

Aus dem Zentrum für Zahnmedizin
Abteilung für Parodontologie und Synoptische Zahnmedizin
Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Möglichkeit der Erkennung parodontalpathogener Keime in vitro
durch die Nutzung eines Multigassensorsystems**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Zahnärztin Kristina Faust
aus Zossen

Gutachter: 1. Prof. Dr. Dr. J.-P. Bernimoulin
 2. Prof. Dr. R. J. Radlanski
 3. Prof. Dr. J. Meyer

Datum der Disputation: 26. Januar 2007

Meinen Eltern und Großeltern
und meinem Mann Daniel

Inhalt

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Definition Parodontitis marginalis	3
2.2	Mikrobiologie der parodontalen Erkrankung	3
2.2.1	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	4
2.2.2	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5
2.2.3	<i>Prevotella intermedia</i>	6
2.2.4	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	6
2.2.5	<i>Eikenella corrodens</i>	7
2.3	Mikrobiologische Evaluation	8
2.4	Gaschromatographie	8
2.5	Multigassensensorsysteme	9
2.5.1	Grundprinzip von Multigassensensorsystemen	11
2.5.2	Signalübersetzungsmechanismen der Multigassensensorsysteme	12
2.5.3	Datenverarbeitung und Mustererkennung von Multigassensensorsystemen	14
2.5.4	Anwendungen von Multigassensensorsystemen	14
3	Fragestellung	19
4	Material und Methode	20
4.1	Übersicht	20
4.2	Herstellung der Proben	22
4.2.1	Subgingivale Proben	22
4.2.2	Bakterielle Kulturproben	22
4.3	Das Messgerät	24
4.3.1	Das Funktionsprinzip des Gassensormikroarray	25
4.3.2	Aufbau und Funktionsweise des Olfaktographen	29
4.3.3	Die Messkammer	29
4.4	Durchführung der Messungen	30
4.4.1	Messbedingungen	30
4.4.2	Abfolge einer Messung	31
4.5	Auswertung der Daten	32
4.5.1	Datenverarbeitung	32
4.5.2	Lineare Diskriminanzanalyse	34
4.5.3	Die Diskriminanz	35

4.5.4	Der maximale Separationsquotient Lambda	36
4.5.5	Modelltest.....	36
4.5.6	Modellstabilität	37
4.5.7	Entwicklung der Modellerkennung mit zunehmender Größe der Datenbasis	37
5	Ergebnisse	38
5.1	Vergleich der Normierung/Referenznormierung	38
5.2	LDA-Modellbildung für fünf Laborspezies	38
5.3	LDA-Modelltest für fünf Laborspezies.....	40
5.4	LDA-Modell der klinischen Isolate von <i>P. gingivalis</i> und <i>P. intermedia</i>	40
5.5	Erkennung der klinischen Isolate von <i>P. intermedia</i> und <i>P. gingivalis</i> im Zwei-Klassen-Modell der Laborstämme	41
5.5.1	Erkennung der klinischen Isolate der Spezies <i>P. intermedia</i> und <i>P. gingivalis</i> im Fünf-Klassen-Modell der Laborspezies	42
5.5.2	Vergleich der Erkennung von <i>P. gingivalis</i> und <i>P. intermedia</i> im Modell aus Laborstämmen und im Modell aus Laborstämmen und klinischen Isolaten zusammen.....	43
5.6	Untersuchung der Stabilität des LDA-Modells.....	44
5.6.1	Verringerung der Datenbasis des Fünf-Klassen-Modells unter Weglassen von Datensätzen aus ersten Messungen	45
5.6.2	Verringerung der Datenbasis des Fünf-Klassen-Modells unter Weglassen von Datensätzen aus letzten Messungen	46
5.6.3	Überprüfung der Zufälligkeit des Anstiegs der Erkennungsraten bei verringerter Datenbasis	47
5.7	Überprüfung der Entwicklung der Modellerkennung	47
5.7.1	Entwicklung der Modellerkennung für die chronologische Abfolge der Messungen.....	48
5.7.2	Datumsbezogene Entwicklung der Modellerkennung	49
5.7.3	Entwicklung der Modellerkennung für zwei zufällige Abfolgen der Messungen	51
5.8	Vergleich der Erkennung in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer der bakteriellen Spezies.....	53
5.9	Anwendbarkeit von Modelltests	55
5.9.1	Zwei-Klassen-Modell.....	55
5.9.2	Schrittweise Erkennung	55
5.9.3	Vergleich der Erkennung durch die drei Methoden.....	56
5.10	Vergleich der Erkennung durch die zwei Sensorarrays und ihrer gemeinsamen Nutzung im Zwei-Klassen-Modell.....	57
5.11	Zusammenfassung der Ergebnisse	58

6	Diskussion.....	60
6.1	Material und Methode.....	60
6.1.1	Entwicklung der Methode.....	60
6.1.2	Auswahl der bakteriellen Spezies.....	61
6.1.3	Messung anaerober und mikroaerophiler Keime.....	65
6.1.4	Alter der Bakterien zum Zeitpunkt der Messung.....	66
6.1.5	Datenauswertung.....	69
6.1.6	Sensordrift.....	71
6.2	Ergebnisse.....	73
6.2.1	Erkennung von fünf bakteriellen Geruchsklassen durch die lineare Diskriminanzanalyse.....	73
6.2.2	Erkennung klinischer Isolate.....	75
6.2.3	Mögliche Ursachen für den Anteil falsch zugeordneter unbekannter Proben.....	77
6.2.4	Eignung des Gerätes.....	82
6.2.5	Multigassensensorsysteme im Vergleich mit anderen gassensitiven Methoden.....	84
7	Schlussfolgerungen.....	85
8	Zusammenfassung.....	86
9	Summary.....	88
10	Literatur.....	90

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Bild einer <i>A. actinomycetemcomitans</i> Kultur.....	4
Abb. 2	Bild einer <i>P. gingivalis</i> Kultur	5
Abb. 3	Bild einer <i>P. intermedia</i> Kultur.....	6
Abb. 4	Bild einer <i>F. nucleatum</i> Kultur	7
Abb. 5	Bild einer <i>E. corrodens</i> Kultur.....	7
Abb. 6	Funktionsprinzip eines Multigassensensorsystems im Vergleich zum humanen Geruchssinn.....	11
Abb. 7	Olfaktograph	25
Abb. 8	Gassensormikroarray.....	26
Abb. 9	Aufbau und Prinzipskizze des Gassensormikroarrays.....	27
Abb. 10	Prinzip der Gasdetektion durch Metalloxidsensoren am Beispiel der Methan-Detektion.....	28
Abb. 11	Messkammer	30
Abb. 12	Bakterienkultur in der Messkammer unter geöffnetem Deckel	30
Abb. 13	PC-Darstellung eines Messablaufes für die Keime <i>P. intermedia</i> (Pi), <i>A. actinomycetemcomitans</i> (Aa), <i>E. corrodens</i> (Ec), <i>F. nucleatum</i> (Fn), <i>P. gingivalis</i> (Pg).....	32
Abb. 14	Modellbildung aus den Daten der Messungen Nr. 25 bis 32 des Woframtrioxid-Sensorarrays für die fünf bakteriellen Spezies.....	35
Abb. 15	Zwei Ebenen des Fünf-Klassen-Modells für die fünf bakteriellen Spezies.....	39
Abb. 16	Zwei-Klassen-Modell für die klinischen Isolate der Spezies <i>P. gingivalis</i> und <i>P. intermedia</i>	41
Abb. 17	Testmessungen zwei klinischer Isolate von <i>P. gingivalis</i> und <i>P. intermedia</i>	42
Abb. 18	LDA-Modell der fünf Bakterienklassen der Laborspezies und der klinischen Isolate Die Datenbasis des LDA-Modells umfasst 150 Datensätze.....	45
Abb. 19	Fünf-Klassen-Modell für die fünf Bakterienklassen der Laborspezies und klinischen Isolate Die Datenbasis des LDA-Modells umfasst 120 Datensätze.. ..	46
Abb. 20	Entwicklung der Modellerkennung in Abhängigkeit von der Größe der Datenbasis des Fünf-Klassen-Modells Die Größe der Datenbasis wird verändert durch die zunehmende Anzahl von Messungen, die in chronologischer Abfolge in die Datenbasis aufgenommen werden.....	49
Abb. 21	Entwicklung der Separationsquotienten Lambda 1 bis 4 in Abhängigkeit von der Größe der Datenbasis des Fünf-Klassen-Modells Die Größe der Datenbasis wird verändert durch die zunehmende Anzahl von Messungen, die in chronologischer Abfolge in die Datenbasis aufgenommen werden.	49
Abb. 22	Entwicklung der Modellerkennung in Abhängigkeit von der Größe der Datenbasis des Fünf-Klassen-Modells Die Größe der Datenbasis wird verändert durch die zunehmende Anzahl von Messungen. Die LDA-Modell-Bildung beginnt mit den Messungen der zweiten Hälfte des Untersuchungszeitraumes von vierzehn Monaten.....	50
Abb. 23	Entwicklung der Separationsquotienten Lambda 1 bis 4 in Abhängigkeit von der Größe der Datenbasis des Fünf-Klassen-Modells Die Größe der Datenbasis wird verändert durch die zunehmende Anzahl von Messungen. Die LDA-Modell-	

	Bildung beginnt mit den Messungen der zweiten Hälfte des Untersuchungszeitraumes von vierzehn Monaten.	51
Abb. 24	Entwicklung der Modellerkennung in Abhängigkeit von der Größe der Datenbasis des Fünf-Klassen-Modells Die Größe der Datenbasis wird verändert durch die zunehmende Anzahl von Messungen. Die Abfolge der Messungen in der Datenbasis des LDA-Modells ist zufällig gewählt.	52
Abb. 25	Entwicklung der Separationsquotienten Lambda 1 bis 4 in Abhängigkeit von der Größe der Datenbasis des Fünf-Klassen-Modells Die Größe der Datenbasis wird verändert durch die zunehmende Anzahl von Messungen. Die Abfolge der Messungen in der Datenbasis des LDA-Modells ist zufällig gewählt.	52
Abb. 26	Entwicklung der Modellerkennung in Abhängigkeit von der Größe der Datenbasis des Fünf-Klassen-Modells Die Größe der Datenbasis wird verändert durch die zunehmende Anzahl von Messungen. Die Abfolge der Messungen in der Datenbasis des LDA-Modells ist zufällig gewählt.	53
Abb. 27	Entwicklung der Separationsquotienten Lambda 1 bis 4 in Abhängigkeit von der Größe der Datenbasis des Fünf-Klassen-Modells Die Größe der Datenbasis wird verändert durch die zunehmende Anzahl von Messungen. Die Abfolge der Messungen in der Datenbasis des LDA-Modells ist zufällig gewählt.	53

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Übersicht der durchgeführten Messungen von bakteriellen Kulturen von Keimen der Laborstämme: <i>P. intermedia</i> (PI), <i>A. actinomycetemcomitans</i> (AA), <i>E. corrodens</i> (EC), <i>F. nucleatum</i> (FN), <i>P. gingivalis</i> (PG) und der klinischen Isolate: <i>P. intermedia</i> (PIPat), <i>P. gingivalis</i> (PG).....	21
Tab. 2	Übersicht der angelegten und gemessenen Kulturen der fünf Laborstämme und der zwei klinischen Isolate	24
Tab. 3	die Separationsquotienten Λ_1 bis Λ_4 für das Fünf-Klassen-Modell der fünf Laborstämme <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>E. corrodens</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i>	40
Tab. 4	Erkennungsraten für die Laborspezies von <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>E. corrodens</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> im Fünf-Klassen-Modell	40
Tab. 5	Erkennungsraten für die klinischen Isolate von <i>P. gingivalis</i> und <i>P. intermedia</i> im Zwei-Klassen-Modelltest	41
Tab. 6	Erkennungsraten für die Messungen der klinischen Isolate von <i>P. intermedia</i> und <i>P. gingivalis</i> im Zwei-Klassen-Modell aus Laborkeimen.....	42
Tab. 7	Erkennung der klinischen Isolate der Spezies <i>P. intermedia</i> und <i>P. gingivalis</i> in einem Fünf-Klassen-Modell der Laborkeime	43
Tab. 8	Vergleich der Erkennung für die Spezies <i>P. gingivalis</i> und <i>P. intermedia</i> im Fünf-Klassen-Modell der Laborspezies mit der Erkennung im Fünf-Klassen-Modell der fünf Laborspezies zusammen mit den klinischen Isolaten.....	44
Tab. 9	Erkennungsraten für das Fünf-Klassen-Modell aus Datensätzen der Laborspezies und klinischen Isolate.....	45
Tab. 10	Erkennungsraten für das Fünf-Klassen-Modell der fünf Bakterienklassen der Laborspezies und klinischen Isolate mit einer Datenbasis von 120 Datensätzen, verringert um Datensätze der ersten aufgenommenen Messungen.....	46
Tab. 11	Erkennungsraten für das Fünf-Klassen-Modell der fünf Bakterienklassen der Laborspezies und klinischen Isolate mit einer Datenbasis von 120 Datensätzen, verringert um Datensätze der letzten aufgenommenen Messungen.....	47
Tab. 12	Erkennungsraten für das Fünf-Klassen-Modell der fünf Bakterienklassen der Laborspezies und klinischen Isolate mit einer Datenbasis von 120 Datensätzen, verringert um Datensätze von Messungen, die chronologisch in der Mitte des Untersuchungszeitraumes aufgenommen wurden.....	47
Tab. 13	Vergleich der Erkennung der einzelnen Spezies für verschiedene Gruppen der Kultivierungsdauer der bakteriellen Proben.....	54
Tab. 14	Vergleich der Erkennung der einzelnen Spezies für zusammengefasste Gruppen der Kultivierungsdauer der bakteriellen Proben	55
Tab. 15	Erkennungsraten für die fünf bakteriellen Geruchsklassen beim schrittweisen Vorgehen im LDA-Modelltest	56
Tab. 16	Vergleich der Erkennungsraten des Zwei-Klassen-Modells, Fünf-Klassen-Modells und der schrittweisen Erkennung für die fünf bakteriellen Gruppen.....	57
Tab. 17	Übersicht der Erkennungsraten im Zwei-Klassen-Modell für Datensätze des Zinndioxid-Gassensormikroarrays (SnO ₂ -GSMA), für Datensätze des Wolframtrioxid-Gassensormikroarrays (WO ₃ -GSMA) und für die Nutzung der Datensätze beider Gassensormikroarrays in einer Datenbasis.....	58

Tab. 18	Gaschromatographische-flammenphotometrische Analyse schwefelhaltiger Verbindungen im Gasraum über Serum-Kulturen von einigen oralen Spezies	63
Tab. 19	Gaschromatographische-flammenphotometrische Analyse schwefelhaltiger Verbindungen im Gasraum über Suspensionen von oralen Spezies in isotoner Kochsalzlösung mit Zusatz der Aminosäuren L-Methionin oder L-Cystein	63
Tab. 20	Gaschromatographische-massenspektrometrische Analyse der flüchtigen Komponenten im Gasraum über Kulturen von einigen oralen Spezies	64
Tab. 21	Nachweisgrenzen für einige Verbindungen für die beiden Detektionshalbleitermaterialien der KAMINA	64

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. J.-P. Bernimoulin für das Überlassen des Dissertationsthemas und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. B.-M. Kleber für seine gute weiterführende Betreuung.

Meinem Betreuer Herrn Dr. P. Purucker danke ich für seine unkomplizierte und geduldige Hilfe. Mit seinem Optimismus hat er mir besonders bei der schriftlichen Umsetzung der Arbeit immer wieder aufmunternd und mit konstruktiver Kritik beiseite gestanden.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. U. Krüger von der Firma Yson Diagnostics für seinen unermüdlichen Erfindergeist. Er hatte immer wieder neue Ideen, die praktische Arbeit zu vereinfachen. Bei seiner Kollegin, Frau I. Dismus, möchte ich mich ganz herzlich bedanken für ihre Arbeit beim Vorbereiten der gesammelten Daten.

Frau V. Kanitz danke ich für die freundliche Anleitung, Hilfe und Aufmunterung bei der Arbeit im Forschungslabor.

Frau I. Koronzci und Herrn I. Kiselev vom Institut für Instrumentelle Analytik des Forschungszentrums Karlsruhe möchte ich ganz herzlich danken für ihre freimütige Arbeit zur Auswertung der Daten und ihre freundliche Betreuung bei meinem Aufenthalt in ihrem Institut.

Weiterhin danke ich meinem Mann, meiner Familie und allen meinen Freunden für ihren Beitrag zum Gelingen dieser Dissertation.

Ich bedanke mich bei der DFG für die dreijährige finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung an Eides Statt

Die vorliegende Arbeit wurde von mir selbst und ohne Hilfe Dritter verfasst. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Alle benutzten Hilfsmittel, sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

Kristina Faust