

4 Material und Methode

4.1 Übersicht

In vitro wurden 57 Messungen von bakteriellen Kulturen auf Columbia-Blutagar-Nährböden (SIFIN®, Berlin, Deutschland) mit einem Prototyp des Olfaktographen (Yson Diagnostics®, Teltow, Deutschland) durchgeführt.

Bakterielle Kulturen der folgenden Laborstämme wurden auf Columbia-Blutagarplatten (SIFIN, Berlin, Deutschland) angelegt:

Actinobacillus actinomycetemcomitans (DSM 11123, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Deutschland)

Prevotella intermedia (DSM 20706, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Deutschland)

Porphyromonas gingivalis (DSM 20709, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Deutschland)

Eikenella corrodens (ATCC 23834, American Type Culture Collection, LGC Promochem, Wesel, Deutschland)

Fusobacterium nucleatum (DSM 20482, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Braunschweig, Deutschland).

Des Weiteren wurden von zwei Patienten der Abteilung für Parodontologie des Zentrums für Zahnmedizin der Charité subgingivale Proben aus parodontal aktiven Läsionen entnommen. Die Patienten zeigten eine generalisierte chronische Parodontitis. Von den subgingivalen Proben wurden Kulturen auf Columbia-Blutagarplatten (SIFIN, Berlin, Deutschland) angelegt. Nach morphologischen Gesichtspunkten wurden nach Subkultivierung folgende zwei klinische Spezies isoliert:

P. gingivalis

P. intermedia.

Beide Spezies wurden mit dem API rapid ID 32 A® (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) biochemisch bestätigt.

Die Kulturen der Laborspezies und der klinischen Isolate wurden anaerob kultiviert bis ihr Gasraum mit dem Olfaktographen gemessen wurde. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die durchgeführten Messungen von bakteriellen Proben.

Nr. der Messg.	Messdatum	Keim 1	Keim 2	Keim3	Keim 4	Keim 5	Keim 6	Keim 7
1	12.12.01	AA						
2	13.12.01	PG	FN	EC				
3	19.12.01	EC	AA	FN	PG			
4	16.01.02	EC	AA	PG				
5	21.01.02	AA	PG					
6	22.01.02	PG	AA	EC				
7	25.01.02	PG						
8	31.01.02	AA	PG					
9	31.01.02	PG	PG					
10	07.02.02	PI	AA	EC	FN	PG		
11	14.02.02	PI	AA	EC	FN			
12	25.02.02	PI	AA	EC				
13	25.02.02	FN	PG	PGPat				
14	28.02.02	PI	AA	EC	FN	PG	PI	
15	06.03.02	PI	PIPat					
16	21.03.02	PIPat	PI	AA	EC	FN	PG	PI
17	28.03.02	PI	FN	PG				
18	08.04.02	PI	PIPat					
19	08.04.02	AA	EC	PG	PGPat			
20	03.06.02	PI	AA	FN	EC	PGPat		
21	06.06.02	PI	AA	EC	FN	PG	PGPat	
22	12.06.02	AA	PI	EC	FN	PIPat	PG	
23	19.06.02	PI	PI	AA	EC	FN		
24	04.07.02	AA	PI	FN				
25	17.07.02	AA						
26	18.07.02	FN	AA					
27	29.07.02	AA	PI	FN				
28	01.08.02	PIPat	EC	PG				
29	09.09.02	AA	EC	PIPat				
30	10.09.02	PI	FN					
31	26.09.02	AA	PI	FN				
32	30.09.02	PI	AA	FN				
33	30.10.02	AA	PI	FN				
34	31.10.02	EC	PG					
35	04.11.02	AA	PI	EC	FN	PG		
36	07.11.02	PI	PG					
37	08.11.02	FN	PG					
38	11.11.02	AA	FN	PG	EC			
39	13.11.02	PI						
40	13.11.02	EC						
41	15.11.02	FN	AA	PG				
42	19.11.02	PI	EC					
43	27.11.02	AA	PI	PIPat				
44	28.11.02	EC	PI	PIPat	FN	PG		
45	02.12.02	PI	AA	FN	PG	EC		
46	04.12.02	PI	AA	EC	PG	FN		
47	05.12.02	AA	PI	EC	PG			
48	16.12.02	AA	PI	EC	PG			
49	27.12.02	AA	FN					
50	02.01.03	PI	EC	PG				
51	13.01.03	PI	AA	EC	FN	PG		
52	20.01.03	AA	PI	EC	FN	PG		
53	03.02.03	PI	AA	EC	FN	PG		
54	06.02.03	PI	AA	EC				
55	07.02.03	AA	EC	FN	PG			
56	10.02.03	AA	EC	FN	PG			
57	21.02.03	AA	EC	FN				

Tab. 1 Übersicht der durchgeführten Messungen von bakteriellen Kulturen von Keimen der Laborstämme: *P. intermedia* (PI), *A. actinomycetemcomitans* (AA), *E. corrodens* (EC), *F. nucleatum* (FN), *P. gingivalis* (PG) und der klinischen Isolate: *P. intermedia* (PIPat), *P. gingivalis* (PG)

4.2 Herstellung der Proben

4.2.1 Subgingivale Proben

Probenentnahme

Proben der subgingivalen Mikroflora wurden aus aktiven parodontalen Läsionen von zwei Patienten mit chronischer Parodontitis gewonnen. In dem entsprechenden Quadranten wurde dafür die supragingivale Plaque mit sterilen Wattepellets (Roeko, Langenau, Deutschland) entfernt. Zuvor wurde der Quadrant mit Watterollen (Omnident, Rodgau, Deutschland) isoliert. Zur Probenentnahme wurden drei sterile Papierspitzen (Roeko, Langenau, Deutschland) in die parodontale Läsion eingebracht und nach 15 Sekunden zusammen entfernt (DAHLÉN et al. 1996). Innerhalb von ein bis zwei Sekunden wurden die entnommenen Papierspitzen in ein Kryoröhrchen (Nalgene Cryoware Brand Products, Rochester NY, USA) umgesetzt. Das Transportröhrchen enthielt einen Milliliter anaerob, bei 37° Celsius vorreduziertes, steriles RTF-Medium (reduced transport fluid) (SYED und LOESCHE 1972). Es wurde dicht verschlossen. Die Proben wurden sofort nach der Entnahme ins Labor transportiert und dort weiter behandelt.

Kulturtechnik und Identifikation

Die bakteriellen Beläge der Papierspitzen wurden im RTF Medium durch Dispersion mittels eines Rüttlers (Schüttler MTS 4, IKA-Werke, Staufen, Deutschland) für maximal 30 Sekunden suspendiert (DAHLÉN et al. 1992). Von der Bakteriensuspension wurden 200 Mikroliter auf einer Columbia-Blutagarplatte (SIFIN, Berlin, Deutschland) verteilt und in anaerober Atmosphäre (Oxoid, Wesel, Deutschland) bei 37° Celsius inkubiert. Schwarz pigmentierte Kolonien wurden alle drei bis vier Tage auf Columbia-Blutagarplatten subkultiviert, bis sie in der Kolonie- und mikroskopischen Morphologie rein erschienen (QUIRYNEN et al. 1998). Die Isolate wurden durch ihr Gram-Färbeverhalten, die Indol-, die Katalasereaktion, den Lactase-Fermentationstest und metabolische Standardtests (API rapid ID 32 A®, bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) überprüft, um *Porphyromonas gingivalis* und *Prevotella intermedia* zu identifizieren (BUCHANAN und GIBBONS 1974, DAHLÉN et al. 1996).

4.2.2 Bakterielle Kulturproben

Für die Untersuchung wurden Kulturen der zuvor genannten bakteriellen Spezies der Laborstämme und klinischen Isolate auf Columbia-Blutagar-Nährböden (SIFIN, Berlin,

Deutschland) in Petri-Schalen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland) angelegt. Der Columbia-Blutagar wurde mit Vitamin K und Hämin angereichert (WYSS 1992). Fünfprozentiges defibriniertes Schafblut (elocin Lab, München, Deutschland) wurde zugesetzt. Die Kulturen wurden in anaerober Atmosphäre (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂) mit einem Anaerobiersystem (Oxoid, Wesel, Deutschland) bei 37° Celsius im Brutschrank inkubiert. Alle 72 Stunden wurden die Keime der fünf Laborstämme und der klinischen Isolate auf neue Columbia-Blutagarplatten überimpft. Pro Spezies wurden jeweils drei Subkulturen angefertigt. Die Herstellung der Subkulturen erfolgte in aerober Atmosphäre unter einer Sterilwerkbank. Die Kulturen der einzelnen Spezies waren während der Subkultivierung nicht länger als 30 Minuten der Luft unter der Sterilwerkbank ausgesetzt. Die Reinheit der Kulturen wurde wöchentlich mikroskopisch durch Anfertigung von Präparaten in Gram-Färbung und monatlich unter Nutzung metabolischer Standardtests überprüft. Die Identifikation der Spezies basierte auf Kolonie- und zellulärer Morphologie und spezifischen biochemischen Reaktionen der Spezies entsprechend "Bergey`s manual of determinative bacteriology" (BUCHANAN und GIBBONS 1974). Als Standardtests wurden der API rapid ID 32 A® (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) zum Nachweis von *E. corrodens*, *P. intermedia* und *P. gingivalis*, der API 20 A® (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) mit dem Zusatz API 10 S® (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) zum Nachweis von *A. actinomycetemcomitans* und der API ZYM® (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) zum Nachweis von *F. nucleatum* und *E. corrodens* genutzt. Die Spezies *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* und *E. corrodens* wurden durch die Katalasereaktion (BLIX et al. 1990, ZAMBON et al. 1985), *E. corrodens* noch zusätzlich durch die Peroxidasereaktion überprüft.

Von den Stammkulturen der fünf Laborspezies und den zwei klinischen Isolaten wurden zusätzlich zur Subkultivierung bakterielle Kulturen unter den gleichen standardisierten, oben beschriebenen Bedingungen auf fünf Millilitern Columbia-Blutagar in Zellkulturschalen (Falcon Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes NJ, USA) angelegt. Diese Proben wurden zusammen mit den Stammkulturen der jeweiligen Spezies inkubiert. Die Petrischalen der Stammkulturen und die Proben in den Zellkulturschalen jeweils einer Spezies befanden sich in einem separaten Anaerobiertopf mit einem Volumen von zweieinhalb Litern. Die einzelnen Spezies selbst und die Zellkulturschalen aus Kunststoff waren so keinen speziesfremden Gerüchen ausgesetzt. Der Gasraum über diesen Proben wurde nach zwei bis zehn Tagen gemessen. Die Dauer der Kultivierung richtete sich nach Angaben, die in der Literatur für die Kultivierung von Anaerobiern auf festen Nährböden angegeben sind (DAHLÉN und ROSLING 1998, DAHLÉN

et al. 1990, DAHLÉN et al. 1996, EICK und PFISTER 2002, JOHANNSSON et al. 1994, LAUGHON et al. 1982, MOMBELLI et al. 2000, MOORE et al. 1982, PERSSON et al. 1990, PIRNAZAR et al. 1999, QUIRYNEN et al. 1998, SLOTS 1976, SLOTS et al. 1979, SOCRANSKY et al. 1988, TANNER et al. 1979, WILLIS et al. 1999).

Insgesamt wurden 178 Proben von den fünf Laborstämmen und zwölf von den klinischen Isolaten gemessen. Eine Übersicht über die Anzahl gemessener Proben für die einzelnen Spezies gibt die folgende Tabelle (Tab. 2).

Spezies	Anzahl gemessener Kulturen
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	40
<i>P. intermedia</i>	36
<i>E. corrodens</i>	34
<i>F. nucleatum</i>	33
<i>P. gingivalis</i>	35
<i>P. intermedia</i> /Patientenisolat	8
<i>P. gingivalis</i> / Patientenisolat	4

Tab. 2 Übersicht der angelegten und gemessenen Kulturen der fünf Laborstämme und der zwei klinischen Isolate

4.3 Das Messgerät

In der vorliegenden Studie wurde der neu entwickelte Prototyp eines Multigassensensorsystems, der Olfaktograph (YSON Diagnostics, Teltow, Deutschland) (Abb. 7), für seine mögliche Anwendung in der mikrobiologischen parodontalen Diagnostik getestet. Kernstück des Olfaktographen ist ein Gassensormikrosystem, die KAMINA (Insitut für instrumentelle Analytik des Forschungszentrum Karlsruhe, Karlsruhe, Deutschland). Das Akronym KAMINA steht für Karlsruher MikroNase. Es besteht aus dem Gassensormikroarray (GSMA) und einer zugehörigen mikrocontrollergesteuerten Betriebselektronik.



Abb. 7 Olfaktograph

4.3.1 Das Funktionsprinzip des Gassensormikroarray

Das Sensorarray ist ein 9 x 10 mm großer Siliziumchip, auf den ein Metalloxidfeld aufgebracht ist. Durch parallel angeordnete Streifenelektroden wird dieses Feld in 38 identische Einzelsegmente unterteilt. Ein Sensorsignal ist der elektrische Widerstand, der zwischen zwei benachbarten Elektroden gemessen werden kann. Für die Metalloxidsensoren ist eine Betriebstemperatur von 200 bis 400 Grad Celsius notwendig. Diese wird durch vier Heizmäander erreicht, die auf der Rückseite des Chips aufgebracht sind. Die Heizleistung der Mäander wird durch einen Regelkreis mit Hilfe zweier Platin-Widerstandstemperaturfühler auf der Oberseite des Chips reguliert. In dem Olfaktographen sind zwei verschiedene Gassensormikroarrays integriert. Das eine enthält Wolframtrioxid, das zweite Zinndioxid als Metalloxidfeld.

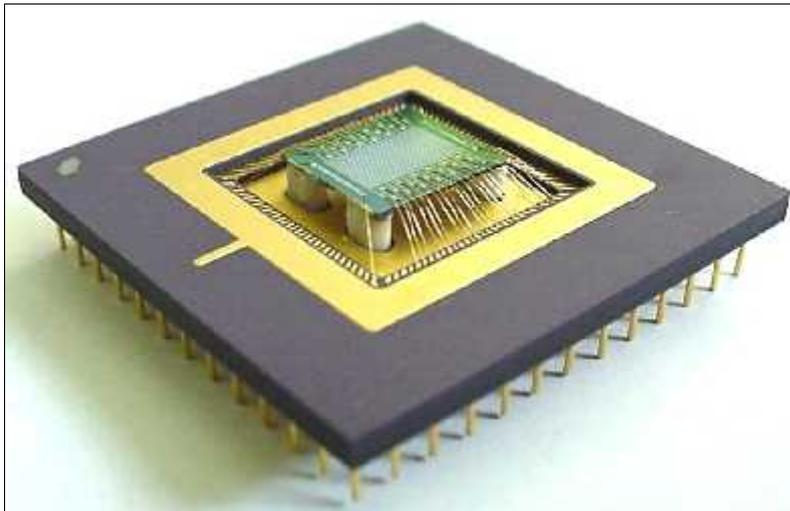


Abb. 8 Gassensormikroarray

Die Gradiententechnik

Um eine unterschiedliche Selektivität der einzelnen gleichartigen Sensorelemente für verschiedene Gase zu erreichen, wird die Gradiententechnik angewendet (ZUDOCK 1998). Bestimmte Einflussgrößen auf das Detektionsverhalten der Sensoren können damit gezielt von Sensorelement zu Sensorelement variiert werden. Bei dem Sensorarray der KAMINA werden zwei Gradienten miteinander antiparallel verwendet.

Zum einen wird durch vier separat steuerbare Heizmäander auf der Unterseite des Chips ein Temperaturgradient über die Länge des Metalloxidfelds eingestellt. Sie beheizen das Sensorfeld gezielt inhomogen durch unterschiedliche Heizleistung jedes der vier Heizmäander. Von der einen Seite des Chips zur anderen Seite kann dieser Gradient bis zu 50° Celsius betragen. Da die Temperaturabhängigkeit der Detektion gasspezifisch ist, wird durch den Temperaturgradienten eine unterschiedliche Selektivität der einzelnen Sensorelemente erreicht (EHRMANN 1997).

Zum anderen ist das Metalloxidfeld beschichtet mit einer gaspermeablen Filtermembran aus Siliziumdioxid, die über das gesamte Sensorarray eine ansteigende Dicke aufweist. Sie ist einige Nanometer stark. Durch diese Beschichtung wird der Gaszutritt zum Sensorelement gesteuert und demzufolge die Selektivität der einzelnen Sensorelemente unterschiedlich beeinflusst (EHRMANN 1997, GOSCHNICK 2003). Diese Membran stellt darüber hinaus eine Schutzfunktion gegenüber Alterungsprozessen her. Sie erhöht die Stabilität des Sensormaterials (EHRMANN 1997). Halbleitermetalloxide sind sehr empfindlich gegenüber schwachen Säuren oder Schwefel enthaltenden Verbindungen. Durch Reaktionen mit diesen Stoffen können sich über die Zeit Veränderungen in der Empfindlichkeit und Selektivität ergeben.

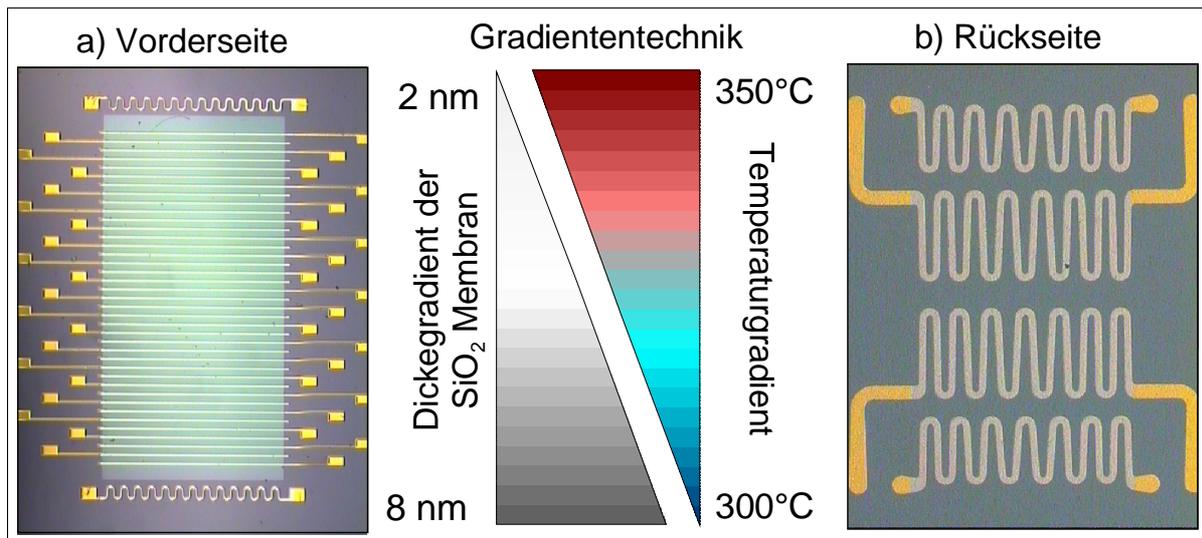


Abb. 9 Aufbau und Prinzipskizze des Gassensormikroarrays (GOSCHNICK 2003)

a) **Chipvorderseite** mit rechteckigem Metalloxidfeld, das durch 39 Streifenelektroden in 38 Sensorsegmente unterteilt ist. Am oberen und unteren Ende des Chips befindet sich ein Temperaturfühler.

b) **Chiprückseite** mit vier voneinander unabhängigen Heizmängern.

Schematisch ist das Prinzip der **Gradiententechnik** dargestellt: Durch stete stationäre Variation der Chiptemperatur und der Dicke einer porösen SiO_2 -Membranbeschichtung resultiert für jedes Sensorelement ein individuelles Detektionsverhalten.

Signalentstehung/ Detektionsprinzip von Metalloxidsensoren

Wird eine Metalloxidoberfläche als Gasdetektorschicht dem Sauerstoff der Atmosphäre ausgesetzt, findet eine Adsorption von Sauerstoffmolekülen an der Oberfläche des Sensors statt (Abb. 10). Die adsorbierten Sauerstoffmoleküle reagieren mit Elektronen des Leitungsbandes des Halbleiter-Detektors. Daraus resultiert ein Zustand verringerter Leitfähigkeit. Nahezu alle Gase (mit Ausnahme der Edelgase oder ähnlich passiver Gase wie Stickstoff) adsorbieren und beeinflussen dadurch die Leitungseigenschaften der Metalloxidoberfläche. Treten oxidierbare Gase, wie z. B. Methan oder Ethanol, mit der Oberfläche des Sensors in Kontakt, so findet bei der üblichen Betriebstemperatur von einigen hundert Grad Celsius unter Verbrauch der oberflächenadsorbierten Sauerstoffmoleküle eine katalytische Verbrennung statt. Bei diesem Vorgang werden Elektronen wieder an das Leitungsband des Halbleiters zurückgegeben. Die dadurch resultierende Leitfähigkeitserhöhung ist als Signal messbar. Die Wechselwirkung mit der Oberfläche ist bei den genannten Betriebstemperaturen reversibel. Das heißt, wenn das nachgewiesene Gas nicht mehr zugeführt wird, reagiert der atmosphärische Sauerstoff mit der Metalloberfläche, und der ursprüngliche Leitungszustand stellt sich wieder ein (DICKINSON et al. 1998).

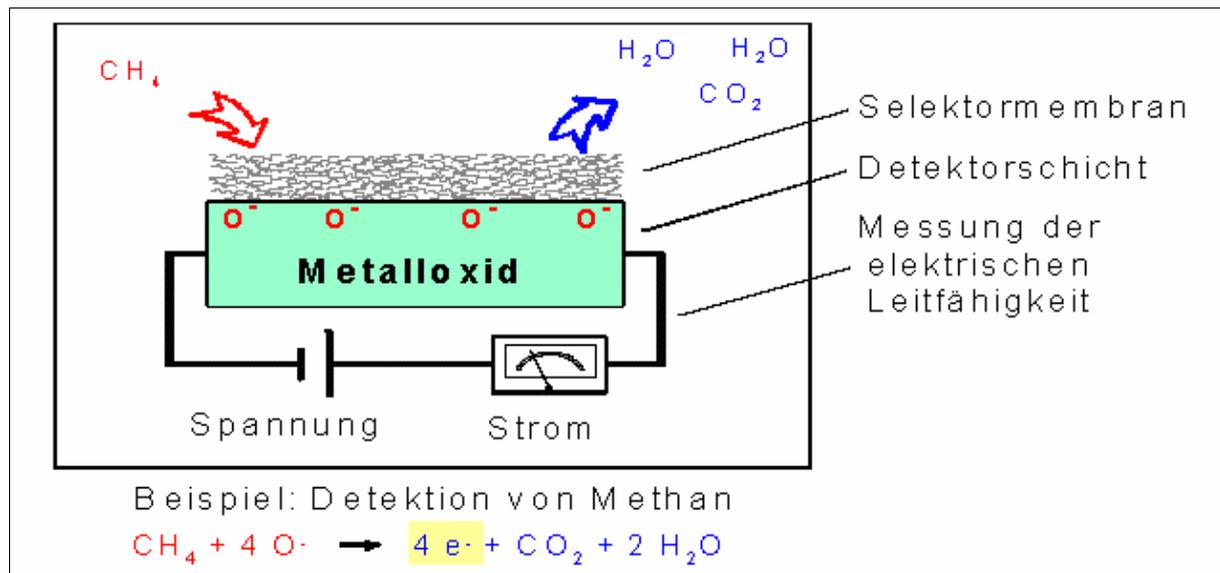


Abb. 10 Prinzip der Gasdetektion durch Metalloxidsensoren am Beispiel der Methan-Detektion
(GOSCHNICK 2003)

Die Abhängigkeit des Sensorsignals S von der Konzentration des Analyten lässt sich, analog zum Reizverhalten der menschlichen Riechzellen, durch eine Potenzfunktion beschreiben. Damit zeigen Metalloxidsensoren ein nicht lineares Detektionsverhalten (GOSCHNICK 2003).

Das Sensorsignal S ist hier definiert als relative Leitfähigkeitsänderung:

$$\frac{\Delta G}{G_o} = \frac{G - G_o}{G_o} = \frac{G}{G_o} - 1$$

Zu den Vorzügen von Metalloxidsensoren gehört allgemein, neben dem sehr schnellen, im Sekundenbereich liegenden Ansprechverhalten, auch die große Bandbreite der detektierbaren Gase und die hohe Empfindlichkeit des Nachweises. So können durch verschiedene Reaktionsmechanismen nicht nur oxidierbare, sondern auch reduzierbare Gase, wie Stickstoffdioxid und Ozon, oder reaktionsträge Gase, wie Chlorkohlenwasserstoffe, nachgewiesen werden. Für die meisten organischen und anorganischen Gase liegen die Nachweisgrenzen im Bereich von Teilchen pro Billion (ppb) oder gar darunter (GOSCHNICK 2003).

Verschiedene Gase können unterschiedlich schnell durch die Siliziumoxidmembranschicht diffundieren und temperaturabhängig unterschiedlich stark mit der Sensoroberfläche reagieren. So entsteht ein für einzelne Gase oder Gaskollektive spezifisches Signalmuster, ein spezifisches Muster der Veränderung der elektrischen Leitfähigkeit, das Erkennung und quantitative Bestimmung der Gase erlaubt (GOSCHNICK 2003).

4.3.2 Aufbau und Funktionsweise des Olfaktographen

Der Olfaktograph setzt sich aus drei Teilen zusammen: einem Gerätekasten, einer Messkammer und einem Computer.

Im Gerätekasten befinden sich die zwei KAMINA (mit den Gassensormikroarrays), ein Aktivkohlefilter und eine elektrisch betriebene Pumpe. Die Pumpe erzeugt einen Luftstrom mit einer Strömungsgeschwindigkeit von einem halben Liter pro Minute. Außenluft wird über einen Teflonschlauch (Durchmesser von fünf Millimetern) in das Gerät gepumpt. Im Gerätekasten fließt die Luft durch den Aktivkohlefilter. Der gereinigte Luftstrom wird durch eine weitere Schlauchverbindung aus dem Gerät zur Messkammer geführt. Dort fließt der Luftstrom über die Probe und nimmt vorhandene flüchtige Gaskomponenten mit. Vor dem Eintritt in den Gerätekasten teilt sich die Schlauchverbindung in zwei Eingänge. Ein Teil der Luft wird über das Zinndioxid-GSMA, der andere über das Wolframtrioxid-GSMA geführt.

Mit dem Computer werden die technischen Betriebsdaten für die Sensorarrays kontrolliert und gesteuert. Während der Messung ist die Signaländerung visuell dargestellt. Für die Untersuchung wurde eine Betriebstemperatur von 320° Celsius eingestellt.

Im Zinndioxid-GSMA werden die Signale der 38 Sensorelemente im Sekundenabstand, im Wolframtrioxid-GSMA alle zehn Sekunden aufgenommen.

4.3.3 Die Messkammer

Mit der Messkammer können Proben in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von fünf Zentimetern gemessen werden. Die Schalen werden durch einen Goldbeschichteten Deckel gegenüber der Umgebungsluft abgedichtet. Das manuelle Schließen des Deckels startet automatisiert den Messvorgang. Die Temperatur der Messkammer wird durch einen Regelkreis auf 37° Celsius gehalten durch eine Heizspirale, die sich im Boden der Messkammer befindet.



Abb. 11 Messkammer

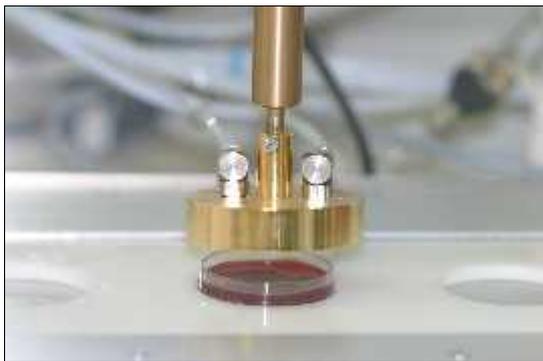


Abb. 12 Bakterienkultur in der Messkammer unter geöffnetem Deckel

4.4 Durchführung der Messungen

4.4.1 Messbedingungen

Jede der 190 Kulturen wurde einmal gemessen. Die bakteriellen Kulturen und der sterile Referenzagar, die in einer Messung verwendet wurden, entstammten dem gleichen Agarguss. Für die Herstellung neuer Columbia-Blutagarplatten und für alle Referenzmessungen von reiner Luft wurden neue, sterile Zellkulturschalen verwendet, da Kunststoff durch seinen molekularen Aufbau dazu neigt, Gerüche aufzunehmen. Die Probe (Kulturschale) wurde vor ihrer Messung unter der Sterilwerkbank dem Anaerobiersystem entnommen und unmittelbar danach in weniger als einer Minute in die Messkammer platziert. Nach Entfernung des Deckels der Kultur, wurde

diese durch den Deckel der Probenkammer luftdicht abgeschlossen und automatisch ein Strom gereinigter Luft als Transportgas über die Kultur geleitet. Die Messungen wurden visuell am PC kontrolliert. Messbedingungen, Raumtemperatur und Daten der Proben wurden protokolliert. Die Geschlossenheit des Systems gegenüber der Raumluft wurde durch Alkohol überprüft. Zu diesem Zweck befand sich eine mit Ethanol gefüllte Schale während der Testmessungen in der Messkammer neben der Testprobe oder unter den Schlauchverbindungen, die ins Gerät und in die Messkammer führen. Als Testprobe wurde eine leere Zellkulturschale genutzt.

Referenzgasmessungen

Als Referenz für die Atmosphäre der Raumluft wurde zu Beginn einer Messung eine leere Zellkulturschale gemessen. Als zweite Referenz wurde dann eine Schale sterilen Columbia-Blutagars gemessen.

Messdauer für eine Probe

In den Vorversuchen ergab die Überprüfung der Messdauer, dass eine Zeitspanne von 20 Minuten ausreichend ist, das Luftvolumen in Messkammer und Schlauchsystem auszutauschen und genügend Probengas zu sammeln. Diese Zeit war insbesondere notwendig für die Erholungsphase nach den Messungen von bakteriellen Proben, um einen Anstieg der Sensorwiderstände auf die Basiswerte zu erreichen, bevor eine neue Probe gemessen werden konnte. Jede Bakterienkultur und jede Referenz wurden jeweils 20 Minuten gemessen. Visuell wurde der Verlauf der Sensorwiderstände am Bildschirm überprüft. Es musste eine stabile Phase der elektrischen Widerstände erkennbar sein, bevor ein Probenwechsel durchgeführt wurde.

4.4.2 Abfolge einer Messung

In folgender Reihenfolge wurden die einzelnen Bakterienproben gemessen:

Referenz- schale	Referenz- agar	Referenz- schale	Bakterien- probe 1	Referenz- schale	Bakterien- probe 2	Referenz- Schale n	Bakterien- probe n
---------------------	-------------------	---------------------	-----------------------	---------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

Die Referenzschale ist eine leere, neue Zellkulturschale. Der Referenzagar ist eine Zellkulturschale mit fünf Millilitern sterilen Columbia-Blutagars, der zur gleichen Zeit gegossen und vorreduziert wurde wie die Platten für die Bakterienkulturen. Die Bakterienproben sind jeweils gleich alte Kulturen der fünf Laborstämme und/oder der beiden klinischen Isolate.

Auf dem PC zeigt sich eine Messung von fünf Proben der fünf Laborstämme wie in Abb. 13:

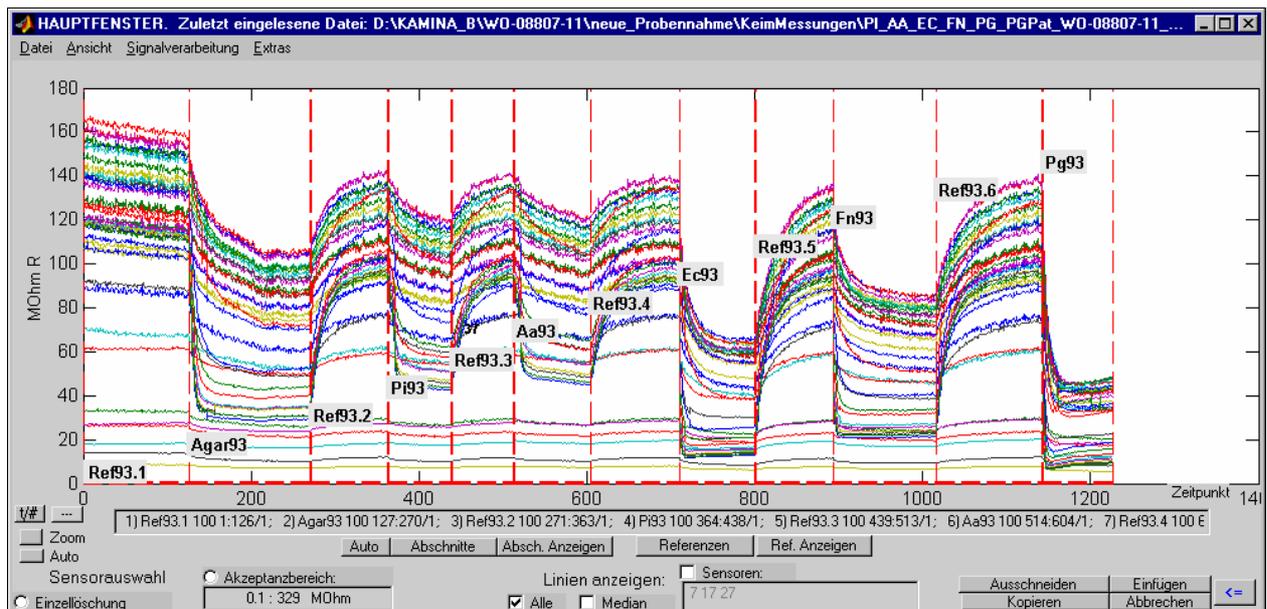


Abb. 13 PC-Darstellung eines Messablaufes

für die Keime *P. intermedia* (Pi), *A. actinomycetemcomitans* (Aa), *E. corrodens* (Ec), *F. nucleatum* (Fn), *P. gingivalis* (Pg)

4.5 Auswertung der Daten

Die aufgenommenen Daten sind multivariater Natur. Die Daten wurden durch eine lineare Diskriminanzanalyse ausgewertet. Die Durchführung der Diskriminanzanalyse erfolgte mit der Software COMMAS LDA-MT (Institut für instrumentelle Analytik des Forschungszentrums Karlsruhe, Deutschland).

4.5.1 Datenverarbeitung

Für jede gemessene Probe entsteht ein Signalsatz von 38 Sensorwiderständen, der einen dynamischen und einen statischen Anteil hat. Die dynamischen Anteile der Signalentstehung werden herausgeschnitten. Für die Auswertung werden nur die Werte der statischen Phase genutzt.

Definition Messwert

Durch das Schneiden der Widerstandswerte der 38 Sensoren werden für jede gemessene bakterielle Probe 30 Messwerte der statischen Phase für jeden Sensor ausgewählt. Diese Widerstandswerte werden normiert und gehen als normierte Messwerte in die lineare Diskriminanzanalyse ein. 38 x 30 normierte Messwerte bilden einen Datensatz für eine Messung.

Für das Wolframtrioxid-Sensorarray ergeben sich 30 Sensorwerte durch Messungen im Zehnstundenabstand innerhalb von fünf Minuten, für das Zinndioxid-Sensorarray durch Messungen im Sekundenabstand innerhalb einer halben Minute.

Validierung der Sensorsignale

Fehlerhafte Signale in den Rohdaten wurden visuell am Computerbildschirm überprüft und eliminiert. Als Ausreißer wird eine spontane Störung an einzelnen Sensorsegmenten verstanden, die zu jedem beliebigen Zeitpunkt vorkommen kann und sich dadurch auszeichnet, dass der betrachtete Widerstandswert stark von den benachbarten Sensorsegmenten abweicht. Aufgrund der Gradiententechnik können mit Hilfe der Nachbarsegmente die Ausreißer nicht nur erkannt, sondern auch fehlerhafte Werte korrigiert werden, so dass der Sensorsatz für die Auswertung vollständig benutzt werden kann (GOSCHNICK und WALTER 2003).

Datennormierung

In der nächsten Stufe der Datenverarbeitung werden die Sensorwerte normiert, um einem Dominieren der hohen Sensorantworten vorzubeugen und den Informationsgehalt der niedrigen Sensorantworten evaluieren zu können. Durch die Normierung ergeben sich für jeden Datensatz Werte, die zwischen null und eins liegen.

Für die Referenznormierung werden die Sensorwerte durch den Mittelwert einer definierten Referenz dividiert. Als Referenz wurden zum einen die Signalmuster für den reinen Agar, bzw. zum anderen für Luft als Referenz die Signalmuster der leeren Referenzschale festgelegt. Durch die Referenznormierung wird der Einfluss des Eigengeruchs der Luft, bzw. des Agars auf die Sensorsignalebildung berücksichtigt.

Für die Mediannormierung wird jeder Messwert durch den Medianwert aller 38 Sensorsignale der jeweiligen Probe dividiert ohne eine Referenz zu berücksichtigen. Der Median ist der Sensorwiderstand, für den 50 % der Sensorwiderstände oberhalb und 50 % unterhalb liegen. Bei einer geraden Anzahl von 38 Sensorwiderständen dient der Mittelwert der beiden mittleren Widerstände als Median. Extremwerte von störbedingten Ausreißern des Signalkollektivs haben auf die Größe des Median nur sehr geringen oder gar keinen Einfluss.

Für die drei verschiedenen Normierungen, bzw. Referenznormierungen wurden jeweils die LDA-Modelle berechnet und getestet und miteinander verglichen.

4.5.2 Lineare Diskriminanzanalyse

Mit den normierten Datensätzen wird eine lineare Diskriminanzanalyse (LDA) durchgeführt. Man verwendet diesen Algorithmus zur Wiedererkennung von Gasen, weil nur für eine Geruchsklasse charakteristische Signalwerte genutzt und alle überflüssigen Signalbeiträge (z. B. ein wechselnder Geruchshintergrund) vernachlässigt werden.

Die lineare Diskriminanzanalyse ist ein klassisches Verfahren der multivariaten Datenanalyse. Das primäre Ziel besteht in einer optimalen, linearen Separierung von gegebenen Objektgruppen, hier die fünf Bakterienklassen. Es werden dabei optimale Linearkombinationen (Wichtungen) der gemessenen Variablen gesucht. Durch Berechnung der Wichtungen entsteht eine neue künstliche Variable, das Diskriminanzmerkmal. In den folgenden Ausführungen wird es als LDA-Komponente bezeichnet. Für eine gegebene Menge g von Objektgruppen können $g-1$ unabhängige Diskriminanzmerkmale berechnet werden. Für die fünf gegebenen Bakterienklassen gibt es demzufolge vier Diskriminanzmerkmale, die LDA-Komponenten 1 bis 4. Durch die Diskriminanzmerkmale werden neue Projektionsebenen in einem niedrigdimensionalen Werteraum erzeugt. Die Wichtungen sollen dabei so optimiert werden, dass die gegebenen fünf Objektgruppen maximal getrennt erscheinen. Die Separierung der Objektgruppen ist dabei um so besser, je homogener die Gruppen sind, je kleiner also die Streuung der Objekte innerhalb der Gruppen verglichen mit der Streuung der Gruppenmittelpunkte (Streuung „zwischen den Gruppen“) ist. Die Koordinaten der fünf Bakterienklassen werden in einem Diagramm der vier LDA-Komponenten abgebildet. Diese Darstellung erfasst die vollständige Information über die Separierbarkeit der gegebenen Gruppen (HENRION und HENRION 1994).

Anschauungsmodell für eine lineare Diskriminanzanalyse der fünf Bakterienklassen

Jedem Zeitpunkt einer Messung können 38 normierte Sensorwerte zugeordnet werden. Die normierten Sensorwerte bilden einen 38-dimensionalen Werteraum, wobei jedes Signalmuster durch einen Punkt in diesem Raum repräsentiert wird. Die LDA erlaubt es, diese unanschauliche Darstellung in einen vierdimensionalen Werteraum zu überführen. Für die 18 Datensätze aus den acht Messungen Nummer 25 bis 32 zeigt die Abb. 14 die LDA-Modellbildung, hier die Darstellung der Objekte der fünf Bakterienklassen bezüglich des ersten und dritten Diskriminanzmerkmals, der LDA-Komponenten 1 und 3. In dieser Ebene des vierdimensionalen Modells ist die Separierung der fünf Klassen sehr gut zu sehen. Es sind fünf Ellipsen abgebildet, die jeweils für eine Bakterienklasse stehen. Man erkennt, dass die LDA 1

vor allem die Gruppen von *P. gingivalis*, *E. corrodens* und *P. intermedia* unterscheidet, während durch die LDA 3 *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* und auch *P. gingivalis* von den übrigen separiert werden. Die geringe Anzahl von acht Messungen wurde gewählt, um eine klare Unterscheidung der Gruppen durch eine geringe Streuung der Messwerte zu erreichen.

Die LDA nutzt gleich große Ellipsen. So wird der Durchmesser für alle Ellipsen durch die Gruppe mit der größten Streubreite der Messpunkte bestimmt.

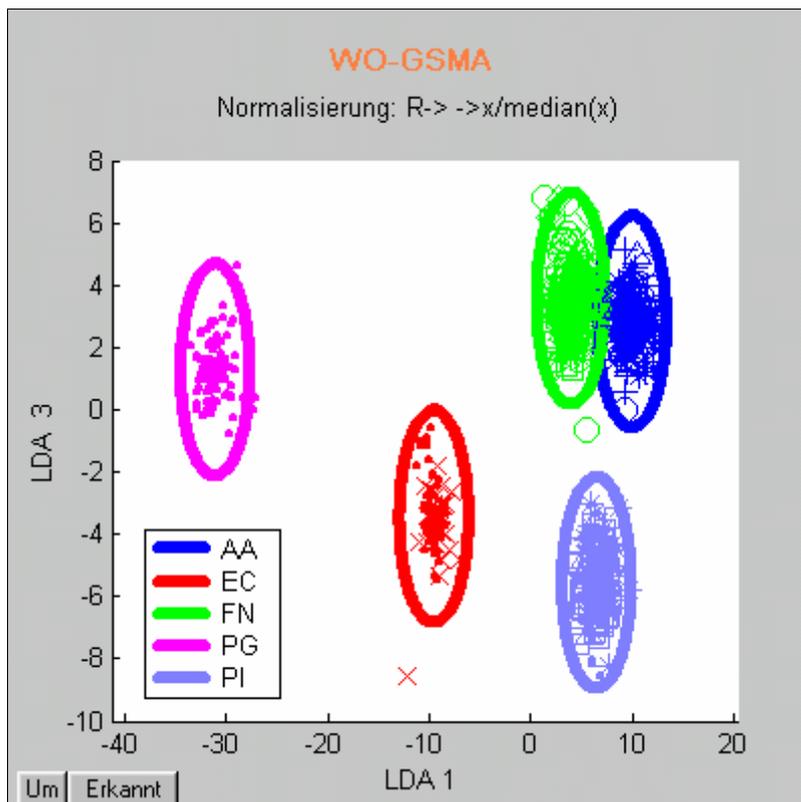


Abb. 14 Modellbildung aus den Daten der Messungen Nr. 25 bis 32 des Woframtrioxid-Sensorarrays für die fünf bakteriellen Spezies

Die Datenbasis des fünf-Klassen-Modells umfasst *A. actinomycetemcomitans* (AA) mit sechs Datensätzen, *E. corrodens* (EC) mit zwei Datensätzen, *F. nucleatum* (FN) mit fünf Datensätzen, *P. gingivalis* (PG) mit einem Datensatz, *P. intermedia* (PI) mit vier Datensätzen.

4.5.3 Die Diskriminanz

Das Geruchsunterscheidungsvermögen eines LDA-Modells wird durch zwei mathematische Größen beschrieben. Eine dieser beiden Größen ist die Diskriminanz. Sie stellt den mittleren relativen Abstand der Klassen zueinander dar (vom Zentrum der Ellipsen/Geruchsklassen). Dieser Abstand wird in Relation zum mittleren Streudurchmesser der Signalwerte der Klassen angegeben (also dem mittleren Durchmesser der Ellipsen).

Für den Fall, dass die Klassen nicht voneinander zu unterscheiden wären, würden alle Ellipsen aufeinander liegen. Keine Gasunterscheidung wäre möglich. Der mittlere relative Abstand der Klassen zum Zentrum der Ellipsen wäre „0“.

Liegt eine ideale Trennung der Geruchsklassen vor, sind die Ellipsen unendlich weit entfernt voneinander. Dann ist auch der mittlere relative Abstand unendlich. Die ideale Trennung liegt nur dann vor, wenn die Messwerte keine Streuung zeigen.

Das Gasunterscheidungsvermögen ist also umso besser, je größer der mittlere relative Abstand der Klassen zum Zentrum der Ellipsen ist.

4.5.4 Der maximale Separationsquotient Lambda

Die zweite Größe für das Maß des Geruchsunterscheidungsvermögens ist der maximale Separationsquotient Λ . Wie auch für das Diskriminanzmerkmal (die LDA-Komponente) gibt es in einem Fünf-Klassen-Fall vier unabhängige maximale Separationsquotienten. Der Separationsquotient nimmt Werte zwischen 0 und 1 an. Er ist in der ersten Dimension für die LDA 1 am größten. Bei einer idealisierten Trennung der Geruchsklassen hätte Λ den Wert 1. Ist keine Unterscheidung der Geruchsklassen möglich, liegen die Ellipsen aufeinander und Λ hätte den Wert 0.

Existieren Überschneidungen zwischen den Geruchsklassen/Ellipsen, nimmt Λ Werte an, die zwischen 0 und 1 liegen. Die Summe der Separationsquotienten gibt das Gesamtseparationsmaß an.

4.5.5 Modelltest

Um die Anwendbarkeit des gebildeten LDA-Modells für eine Erkennung der Spezies durch ihre Gerüche einschätzen zu können, wird die Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der die Messung einer Probe korrekt klassifiziert wird. Bei gut separierten Gruppen sind die Ellipsen selbst die Basis für eine Zuordnungsregel. Bei weniger gut separierten Gruppen ist es sinnvoller, die Trennflächen, die sich beim Überschneiden der Ellipsen ergeben, als Basis der Zuordnung zu nutzen.

Die Erkennung der einzelnen Bakteriengruppen wird durch den Modelltest ermittelt. Mit Nutzung der „leave-one-out“-Methode bildet die LDA Modelle unter Weglassen eines Datensatzes. Im gebildeten LDA-Modell wird für diesen Testdatensatz die Wahrscheinlichkeit der korrekten Zuordnung ermittelt. Dieses Vorgehen wird für alle Möglichkeiten einer

vorgegebenen Datenbasis wiederholt. Die Wahrscheinlichkeit der Erkennung für eine Gruppe und das gesamte Modell wird dann aus den berechneten Wahrscheinlichkeiten gemittelt.

Die Erkennungsrate als Wahrscheinlichkeit für die korrekte Zuordnung einer unbekannt Probe wird zum einen berechnet für die Messung (entspricht einem Datensatz einer Probe) und zum anderen für den Messpunkt im LDA-Modell (dieser entspricht einem der ausgewählten 30 normierten Messwerte). Für die Auswertung wurde festgelegt, dass eine Messung korrekt erkannt gilt, wenn mehr als 50 % ihrer Messpunkte der richtigen Ellipse zugeordnet werden (Erkennung nach Ellipsen).

4.5.6 Modellstabilität

In der Literatur (BLIXT und BORCH 1999, DEWETTINCK et al. 2001, DUTTA et al. 2003, HUDON et al. 2000, LIDÉN et al. 2000, PAULSSON und WINQUIST 1999, PAVLOU et al. 2000) wird die Veränderung von Sensorantworten im Laufe der Nutzungszeit von Multigassensoren systemen diskutiert. Ob sich das LDA-Modell durch die Anwendung des Multigassensorenarrays über den Untersuchungszeitraum von vierzehn Monaten verändert, wird durch die Bildung von drei LDA-Modellen mit unterschiedlicher Datenbasis überprüft. Für diese LDA-Modelle wird die Datenbasis von 150 Datensätzen um jeweils 20 % verringert. Zum einen werden Datensätze der zu Beginn der Untersuchung aufgenommenen Messungen nicht in der LDA-Modellbildung verwendet, zum anderen Datensätze der letzten Messungen. In einem dritten Modell werden 20 % der Datensätze aus der Mitte des Untersuchungszeitraumes nicht in der LDA-Modellbildung verwendet. Für die drei Modelle werden die Erkennungsraten berechnet und miteinander verglichen.

4.5.7 Entwicklung der Modellerkennung mit zunehmender Größe der Datenbasis

Mit der Entwicklung der Modellerkennung wird untersucht, ob eine ausreichende Zahl von Messungen in die LDA-Modellbildung eingehen. Dazu werden Modelle gebildet aus Abfolgen von Datensätzen wie sie in den Messungen vorkommen. Es wird schrittweise die Zahl der Messungen, die in die LDA-Modellbildung eingehen, erhöht. Für jedes dieser Modelle wird die Wahrscheinlichkeit der Erkennung berechnet. Die Erkennungsraten werden in Bezug auf die Anzahl, der in der Datenbasis vorhandenen Messungen, miteinander verglichen.