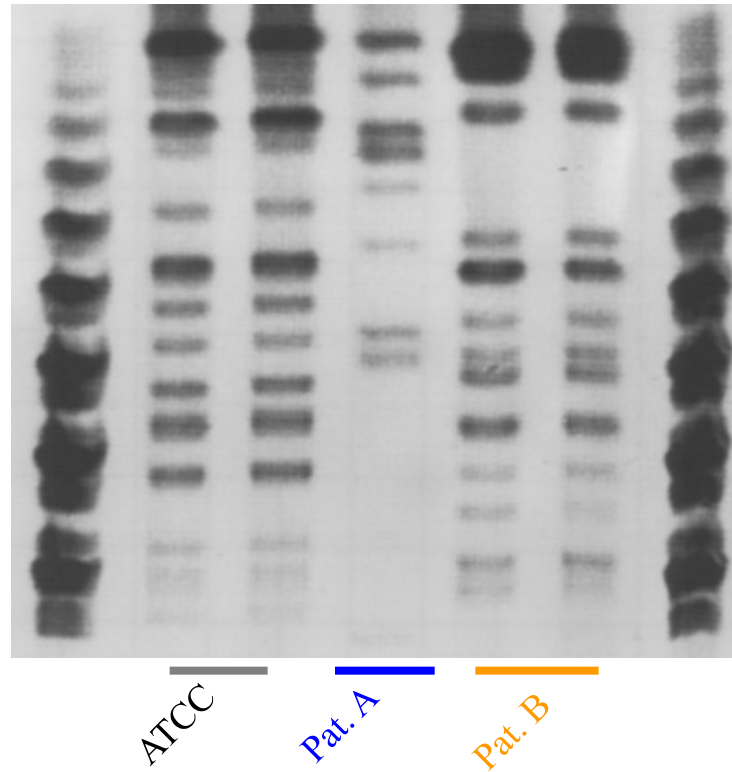
Bio-Rad CHEF III Mapper

Erregertypisierung mittels PFGE

Patienten mit cystischer Fibrose

Kolonisierung mit *Burkholderia cepacia*

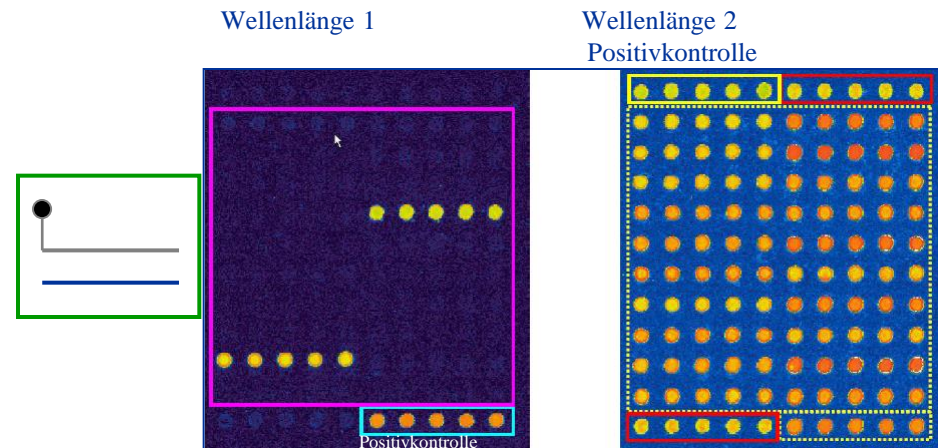
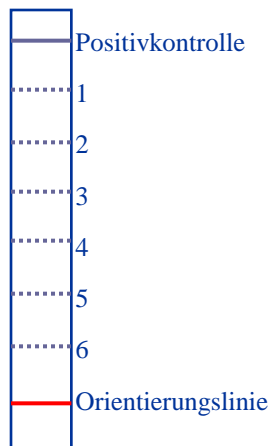
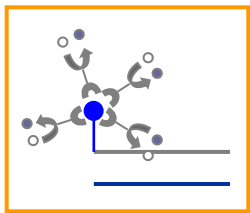
Transmission eines Stammes oder unabhängig erworbene Kolonisation



unterschiedliche Pulsfeldmuster → kein Hinweis auf Übertragung

Durchführung der *array*-Hybridisierung

- Isolierung der bakteriellen DNA
- PCR-Amplifizierung der 16S-rRNA mit Primern, die markiert sind mit
Biotin **Fluoreszenzfarbstoff**
- Hybridisierung der denaturierten *targets* an 16S-rRNA-Oligonukleotid-Sonden auf
Nitrocellulose-Membran **Glas-Objekträger**
- Entfernung unspezifisch gebundener *targets*
- Nachweis der Hybridisierung mittels
Anlagerung von Streptavidin-alkalische **Fluoreszenz-Scanner**
Phosphatase-Komplex
Farbreaktion

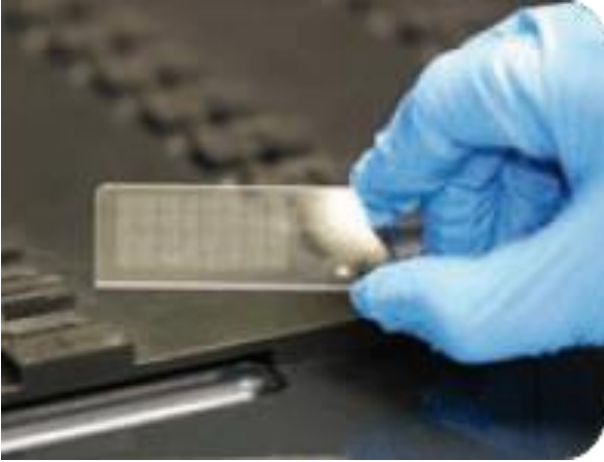


ParoCheck® 10 (Greiner Bio-One)

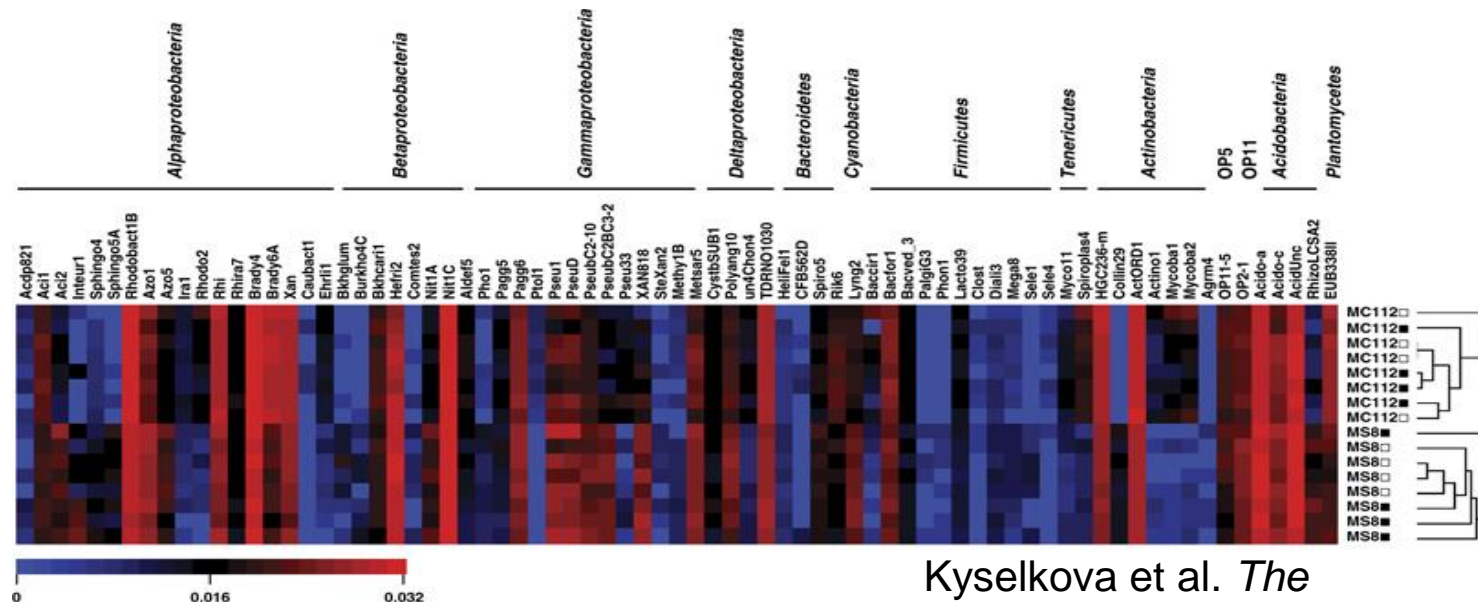
macro-array

micro-array

Microarrays



<http://www.biotech.or.th/microarray/images/stories/pic.gif>



Kyselkova et al. *The ISME Journal* (2009) **3**, 1127–1138

Spa-Typisierung: Sequenz-Auswertung

Ridom StaphType

File Database Options Windows Help

007_spa_id_410_2004

Found 16 repeats: 5' r26 r23 r23 r13 r23 r31 r29 r17 r31 r29 r17 r25 r17 r25 r16 r28 3'

5': AAAGCTAACGATGCTCAAGCACCAAA
r20: . C . A . A . . . CTG
r02: . C . AAA . . . CTG
r13: . C . A . A . . . CTG T
r19: . T . A . A . G . CTG
r21: . C . A . A . G . CTG

Type	Repeat Succession
user	26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25...
t032	26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25...
t101	26-23-18-13-23-31-29-17-31-36-24-25-17-25...
t290	26-23-23-13-23-29-17-31-29-17-25-17-25-16...
t025	26-23-23-13-23-29-17-31-29-17-25-17-25-16...
t055	26-30-17-34-17-13-20-17-34-17-20-17-12-17...

Spa-typing reliability is poor (not reliable)

WARNING:
5' signature (GCACCAAAA) could not be detected but a close match was found.
Please control the following low quality positions "position (base, quality)":

forward : 007_spa_id_410_2004f a DNA sample (RT20=407; RT20ratio=0.90; MBQ=35.67)

reverse : 007_spa_id_410_2004r a DNA sample (RT20=422; RT20ratio=0.90; MBQ=38.52)

Repeat Succession: 26-23-23-13-23-31-29-17-31-29-17-25-17-25-16-28 | Spa Type: t032, freq:5.78 %, MLST ST-22 | Cursor Base: -1





Wissenschaftliche Leistungen P. Ehrlichs

- Theorie und Praxis histologischer und bakteriologischer Färbungen
- Forschungen zur Serumtherapie, Unterscheidung zwischen aktiver und passiver Immunität, Arbeiten über neutralisierende Antikörper und deren Bestimmung
- Einführung der Seitenketten- und Rezeptortheorie (im Zellplasma existieren sog. Seitenketten, mit denen Arzneistoffe oder andere Substanzen eine chemische Bindung eingehen, später bezeichnete er diese als Chemorezeptoren; Reaktion des Arzneimittels mit Rezeptor verläuft nach dem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“)
- Begründung und Entwicklung der antimikrobiellen „Chemotherapie“



Wissenschaftliche Leistungen P. Ehrlichs

- Beschäftigung mit organischen Arsenverbindungen (seit 1902 im Handel: Atoxyl® - wirksam getestet gegen die Schlafkrankheit)
- 1907 Herstellung von Arsacetin® durch Acetylierung von Atoxyl® - erwies sich als wirksam gegen Syphilis und Schlafkrankheit
- 1910 Einführung der Verbindung 606 - **Salvarsan®** „3,3-Diamino-4,4-dihydroxyarsenobenzol“ zur Therapie der Syphilis
gilt als eigentlicher Beginn der Chemotherapie
Herstellung durch Farbwerke Hoechst
- 1912 Verbindung 914 als **Neosalvarsan®** eingeführt (als wasserlösliche Verbindung gut geeignet zur iv-Therapie)

Wissenschaftliche Leistungen P. Ehrlichs



306. Acetylatoxyl (Arsacebin / Na-Salz)

$\text{AsO}_3 \text{H Na}$

= 306

307. At-Chinon.

418. Aus 379 durch Acetanhydrid; Na-Salz
 (Arsenophenylglyzzin Na.)
 („Spixarsyl“)

606. Saksauer Aminoarsenophenol.

149

2 Hll.

JH 14. IX. 09.

Seite aus Ehrlichs Laborbuch mit Präparat 606 (später Salvarsan)

Salvarsan® in der Zahnheilkunde

Die Anwendung des Salvarsans wurde in mehreren Dissertationen untersucht



1. Lossow, Paul:

Die Einwirkung lokaler Salvarsan-Applikationen auf die Bakterien der Mundhöhle. Med. Diss. Kiel 1921

50% ige und noch konzentriertere Lösungen vernichteten die Spirochaeten, während die gewöhnlichen Mundbakterien nur bis zu einem gewissen Grade geschädigt wurden.

2. Große, Hans-Georg:

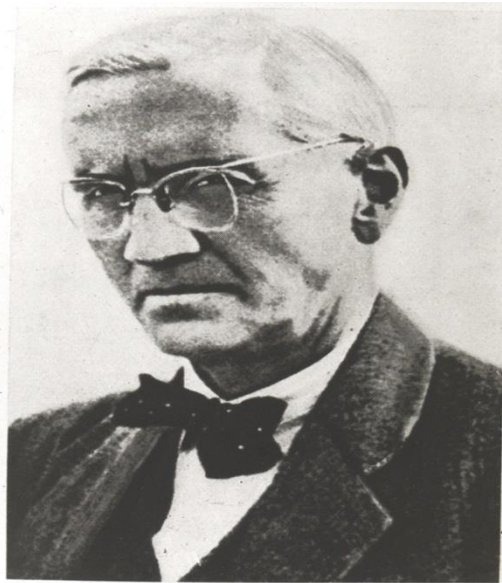
Ist die Behandlung der Alveolarpyorrhoe mit Salvarsan berechtigt?
Med. Diss. Leipzig 1922

Obwohl einige Autoren auf dem Standpunkt stehen, die Alveolarpyorrhoe sei eine Infektionskrankheit, die durch Spirochaeten hervorgerufen werde, ergab eine alleinige Therapie mit Salvarsan zwar eine günstige Beeinflussung des Krankheitsbildes, aber keine Dauerheilung.

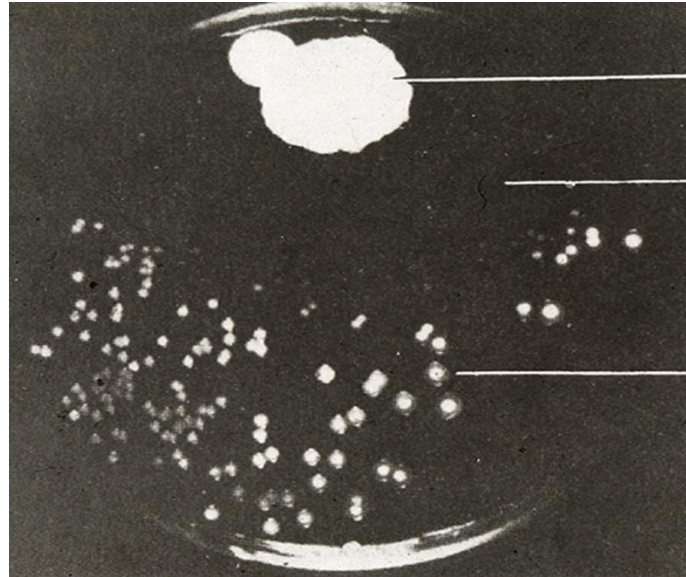
Salvarsan® in der Zahnheilkunde

- Zils, J. Das Salvarsan in der Zahnheilkunde.
Zahnärztl. Rundschau 1912
- Seidel, H. Alveolarpyorrhoe, Spirochaeten, Salvarsan.
Zahnärztl. Rundschau 1919
- Seidel, H. Die Beziehungen der Spirochaeten und der Salvarsantherapie zu Pyorrhoea alveolaris und anderen Erkrankungen des Mundes.
Dtsch. Zahnheilkunde 1919
- Beyer, E. Vergleich der Wirkung der intravenösen und lokalen Neosalvarsaninjection.
Zahnärztl. Rundschau 1920
- Gottlieb, B. Zur Aetiologie und Therapie der Alveolarpyorrhoe.
Oesterr. Z. Stomatol. 1920
- Moral, H. Über die derzeitige Behandlung der Alveolarpyorrhoe mit Neosalvarsan.
Zahnärztl. Rundschau 1920
- Schenk, H. Zur Aussprache über Alveolarpyorrhoe.
Zahnärztl. Rundschau 1920

Entdeckung der ersten breit eingesetzten antimikrobiellen Chemotherapeutika



Sir Alexander Fleming,
der Entdecker des Penicillin



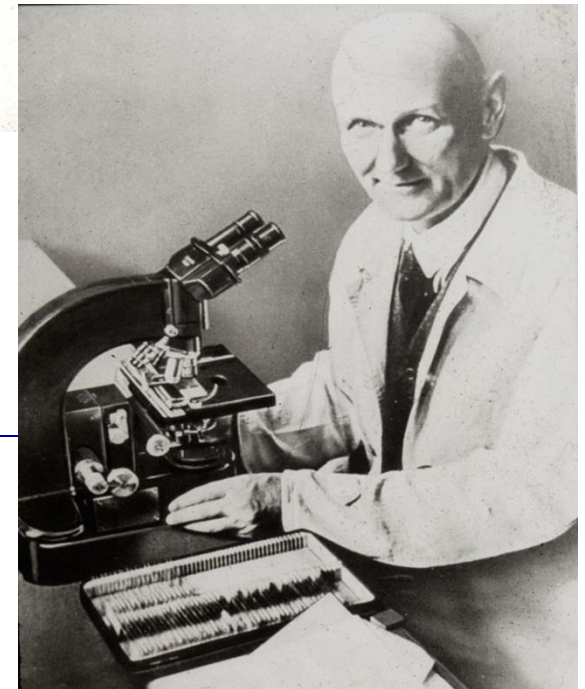
Penicillium
colony

Lysed
staphylococcal
colonies

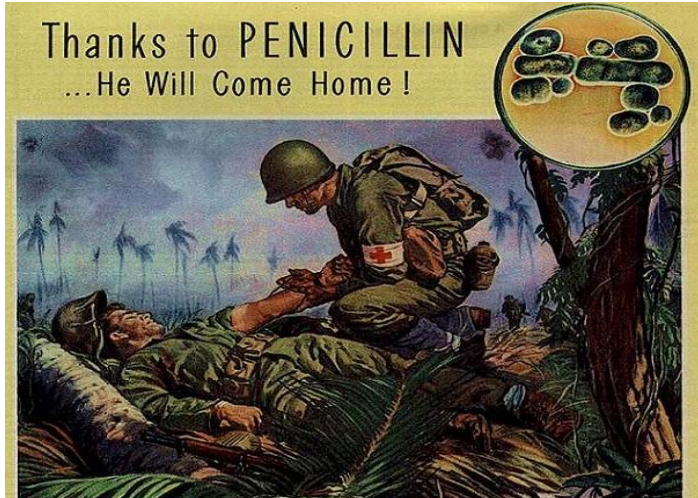
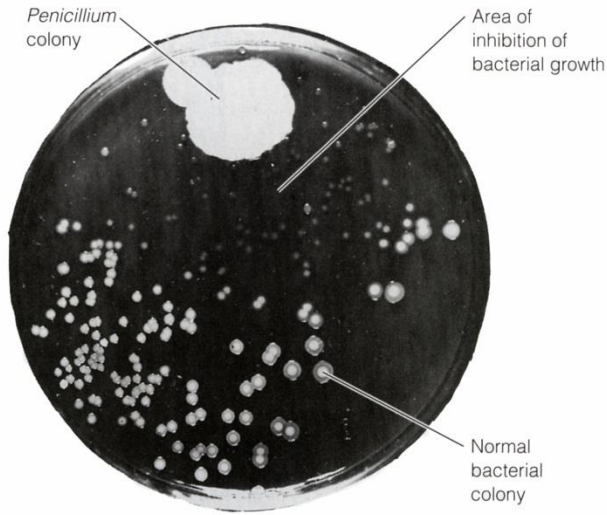
staphylococcal
colonies

1928 entdeckt Alexander Fleming (1881 - 1955) die Wirkung des Penicillins. 1941 kommt es zur ersten klinischen Anwendung.

Abb. rechts: Gerhard Domagk (1895 - 1964) entwickelt 1935 das erste Sulfonamid (Prontosil®) in den Bayer-Werken in Wuppertal-Elberfeld



Nobelpreis 1945 für die Entdeckung und Reindarstellung des Penicillins



Sir Alexander Fleming
(1881-1955)

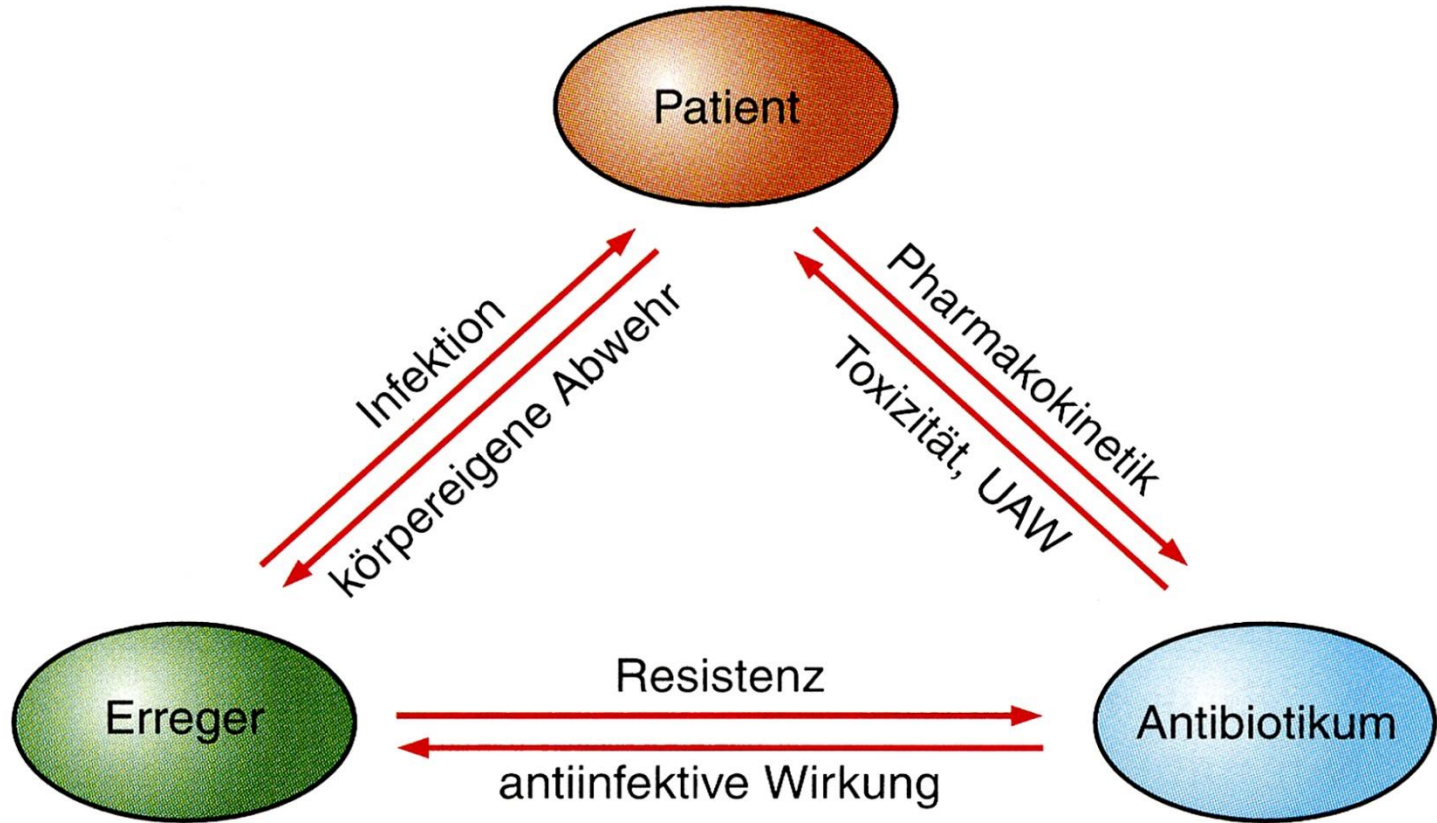


Ernst Boris Chain
(1906-1979)

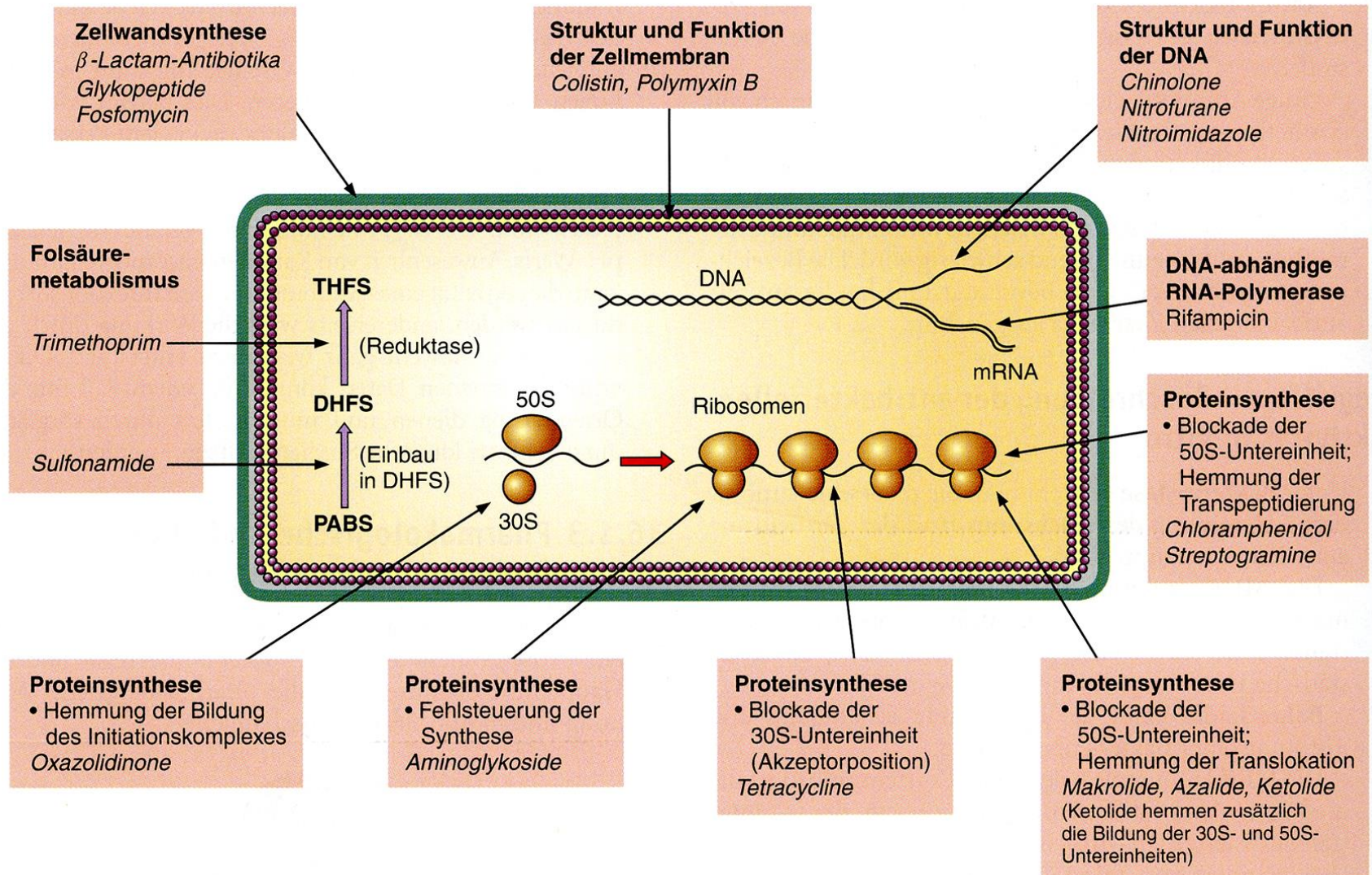


Sir Howard Walter Florey
(1898-1968)

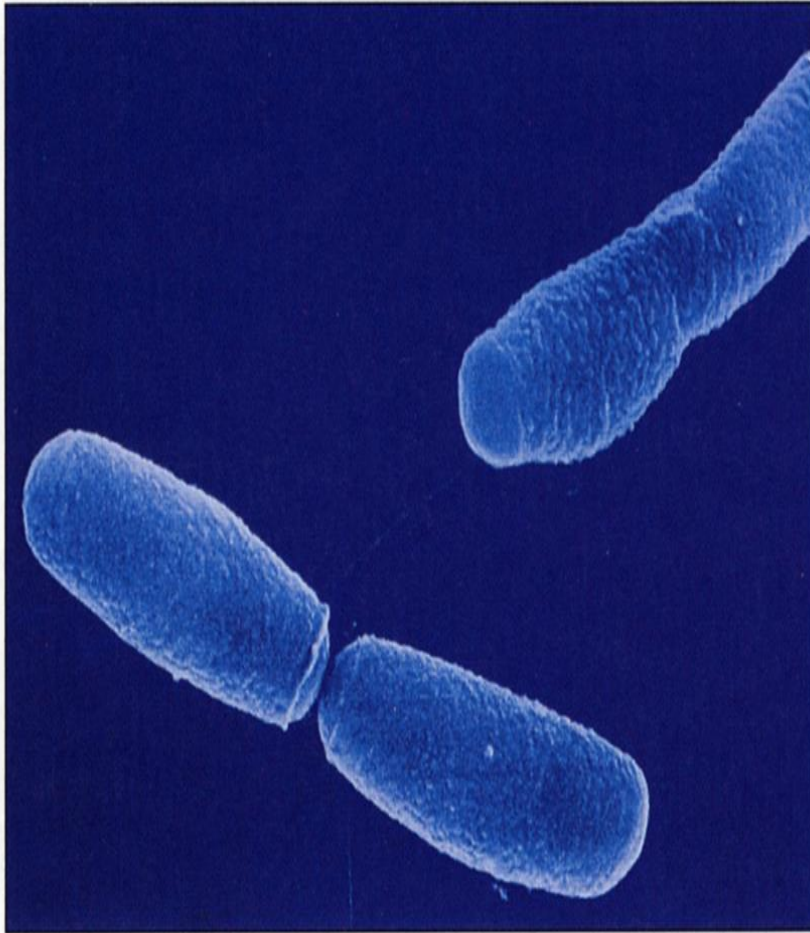
Wechselbeziehungen bei antimikrobieller Chemotherapie



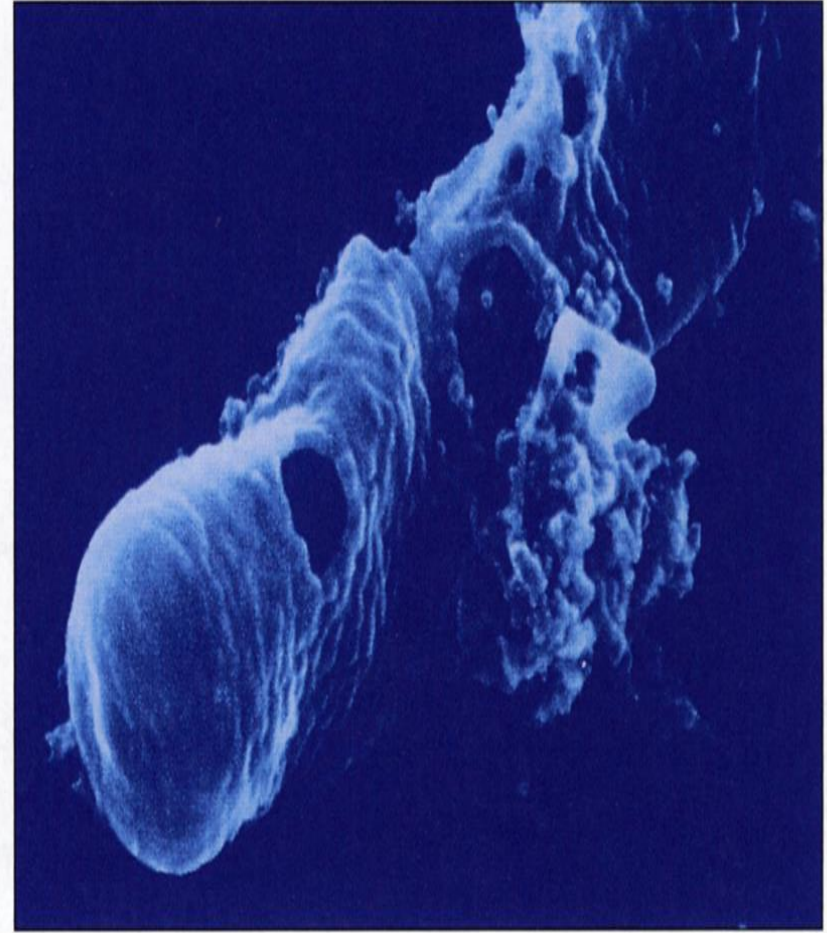
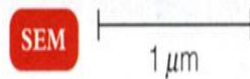
Angriffspunkte der Antibiotika bei Bakterien



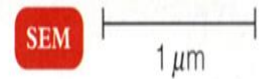
Zellwanddefekte eines Bakteriums durch Penicillin



(a) Rod-shaped bacterium before penicillin.



(b) The bacterial cell is lysing as penicillin weakens the cell wall.



Faktoren, die die Wirksamkeit eines Antibiotikums beeinflussen

- Wirkungsspektrum und Resistenzentwicklung

antibakterielle Wirkung

andere - immunmodulatorische Wirkungen

- pharmakodynamische und –kinetische Parameter
- Art und Lokalisation der Infektion
- Biologische Verhältnisse am Infektionsort
- Immunstatus des Patienten

Faktoren, die die Wirksamkeit eines Antibiotikums beeinflussen

- Wirkungsspektrum und Resistenzentwicklung

antibakterielle Wirkung

andere - immunmodulatorische Wirkungen

- pharmakodynamische und –kinetische Parameter
- Art und Lokalisation der Infektion
- Biologische Verhältnisse am Infektionsort
- Immunstatus des Patienten

Resistenz

- Natürliche Resistenz (Grundlage für Wirkspektrum eines AB)

- Erworbene Resistenz

Chromosomenmutation - Selektion resistenter Bakterien

Übertragbare Resistenz

Aufnahme von DNA durch

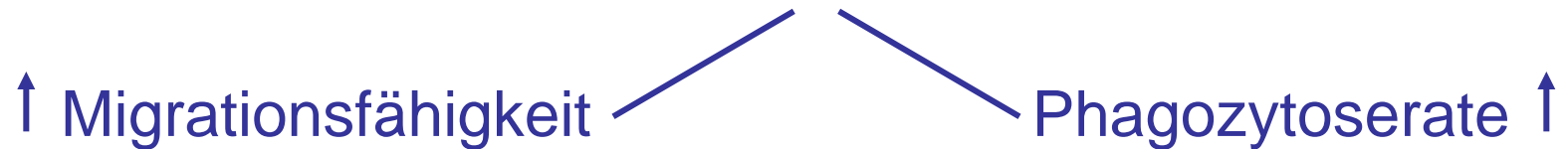
Transformation

Transduktion

Konjugation (Resistenzplasmide)

Immunmodulatorische Wirkungen bei Antibiotika

- *Beispiel Clindamycin:* Anreicherung von Clindamycin in PMNL und Makrophagen



- *Beispiel Doxycyclin-Hyclat:* subinhibitorische Dosen hemmen die Aktivierung zellständiger Matrix-Metall-Proteinasen

Resistenz

- Natürliche Resistenz (Grundlage für Wirkspektrum eines AB)

- Erworbene Resistenz

Chromosomenmutation - Selektion resistenter Bakterien

Übertragbare Resistenz

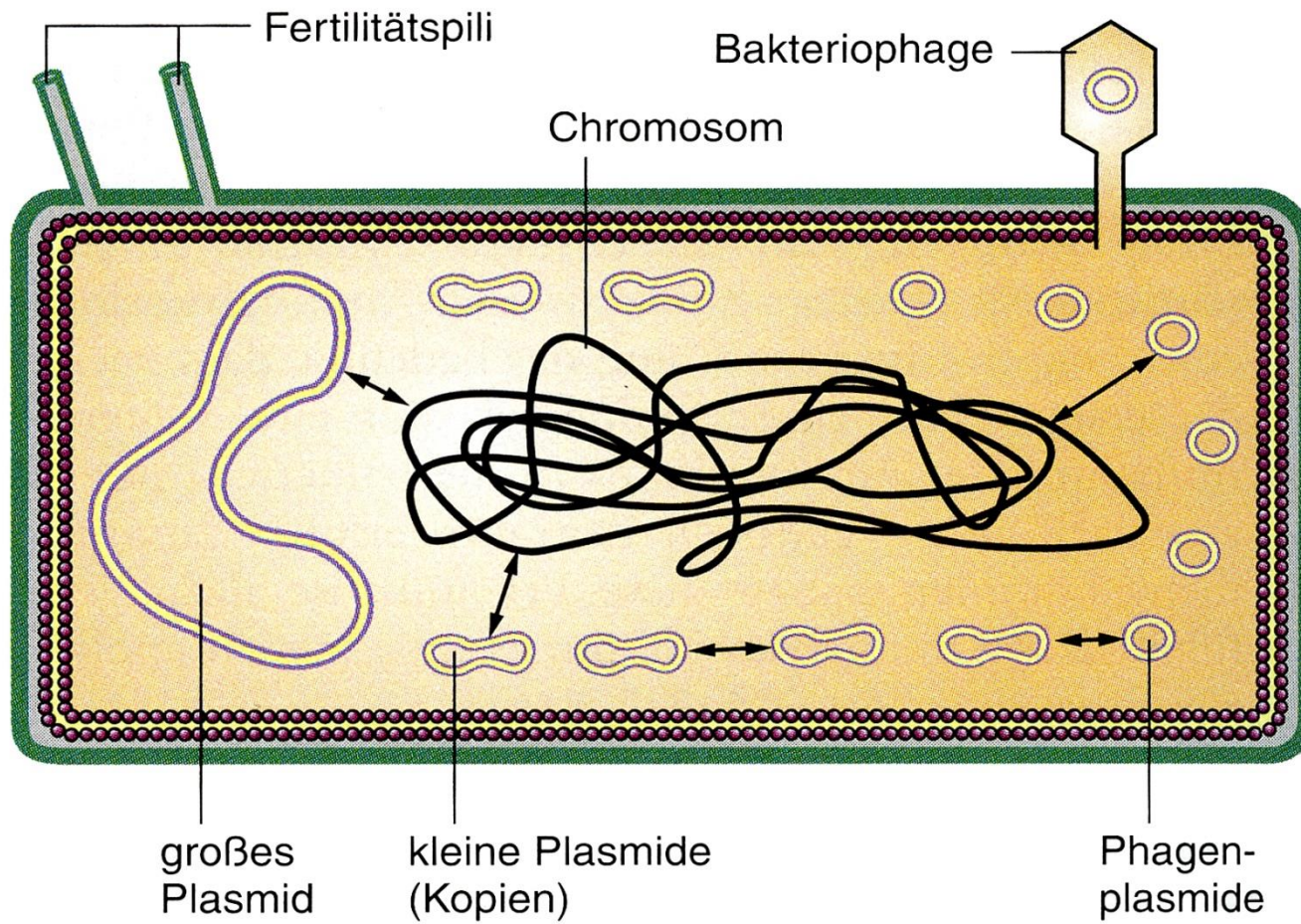
Aufnahme von DNA durch

Transformation

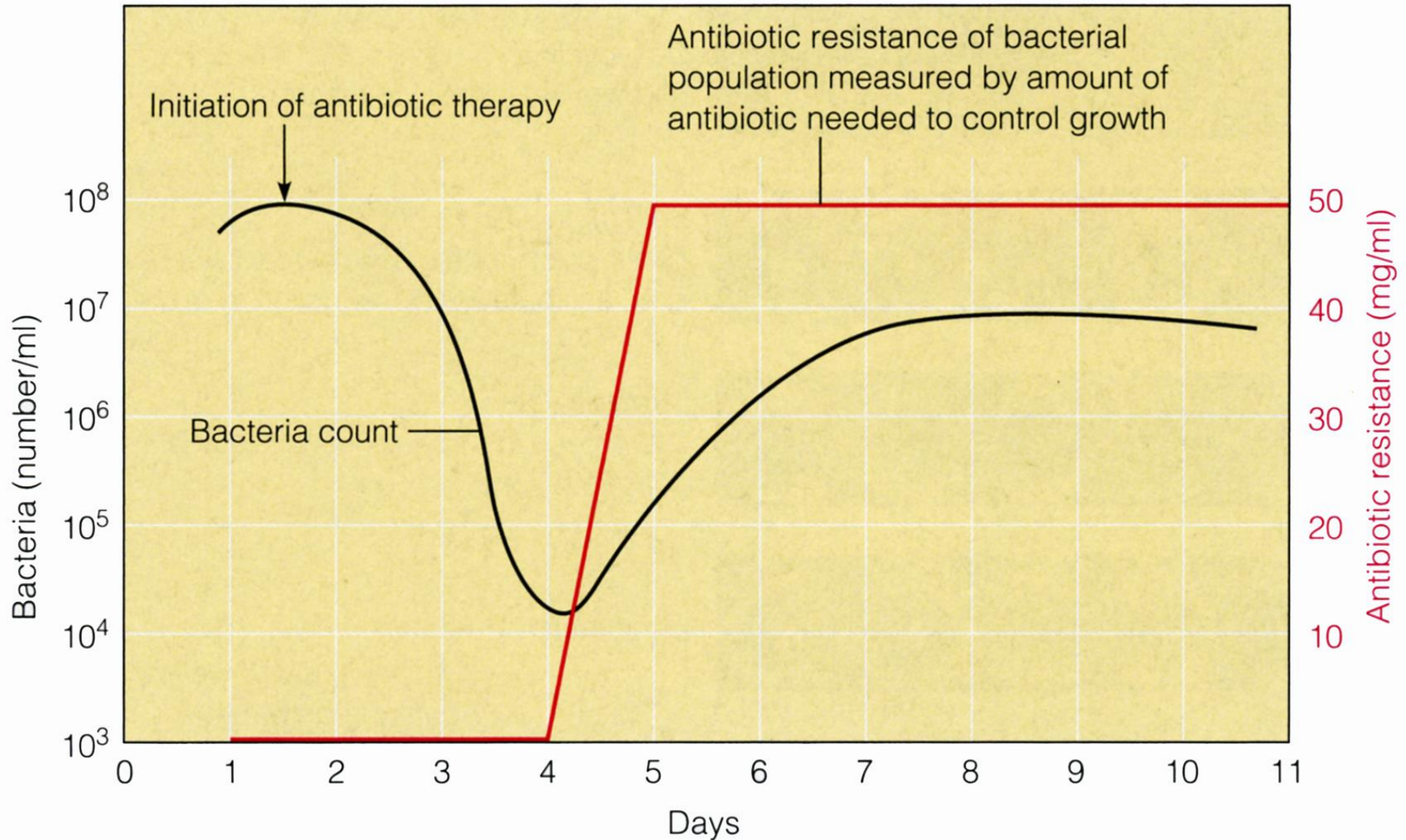
Transduktion

Konjugation (Resistenzplasmide)

Mechanismen genetischer Änderungen in Bakterien



Entwicklung resistenter Mutanten während einer Antibiotika-Therapie



Induzierte Resistenz - Moxifloxacin



Induzierte Resistenz

Stamm	Ciprofloxacin			Gatifloxacin			Moxifloxacin		
	Anfang	Ende	ab Passage	Anfang	Ende	ab Passage	Anfang	Ende	ab Passage
ATCC 33277	0,125	>32	10	0,012	>32	10	0,006	32	20
D2-4-3	0,064	6	10	0,008	>32	30	0,008	32	20
D5-2-2	0,125	0,38	50	0,016	>32	20	0,012	>32	20
D9-3-3	0,125	>32	10	0,016	>32	10	0,008	4	10
J358-1	0,064	0,125	50	0,006	0,047	40	0,008	>32	20
J361-1	0,094	6	10	0,012	>32	10	0,008	32	40
J362-1	0,125	16	10	0,006	>32	10	0,008	>32	20
J374-1	0,25	0,25		0,016	8	10	0,016	>32	10
J378-1	0,125	3	10	0,004	>32	40	0,008	>32	30
J384-1	0,25	4	30	0,023	>32	20	0,032	3	40
J424-1	0,19	>32	20	0,008	>32	10	0,008	0,008	
J426-1	0,094	>32	20	0,012	32	40	0,012	>32	20
J430-1	0,064	>32	30	0,023	>32	20	0,006	24	10
J435-1	0,125	1	10	0,008	>32	30	0,006	32	10
J439-1	0,125	>32	10	0,012	>32	40	0,008	4	10
JH16-1	0,094	>32	10	0,012	>32	20	0,006	8	40

Resistenzmechanismen

1. Inaktivierende Enzyme: z.B. Betalaktamasen spalten Betalaktamring von Betalaktamantibiotika; deshalb Betalaktamaseinhibitoren (Clavulansäure)
2. Veränderte Zielmoleküle:
Tetrazykline, Lincosamide, Fluorchinolone
3. Veränderte Permeabilität der Zellwand:
Tetrazykline
4. Verstärkte Ausschleusung aus Zelle (Effluxpumpen):
Tetrazykline
5. Alternative Stoffwechselwege: Folsäureantagonisten