

Aus der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Vergleich von Sonikation, Vortex und dem Standardverfahren,
intraoperativer Abstrich, zur Keimbestimmung bei der
chirurgischen Zahnentfernung,
eine Pilotstudie

Comparison of sonication, vortex and the standard method,
intraoperative swab, for microbiological testing in tooth extrac-
tion, a pilot study

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Oliver Wagendorf

Datum der Promotion: 30.06.2024

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung	6
Abstract	7
1 Einleitung	9
1.1 <i>Bakterielle Biofilme</i>	10
1.2 <i>Biofilm assoziierte Infektionen außerhalb des Mundes</i>	10
1.3 <i>Entstehung des oralen Biofilms am Beispiel der dentalen Plaque</i>	11
1.4 <i>Dentale Infektionen</i>	12
1.4.1 <i>Karies und der dentale Biofilm</i>	13
1.4.2 <i>Parodontitis und der dentale Biofilm</i>	13
1.5 <i>Mikrobiomtestung in der Zahn- Mund- und Kieferheilkunde</i>	13
1.6 <i>Mikrobiologische Probengewinnung in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie</i>	15
1.6.1 <i>Intraoperativer Abstrich</i>	15
1.6.2 <i>Vortex</i>	15
1.6.3 <i>Sonikation</i>	15
1.7 <i>Ziel der Studie</i>	19
2 Methodik	20
2.1 <i>Patientenkollektiv und Einschlusskriterien</i>	20
2.2 <i>Chirurgisches Vorgehen</i>	20
2.3 <i>Weitere Aufbereitung und Verarbeitung der Proben</i>	21
2.4 <i>Mikrobiologische Analyse</i>	22
2.5 <i>Datenanalyse</i>	22

2.6	<i>Antibiotikaempfindlichkeit</i>	25
2.7	<i>Statistische Auswertung</i>	25
3.	Ergebnisse	26
3.1	<i>Analyse der Proben</i>	26
3.2	<i>Analyse der bakteriellen Zusammensetzung</i>	30
3.2.1	Operational Taxonomic Units – OTUs	30
3.2.2	Phyla-Verteilung.....	31
3.2.3	Verteilung der bakteriellen Ordnungen	32
3.3	<i>Analyse der bakteriellen Resistenzen</i>	33
4.	Diskussion	34
4.1	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	34
4.2	<i>Interpretation der Ergebnisse</i>	34
4.3	<i>Vergleich der Ergebnisse zum Stand der Wissenschaft</i>	37
4.4	<i>Stärken und Schwächen der Studie</i>	39
4.5	<i>Implikationen für Praxis und/oder zukünftige Forschung</i>	39
5.	Schlussfolgerungen	40
	Literaturverzeichnis	41
	Eidesstattliche Versicherung	46
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	47
	Druckexemplar der Publikation	48
	Lebenslauf	59
	Komplette Publikationsliste	60
	Danksagung	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Intrinsische Antibiotika Resistenz in Prozent, je Probenart: Abstrich (swab), Vortex (vortex), Sonikation (sonication) (Wagendorf et al.,2022) (73)	30
Tabelle 2: Vergleich der Antibiotikaresistenzen gegeneinander (Wagendorf et al., 2022) (73).....	33

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktion eines Ultraschallreiniger, äquivalent zur Sonikation, Quelle: www.maschinenbau-wissen.de	16
Abbildung 2: Blasenentwicklung im Zuge der Ultraschallreinigung, äquivalent bei der Sonikation, Quelle: www.maschinenbau-wissen.de	17
Abbildung 3: Sonikation von 6 Proben im Bacto-Sonic für 1 Minute (Foto: O. Wagendorf)	21
Abbildung 4: Methodik der Probengewinnung und -aufbereitung: 1. Gewinnung der Proben während des chirurgischen Vorgehens, 2: Weitere Aufbereitung der Proben durch Vortex und Sonikation, 3: mikrobiologische Analyse durch DNA-Isolierung, 16S rRNA-Gensequenzierung und anschließende Analyse, erstellt mit BioRender.com	22
Abbildung 5: Sättigungskurven aller Proben, je Patient für Abstrich (swab), Vortex (vortex) und Sonikation (sonication), (Wagendorf et al., 2022) (73).....	24
Abbildung 6: Mittelwerte der OTUs in Abstrich (swab), Vortex und Sonikation (sonication) (Wagendorf et al., 2022) (73).....	27
Abbildung 7: Verteilung der Phyla je Probenart: Abstrich (swab), Vortex und Sonikation (sonication) (Wagendorf et al., 2022) (73)	28
Abbildung 8: Verteilung der bakteriellen Ordnungen je Probenart: Abstrich (swab), Vortex, Sonikation (sonication) (Wagendorf et al., 2022) (73).....	29
Abbildung 9: Bland-Altman- Plot zum Vergleich Abstrich gegen Sonikation, bezogen auf Gesamt-OTUs. (Wagendorf et al., 2022) (73).....	31
Abbildung 10: Vergleich in der prozentualen Verteilung der bakteriellen Ordnungen zwischen Abstrich (swab), Vortex, und Sonikation (sonication) (Wagendorf et al.,2022) (73).....	32

Abkürzungsverzeichnis

BP: Basenpaare

DNA: desoxyribonucleinacid

kHz: Kiloherz

ml: Milliliter

OTU: Operational Taxonomic Units

PCR: Polimerase Ketten Reaktion

PJI: Endoprothesen Infektion

rRNA: ribosomale-Ribonuklein-Säure

Zusammenfassung

Einleitung: Ausgeprägte kariöse Läsionen oder Parodontitis stellen die häufigste Ursache für dentale Infektionen dar. Beide Krankheitsbilder entstehen durch Veränderungen des oralen Mikrobioms. Diese Infektionen können zu schwerwiegenden Verläufen bis hin zu Abszedierungen mit potenziell letalem Ausgang führen. In Zusammenhang mit diesen Infektionen reicht dann allein eine Sanierung des Infektionsfokus nicht aus, was den Einsatz von Antibiotika von Nöten macht. Zur gezielten antibiotischen Behandlung ist eine Abstrichnahme zur Keimbestimmung und Resistenztestung notwendig. Diese erweist sich häufig als unzureichend. Von daher ist es notwendig, aussagekräftigere Methoden zur Mikrobiombestimmung zu entwickeln. Ziel dieser Arbeit bestand darin, verschiedene biofilmlösende Verfahren, wie die Sonikation und Vortex an extrahierten Zähnen als ein Alternativverfahren für die mikrobiologische Diagnostik im Vergleich zum Standardverfahren zu untersuchen. Ebenso sollte die Resistenzlage der identifizierten bakteriellen Spezies untersucht werden.

Material und Methoden: Es wurden 20 Patienten mit einem nicht erhaltungswürdigen unteren Prämolaren eingeschlossen. Nach chirurgischer Zahnentfernung wurde ein intraoperativer Abstrich aus dem Zahnfach zur Keimbestimmung gewonnen und der extrahierte Zahn für die weitere Aufbereitung in einer DNA-Pufferflüssigkeit asserviert. Anschließend wurde der Zahn mittels der zu untersuchenden Verfahren, der Sonikation und dem Vortex aufbereitet. Die dadurch gewonnenen Proben wurden jeweils zur Analyse des Mikrobioms mit Hilfe der genetischen Sequenzierung des 16s-rRNA-Gens ausgewertet. Es wurde an allen Proben die Menge an bakterieller DNA, gefundener Spezies, sowie deren Einteilung in Phylum und Ordnung analysiert. Für die statistische Auswertung wurden der Bland-Altman-Test, sowie der Friedman-Test und die alpha-adjustierte post-hoc-Analysen durchgeführt.

Ergebnisse: Insgesamt konnten 60 Proben, je 20 für jedes Verfahren ausgewertet werden. Durch den Einsatz der Sonikation war es möglich, signifikant mehr bakterielle Spezies im Vergleich zum Standardverfahren nachzuweisen. Die intrinsischen Resistenzen unterschieden sich in den untersuchten Methoden nicht. Signifikante Unterschiede konnten jedoch in Bezug auf die getesteten Antibiotika gezeigt werden. Die Antibiotika mit der geringsten Resistenzrate waren Amoxicillin mit Clavulansäure und Levofloxacin. Die mit der höchsten Resistenzrate Amoxicillin und Clindamycin.

Schlussfolgerung: Durch den Einsatz der Sonikation ist es möglich, signifikant mehr bakterielle Spezies als mit dem Standardverfahren nachzuweisen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung der gefundenen Mikrobiome unterscheidet. Daraus resultierend, stellt die Sonikation ein valides Mittel für einen bestmöglichen Einblick in das krankheitsverursachende oder krankheitsassoziierte Mikrobiom dar.

Abstract

Introduction: Advanced carious destruction or periodontitis represents the most common cause of dental infections. Both conditions arise due to changes in the oral microbiome. As the disease progresses, it can lead to severe infections, including abscesses with potentially lethal outcomes. In the context of these infections, merely addressing the infectious focus is insufficient, necessitating the use of antibiotics. In cases of particularly severe infections, a microbial identification and resistance testing via swab sampling is indicated for targeted antibiotic treatment. However, this approach often proves inadequate, making it necessary to develop more informative methods for microbiome determination. The aim of this study was to investigate various biofilm-detaching techniques, such as sonication and vortexing on extracted teeth as an alternative method for microbiological diagnostics, in comparison to the standard procedure. Additionally, the resistance profile of the identified bacterial species was to be examined.

Materials and Methods: Twenty patients with non-restorable lower premolars were included in the study. After surgical tooth removal, an intraoperative swab from the alveolus was obtained for microbial identification, and the extracted tooth was preserved in a DNA buffer solution for further processing. Subsequently, the tooth was prepared using the tested methods, sonication and vortexing. The obtained samples were analyzed for microbiome composition using genetic sequencing of the 16S rRNA gene. The analysis included assessing the quantity of bacterial DNA, identified species, and their classification into phylum and order. Statistical analysis was conducted using the Bland-Altman test, the Friedman test, and alpha-adjusted post-hoc analyses.

Results: In total, 60 samples, 20 for each method, were evaluated. The use of sonication allowed the detection of significantly more bacterial species compared to the standard

procedure. Intrinsic resistances did not differ between the tested methods. However, significant differences were observed in terms of the tested antibiotics. Antibiotics with the lowest resistance rates were amoxicillin with clavulanic acid and levofloxacin, while amoxicillin and clindamycin had the highest resistance rates.

Conclusion: Sonication allows for the detection of significant more bacterial species than the standard procedure and showed differences in the composition of the identified microbiomes also. Consequently, sonication represents a valid method to gain a better understanding of the disease-causing or disease-associated microbiome.

1 Einleitung

Dentale Infektionen sind der häufigste Grund für die Vorstellung in einer zahnärztlichen Notaufnahme in Deutschland.(1) Ursächlich dafür sind meist nicht erhaltungswürdige Zähne oder Parodontitiden. Die Entfernung dieser Zähne, zum Teil mit begleitender antibiotischer Behandlung, stellt meist die einzige Therapieoption dar.(2) Weltweit sind Zahnärzte für 10% der verschriebenen Antibiotika verantwortlich.(3) Die am häufigsten verschriebenen Antibiotika bei oralen Infektionen sind Beta-Lactam-Antibiotika (z.B. Penicilline), gefolgt von Lincosamiden (z.B. Clindamycin), Makroliden (z.B. Erythromycin), Tetracyclinen (z.B. Doxycyclin) und Fluorochinolonen (z.B. Levofloxacin).(4) Das in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie am häufigsten verwendete Antibiotikum ist Amoxicillin mit Clavulansäure (z.B. Augmentan oder Amoxi-Clav), da es aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums sowohl aerobe als auch anaerobe Spezies einschließt.(4) Bei einer Allergie gegen Penicillin ist laut der S3-Leitlinie „odontogene Infektionen“, der Deutschen Gesellschaft für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde, Clindamycin die Alternative der Wahl.(5) Aufgrund fehlender evidenzbasierter Empfehlungen zum rationalen Einsatz von Antibiotika im Bereich der Zahnmedizin werden Überverordnung in 55-80% der Fälle diskutiert.(3) Daten einer Studie von 2017 zeigten, dass nur 12% der Zahnärzte Antibiotika bei der richtigen Indikation verordnet hatten.(6) Dies wird als ein entscheidender Faktor für eine zunehmende Antibiotika Resistenz und Veränderung der Zusammensetzung des Mikrobioms bei odontogenen Infektionen vermutet.(7, 8) In neueren Untersuchungen von Heim et al. aus dem Jahr 2020 wurden Streptococcus Spezies als die vorwiegende Spezies in odontogenen Abszessen identifiziert, mit einer Antibiotikaresistenz in bis zu 50% der Fälle. Nur 4,3% der gefundenen Bakterien zeigten Resistenzen auf Ampicillin/Sulbactam, wohingegen 17,5% Resistenzen gegen Clindamycin aufwiesen.(9) In einer Studie von Meinen et al. wurden die Resistenzen unterschiedlicher Antibiotika auf Streptococcus spp. in Zahnarztpraxen und Krankenhäusern, basierend auf Daten der deutschen Antimicrobial-Resistance-Surveillance, untersucht.(10) Hierbei zeigten sich Resistenzraten von 17-19% für Clindamycin, aber auch von 17,4% gegen Fluorochinolone.(10) Salinas und Mitarbeiter konnten bei odontogenen Infektionen Resistenzen gegenüber Doxycyclin in 15,02% der gefundenen Spezies nachweisen.(11)

Gemäß der aktuell gültigen deutschen Leitlinie wird eine intraoperative Abstrichnahme bei schweren odontogenen Infektionen zur Identifikation der potentiell ursächlichen

Keime empfohlen, um ein möglichst gezieltes Antibiotikaregime anhand einer mikrobiologischen Resistenztestung etablieren zu können.(12) Es ist bekannt, dass als Hauptursache für dentogene Infektionen Bakterien gelten, die einen organisierten Biofilm bilden.(5)

1.1 Bakterielle Biofilme

Bakterien werden nach ihren Eigenschaften und ihrer Abstammung nach Phylum, Klasse, Ordnung, Familie, Gattung und Spezies eingeteilt.(13) Ein durch Co-Aggregationsmechanismen stabilisierter Komplex aus Bakterien wird als Biofilm bezeichnet.(14-16)

Diese Biofilme sind nicht nur im Bereich der Medizin ein bekanntes Problem, sondern finden auch in vielen anderen Bereichen Beachtung.(17, 18) Die Entstehung eines Biofilms findet überwiegend auf feuchten Oberflächen statt. Die Biofilmbildung dient den Bakterien als Schutz vor externen Noxen, sowie dem Austausch von Genen, zur Anpassung und Verbesserung ihrer Eigenschaften.(19, 20) Durch die Interaktion ist es ihnen möglich, die Umweltbedingungen, beispielsweise durch Anpassung des pH-Wertes, zu beeinflussen.(21)

Biofilme können grundsätzlich aus nur einer Bakterienspezies bestehen oder aus unterschiedlichen Spezies.(22)

Abhängig von den unterschiedlichen Oberflächenbedingungen und den assoziierten Bakterien, können die Eigenschaften eines solchen Biofilms stark variieren.(20, 23, 24)

Die Biofilmentstehung beginnt mit der Adhärenz von planktonischen Bakterien auf Oberflächen.(25) Nach Wachstum in lateraler und horizontaler Richtung und daraus entstehenden Kolonien, kommt es zur Produktion von Extrazellulärschubstanz, in welcher die Kolonie eingebettet sind. Durch die Ausbildung von Wasserkanälen wird die Nährstoffzufuhr, aber auch der Abtransport von Metaboliten gewährleistet.(15) Durch das weitere Wachstum und die Bildung von Extrazellulärschubstanz als Gerüst für die einzelnen Kolonie entsteht schlussendlich der Biofilm.(26)

1.2 Biofilm assoziierte Infektionen außerhalb des Mundes

Biofilm assoziierte Infektionen treten nicht nur im Bereich des Mundes auf.

Periprothetische Infektionen durch bakterielle Besiedelung der künstlichen Gelenkoberfläche stellen die zweithäufigste Ursache für das Versagen einer Gelenkprothese in der Orthopädie dar.(27) Studien konnten auch hier einen

organisierten Biofilm, vornehmlich bestehend aus einer einzelnen Spezies, nachweisen. Biofilme können nicht nur lokal, sondern auch in anderen Körperregionen zu Erkrankungen führen. Das Risiko eine Bakteriämie auszulösen, liegt bei bis zu 100 % nach zahnärztlichen Eingriffen (Extraktionen, dentoalveoläre Eingriffe), aber auch bei bis zu 57% nach Routinemaßnahmen wie täglicher Mundhygiene oder Benutzung von Zahnseide.(28) Es konnte ebenso ein Zusammenhang zwischen einer durch eine zahnärztliche Behandlung induzierte Bakteriämie und der Entwicklung einer periprothetischen Infektion gezeigt werden.(29) Ursächlich dafür ist die resultierende hämatogene Ausbreitung oraler Bakterien zur künstlichen Gelenkoberfläche und der fehlenden Abwehr aufgrund der Avitalität des künstlichen Gelenkes.

Die hämatogene Streuung oraler Bakterien ist eine Hauptursache für infektiöse Endokarditiden.(30)

1.3 Entstehung des oralen Biofilms am Beispiel der dentalen Plaque

Die Entstehung des oralen Biofilms ist ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlicher bakterieller Spezies, welche die verschiedenen Oberflächen der Mundhöhlen besiedeln. Der Biofilm, welcher sich auf Zähnen bildet, wird als dentale Plaque bezeichnet.(31)

Direkt nach erfolgter Reinigung kommt die Zahnoberfläche mit Speichel und Sulkusfluid in Kontakt. Durch die negative Ladung des Hydroxylapatit entsteht der Pellikel, welcher mit positiv geladenen Glykoproteinen, Statherin, Histatin, Prolin-reichen Proteinen und Alpha-Amylase bedeckt ist.(32) Gram-positive Streptokokken wie *Streptokokkus sanguinis*, *Streptokokkus oralis*, *Streptokokkus mitis* und *Neisseria* zählen zu den ersten Kolonialisierern der Zahnoberfläche.(25) Diese sind aerobe oder fakultativ aerobe Spezies. Durch Wachstum und Zellteilung, mit Bildung von Extrazellulärschubstanz, kommt es zum Verbrauch von Sauerstoff, was den meist anaeroben Zweitbesiedlern den Weg ebnet. Hierzu zählen insbesondere *Actinomyces* Spezies, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* und *Capnocytophaga* Spezies.(25) Konnte der bereits entstandene Biofilm über eine Zeit von ungefähr sieben Tagen reifen, kommt es nun durch die starke Beeinflussung der Umweltbedingungen innerhalb des Biofilms zur Kolonialisierung durch die sogenannten Drittbesiedler.(25) Hierzu zählen hauptsächlich die gram-negativen streng anaeroben *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* und Spirochaeten wie *Treponema denticola*.(25)

Diese Interaktion resultiert schließlich in einem organisierten, aus vielen Spezies bestehenden Bakterienverbund mit spezifischen Eigenschaften und Folgen für potenzielle dentale Infektionen.(20)

1.4 Dentale Infektionen

Die Bakterien, welche das Cavum oris besiedeln werden als die orale Mikroflora oder auch das orale Mikrobiom bezeichnet.(33)

Der Begriff Mikrobiom wurde durch Joshua Lederberg geprägt und bezeichnet „die ökologische Gemeinschaft kommensaler, symbiotischer und pathogener Mikroorganismen, die buchstäblich unseren Körperraum teilen und als Determinanten von Gesundheit und Krankheit so gut wie ignoriert werden“ (aus dem Englischen von Lederberg et. al. 2001).(34) Abhängig vom Habitat unterscheidet man folglich unterschiedliche Mikrobiome: das des Gastrointestinaltrakt, der Geschlechtsorgane, der Haut oder auch der Mundhöhle mit seinen unterschiedlichen Oberflächen, welches als das orale Mikrobiom zusammengefasst wird.

Das orale Mikrobiom besteht aus mehr als 600 Arten, die verschiedene Lebensräume wie Zähne, Gingiva, Zunge, Wangen, Gaumen und Mandeln besiedeln. 1179 verschiedene bakterielle Spezies, auch bezeichnet als Taxa, wurden 2010 von Floyd E. Dewhirst et al. identifiziert, von denen 24% benannt wurden, 8% kultiviert, aber unbenannt waren und 68% unkultiviert blieben.(33) Heute sind 1599 Taxa in der "expanded Human Oral Microbiome Database" (eHOMD.org) aufgeführt. Das beweist, dass es eine große Diskrepanz zwischen den kultivierbaren Bakterien und der tatsächlichen Anzahl an bakteriellen Spezies in der Mundhöhle gibt.

Während man in früheren Untersuchungen davon ausging, dass ein bestimmtes Bakterium ursächlich für die Entstehung oraler Infektionen ist, haben neuere Studien gezeigt, dass Mischinfektionen und spezifische Zusammensetzungen des oralen Biofilms für die Erkrankungsentstehung verantwortlich sind.(25, 35, 36)

Aus diesem Wissen entstand die „ökologische Plaque Hypothese“, welche eine Änderung der Umweltbedingungen unter Vorhandensein von dentaler Plaque als Ursache für die Änderung des Biofilms, mit daraus resultierender Entstehung von Karies und Parodontitis

sieht.(24, 37, 38) Diese Hypothese gilt als die aktuell gültige in Bezug auf die Ätiopathogenese der Karies und Parodontitis und stellt die Grundlage von Interventions- und Prophylaxemaßnahmen dar.

1.4.1 Karies und der dentale Biofilm

Häufiger Konsum von Zucker ermöglicht es, sauren und säureproduzierenden Bakterien wie *Streptokokkus mutans* und *Lactobacillus acidophilus* ein saures Milieu innerhalb des Biofilmes zu Lasten der Demineralisation des Zahnschmelzes zu erzeugen, was schlussendlich in der Entstehung der Karies resultiert.(21) Trotz der starken Verbindung von *S. mutans* und der Entstehung von Karies, konnte gezeigt werden, dass eine hohe Bakterienzahl allein nicht ausreichend für die Entwicklung einer Karies ist.(25)

Aus diesem Grund wird nicht eine einzelne Spezies als Ursache für die Entstehung einer Karies gesehen.(25) Viel mehr wird die Kombination unterschiedlicher kariogener Keime wie *S. mutans*, *S. mitis*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* und Bifidobakterien zur Erhöhung des kariogenen Potentials der dentalen Plaque als Ursache für die Entstehung einer Karies diskutiert.(25)

1.4.2 Parodontitis und der dentale Biofilm

Bei der Entstehung der Parodontitis wird vornehmlich die inflammatorische Reaktion auf gramnegative Bakterien, wie *Porphyromonas gingivalis* und Spirochaeten, wie *Treponema denticola* als Bestandteile des Biofilms für ursächlich gehalten.(39) Durch Produktion von Virulenzfaktoren und Reifung des Biofilmes durch unterschiedliche Umweltfaktoren kommt es weiterhin zur Differenzierung des Biofilmes mit verstärktem Wachstum von weiteren Keimen, wie *Tannerella forsythia*, *P. intermedia*, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens* und *Campylobacter rectus*.(36, 40, 41)

1.5 Mikrobiomtestung in der Zahn- Mund- und Kieferheilkunde

Um krankheitsbedingte Veränderungen des oralen Biofilms analysieren zu können, ist die Kenntnis dessen Zusammensetzung essenziell. Erste Studien dazu wurden bereits im Jahr 1994 publiziert.(42, 43) Diese Untersuchungen waren aufgrund der damaligen Untersuchungsmethoden auf kulturbasierte Auswertungen limitiert, konnten aber bereits ungefähr 280 unterschiedliche Spezies detektieren.(33) Um die Zusammensetzung noch

weiter aufzuschlüsseln, wurden weitere mikrobiologische Analysemethoden wie z.B. Next-Generation-Sequenzierungsmethoden mit PCR zur Amplifikation, gefolgt von einer Analyse der V3-V4-Region des 16s rRNA-Gens, im Jahr 2001 etabliert.(35, 44-48) Die Untersuchungen dazu erfolgten entweder im stimulierten und nicht stimulierten Speichel durch Mundspülungen oder anhand von nischenspezifische Proben von der supra- und subgingivalen Plaque oder Zungenabstrichen.(49) Vergleiche dieser Proben verschiedener Regionen zeigten erhebliche intra- und interindividuelle Unterschiede, wobei die grundsätzliche bakterielle Zusammensetzung des Mikrobioms sich ähnelte.(23) So finden sich beispielsweise in der subgingivalen Plaque mehr Anaerobier, als im Wangenabstrich, was allein durch die Umweltbedingungen erklärt werden kann.(49) Durch die Einführung der Gen-Analyse war es möglich, zusätzlich zu den 280 zuvor bekannten Spezies, weitere 320 Spezies zu identifizieren.(50-53) Die Limitation der bisherigen Untersuchungen stellt die Spezifität der jeweiligen untersuchten oralen Nischen dar, welche immer nur einen Ausschnitt des kompletten Mikrobioms darstellen. Durch die klassischen Untersuchungsmethoden können ebenso nur planktonische Mikroorganismen nachgewiesen werden, da die in Biofilm organisierten Bakterien an der jeweiligen Oberfläche anhaften und sich somit schwer nachweisen lassen. Hier Bedarf es somit neuer Ansätze um einen Querschnitt über die oralen Nischen in einem speziellen Setting, wie der Zahnentfernung, unter Berücksichtigung der Nachweisproblematik von in Biofilmen organisierten Bakterien, zu erhalten.

Eine Erkrankung, welche schwer zu diagnostizieren ist und im Zusammenhang mit dentalen Infektionen entsteht, ist die kraniofaziale Actinomycose.(54, 55) Aufgrund der schweren Nachweisbarkeit dieser Erreger ist anzunehmen, dass es zu einer Unterschätzung des generellen Auftretens dieser Erkrankung kommt, wenn nur intraoperative Abstriche, zur mikrobiellen Analyse herangezogen werden.

Insbesondere bei Patient:innen nach Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich in Folge einer malignen Erkrankung ist dieses Krankheitsbild eine schwerwiegende Komplikation.(54) Es Bedarf folglich neuer, aussagekräftiger Methoden um die Diagnostik und somit die Prophylaxe zu verbessern und die frühzeitige Intervention zu ermöglichen.

1.6 Mikrobiologische Probengewinnung in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie

1.6.1 Intraoperativer Abstrich

Der intraoperative Abstrich stellt das Standardverfahren zur mikrobiologischen Probengewinnung in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie dar.(12) Hierbei wird ein steriler Abstrichtupfer in das zu untersuchende Gebiet gebracht und dort gedreht. Dies kann in allen zu untersuchenden Regionen wie beispielsweise in Abszesshöhlen oder in Alveolen, nach Zahntfernung durchgeführt werden. Potenzielle Schwachstellen sind die hohe Gefahr der Kontamination während der Probengewinnung und Abstrichproduktion.(56) Ein Vorteil ist die Einfachheit und großflächige Verfügbarkeit dieser Methode.

1.6.2 Vortex

Der Vorgang des Vortex ist ein in der biologischen und biochemischen Labortätigkeit etabliertes Verfahren.(57, 58) Hierbei wird die sich in einem Gefäß befindende Flüssigkeit durch Rüttel- oder Kreisbewegungen durchmischt. Dies geschieht mit einem sogenannten Vortexmischer, welcher Umdrehungen von bis zu 2500 pro Minute erreichen kann. Durch die Vortexapplikation soll es zu einer besseren Lösung von an Oberflächen adhärenen Partikeln im Untersuchungsmedium kommen, was eine Voraussetzung für die Analyse dieser darstellt.(58) In der Zahnmedizin wurde dieses Verfahren bisher nicht eigenständig untersucht, fand jedoch in mikrobiologischen Studien weitreichenden Anklang.(57)

1.6.3 Sonikation

Eine Weiterentwicklung zum Ablösen des Biofilmes stellt das Verfahren der Sonikation dar. Es wurde erstmals im Jahr 1985 eingesetzt, um adhärenente Biofilme auf orthopädischen Implantaten bei periprothetischen Infektionen zu untersuchen. (59) Sonikation ist ein Ultraschallverfahren und ermöglicht Biofilme von Oberflächen zu lösen. Beim Einsatz der Sonikation in der Medizin werden die zu untersuchenden Objekte in einem Behälter mit Flüssigkeit, meist steriler Kochsalzlösung, gelagert und in das Ultraschallbad gelegt. Der Ablauf der Sonikation wird im Folgenden beschrieben:

In einem speziellen Ultraschallbad werden mit Hilfe eines Wandlers, Ultraschallwellen im Bereich von 20- 400 kHz erzeugt. Es entsteht ein Ultraschallfeld, in dem durch einen kontinuierlichen Wechsel von Über- und Unterdruck, Vakuumbülschen an der Oberfläche des Objektes entstehen, welche im Verlauf platzen und somit Verunreinigungen, wie beispielsweise Biofilme ablösen können. (Abbildung 1 und 2) Je geringer die Frequenz, desto intensiver ist die ablösende Wirkung.

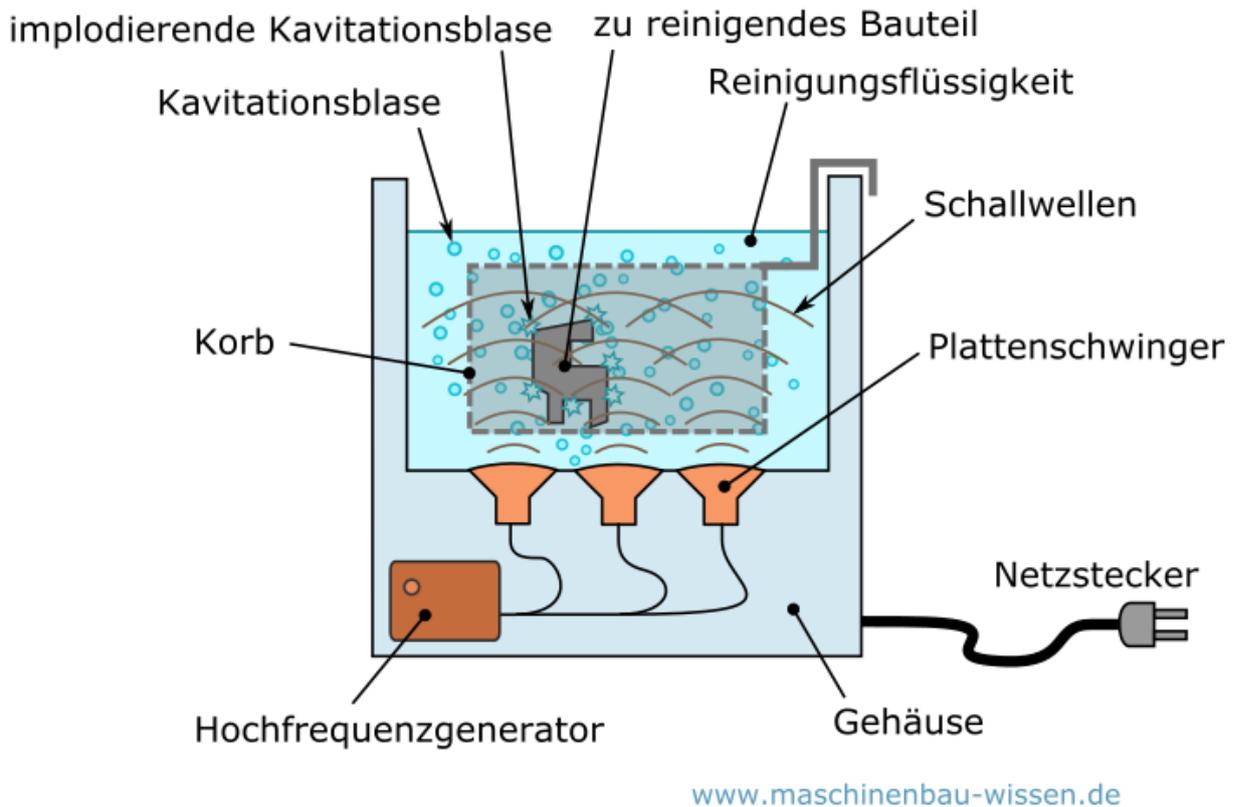


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktion eines Ultraschallreiniger, äquivalent zur Sonikation, Quelle: www.maschinenbau-wissen.de

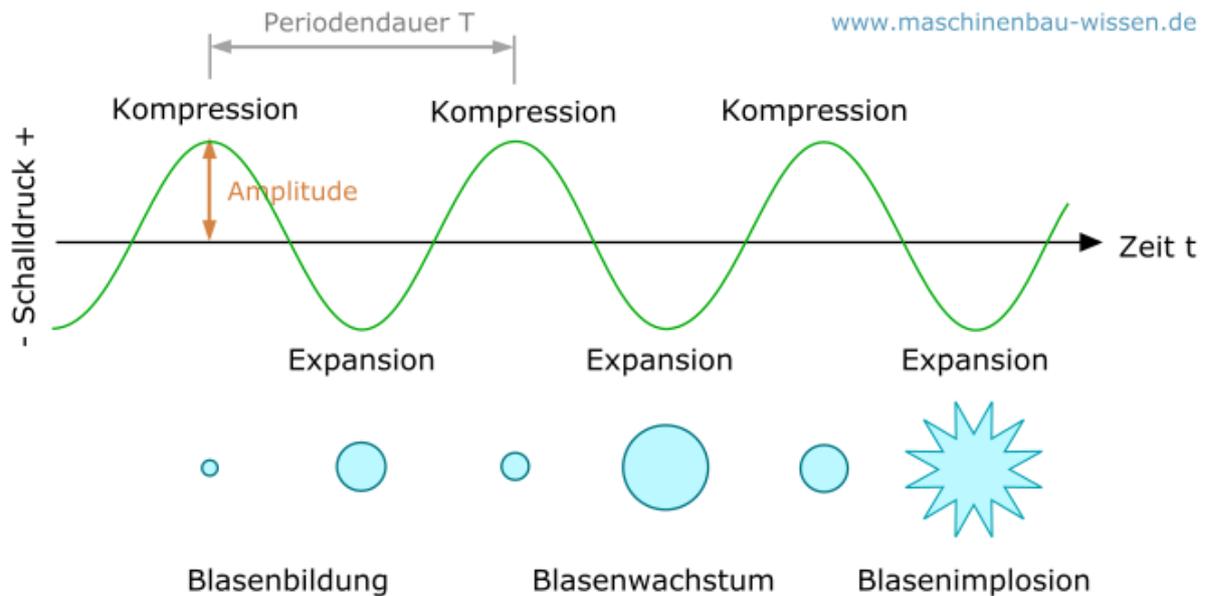


Abbildung 2: Blasenentwicklung im Zuge der Ultraschallreinigung, äquivalent bei der Sonikation, Quelle: www.maschinenbau-wissen.de

Nach erfolgter Sonikation kann die gewonnene Flüssigkeit kultiviert und anschließend mikrobiologisch ausgewertet werden.(60)

Weiterführende, meist orthopädische Studien haben gezeigt, dass durch den Einsatz der Sonikation bei explantierten orthopädischen Prothesen die Sensitivität und Spezifität im Vergleich zum normalen Verfahren, wie Synovialflüssigkeitskulturen und Gewebeproben oder Abstrichen, wesentlich verbessert wird.(61) Aufgrund der Überlegenheit dieses Prozedere in der Diagnostik von Hardware assoziierten Infektion wird die Sonikation in verschiedenen medizinischen Bereichen eingesetzt. In der Orthopädie hat es sich bereits als Standardverfahren etabliert.

In der Diagnostik von Infektionen und dem Erregernachweises bei Brust-, Harn-, endovaskulären und zerebralen Implantaten wird sie ebenfalls angewendet und führte zu einer Verbesserung des diagnostischen Outcomes.(62-65)

Zusätzlich zum Sonikationsverfahren erlauben die verbesserten Analysemethoden des Next-Generation-Sequencing mittels Polymeraskettenreaktion und molekulargenetische Auswertungen, eine detaillierte Bestimmung der Zusammensetzung des infektionsassoziierten Biofilms durch Detektion pathologischer Keime als Auslöser periprothetischer Infektionen.(66)

Die meisten bis dato veröffentlichten Studien in Zusammenhang mit Sonikation finden sich in dem Bereich der Orthopädie, einige wenige Untersuchungen verwendeten diese Verfahren in zahnmedizinischen Fragestellungen. Im intraoralen Bereich ist das Problem des adhärennten Biofilms und dessen mögliches Entzündungspotential bekannt, bisher aber nur an Prothesenoberflächen oder auf Titan- oder Carbonflächen unter Verwendung der Sonikation untersucht worden. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine suffiziente Ablösung erfolgen kann. Die bisherigen Studien verwendeten die Sonikation als methodisches Mittel, untersuchten diese jedoch nicht selbst in vivo.(67-69)

Es ist bekannt, dass der Biofilm, aber nicht nur auf künstlichen Oberflächen im intraoralen Bereich existiert, sondern auch auf zahntragenden Abschnitten vorhanden ist. Eine Änderung dieses Biofilms entspricht somit der Krankheitsentstehung im Sinne der ökologischen Plaque Hypothese. Die Vermutung, dass das diagnostische Outcome bei Abstrichnahme zur adäquaten Erregerbestimmung im Bereich der Mund-Kiefer-Gesichts-chirurgie unzureichend ist, wird vielfach diskutiert. Bis dato fehlen allerdings repräsentative Daten zu dieser Fragestellung. Es ist bekannt, dass durch das unkontrollierte Wachstum verschiedener Spezies, eine Isolation insbesondere in kulturbasierten Untersuchungen nahezu unmöglich macht. Zusätzlich stellt die Organisation aufgrund der erschweren Lösbarkeit und daraus resultierender diagnostischer Lücke in Form von adhärennten Biofilmen ein Problem dar.

Um diesen Biofilm besser untersuchen und verstehen zu können, sind neue Analysemethoden zur Probengewinnung von Nöten, die nicht nur eine orale lokale Nische repräsentieren, sondern der Gesamtheit des potenziellen krankheitsassoziierten Mikrobioms entsprechen. Nur durch ein Verständnis der komplexen Zusammensetzung des krankheitsassoziierten Mikrobioms ist es möglich, zielgerichtete antiinfektiöse Therapiekonzepte zu wählen. Insbesondere bei immungeschwächtem Patienten:innen aber auch bei Patient:innen mit künstlichen Herzklappen, orthopädischen Endoprothesen oder schweren Infektionen, die einer begleitenden antibiotische Therapie bedürfen, ist eine genaue Kenntnis des potentiellen krankheitsverursachenden Mikrobioms und seiner vorherrschenden Erreger entscheidend.

1.7 Ziel der Studie

Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene biofilmlösende Verfahren, wie die Sonikation und Vortex an extrahierten Zähnen als ein Alternativverfahren für die mikrobiologische Diagnostik im Bereich der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie im Vergleich zum Standardverfahren zu untersuchen.

Durch die verbesserte Ablösung des Biofilms in Verbindung mit molekulargenetischen Analysen der Zusammensetzung soll ein, kompletteres Bild des oralen Mikrobioms, im Setting der Zahnentfernung geschaffen werden, was zu einem spezifischen, zielgerichteten antibiotischen Einsatz führen soll.

- Hypothese 1: Durch Sonikation werden mehr Keime gefunden als beim Standardverfahren dem intraoperativen Abstrich.
- Hypothese 2: Sonikation und Vortex führen zu einer größeren Anzahl an nachweisbarer bakterieller DNA, im Vergleich zum Standardverfahren.
- Hypothese 3: Das nachweisbare Mikrobiom unterscheidet sich in seiner Zusammensetzung zwischen Sonikation und Abstrich.
- Hypothese 4: Die Resistenzlage der identifizierten Bakterien im Sonikat, Vortex und Abstrich gegenüber spezifischen Antibiotika unterscheidet sich.
- Hypothese 5: Die Resistenzlage der identifizierten bakteriellen Spezies in Bezug auf die untersuchten Antibiotika unterscheidet sich.

2 Methodik

Die vorliegende Pilotstudie wurde von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin befürwortet (Antragsnummer EA4/194/19). Sie folgt den Empfehlungen der STROBE Leitlinie und richtet sich nach den Empfehlungen der europäischen medizinischen Vereinigung für gute wissenschaftliche Praxis und der Declaration von Helsinki.

2.1 Patientenkollektiv und Einschlusskriterien

Alle eingeschlossenen Patient:innen wurden über die Sprechstunde der Klinik für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie rekrutiert. Einschlusskriterien waren Volljährigkeit, ein nicht erhaltungswürdiger Zahn aufgrund von kariöser Zerstörung, keine systemischen Erkrankungen, keine Medikamenteneinnahme, kein Nikotinabusus sowie mündliche und schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie. Insgesamt wurden zwanzig Patienten (zwölf Männer und acht Frauen) mit einem Durchschnittsalter von 60 Jahren in die Studie eingeschlossen. Bei all diesen Patienten wurde die Diagnose eines nicht erhaltungswürdigen Prämolaren im Unterkiefer gestellt.

2.2 Chirurgisches Vorgehen

Nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung, mindestens 24 Stunden vor dem chirurgischen Eingriff, erfolgte die routinemäßige Zahnentfernung in örtlicher Betäubung. Alle Extraktionen wurden durch einen Behandler durchgeführt. Sie erfolgte unter sterilen Bedingungen, in atraumatischer Extraktionstechnik mit Hebel und Zange. Direkt nach der Entfernung wurde der Zahn in einen Falcon Tube mit 4 ml Urine Conditioning Buffer™ (UCB™, Zymo Research Corp, CA 92614, USA) gelegt. Gleichzeitig erfolgte gemäß dem Standardvorgehen, eine Abstrichnahme aus der Alveole. Es wurde hierfür der Abstrichtupfer der Firma Zymo Research verwendet: "DNA/RNA Shield Collection Tube w/ Swab" (Zymo Research Crop, CA 92614, USA). Der Abstrichtupfer und der Falcon Tube wurden direkt und bis zur weiteren Aufbereitung im Kühlschrank gelagert. Es wurde eine Negativkontrolle äquivalent zu den anderen Proben zur Kontrolle etwaiger Kontaminationen und Verunreinigungen je Prozedur untersucht.

2.3 Weitere Aufbereitung und Verarbeitung der Proben

Alle Proben wurden innerhalb von 24 Stunden weiterverarbeitet. Die Aufbereitung erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Lamina Flow Bench (Safety cabinet, Thermo Scientific, Langenselbold, Germany). Die Aufbereitung der Proben erfolgte nach dem etablierten Protokoll von Renz et al.(70)

Der Ablauf wird im Folgenden beschrieben:

Es wird begonnen mit 30 Sekunden Vortex mit Hilfe des Vortexmischer, gefolgt von einer Minute Sonikation und erneut 30 Sekunden Vortex.

Nach dem ersten Vortexmischen, wurden 2 ml der 4 ml aus dem Falcon Tube entnommen und in einen zweiten Falcon Tube überführt und für die Analyse vorbereitet. Der verbliebene Falcon Tube mit dem extrahierten Zahn wurde dann mittels Sonikation bei 40 kHz im Bacto- Sonic (Bandelin electronic, Berlin, Germany) weiter aufbereitet und anschließend wieder gevortext.



Abbildung 3: Sonikation von 6 Proben im Bacto-Sonic für 1 Minute (Foto: O. Wagendorf)

Danach wurden der Falcon Tube nach dem reinen Vortexmischen, dem Vortexmischen mit anschließender Sonikation und der intraoperativ gewonnene Abstrich, sowie die Negativkontrolle zur Mikrobiomanalyse versandt (Labor Berlin, Charité Vivantes GmbH, Berlin). Alle Proben wurden von einer Person aufbereitet. (Abbildung 4)

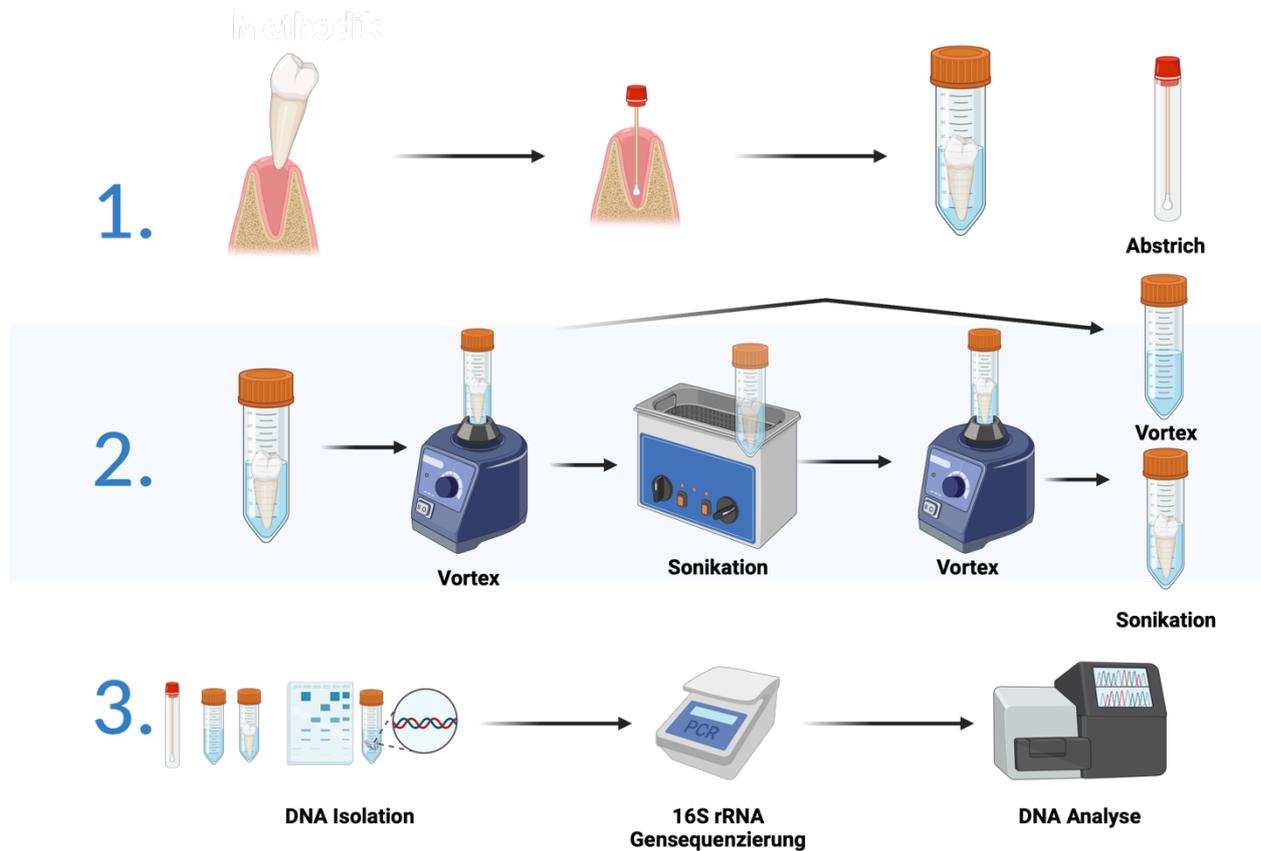


Abbildung 4: Methodik der Probengewinnung und -aufbereitung: 1. Gewinnung der Proben während des chirurgischen Vorgehens, 2: Weitere Aufbereitung der Proben durch Vortex und Sonikation, 3: mikrobiologische Analyse durch DNA-Isolierung, 16S rRNA-Gensequenzierung und anschließende Analyse, erstellt mit BioRender.com

2.4 Mikrobiologische Analyse

Die Extraktion und Reinigung der DNA erfolgte mit 50 µl des Lösungspuffer DNeasy PowerSoil Pro-Kit (Qigon). Die 16S-V3V4-PCR wird mit dem UCP-Multiplex-PCR-Mastermix (Qiagen) auf 2 µl DNA und den folgenden Primern durchgeführt: Fwd=CCTACGGGNGGCWGCAG, Rev=GACTACHVGGGTATCTAATCC.(71) In einer darauffolgenden PCR wurden Index-Sequenzen an das aufgereinigte PCR-Produkt angefügt. Mehrere Proben wurden zusammen auf einem Illumina MiSeq mit v2- Reagenz in 2x250 bp sequenziert. Das Ziel war eine Sequenzierungstiefe von >100000 Reads pro Probe.

2.5 Datenanalyse

Nach der Sequenzierung werden die beiden Reads jedes Amplicons durch Überlagern ihrer 3'-Enden zusammengeführt. Mit dem Programm „usearch“, werden anschließend die Sequenzen in Operational Taxonomic Units – OTUs – zusammengefasst.

Die repräsentativen Sequenzen jeder OTU werden mittels NCBI BLAST (im Modus megablast) mit den NCBI 16S-Microbial und NT Referenz- Datenbanken abgeglichen und die OTU wird den Spezies aller am besten bewerteten BLAST Alignments zugewiesen (nach Bit-Score). Es wurde hierbei eine minimale Übereinstimmung von 97% angestrebt. Sollten mehrere Spezies gleich gute Alignments haben, wurde die OTU dem entsprechenden Genus (bzw. der Familie oder einer noch höheren Ebene) zugewiesen. Die Zuordnung zu mehreren Spezies ist hierbei möglich, da die V3-V4 Region des 16S-rRNA-Gen in unterschiedlichen Spezies identisch sein kann. Wird für eine OTU kein Alignment gefunden, oder nur Alignments mit einer Sequenz-Identität < 97%, galt sie als unklassifiziert.(72)

Um eine Über- oder Untersequenzierung zu verhindern, wurden ebenfalls Sättigungskurven für jede Probe erstellt und in die Betrachtung mit einbezogen.

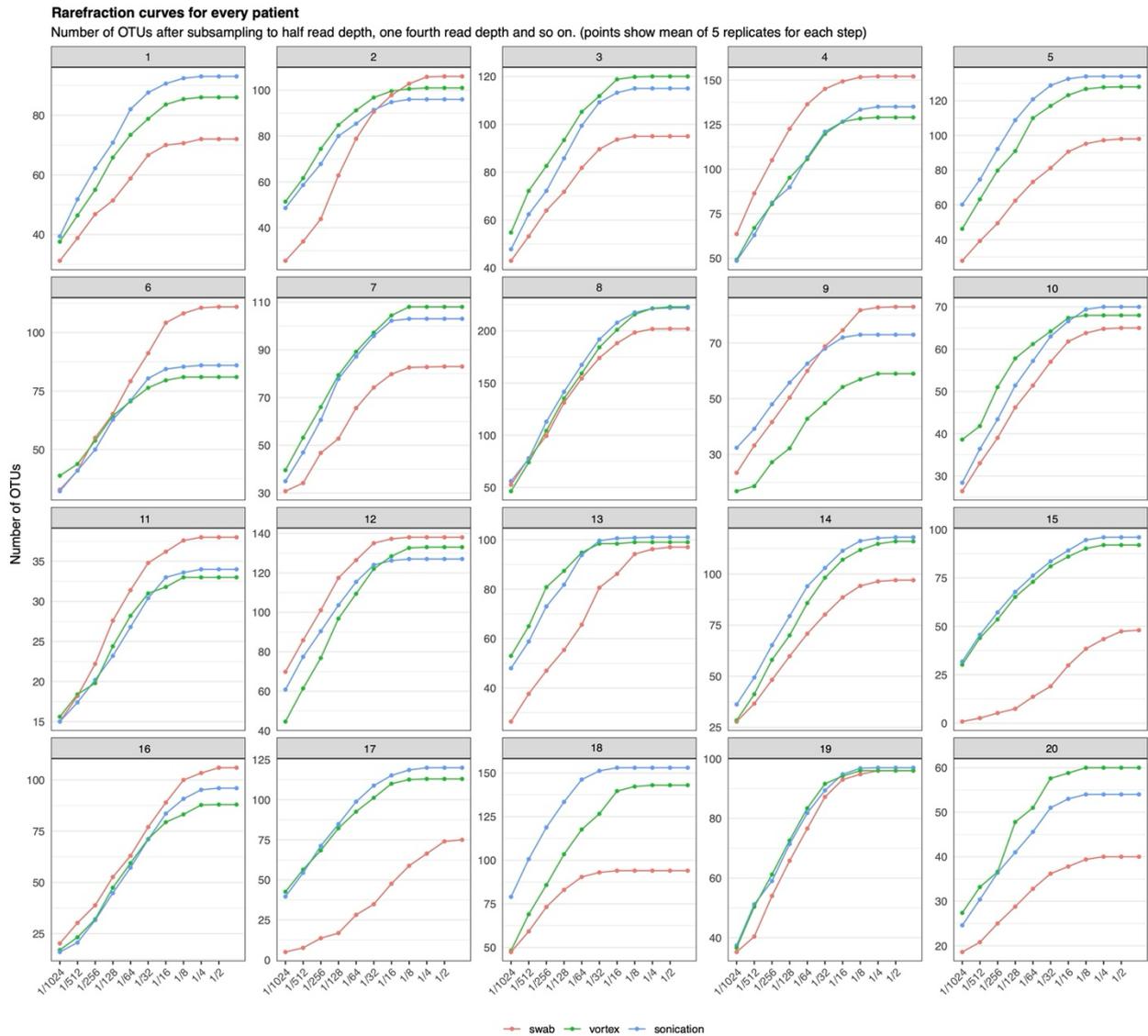


Abbildung 5: Sättigungskurven aller Proben, je Patient für Abstrich (swab), Vortex (vortex) und Sonikation (sonication), (Wagendorf et al., 2022) (73)

Als Resultate wurden entsprechende Variablen je Probe generiert:

Dabei entsprechen die Reads der Masse an gefundener DNA je Probe.

Es wurde ebenso je Probe eine Unterscheidung in Gesamt-OTUs, klassifizierte-OTUs und nicht klassifizierte-OTUs durchgeführt. OTUs repräsentieren die genetische Information je einer gefundenen Spezies. Die Unterteilung nach klassifiziert und unklassifiziert richtet sich nach der Zuordenbarkeit der jeweiligen Spezies, wie zuvor beschrieben.

2.6 Antibiotikaempfindlichkeit

Es wurde die Empfindlichkeit aller gefundenen Bakterien auf spezifische Antibiotika getestet. Als Grundlage diente hier das Werk „Antibiotics in Laboratory Medicine, 6th Edition“.(74) Es wurde nach bekannten Enzymen oder intrinsischen Resistenzen gesucht, welche in der Lage sind, die in der klinischen Routine genutzt Antibiotika zu inaktivieren. Die untersuchten Antibiotika waren Amoxicillin, Amoxicillin + Clavulansäure, Clindamycin, Doxycyclin und Levofloxacin.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit „R“ und MathClac Version 15.8. Die Grafiken wurden mit „Phyton“ und MathCalc Version 15.8 erstellt. Alle gesammelten Proben wurden deskriptiv nach der Anzahl an Reads, bakterielle Diversität, Verteilung der Phyla und bakteriellen Ordnungen, sowie Anzahl an Spezies ausgewertet. Der Bland-Altman-Test wurde zur Evaluation von signifikanten Unterschieden zwischen den Probenarten verwendet. Der Friedmann-Test wurde zur Beurteilung der Antibiotikaresistenz angewendet. Die Post-hoc-Analyse wurden alpha-adjustiert und zur Analyse der unterschiedlichen Antibiotikaresistenzen untereinander verwendet. Ein p-Wert von < 0.05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der Proben

In die Auswertung wurden 3 Proben je Patient:in einbezogen, sodass insgesamt 60 Proben analysiert werden konnten. Zusätzlich wurde je Probenmethode eine Kontaminationskontrollprobe untersucht. Der Mittelwert der Reads lag im intraoperativen Abstrich bei 142858, beim Vortex bei 180739 und bei der Sonikation bei 217972. Die bakterielle Diversität wurde durch die Anzahl an gefundenen OTUs dargestellt.

Insgesamt wurden über alle Proben 253 unterschiedliche Spezies gefunden. Je Probe, wurde eine Unterscheidung in Gesamt-OTUs, klassifizierte-OTUs und nicht klassifizierte-OTUs durchgeführt. Die Mittelwerte der OTUs, je Probenart ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Verteilung der einzelnen Phyla je Probenart ist in Abbildung 8 illustriert. Die Verteilung der bakteriellen Ordnungen ist in Abbildung 9 abgebildet. Die prozentuale intrinsische Resistenz der gefundenen Bakterien gegenüber den getesteten Antibiotika ist in Tabelle 1 zu sehen.

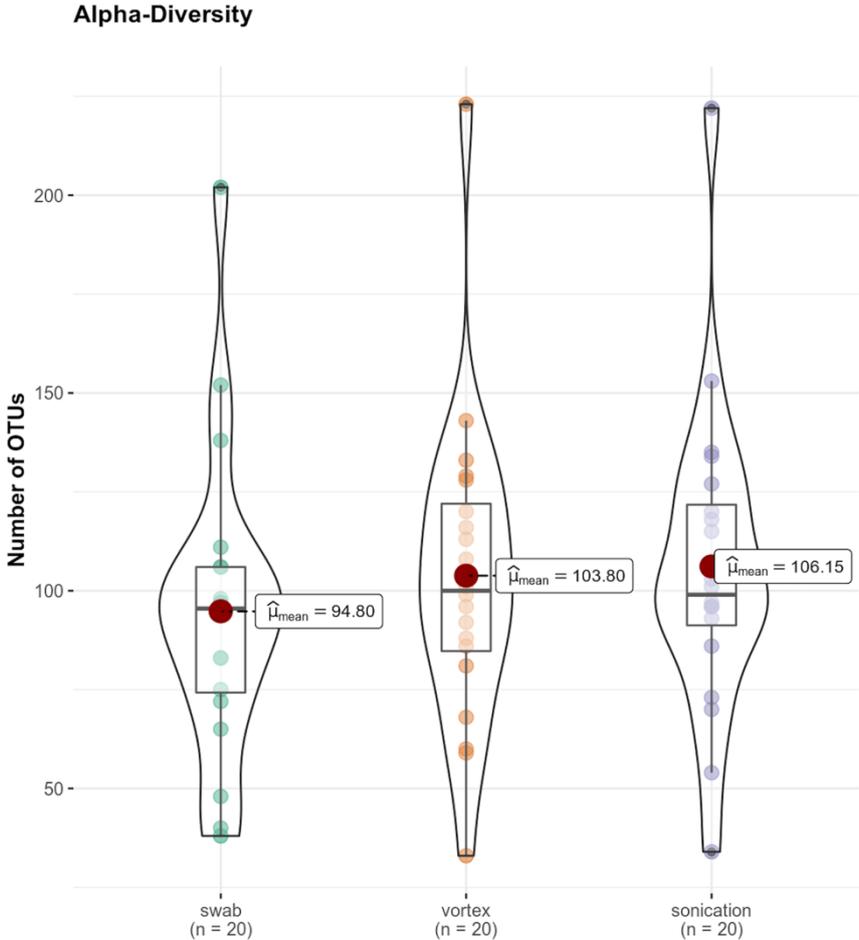


Abbildung 6: Mittelwerte der OTUs in Abstrich (swab), Vortex und Soniktation (sonication) (Wagendorf et al., 2022) (73)

Distribution of relative phylum abundances in %

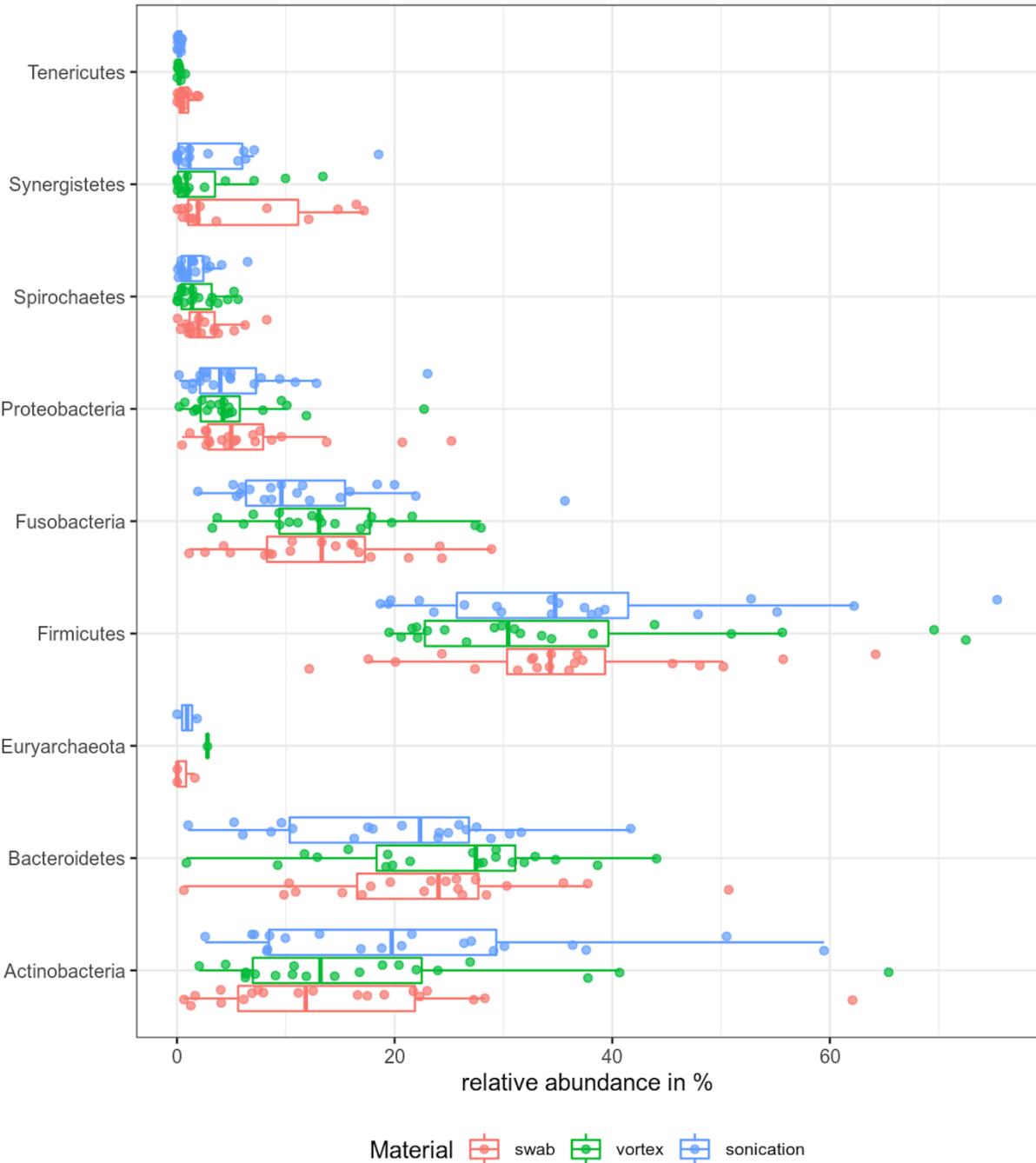


Abbildung 7: Verteilung der Phyla je Probenart: Abstrich (swab), Vortex und Sonikation (sonication) (Wagendorf et al., 2022) (73)

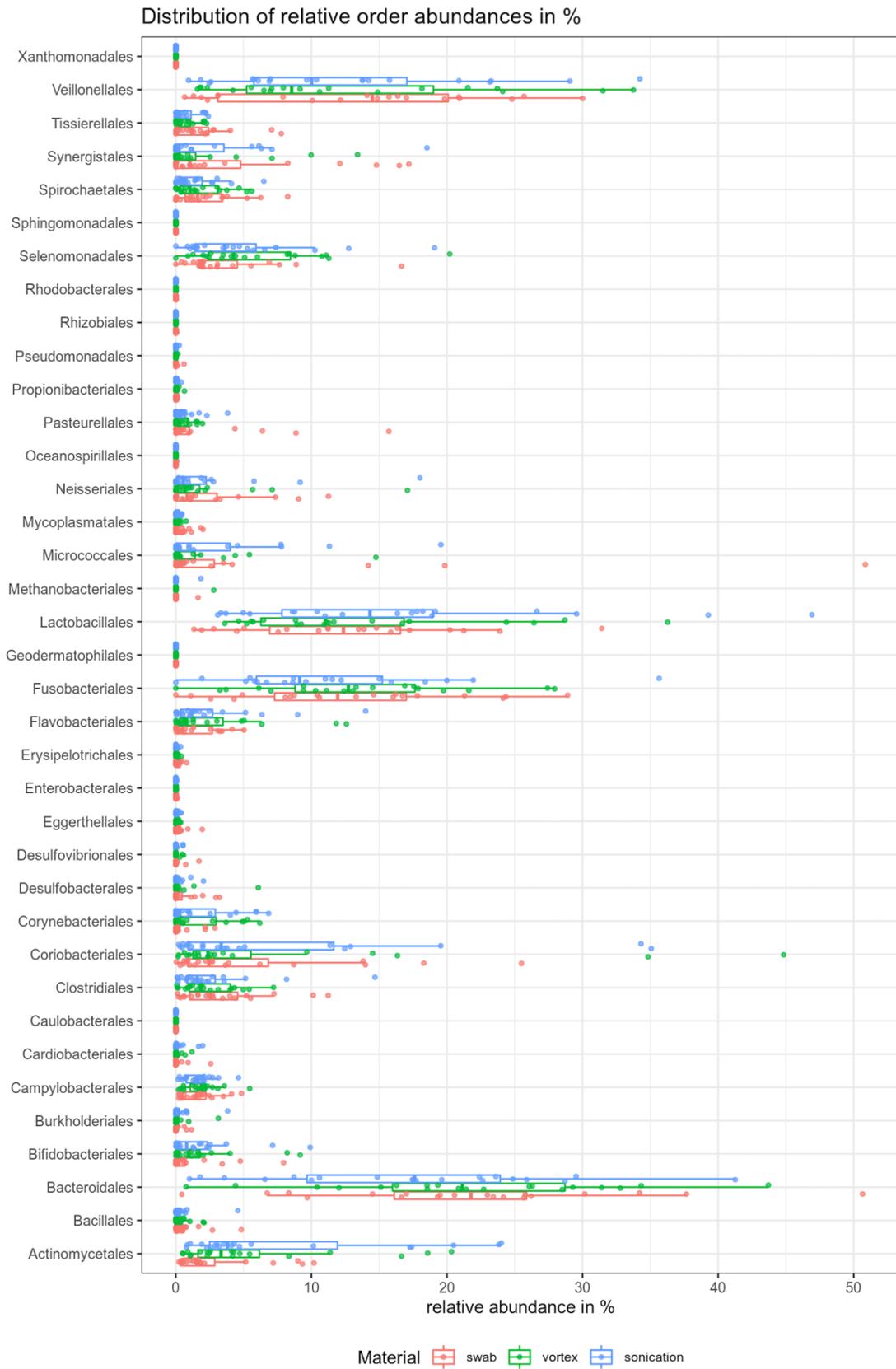


Abbildung 8: Verteilung der bakteriellen Ordnungen je Probenart: Abstrich (swab), Vortex, Sonikation (sonication) (Wagendorf et al., 2022) (73)

Resistance to	Swab	Vortex	Sonication
Amoxicillin	27,12 %	32,29 %	31,23 %
Amoxicillin + Clavulanate	6,51 %	2,78 %	2,56 %
Clindamycin	19,48 %	24,43 %	21,74 %
Doxycycline	17,75%	20,56%	20,48%
Levofloxacin	4,58%	1,79%	3,82%

Tabelle 1: Intrinsische Antibiotika Resistenz in Prozent, je Probenart: Abstrich (swab), Vortex (vortex), Sonikation (sonication) (Wagendorf et al.,2022) (73)

3.2 Analyse der bakteriellen Zusammensetzung

3.2.1 Operational Taxonomic Units – OTUs

Bei dem Vergleich der Gesamt-OTUs konnte zwischen der Sonikation und dem intraoperativen Abstrich ein signifikanter Unterschied gefunden werden ($p=0.04$; 95% CI–22.19 bis – 0.51) (Bland-Altman-Graph: Abbildung 10). Das negative Konfidenzintervall zeigt hierbei, dass in der Sonikation signifikant mehr OTUs und somit bakterielle Spezies gefunden wurden als im Abstrich.

Alle anderen Vergleiche zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede.

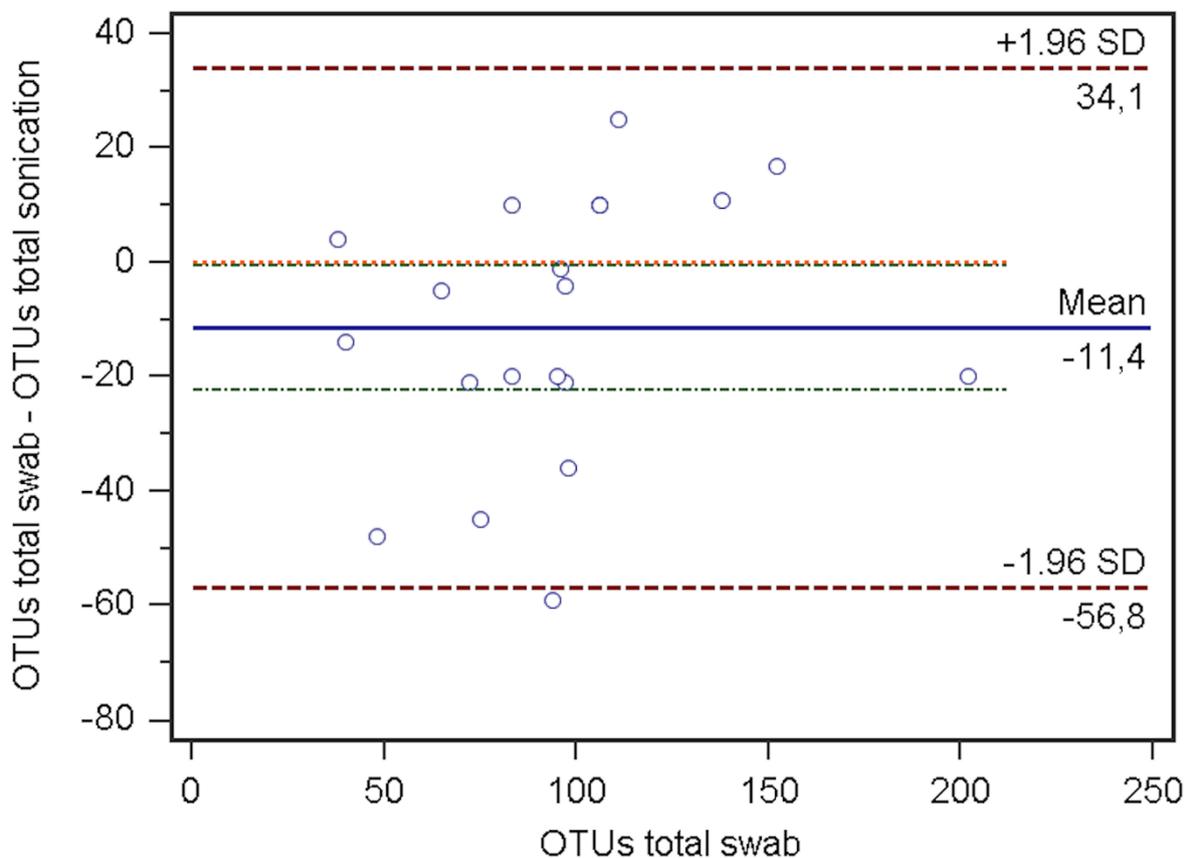


Abbildung 9: Bland-Altman-Plot zum Vergleich Abstrich gegen Sonikation, bezogen auf Gesamt-OTUs. (Wagendorf et al., 2022) (73)

3.2.2 Phyla-Verteilung

Die relative Verteilung der Phyla unterscheidet sich deutlich in allen drei untersuchten Probenarten. Signifikante Unterschiede zwischen intraoperativem Abstrich und Sonikation konnten in Actinobacteria ($p < 0.01$), Bacteroidetes ($p < 0.01$) sowie Tenericutes ($p < 0.0396$) gefunden werden. Die entsprechenden Konfidenzintervalle lagen bei -11.19 bis -2.57 bei Actinobacteria, sowie 0.86 bis 5.18 bei Bacteroidetes und 0.01 bis 0.56 bei Tenericutes. Dies zeigt, dass der prozentuale Anteil an Actinobacteria in der Sonikation deutlich größer war, wohingegen der Anteil an Bacteroidetes und Tenericutes geringer war. Bei dem Vergleich von Vortex und intraoperativem Abstrich konnten nur Tendenzen zu einem höheren prozentualen Anteil an Actinobacteria gefunden werden.

3.2.3 Verteilung der bakteriellen Ordnungen

Die Unterschiede in der Verteilung der bakteriellen Ordnungen, je Probenart, ist dargestellt in Abbildung 11. Actinomycetales ($p < 0.01$), Bacteroidales ($p < 0.01$), Corynebacteriales ($p < 0.01$), Flavobacteriales ($p = 0.03$) und Mycoplasmatales ($p = 0.04$) zeigten signifikante Unterschiede in der Verteilung. Actinomycetales (Konfidenzintervall -7.29 bis 2.39), Corynebacteriales (Konfidenzintervall -2.09 bis -0.34) und Flavobacteriales (Konfidenzintervall -2.32 bis -0.16) zeigten höhere prozentuale Anteile in der Sonikation im Vergleich zum intraoperativen Abstrich. Wohingegen Bacteroidales (Konfidenzintervall 2.0777 bis 6.4547) und Mycoplasmatales (Konfidenzintervall: 0.015 bis 0.56) einen höheren Anteil im intraoperativen Abstrich zeigten.

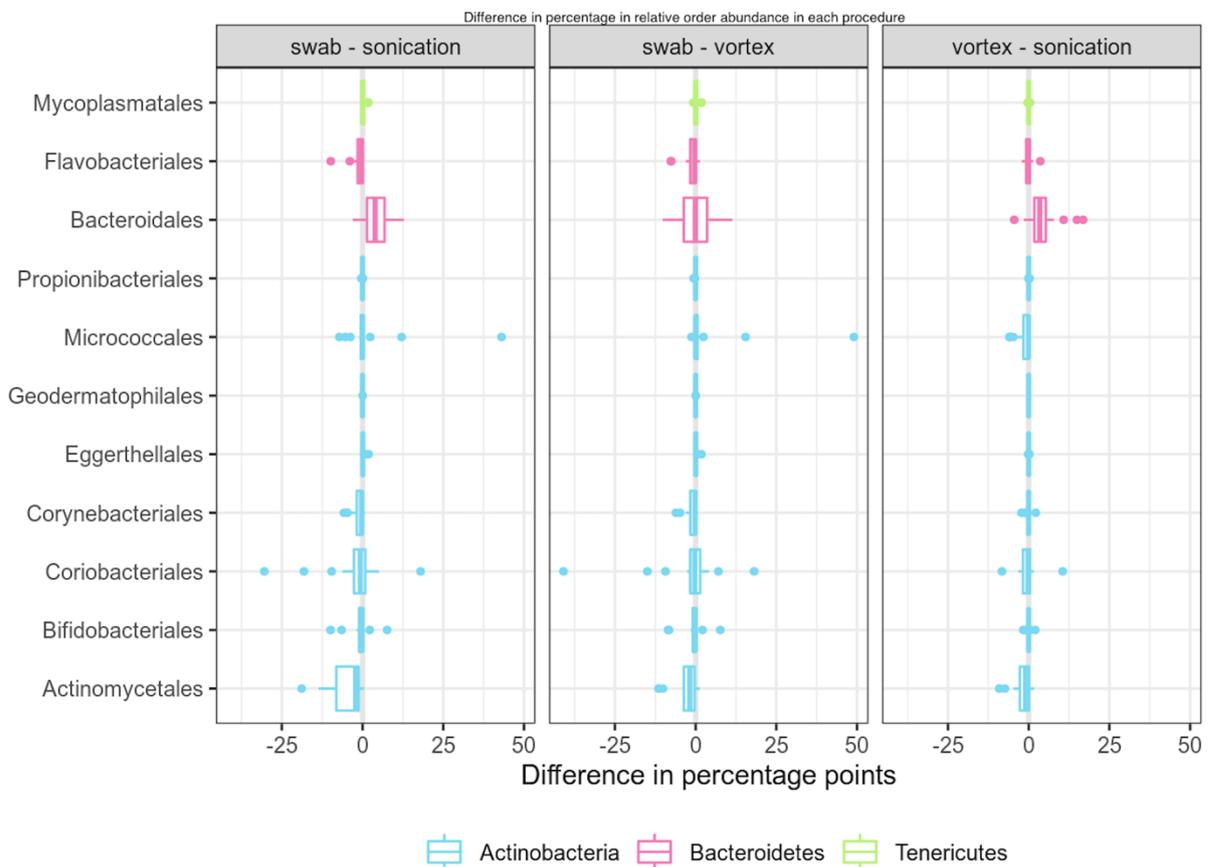


Abbildung 10: Vergleich in der prozentualen Verteilung der bakteriellen Ordnungen zwischen Abstrich (swab), Vortex, und Sonikation (sonication) (Wagendorf et al., 2022) (73)

3.3 Analyse der bakteriellen Resistenzen

Im Vergleich der intrinsischen Antibiotikaresistenzen konnte kein Unterscheid zwischen intraoperativem Abstrich, Vortex und Sonikation gefunden werden.

Bei dem Vergleich der Resistenzen gegen die einzelnen Antibiotika konnte ein signifikanter Unterschied gefunden werden ($p < 0.01$). Die Ränge, gemäß Friedmanntest waren 1.58 für Amoxicillin mit Clavulansäure, 1.73 für Levofloxacin, 3.35 für Doxycyclin, 3.60 für Clindamycin und 4.75 für Amoxicillin. Die Post-hoc-Analyse ist mit den entsprechenden P-Werten dargestellt in Tabelle 2. Alle Vergleiche zeigen signifikante Unterschiede, ausgenommen Amoxicillin mit Clavulansäure gegen Levofloxacin und Clindamycin gegen Doxycyclin.

	Comparison									
	Amoxicillin-clavulanate	Clindamycin	Doxycycline	Levofloxacin	Clindamycin	Doxycycline	Levofloxacin	Doxycycline	Levofloxacin	Levofloxacin
	Amoxicillin	Amoxicillin	Amoxicillin	Amoxicillin	Amoxicillin-Clavulanate	Amoxicillin-Clavulanate	Amoxicillin-Clavulanate	Clindamycin	Clindamycin	Doxycycline
p-Wert	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.877	0.232	0.000	0.001

Tabelle 2: Vergleich der Antibiotikaresistenzen gegeneinander (Wagendorf et al., 2022) (73)

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte durch die beschriebenen Untersuchungen gezeigt werden, dass unter Einsatz der Sonikation an extrahierten Zähnen signifikant mehr Bakterien gefunden werden konnten als mit dem Standardverfahren zur mikrobiologischen Testung, dem intraoperativen Abstrich. Im Vergleich zum Abstrich wurden im Sonikat eine höhere Anzahl an OTUs nachgewiesen.

Es unterscheiden sich in den angewandten Verfahren nicht nur die Anzahl der gefundenen Spezies, sondern auch die prozentuale Zusammensetzung des gefundenen Mikrobioms. Des Weiteren wurden mit Vortex und Sonikation Spezies detektiert, welche nicht im Abstrich nachweisbar waren.

Die Antibiotikaresistenzen unterschieden sich, je nach Probenaufbereitungsmethode (Abstrich, Vortex oder Sonikation) nicht.

Die Resistenzen der Bakterien gegenüber den getesteten Antibiotika unterschieden sich jedoch signifikant.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

Für eine bestmögliche antiinfektive Therapie durch Antibiotika ist eine genaue Kenntnis über das infektionsassoziierte Mikrobiom essenziell.(75) Durch den Einsatz von Technologien wie der Next-Generation Sequencing unter Verwendung des 16s rRNA-Gens ist es möglich, tiefe Einblicke in die Zusammensetzung des Mikrobioms zu erhalten. (33, 47-49, 76, 77) Die Zusammensetzung des in der vorliegenden Arbeit analysierten Mikrobioms ist vergleichbar zu den bereits vorher beschriebenen Zusammensetzungen des oralen Mikrobioms.(33, 46-48)

Für die Analyse des Mikrobioms wurden neben dem Vorkommen der gefundenen Spezies und ihrer Zuordnung in die entsprechenden Klassen auch eine quantitative Untersuchung der Biofilmmasse, repräsentiert in gefundenen Reads, durchgeführt.

Hierbei handelt es sich um ein semi-quantitatives Analyseverfahren, welches stark durch die Anzahl an PCR-Zyklen, gefundenen Taxa und dem Sequenzierungsdurchlauf selbst beeinflusst wird. (78, 79) Aus diesem Grund kann keine genaue Einschätzung getroffen

werden, wieviel mehr bakterielle DNA mit Hilfe der Sonikation, im Vergleich zum Standardverfahren, intraoperativer Abstrich, oder Vortex, nachgewiesen werden kann.

Um eine möglichst große Vergleichbarkeit dieser Werte zu erreichen, waren die Proben eines jeden Patienten immer auf dem gleichen Sequenzierungsdurchgang lokalisiert, mit der gleichen Anzahl an Sequenzierungszyklen und den gleichen Primern.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch den Einsatz der Sonikation mehr bakterielle DNA gewonnen und untersucht werden kann als durch das Standardvorgehen, dem intraoperativen Abstrich. Dies konnte bereits in orthopädischen Studien gezeigt werden und erstmalig jetzt auch in der Mundhöhle.

Zu berücksichtigen ist auch, dass bei der Sonikation im Gegensatz zum Abstrich, der komplette Biofilm, welcher auf dem Zahn lokalisiert ist, abgelöst und untersucht werden kann. Im Gegensatz dazu wird durch den Abstrich, nur das Mikrobiom in der Alveole untersucht. Dadurch ist die Masse an gewonnener DNA bei der Sonikation höher als beim intraoperativen Abstrich und führt somit zu einer höheren Anzahl an Reads. Zusätzlich werden jedoch auch Spezies identifiziert, die durch den Abstrich nicht nachgewiesen werden konnten.

Des Weiteren haben Studien gezeigt, dass die Analyse von potenziell avitalen Bakterien zur Diagnostik für Infektionen entscheidend sein können, da die Vitalität durch die Probengewinnung selbst beeinflusst werden. In konventionellen kulturbasierten Analysen von Bakterien, wo ein bakterielles Wachstum Grundvoraussetzung für die Untersuchung ist, können bereits abgestorbenen Bakterien nicht nachgewiesen werden.

Die Anwendung von Next Generation Sequenzierung und Untersuchung des 16S rRNA-Gens unterscheidet in der Auswertung nicht zwischen vitalen und avitalen Bakterien.

Man weiß aus Untersuchungen, dass auch die Durchführung eines Abstrichs die Vitalität von anaeroben Bakterien beeinflusst und somit diese in kulturbasierten Untersuchungen nicht mehr nachweisbar sind.(2)

Im Rahmen der Sonikation kommt es zur Bildung kleiner Luftblasen auf der Oberfläche des Zahnes, welche im Weiteren explodieren und zur Lösung des Biofilms führen. Obwohl anaerobe Bakterien durch diesen Sauerstoffüberschuss stark beeinflusst werden, konnte gezeigt werden, dass die Vitalität nicht entscheidend durch die Sonikation beeinflusst wird.(61, 80) Durch die Analyse des 16s rRNA-Gens kann dieser Punkt ignoriert

werden, da die Stabilität des Genoms durch keine der angewendeten Methoden beeinflusst wird.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie konnten nachweisen, dass der Anteil an Actinomycetales im intraoperativen Abstrich unterrepräsentiert zu sein scheint.

Studien haben gezeigt, dass *Actinomycetes spp.* beispielsweise bei der Entstehung einer medikamentenassoziierte Kiefernekrose (MRONJ) eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen. Diese Erkrankung führt zu einer progredienten Zerstörung des Kieferknochens in Verbindung mit schwerwiegenden Infektionen, welche bis zum Verlust des kompletten Kiefers führen können. (81-83) In der aktuellen Diagnostik ist bisher ein konventioneller intraoperativer Abstrich das empfohlene Mittel zur mikrobiologischen Testung. Dieser eignet sich nur bedingt, da sich das Mikrobiom in den unterschiedlichen Bereichen der Nekrose unterscheiden kann.(84) Zur Prävention der MRONJ, in Verbindung mit invasiven dentalen Maßnahmen, ist eine Antibiotikaphylaxe indiziert. Um diese so gezielt wie möglich einzusetzen, könnte die vorgestellte Methodik aus Sicht der präsentierten Daten in den gängigen Workflow übernommen werden.

Bei der Betrachtung von Bacteroidales und Mycoplasmatales, welche ein höheres prozentuales Vorkommen im Abstrich zeigten, waren die Anzahl an Reads in der Sonikation höher als im Abstrich. Dies zeigt, dass hierbei nur der prozentuale Anteil an Actinomycetales höher war und es somit zu einer relativen Verschiebung ohne Verlust an Informationen kam.

Betrachtet man abschließend die gefundenen Antibiotikaresistenzen sind diese vergleichbar zu den Daten, welche man in der Literatur findet, in Bezug auf Amoxicillin, Amoxicillin mit Clavulansäure, sowie Clindamycin und Doxycyclin.(9-11) In Bezug auf Fluorochinolone konnte eine vergleichbar Resistenzlage zu Daten des ambulanten Sektors gefunden werden, jedoch bedeutend geringere als im stationären Sektor.(10)

Betrachtet man nun die dargestellten Daten, kann ein Wechsel zu Levofloxacin als first-line Alternative in komplexen odontogenen Infektionen bei Patient:innen mit bestehender Penicillinallergie, aus unserer Sicht erwogen werden.

Aufgrund des hohen Anteils an Übertherapie mit Antibiotika durch Zahnärzte, sollte diese Empfehlung, zunächst nur für stationäre Patienten gelten.(3) Diese Aussage sollte im

Vergleich zu den Daten von Meinen et al. kritisch geprüft und weiter evaluiert werden.(10) Ein stationäres Setting ist ebenso von Vorteil, da Fluorochinolonantibiotika zu Verlängerungen der QT-Zeit, als unerwünschte Arzneimittelwirkung, führen können.(85) Ebenso sind Tendinopathien, insbesondere bei der Langzeitanwendung und Arzneimittelinteraktionen mögliche Nebenwirkungen.(86) Aufgrund seiner Chondrotoxizität wird es ebenso nicht für Schwangere und Kinder empfohlen.

4.3 Vergleich der Ergebnisse zum Stand der Wissenschaft

Die meistgenutzten und untersuchten Probenarten zur Evaluation des oralen Mikrobioms in Gesundheit und Krankheit sind Speichel, stimuliert und nicht stimuliert, Mundspülung oder Proben bestimmter oraler Nischen, wie supra- oder subgingivale Plaque, Wangenabstriche oder Zungenabstriche.(49) Eine Untersuchung eines extrahierten, kompletten Zahnes wurde bisher noch nie vorgenommen.

Die Zusammensetzung eines jeden oralen Mikrobioms unterscheidet sich nicht nur in der Anzahl und Verteilung an Bakterien, aufgrund von inter- und intraindividuellen Veränderungen, sondern auch aufgrund der unterschiedlichen Oberflächen in der Mundhöhle. Dieser Umstand wird durch die unterschiedlichen physikalischen und biologischen Bedingungen wie Oberflächenstruktur, Zellabschilferung aber auch aerobe oder anaerobe Bedingungen verursacht.(35)

Aufgrund der Ähnlichkeiten aber auch Unterschiede jeder oralen Nische, konnten Faust et al. zeigen, dass das Mikrobiom der jeweiligen Probenorte ähnlich, aber nicht gleich ist.(23) Dieser Umstand unterstreicht die Wichtigkeit, der Auswahl, der geeigneten Probenart für die weitere mikrobiologische Untersuchung und Antibiotikaresistenztestung, aber auch die Sensibilität der Tests. Möglicherweise lässt sich dadurch auch der Unterschied in der Zusammensetzung des gefundenen Mikrobioms durch Sonikation im Vergleich zum Abstrich in der vorliegenden Studie darstellen. Es ist davon auszugehen, dass in der Alveole oder parodontalen Taschen mehr anaerobe Bakterien zu finden sind als auf der Zahnoberfläche, da diese aufgrund der lokalen Umweltbedingungen einen evolutionären Vorteil genießen. Folglich ist davon auszugehen, dass die Zusammensetzung der durch Sonikation gewonnenen Proben, welche die komplette Zahnoberfläche repräsentieren, sich von der in denen der Alveole unterscheiden.

Sucht man nach vergleichbaren Studien in anderen Fachgebieten gibt es aktuell keine Daten, welche einen Vergleich von unterschiedlichen Probenarten zur mikrobiologischen Testung unter Verwendung von 16s rRNA-Gen-Analyse vorgenommen haben. Es gibt nur wenige Studien, welche den Unterschied von 16s rRNA-Gen-Analyse mit konventionellen mikrobiologischen Analysemethoden verglichen haben. Hierbei fanden sie zum Teil vergleichbare oder sogar verbesserte Ergebnisse bei der Verwendung von 16s rRNA-Gen-Analyse im Vergleich zu kulturbasierten Analysen.(66, 70, 87, 88) Aufgrund der gezeigten Ergebnisse und der bereits bestätigten Zuverlässigkeit der 16S rRNA-Gen-Analyse kann vermutet werden, dass sie ein zuverlässiges Tool zur Bestimmung des infektionsassoziierten Mikrobiom im Kopf-Hals-Bereich darstellt.(45, 47, 48, 51, 76)

Die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen wurde bereits vielfältig untersucht. Heim et al. konnten bereits zeigen, dass sich in den letzten Jahren die Anzahl an resistenten Keimen massiv erhöht hat.(9, 75) Die in der Literatur angegebenen Resistenzraten sind vergleichbar zu denen in dieser Arbeit vorgestellten Werten. Insbesondere Anaerobier, welche meistens schwerer zu kultivieren sind als Aerobier, zeigen höhere Resistenzraten gegen Clindamycin, welches nach wie vor das Antibiotikum der Wahl bei Patient:innen mit Penicillinallergie darstellt, gemäß der deutschen Leitlinie.(4, 12, 85, 89) Neben diesem Umstand fand bereits in einer aktualisierten Leitlinie der American Heart Association zur Prävention der infektiösen Endokarditis in Zusammenhang mit dentalen Eingriffen das durchaus ausgeprägte Nebenwirkungsprofil von Clindamycin Beachtung. In der 2021 aktualisierten Leitlinie wird Clindamycin nicht mehr als Antibiotikum der Wahl bei Patient:innen mit Penicillinallergie empfohlen.(90)

Durch die Untersuchung von Doxycyclin und Levofloxacin konnten eine vergleichbare Resistenzlage bei Levofloxacin, wie bei dem aktuellen Goldstandard Amoxicillin mit Clavulansäure gefunden werden. Ein gleicher Zusammenhang konnte zwischen Clindamycin und Doxycyclin gefunden werden. Levofloxacin ist vergleichbar mit Moxifloxacin, welches bereits bei dentalen Infektionen eingesetzt wird.(4) Im Jahr 2011 konnte ein Vergleich von Clindamycin und Moxifloxacin vergleichbare Effektivität der Antibiose, jedoch bei weniger unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei Moxifloxacin, zeigen.(91) Vergleicht man all diese Daten, sollte die Indikation von Clindamycin als first-line Alternative bei Patient:innen mit Penicillinallergie überdacht werden und sich bei schweren Infektionen im Kopf-Hals-Bereich eher für Levofloxacin oder Moxifloxacin entscheiden werden.(3, 75, 91)

4.4 Stärken und Schwächen der Studie

Die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden an gesunden Patient:innen und kleiner Kohortenanzahl durchgeführt. Diese Studie ist als Pilotstudie konzipiert, um erste Daten zu gewinnen und die Möglichkeit der angewandten Verfahren zu testen. Um generelle Aussagen treffen zu können, braucht es weitere Untersuchungen mit größeren Probandenzahlen.

Eine weitere Problematik in Bezug auf Mikrobiomanalysen ist die Kontamination, welche bereits während der Produktion der Untersuchungs-Kits entstehen kann.⁽⁵⁶⁾ In der vorliegenden Studie wurde immer eine Kontrollprobe nach dem beschriebenen Verfahren von Zaura et al. genommen.⁽⁴⁹⁾ So kann das Kit-spezifische Mikrobiom identifiziert und mögliche Verunreinigungen erkannt werden.⁽⁴⁹⁾ Hierbei konnte nur eine sehr geringe Zahl an Reads und OTUs gefunden werden, was eine zu vernachlässigende Kontamination der Proben darstellte. Die gefunden OTUs waren hierbei keine der oralen Flora.

Die Antibiotikaresistenz wurde in der vorliegenden Studie nicht in einer bakteriellen Kultur oder durch molekulargenetische Analysen getestet, was einen entscheidenden Kritikpunkt an der Methodik darstellt. Das primäre Ziel dieser Studie war es jedoch nicht, ausschließlich die Antibiotikaresistenten zu untersuchen, sondern die Sonikation als neue Methode in der mikrobiologischen Probengewinnung zu evaluieren. Aufgrund dieser Limitation kann jedoch keine exakte Empfehlung für das Umstellen einer kalkulierten Antibiotikatherapie getroffen werden. Es bedarf weiterer Studien, welche sich dieser Fragestellung mit kulturbasierter Resistenztestung widmen, um hier eine valide Aussage treffen zu können.

4.5 Implikationen für Praxis und/oder zukünftige Forschung

Die Sonikation ist ein einfaches Tool, insbesondere bei immunkompromittierten Patient:innen, zur Analyse des Zahninfektion assoziierten Mikrobioms. Es lassen sich mit einer Probe durch die verbesserte Ablösung des Biofilms größere Mengen an DNA gewinnen, umso detaillierte Analysen der Anzahl und Verteilung von Keimen zu generieren. Gerade im Hinblick auf schwer zu diagnostizierende Ursachen dentogener Infektionen könnte das Verfahren der Sonikation eine einfache Unterstützung zur Analyse des Mikrobioms sein und zu einer zielgerichteten antibiotischen Prophylaxe und Therapie führen.

Sollte die Sonikation nicht verfügbar sein, kann der Einsatz von Vortex erwogen werden, um einen erweiterten Einblick zu erhalten.

Um diesen Sachverhalt zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen mit größeren Kohorten nötig. Diese sollten sich nicht nur auf den Vergleich von Sonikation und dem Standardverfahren beziehen, sondern auch auf die Entwicklung des oralen Mikrobiom bei gesunden und kompromittierten Patient:innen. Hierbei spielt auch die Testung von Antibiotikaresistenzen eine entscheidende Rolle, um validere Aussagen treffen zu können.

Zusätzlich sollten die hier formulierten Aussagen an größeren Patientenkollektiven getestet werden, um ihnen eine stärkere wissenschaftliche Grundlage zu verleihen.

5. Schlussfolgerungen

Zusammenfassend ist zu sagen, dass unter Verwendung von Sonikation es möglich ist, Spezies zu finden, welche mit dem Standardverfahren, dem intraoperativen Abstrich, nicht gefunden werden konnten. Es unterscheidet sich nicht nur die Anzahl an Bakterien, sondern auch die komplette Zusammensetzung des gefundenen Mikrobioms. Dennoch zeigten die gefundenen Mikrobiome beim Abstrich, Vortex und Sonikation deutliche Ähnlichkeiten.

Daraus resultierend, stellt die Sonikation ein valides Mittel für einen bestmöglichen Einblick in das krankheitsverursachende oder krankheitsassoziierte Mikrobiom dar. Dies ist insbesondere bei Hochrisiko-Patient:innen eine entscheidende Information, wo eine möglichst zielgerichtete Antibiose indiziert ist. Hochrisiko-Patient:innen, sind Patient:innen mit ausgedehnten Infektionen, nach erfolgter oder laufender Radio-/Chemo-Therapie, erfolgter oder laufender Therapie mit Antiresorptiva, kongenitalen Herzerkrankungen oder Klappenvitien aber auch unter laufender Immunsuppression. Mit Hilfe der Sonikation ist es möglich, mehr Informationen, über den adhärennten Biofilm und damit der möglichen Kontamination der Wunde zu bekommen und damit um eine verbesserte antibiotische Therapie oder Prophylaxe zu etablieren, welche bei diesen Patientengruppen entscheidend für ihr Überleben sein kann.

Literaturverzeichnis

1. Rauch A, Hahnel S, Schierz O. Pain, Dental Fear, and Oral Health-related Quality of Life-Patients Seeking Care in an Emergency Dental Service in Germany. *J Contemp Dent Pract.* 2019;20(1):3-7.
2. Ogle OE. Odontogenic Infections. *Dent Clin North Am.* 2017;61(2):235-52.
3. Teoh L, Cheung MC, Dashper S, James R, McCullough MJ. Oral Antibiotic for Empirical Management of Acute Dentoalveolar Infections-A Systematic Review. *Antibiotics (Basel).* 2021;10(3).
4. Ahmadi H, Ebrahimi A, Ahmadi F. Antibiotic Therapy in Dentistry. *Int J Dent.* 2021;2021:6667624.
5. Lopez-Piriz R, Aguilar L, Gimenez MJ. Management of odontogenic infection of pulpal and periodontal origin. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007;12(2):E154-9.
6. Koyuncuoglu CZ, Aydin M, Kirmizi NI, Aydin V, Aksoy M, Isli F, et al. Rational use of medicine in dentistry: do dentists prescribe antibiotics in appropriate indications? *Eur J Clin Pharmacol.* 2017;73(8):1027-32.
7. Sobottka I, Wegscheider K, Balzer L, Boger RH, Hallier O, Giersdorf I, et al. Microbiological analysis of a prospective, randomized, double-blind trial comparing moxifloxacin and clindamycin in the treatment of odontogenic infiltrates and abscesses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2565-9.
8. Robertson D, Smith AJ. The microbiology of the acute dental abscess. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 2):155-62.
9. Heim N, Jurgensen B, Kramer FJ, Wiedemeyer V. Mapping the microbiological diversity of odontogenic abscess: are we using the right drugs? *Clin Oral Investig.* 2021;25(1):187-93.
10. Meinen A, Reuss A, Willrich N, Feig M, Noll I, Eckmanns T, et al. Antimicrobial Resistance and the Spectrum of Pathogens in Dental and Oral-Maxillofacial Infections in Hospitals and Dental Practices in Germany. *Front Microbiol.* 2021;12:676108.
11. Brescó-Salinas M, Costa-Riu N, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Antibiotic susceptibility of the bacteria causing odontogenic infections. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11(1):E70-5.
12. Al-Nawas BK, Julia. *Odontogene Infektionen.* 2016;Version 1.0.
13. Kämpfer P. Systematics of prokaryotes: the state of the art. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2012;101(1):3-11.
14. Simonsson T. Aspects of dental plaque formation with special reference to colloid-chemical phenomena. *Swed Dent J Suppl.* 1989;58:1-67.
15. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *J Ind Microbiol.* 1995;15(3):169-75.
16. Ligtenberg AJ, de Soet JJ, Veerman EC, Amerongen AV. Oral diseases: from detection to diagnostics. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1098:200-3.
17. Passerini L, Lam K, Costerton JW, King EG. Biofilms on indwelling vascular catheters. *Crit Care Med.* 1992;20(5):665-73.
18. Giaouris E, Chorianopoulos N, Nychas GJ. Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica enteritidis* PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *J Food Prot.* 2005;68(10):2149-54.
19. Olsen I, Tribble GD, Fiehn NE, Wang BY. Bacterial sex in dental plaque. *J Oral Microbiol.* 2013;5.

20. Jiang S, Zeng J, Zhou X, Li Y. Drug Resistance and Gene Transfer Mechanisms in Respiratory/Oral Bacteria. *Journal of Dental Research*. 2018;97(10):1092-9.
21. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. *Compend Contin Educ Dent*. 2009;30(2):76-8, 80, 3-7; quiz 8, 90.
22. Tolker-Nielsen T. Biofilm Development. *Microbiol Spectr*. 2015;3(2):Mb-0001-2014.
23. Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, Segata N, Gevers D, Raes J, et al. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(7):e1002606.
24. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology 2000*. 2011;55(1):16-35.
25. Seneviratne CJ, Zhang CF, Samaranayake LP. Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res*. 2011;14(2):87-94.
26. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995;49:711-45.
27. Trampuz A, Piper KE, Hanssen AD, Osmon DR, Cockerill FR, Steckelberg JM, et al. Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):628-31.
28. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia Associated With Toothbrushing and Dental Extraction. *Circulation*. 2008;117(24):3118-25.
29. Temoin S, Chakaki A, Askari A, El-Halaby A, Fitzgerald S, Marcus RE, et al. Identification of oral bacterial DNA in synovial fluid of patients with arthritis with native and failed prosthetic joints. *J Clin Rheumatol*. 2012;18(3):117-21.
30. Duval X, Millot S, Chirouze C, Selton-Suty C, Moby V, Tattevin P, et al. Oral Streptococcal Endocarditis, Oral Hygiene Habits, and Recent Dental Procedures: A Case-Control Study. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;64(12):1678-85.
31. Laird WR, Grant AA. Dental bacterial plaque. *Int J Biochem*. 1983;15(9):1095-102.
32. Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci*. 2006;19:29-64.
33. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010;192(19):5002-17.
34. Lederberg J, McCray AT. Ome SweetOmics--A genealogical treasury of words. *The scientist*. 2001;15(7):8-.
35. Do T, Devine D, Marsh PD. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2013;5:11-9.
36. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2015;21(3):172-83.
37. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology (Reading)*. 2003;149(Pt 2):279-94.
38. Parahitiyawa NB, Jin LJ, Leung WK, Yam WC, Samaranayake LP. Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):46-64, Table of Contents.
39. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005;366(9499):1809-20.
40. Shchipkova AY, Nagaraja HN, Kumar PS. Subgingival microbial profiles of smokers with periodontitis. *J Dent Res*. 2010;89(11):1247-53.
41. Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol*. 2001;28(5):377-88.

42. Socransky SS, Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000*. 1994;5:7-25.
43. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994;5:66-77.
44. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol*. 2001;183(12):3770-83.
45. Lazarevic V, Whiteson K, Hernandez D, Francois P, Schrenzel J. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics*. 2010;11(1):523.
46. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities. *BMC Microbiol*. 2009;9(1):259.
47. Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, Hernandez D, Farinelli L, Osteras M, et al. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods*. 2009;79(3):266-71.
48. Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res*. 2008;87(11):1016-20.
49. Zaura E, Pappalardo VY, Buijs MJ, Volgenant CMC, Brandt BW. Optimizing the quality of clinical studies on oral microbiome: A practical guide for planning, performing, and reporting. *Periodontol 2000*. 2021;85(1):210-36.
50. Weyrich LS. The evolutionary history of the human oral microbiota and its implications for modern health. *Periodontol 2000*. 2021;85(1):90-100.
51. Ng E, Tay JRH, Balan P, Ong MMA, Bostanci N, Belibasakis GN, et al. Metagenomic sequencing provides new insights into the subgingival bacteriome and aetiopathology of periodontitis. *J Periodontal Res*. 2021;56(2):205-18.
52. Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res*. 2013;92(6):485-91.
53. Mascitti M, Togni L, Troiano G, Caponio VCA, Gissi DB, Montebugnoli L, et al. Beyond Head and Neck Cancer: The Relationship Between Oral Microbiota and Tumour Development in Distant Organs. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:232.
54. Karanfilian KM, Valentin MN, Kapila R, Bhate C, Fatahzadeh M, Micali G, et al. Cervicofacial actinomycosis. *Int J Dermatol*. 2020;59(10):1185-90.
55. Valour F, Senechal A, Dupieux C, Karsenty J, Lustig S, Breton P, et al. Actinomycosis: etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infect Drug Resist*. 2014;7:183-97.
56. Salter SJ, Turner C, Watthanaworawit W, de Goffau MC, Wagner J, Parkhill J, et al. A longitudinal study of the infant nasopharyngeal microbiota: The effects of age, illness and antibiotic use in a cohort of South East Asian children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(10):e0005975.
57. Donaldson AC, McKenzie D, Riggio MP, Hodge PJ, Rolph H, Flanagan A, et al. Microbiological culture analysis of the tongue anaerobic microflora in subjects with and without halitosis. *Oral Dis*. 2005;11 Suppl 1:61-3.
58. Kanji JN, Pabbaraju K, Wong A, Beitku C, Deo A, Kailey S, et al. Effect of not vortexing nasopharyngeal and throat swabs on SARS-CoV-2 nucleic acid detection: A pilot study. *J Virol Methods*. 2022;301:114468.
59. Gristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg Am*. 1985;67(2):264-73.
60. Nguyen LL, Nelson CL, Saccente M, Smeltzer MS, Wassell DL, McLaren SG. Detecting Bacterial Colonization of Implanted Orthopaedic Devices by Ultrasonication. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2002;403(403):29-37.

61. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med.* 2007;357(7):654-63.
62. Oliva A, Pavone P, D'Abramo A, Iannetta M, Mastroianni CM, Vullo V. Role of Sonication in the Microbiological Diagnosis of Implant-Associated Infections: Beyond the Orthopedic Prosthesis. *Adv Exp Med Biol.* 2016;897:85-102.
63. Prinz V, Bayerl S, Renz N, Trampuz A, Vajkoczy P, Finger T. Sonication Improves Pathogen Detection in Ventriculoperitoneal Shunt-Associated Infections. *Neurosurgery.* 2019;85(4):516-23.
64. Bonkat G, Rieken M, Rentsch CA, Wyler S, Feike A, Schafer J, et al. Improved detection of microbial ureteral stent colonisation by sonication. *World J Urol.* 2011;29(1):133-8.
65. Rieger UM, Pierer G, Luscher NJ, Trampuz A. Sonication of removed breast implants for improved detection of subclinical infection. *Aesthetic Plast Surg.* 2009;33(3):404-8.
66. Renz N, Cabric S, Morgenstern C, Schuetz MA, Trampuz A. Value of PCR in sonication fluid for the diagnosis of orthopedic hardware-associated infections: Has the molecular era arrived? *Injury.* 2018;49(4):806-11.
67. Almaguer-Flores A, Ximenez-Fyvie LA, Rodil SE. Oral bacterial adhesion on amorphous carbon and titanium films: effect of surface roughness and culture media. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;92(1):196-204.
68. Kim E, Driscoll CF, Minah GE. The effect of a denture adhesive on the colonization of *Candida* species in vivo. *J Prosthodont.* 2003;12(3):187-91.
69. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The Oral Microbiome of Denture Wearers Is Influenced by Levels of Natural Dentition. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137717.
70. Renz N, Cabric S, Janz V, Trampuz A. Sonikation in der Diagnostik periprothetischer Infektionen. *Der Orthopäde.* 2015;44(12):942-5.
71. Kurian SM, Gordon S, Barrick B, Dadlani MN, Fanelli B, Cornell JB, et al. Feasibility and Comparison Study of Fecal Sample Collection Methods in Healthy Volunteers and Solid Organ Transplant Recipients Using 16S rRNA and Metagenomics Approaches. *Biopreserv Biobank.* 2020;18(5):425-40.
72. Olsson LM, Boulund F, Nilsson S, Khan MT, Gummesson A, Fagerberg L, et al. Dynamics of the normal gut microbiota: A longitudinal one-year population study in Sweden. *Cell Host Microbe.* 2022;30(5):726-39.e3.
73. Wagendorf O, Menzel P, Schwarzer R, Neckel N, Preissner S, Heiland M, et al. Sonication versus the conventional method for evaluation of the dental microbiome: a prospective pilot study. *BMC Oral Health.* 2022;22(1):348.
74. Amsterdam D. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 6th Edition. 6th ed. PA: Wolters Kluwer Health;2014. 832 pp p.
75. Heim N, Faron A, Wiedemeyer V, Reich R, Martini M. Microbiology and antibiotic sensitivity of head and neck space infections of odontogenic origin. Differences in inpatient and outpatient management. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2017;45(10):1731-5.
76. Carda-Diéguez M, Bravo-González LA, Morata IM, Vicente A, Mira A. High-throughput DNA sequencing of microbiota at interproximal sites. *J Oral Microbiol.* 2020;12(1):1687397.
77. Oliveira SG, Nishiyama RR, Trigo CAC, Mattos-Guaraldi AL, Dávila AMR, Jardim R, et al. Core of the saliva microbiome: an analysis of the MG-RAST data. *BMC Oral Health.* 2021;21(1):351.

78. Drengenes C, Eagan TML, Haaland I, Wiker HG, Nielsen R. Exploring protocol bias in airway microbiome studies: one versus two PCR steps and 16S rRNA gene region V3 V4 versus V4. *BMC Genomics*. 2021;22(1):3.
79. Abusleme L, Hong BY, Dupuy AK, Strausbaugh LD, Diaz PI. Influence of DNA extraction on oral microbial profiles obtained via 16S rRNA gene sequencing. *J Oral Microbiol*. 2014;6.
80. Joyce E, Phull SS, Lorimer JP, Mason TJ. The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrason Sonochem*. 2003;10(6):315-8.
81. Russmueller G, Seemann R, Weiss K, Stadler V, Speiss M, Perisanidis C, et al. The association of medication-related osteonecrosis of the jaw with *Actinomyces* spp. infection. *Sci Rep*. 2016;6(1):31604.
82. Arranz Caso JA, Flores Ballester E, Ngo Pombe S, Lopez Pizarro V, Dominguez-Mompello JL, Restoy Lozano A. [Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw and infection with *Actinomyces*]. *Med Clin (Barc)*. 2012;139(15):676-80.
83. Raguse JD, Trampuz A, Boehm MS, Nahles S, Beck-Broichsitter B, Heiland M, et al. Replacing one evil with another: Is the fibula really a dispensable spare part available for transfer in patients with medication-related osteonecrosis of the jaws? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2020;129(6):e257-e63.
84. Zirk M, Wenzel C, Buller J, Zöller JE, Zinser M, Peters F. Microbial diversity in infections of patients with medication-related osteonecrosis of the jaw. *Clin Oral Investig*. 2019;23(5):2143-51.
85. Flynn TR. Evidence-Based Principles of Antibiotic Therapy. In: Ferneini EM, Goupil MT, editors. *Evidence-Based Oral Surgery*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 283-316.
86. Sendzik J, Shakibaei M, Schafer-Korting M, Lode H, Stahlmann R. Synergistic effects of dexamethasone and quinolones on human-derived tendon cells. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(4):366-74.
87. Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wüst Jr, Trampuz A. Improved Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection by Multiplex PCR of Sonication Fluid from Removed Implants. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(4):1208-14.
88. Jacquier H, Fihman V, Amarsy R, Vicaut E, Bousson V, Cambau E, et al. Benefits of Polymerase Chain Reaction Combined With Culture for the Diagnosis of Bone and Joint Infections: A Prospective Test Performance Study. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(12):ofz511.
89. Brook I. Spectrum and treatment of anaerobic infections. *J Infect Chemother*. 2016;22(1):1-13.
90. Wilson WR, Gewitz M, Lockhart PB, Bolger AF, DeSimone DC, Kazi DS, et al. Prevention of Viridans Group Streptococcal Infective Endocarditis: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*. 2021;143(20):e963-e78.
91. Cachovan G, Boger RH, Giersdorf I, Hallier O, Streichert T, Haddad M, et al. Comparative efficacy and safety of moxifloxacin and clindamycin in the treatment of odontogenic abscesses and inflammatory infiltrates: a phase II, double-blind, randomized trial. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(3):1142-7.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Oliver Wagendorf, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Vergleich von Sonikation, Vortex und dem Standardverfahren, intraoperativer Abstrich, zur Keimbestimmung bei der chirurgischen Zahnentfernung, eine Pilotstudie“, „Comparison of sonication, vortex and the standard method, intraoperative swab, for microbiological testing in tooth extraction, a pilot study“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Oliver Wagendorf hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Oliver Wagendorf, Peter Menzel, Rolf Schwarzer, Norbert Neckel, Saskia Preissner, Max Heiland und Susanne Nahles, Sonication versus the conventional method for evaluation of the dental microbiome: a prospective pilot study, BMC Oral Health, 2022;22(1):348

Beitrag im Einzelnen:

1. Idee, Vorbereitung der Studie

Mein Anteil an der publizierten Studie lag in der Ausarbeitung der Idee, Erstellung des Ethikantrages, Ausarbeitung der Aufklärungs- und Einwilligungserklärungen, sowie Definition des Studiendesign und der Auswahl geeigneter statistischer Analysemethoden.

Alle Patient:innen wurden durch mich eingeschlossen. Ebenso führte ich alle Aufklärungsgespräche.

2. Durchführung der Studie

Alle Zahnentfernungen wurden durch mich durchgeführt. Die weitere Aufbereitung der gewonnenen Probe in Form von Vortex und Sonikation wurde ebenfalls durch mich durchgeführt, unter Aufsicht und Kontrolle von erfahrenem Laborpersonal. Die Analyse des Mikrobioms wurde von Labor Berlin durchgeführt, unter meiner Begleitung und Mithilfe.

3. Aufbereitung der Daten zur Vorbereitung der statistischen Analyse

Ich bereitete die Daten auf und bereitete Sie für die Analyse in R und MathCalc vor. Ebenso war ich aktiv an der statistischen Auswertung beteiligt.

4. Verfassen der Publikation, Literaturrecherche

Ich führte die Literaturrecherche durch und war für die Erstellung und Überarbeitung der Publikation in Zusammenarbeit mit meinen Co-Autoren beteiligt.

Der hier vorliegende Manteltext wurde von mir eigenständig und vollständig verfasst.

Unterschrift, Datum und Stempel des/der erstbetreuenden Hochschullehrers/in

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Druckexemplar der Publikation

Wagendorf et al. *BMC Oral Health* (2022) 22:348
<https://doi.org/10.1186/s12903-022-02374-0>

BMC Oral Health

RESEARCH

Open Access

Sonication versus the conventional method for evaluation of the dental microbiome: a prospective pilot study



Oliver Wagendorf^{1*}, Peter Menzel², Rolf Schwarzer², Norbert Neckel¹, Saskia Preissner¹, Max Heiland¹ and Susanne Nahles^{1*}

Abstract

Objectives: To investigate sonication as a new tool in microbiological probing of dental infections.

Methods: Comparison of a standard probing method: intraoperative swab, with sonication, and vortex of the removed tooth, was performed on 20 carious destructed teeth. Illumina high throughput sequencing of the 16S-rRNA-gene was used for assessing the microbial composition. Antibiotic susceptibility has been assigned based on known resistances of each detected species. Probing procedures were compared using Bland–Altman-Test, and antibiotic susceptibility using the Friedmann-Test and alpha-adjusted post-hoc-analysis.

Results: In total, 60 samples were analysed: 20 intraoperative swabs, 20 vortex fluids, and 20 sonication fluids. Sonication fluid yielded the highest number of bacterial sequencing reads in all three procedures. Comparing the operational taxonomic units (OTUs) of the identified bacteria, significantly more OTUs were found in sonication fluid samples. Phylum and order abundances varied between the three procedures. Significantly more Actinomycetales have been found in sonication fluid samples compared to swab samples. The assigned resistance rates for the identified bacteria (1.79–31.23%) showed no differences between the tested probing procedures. The lowest resistance rates were found for amoxicillin + clavulanate (3.95%) and levofloxacin (3.40%), with the highest in amoxicillin (30.21%) and clindamycin (21.88%).

Conclusions: By using sonication on extracted teeth, it is possible to get a more comprehensive image of the residing microbial flora compared to the standard procedure. If sonication is not available, vortexing is a potential alternative. In immunocompromised patients, especially when actinomycosis is suspected, sonication should be considered for a more detailed microbiological evaluation of the potential disease-causing microbiome. Due to the high rates of antibiotic resistance, a more targeted antibiotic therapy is favourable. Levofloxacin should be considered as a first-line alternative to amoxicillin + clavulanate in patients with an allergy to penicillin.

Keywords: Microbiome, Tooth extraction, Sonication, Antibiotic resistance

Introduction

Worldwide, 10% of antibiotic prescriptions are due to dental infections [1]. The most commonly prescribed antibiotics in oral infections are penicillin, followed by lincosamides, macrolides, tetracyclines, and fluoroquinolones [2]. The overprescribing of antibiotics occurs at a rate of 55–80% by dentists [1], leading to an increasing

*Correspondence: oliver.wagendorf@charite.de; susanne.nahles@charite.de

¹ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

level of bacterial resistance and changes in the composition of the microbiome in odontogenic infections [3–5]. Even though early studies focused on finding one specific microorganism causing dental diseases such as caries, gingivitis, and periodontitis, it is now generally accepted, that dental diseases are caused by a change in the specific surface microbiome of the affected oral tissue, driven forward by multispecies microbial interactions [6, 7].

Taking intraoperative swabs in severe odontogenic infections [8] to verify microbiological and antibiotic susceptibility of the present bacteria to ensure a targeted antibiotic regime is the usual procedure. Due to contamination or growth of too many different species or subspecies, which are hard to cultivate, the outcome of this method is poor and calls for better alternatives for microbiological sampling [9–12].

It is known that the composition and structure of the oral microbiota differ between the existing oral niches [13]. Testing of the saliva reveals microorganisms from various oral niches, but studies have demonstrated that it will not represent the entire oral microbiome [14]. However, tooth surfaces provide an ideal environment for bacterial growth and formation of dental plaque, so they will represent a higher microbial richness and diversity [15]. Besides preventing biofilm-related infections, the analysis of the sensitivity, specificity, and amount of the bacteria in the microbiome plays a decisive role in a targeted antibiotic regimen [10].

Bio-film-related infections do not only occur in the mouth but also in different regions of the human body. One such type of infection associated with biofilm formation is prosthetic joint infections (PJIs). PJIs are the second most common cause of prosthetic joint failure [16] and it is known that they are also caused by bacteria forming an organised biofilm on the implant surface, as oral bacteria do on teeth [17].

Orthopaedic studies have published data about the special procedure of sonication [16, 18]. Thus, the sensitivity and specificity of using the sonication fluid of explanted prostheses for detecting bacteria were shown to be increased compared to the normal procedure, such as synovial fluid cultures and tissue samples or swabs [18]. The number of bacteria identified was up to 10,000 times higher than in standard procedures [18].

Furthermore, sonication was used as an established method on breast, urinary, endovascular and cerebral implants [19–22]. Less is known about the use of sonication for microbiological testing in dentistry. It was mostly used to detach the biofilm from dentures, to evaluate the amount of *Candida* species [23], the microbiome of dentures in relation to denture stomatitis [24], and in vitro, to detach the formed biofilm from carbon or titanium surfaces [25] for analysis of the formed biofilm in relation

to the implant surface. Regarding the orthopaedic and dental results, the sonication method promises improved detachment of the biofilm located on the teeth, resulting in a complete image of the potential disease-causing microbiome. In these previously published studies, only the sonication method was used to identify the bacterial colonisation process without comparable methods. Furthermore, Almaguer-Flores et al. could demonstrate the strong influence of chemical and physical properties of the substrate in the colonisation of oral bacteria [17].

To the best of our knowledge, no data are available to compare the sonication process to the conventional swab method for microbial investigation. Even in compromised patients, the safe and sufficient extraction of material for microbiological testing and therefore a better knowledge about the predominant microorganisms could lead to a more targeted approach in antibiotic treatment.

Therefore, the aim of the present study was to evaluate the outcome of bacterial DNA extraction and 16S-rRNA amplicon sequencing in the sonication fluid compared to vortex fluid and the standard method, intraoperative swab of the alveolus.

Methods

Inclusion criteria and surgical procedure

The research proposal for this prospective study was approved by the Ethics Committee of the Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany (EA4/194/19) and complies with the STROBE guidelines. It conforms to the Declaration of Helsinki and the European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice. The study's inclusion criteria were age of majority, at least one permanent tooth, which had to be removed due to carious destruction, no abscess, no systemic disease or drugs, and no nicotine abuses.

Twenty healthy patients, twelve men (mean age 54.2 years) and eight women (mean age 61.9 years) with at least one non-restorable premolar in the mandible were included in the study. All teeth were removed due to carious destruction.

All surgical procedures were performed under sterile conditions by one experienced surgeon under local anaesthesia. Extraction was performed atraumatically, using forceps and elevators. After the removal of the tooth, the extracted tooth was directly placed in a Falcon tube filled with 4 ml Urine Conditioning Buffer™ (UCB™, Zymo Research Corp, CA 92614, USA). Thereafter, a swab, using “DNA/RNA Shield Collection Tube w/ Swab” (Zymo Research Corp, CA 92614, USA), was taken from the extraction socket, representing the standard procedure of microbiological sampling.

All samples have been stored in the refrigerator after collection.

Microbiological preparation and assessment

All samples were transferred to the microbiological laboratory within 24 h, where the probes were processed on a laminar flow bench (Safety cabinet, Thermo Scientific, Langenselbold, Germany). The Falcon tube was vortexed for 30 s. Afterwards, 2 ml of the fluid was removed and placed in a second Falcon tube for further evaluation. Sonication was performed for 1 min at 40 kHz (Bacto-Sonic, Bandelin electronic, Berlin, Germany), following vortexing for another 30 s, as already established in the sonication of endoprosthesis [26]. The swab and the two Falcon tubes per patient, containing the sonication fluid and vortex fluid, were transferred to the microbiology laboratory for analysis. For each procedure, one control sample (swab without probing, vortex, and sonication without tooth) was taken and analysed separately, to evaluate the kit-specific microbiome. Total processing of all samples was performed by the same person.

Microbial analysis

DNA was extracted and purified into 50 µl elution buffer using the DNeasy PowerSoil Pro-Kit (Qiagen). The 16S-V3-V4-PCR was performed using UCP-Multiplex-PCR Mastermix (Qiagen) according to the 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol (Illumina, Primer: Fwd = CCTACGGGNGGCWGCAG, Rev = GACTACHVGGGTATCTAATCC) with 2 µl DNA [27]. In a subsequent PCR, index sequences were added to the purified PCR product. Samples were pooled in one sequencing library and sequenced on an Illumina MiSeq with v2-reagents in 2 × 250 bp paired-end reads with a mean sequencing depth of > 100,000 reads per sample. The number of reads per sample serves as a rough estimation of the amount of bacterial DNA.

After sequencing, paired reads of each amplicon were merged and clustered to Operational Taxonomic Units—OTUs, using the usearch package by clustering identical sequences with an identity of at least 97%. A representative consensus sequence was assigned to every OTU and OTUs were quantified by counting the number of reads mapped to each OTU consensus. The consensus sequences of each OTU were compared to the NCBI 16S-Microbial and NT Reference-Database, using NCBI BLAST (megablast). The OTUs were taxonomically classified based on the best database match (with a minimum identity of 97%) [28]. If multiple database hits matched the OTU sequence with the same identity the OTU was classified as the lowest common ancestor of the different database hits. If no match was found the respective OTU was labeled as unclassified. The reason for the alignment to more than one species relates to the fact that the V3-V4 region in different species can be identical.

Antibiotic susceptibility was evaluated by using “Antibiotics in Laboratory Medicine, 6th Edition” [29]. All found bacterial species were checked for existing enzymes or intrinsic resistances, which are able to inactivate the antibiotics used in clinical routine. Susceptibility was evaluated for amoxicillin, amoxicillin + clavulanate, clindamycin, doxycycline, and levofloxacin. For each sample, we calculated the percentage of bacterial species that have known resistances to any of the 4 antibiotics groups.

Statistics

Statistical analysis was performed using “R” and MathCalc version 15.8. Graphs were created using “Phyton” and MathCalc version 15.8. Overall, 60 different probes, three for each patient, were analysed. Descriptive Statistics were performed for a number of reads, diversity, phyla distribution, and identified taxa for all samples. Bland–Altman-test was used to check for significant differences over all three procedures. Friedman-Test was used to check for differences in antibiotic resistance. Post-hoc analysis was alpha-adjusted and performed to check for significant differences between specific antibiotics. A P-value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

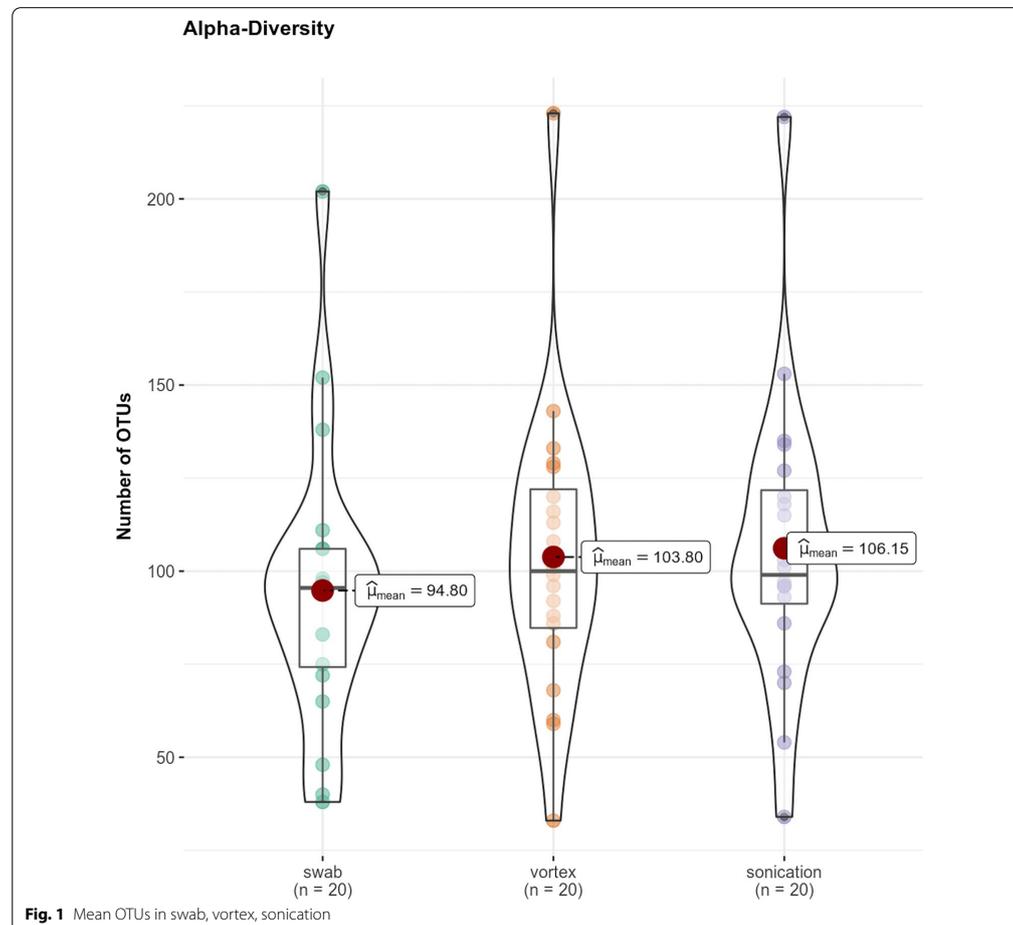
Of the 60 samples, the mean number of sequenced reads for each procedure, was 142,858 in the swab, 180,739 in the vortex, and 217,972 in the sonication. The diversity of all samples was evaluated by counting the number of OTUs. Each OTU symbolised one specific bacterial entity. 253 different species were detected in all samples.

In total OTUs, the swab compared to sonication showed a significant difference ($p = 0.04$; 95% CI – 22.19 to – 0.51). A negative confidence interval highlighted that sonication produced a significantly higher number of OTUs compared to the swab.

All other combinations showed no significant difference. The mean number of OTUs is shown in Fig. 1. Bland–Altman-Plot for comparison swab and sonication, regarding found OTUs is shown in Fig. 2.

In Fig. 3, the distribution of relative phylum abundances is shown.

There is a high variance in relative phylum abundance in all three sampling procedures. In Actinobacteria ($p < 0.01$), Bacteroidetes ($p < 0.01$), and Tenericutes ($p < 0.0396$), significant differences between swabs and sonication could be found. The confidence interval in Actinobacteria (– 11.19 to – 2.57) showed a higher percentage in sonication in contrast to Bacteroidetes (0.86 to 5.18) and Tenericutes (0.01 to 0.56), where a higher percentage of appearance was found in the swab. Only



slight tendencies towards a higher amount of Actinobacteria could be found in vortex, compared to swabs.

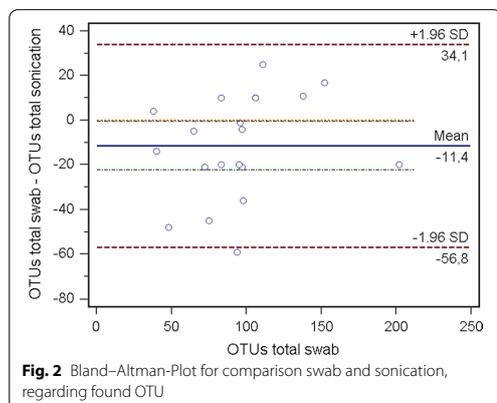
On Order-Level, as shown in the supplements, Actinomycetales ($p < 0.01$), Bacteroidales ($p < 0.01$), Corynebacteriales ($p < 0.01$), Flavobacteriales ($p = 0.03$), and Mycoplasmatales ($p = 0.04$) showed significant differences when comparing the swab to the sonication procedure (Additional file 1). In Actinomycetales (confidence-interval -7.29 to -2.39), Corynebacteriales (95% CI -2.09 to -0.34), and Flavobacteriales (95% CI -2.32 to -0.16), higher percentage abundances could be found in sonication, in contrast to Bacteroidales (95% CI 2.0777 – 6.4547) and Mycoplasmatales

(95% CI 0.015 – 0.56) where a higher relative abundance was found in the swab compared to sonication (Additional file 2).

For each experimental group, the mean fraction of bacterial species with intrinsic resistance against certain antibiotics are shown in Table 1.

In sonication fluid, vortex fluid, and swab, no significant differences were found in the resistance rate of the bacteria.

A significant difference ($p < 0.01$) could be found in bacterial resistance to different antibiotics using Friedmann-Test. Assigned ranks were 1.58, 1.73, 3.35, 3.60, and 4.75 for amoxicillin-clavulanate, levofloxacin,



doxycycline, clindamycin, and amoxicillin, respectively, representing amoxicillin-clavulanate with the lowest and amoxicillin with the highest resistance percentage rate. The post-hoc test for differences in specific antibiotic resistance between each analysed individual showed significant differences in all combinations except for amoxicillin-clavulanate with levofloxacin and clindamycin with doxycycline. P-values for each comparison are shown in Table 2.

No relevant delay in microbiological results could be observed between the tested procedures.

Discussion

To summarise the present results, by sonicating the tooth, significantly more bacteria could be detected compared to the swab, as shown by the higher number of OTUs in sonication samples. Furthermore, even the microbial composition of the analysed samples differed between the tested procedures. Moreover, it was possible to find some bacteria which could not be found in the standard procedure for microbiological testing. Focusing on antibiotic resistance rate, no significant difference between sonication fluid, vortex fluid, or swab could be found. A significant difference could be shown in the comparison of the resistance rate of the evaluated antibiotics.

The knowledge of the bacterial composition is crucial for a targeted and effective antibiotic regime. Next-generation sequencing using 16S rRNA gene has shown good results for identification of the oral microbiome [30–35]. The microbial composition reported is similar to earlier studies focusing on the oral bacterial composition [30, 32, 33, 36]. The most commonly used sample types to study the healthy oral microbiome and its changes in

various diseases were saliva, oral rinse, or niche-specific samples, e.g. supra- or subgingival plaque or tongue swab [31]. Whole teeth have never been analysed before.

For evaluation of the purity of the collected specimen, one control sample for every procedure was taken and analysed separately, as recommended by Zaura et al. [31]. The results showed a low number of reads and diversity, confirming negligible contamination due to the kit-specific microbiome.

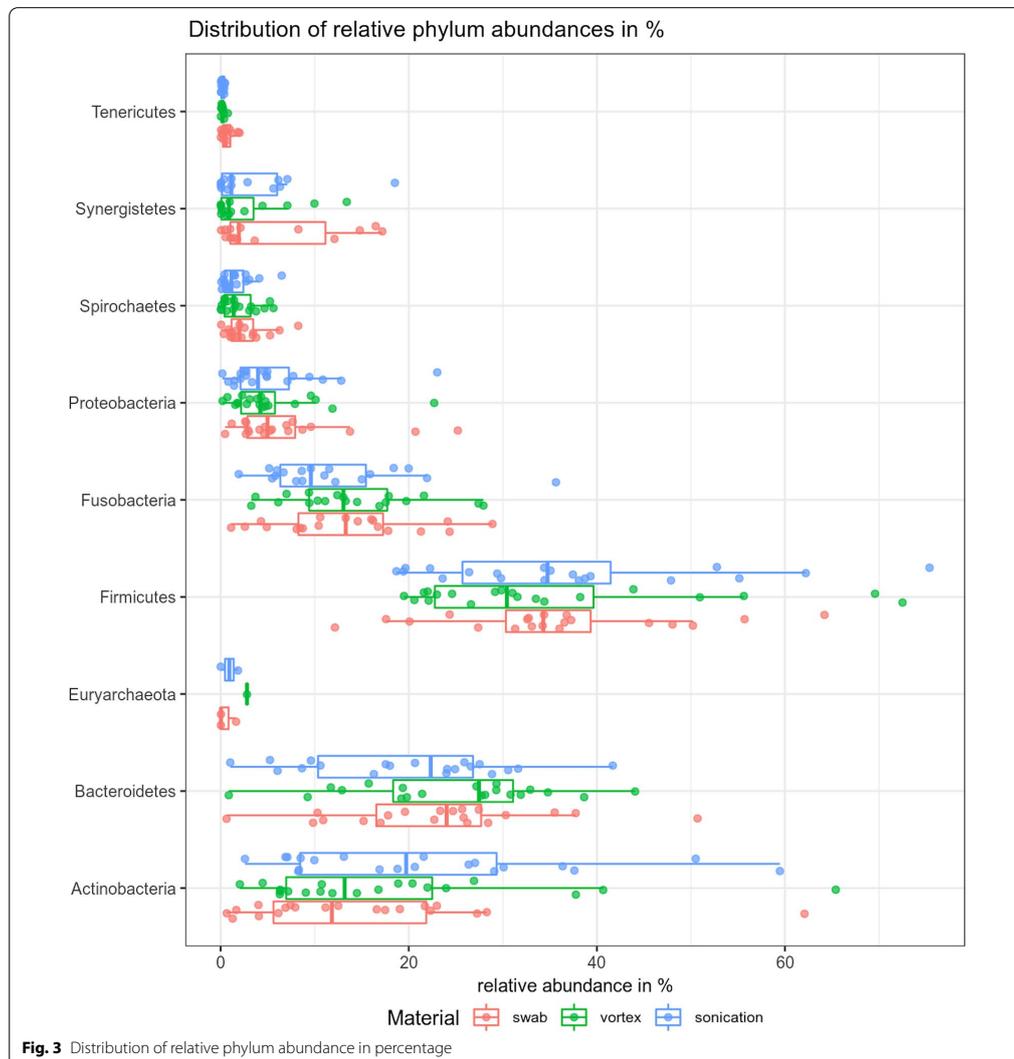
The number of reads is a semi-quantitative tool. It is highly affected by the number of PCR cycles performed, the taxa identified, and the sequencing runs itself [37, 38]. Therefore, no precise quantitative measurement is possible regarding how many times more DNA can be found in the sonication fluid compared to the swab or vortex.

In the present study, all patient samples were located on the same sequencing run, with the same number of cycles and same primer respectively, which provides comparability between the swab, vortex, and sonication fluid (Additional file 3).

Taking all of this into consideration, it is highly likely that there is a higher amount of DNA in the sonication fluid compared to the swab and vortex in each patient.

The procedural difference between sonication in contrast to the swab is that they are performed on extracted teeth, resulting in biofilm loosening on the whole surface, whereas the swab was only taken from the alveolus. Therefore, the quantity of the material gathered is probably higher and might have a distorting effect.

The composition of each oral microbiome is different, not only in the number of reads but also in the taxa found. A possible reason for this could be the diversity of the different microbiome surfaces and inter- and intra-individual variations [39]. The oral biofilm development over time is a complex interaction of different species which colonise oral surfaces to form an organised multispecies community with a specific composition. This is caused by the different prevailing physical and biological conditions in the oral habitat, such as surface texture, cell desquamation, or aerobic capacity in the specific niche [6]. Faust et al. demonstrated that the microbiome in different types of samples is similar but nevertheless different [40], highlighting that the source of sampling is crucial for proper microbial testing and especially so for antimicrobial susceptibility testing. This difference could be a reason for the differing microbiological results of the swab and vortex or sonication fluid. Especially regarding the aerophilic capacity of each bacterium, a more anaerobic bacterial composition should be expected in the alveolus or the periodontal pocket than on the tooth surface. By comparing the whole tooth surface, symbolised in the sonication fluid, the bacterial distribution is expected to be different from the bacterial distribution of the alveolus itself.



Apart from this, the contamination of sample extraction kits, during production, can have a potentially misleading impact on the microbiome analysis and consequent conclusion [41].

Even though the biofilm disruption on the whole surface of the tooth could be a potential bias, every bacterium located on the tooth could be able to cause further or could be the reason for the specific infection.

Therefore, this setup resembles the reality of biofilm behaviour in the extraction setting in which the potential dissemination of parts of the biofilm can occur, resulting in severe consequences such as infectious endocarditis [42].

A potential criticism could be the amplification of the 16S rRNA gene. Using this procedure, there is no differentiation between bacteria, dead or alive.

Table 1 Mean resistance among swab, vortex, and sonication in percentage point

Resistance to	Swab (%)	Vortex (%)	Sonication (%)
Amoxicillin	27.12	32.29	31.23
Amoxicillin + Clavulanate	6.51	2.78	2.56
Clindamycin	19.48	24.43	21.74
Doxycycline	17.75	20.56	20.48
Levofloxacin	4.58	1.79	3.82

Mean resistance among swab, vortex and sonication in percentage point

Nonetheless, detection of dead bacteria is a potential benefit, because the procedure of swab taking negatively affects the viability of anaerobic bacteria [9]. In normal culture-based analysis, only living bacteria can be examined.

So, the procedure of sonication could be a further influencing factor and cause potential bias. During sonication, little air bubbles explode on the surface of the tooth, leading to the loosening of the biofilm. Bacteria, which are anaerobes or facultative anaerobes, will be highly affected by this excess oxygen [43], even though it could be shown that these bacteria are still alive after sonication of endoprosthesis [18]. Using the 16S rRNA gene, this correlation can be ignored, due to the stability of the genome, even when the bacteria are compromised.

Focusing on the study design, neither orthopaedic nor else studies, which are comparing direct 16S-rRNA-gene analysis and the difference in the microbiome distribution in different sampling modalities exist. Only a few studies have been investigating, whether using 16S-rRNA-gene analysis resulted in similar or even improved results, than normal microbiological testing [26, 44–46]. Due to this fact and the appropriate results of 16S-rRNA-gene analysis in microbiome analysis of the oral cavity, we assume, that this is a reliable tool for such investigation [30, 32, 34, 47]. Also in settings, where a dental infection is a potential causing of more severe disease such as medication-related osteonecrosis of the jaw, this sampling method is a potential tool to evaluate and identify the disease-causing bacteria, also in areas hard to reach or where contamination of the normal probing method, swab or tissue sample, is to be expected.

The present results revealed that the amount of Actinomycetales is underrepresented in the normal probing procedure. One potential life-threatening disease, which is hard to diagnose, is craniofacial actinomycosis [48]. In most cases, it is associated with odontogenic infections [49]. Therefore, it can be assumed, that by only taking a swab in combination with normal microbial culture, there is a general underestimation of this disease. Especially in patients undergoing or following radiotherapy due to head and neck cancer, this disease is a feared

complication [48]. Also, in medication-related osteonecrosis of the jaw, Actinomycetes spp. seem to play a major role in disease progression [50–52].

Focusing on Bacteroidales and Mycoplasmatales, which had a higher abundance in swabs, the read numbers of these orders were higher in sonication than in the swab. Showing that there were no bacteria missing but because of the higher amount of Actinomycetales, the relative abundance was lower than in the swab.

The antimicrobial susceptibility to specific antibiotics was not tested in bacterial culture or by molecular genetic analysis, which is a downside of this study. Nevertheless, it was not the primary objective of this investigation to precisely analyse antibiotic resistances, but rather to evaluate the procedure of sonication or vortex as a new tool in microbiological testing in oral surgery. Due to this limitation, no exact statement regarding proper antibiotic treatment can be made.

Heim et al. have already shown the increasing level of resistance found in cultures [53]. Literature-based resistances show the same percentage of resistance as that assigned by enzyme-based evaluation. In particular, the anaerobic species, which are hard to cultivate, show a higher resistance to clindamycin [54], which is still the antibiotic of choice in penicillin-allergic patients [2, 55] according to the German Guidelines [8]. By also evaluating doxycycline and levofloxacin, it could be shown that the resistance rate of amoxicillin with clavulanate was similar to levofloxacin and clindamycin to doxycycline.

Focusing on the analysed resistance rates, a change to the use of levofloxacin as a first-line alternative in severe cases of odontogenic infections should be considered in patients with an allergy to penicillin. Levofloxacin is similar to moxifloxacin, which is already in use in odontogenic infections [2]. In 2011, a comparison of clindamycin and moxifloxacin showed similar outcomes, but with a lower rate of adverse effects in moxifloxacin [56]. Taking this into consideration, levofloxacin or moxifloxacin should replace clindamycin as the first line alternative to amoxicillin with clavulanate in severe odontogenic infections. Due to the high rates of overprescribing of dental antibiotics [1], this change should be exclusively provided for hospitalised patients. The inpatient setting is also preferable for fluoroquinolones, due to their possible side effects like increasing the QT-interval [55]. Other possible side effects are tendinopathy, especially with long-term use [57], and drug-drug interactions. Because of the chondrotoxicity, it is not recommended to use this during pregnancy and in children.

In conclusion with the help of sonication, it was possible to find additional species which were not found in the standard procedure, swabs. The whole microbiome constitution differs, showing a potential incongruence

Table 2 Antibiotic resistance comparison

Comparison		Clindamycin	Doxycycline	Levofloxacin	Clindamycin	Doxycycline	Levofloxacin	Doxycycline	Levofloxacin	Levofloxacin	Levofloxacin
Amoxicillin-clavulanate		Amoxicillin	Amoxicillin	Amoxicillin	Amoxicillin-Clavulanate	Amoxicillin-Clavulanate	Amoxicillin-Clavulanate	Clindamycin	Clindamycin	Clindamycin	Doxycycline
p-Value	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.001	0.877	0.232	0.000	0.000	0.001

Antibiotic resistance comparison

between the standard method and our shown procedure. Still, the microbiomes found were similar in the swab, vortex, and sonication. Consequently, in high-risk patients requiring a more targeted antibiotic treatment (e.g., complex infections, former or ongoing radiotherapy, former or ongoing bisphosphonate medication, congenital heart disease, or immunosuppression) sonication of the tooth should be considered to gain a more complete image of the potential disease-causing microbiome. This sample provides the option to obtain as much information on the bacterial colonisation of the tooth as currently possible, meaning that it can therefore improve treatment as well as clinical outcomes. Early targeted treatment or the prevention of severe complications in high-risk patients can be necessary for their survival.

Limitations

This evaluation was performed on healthy patients, where the hosts' anti-infective capability is high and severe complications are rare. Due to the small cohort and the characteristic as a pilot study, further investigation should be performed not only focusing on the differences between sonication and the standard procedure for microbial testing in the treatment of infections of the maxillo-facial region. Additionally, the focus should be laid on changes in the oral microbiome in immunocompromised patients. No differentiation has been performed regarding the location of the teeth or the grade of carious destruction.

Yet, sonication could be a tool, especially for immunocompetent patients, to improve the overview of the bacteria in the infected area, allowing for a more targeted antimicrobial therapy. Also, differences in conventional microbiological testing: bacterial culture, identification, and bacterial susceptibility are planned, to validate the found data, in a bigger cohort. If sonication is not accessible, we could show that vortex could also be considered for loosening of the biofilm on extracted teeth.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02374-0>.

Additional file 1. Distribution of relative order abundances in %.

Additional file 2. Differences in percentage in relative order abundance in each procedure.

Additional file 3. Rarefaction curves for every patient.

Acknowledgements

The authors thank PD Dr. Andrej Trampuz (Charité Universitätsmedizin Berlin) for his support during the antimicrobial investigation and help by providing lab space.

Author contributions

OW: Contributed to conception and design, acquisition, analysis, and interpretation, performed the statistical analysis, drafted and critically revised the manuscript. PM: Contributed to analysis and interpretation, performed the statistical analysis, and critically revised the manuscript. RS: Contributed to analysis and interpretation and critically revised the manuscript. NN: Contributed to conception and design, acquisition, drafted and critically revised the manuscript. SP: Contributed to acquisition and critically revised the manuscript. MH: Contributed to interpretation and critically revised the manuscript. SN: Contributed to conception and design, interpretation, and critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The research proposal for this prospective study was approved by the Ethics Committee of the Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany (EA4/194/19) and complies with the STROBE guidelines. It conforms to the Declaration of Helsinki and the European Medicines Agency Guidelines for Good Clinical Practice. Informed consent was obtained from all subjects.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors have no conflict of interest to declare.

Author details

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin and Berlin Institute of Health, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany. ²Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH, Berlin, Germany.

Received: 23 March 2022 Accepted: 3 August 2022

Published online: 12 August 2022

References

- Teoh L, Cheung MC, Dashper S, James R, McCullough MJ. Oral antibiotic for empirical management of acute dentoalveolar infections—a systematic review. *Antibiotics*. 2021;10(3):66.
- Ahmadi H, Ebrahimi A, Ahmadi F. Antibiotic therapy in dentistry. *Int J Dent*. 2021;2021:6667624.
- Sobottka I, Wegscheider K, Balzer L, Boger RH, Hallier O, Giersdorf I, et al. Microbiological analysis of a prospective, randomized, double-blind trial comparing moxifloxacin and clindamycin in the treatment of odontogenic infiltrates and abscesses. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(5):2565–9.
- Robertson D, Smith AJ. The microbiology of the acute dental abscess. *J Med Microbiol*. 2009;58(Pt 2):155–62.
- Olsen I, Tribble GD, Fiehn NE, Wang BY. Bacterial sex in dental plaque. *J Oral Microbiol*. 2013;5:66.
- Do T, Devine D, Marsh PD. Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2013;5:11–9.
- Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med*. 2015;21(3):172–83.
- Al-Nawas BK, Julia. *Odontogene Infektionen*. 2016;Version 1.0.
- Ogle OE. Odontogenic infections. *Dent Clin N Am*. 2017;61(2):235–52.

10. Böttger S, Zechel-Gran S, Schmermund D, Streckbein P, Wilbrand J-F, Knitschke M, et al. Clinical relevance of the microbiome in odontogenic abscesses. *Biology*. 2021;10(9):916.
11. Siqueira JF Jr, Rôças IN. As-yet-uncultivated oral bacteria: breadth and association with oral and extra-oral diseases. *J Oral Microbiol*. 2013;5:66.
12. Eckert AW, Maurer P, Wilhelms D, Schubert J. Soft tissue infections in oral, maxillofacial, and plastic surgery. *Bacterial spectra and antibiotics*. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 2005;9(6):389–95.
13. Zhang Y, Wang X, Li H, Ni C, Du Z, Yan F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed Pharmacother*. 2018;99:883–93.
14. Ren W, Zhang Q, Liu X, Zheng S, Ma L, Chen F, et al. Exploring the oral microflora of preschool children. *J Microbiol*. 2017;55(7):531–7.
15. Li X, Liu Y, Yang X, Li C, Song Z. The oral microbiota: community composition, influencing factors, pathogenesis, and interventions. *Front Microbiol*. 2022;13: 895537.
16. Trampuz A, Piper KE, Hanssen AD, Osmon DR, Cockerill FR, Steckelberg JM, et al. Sonication of explanted prosthetic components in bags for diagnosis of prosthetic joint infection is associated with risk of contamination. *J Clin Microbiol*. 2006;44(2):628–31.
17. Temoin S, Chakaki A, Askari A, El-Halaby A, Fitzgerald S, Marcus RE, et al. Identification of oral bacterial DNA in synovial fluid of patients with arthritis with native and failed prosthetic joints. *J Clin Rheumatol*. 2012;18(3):117–21.
18. Trampuz A, Piper KE, Jacobson MJ, Hanssen AD, Unni KK, Osmon DR, et al. Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*. 2007;357(7):654–63.
19. Oliva A, Pavone P, D'Abramo A, Iannetta M, Mastroianni CM, Vullo V. Role of sonication in the microbiological diagnosis of implant-associated infections: beyond the orthopedic prosthesis. *Adv Exp Med Biol*. 2016;897:85–102.
20. Prinz V, Bayerl S, Renz N, Trampuz A, Vajkoczy P, Finger T. Sonication improves pathogen detection in ventriculoperitoneal shunt-associated infections. *Neurosurgery*. 2019;85(4):516–23.
21. Bonkat G, Rieken M, Rentsch CA, Wyler S, Feike A, Schafer J, et al. Improved detection of microbial ureteral stent colonisation by sonication. *World J Urol*. 2011;29(1):133–8.
22. Rieger UM, Pierer G, Luscher NJ, Trampuz A. Sonication of removed breast implants for improved detection of subclinical infection. *Aesthetic Plast Surg*. 2009;33(3):404–8.
23. Kim E, Driscoll CF, Minah GE. The effect of a denture adhesive on the colonization of *Candida* species in vivo. *J Prosthodont*. 2003;12(3):187–91.
24. O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, et al. The oral microbiome of denture wearers is influenced by levels of natural dentition. *PLoS ONE*. 2015;10(9): e0137717.
25. Almaguer-Flores A, Ximenez-Fyvie LA, Rodil SE. Oral bacterial adhesion on amorphous carbon and titanium films: effect of surface roughness and culture media. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2010;92(1):196–204.
26. Renz N, Cabric S, Janz V, Trampuz A. Sonication in the diagnosis of periprosthetic infections: significance and practical implementation. *Orthopaed*. 2015;44(12):942–5.
27. Kurian SM, Gordon S, Barrick B, Dadlani MN, Fanelli B, Cornell JB, et al. Feasibility and comparison study of fecal sample collection methods in healthy volunteers and solid organ transplant recipients using 16S rRNA and metagenomics approaches. *Biopreserv Biobank*. 2020;18(5):425–40.
28. Olsson LM, Boulund F, Nilsson S, Khan MT, Gummesson A, Fagerberg L, et al. Dynamics of the normal gut microbiota: a longitudinal one-year population study in Sweden. *Cell Host Microbe*. 2022;30(5):726–39.e3.
29. Amsterdam D. *Antibiotics in laboratory medicine*, 6th edn. PA: Wolters Kluwer Health; 2014. p. 832.
30. Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res*. 2008;87(11):1016–20.
31. Zaura E, Pappalardo VV, Buijs MJ, Volgenant CMC, Brandt BW. Optimizing the quality of clinical studies on oral microbiome: a practical guide for planning, performing, and reporting. *Periodontol*. 2021;85(1):210–36.
32. Lazarevic V, Whiteson K, Huse S, Hernandez D, Farinelli L, Osteras M, et al. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J Microbiol Methods*. 2009;79(3):266–71.
33. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010;192(19):5002–17.
34. Carda-Diéguez M, Bravo-González LA, Morata IM, Vicente A, Mira A. High-throughput DNA sequencing of microbiota at interproximal sites. *J Oral Microbiol*. 2020;12(1):1687397.
35. Oliveira SG, Nishiyama RR, Trigo CAC, Mattos-Guaraldi AL, Dávila AMR, Jardim R, et al. Core of the saliva microbiome: an analysis of the MG-RAST data. *BMC Oral Health*. 2021;21(1):351.
36. Zaura E, Keijser BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol*. 2009;9(1):259.
37. Drengenes C, Eagan TML, Haaland I, Wiker HG, Nielsen R. Exploring protocol bias in airway microbiome studies: one versus two PCR steps and 16S rRNA gene region V3 V4 versus V4. *BMC Genomics*. 2021;22(1):3.
38. Abusleme L, Hong BY, Dupuy AK, Strausbaugh LD, Diaz PI. Influence of DNA extraction on oral microbial profiles obtained via 16S rRNA gene sequencing. *J Oral Microbiol*. 2014;6:66.
39. Lazarevic V, Whiteson K, Hernandez D, Francois P, Schrenzel J. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics*. 2010;11(1):523.
40. Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, Segata N, Gevers D, Raes J, et al. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(7): e1002606.
41. Salter SJ, Turner C, Wathanaworawit W, de Goffau MC, Wagner J, Parkhill J, et al. A longitudinal study of the infant nasopharyngeal microbiota: the effects of age, illness and antibiotic use in a cohort of South East Asian children. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(10): e0005975.
42. Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res*. 2013;92(6):485–91.
43. Joyce E, Phull SS, Lorimer JP, Mason TJ. The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species. *Ultrason Sonochem*. 2003;10(6):315–8.
44. Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wüst A Jr, Trampuz A. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1208–14.
45. Jacquier H, Fihman V, Amarsy R, Vicaut E, Bousson V, Cambau E, et al. Benefits of polymerase chain reaction combined with culture for the diagnosis of bone and joint infections: a prospective test performance study. *Open Forum Infect Dis*. 2019;6(12):ofz511.
46. Renz N, Cabric S, Morgenstern C, Schuetz MA, Trampuz A. Value of PCR in sonication fluid for the diagnosis of orthopedic hardware-associated infections: Has the molecular era arrived? *Injury*. 2018;49(4):806–11.
47. Ng E, Tay JRH, Balan P, Ong MMA, Bostanci N, Belibasakis GN, et al. Metagenomic sequencing provides new insights into the subgingival bacteriome and aetiopathology of periodontitis. *J Periodontol Res*. 2021;56(2):205–18.
48. Karanflian KM, Valentin MN, Kapila R, Bhat C, Fatahzadeh M, Micali G, et al. Cervicofacial actinomycosis. *Int J Dermatol*. 2020;59(10):1185–90.
49. Valour F, Senechal A, Dupieux C, Karsenty J, Lustig S, Breton P, et al. Actinomycosis: etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infect Drug Resist*. 2014;7:183–97.
50. Russmueller G, Seemann R, Weiss K, Stadler V, Speiss M, Perisanidis C, et al. The association of medication-related osteonecrosis of the jaw with *Actinomyces* spp. infection. *Sci Rep*. 2016;6(1):31–604.
51. Arranz Caso JA, Flores Ballester E, Ngo Pombe S, Lopez Pizarro V, Dominguez-Mompello JL, Restoy LA. Bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw and infection with *Actinomyces*. *Med Clin*. 2012;139(15):676–80.
52. Raguse JD, Trampuz A, Boehm MS, Nahles S, Beck-Broichsitter B, Heiland M, et al. Replacing one evil with another: Is the fibula really a dispensable spare part available for transfer in patients with medication-related osteonecrosis of the jaws? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2020;129(6):e257–63.
53. Heim N, Jurgensen B, Kramer FJ, Wiedemeyer V. Mapping the microbiological diversity of odontogenic abscess: Are we using the right drugs? *Clin Oral Investig*. 2021;25(1):187–93.
54. Brook I. Spectrum and treatment of anaerobic infections. *J Infect Chemother*. 2016;22(1):1–13.
55. Flynn TR. Evidence-based principles of antibiotic therapy. In: Ferneini EM, Goupil MT, editors. *Evidence-based oral surgery*. Cham: Springer; 2019. p. 283–316.

56. Cachovan G, Boger RH, Giersdorf I, Hallier O, Streichert T, Haddad M, et al. Comparative efficacy and safety of moxifloxacin and clindamycin in the treatment of odontogenic abscesses and inflammatory infiltrates: a phase II, double-blind, randomized trial. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(3):1142–7.
57. Sendzik J, Shakibaei M, Schafer-Korting M, Lode H, Stahlmann R. Synergistic effects of dexamethasone and quinolones on human-derived tendon cells. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):366–74.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

1. Originalarbeiten (peer-reviewed) als Erst- bzw. Letztautor

1. Wagendorf O, Menzel P, Schwarzer R, Neckel N, Preissner S, Heiland M, **IF 3.747**
Nahles S. 2022. Sonication versus the conventional method for evaluation
of the dental microbiome: A prospective pilot study. BMC Oral Health.
22(1):348.
2. Nahles S, Preißner S, Wagendorf O. 2022. Biologische Grundlagen der
alveolären Wundheilung. Wissen kompakt. 17(1):3-11.

2. Originalarbeiten (peer-reviewed) als Koautor

Mentel S, Gallo K, Wagendorf O, Preissner R, Nahles S, Heiland M, Pre- **IF 2.757**
issner S.

Prediction of oral squamous cell carcinoma based on machine learning of
breath samples: a prospective controlled study. BMC Oral Health. 2021
Oct 6;21(1):500. doi: 10.1186/s12903-021-01862-z. PMID: 34615514;
PMCID: PMC8496028.

Wuster J, Sachse C, Sachse C, Rendenbach C, Wagendorf O, Vach K, **IF 3,606**
Preissner S, Heiland M, Nelson K, Nahles S. 2023. Vestibuloplasty and its
impact on the long-term survival and success of dental implants in irradiated
and non-irradiated patients after head and neck tumor therapy: A retrospec-
tive study. Clin Oral Investig.

3. Kernen F, Brandle D, Wagendorf O, Recca M, Mehrhof J, Vach K, Nahles **IF 5,021**
S, Nelson K, Flugge T. 2023. Enhancing intraoral scanner accuracy using
scan aid for multiple implants in the edentulous arch: An in vivo study. Clin
Oral Implants Res.

Publikationen

Nahles, S., Sachse, C., Wagendorf, O., Flügge, T., Beck-Broichsitter, B., Heiland, M.

Implantatprothetische Rehabilitation von Patienten nach Tumorthherapie im Kopf-Hals-Bereich. *Der MKG-Chirurg*, 14(3), 212-220.
doi:10.1007/s12285-021-00313-6

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Max Heiland für die Möglichkeit bedanken, an Ihrer Klinik diese Promotion zum Dr. med. dent. durchführen und arbeiten zu können.

Ein großer Dank gilt auch meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. Susanne Nahles, die mich stets bei allen Fragen unterstützt hat, nicht nur wissenschaftlich, sondern auch menschlich. Ohne deine Unterstützung und Anleitung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank Susanne!

Meinen Eltern danke ich für ihre ständige Unterstützung in meinem bisherigen Leben und ihr Vertrauen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Pia Wagendorf, ganz besonders für ihre endlose Liebe und Unterstützung bedanken. Ohne dich, Pia, würde ich vieles nicht in der Form umsetzen können und mein Leben würde wesentlich trauriger und grauer sein.