

Aus der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde,
Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. M. Hannig)

**Identifizierung des Keims *Streptococcus mutans*
aus Bakteriengemischen und Speichelisolaten
mittels Flugzeit-Massenspektrometrie**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. dent.

Doctor medicinae dentariae

an der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes 2014

Eingereicht von Till-Martin Wessel Hüsken,

geb. am 23.06.1980 in Wesel

Promotionsjahr: 2014

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Rupf
- 2.

Inhaltsverzeichnis:

| | |
|--|-----|
| Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis | III |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| 1. Zusammenfassung | VII |
| 1.1 Zusammenfassung (deutsch) | VII |
| 1.2 Abstract (englisch)..... | IX |
| 2. Einleitung | 1 |
| 2.1 MALDI-TOF-Massenspektrometrie zur Identifizierung oraler Mikroorganismen | 1 |
| 2.2 Probleme bei der Identifikation oraler Bakterien | 7 |
| 2.3 Orale mikrobielle Gemeinschaften..... | 9 |
| 2.4 Bedeutung von <i>Streptococcus mutans</i> , Kariesinitiation..... | 13 |
| 2.5 Klassifikation und Identifizierung der Mutans-Streptokokken | 19 |
| 2.6 Ziele der Arbeit, Fragestellung..... | 28 |
| 3 Material und Methoden | 29 |
| 3.1 Material: Geräte und Chemikalien..... | 29 |
| 3.2 Methoden: MALDI-TOF MS | 32 |
| 3.3 Bakterien: Gemischherstellung, Reinkulturen und klinische Isolate und ihre Analyse mittels MALDI-TOF MS | 34 |
| 3.4 Analyse der Peptidmassenspektren..... | 38 |
| 4. Ergebnisse | 42 |
| 4.1 Vorversuche (Reinkulturen und Gemische) | 42 |
| 4.2 Erstellung der Referenzdatenbank..... | 43 |
| 4.3 Quantitative Analyse der Bakteriengemische..... | 49 |
| 4.3.1 Qualität der Analyseergebnisse | 62 |

| | |
|--|----|
| 5. Diskussion | 71 |
| 5.1 Fragestellung..... | 71 |
| 5.2 Methodik..... | 73 |
| 5.3 Folgerungen | 77 |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 78 |
| 7. Anhang (Tabelle der Peakmassenlisten der 43 Gemische) | 95 |
| 8. Danksagung | 96 |
| 9. Lebenslauf | 97 |

Abbildungsverzeichnis:

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Grafische Darstellung des Funktionsprinzips der Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie | 6 |
| Abbildung 2: Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Streptokokken (modifiziert nach Kawamura et al. 1995 und Zbinden et al. 2012)..... | 22 |
| Abbildung 3: Beispiele von mikroskopischen Aufnahmen von <i>S. mutans</i> – Bakterienkolonien auf MSB-Agar | 23 |
| Abbildung 4: Untersuchung der optimalen Anzahl von Massenpeaks zur Identifizierung von Mutans Streptokokken Isolaten | 42 |
| Abbildung 5a: MALDI-TOF MS- Ergebnisse der Mutans-Referenzstämme (GS 5, Ingbritt, Jb 1600 und LM-7) der Datenbank..... | 44 |
| Abbildung 5b: MALDI-TOF MS- Ergebnisse der Mutans-Referenzstämme (NCTC 10449, OMZ 125, OMZ 175 und Qp 50-1) der Datenbank..... | 45 |
| Abbildung 5c: MALDI-TOF MS- Ergebniss des Mutans-Referenzstammes Se 11 der Datenbank..... | 46 |
| Abbildung 6a: MALDI-TOF-MS Darstellung des aus einer Speichelprobe isolierten Stammes S50_834. | 46 |
| Abbildung 6b: Klassifikation als <i>S. mutans</i> (Isolat S50_834), aus Speichel gewonnen, im Vergleich mit anderen Stämmen der Datenbank. | 47 |
| Abbildung 7a: MALDI-TOF-Masterspektren der Gemische 1-3 mit jeweils 100 prozentiger Bakterienbeteiligung | 50 |
| Abbildung 7b: MALDI-TOF-Master-Massenspektren der Gemische 4 - 7 | 51 |
| Abbildung 7c: MALDI-TOF-Master-Massenspektren der Gemische 8 - 11 | 52 |
| Abbildung 7d: MALDI-TOF-Master-Massenspektren der Gemische 12 - 15 | 53 |
| Abbildung 7e: MALDI-TOF-Master-Massenspektren der Gemische 16 - 19 | 54 |
| Abbildung 7f: MALDI-TOF-Master-Massenspektren der Gemische 20 - 23 | 55 |
| Abbildung 7g: MALDI-TOF-Master-Massenspektren der Gemische 24 - 27 | 56 |
| Abbildung 7h: MALDI-TOF-Master-Massenspektren der Gemische 28 - 31 | 57 |
| Abbildung 7i: MALDI-TOF-Master-Massenspektren der Gemische 32 - 35 | 58 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 7j: MALDI-TOF-Master-Massenspektren der Gemische 36 - 39 | 59 |
| Abbildung 7k: MALDI-TOF-Master-Massenspektren der Gemische 40 - 43 | 60 |
| Abbildung 8: Qualität der Analyseergebnisse der Bakteriengemische (gesamt)..... | 62 |
| Abbildung 9: Qualität der Analyseergebnisse der binären Bakteriengemische..... | 63 |
| Abbildung 10: Qualität der Analyseergebnisse der ternären Bakteriengemische | 63 |
| Abbildung 11: Prozentuale Speziesanteile am Originalgemisch / Analyse-Ergebnisse (Gemische 1-10) | 66 |
| Abbildung 12: Prozentuale Speziesanteile am Originalgemisch / Analyse-Ergebnisse (Gemische 11-20) | 67 |
| Abbildung 13: Prozentuale Speziesanteile am Originalgemisch / Analyse-Ergebnisse (Gemische 21-30) | 67 |
| Abbildung 14: Prozentuale Speziesanteile am Originalgemisch / Analyse-Ergebnisse (Gemische 31-43) | 68 |
| Abbildung 15: Unterteilung der Analyse-Ergebnisse in pos. / neg. Abweichungen und exakte Analysen | 69 |
| Abbildung 16: Durchschnittliche Abweichungen binäre / ternäre Gemische..... | 69 |
| Abbildung 17: Prozentuale Abweichungen aller Gemische | 70 |

Tabellenverzeichnis:

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Vergleichende Darstellung der Verfahren zur Geno- und Phänotypisierung von Bakterien..... | 26 |
| Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Geräte | 29 |
| Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Chemikalien..... | 30 |
| Tabelle 4: Referenzstämme von Mutans- und oralen Streptokokken..... | 31 |
| Tabelle 5: Sanger DNA-Sequenzierung: Reaktionsansatz | 33 |
| Tabelle 6: Darstellung der vorbereiteten Gemischproben, angegeben in prozentualer Beteili- gung | 35 |
| Tabelle 7: Speziesspezifische Peaks der Massenspektren von 10 Mutans und oralen Strep- tokokken der Datenbank im Vergleich untereinander..... | 48 |
| Tabelle 8: Artspezifische (exklusive) Peakmassenliste der Bakterien <i>S. sanguinis</i> , <i>S. oralis</i> und <i>S. mutans</i> zur Identifikation im Bakteriengemisch | 49 |
| Tabelle 9: Bakteriengemische und dazugehörige quantitative Analysewerte | 64 |
| Tabelle 10: Peakmassenliste der 43 Gemische..... | 95 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| BHI-Agar | Brean-Heart-Infusion-Agar |
| CID | “Collision-induced dissociation” |
| Da | Dalton |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| HCCA | á-Cyano-4-hydroxymzimtsäure |
| ICM-MS | „intact cell“ MALDI-TOF Massenspektrometrie |
| kDa | Kilodalton |
| m | Masse |
| m/z-Verhältnis | Verhältnis von Masse zu Ladung |
| MALDI-TOF MS | “matrix assisted laser desorption/ionization time of flight”- Massenspektrometrie (Flugzeitmassenspektrometrie) |
| MSB-Agar | Mitis-Salivarius-Bacitracin-Agar |
| ns | Nanosekunde |
| OD | optische Dichte |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PSD | „Post-source decay” |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Th | Thomson |
| w/v | weight per volume |
| z | Ladung |

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung (deutsch)

Orale Streptokokken nehmen bei der Entstehung der Karies eine bedeutende Rolle ein. *Streptococcus mutans* stellt als Schlüsselpathogen einen geeigneten Modellkeim zur Darstellung des Kariesprozesses dar. Aufgrund der genetischen Verwandtschaft und ähnlicher Kultivierungsbedingungen von oralen Streptokokken ist trotz des Einsatzes molekulargenetischer Methoden eine sichere Identifizierung einzelner klinischer Isolate kompliziert. Gemische phylogenetisch verwandter Arten können nur durch Kultivierung oder Sequenzierung als solche erkannt werden. Kulturtechniken sind für potentielle Kreuzinfektionen nahe verwandter Arten oder auch gegenüber Laborstämmen anfällig.

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war die Detektion des kariesassoziierten Keimes *S. mutans* in Bakteriengemischen. Es sollten Gemische als solche erkannt und ihre anteilige Zusammensetzung analysiert werden. Aus Referenzstämmen der Arten *Streptococcus mutans* (DSM 20523), *Streptococcus sanguinis* (DSM 20567) und *Streptococcus oralis* (DSM 20627) wurden 27 binäre und 13 ternäre artifizielle Gemische hergestellt, die mittels MALDI-TOF MS untersucht wurden.

Basierend auf Referenzstämmen der Spezies *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis*, *S. macacae*, *S. ratti*, *S. pneumoniae*, *S. criceti*, *S. ferus*, *S. downei*, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. parasanguinis*, *S. constellatus*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. mitis* und *S. intermedius*, wurde unter Verwendung der Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) eine Datenbank erstellt.

539 Wildtypisolate des Taxons *S. mutans*, die mit Hilfe von selektiver Kultivierung und spezies-spezifischer Polymerasekettenreaktion klassifiziert worden waren, wurden dieser Stammsammlung zugeordnet. Die Auswertung der Peptidspektren erfolgte unter Nutzung von Massenpeaks mit Hilfe der hierarchischen Clusteranalyse.

Ein sicherer qualitativer Nachweis war für alle drei untersuchten Arten bei einem Anteil von mehr als 10 % innerhalb der Bakteriengemische gewährleistet. Eine quantitative Auswertung war nur bei gleichen Anteilen der drei untersuchten Arten an den Gemischen möglich.

Innerhalb der mit mikrobiologischen Methoden als *S. mutans* klassifizierten 539 klinischen Isolate lagen 460 Klassifizierungen bereits aus einer anderen Studie vor und wurden mittels MALDI-TOF MS bestätigt. Aus den übrigen 79 Spektren (zunächst visuell nach Kultur als *S. mutans* eingeordnet) konnten 68 als *S. mutans* und 11 Spektren der Arten *S. sanguinis* (4

Stämme), *S. sobrinus* (6 Stämme) und *S. anginosus* (1 Stamm) identifiziert werden. Diese korrigierte Zuordnung wurde molekulargenetisch wiederum durch Sanger - Sequenzierung bestätigt.

Gemische der Taxa *S. mutans*, *S. sanguinis* und *S. oralis*, bei denen ein weiteres Bakterium über 10 Prozent vorlag, wurden sicher erkannt. Somit kann zusammenfassend ausgeführt werden, dass mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie ein schnelles Verfahren zur Identifikation von Bakterien vorliegt, mit dem Bakterien-Isolate auf Artebene korrekt identifiziert werden können. Außerdem stellt die MALDI-TOF MS eine bedingt geeignete Methode zur Identifizierung von Bakteriengemischen dar.

Ein Vorteil der Methode liegt in den geringen Mengen von nur ca. 10^4 bis 10^6 Bakterien, die von einer gewachsenen Kolonie bzw. von einem Bakteriengemisch zur Identifizierung der Taxa benötigt werden. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass die Ergebnisse sehr zeitnah vorliegen. Im Vergleich hierzu benötigen biochemische Testverfahren Zeiten für die biochemischen Reaktionen von sechs bis zwölf Stunden.

Durch die MALDI-TOF MS ist es möglich, sowohl bekannte als auch völlig neue Isolate und Gemische zu erkennen. Wie bei den klinischen Isolaten in der vorliegenden Studie gezeigt, kann MALDI-TOF MS die Klassifikation durch Selektivkultivierung unterstützen. Ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass es für die Identifizierung von Bakterien mit MALDI-TOF MS günstiger ist, Peakmassenlisten anstelle exklusiver Peaks zu nutzen.

1.2 Abstract

Oral streptococci play a significant role in the development of dental caries. In this process the germ called *Streptococcus mutans* acts as a key pathogen and fits as an appropriate model germ. Despite the use of molecular genetic methods, an infallible identification of single clinical isolates is a complex endeavor due to the genetic relationship and similar culturing conditions of oral streptococci. Mixtures of phylogenetically closely related types can only be identified by sequencing. Culture techniques bear a certain risk by cross infections of closely related types. The present thesis' goal was to detect the caries-associated germ *S. mutans* in bacteria mixtures and to analyze these as to their proportional compositions. Twenty seven binary and 13 ternary artificial mixtures were prepared from reference strains of the *S. mutans* (DSM 20523), the *Streptococcus sanguinis* (DSM 20567) and the *Streptococcus oralis* (DSM 20627), and were analyzed via MALDI-TOF MS. Based on reference strains of the species *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis*, *S. macacae*, *S. rattii*, *S. pneumoniae*, *S. criceti*, *S. ferus*, *S. downei*, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. parasanguinis*, *S. constellatus*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. mitis* und *S. intermedius*, a database was created by using time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

539 wild-type isolates of the taxon *S. mutans*, previously classified via selective culturing and species-specific polymerase chain reaction, were included in the strain collection. Mass peak lists were made in order to evaluate the peptide spectra, using hierarchical cluster analyses.

Given a share of at least 10 % within the bacteria mixtures, solid qualitative evidence could be found for all three types included in the study. A quantitative analysis was only possible in the case of mixtures of equal portions of the three types.

Amongst the 539 isolates that had been classified as *S. mutans* via microbiological methods, 460 classifications already existed by another study and were confirmed via MALDI-TOF-MS. From the further 79 spectra (first visual classified after growing as *S. mutans*) 68 could be identified as *S. mutans*, 11 spectra were identified as *S. sanguinis* (4 strains), *S. sobrinus* (6 strains) and *S. anginosus* (1 strain). This reclassification was confirmed molecular genetically by Sanger sequencing.

Mixtures of the taxa *S. mutans*, *S. sanguinis* und *S. oralis* containing more than 10 percent of another bacterium can be identified with certainty. Thus, in summary it can be concluded that the MALDI-TOF mass spectrometry serves as a quick tool for the identification of bacteria at the type level (nearly all bacterial isolates were accurately recognized) as well as - with certain restrictions - of bacterial mixtures. The advantages become most evident with the small

quantities of about 10^4 to 10^6 cultures that are required of bacterial mixtures or grown colonies for identification of the taxa, and in the short time that is needed for preservation of the results.

The MALDI-TOF MS allows the identification and classification of both established and all new isolates and mixtures. As seen in the clinical isolates, it does prevent the risk of a misinterpretation through exclusive selective culturing. The next result of this promotion is that it is better to use full peak mass lists than exclusive peaks to identify bacteria.

2. Einleitung

2.1 MALDI-TOF Massenspektrometrie für die Identifizierung oraler Mikroorganismen

Arbeitsprinzip:

Die Abkürzung MALDI-TOF steht für die Kombination aus einer Matrix-unterstützten Laser-desorptions/Ionisations-(MALDI)-Ionenquelle und einem „Time-of-Flight“ (TOF) Flugzeit-analysator (Hillenkamp 1991). MALDI-TOF MS ist eine diskontinuierliche Methode, bei der die Desorption der Ionen jeweils als Folge von einzelnen Laserblitzen erfolgt, d.h. die Abfolge der Ionenerzeugung, Beschleunigung und Trennung wird in kurzen Zeitabständen wiederholt. Aufgrund des gepulsten MALDI-Ionisationsverfahrens lässt sich dieses besonders vorteilhaft mit dem ebenfalls diskontinuierlichen Betriebsmodus des TOF-Analysators koppeln. Die weiteren Vorteile der MALDI-TOF-MS-Methode liegen u.a. in einem prinzipiell unbegrenzten Massenbereich, z.B. Polystyrol 1.500 kDa (Schriemer 1996). Die MALDI-TOF MS ist eine Methode, die der Ionisierung von Molekülen ohne starke Fragmentation dient. Außerhalb des Massenspektrometers wird bei der MALDI-Probenpräparation die Analyt-Matrix-Mischung auf den mobilen MALDI-Probenträger aufgebracht und durch Vakuumschleusen in die Ionenquelle eingebracht. Durch den Laserpuls erfolgt sowohl der Start der Flugzeitmessung als auch der Beschuss des Analyt-Matrix-Kristalls in der Ionenquelle. In diesem Desorptions/Ionisationsprozess werden durch die bei der Laserwellenlänge absorbierende Matrix gasförmige Analytionen erzeugt. Diese werden in einem anliegenden starken elektrischen Feld (10 bis 30 kV) beschleunigt und im TOF-Analysator nach der Flugzeit getrennt.

Nach der unten angegebenen Gleichung (Cotter 1992) haben die Molekülionen nach Durchlaufen des Spannungsgefälles die gleiche, definierte kinetische Energie:

$$E_{\text{kin}} = U \cdot z = 1/2 \cdot m \cdot v^2$$

E_{kin} = kinetische Energie
 U = Beschleunigungsspannung
 z = Elementarladung
 m = Ionenmasse
 v = Ionengeschwindigkeit

Die gleiche kinetische Energie der Molekülonen führt in der Flugstrecke des TOF MS zu unterschiedlichen Flugzeiten t in Abhängigkeit vom m/z . Nach definierter Flugstrecke L treffen die Ionen auf den Detektor. Die Aufnahme des Detektorsignals nach der Flugzeit ergibt zunächst das TOF-Massenspektrum in Abhängigkeit von der Zeit, welches sich dann in eine m/z -Abszisse umrechnen lässt.

Durch Substitution von $v = L/t$ in oben genannte Gleichung und Umformung für m/z ergibt sich:

$$m/z = 2 \cdot U / L^2$$

L = definierte Länge der Flugstrecke

t = Flugzeit des Molekülonen

Die Registrierung der Analytionen kann im Linear- oder im Reflektordetektor erfolgen (Cotter 1992).

Das Datensystem liefert die Massenspektren. Die Massenspektrometrie dient der Ermittlung der absoluten Masse geladener Moleküle und Molekülfragmente. Hierbei gibt es verschiedene Verfahren, die sich zum einen hinsichtlich der Ionisierungs- und Fragmentierungsmethoden und zum anderen hinsichtlich der Fragmentanalyse unterscheiden (Lottspeich und Zorbas, 1998a).

Das allgemeine Arbeitsprinzip der Flugzeit-Massenspektrometrie „*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*“ (MALDI-TOF MS) besteht aus der Überführung einer neutralen Spezies in Ionenform, der Trennung der Ionen nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) und dem Nachweis der Ionen durch einen Detektor. Hierbei besitzen im Unterschied zur MALDI MS alle Ionen beim Eintritt in den Analysator die gleiche Energie. Bei der Post-Source Decay MALDI-TOF Fragmentierungsmethode z.B. wird die Aktivierungsenergie lediglich durch eine Änderung der Laserleistung geregelt und lässt damit nur einen geringfügigen Einfluss auf den Fragmentierungsmechanismus zu. Bei der „Collision-Induced Dissociation“ (CID)-Fragmentierungsmethode beruht die Fragmentierung dagegen auf Stößen mit einem nach der Beschleunigungszone eingelassenen, regelbaren Stoßgas (Trimpin 2002).

Das zu analysierende Material wird mit einer organischen Säure vermengt, die die konzentrierte Matrix (in unserem Fall Zimtsäure) darstellt (Zimtsäure: Bakteriensuspension im Verhältnis 1:1) und auf dem Target getrocknet. Das Target ist in unserem Fall ein Stahl-Probenträger, auf welchem nach Verdunstung des Lösemittels eine teilkristalline Schicht ent-

steht, in der die Polymermoleküle im Idealfall durch Matrixmoleküle vollständig voneinander separiert sind.

Durch die Kombination der Probe mit einer Matrix wurde erstmals die Untersuchung größerer intakter Biomoleküle wie Nukleinsäuren und Proteine ermöglicht (Hillenkamp et al. 1991). Proteine, die etwa die Hälfte des Trockengewichtes der Zelle ausmachen, können ohne Extraktion zur Typisierung von Bakterien verwendet werden (Fenselau und Demirev 2001).

Das Gemisch von Analyt und Matrix wird mit einem gepulsten Laser (1-200 ns) beschossen. Bei diesem Vorgang werden Protonen aus der Matrix auf den Analyten übertragen (s. Abb. 1).

Es erfolgt die Absorption von Laserenergie durch die Matrix. Somit bildet die Fähigkeit einer organischen Matrix, Energie zu absorbieren die Grundlage der MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Alle MALDI-TOF MS Geräte arbeiten unter Verwendung eines Vakuums, was dazu führt, dass sich die Ionen nicht berühren, da dies zu einem Zerfall der Ionen bzw. einer Änderung ihrer Flugrichtung führen würde. Danach werden die entstandenen Ionen entsprechend ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) in einem Analysator aufgetrennt. Die meisten Ionen sind einfach geladen, aber es treten auch mehrfach geladene Ionen auf. Das bedeutet, dass ein doppelt geladenes Ion mit der Masse $m=2000$ bei m/z 1000 wiedergefunden wird. In einem elektrischen Feld werden die Ionen dann beschleunigt und fliegen durch einen Raum, in dem keine Feldstärken mehr vorherrschen. Die gleiche kinetische Energie der Ionen ist die Voraussetzung dafür, dass sie sich nach ihrem unterschiedlichen Verhältnis von m/z und ihrer dadurch vorhandenen Geschwindigkeit auftrennen. Die Ionen treffen am Ende der Röhre auf eine Detektorvorrichtung, welche die Ionenpakete wahrnimmt. Das Masse/Ladungsverhältnis wird dann aus der Differenz der gleichen Startzeit und der unterschiedlichen Ankunftszeit am Detektor berechnet. Die Darstellung erfolgt im Diagramm (s. Abb. 1) als m/z – Verhältnis, aufgetragen gegen die Intensität (Guilhaus 1995).

Es zeigte sich, dass mit Hilfe der MALDI-TOF MS qualitativ unterschiedliche Massenspektren von verschiedenen Bakterien erzeugt werden können (Arnold und Reilly 1998, Nilsson 1999). Die Methode eignet sich sowohl dazu, intakte Bakterienzellen (Welham et al. 1998, Fenselau und Demirev 2001) als auch Bakterienlysate (Wang et al. 1998) zu analysieren. Anhalt und Fenselau konnten zeigen, dass die in Peptid-Massenspektren enthaltenen Peakmassen unterschiedlicher Bakterien für die jeweilige Bakterienart charakteristisch sind (Anhalt und Fenselau 1975). Hierauf basiert auch die Methode zur Differenzierung von Bakteriengemischen, die eine Identifizierung einzelner Bakterien anhand ihrer Massenpeaks ermöglicht

(Wahl et al. 2002). Die MALDI-TOF Massenspektrometrie bietet darüber hinaus die Möglichkeit, Bakterienarten schnell bis hin zur Subspezies zu phänotypbasieren, außerdem kann eine Analyse von Mutationen und Resistenzen erfolgen (Raoult et al. 2004). Es ist möglich, sowohl Bakterienlysate als auch Peptidspektren ganzer Zellen und Mikroorganismen zu untersuchen (Marvin et al. 2003). Des Weiteren können in Kombination mit der PCR Einzelbasenpolymorphismen einfach aufgeklärt (Tost und Gut 2005) oder DNA-Sequenzierungen vorgenommen werden (Kaetzke und Eschrich 2002).

Für die Identifizierung und Typisierung von Mikroorganismen lassen sich bei der MALDI-TOF MS zwei Ansätze unterscheiden: Zum einen ist es möglich, spezifische Biomarker nachzuweisen (Allmaier et al. 1995, Madonna et al. 2003), zum anderen können komplette Spektren ganzer Zellen durch „intact-cell“ (MALDI-TOF MS (ICM)) gewonnen werden (Evason 2000, Edwards-Jones 2000), bei der die Identität der einzelnen Massenpeaks nicht bekannt ist. Die Signale repräsentieren abundante Moleküle wie Proteine und Peptide. So können einzelne Massenpeaks ribosomalen Proteinen zugeordnet werden (Ryzhov und Fenselau 2001). Entsprechend unterscheidet man für die Auswertung der Massenspektren zwei verschiedene Methoden. Bei der ersten wird das gesamte Spektrum der Peakmassen analysiert (Bright et al. 2002). Bei der zweiten hingegen werden nur charakteristische Peakmassen bewertet (Arnold und Reilly 1998, Hathout et al. 1999, Jarman et al. 2000, Smole et al. 2002). Die Klassifikation von Bakterien wurde auf Artebene (Jarman et al. 2000), Gattungsebene (Holland et al. 1996) und auch auf Stammebene (Nilsson 1999, Shah et al. 2002) beschrieben.

In unterschiedlichen Arbeiten nutzte man Massenpeakmuster sowie die Interpretation ganzer Spektren im Sinne eines „Fingerabdrucks“ zur Differenzierung von Bakterien sowohl auf Art- als auch auf Stammebene (Arnold und Reilly 1998, Shah et al. 2002, Welham et al. 1998, Wang et al. 1998, Nilsson 1999, Jarman et al. 2000, Fenselau und Demirev 2001, Rupf et al. 2006). So vermochten Krishnamurthy und Ross (1996) anhand charakteristischer Peakmassen zwischen virulenten und nichtvirulenten Stämmen von *Bacillus melitensis* zu unterscheiden. Mit Hilfe dieser Methode wurden des Weiteren 25 verschiedene Stämme der Bakterienart *Escherichia coli* differenziert und von anderen Enterobakterien abgegrenzt (Conway et al. 2001).

MALDI-TOF MS wird zurzeit in vielen Bereichen der medizinischen Diagnostik mit unterschiedlichen Ansätzen genutzt und hat hier auf Grund der schonenden Ionisierung, die auch eine Analyse großer intakter Moleküle ermöglicht, große Bedeutung erlangt (Hillenkamp und Karas 1988). Einer Arbeitsgruppe (Moussaoui et al. 2010) gelang es, 193 von 213 gram-

negative Bakterien (91,1 %) und 284 von 319 gram-positiven Bakterien (89,0 %) korrekt auf Spezies-Ebene zu identifizieren. Dies gelang direkt aus Blutzellen. Sieben Isolate wurden fälschlicherweise als *S. pneumoniae* identifiziert.

Risch et al. (2010) identifizierten 204 klinische Isolate aus Urin, Speichel und Blut. Hierzu nutzten sie zum einen die MALDI-TOF MS und zum anderen konventionelle Methoden (VITEK II und API). Zweiundsiebzig der 204 Isolate waren gram-positiv und 130 gram-negativ, außerdem waren 2 Candida-Arten vertreten. Bei 27 Isolaten (13,2 %) gab es eine Abweichung zwischen der Spezies und Artzuordnung. 61 von 72 der gram positiven Bakterien wurden durch beide Methoden korrekt identifiziert (85 %) und 115/130 (88 %) der gram negativen Bakterien. Das bedeutet eine Sensivität von 86,8 %. Diese Angaben werden durch andere Studien verifiziert: So gab es 84,1 % Übereinstimmungen beim Vergleich konventioneller Methoden mit der MALDI-TOF MS bei Seng et al. (2010). Cherkaoui et al. (2010) identifizierten 99,1 % korrekt und Bizzini et al. (2010) führen 93 % in ihrer Studie an.

Wahl und Mitarbeitern (2002) gelang es, einzelne Bakterienarten aus künstlich hergestellten Bakteriengemischen zu identifizieren. An diese Arbeit knüpft die vorliegende Dissertation an. Die Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF MS findet heute auch Anwendung in der oralen Mikrobiologie. So konnte beispielsweise eine Regulation von Stressproteinen für *S. mutans* (Wilkins et al. 2002, Len et al. 2004) gezeigt werden. Außerdem wurden Unterschiede zwischen Peptidmustern planktonischer und adhärenter Zellen für *S. mutans* nachgewiesen (Svensater et al. 2001, Welin et al. 2004), das P1-Epitop charakterisiert (Rhodin et al. 2004) und eine alterierte Proteinexpression für *S. oralis* bei saurem pH-Wert (Wilkins et al. 2001 und 2003) gezeigt. Darüber hinaus wurden Untersuchungen zur strukturabhängigen Aktivität von Mutacin II (Novak et al. 1996, Chen et al. 1998) sowie Mutacin 1140 (Hillman et al. 1998) durchgeführt. Zusammenfassend ist aus den obigen Studien zu entnehmen, dass sich sowohl die herkömmlichen Methoden, als auch die MALDI-TOF MS als geeignete Verfahren zur Identifikation von Bakterien erweisen. Der große Vorteil der MALDI-TOF MS liegt sicherlich in der Zeitersparnis, Kosteneinsparung (s. Tabelle 1) und letztendlich auch in der sichereren Beurteilung, ob es sich um ein Gemisch, ein bekanntes oder ein völlig neues Isolat handelt.

In Abbildung 1 ist das Funktionsprinzip der Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie grafisch dargestellt.

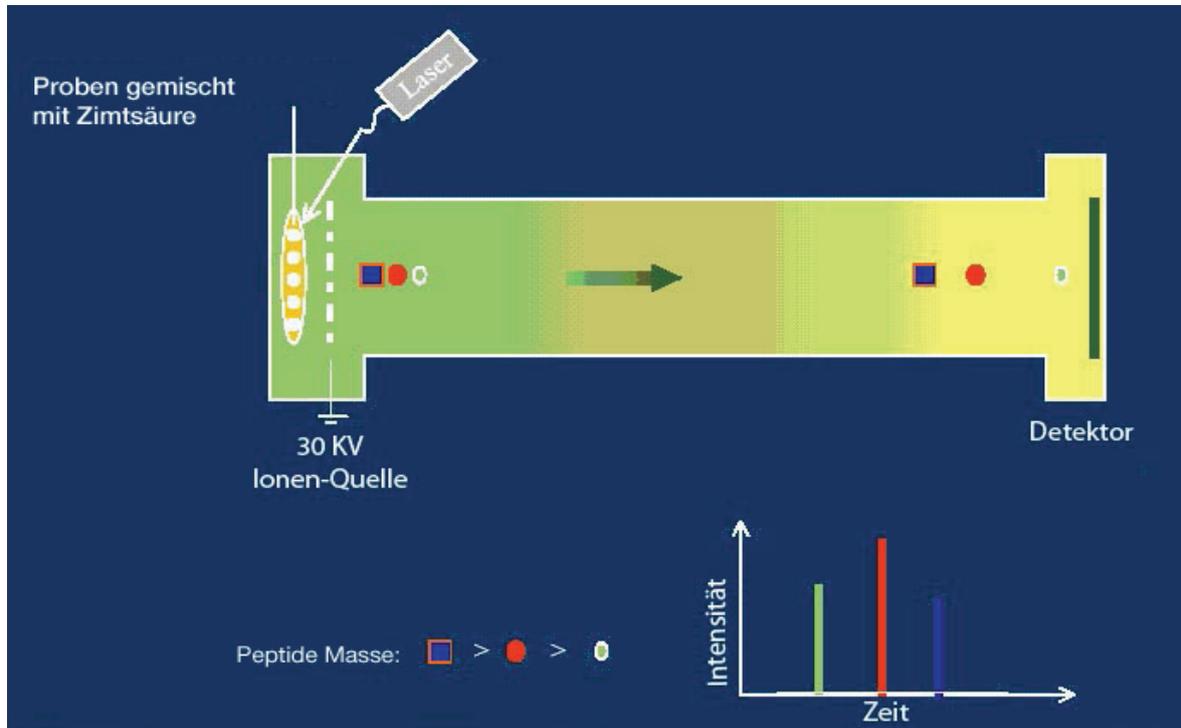


Abbildung 1: Grafische Darstellung des Funktionsprinzips der Matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie (hier dargestellt mit Zimtsäure als Matrix).

2.2 Probleme bei der Identifikation oraler Bakterien

Die mikrobiologische Analyse der oralen Mikroflora stellt auf Grund der hohen Dichte der Besiedlung, der verschiedenen Habitate in der Mundhöhle und der Organisation von Biofilmen ein komplexes Feld dar (Davey und O'Toole 2000).

Das Untersuchungsgut wie Plaque oder Speichel können quantitativ und qualitativ stark differieren, wie Rupf (2006) anmerkte, und eine Kultivierung im Labor stellt sich allein schon durch die komplexen Nährstoffansprüche vieler Bakterien als schwierig dar (Marsh 2003).

Bakterien korrekt zu identifizieren ist außerdem bei einigen Bakteriengruppen als problematisch anzusehen. Diese Problematik tritt sowohl bei der phänotypischen Einordnung von Actinomyzeten aufgrund ihrer phänotypischen Variabilität (Slack and Gerencser 1975, Ruby et al. 2002) als auch bei Laktobazillen auf, welche ähnliche Phänotypen in der Kultur zeigen, so dass es schwer ist, sie mit mikrobiologischen Methoden zu differenzieren (Karoly et al. 2012). Weitere Probleme ergeben sich durch die Ähnlichkeit mancher Bakterien, wie *S. mutans* und *S. sobrinus*, die ebenfalls schwierig zu differenzieren sind.

Die Fortschritte in der mikrobiologischen Klassifikation von oralen Bakterien führten hierbei nicht nur zu einer Erleichterung der Identifikation neuer Arten. Auf Grund der komplexen Problematik der Taxonomie finden heute numerische und phylogenetische Parameter gleichermaßen Berücksichtigung, was durch neu hinzugekommene Arten und die weitere Differenzierung einzelner Stämme zu Neuerungen in der bislang bestehenden Nomenklatur führte. Die Interpretation von Ergebnissen älterer Studien stellt somit eine ernstzunehmende Herausforderung dar (Holt 1984, Baron 1996, Kilian 2001, Siqueira 2003).

Grundsätzlich ist die bakterielle Taxonomie nur bedingt mit der höherer Organismen vergleichbar, da Bakterien zu den Prokaryoten zählen und sich durch Teilung vermehren. Dank der Einführung von DNA-Sequenzierungstechniken (Fox et al. 1977) ist eine auf dem ubiquitär vorhandenen Gen der 16S rRNA phylogenetisch basierte Klassifikation der Mikroorganismen möglich, die gesamte bakterielle DNA selbst ist aber keine eindeutig zu erfassende Einheit. Beim Einsatz von DNA-Sequenzierungstechniken werden Fragmente einer DNA-Sequenz erstellt, die dann meist mit einer Gelelektrophorese getrennt und durch Fluoreszenz identifiziert werden. Zusätzlich zur chromosomalen DNA werden aber immer auch extrachromosomale Strukturen wie Plasmide oder Erbinformationen von Bakteriophagen aufgefunden.

Zur möglichst genauen Genotypisierung muss eine vollständige Analyse des gesamten Genoms erfolgen. Solche Genomsequenzen stehen aber erst für wenige Referenzstämme zur Verfügung (Ajdic et al. 2002, Duncan 2003, Nelson et al. 2003, Chen et al. 2004, 2005). Un-

terschiedliche Studien gehen davon aus, dass bis zu 25 % der Streptokokken falsch oder inkorrekt identifiziert wurden (Gorm Jensen et al. 1999 und Kikuchi et al. 1995). Diese mikrobiologischen Fehlklassifikationen treten wegen genetischer Polymorphismen innerhalb der Stämme (Beighton et al. 1991) und wegen Inkonsistenzen innerhalb biochemischer Merkmale desselben Stammes auf (Tardif et al. 1989).

Das gleichzeitige Auftreten nahe verwandter Stämme bei der Kultivierung sowie die damit verbundene mögliche Bildung einer Mischkultur erschweren die spätere Trennung zusätzlich. Dies zeigt die Problematik der korrekten Identifizierung nahe verwandter Arten und der damit verbundenen Selektivität und Sensitivität einzelner Testverfahren. Des Weiteren stellen falsch eingeordnete Stämme selbst, sowie neu klassifizierte Stämme, Fehlerquellen dar (Rupf et al. 2005). Erst kürzlich wurde in der Arbeitsgruppe um Zbinden et al. (2012) mit *Streptococcus tigurinus* ein neuer Vertreter der Mitis-Gruppe gefunden. Genau hier kann die Maldi-TOF MS eingesetzt werden, um Inkorrektheiten zu detektieren (Rupf et al. 2005, 2008), eventuell neue Arten zu detektieren oder andere Verfahren wie die Sequenzierung bei der taxonomischen Einordnung unbekannter Isolate zu unterstützen. Bei Vorliegen von Bakteriengemischen versagt jedoch häufig selbst die Sequenzierung und liefert im besten Falle Hinweise auf das Vorliegen eines Gemischs.

2.3 Orale mikrobielle Gemeinschaften

Der menschliche Körper stellt einen günstigen Lebensraum für Mikroorganismen dar. So wird ein Erwachsener von ca. 10^{14} Bakterien besiedelt, was dem Zehnfachen der körpereigenen Zellen (10^{13}) entspricht (Henderson und Wilson 1998).

Der oropharyngeale Trakt bietet durch sein feuchtes und gleichwarmes Milieu optimale Bedingungen zur Vermehrung von Bakterien. Aus diesem Grund stellt sich die bakterielle Besiedlung hier dichter dar als auf den äußeren Hautoberflächen. In der Mundhöhle finden sich mehr Bakterien als im Respirationstrakt und dem oberen Verdauungstrakt (Davis 1996). Die orale Mikroflora besteht aus einer großen Anzahl unterschiedlicher Taxa, von denen einige in hoher, andere nur in geringer Zahl vorhanden und nicht alle kultivierbar sind. Mehr als 700 Arten wurden bis heute kultiviert (Ekstrand 2012, Rupf 2006, Paster et al. 2006). Diese Vielfalt an Mikroorganismen (Marsh 2003) ergibt sich aus zwei grundsätzlich qualitativ unterschiedlichen Habitaten in der Mundhöhle, die sich in Oberflächenstruktur und Nährstoffangebot voneinander unterscheiden. Zum einen sind dies die sich nicht erneuernden Zahnoberflächen, die aus azellulären Substanzen bestehen und in Glattflächen, Fissuren und Approximalflächen sowie in supra- und subgingivale Zonen eingeteilt werden können. Andererseits existieren in der Mundhöhle epitheliale Oberflächen. Black arbeitete schon zum Ende des 19. Jahrhunderts die Bedeutung der unterschiedlichen Areale der Zahnoberflächen als Kariesprädispositionsstellen heraus, der eine Klassifikation der Kavitäten folgte (Black 1886 und 1914). Die oralen Epithelien hingegen finden sich an Lippen, Wangen- und Gaumen- sowie in der Alveolarkammshleimhaut, weiterhin am gingivalen Sulkus, der Zunge und im Rachenbereich. Sie verfügen über eine hohe Erneuerungsrate (Schröder 2000). Auf ihrer Oberfläche befinden sich endständige Neuroaminsäuremoleküle, die als Wirtsrezeptoren mit Adhäsinen von einigen Bakterien reagieren können (Marsh et al. 2003, Rupf 2006).

Die physiologische Kolonisation eines Menschen mit Mikroorganismen beginnt mit der Geburt. Zu diesem Zeitpunkt werden die meisten Bakterien von der Mutter übertragen, später erfolgt eine Aufnahme weiterer Bakterien auch aus der weiteren Umwelt. Die so entstehende Bakterienflora, die interindividuell starke Varianzen aufweist, bildet sich in den ersten Lebenswochen heraus (Hahn 2009). Physiologische Veränderungen ergeben sich dann noch einmal durch den Zahndurchbruch und später den Zahnwechsel in der Kindheit (Brailsford et al. 2005). Neben den dominierenden Bakterien lassen sich auch Pilze und Protozoen in der Normalflora nachweisen, des Weiteren können Infektionen durch Viren oder andere Erregergruppen erfolgen (Monjardino 1996, Porter 2003, Gorski und Weber-Dabrowska 2005).

Neben den physiologisch vorhandenen Habitaten oraler Mikroorganismen können endodontische, implantologische, prothetische oder kieferorthopädische Eingriffe zur Entstehung neuer Mikrobiotope führen (van Winkelhoff et al. 2000). Aber auch ein höheres Lebensalter wirkt sich auf die Mundflora aus. So steigt beispielsweise das Krebsrisiko mit zunehmendem Alter an. Eine Zytostatikatherapie bewirkt dann eine Veränderung der oralen Flora durch Zunahme von *Candida albicans* und nichtoralen opportunistischen Keimen wie Enterobakterien. Aber auch andere Medikamente, die vermehrt von älteren Patienten eingenommen werden, können das Gleichgewicht der Normalflora stören, indem sie den Speichelfluss reduzieren. Darüber hinaus kann durch das Tragen von Prothesen die Besiedlung des Mundes mit *C. albicans* gefördert werden (Marsh 2003).

Die physiologisch hohe Bakteriendichte in der Mundhöhle bietet einen gewissen natürlichen Schutz vor der Etablierung pathogener Keime durch die Konkurrenz um zur Verfügung stehende Nährstoffe und Bindungsstellen (Marsh 2004). Die Substratkonkurrenz führt hierbei zu einer Wachstumseinschränkung der zumeist anaeroben Pathogene. Des Weiteren bestimmen bakterielle Interaktionen die Zusammensetzung der oralen Flora entscheidend mit. So können Stoffwechselprodukte der Bakterien einer Spezies Nährstoffe für andere Spezies darstellen (Costerton et al. 1995). Darüber hinaus existieren aber auch antagonistische Effekte der Metabolithemmung innerhalb unterschiedlicher Bakteriengruppen durch die Abgabe von Abfallprodukten, die toxisch auf andere Bakterien wirken. Davon abzugrenzen ist die aktive Produktion toxischer Substanzen, um den Lebensraum vor anderen Bakterienstämmen zu schützen (Hahn 2009, Kolenbrander et al. 1985, Marsh 1989, Raskin et al. 1996, Grönroos et al. 1998).

Eine wichtige Funktion der physiologischen Bakterienflora ist die Stimulation der Entwicklung des Immunsystems, wobei es sich um einen fortlaufenden Prozess handelt (Robbins et al. 1996). Eine Verschiebung vom physiologischen Zustand, der „mikrobiellen Homöostase“ (Marsh 2003), zum opportunistisch pathogenen Zustand, erfolgt dann, wenn die spezifische und unspezifische mechanische und immunologische Kontrolle des menschlichen Organismus herabgesetzt ist. Des Weiteren herrschen pathogene Zustände immer dann, wenn die Bakterien der Normalflora Zugriff auf physiologisch gering- oder unbesiedelte Gewebe wie Dentin, die Zahnpulpa oder parodontale und periradikuläre Strukturen nehmen (Davis 1996, Sbordone und Bortolaia 2003, Tronstad und Sunde 2003, Sundqvist und Figdor 2003). Dentin und Pulpa sind beim gesunden Menschen durch den Zahnschmelz vor einem solchen Zugriff geschützt. Der Schmelz ist eine Substanz ektodermalen Ursprungs, die die Schutzfunktionen von Epithelien übernimmt. Sind diese gesunden Verhältnisse aber gestört und der Zahnschmelz durch-

brochen, so sind die sterilen Gewebe ungeschützt und Bakterien der Normalflora können zunächst in die Dentinstrukturen eindringen (Adriaens et al. 1988), das Pulpenkavum erreichen und dieses infizieren (Tronstad und Sunde 2003). Parodontale Strukturen sind in physiologischen Verhältnissen durch die hemidesmosomale Anlagerung des Sulkusepithels an den Zahn geschützt. Wird dieser Schutz im gingivalen Sulkus zerstört, entstehen gingivale und parodontale Taschen, die wiederum neue Habitate für Mikroorganismen bilden, die als pathologisch einzustufen sind (Page und Schroeder 1982, Listgarten 1986, Schenkein et al. 1999).

Der Erhalt des Gleichgewichts der oralen Mikroflora erfolgt in erster Linie durch chemo-mechanische Maßnahmen, also das tägliche Zähneputzen in Verbindung mit chemisch unterstützenden, antimikrobiellen Zahnpasten und Spüllösungen. Diese Zahnreinigung ist essentiell um die orale Gesundheit zu erhalten, da die wirtseigenen immunologischen und funktionellen Abwehrmechanismen allein nicht genügen, um die Bildung eines mikrobiellen Biofilms auf den Zahnflächen zu unterbinden. Hinzu kommt, dass neben dem Effekt der Säuberung der Zähne die kompetitiven Eigenschaften der Bakterien gegen andere Arten durch das Zähneputzen verstärkt werden (Addy et al. 1986, Page und Kornman 1997, Mombelli und Samaranayake 2004, Foster 2005). Hierbei ist jedoch die eingesetzte Kraft dosiert aufzuwenden, da ein allzu kräftiges Zähneputzen wiederum Zähne und Zahnfleisch zu beschädigen vermag (König 1990, Attin et al. 2004).

In zahlreichen Studien wird das gemeinsame Vorkommen verschiedener oraler Streptokokken mit einer höheren Kariesaktivität assoziiert: hierbei handelt es sich um *S. mutans* und *S. sobrinus* (de Soet 1995). Sie sind anhand ihrer Koloniemorphologie und ihrer biochemischen Eigenschaften nur schwer voneinander zu differenzieren. *S. mutans* und *S. sobrinus* sind häufig in der Mundhöhle vergesellschaftet. Dabei zählen die Mutans-Streptokokken zu den kariessinitierenden Mikroorganismen (Marsh und Martin 2003). Hier haften sie sowohl an der Plaque, auf Schmelzoberflächen als auch an kariösem Dentin. Bakterien bilden 70 Prozent des Gesamtvolumens der ausgereiften Zahnplaque. Sie sind in eine Plaquematrix eingebettet (Hellwig et al. 1999). In dieser bilden sie einen Verbund mit vielen Wechselwirkungen, mit denen sie sich untereinander beeinflussen. Die Plaquematrix wird durch die Speichelzusammensetzung, andere Mikroorganismen und die Ernährung beeinflusst. In mehreren Studien wird das gemeinsame Vorhandensein mehrerer Bakterienarten in Abhängigkeit vom Kariestadium proklamiert. Dies betrifft je nach Studie Mutans- (Marsh und Martin 2003) oder Non-Mutans-Streptokokken und Veillonellen (Becker et al. 2002, Aas et al. 2008).

Die mikrobielle Dynamik macht es notwendig, schnelle und sichere Verfahren zur Identifizierung von Bakteriengemischen zu etablieren, um sowohl diese in verschiedenen Kariesstadien untersuchen zu können, als auch die Rolle eines jeden im Krankheitsprozess zu ermitteln. Man kann zwischen 30 und 300 Bakterienarten aus Plaqueproben kultivieren (Sissons 1997). Mittels Pyrosequencing wurden zwischen 73 und 120 Genera gefunden (Balda-Ferre et al. 2012).

2.4 Kariesinitiation und *Streptococcus mutans*

Es wird heutzutage davon ausgegangen, dass Karies eine multifaktorielle Erkrankung ist. Zu Beginn der systematischen Erforschung der Kariesentstehung postulierte man, dass Karies durch die 3 Faktoren Wirt, Substrat und Mikroorganismen beeinflusst wird (Keyes und Jordan 1963). Diese Trias ist dann im Laufe der Jahre um den Parameter Zeit erweitert worden (König 1971).

In den folgenden Jahrzehnten konkurrierten zwei Ansichten zur mikrobiologischen Komponente der Kariesentstehung miteinander: Einerseits propagierte man eine Infektion durch Mutans-Streptokokken oder Laktobazillen (Fitzgerald und Keyes 1960, Loesche 1986) als „spezifische Plaquehypothese“. Andererseits konnte für eine Reihe weiterer Keime der normalen Standortflora, wie *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* oder *Streptococcus salivarius*, ein kariogenes Potenzial nachgewiesen werden. Die daraus abgeleitete Schlussfolgerung, dass alle die Zahnoberflächen kolonisierenden Bakterien mit ihren Stoffwechselprodukten zur Kariesinitiation beitragen können, führte zur Postulierung der „unspezifischen Plaquehypothese“ (Loesche 1986, Kleinberg 2002). Marsh und Martin (2003) kombinierten beide Theorien zur „ökologischen Plaquehypothese“. Diese sieht die Kariesinitiation als die Folge einer Verschiebung im natürlichen Gleichgewicht der Plaqueflora, hervorgerufen durch Änderungen in den örtlichen Bedingungen. Diese Theorie wird momentan stark kontrovers erörtert und diskutiert, was zur „erweiterten ökologischen Plaquehypothese“ (Takahashi und Nyvad 2008) führte, die weiter unten beschrieben wird.

Da Mutans-Streptokokken in der Mundhöhle in großer Anzahl vorkommen können, gingen und gehen zahlreiche Wissenschaftler davon aus, dass sie ursächlich für die Etablierung der menschlichen Karies verantwortlich sind. Das wird zum einen dadurch begründet, dass *S. mutans* regelmäßig aus kariösen Läsionen isoliert werden kann und hochgradig säurebildend ist (Hamada and Slade 1980, Loesche 1986). Die Eigenschaft von *S. mutans*, wasserunlösliche Glukane bilden zu können, was die Etablierung weiterer Bakterienarten an der Zahnoberfläche erlaubt, sowie die Eigenschaft, im Tierexperiment in Abwesenheit von Saccharose Karies auslösen zu können, sind weitere Indizien für die hohe Kariogenität des Keims (Hamada and Slade 1980).

Andere Studien gehen hingegen davon aus, dass das Verhältnis vom Vorhandensein von *S. mutans* und der Karies nicht absolut ist: Beim massiven Vorhandensein von *S. mutans* an der Zahnoberfläche kommt es demnach oft nicht zu einer kariösen Läsion und auch ohne *S. mutans* kann sich Karies etablieren (Nyvad 1993, Bowden 1997, Aas et al. 2008). In anderen

Untersuchungen wurden Non-Mutans-Streptokokken mit niedrigem pH-Wert und Actinomyzeten für die Kariesinitiation verantwortlich gemacht (van Houte et al 1994, 1996, Sansone et al. 1993), sowie ein breites Spektrum anderer Streptokokken und Veillonellen (Becker et al. 2002, Aas et al. 2008).

Dennoch gibt es viele Belege, dass Mutans-Streptokokken an der Säure- und Plaqueproduktion in der Mundhöhle beteiligt sind. Schon mit Durchbruch des ersten Zahns beginnt die Besiedlung der Mundhöhle mit Mutans-Streptokokken (Berkowitz et al. 1975). Kinder mit kariösen Zähnen weisen eine höhere Anzahl von Mutans-Streptokokken im Speichel auf als Kinder ohne behandlungsbedürftige Zähne (Kneist et al. 1998). Dabei lag im Durchschnitt nach Erreichen der Okklusion im 48. Lebensmonat der prozentuale Anteil infizierter Kinder bei 45 Prozent (Catalanotto et al. 1975, Edwardsson und Mejare 1978, Alaluusua und Renkonen 1983, Roeters et al. 1995). Entscheidenden Einfluss auf die Ansiedlung von *S. mutans* haben die Zahnmorphologie und die Position des Zahnes in der menschlichen Mundhöhle. Es ist ein Anstieg der bakteriellen Zahnbesiedlung von den Approximalflächen unterer Schneidezähne über die Approximalflächen oberer Schneidezähne, die Approximalflächen von Molaren bis zu den Fissuren von Molaren festzustellen (Loesche 1986). *S. mutans* kommt allerdings auch im zahnlosen Kiefer vor und bildet hier mit 50-60 Prozent eine transiente Keimbesiedlung (Wan et al. 2001).

Neben den Zähnen ist der Speichel ein bedeutendes Reservoir der Mutans-Streptokokken. In einem Milliliter Speichel findet man bis zu 10^9 Bakterien (Bowen 1996). Durch den Speichel werden die Bakterien in der gesamten Mundhöhle verteilt. Eine signifikante Verbindung zwischen der Anzahl Mutans-Streptokokken im Speichel und deren Prävalenz an den Zähnen ist ebenfalls beschrieben worden (Duchin und van Houte 1978). Durch Speichelkontakt vollzieht sich auch die erste Übertragung der Bakterien von der Mutter oder dem Vater, beispielsweise durch das gemeinsame Ablecken desselben Löffels. Die Eltern, insbesondere die Mutter, gelten als wichtigster Überträger der Mutans-Streptokokken auf das Kind (Li und Caufield 1995).

In einer *in-vitro*-Studie zum Adhärenzverhalten von *S. mutans* an zahnärztlichen Werkstoffen wurde festgestellt, dass es signifikante Unterschiede bezüglich der Besiedlungsdichte gibt. Hierbei war zum einen entscheidend, ob die Materialien mit oder ohne Speichel untersucht worden sind und zum anderen, um welches Material es sich handelte, hier genannt in der Reihenfolge der aufsteigenden Keimzahl: Titan, Gold, Schmelz, Amalgam, Cerec-Industriekeramik, Acrylat, Komposit, Hydroxylapatit und Aluminiumoxidkeramik. Generell

zeigten die Proben ohne Speichelbedeckung eine höhere Keimbesiedlung (Greiss und Ivanusch 2006).

Mutans-Streptokokken spalten niedermolekulare Kohlenhydrate, z.B. Saccharose, als Dimer aus Fructose und Glucose mit Hilfe des Enzyms Glycosyltransferase und verstoffwechseln den Fructose-Anteil zu Milchsäure ($pK= 3,08$). Sie nutzen ferner den Glucoseanteil zum Aufbau von schwerlöslichem Dextran, in dieser besonders adhärenenten Form auch als Mutan bezeichnet, das einen Hauptbestandteil der Plaquematrix bildet. Die Glycosyltransferase der Mutans-Streptokokken kann man daher auch als die hauptsächliche Säure- und Plaquematrix-Produktionsstätte der Mundhöhle bezeichnen, wobei auch andere Bakterienarten Plaque produzieren (Hannig et al. 2008, Bowen und Koo 2011). König et al. (1971) formulierten drei charakteristische Merkmale für kariesauslösende Bakterien, die im Besonderen für Mutans-Streptokokken gelten: Erstens müssen diese Bakterien niedermolekulare Kohlenhydrate schnell transportieren können, wenn sie in Konkurrenz mit anderen Plaquebakterien stehen. Zweitens sollte eine rasche Umwandlung dieser Kohlenhydrate erfolgen. Beide Fähigkeiten sollten drittens auch unter Extrembedingungen, beispielsweise bei niedrigem pH-Wert, funktionieren. Mutans-Streptokokken sind in der Lage, Saccharose schneller als andere orale Keime zu metabolisieren (Minah und Loesche 1977).

Bei neutralem pH-Wert sind Mutans-Streptokokken und Laktobazillen nur wenig konkurrenzfähig und machen einen geringen Anteil der Plaque aus. Durch häufigen Verzehr fermentierbarer Kohlenhydrate produzieren *S. mitis*, *S. oralis* und *S. sanguinis* Säuren und senken so den pH-Wert in der Plaque ab. Dadurch können sich azidogene und azidurische Keime stärker vermehren. Durch verstärkte Säurebildung dieser Keime kommt es nun zur Demineralisierung der Zahnhartsubstanz mit Defektformation (Marsh und Martin 2003).

Mutans-Streptokokken sind azidogener und azidurer als viele andere orale Bakterien (Hamada und Slade 1980, Loesche 1986), wobei die Vermehrung unter sauren Milieubedingungen nicht eingeschränkt ist, da die für diese Bakterien essentiellen Stoffwechselwege, wie u.a. die Glycolyse, auch hier ablaufen (Takahashi et al. 1997). Streptokokken der Mutansfamilie können Saccharose schneller als andere orale Keime metabolisieren (Minah und Loesche 1977). Hierbei entsteht vor allem Laktat, das eine starke organische Säure ist (Iwami und Yamada 1985). Weitere Pathogenitäts- und Virulenzfaktoren von Mutans-Streptokokken sind die Bildung von Adhärenzfaktoren, die Produktion von Glykosyltransferasen, Mutazinen und intrazellulären Polysacchariden (Kuramitsu 1993). Kritiker formulieren hingegen folgende Punkte, die gegen eine alleinige Kariesinitiation durch *S. mutans* sprechen:

Die ersten Bakterien, die gesäuberte Zähne *in situ* kolonialisieren, sind *S. sanguinis*, *S. oralis* und *S. mitis* (Nyvad und Kilian 1987). Diese drei Spezies stellen zusammen 95 % der Streptokokken und 56 % der totalen initialen bakteriellen Flora (Nyvad und Kilian 1987, Li et al. 2004), während *S. mutans* hingegen lediglich 2 % oder weniger Anteil an der initialen Flora einnimmt (Nyvad und Kilian 1990). Somit gehören die ersten besiedelnden Bakterien der Mitis-Gruppe an. Bei einer etablierten Dentinkaries mit Defektformation nehmen die Mutansbakterien bis zu 30 % ein, wobei hier die Laktobazillen, Prevotellen und Bifidobakterien überwiegen (Aas et al 2008, Becker et al. 2002, Chhour et al. 2005, Munson et al. 2004).

In einer Studie von De Soet und Mitarbeitern von 1995 wurde die Mikroflora von offenen und geschlossenen Dentinläsionen von Kindermolaren im Alter von 8-18 Jahren verglichen. In beiden Gruppen wurden Anteile von *S. mutans*, Laktobazillen, *S. sobrinus* und Aktinomyzeten gefunden. Hierbei war das Verhältnis von *S. mutans* und Laktobazillen ausgeglichen (De Soet et al. 1995).

Die meisten Non-Mutans-Streptokokken verfügen über Adhäsine, mit denen sie sich an die Proteine und die Zuckerketten der erworbenen Pellikelschicht auf Zahnoberflächen anheften können (Gibbons 1989, Kolenbrander 2000). *S. mutans* hingegen haftet nicht effizient an der Pellikel (Nyvad und Kilian 1990b), obwohl das Bakterium ebenfalls Adhäsine bilden kann. Die gebildeten wasserunlöslichen Glucane fungieren als ein Faktor für die Plaquebildung, indem sie die Adhärenz und Kolonisation in der Plaque fördern (Mattos-Graner et al. 2000). Diese extrazelluläre Polysaccharide wie Glucane oder Fruktane können aber von den meisten oralen Streptokokken gebildet werden (Banas und Vickerman 2003, Vocca-Smith et al. 2000). In einer kariösen Läsion haben die Non-Mutans-Streptokokken einen Standortvorteil, da sie Aminozucker verwenden können, welche in der oralen Kavität immer vorhanden sind (Whitley and Beighton 1998).

Diese Argumente ließen die momentan propagierte „erweiterte ökologische Plaquehypothese“ entstehen.

Sie veranschaulicht die Beziehungen und Wechselwirkungen zwischen säuretoleranten und säureproduzierenden Bakterien des Biofilms und die Auswirkungen auf die Mineralbalance der Zahnhartsubstanz, die Zusammensetzung der dentalen Plaque und den Kariesprozess. In dieser Theorie ist die Plaque ein dynamisches mikrobiologisches Ökosystem mit Mutans- und Non-Mutans-Bakterien und Aktinomyzeten, welche die Schlüsselrollen für die Aufrechterhaltung der dynamischen Stabilität bilden (Takahashi und Nyvad 2008).

Die Säurebildung aus Zuckern führt zu einer vorübergehenden Senkung des pH-Wertes, der durch homöostatische Mechanismen in der Plaque schnell wieder in den neutralen Bereich zurückkehrt (Marsh and Martin 1999). Dies passiert in der supragingivalen Plaque mehrere Male am Tag und wird als „dynamisches Stabilitätsstadium“ bezeichnet. Überschreitet nun die Zuckerzufuhr das Maß, in dem der Speichel die Säuren noch neutralisieren kann, so sinkt der pH-Wert ab und ermöglicht den 'low pH'-Non-Mutans-Streptokokken und Aktinomyzeten, Säuren zu produzieren. Das wiederum führt zu einem Mineralverlust des Schmelzes und letztendlich zu einer initialen Läsion (säurebildende Phase/Stadium).

Nach dieser Phase nehmen die säureliebenden Bakterien wie *S. mutans* und Laktobazillen eine zunehmende Rolle ein (säureliebende Phase) und beschleunigen den Kariesprozess (Takahashi und Nyvad 2008).

Die „erweiterte ökologische Karieshypothese“ unterstützt die von Kleinberg (2002) aufgestellte Theorie, dass das Verhältnis zwischen säure- und baseproduzierenden Bakterien das Herz der Kariesaktivität ist.

Die Bakterien bestimmen die Aktivität der Läsion und das äußere klinische Erscheinungsbild (Nyvad und Fejerskov 1997, Nyvad et al. 2003, 2005, Thylstrup et al. 1994).

Diese klinischen Unterschiede wurden klassifiziert (Nyvad et al. 1999, 2003). Liegt bei einem Patienten bei der Untersuchung klinisch ein Defekt ohne stabile Oberfläche vor, entsteht ein Raum, der von ihm nicht mehr gereinigt werden kann. Dieser Zustand erfordert restaurative Maßnahmen (Kidd und Fejerskov 2004).

Die Karies stellt somit eine Zahnhartgewebsemineralisation dar, die durch bakterielle organische Säuren in der Zahnplaque ausgelöst wird. Die bakterielle Vergärung von Mono- und Disacchariden führt vor allem zur Entstehung von Milchsäure. Diese bewirkt einen lokalen Abfall des pH-Wertes an der Zahnoberfläche. Der kritische pH-Wert, bei dem eine Demineralisation des Zahnschmelzes beginnt, liegt zwischen 5,0 und 5,5 (Loesche 1986).

Das klinische Bild der Karies manifestiert sich in mehreren Stadien. Silverstone (1973) zeigte die Entwicklung einer initialen Karies über eine Läsion mit makroskopisch intakter Schmelzoberfläche bis zur Defektkaries. Als Folge der Invasion des Dentins kann auch das Pulpenkavum durch Mikroorganismen infiziert werden (Tronstad und Sunde 2003).

Die Entfernung kariöser Zahnhartsubstanz erfolgt entweder mittels rotierender Instrumente oder durch Handexkavatoren. Weitere Verfahren, wie der Einsatz von Lasern (Matsumoto et al. 2002) und Ozon (Baysan 2000, Rickard et al. 2004), stellen zusätzliche Ansätze dar. Bei der mechanischen Kariesexkavation können zur Unterstützung chemische Substanzen wie N-Monochloro-DL2-Aminobutyrat (NMAB) (Goldman und Kronman 1976) oder eine Kombi-

nation der Aminosäuren Lysin, Leucin und Glutamin mit Natriumhypochlorit (Carisolv) (Ericson et al. 1999) eingesetzt werden. Das Prinzip der chemomechanischen Kariesentfernung beruht auf dem selektiven Anlösen kariösen Dentins durch Auflösung und Spaltung des durch bakterielle Proteolyse denaturierten Kollagens (Hannig 1999). Es konnte nachgewiesen werden, dass durch chemomechanische Kariesexkavation ein vergleichbarer Erfolg bei der Entfernung kariösen Dentins wie durch Einsatz rotierender Instrumente erzielt wird (Lager et al. 2003).

Insbesondere durch individuelle Betreuung, kombiniert mit gruppenprophylaktischen Maßnahmen, ist die Krankheitsvermeidung durch Vorsorge möglich (Hellwig et al. 1999). Der Einfluss begünstigender Faktoren soll so vermindert, initiale Läsionen möglichst früh erkannt und einer Remineralisation zugeführt werden. Hierbei ist besonders die Applikation von Fluoriden für die Reduktion der Karies verantwortlich (Klein et al. 1985, Kalsbeek und Verrips 1990, Belfrán-Aguilar et al. 2000). Fluoride lagern sich in den Schmelz ein und machen ihn widerstandsfähiger gegenüber säurebedingten Demineralisationsvorgängen. Zusätzlich unterstützen Fluoride die Remineralisation (ten Cate 1990), üben einen hemmenden Effekt auf einige kariesassoziierte Bakterien aus und reduzieren so die Säureproduktion der Bakterien (Marquis 1990).

Es existieren allerdings auch einige wirtspezifische Schutzmaßnahmen gegen die Bakterien, wie zum Beispiel die Produktion von sekretorischem Immunglobulin A. Dieses verhindert das Anheften der Bakterien an die Zähne, aktiviert gleichzeitig die antibakteriellen Faktoren und macht die bakteriellen Enzyme unwirksam. So besitzt der Speichel aufgrund von Immunglobulinen, Lysozymen, Peroxidasen, Laktoferrinen und anionischen Proteinen antibakterielle Aktivität (Bowen 1996, Tenovuo 1998). Weitere Schutzfunktionen, die durch den Speichel wahrgenommen werden, sind die Reinigungsfunktion der Mundhöhle, Gleitwirkung, Säurepufferung und Verdauung von Stärke (Whelton 1996).

2.5 Klassifikation und Identifizierung der Mutans-Streptokokken

Klassifikation

Die Klassifikation, Nomenklatur und Identifizierung von Mikroorganismen wird als *Taxonomie* bezeichnet. Sie hat die Aufgabe, Bakterien hinsichtlich ihrer Ähnlichkeiten und Verwandtschaftsverhältnisse anzuordnen und führt zur Schaffung international anerkannter Taxa. Die Benennung oder *Nomenklatur* der Bakterien, die die Klassifikation widerspiegelt, wird von einem internationalen Komitee geregelt (Marsh 2003). Erste Klassifikationssysteme wurden mit einfachen und später komplexeren Lichtmikroskopen, später mit Elektronenmikroskopen und durch Kultivierung auf unterschiedlichen Medien erarbeitet.

Während ältere Klassifikationssysteme lediglich hinsichtlich morphologischer und einfacher physiologischer Kriterien, wie der Form der Zelle und dem Vergärungsspektrum einfacher Zucker erfolgten, das genetische Material aber weitgehend unberücksichtigt blieb, beruhen modernere Klassifizierungsschemata hauptsächlich auf chemischen Analysen der Zelle (Chemotaxonomie) und auf der Bestimmung genetischer Verwandtschaftsverhältnisse zwischen einzelnen Stämmen (Marsh 2003). Auf diese Weise konnten bis heute mehr als 700 verschiedene Bakterienarten in der Mundhöhle identifiziert werden. *Streptococcus mutans* gehört nach der allgemeinen biologischen Klassifikation zum *Reich* der Bakterien und hier aufgrund der gram-positiven Zellwandstruktur zum *Stamm* der Firmicutes, des Weiteren zur *Klasse* der kokkoiden Bacilli und auf Grund des wichtigsten Stoffwechselendproduktes der Kohlenhydratfermentierung -der Milchsäure- zur *Ordnung* der Lactobacillales. *Streptococcus mutans* ist weiterhin der *Familie* der Streptococcaceae zuzuordnen sowie der *Gattung* der Streptokokken, die den größten Anteil der oralen Mikroflora ausmachen, und hierbei der *Art mutans* (Ekstrand et al. 2012). Eine *Art*, *Spezies* oder *Taxon* stellt eine Kollektion von Stämmen dar, die gemeinsame Eigenschaften aufweisen und sich wesentlich von anderen Stämmen unterscheiden. Hierbei wird, sobald eine Art als anerkannt gilt, ein Stamm in Reinkultur als Typ- oder Referenzstamm dargestellt, der als Namensgeber und konstantes Beispiel seiner Art gilt (Holt 1984, Marsh 2003). Innerhalb einer Art können verschiedene Stammgruppen gebildet werden. Diejenigen, die sich durch eine bestimmte Eigenschaft auszeichnen, werden als *Biotypen* oder *Biovare* bezeichnet. Stammgruppen mit bestimmten Antigenzusammensetzungen bezeichnet man als *Serotypen* oder *Serovare* (Marsh 2003).

Zuerst in der Literatur beschrieben wurde *S. mutans* von Clarke (1924). Hier wurde der Keim, der als Namensgeber für die Gruppe fungiert, aus kariösen Läsionen isoliert. Die Klassifikation zur *Art* „mutans“ verdankt er seiner Fähigkeit, sich bei sich änderndem (sinkenden) pH-

Wert in seiner Form anzupassen. Dabei wandelt er sich von der Kokkenform in eine lanzettartige Stäbchenform um (Clarke 1924). Schon in den frühen 70er Jahren gab es verschiedene Ansätze um orale Streptokokken weiter einzuteilen. Diese reichten von der makroskopischen Betrachtung bis hin zur Mikroskopie. Ein weiterer Ansatz war die Untersuchung der Hemmung des Wachstums anderer Bakterien über Bakteriozine (Kelstrup et al. 1970). Hierbei handelt es sich um antimikrobielle Substanzen, die von den Bakterien selbst gebildet werden. Ein Stamm wird danach charakterisiert, wie stark er einen Indikatorkeim im Wachstum hemmt und selbst durch andere Keime gehemmt wird (Kolenbrander et al. 1985, Marsh 1989, Raskin et al. 1996, Grönroos et al. 1998). Mutans-Streptokokken sind unabhängig von der Kariesprävalenz in fast allen Individuen einer Population zu finden (Carlsson 1989). Die Mutans Gruppe enthält als weitere 6 Vertreter *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus criceti*, *Streptococcus rattii*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus macacae* und *Streptococcus ferus* (Coykendall 1989). Auch Kawamura und Mitarbeiter (1995) untersuchten die Verwandtschaftsverhältnisse der Gattung Streptokokkus und unterteilten diese in sechs Gruppen (Abbildung 2).

Aufgrund ihres Kohlenhydrat-Antigens teilte man die Mutans- Gruppe in acht Serotypen (a-h) ein (Beighton et al. 1981, Perch et al. 1974). Ein Serotyp k wurde zusätzlich beschrieben (Nakano et al. 2004). Die ursprüngliche Form von *S. mutans* umfasst allerdings nur die Serotypen c, e und f, während die Serotypen d und g *S. sobrinus* genannt werden. Diese Unterscheidung ist insofern wichtig, da manche Serotypen in der Lage sind, aus Saccharose mehr Säure herzustellen als *S. mutans* (Ekstrand et al. 2012).

Allen oralen Streptokokken ist gemeinsam, dass es sich um Katalase-negative, gram-positive Kokken handelt, die Leucinaminopeptidase-positive, Pyrrolidonylarylamidase-negative Nachweisreaktionen zeigen und nicht in 6,5 % NaCl-Bouillon wachsen (Facklam 2002). Mutans-Streptokokken sind fakultative Anaerobier und lassen sich bei einer Temperatur von 37 °C kultivieren (Ma und Marquis 1997). Die Zellen haben einen Durchmesser von 0,5-0,75 µm. *S. mutans* Zellen bilden Paare oder kapsellose Ketten und gehen in Flüssigmedien und auf einzelnen Festmedien, wenn ein saurer pH-Wert vorliegt, in eine 1,5-3,0 µm lange Stäbchenform über.

S. sobrinus hat einen Durchmesser von 0,5 µm und erscheint ebenfalls paarweise oder in Kettenform. *S. rattii*, *S. ferus* und *S. criceti* liegen entweder paarweise oder in Kettenform vor (Hardie 1986).

Für die Primärkultur von *S. mutans* wird am häufigsten MSB-Agar (Mitis-Salivarius-Bacitracin) verwendet (Gold et al. 1973), welcher für die anderen Streptokokken in der Mundhöhle ein Selektivmedium ist. Der Zusatz von Bacitracin verhindert hierbei das Wachstum der Begleitflora und anderer oraler Streptokokken. Auf MSB-Agar wächst *S. mutans* als maulbeerförmige Kolonie in die Tiefe des Agars (Siehe Abbildung 3: Kolonien 1-4).

Die Eigenschaft, Karies im Tierexperiment auszulösen, lässt sich für *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. ratti* und *S. criceti* belegen. *S. ferus* konnte bisher nicht mit der Entstehung von Karies in Verbindung gebracht werden (Whiley und Beighton 1998). Des Weiteren können Mutans-Streptokokken beispielsweise durch unterschiedliche Wachstumseigenschaften, unterschiedliche Enzymmuster, morphologische Kriterien auf Selektiv- und Nichtselektivmedien und Fermentation verschiedener Zucker weiter differenziert werden (Bratthall und Köhler 1976, Whiley und Beighton 1998). In der Literatur bereits beschrieben ist die Kultivierung von Streptokokken auf Trypticase-Hefeextract-Cystin-Saccharose-Bacitracin (TYCSB) -Agar (van Palenstein Helder et al. 1983). Hiernach weisen *S. mutans* und *S. sobrinus* unterschiedliche Wachstumsmuster auf. *S. mutans* kommt in drei unterschiedlichen Serotypen (c, e und f) vor, wobei der Serotyp c in Plaque und Speichel des Menschen dominiert (Loesche 1986). In der Zahnmedizin sind verschiedene Verfahren bekannt, um die Mutans-Streptokokken zu identifizieren und zugleich quantitativ zu erfassen. Ein häufig praktiziertes Verfahren bilden hier zum Beispiel „chair-side“-Tests. Hierzu zählt sowohl der Dentocult SM® Strip Mutans-Test (Jensen und Bratthall 1989) als auch der CRT® bacteria-Test (Laurisch 1997). Diese Medien sind allerdings nur teilweise spezifisch und werden dazu genutzt, das Kariesrisiko zu bestimmen.

Überblick über die Bakterienfamilien

Innerhalb der Gruppe der oralen Streptokokken lassen sich die Mutans-Streptokokken von der Anginosus-, der Mitis- und der Salivarius-Gruppe abgrenzen (Whiley und Beighton 1998). Eine Klassifizierung, die auf phänotypischen Merkmalen beruht, beschreibt noch eine zusätzliche *S. sanguinis* - Gruppe, welche sich aus der *Mitis* - Gruppe ausgliedert (Facklam 2002). Die sechs weiteren Vertreter der Mutans-Gruppe sind in Abb. 2 dargestellt: *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus criceti*, *Streptococcus rattii*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus macacae* und *Streptococcus ferus* (Coykendall 1989).

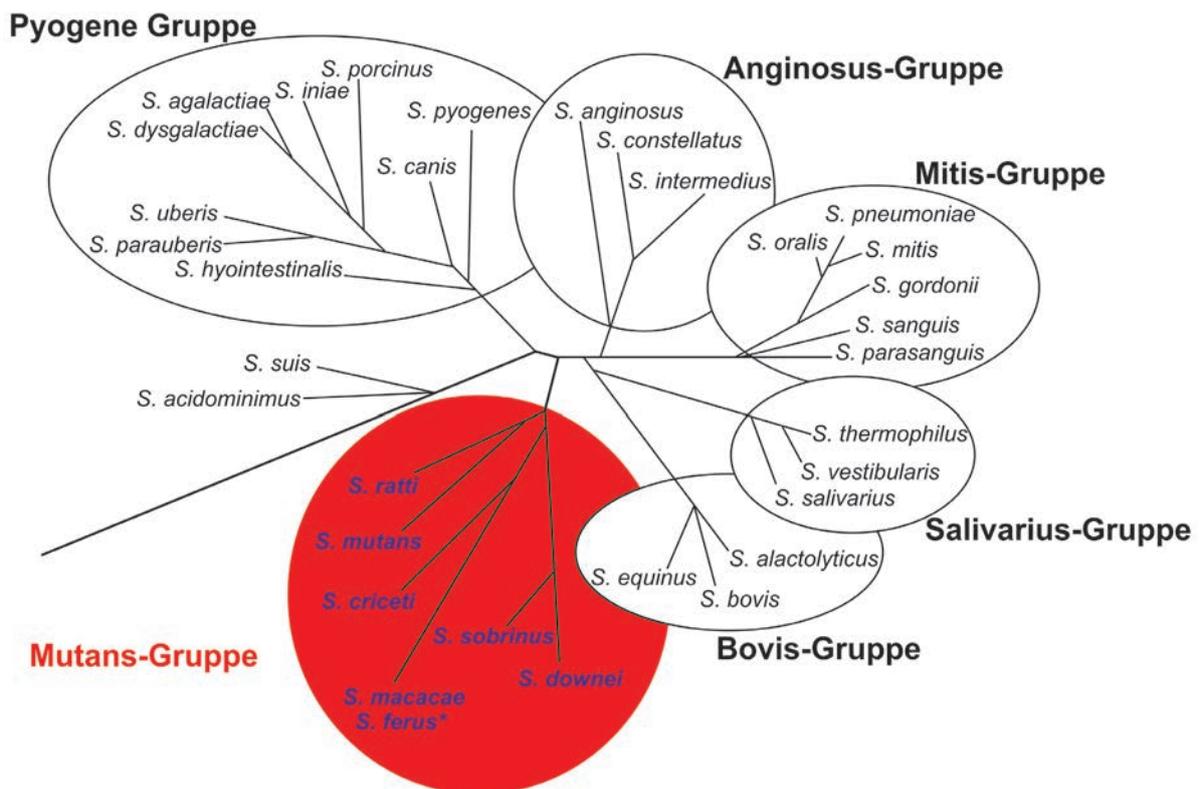


Abbildung 2: Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Streptokokken (modifiziert nach Kawamura et al. 1995). Mutans-Streptokokken sind rot hervorgehoben. * *S. ferus* ordnet sich nach heutigem Kenntnisstand in die Mutans-Gruppe ein und wurde nachträglich eingefügt. * *S. tigurius* ordnet sich in die Mitis-Gruppe ein (Zbinden et al. 2012).

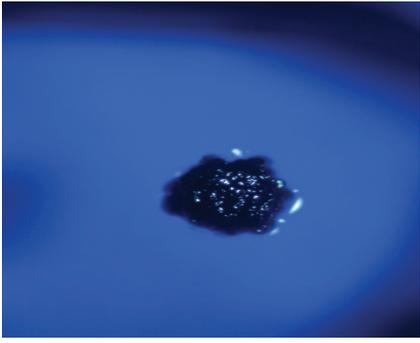
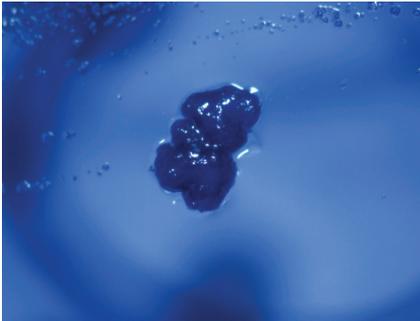
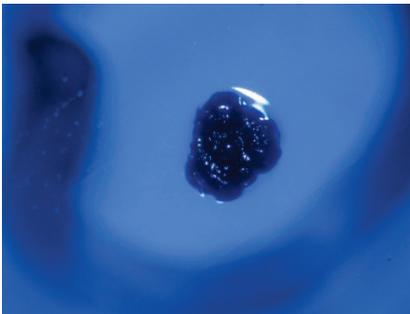
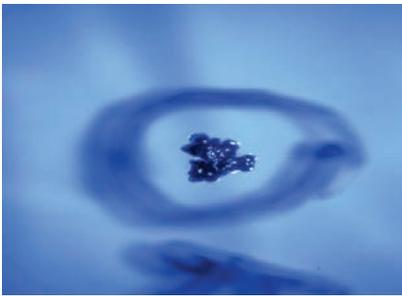
| Bakterienkulturen auf Agar | |
|---|--|
|  | <p>Kolonie 1</p> <p>Auf MSB-Agar wächst <i>S. mutans</i> als maulbeerförmige Kolonie in die Tiefe des Agars.</p> |
|  | <p>Kolonie 2</p> |
|  | <p>Kolonie 3</p> |
|  | <p>Kolonie 4</p> |

Abbildung 3: Beispiele von mikroskopischen Aufnahmen von *S. mutans*- Bakterienkolonien auf MSB-Agar.

Identifizierung

Es existieren verschiedene Möglichkeiten, Mutans-Streptokokken nachzuweisen und zu typisieren. Man unterscheidet hier zwischen Verfahren, die entweder auf phänotypischen oder genotypischen Charakteristika der Bakterien basieren.

In dieser Arbeit wurde eine phänotypische Nachweismethode untersucht, wobei die Klassifikation auf Basis der Genotypisierung stattfand (16S Gen).

Hierbei lag der Hauptschwerpunkt der mikrobiologischen Forschung lange Zeit auf den phänotypischen Unterschieden der Mikroorganismen wie der mikroskopischen Darstellung, Koloniemorphologie auf speziellen Kulturmedien sowie physiologischen, biochemischen und serologischen Unterschieden (Busse et al. 1996). Die Merkmale werden als gleichwertig angesehen und sind anhand der numerischen Taxonomie quantitativ darstellbar. Hierdurch lässt sich ein künstliches System berechnen, welches die Ähnlichkeiten der beschriebenen Bakteriengruppen darstellt (Holt 1984, Bowden und Hamilton 1986).

Seit den 70er Jahren sind Analysen der DNA und RNA von Mikroorganismen anhand erster DNA-Sequenzierungstechniken möglich, die auf eine bakterielle Evolution hindeuten (Fox et al. 1977, Olson et al. 1986). Phylogenetisch basierende Untersuchungen geben Aufschluss über die Genomgröße, den GC-Gehalt, das Reassoziationsverhalten der DNA unter optimalen und nicht optimalen Umständen und die thermische Stabilität des DNA-Doppelstrangs (Baron 1996). Völlige Übereinstimmungen der Erbinformationen wären nur bei den Zellen von Mikroorganismen einer Kolonie zu erwarten (Rupf 2006).

Eine Typisierung mittels monoklonaler Antikörper kann sowohl qualitativ als auch quantitativ erfolgen. Hierbei werden serologische Techniken angewandt, die einen Vergleich der Antigenprofile auf der Zelloberfläche ermöglichen. Ebenso können verschiedene Gene, wie das Dextranase-Gen, verwendet werden, um die DNA nachzuweisen (Ida et al. 1998, 1999). Zu den ersten DNA-basierten Verfahren, mit denen *S. mutans* Stämme auf der Artebene differenziert wurden, gehört die Plasmidanalyse (Caufield et al. 1982). Es sind sowohl monoklonale Antikörper für *S. mutans* als auch für *S. sobrinus* vorhanden (de Soet et al. 1990, Gu et al. 2002). Dennoch lässt sich eine schnellere und einfachere Identifikation von *S. mutans* und *S. sobrinus* durch die spezifische Polymerasekettenreaktionen (PCR) erreichen (Rupf et al. 1999, 2001). Darüber hinaus existieren noch weitere Möglichkeiten für die Typisierung von Bakterien. Beispielsweise wird die genomische DNA durch verschiedene Restriktionsenzyme (Endonucleasen) verdaut, die die Nukleinsäuren an spezifischen Stellen durchtrennen. Die entstehenden Fragmente liefern einen „chromosomalen Fingerabdruck“ (Restriktionslängenpoly-

morphismen, RFLPs), anhand dessen Bakterien verschiedenen Stämmen zugeordnet werden können. Das Verfahren des Ribotypings liefert einfachere Muster als die RFLP-Analyse, indem die Restriktionsfragmente auf eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran transferiert und hybridisiert werden (Saarela et al. 1993, Marsh 2003). Weitere Verfahren sind die Restriktionsendonuklease-Analyse (REA) (Caufield und Walker 1989) und die Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) (Jordan and LeBlanc 2002), welche ebenfalls für die Differenzierung von *S. mutans* und anderen Bakterien eingesetzt werden können.

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) handelt es sich um eine Technik zur gezielten *in vitro*-Amplifizierung von spezifischen DNA-Abschnitten, die von zwei bekannten Sequenzen flankiert werden (Mullis und Faloona 1987, Saiki et al. 1985). Die interessierenden DNA-Abschnitte können hierbei exponentiell vervielfältigt werden, selbst wenn nur wenige Kopien der DNA zur Verfügung stehen.

Anhand von „Fingerprinttechniken“, wie der „arbitrarily primed“ (AP) -PCR oder „repetitive extragenic palindromic“ (REP)-PCR, können Übertragungswege untersucht werden. Diese beiden Techniken basieren auf der Polymerasekettenreaktion und können ebenfalls zur Typisierung herangezogen werden. Die „arbitrarily primed“-PCR wurde u.a. von Williams und Mitarbeitern (1990) sowie Welsh und McClelland (1990) beschrieben. Hierbei kommt es bei einer niedrigen Annealingtemperatur zur Bindung einer oder mehrerer kurzer Primer (9-10 Basenpaare) an die Ziel-DNA. Im Anschluss erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der erhaltenen Fragmente. Anwendung fand die AP-PCR unter anderem für die Typisierung von Mutans-Streptokokken (Saarela et al. 1996, Li und Caufield 1998, Grönroos und Alaluusua 2000) und der *Streptococcus mitis*-Gruppe (Rudney und Larson 1999), sowie für die Untersuchung von Übertragungswegen von *S. mutans* von der Mutter auf das Kind (Li et al. 2000).

In der Arbeit von Shklair und Keene (1974) wurden die Mutans-Streptokokken u.a. nach ihren Fermentationseigenschaften in fünf Biotypen (a-e) eingeteilt. Ein weiteres Kriterium war das Bacteriozinmuster und die Argininhydrolyse. Rupf et al. (2001) identifizierten mittels Gaschromatographie 425 Isolate von Mutans-Streptokokken und verglichen sie mit anderen Möglichkeiten der Identifikation. Dabei wird die Verteilung der kurzkettigen Fettsäuren in Bakterienzellen qualitativ und quantitativ bestimmt und aus dem Verteilungsmuster ein artspezifisches Profil erstellt. Basierend auf den Sequenzunterschieden zwischen den einzelnen Arten war die Entwicklung bakterieller Stammbäume möglich.

In Tabelle 1 sind einige Verfahren zur Geno- und Phänotypisierung von Bakterien dargestellt (nach Wichelhaus et al. 2000):

Tabelle 1: Verfahren zur Geno- und Phänotypisierung von Bakterien (modifiziert nach Wichelhaus et al. 2000).

| Methode | Anteil typisierbarer Stämme | Reproduzierbarkeit | Diskriminierungspotential | Vorteile | Nachteile |
|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|--|--|
| Genotypisierende Verfahren | | | | | |
| Antibiotika-Resistenz-Profil | alle | mäßig bis gut | gut | <ul style="list-style-type: none"> • einfache Durchführung • schnell • preiswert | <ul style="list-style-type: none"> • schwierige Interpretation |
| Plasmid-Analyse | variabel | gut | mäßig | <ul style="list-style-type: none"> • einfache Durchführung • preiswert | <ul style="list-style-type: none"> • Plasmide sind instabile genet. Elemente |
| Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) | alle | gut | exzellent | <ul style="list-style-type: none"> • relativ einfache Interpretation | <ul style="list-style-type: none"> • aufwendige Durchführung • relativ kostenintensive App. notwendig |
| RAPD | alle | mäßig | gut bis exzellent | <ul style="list-style-type: none"> • schnell • preiswert | <ul style="list-style-type: none"> • relativ schwierige Interpretation • viele Variablen beeinflussen die Reproduzierbarkeit |
| REP-PCR | alle | gut | gut | <ul style="list-style-type: none"> • schnell • preiswert | <ul style="list-style-type: none"> • relativ schwierige Interpretation |
| Ribotypisierung | alle | gut | gut | <ul style="list-style-type: none"> • relativ einfache Interpretation | <ul style="list-style-type: none"> • aufwendige Durchführung |
| Sequenzierung | alle | gut | exzellent | <ul style="list-style-type: none"> • relativ einfache Interpretation | <ul style="list-style-type: none"> • heutige Standardmethode |
| Phänotypisierende Verfahren | | | | | |
| Antibiotika-Resistenzprofil | alle | gut | gering | <ul style="list-style-type: none"> • leichte Interpretation • standardisiertes Verfahren • einfache Durchführung • preiswert | <ul style="list-style-type: none"> • geringe Diskriminierung |
| Biotypisierung | alle | mäßig | gering | <ul style="list-style-type: none"> • preiswert • kommerzielle | <ul style="list-style-type: none"> • geringe Diskriminierung |

| | | | | Systeme | |
|---------------------------------|-------------|---------------|---------------|--|--|
| Lysotypie | variabel | gut bis mäßig | gut bis mäßig | <ul style="list-style-type: none"> • standardisiertes Verfahren | <ul style="list-style-type: none"> • aufwendige Durchführung • Referenzlaboratorien vorbehalten • Interpretation häufig schwierig |
| Maldi-TOF-MS | alle | gut | mäßig | <ul style="list-style-type: none"> • relativ einfache Durchführung • einfache Interpretation • schnell | <ul style="list-style-type: none"> • kostenintensive App. • z.Zt. fehlende Standardisierung • Kultivierung ist nötig (Breitung 2007) |
| Multilocus-Enzym-Elektrophorese | alle | gut | gut | <ul style="list-style-type: none"> • einfache Interpretation | <ul style="list-style-type: none"> • kaum angewandte Methode • relativ aufwendige Durchführung |
| Serotypisierung | variabel | gut | mäßig | <ul style="list-style-type: none"> • relativ einfache Durchführung | <ul style="list-style-type: none"> • geringe Diskriminierung |

2.6 Ziele der Arbeit, Fragestellung

Eine sichere Identifizierung einzelner Isolate oraler Streptokokken stellt für die mikrobiologische Forschung aufgrund der genetischen Verwandtschaft einzelner Stämme und ähnlicher Kultivierungsbedingungen eine Herausforderung dar. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, basierend auf Vorarbeiten (Dissertation Breitung 2007, Rupf et al. 2006), die eine Klassifizierung von *S. mutans* mittels MALDI-TOF MS zum Gegenstand hatten, zu überprüfen, ob eine Detektion des Keimes in Bakteriengemischen mittels dieses Verfahrens möglich ist.

Es sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Ist eine Identifizierung und Quantifizierung des Keimes *S. mutans* mittels MALDI-TOF MS aus artifiziellen Bakteriengemischen möglich?
2. Besteht durch die Anwendung von MALDI-TOF MS für die Identifizierung der Art *S. mutans* aus klinischen Isolaten Verbesserungspotenzial in Ergänzung zur Verwendung bisher existierender molekulargenetischer Methoden?

3 Material und Methoden

3.1. Material

Geräte

Im Folgenden sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

Table 2: Übersicht der verwendeten Geräte

| MALDI-TOF MS | |
|-----------------------------|------------------------------|
| Autoflex Massenspektrometer | Bruker Daltonik GmbH, Bremen |
| 384 Target Plate, Edelstahl | Bruker Daltonik GmbH, Bremen |

| PCR-Geräte | |
|-------------------------|---------------------------|
| GeneAmp PCR System 9600 | Applied Biosystems, U.S.A |
| Touchgene Gradient | Techne, Cambridge, UK |

| | |
|---|-----------------------------------|
| Reinstwasseranlage Seralpur Delta UV/UF | Seral, München |
| Spektrofotometer 931 | Kontron Instruments, Watford, UK |
| Sterilwerkbank Antair BSK | Medizin & Labortechnik, Magdeburg |
| Stromversorgungsgerät 1000/ | Biorad GmbH, München |
| Thermomixer 5436 | Eppendorf, Hamburg |
| Ultraschallbad Sonorex RK 100H | Bandelin, Berlin |
| UV-Box CleanCab | Herolab GmbH, Wiesloch |
| Vortex-Mischer VF2 | IKA-Labortechnik, Dresden |

| Waagen | |
|---------------------|------------------------------|
| Laborwaage PB1502 | Mettler Toledo GmbH, Giessen |
| Analysenwaage AJ100 | Mettler Toledo GmbH, Giessen |

| Zentrifugen | |
|-----------------------------|---------------------|
| Tischzentrifuge Mikro 12-24 | Hettich, Tuttlingen |

Chemikalien

Eine Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Pufferlösungen und Matrixsubstanzen ist in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Chemikalien

| | |
|--|--------------------------------------|
| α -Cyano-4-hydroxymizsäure (HCCA) | Bruker Daltonik GmbH, Bremen |
| Aceton | Mallinckrodt Baker, Griesheim |
| Acetonitril (ACN)100% | Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg |
| SeaKem LE Agarose | FMC, Rockland, USA |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Roth, Karlsruhe |
| Methanol | Roth, Karlsruhe |
| Trifluoressigsäure (TFA)5% | Mallinckrodt Baker, Griesheim |
| NaEDTA | Boehringer, Mannheim |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |

| | |
|--------------------------------|-----------------------|
| Enzyme | |
| bio-Taq DNA-Polymerase | Biomaster GmbH, Köln |
| Recombinant Taq DNA-Polymerase | Takara Bio INC, Japan |
| DNA-Längenstandards | |

| | |
|---------------|--|
| Wasser | |
| Für die HPLC | Aldrich, Steinheim |
| Reinstwasser | Kombination der Systeme Seradest Vario |

Bakterienstämme

Die 26 verwendeten Referenzstämme von Mutans- und oralen Streptokokken werden in Tabelle 4 aufgeführt:

Tabelle 4: Referenzstämme von Mutans- und oralen Streptokokken

| Taxa | Stämme |
|---------------------------------|---|
| <i>Streptococcus mutans</i> | NCTC 10449, OMZ 125, GS 5, Ingbritt, JB 1600 LM7, SE 11, QP 50-1, OMZ 175, DSM 20523 |
| <i>Streptococcus sobrinus</i> | OMZ 65, OMZ 176, V 100 |
| <i>Streptococcus criceti</i> | OMZ 61 |
| <i>Streptococcus rattii</i> | FA I3, OMZ 51, LB 28, AHT7, E 493 |
| <i>Streptococcus mitis</i> | OMZ 84 |
| <i>Streptococcus sanguinis</i> | OMZ 9S2, DSM 20567 |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | OMZ 474 |
| <i>Streptococcus oralis</i> | NS 96, NS 306, DSM 20627 |

3.2. Methoden

MALDI-TOF MS

Als Massenspektrometer wurde in der vorliegenden Arbeit ein *Autoflex* der Firma Bruker Daltonik, Bremen, eingesetzt. Als Matrix wurde HCCA verwendet, da die homogenere Kristallstruktur zu reproduzierbareren Ergebnissen führt, als bei der Verwendung anderer Matrixsubstanzen wie Sinapin- und Ferulasäure zu erwarten sind (Breitung 2007).

Die externe Kalibrierung des MALDI-TOF-Massenspektrometers erfolgte mit einem Peptidstandard (Firma Sigma, Taufkirchen) mit bekanntem Molekulargewicht, indem die gemessenen Flugzeiten den bekannten m/z -Verhältnissen zugeordnet werden konnten. Die Genauigkeit der Massenbestimmung des Analyten unter Verwendung des Peptidstandards betrug 0,01 bis 0,1 %.

Der Messbereich lag zwischen 2.000 Da und 20.000 Da für die Erstellung der Datenbank. Jedes Spektrum stellte die Summe aus zehn Einzelspektren zu je 400 Laserschüssen, die an verschiedenen Orten des Kristalls aufgenommen wurden, dar und bildete somit das Summenspektrum. Um eine verbesserte Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurde jede Probe mehrmals an verschiedenen Tagen vermessen. Aus diesen subjektiv zehn besten Summenspektren wurde wiederum ein Masterspektrum gebildet, welches dann für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet wurde.

In dieser Arbeit wurde die Touchdown-PCR eingesetzt, die gegenüber der Standard-PCR eine Abwandlung des Thermocycler-Profiles darstellt, um die erhaltenen Ergebnisse der MALDI-TOF -Spezieszuordnung zu verifizieren (Tabelle 5).

Tabelle 5: Sanger-Sequenzierung: Reaktionsansatz

| Reagenz | Volumen | Temperaturprofil | | | |
|---|----------|------------------|--------|-----------|---|
| 10 x PCR-Puffer | 5 µl | 94 °C | 7 min | | |
| MgCl ₂ (50 mM) | 2 µl | 94 °C | 30 sek | 20 Zyklen | T _{anneal} bei jedem Zyklus um 0,5 °C erniedrigt |
| dNTPs (25 mM) | 0,4 µl | 63 °C | 30 sek | | |
| DNA-Polymerase (5 U/µl) | 0,25 µl | 72 °C | 30 sek | | |
| Primer Bio3U18 (100 pmol/µl) | 0,25 µl | 94 °C | 30 sek | 10 Zyklen | T _{anneal} konstant |
| Primer Uni16SRe (100 pmol/µl) | 0,25 µl | 53 °C | 30 sek | | |
| Bakterienstammlösung (10 ⁶ Zellen) | 1-3 µl | 72 °C | 30 sek | | |
| Reinstwasser | ad 50 µl | 72 °C | 10 min | | |

| Reagenz | Volumen | Temperaturprofil | | |
|---|----------|------------------|--------|-----------|
| Big Dye Mix | 3 µl | 94 °C | 5 min | |
| Sequenzierprimer (6 pmol/µl) | 1 µl | 94 °C | 30 sek | 40 Zyklen |
| über Genopure _{ds} gereinigtes PCR-Produkt (100 ng/µl) | 1 µl | | 30 sek | |
| | | 72 °C | 1 min | |
| Reinstwasser | ad 20 µl | 72 °C | 7 min | |

3.3 Bakterien: Herstellung der Bakteriengemische, Reinkulturen und klinischen Isolate und ihre Analyse mittels MALDI-TOF MS

Bakteriengemische

Für die Herstellung von Bakteriengemischen wurden die Bakterien *S. mutans* DSM 20523, *S. sanguinis* DSM 20567 und *S. oralis* DSM 20627 verwendet. Die Bakterien wurden bei der deutschen Stammsammlung bestellt und in BHI Bouillon (Brain-Heart-Infusion) kultiviert (gemäß Tabelle 6). Ihre taxonomische Zuordnung wurde mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. Diese Stämme wurden zum einen ausgewählt, da sie bei der Kariesinitiation von Bedeutung sind und zum anderen um beurteilen zu können, inwieweit es möglich ist, zwischen Bakterienarten innerhalb der Mitisgruppe einerseits und zwischen der Mitis- und Mutansgruppe andererseits unterscheiden zu können (s. Abb.2).

Es erfolgte das zweimalige Waschen mit doppelt destilliertem Wasser, um Verfälschungen der Messergebnisse durch die Bouillon zu vermeiden. Mit Hilfe eines Photometers wurde die optische Dichte der 3 Bakterienstammsuspensionen bestimmt. Vor allem für die Gemische war es notwendig, vorab zu klären, in welcher Konzentration sie am reproduzierbarsten zu messen sind. Dazu wurden verschiedene Konzentrationen der zuvor anhand eines Photometers abgeglichenen optischen Dichte entnommen und mit Hilfe des MALDI-TOF-Massenspektrometers untersucht. Es wurden Aliquote mit je 10, 20, 30, 40, 50 und 100 Mikrolitern aus der Suspension entnommen und vermessen. Weiterhin wurden die Gemische in den prozentual vorgegebenen Anteilen (siehe Tabelle 6) hergestellt. So entstanden 43 Gemische, wobei die ersten drei Reinkulturen darstellen und alle weiteren binäre oder ternäre Gemische sind. Es ergaben sich für die Auswertung insgesamt 129 abzugleichende Ergebnisse, da jeder Ansatz auf das Vorkommen von allen 3 Bakterien analysiert wurde, auch wenn es ursprünglich nur aus einem oder zwei Bakterien bestand.

Tabelle 6: Darstellung der vorbereiteten Proben, angegeben in prozentualer Beteiligung am Gesamtgemisch (Gemisch 1-3 sind Reinkulturen (Bakterium A = DSM 20523 = S. mutans, Bakterium B = DSM 20567 = S. sanguinis und Bakterium C = DSM 20627 = S. oralis); bei Gemisch 4 bis einschließlich Gemisch 22 handelt es sich um binäre, danach ternäre Gemische).

| | Bakterium A | Bakterium B | Bakterium C |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| | DSM 20523 | DSM 20567 | DSM 20627 |
| Gemisch 01 | 100 | 0 | 0 |
| Gemisch 02 | 0 | 100 | 0 |
| Gemisch 03 | 0 | 0 | 100 |
| Gemisch 04 | 50 | 50 | 0 |
| Gemisch 05 | 50 | 0 | 50 |
| Gemisch 06 | 0 | 50 | 50 |
| Gemisch 07 | 0 | 40 | 60 |
| Gemisch 08 | 0 | 30 | 70 |
| Gemisch 09 | 0 | 20 | 80 |
| Gemisch 10 | 0 | 10 | 90 |
| Gemisch 11 | 0 | 60 | 40 |
| Gemisch 12 | 0 | 70 | 30 |
| Gemisch 13 | 0 | 80 | 20 |
| Gemisch 14 | 0 | 90 | 10 |
| Gemisch 15 | 40 | 0 | 60 |
| Gemisch 16 | 30 | 0 | 70 |
| Gemisch 17 | 20 | 0 | 80 |
| Gemisch 18 | 10 | 0 | 90 |
| Gemisch 19 | 40 | 60 | 0 |
| Gemisch 20 | 30 | 70 | 0 |
| Gemisch 21 | 20 | 80 | 0 |
| Gemisch 22 | 10 | 90 | 0 |
| Gemisch 23 | 30 | 30 | 40 |
| Gemisch 24 | 30 | 40 | 30 |
| Gemisch 25 | 40 | 30 | 30 |
| Gemisch 26 | 20 | 40 | 40 |
| Gemisch 27 | 40 | 20 | 40 |

| | Bakterium A | Bakterium B | Bakterium C |
|------------|-------------|-------------|-------------|
| | DSM 20523 | DSM 20567 | DSM 20627 |
| Gemisch 28 | 40 | 40 | 20 |
| Gemisch 29 | 10 | 40 | 50 |
| Gemisch 30 | 10 | 50 | 40 |
| Gemisch 31 | 0 | 95 | 5 |
| Gemisch 32 | 0 | 99 | 1 |
| Gemisch 33 | 95 | 0 | 5 |
| Gemisch 34 | 99 | 0 | 1 |
| Gemisch 35 | 95 | 5 | 0 |
| Gemisch 36 | 99 | 1 | 0 |
| Gemisch 37 | 0 | 5 | 95 |
| Gemisch 38 | 0 | 1 | 99 |
| Gemisch 39 | 5 | 0 | 95 |
| Gemisch 40 | 1 | 0 | 99 |
| Gemisch 41 | 90 | 5 | 5 |
| Gemisch 42 | 5 | 90 | 5 |
| Gemisch 43 | 5 | 5 | 90 |

Untersuchung der Reinkulturen mittels MALDI-TOF

Es wurden 460 Mutans- und orale Streptokokken untersucht, welche aus einer Sammlung von Prof. Dr. S. Rupf stammen. Für die MALDI-TOF MS Untersuchung wurden diese oralen Streptokokken anaerob kultiviert (GasPack, BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, USA, 24 h, 35 °C ± 2 °C in 10 ml Balmelli Bouillon), bei 4000 U/min für 5 min zentrifugiert (Megafuge 1.0, Heraeus-Christ, Osterode) und bei –20 °C bis zur Messung aufbewahrt. Für die Analyse der Bakterienlysate wurden die bei –20 °C gelagerten Proben aufgetaut und zunächst bei Raumtemperatur mit 13.000 U/min 2 Minuten lang zentrifugiert. Nach Bildung des so erhaltenen Zellpellets wurde der Überstand mittels einer sterilen Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt und dieser dann in 2 Stunden in einer Vakuumzentrifuge kondensiert. Dies entsprach einem Volumen von ca. 1 ml. Vor dem Auftragen auf einem Stahltarget wurden die Proben in 20 Mikrolitern 5 % TFA/100 % Acetonitril (Matrixlösung) suspendiert.

Durch mehrmaliges Durchmischen mit einer sterilen Pipette löste sich das Pellet. Es wurden anschließend 3– 10 Spots zu je 1 Mikroliter auf ein Stahltarget kokkristallisiert. Nach dem Trocknen wurde jede Probe mit 10 µl einer 0,1%igen Trifluoressigsäurelösung gewaschen und mittels 1 Mikroliter Zimtmatrix (gesättigte Lösung von 4-HCCA in 5 % TFA/ 100 % Acetonitril) rekristallisiert. Zuvor wurde in Vorversuchen anhand des *S. mutans*- Referenzstammes NCTC 10449 und *S. sobrinus* OMZ 176 der Einfluss unterschiedlich langer Kultivierungszeiten auf die Spektren untersucht. Die Messungen wurden an einem Massenspektrometer Autoflex (Bruker Daltonik, Bremen) durchgeführt.

In Vorversuchen wurde eine optimale Anzahl von Peakmassen zur Identifizierung gesucht. Hierzu wurde die Differenz der „simple matching“-Koeffizienten der identifizierten Art zur nächstmöglichen Art gebildet. Zur Ermittlung der Mindestzahl der zur Identifizierung auf Art-Ebene benötigten Peakmassen wurde basierend auf der Dissertation von Breitung (2007), die Differenz aus Mittelwert und Standardabweichung genutzt. Die Erstellung der Datenbank erfolgte einmal mit 60 Peakmassen und zum anderen mit 100 Peakmassen, um einen Übertrag in bereits bestehende Datenbanken vornehmen zu können.

Klinische Patientenisolat

Von 10 Patienten wurden 79 *S. mutans* aus Speichelproben und kariösem Dentin isoliert. *S. mutans* wurde in dieser Arbeit verwendet, da er u.a. eine wichtige Rolle bei der Kariesinitiation spielt. Das Vorgehen wurde von der Ethikkommission der Universität Leipzig genehmigt (Az. 266/2005). Die Speichelproben wurden nach 1-minütigem Kauen auf Paraffin, die Dentinproben mittels Exkavation mit dem Rosenbohrer gewonnen und anschließend auf einem Selektivmedium (CRT bacteria, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) für 4 Tage bei 37 °C inkubiert. Die Kolonien wurden danach auf MSBT-Agar überführt und anschließend 3 Tage bei 37 °C kultiviert. Nach 3 Tagen Bebrütung wurden Einzelkolonien, sofern als *S. mutans* erkennbar, fotografiert und in 6 ml Balmelli-Bouillon abgeimpft (siehe Abb. 3). Danach erfolgte die Kultivierung der Balmelli-Bouillon für 24 h bei 37 °C.

3.4 Analyse der Peptidmassenspektren

Zur Auswertung der erhaltenen Massenspektren wurde das Programm Flex-Analysis (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) verwendet. Nach Glättung der Basislinie wurde von jedem einzelnen Spektrum eine Peakmassenliste erstellt und eventuell nicht markierte Massenpeaks nachträglich manuell markiert. Als Grundlage aller weiteren Auswertungsroutinen der Referenzstämme diente der Vergleich der erhaltenen Peakmassenlisten. Diese Peaklisten, welche Massen und relative Intensitäten enthalten, wurden als Excel-Dateien exportiert. Um gleiche Peakmassen in einem Set oder Paar von Spektren zu finden, wurde, unter Berücksichtigung der Variabilität der m/z Werte identischer Fragmente in unterschiedlichen Spektren, ein bewegliches Massefenster angelegt. Die Breite des Fensters war abhängig von der Genauigkeit der Erfassung der m/z -Werte und wurde als lineare Beziehung zur m/z -Größe aufgefasst (Fenstergröße = Absolute Breite + Relative Breite * $[m/z]$).

Basierend auf Wiederholungsmessungen von Masterspektren wurden eine absolute Fensterbreite von 6 Da und eine relative Fensterbreite von 0,001 als geeignet angesehen. Alle Peakmassen, welche innerhalb eines Fensters lagen, wurden einbezogen und als ursprünglich von demselben Molekül stammend angesehen. Die damit generierten Peakmassenlisten wurden in Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corp., Redmond, U.S.A.) importiert, nachdem die subjektiv zwei schlechtesten der 12 gemessenen Spektren verworfen worden waren. Die weitere statistische Auswertung der Peakmassenlisten und Bandenmuster erfolgte mit statistischen Algorithmen, basierend auf der Software MatLab R2006b (The MathWorks Inc., Natick, U.S.A.), programmiert von Prof. Dr. W. Schellenberger, Institut für Biochemie, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig.

A: Identifikation und Klassifikation der Referenzstämme und klinischen Isolate

Es wurden im Gegensatz zu den Gemischen die Gesamtlisten mit einer Länge von ca. 60 bzw. 100 Peaks verwendet. Dabei wurden ausschließlich die Peakpositionen berücksichtigt. Die Intensitäten wurden nicht mit in die Analyse einbezogen. Mittels des „simple matching“-Verfahrens wurde eine Distanzmatrix d_{SM} erstellt:

$$d_{SM} = \frac{a + d}{a + b + c + d},$$

wobei a die Anzahl gemeinsamer Peakmassen darstellt, b die Anzahl von singulären Peakmassen des Stammes A und c des Stammes B. Die Größe d stellt die Anzahl von Peakmassen

dar, die in der Gesamtheit der untersuchten Spektren, aber weder in Stamm A oder B, vorkommen. Bei einem paarweisen Vergleich bleibt sie unberücksichtigt.

Die Distanzmatrix wurde mittels „Agglomerative Hierarchical Clustering“- Algorithmen unter Verwendung von „Complete Linkage“ analysiert.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde also das hierarchische Clustering mit agglomerativem Ansatz angewendet. Hierbei wurde eine Struktur von Clustern gebildet, bei der kleinere Cluster in größeren enthalten sind, wobei die kleinsten jeweils nur ein Objekt enthalten. Anhand der agglomerativen Methode wurden ausgehend von allen Daten die ähnlichsten schrittweise zusammengefasst. Zur Klassifikation der Referenzstämme wurden die Peakmassenlisten also paarweise miteinander verglichen.

B: Identifikation und Klassifikation der Gemische

Die Identifikation von Mutans-Streptokokken in Gemischen beruhte auf dem Vergleich spezifischer Peakmassen und nicht gesamter Peakmassenlisten. Hierbei wurden die Bakterienarten *S. mutans*, *S. sanguinis* und *S. oralis* verwendet. Die Peakmassen umfassten hier einen Bereich von 2-13 kDa. Die weitere statistische Auswertung erfolgte wiederum mit statistischen Algorithmen, basierend auf der Software MatLab R2006b (The MathWorks Inc., Natick, U.S.A.).

Bei der Erstellung der Datenbank wurde das Prinzip des hierarchischen Clusters genutzt. Hierzu wurden ganze Spektren verwendet, wobei nach Gemeinsamkeiten innerhalb dieser gesamten Spektren gesucht wurde.

Das Programm zur Identifizierung von Gemischen basiert auf der Annahme, dass die einzelnen Bakterien spezifische Peakmassen enthalten, die in ihrer Intensität im Gemisch variieren.

Hier wird also nach Unterschieden innerhalb der Signaturen gesucht.

Für die Klassifikation der Gemische wurde ein von Tibshirani (2002) entwickeltes Verfahren zur Analyse von DNA-Microarrays verwendet. Im Rahmen dieser „*shrunk centroid*“ - Methode werden zunächst die m/z -Werte für alle Peaks im Datensatz berechnet. Die Klassen-Centroide sind der Mittelwert der Peakintensitäten in den Klassen. Die Standardabweichung der Peak-Intensitäten innerhalb der Klassen wird als ein Maß für die „Qualität“ eines Peaks innerhalb einer Klasse genutzt. Dazu wird die Differenz zwischen den Klassen-Centroiden und dem Gesamt-Centroid durch die „gepoolten“ Standardabweichungen der Peakintensitäten in den Klassen dividiert. Dabei erhalten Peaks mit einer „stabilen“ Intensität in einer Klasse ein besonders großes Gewicht. Anschließend wird die Peakzahl der Centroiden durch

Anwendung eines "threshold"-Wertes verkleinert. Dabei werden aus dem Datensatz Peaks entfernt, die eine große Streuung aufweisen, oder in der Umgebung des Gesamt-Centroids des Datensatzes liegen.

x_{ij} sind die Peak-Intensitäten für die m/z-Werte $i = 1, 2, \dots, p$ der Spektren $j = 1, 2, \dots, n$.

C_k bezeichnet die n_k Spektren der Klasse k ($k=1, 2, \dots, K$).

Dann gilt für das Centroid der Spektren der Klasse k (\bar{x}_{ik})

$$\bar{x}_{ik} = \sum_{j \in C_k} x_{ij} / n_k$$

Für das globale Centroid gilt entsprechend:

$$\bar{x}_i = \sum_{j=1}^n x_{ij} / n$$

Die normalisierten Differenzen der Klassen-Centroide vom globalen Centroid sind

$$d_{ik} = \frac{\bar{x}_{ik} - \bar{x}_i}{m_k \cdot (s_i + s_0)}$$

dabei ist s_0 eine kleine Konstante, s_i die über alle Klassen des Datensatzes gepoolte (globale) Standardabweichung der Peakintensitäten:

$$s_i^2 = \frac{1}{n - K} \sum_k \sum_{j \in C_k} (x_{ij} - \bar{x}_{ik})^2$$

und

$$m_k = \sqrt{1/n_k + 1/n}$$

Für das Centroid der Klasse k erhält man durch Umstellung:

$$\bar{x}_{ik} = \bar{x}_i + m_k (s_i + s_0) d_{ik}$$

Beim „shrinking“ werden die d_{ik} um den Betrag Δ reduziert und Peaks, deren Intensität dabei den Zahlenwert 0 erreicht, aus dem Klassen-Centroid entfernt.

$$d'_{ik} = \text{sign}(d_{ik})(|d_{ik}| - \Delta)_+$$

((x)₊ = x, wenn x > 0 und (x)₊ = 0, wenn x ≤ 0)

Das dargestellte Verfahren liefert „*shrunk centroids*“ und hat zwei wesentliche Vorteile:

- 1) Durch die Entfernung von „noisy“-Peaks wird das Verfahren im Vergleich mit der direkten Nutzung von Spektren oder Klassen-Centroiden robuster.
- 2) Das Verfahren führt implizit zur Detektion von wichtigen Peaks, um die Klassen unterscheiden zu können (feature reduction).

Der Grad der *Feature-Reduktion* kann durch den „*threshold*“- Parameter Δ kontrolliert werden. Ein robustes Verfahren ist die Bestimmung des „*threshold*“ durch Cross-Validierung des Datensatzes und Wahl desjenigen „*threshold*“- Wertes, der die geringste Rate von Fehlklassifikationen bei der Cross-Validierung aufweist.

Durch die Übertragung der „feature-reduction“ auf die Spektren des Datensatzes entsteht ein reduzierter Datensatz, in dem Ähnlichkeitsbeziehungen durch agglomeratives Clustern dargestellt werden.

Für die Klassifikation von Proben wird das Spektrum mit den „shrunk centroids“ verglichen und der Klasse zugeordnet, für die die *Jaccard-Distanz* zu diesen minimal ist.

4. Ergebnisse (Vorversuche, Gemischerkennung, Gemischquantifizierung, klinische Stämme)

4.1 Vorversuche (Reinkulturen)

Die untersuchten Mutans-Streptokokken lieferten charakteristische Massenspektren, so dass reproduzierbare Peakmassen erhalten wurden. Die höchsten Intensitäten der Peakmassen traten hierbei im Massenbereich von 2 bis 11 kDa auf. Die Spektren verschiedener Taxa wiesen sichtbare Unterschiede auf, wobei die meisten Peakmassen im Bereich von 2 bis 5 kDa gemessen wurden. Als Mindestzahl zur Identifizierung auf Art-Ebene wurde in der Dissertation von Breitung (Breitung 2007) eine Anzahl von 40 Peakmassen ermittelt. Auffällig war, dass bei einer Anzahl von mehr als 70 Peakmassen eine Abnahme der Unterschiede zwischen *S. mutans* und den restlichen Arten festzustellen war. Bei mehr als 80 Peakmassen sank hier die Differenz aus Mittelwert und Standardabweichung wieder. Um die Mindestzahl von Peakmassen zur Identifizierung zu untersuchen, wurde die Differenz der „simple matching“-Koeffizienten der identifizierten Art zur nächstmöglichen gebildet (Breitung 2007). Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Promotionsarbeit bestätigt und für die weitere Auswertung eine Peakmassenliste von 60 bzw. 100 Massenpeaks verwendet, um sie in die Datenbank integrieren zu können.

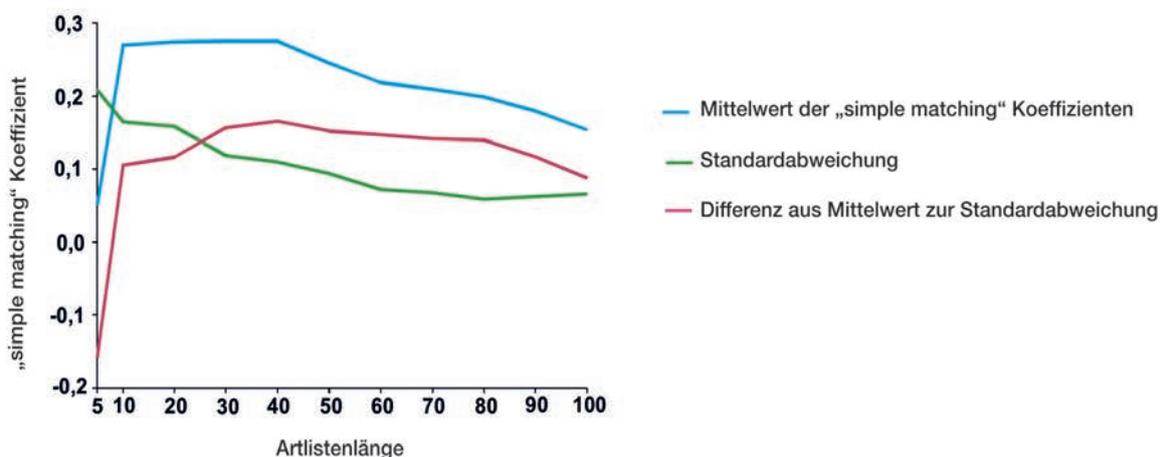


Abbildung 4 : Untersuchung der optimalen Anzahl von Massenpeaks zur Identifizierung von Mutans Streptokokken- Isolaten.

Vorversuche Gemische

Die ermittelten Bakterienkonzentrationen in der Stammlösung, bei der sie optimal messbar waren, ergaben die folgenden optischen Dichten: OD *S. mutans* (DSM 20523) 0,841, OD *S. sanguinis* (DSM 20567) 0,744 und OD *S. oralis* (DSM 20627) 0,892. OD unter 0,5 und über 1 erwiesen sich für alle oben genannten Bakterien als nicht durchgängig messbar.

4.2. Erstellung der Referenzdatenbank

Zu Beginn der Untersuchungen wurde die Methodik unter Verwendung einer Stammsammlung, zu der die Spezies *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis*, *S. macacae*, *S. rattii*, *S. pneumoniae*, *S. criceti*, *S. ferus*, *S. downei*, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. parasanguinis*, *S. constellatus*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. mitis* und *S. intermedius* gehörten, und deren Artzugehörigkeit durch Sequenzierung der Gene der 16S rRNA bestätigt worden war, etabliert. Mit derselben Vorgehensweise wurden 539 Mutans-Streptokokken-Isolate aus klinischen Proben untersucht und anschließend in die Datenbank integriert. Von 460 dieser Isolate war die Klassifizierung durch Sequenzierung der 16S rRNA Gene bereits bekannt. Die übrigen 79 Spektren, gewonnen aus Speichel und kariösem Dentin von 10 Patienten, wurden anhand ihrer Kulturmorphologie vorklassifiziert und mittels MALDI-TOF MS untersucht. Von diesen 79 Spektren konnten 68 als *S. mutans*, 6 als *S. sobrinus*, 4 als *S. sanguinis* und 1 als *S. anginosus* identifiziert werden. Auch diese Klassifizierung wurde mittels Sequenzierung überprüft. Durch wiederholte Kultivierung und Messung ließen sich diese Ergebnisse reproduzieren. Zunächst dargestellt in Abbildung 5 a-c sind MALDI-TOF Massenspektren- Ergebnisse der 9 Mutans-Referenzstämme (GS 5, Ingbritt, Jb 1600, LM-7, NCTC, OMZ 125, OMZ 175, Qp 50 und Se 11) der Datenbank. Als Vergleich danach in Abbildung 6a und 6b, sind exemplarische Massenspektren der klinisch gewonnenen Speichel-Isolate dargestellt und die damit verbundene Analyse.

Analyse der klinischen Isolate

Als Grundlage der Analyse der klinischen Isolate diente die Datenbank. Mittels der Anwendung des Software Package MatLab 2006b konnten insgesamt 79 Spektren aufgezeichnet werden, welche dann nach Sequenzierung ebenfalls in die Datenbank integriert wurden.

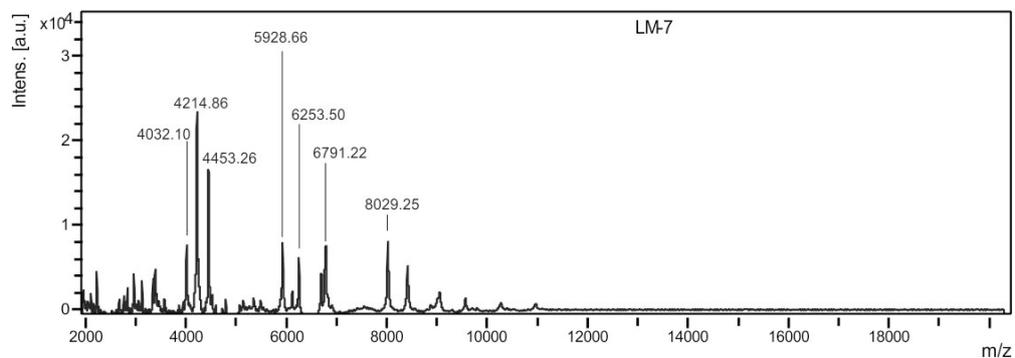
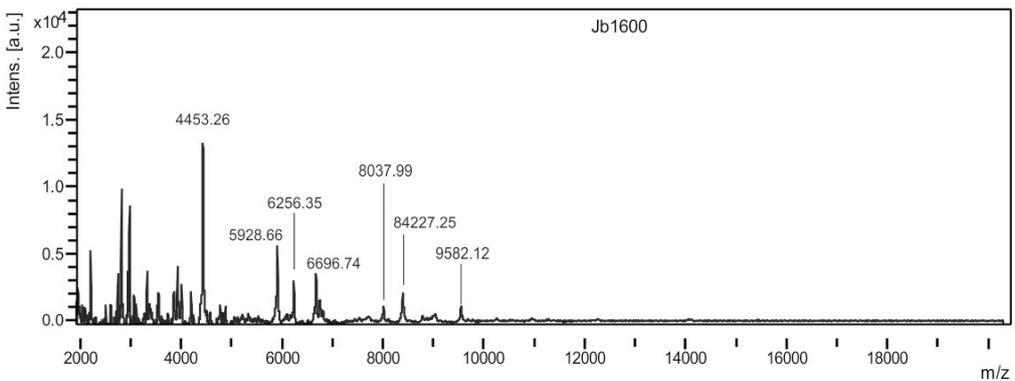
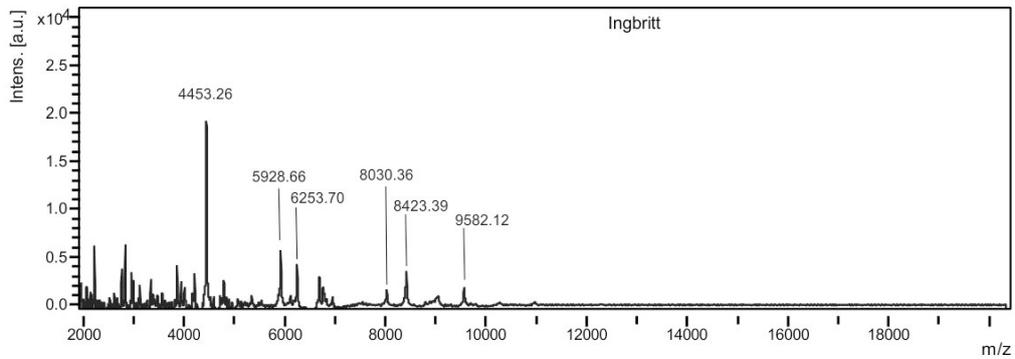
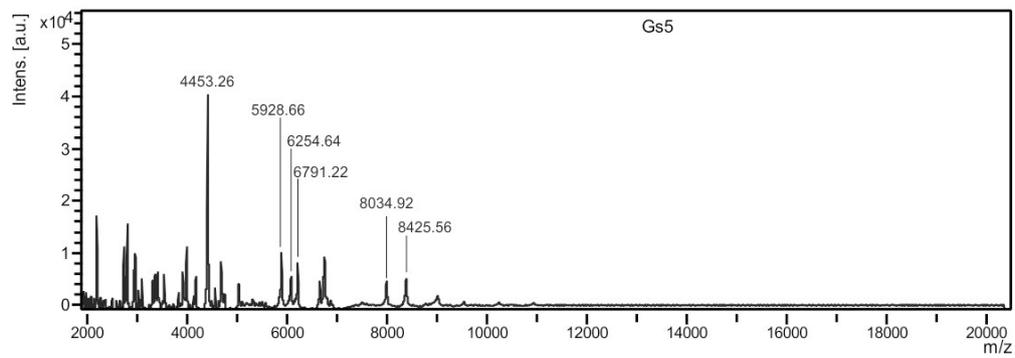


Abbildung 5a: MALDI-TOF Massenspektren-Ergebnisse der Mutans-Referenzstämme (GS 5, Ingbritt, Jb 1600, LM-7) der Datenbank. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Ergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

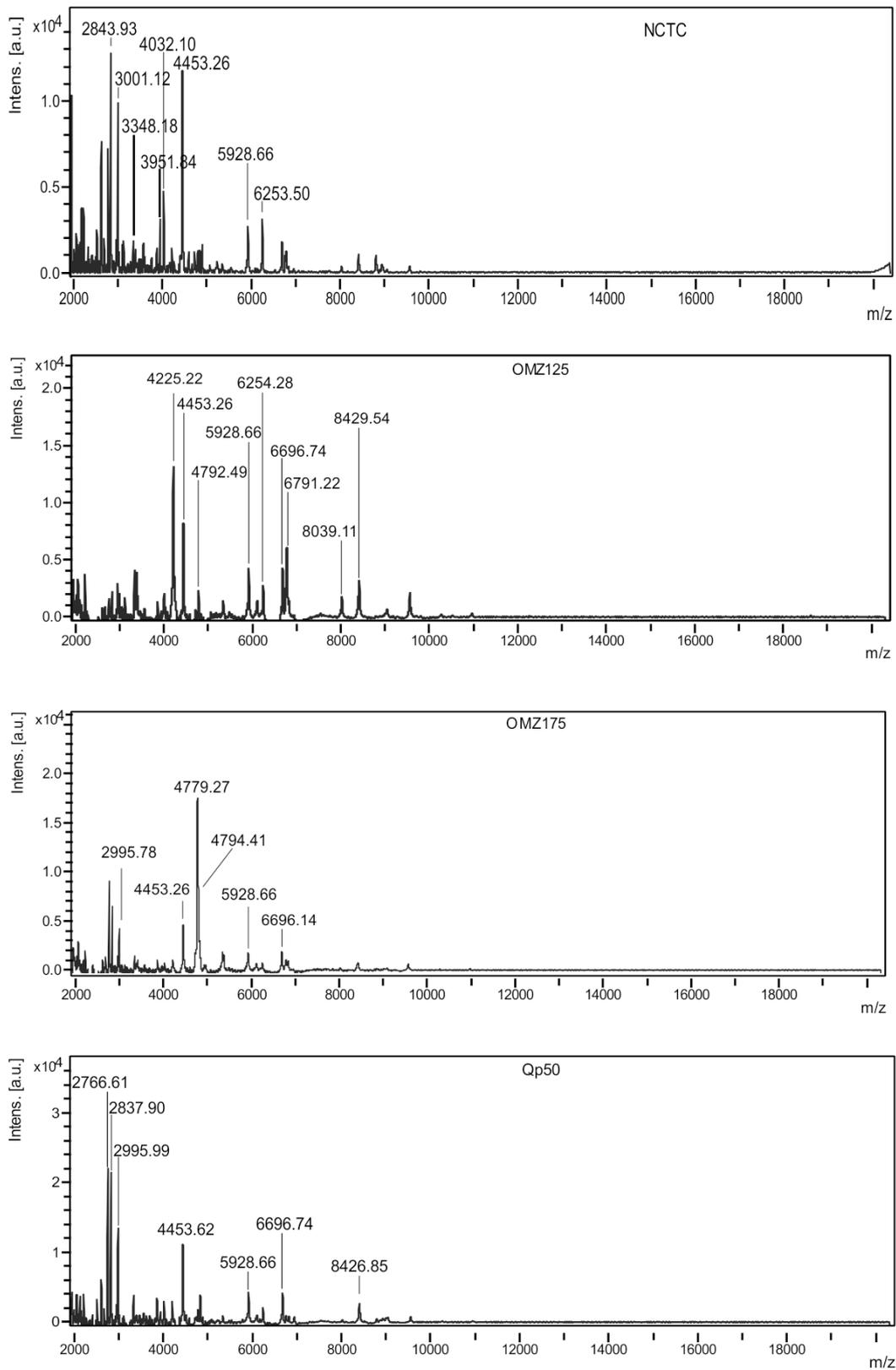


Abbildung 5b: MALDI-TOF Massenspektren-Ergebnisse der Mutans-Referenzstämme (NCTC 10449, OMZ 125, OMZ 175, Qp 50-1,) der Datenbank. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Ergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

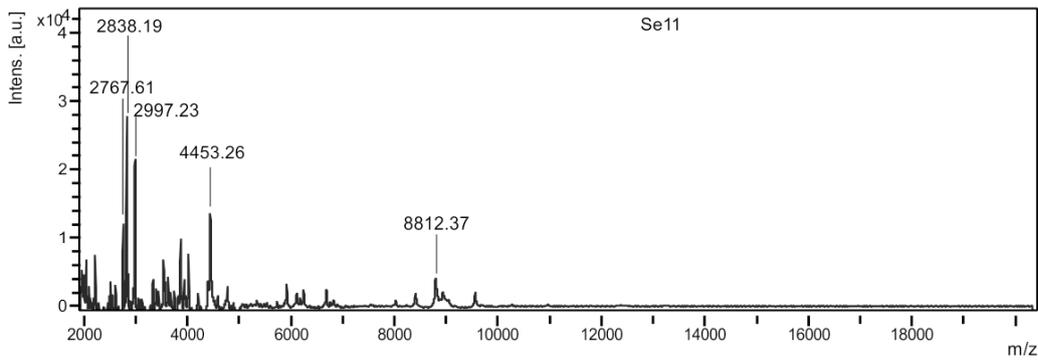


Abbildung 5c: MALDI-TOF Massenspektren-Ergebniss des Mutans-Referenzstammes (Se 11) der Datenbank. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Ergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

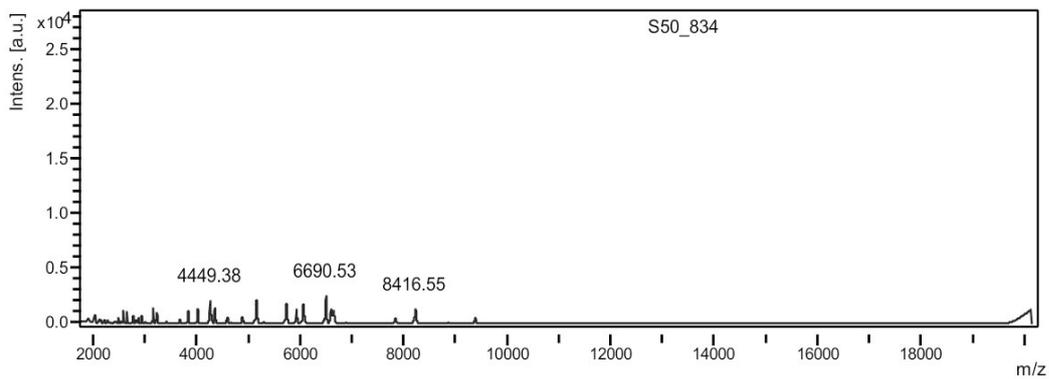


Abbildung 6a: MALDI-TOF-MS Darstellung des aus einer Speichelprobe isolierten Stammes S50_834. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Messergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

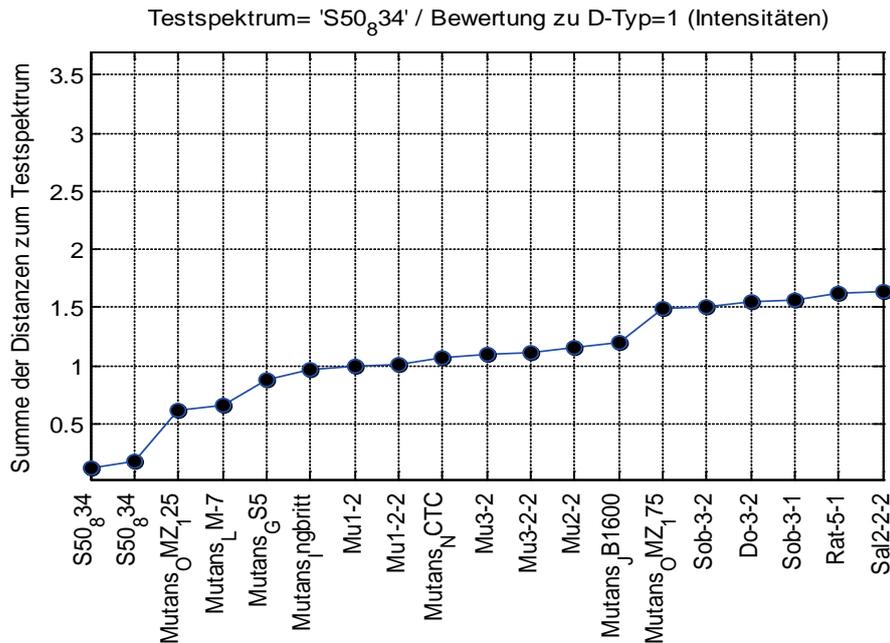


Abbildung 6b: Klassifikation als *S. mutans* (Isolat S50₈₃₄), aus Speichel gewonnen, im Vergleich mit anderen Stämmen der Datenbank.

Auf der y-Achse der Abbildung 6b ist die Differenz zwischen Spektrum S 50 und den Referenzspektren der Datensammlung dargestellt. Auf der x-Achse sind die Einträge der Datenbank, geordnet nach Ähnlichkeiten zum MALDI-TOF-Spektrum S50₈₃₄, dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind nur die 20 ähnlichsten Einträge der Datenbank aufgeführt. Die Messung hat mit 3 verschiedenen Proben des Isolates S50₈₃₄ an verschiedenen Stellen des Probetellers (target) stattgefunden, so dass die ersten beiden Ergebnisse die Kontrollproben darstellen. Bei den weiteren 12 Einträgen (OMZ 125, LM-7, GS 5, Ingbritt, M 1-2, Mu 1-2-2, NCTC 10449, Mu 3-2, Mu 3-2-2, Mu 2-2, JB 1600, OMZ 175) handelt es sich durchgehend um Stämme von *S. mutans*, es folgen *S. sobrinus* (Sob-3-2), *S. downei* (Do-3-2), *S. sobrinus* (Sob 3-1), *S. ratti* (Rat 5-1) und *S. salivarius* 2-2-2.

Die entstandene Peakliste der exemplarischen Speichelprobe S50₈₃₄ (Abbildung 6a) wurde mit den Peaklisten aller Referenzstämme der Datenbank abgeglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 6b zu erkennen.

Alle 79 Proben wurden anhand ihrer Kulturmorphologie vorklassifiziert und mittels MALDI-TOF MS untersucht.

Auf diese Weise konnten 69 der vorliegenden Proben als *S. mutans*, 6 als *S. sobrinus*, 4 als *S. sanguinis* und 1 als *S. anginosus* identifiziert werden. Diese wurden sequenziert und nach Übereinstimmung mit der Identifizierung in die Datenbank integriert.

Auffallend war, dass es sich bei 11 der als *S. mutans* visuell vorklassifizierten Stämme nicht um solche handelte. Erst durch die MALDI-TOF MS erfolgte die oben angeführte Klassifizierung, welche sich dann mittels Sequenzierung bestätigte. Es kann vermutet werden, dass es sich hierbei um eine Fehlklassifikation des Kulturphänotyps handelte.

Bei solchen Datenmengen war es schwer, exklusive peaks zu finden, je größer die Datenbank wurde. Betrachtet man nur die unten aufgeführten Referenzstämme der Datenbank und sucht hierunter speziesspezifische Peaks mit einer Messgenauigkeit von 5 Da, so findet man nur noch folgende exklusive Peaks (in Tabelle 7 dargestellt), welche nicht mehr zur alleinigen Identifizierung durch das für die Analyse der Gemische geschriebene Programm ausreichte. Somit erfolgte die Erstellung der Datenbank, wie oben beschrieben, mittels gesamter Cluster von Spektren.

Tabelle 7: Speziesspezifische Peaks der Massenspektren von 10 Mutans und oralen Streptokokken der Datenbank im Vergleich untereinander.

| | | | | | | | | |
|--------------------------|-----------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|
| <i>S. oralis</i> | DSM 20627 | 3259,4 | 7682,2 | 9375,2 | 9513,7 | | | |
| <i>S. mitis</i> | DSM 12643 | 8821,6 | | | | | | |
| <i>S. sanguinis</i> | DSM 20567 | 2888,1 | 3145,2 | 5768,1 | 6283,9 | 6600,4 | | |
| <i>S. mutans</i> | DSM 20523 | 3068,6 | 4526,2 | 4783,8 | 5928,7 | 6140,8 | 6255,6 | |
| <i>S. anginosus</i> | DSM 20563 | 4595,3 | 6935,4 | 9562,6 | 10391,3 | | | |
| <i>S. pneumoniae 4-2</i> | | 5006,8 | 5103,6 | 5126,9 | 9535,5 | | | |
| <i>S. pneumoniae 4-1</i> | | 3019,7 | 3824,5 | 4343,6 | 4516,7 | 9049,9 | | |
| <i>S. ferus</i> | DSM 20646 | 2621,4 | 3550,7 | 4380,4 | 5968,6 | 6079,8 | 6308,6 | 9620,2 |
| <i>S. parasang.</i> | DSM 6776 | 4129,8 | 5913,8 | 6616,8 | 7671,9 | 7941,3 | 8265,6 | |
| <i>S. mitis</i> | 2-2-2 | 2871,9 | 4976,8 | 5379,9 | | | | |

4.3 Quantitative Analyse der Bakteriengemische

Der gewählte Ansatz zur Identifizierung von Mutans-Streptokokken in Bakteriengemischen beruhte anstelle von Musteranalyse auf dem Vergleich artspezifischer Peakmassen. Verwendung fanden hier die Bakterienarten *S. mutans*, *S. sanguinis* und *S. oralis*. Der zuvor erfolgreiche Weg, mit Hilfe von Clustern gesamter Spektren zu identifizieren, führte zu Peaklisten, welche bei Gemischen nicht mehr anhand der erstellten Datenbank zu erkennen waren. Tabelle 8 zeigt die artspezifischen Peakmassen, die beim Vergleich der untersuchten oralen Streptokokken gefunden wurden. Die Anzahl artspezifischer Peakmassen im Vergleich untereinander lag bei 9 (*S. sanguinis*), 16 (*S. oralis*) und 20 (*S. mutans*).

Tabelle 8: Artspezifische (exklusive) Peakmassenliste der Bakterien *S. sanguinis*, *S. oralis* und *S. mutans* zur Identifikation im Bakteriengemisch.

| <i>S. sanguinis</i> | <i>S. oralis</i> | <i>S. mutans</i> |
|---------------------|------------------|------------------|
| 3315,3 | 2635,8 | 2622,5 |
| 4168,9 | 3931,3 | 3190,7 |
| 4427,3 | 5273,0 | 4217,0 |
| 5240,6 | 5724,9 | 4256,7 |
| 5292,6 | 5961,7 | 4458,3 |
| 5770,0 | 6650 | 5228,2 |
| 6289,3 | 6762,3 | 5355,7 |
| 6870,2 | 6850,1 | 5418,0 |
| 7963,3 | 6969,3 | 5484,2 |
| | 7563,1 | 5606,1 |
| | 8250,0 | 5732,0 |
| | 9067,2 | 5923,2 |
| | 9834,3 | 6259,3 |
| | 10402 | 6691,3 |
| | 11448,3 | 7541,5 |
| | 12226 | 8883,7 |
| | | 8934,1 |
| | | 9707,4 |
| | | 9806,8 |
| | | 10271,5 |

Die Abbildungen 7a-k stellen die gemessenen MALDI-TOF- Masterspektren der 43 Gemische dar. Die Gemische 1-3 sind Reinkulturen, bei Gemisch 4 bis einschließlich Gemisch 22 handelt es sich um binäre, danach ternäre Gemische. Die Masterspektren stellen die Zusammenfassung von 10 Summenspektren dar. Die nachfolgende Portionierung zu je 4 Diagrammen (Gemisch 4-43) ist der Übersichtlichkeit geschuldet. Zur genaueren Interpretation können die Messungen der Tabelle 9 entnommen werden.

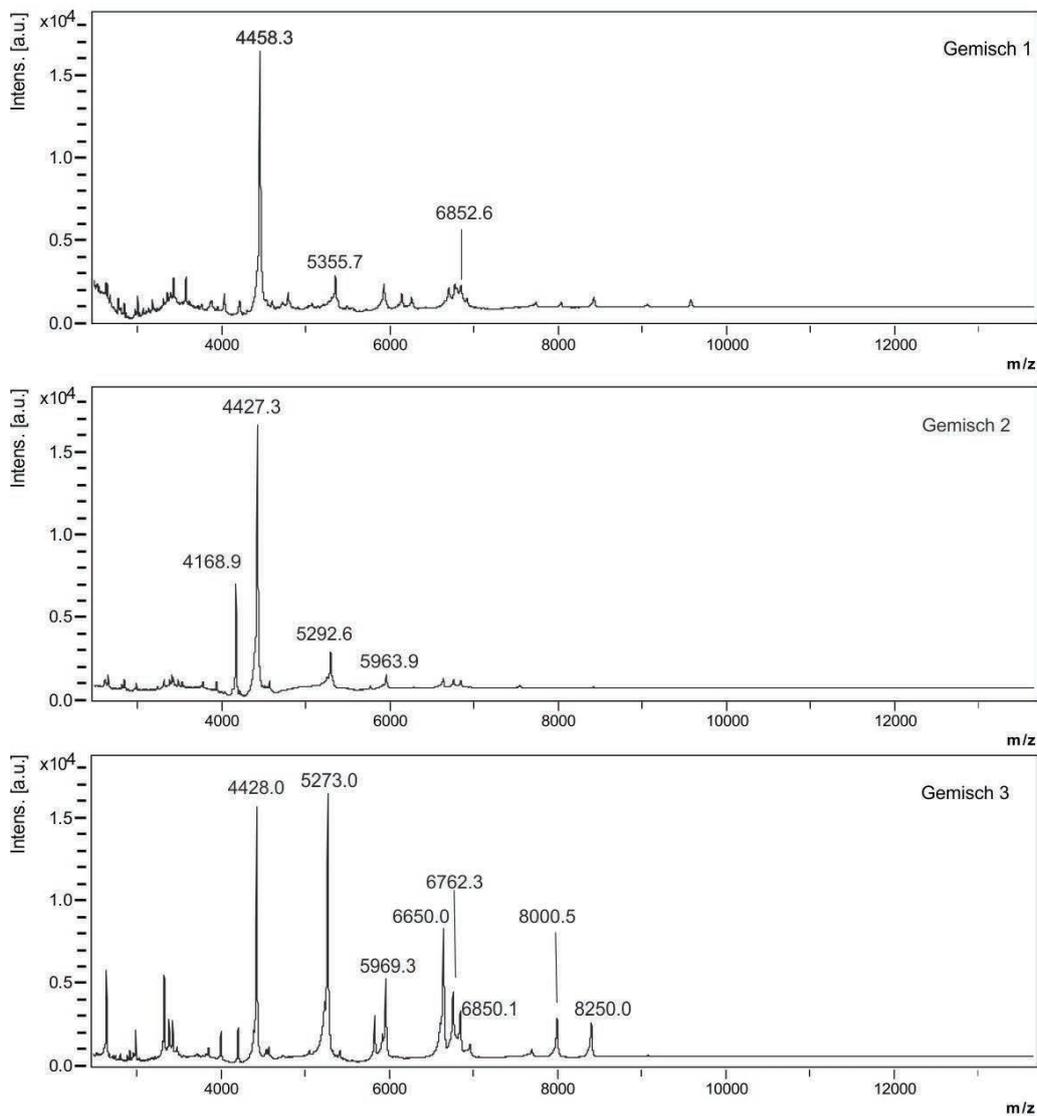


Abbildung 7a: MALDI-TOF-Masterspektren der ersten 3 Gemische mit jeweils 100 prozentiger Bakterienbeteiligung. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Messergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

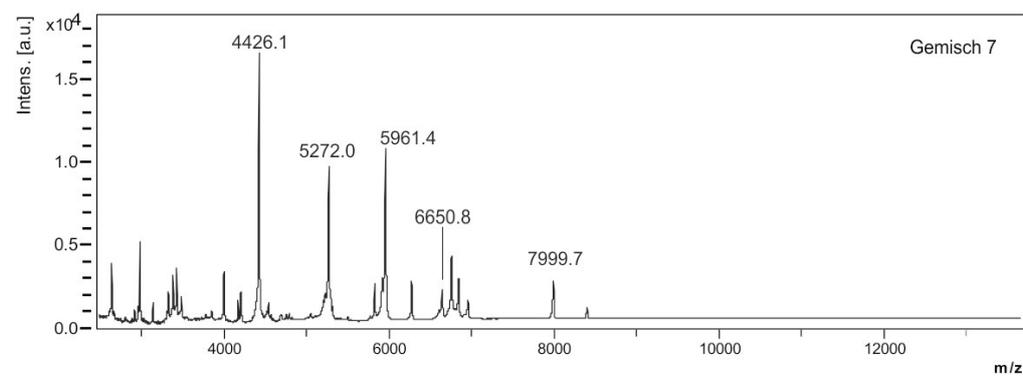
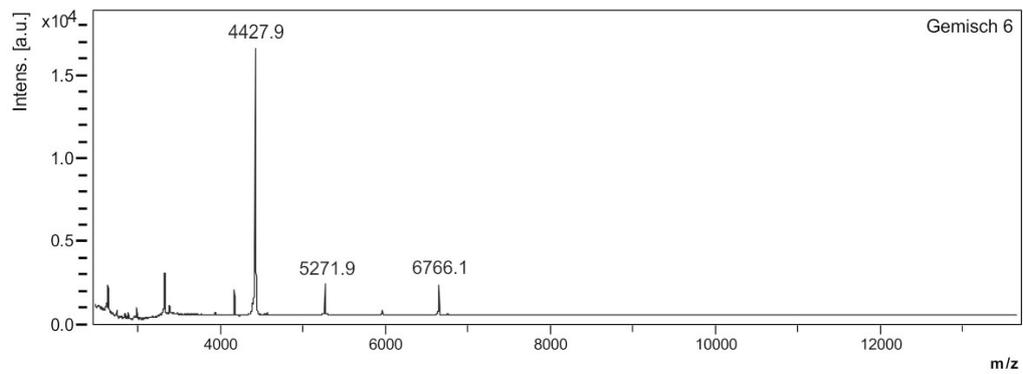
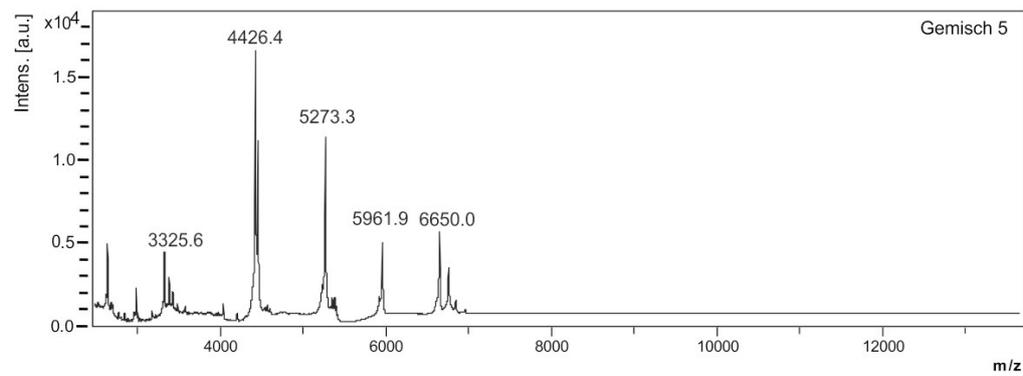
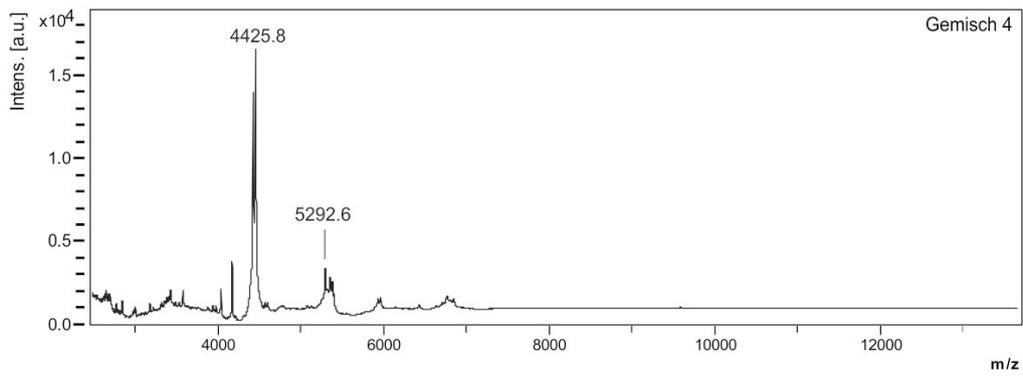


Abbildung 7b: MALDI-TOF-Masterspektren der Gemische 4-7. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Messergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

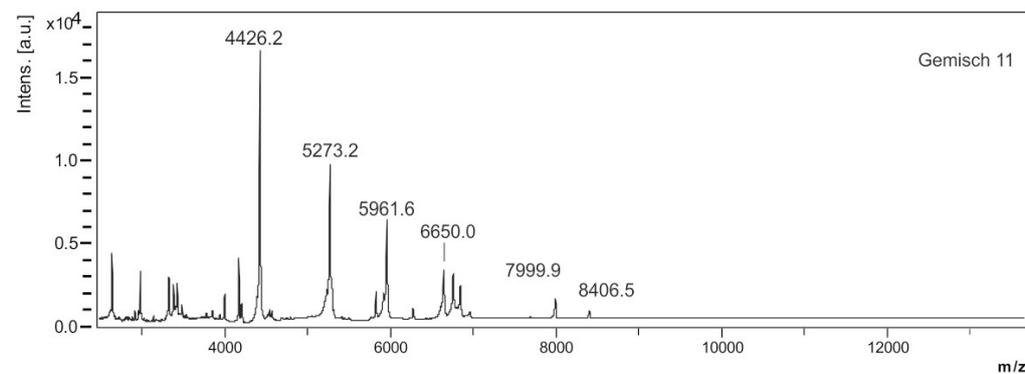
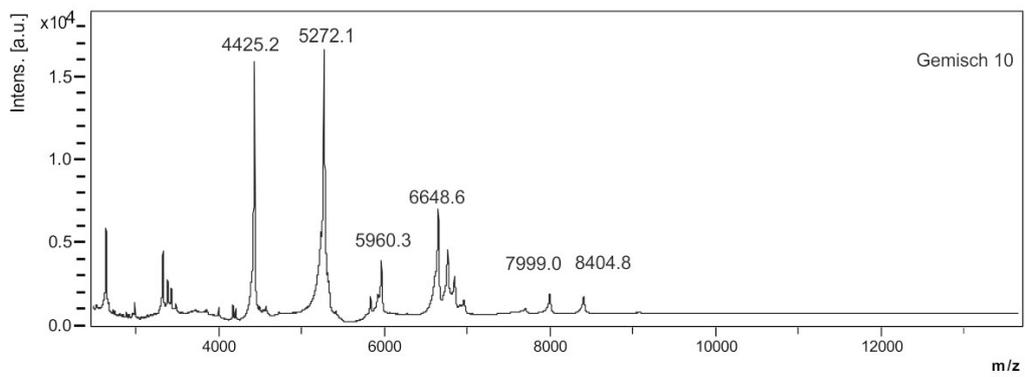
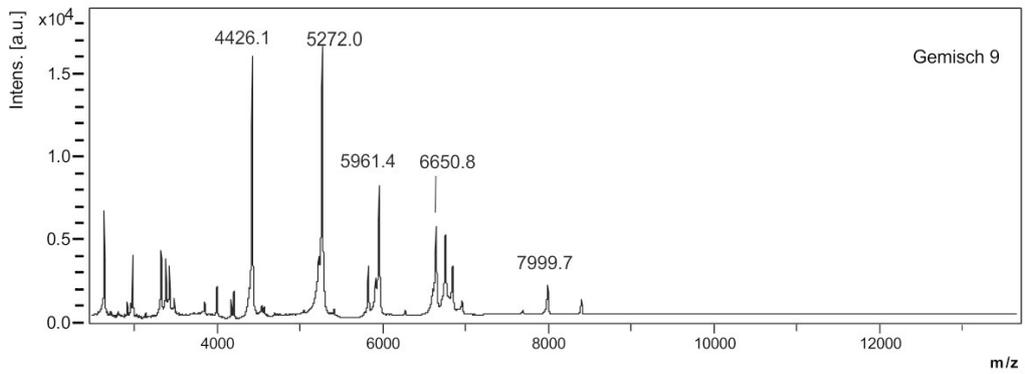
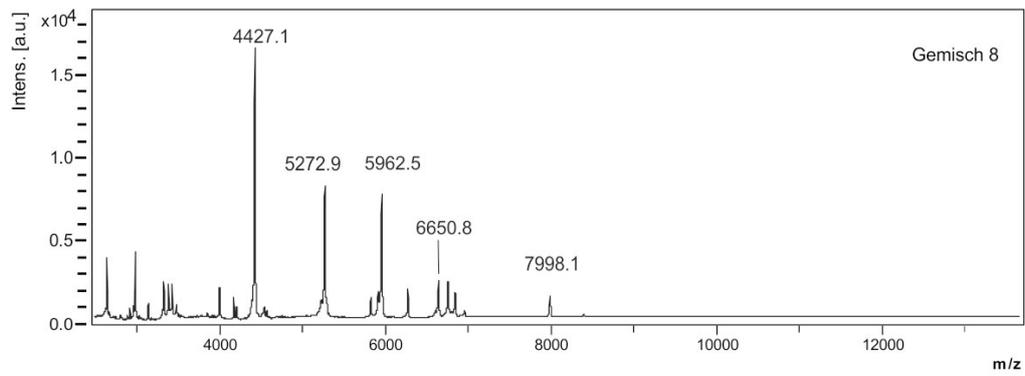


Abbildung 7c: MALDI-TOF-Masterspektren der Gemische 8-11. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Messergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

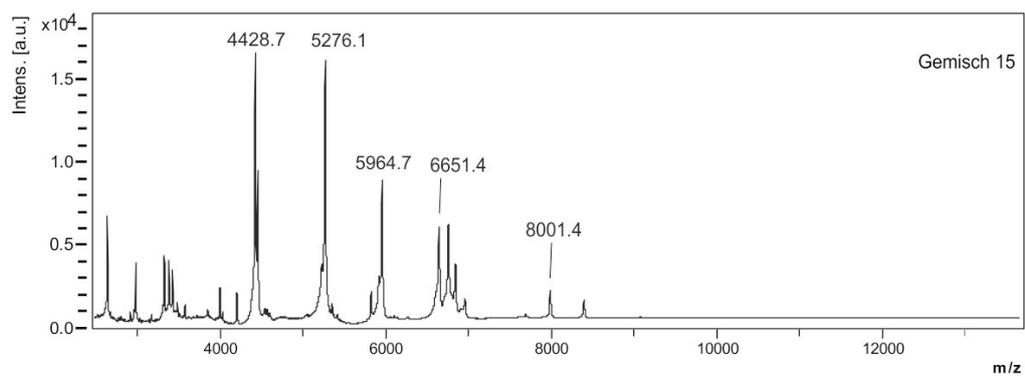
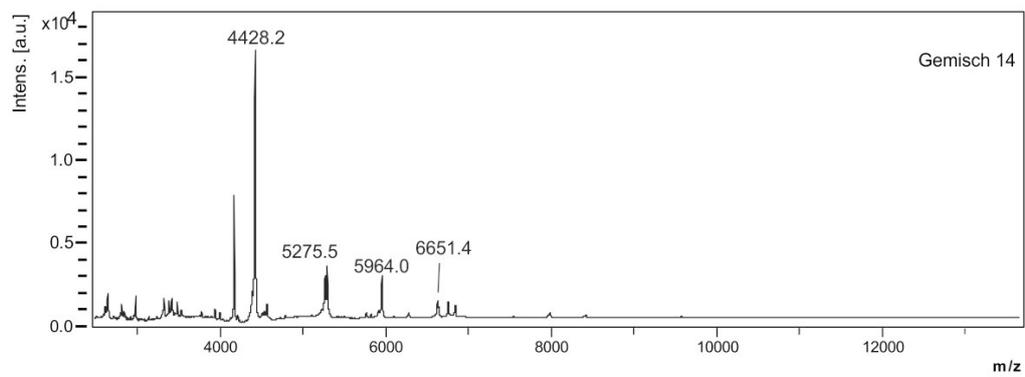
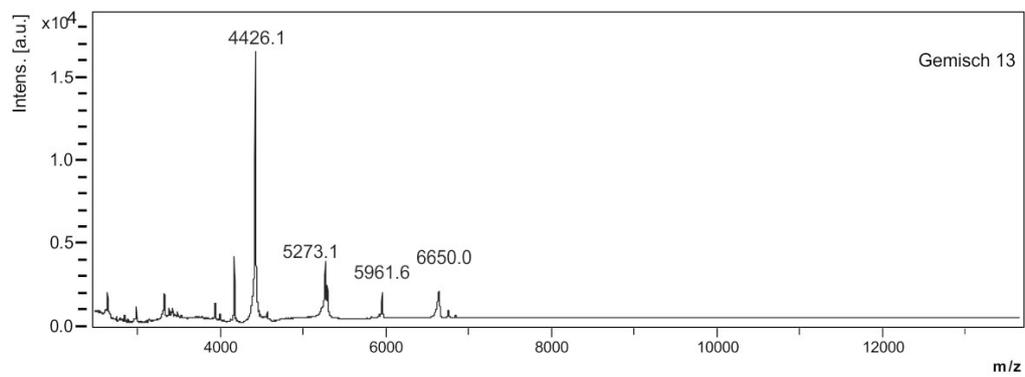
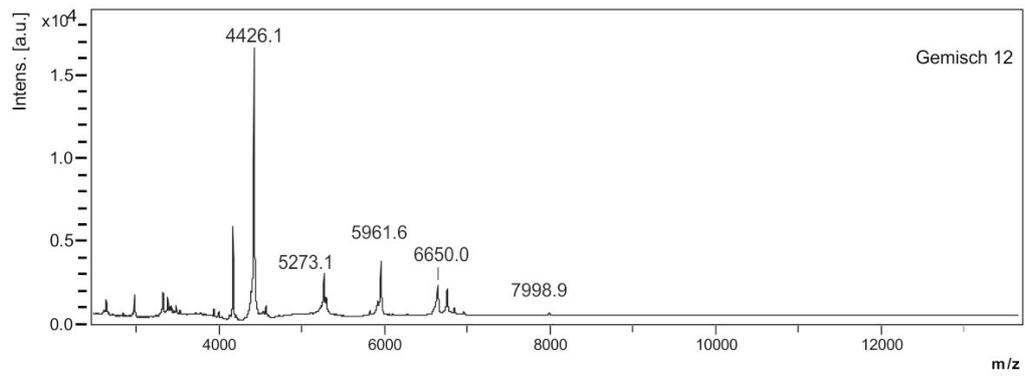


Abbildung 7d: MALDI-TOF-Masterspektren der Gemische 12-15. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Messergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

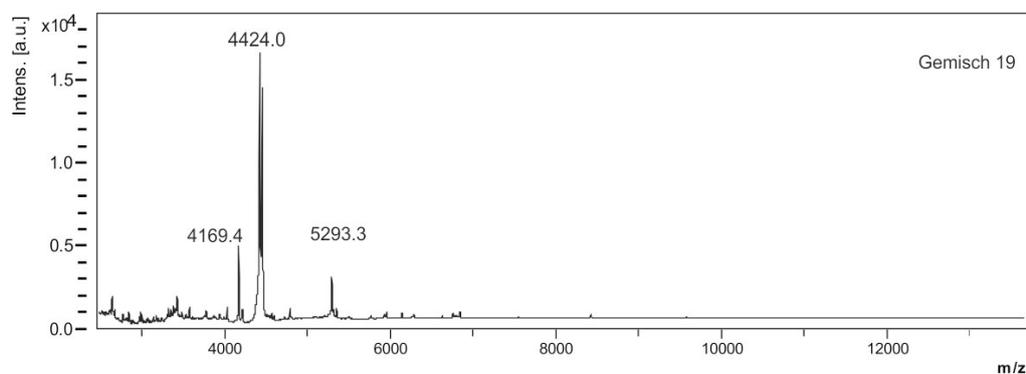
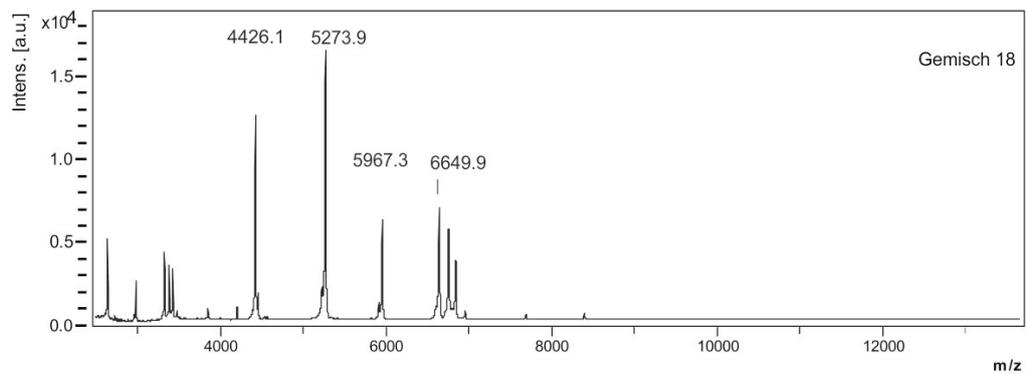
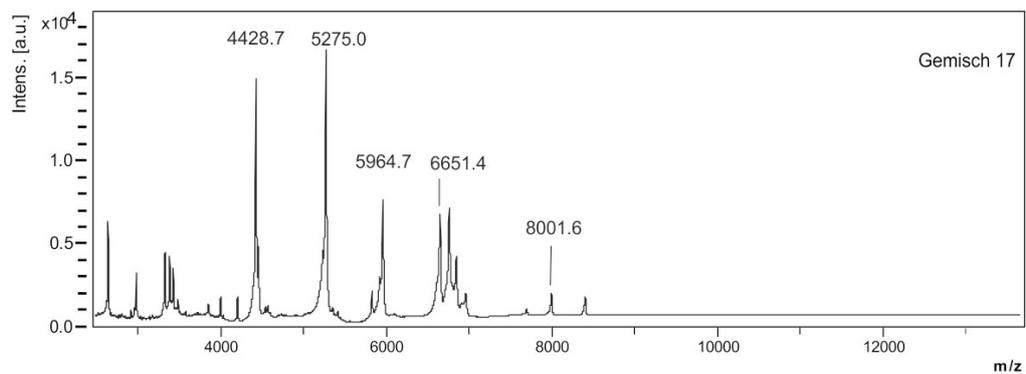
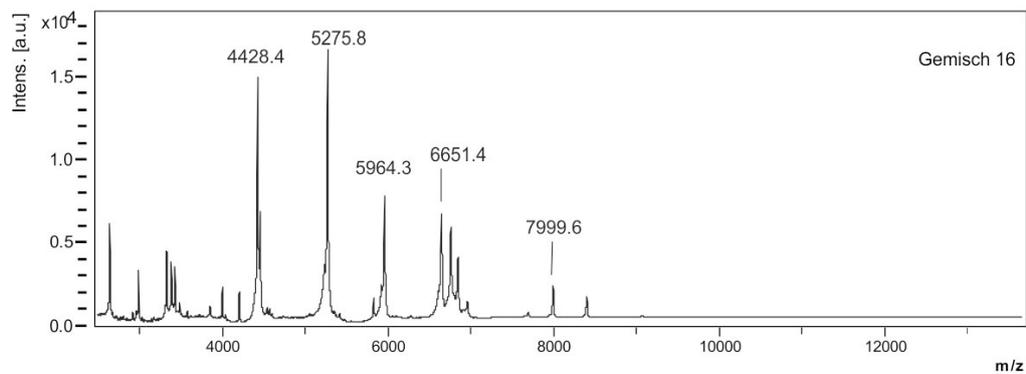


Abbildung 7e: MALDI-TOF-Masterspektren der Gemische 16-19. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Messergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

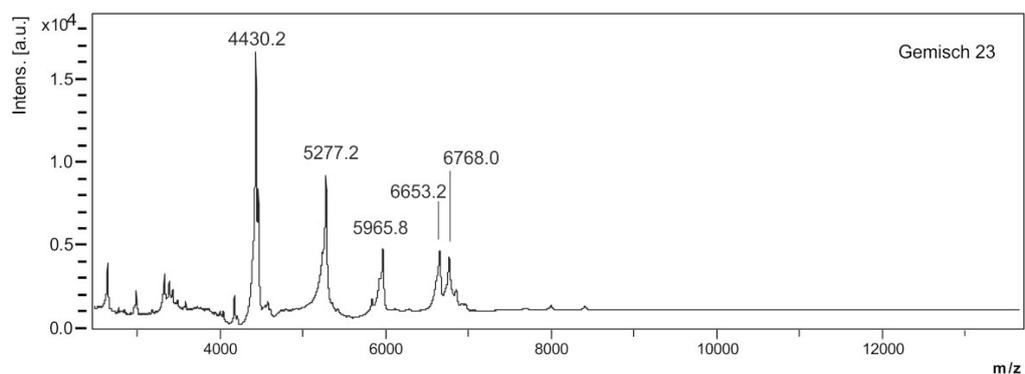
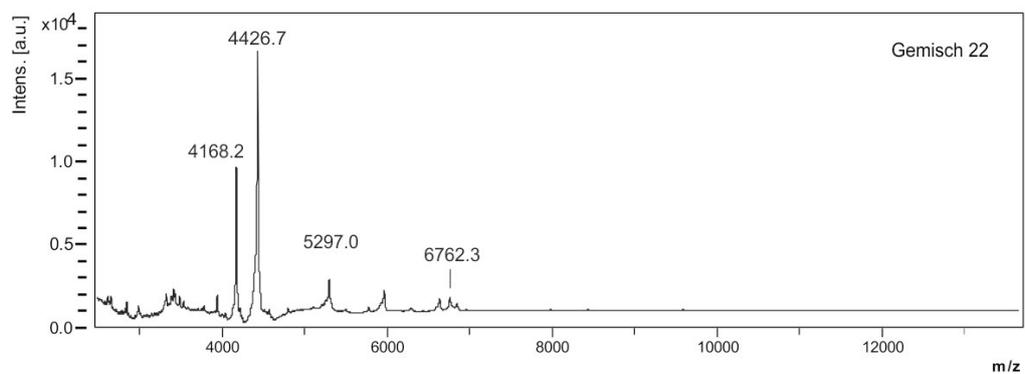
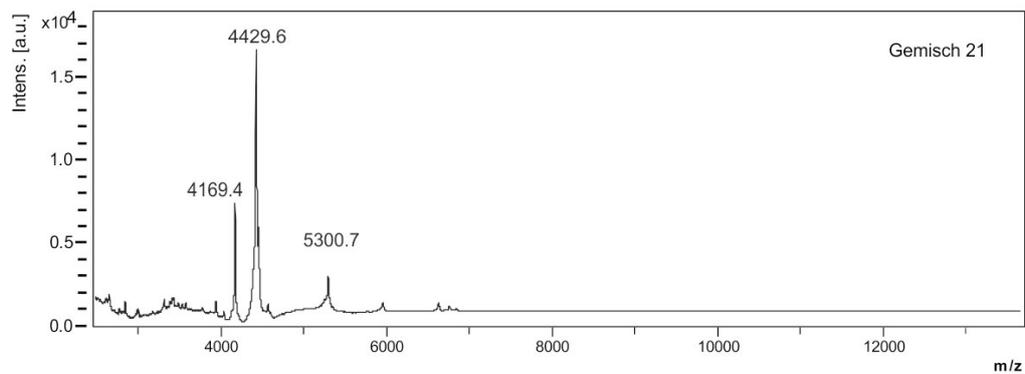
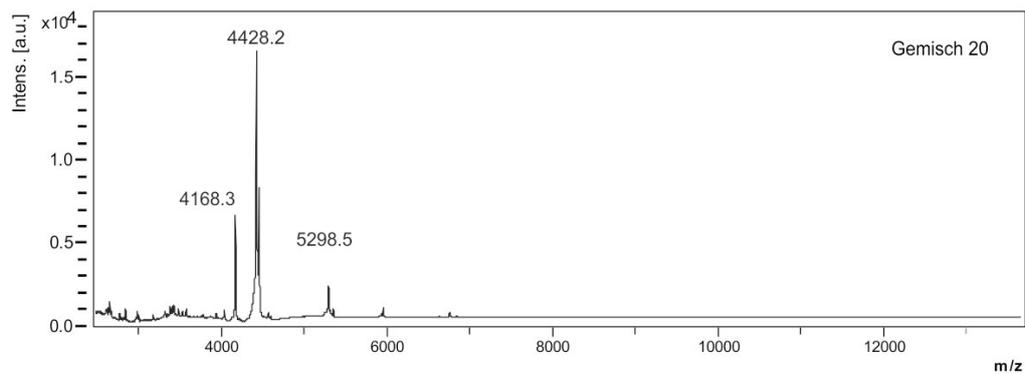


Abbildung 7f: MALDI-TOF-Masterspektren der Gemische 20-23. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Messergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

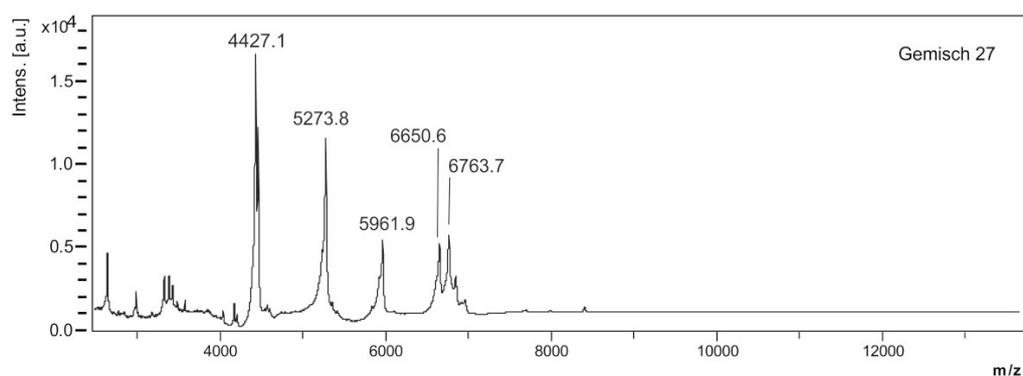
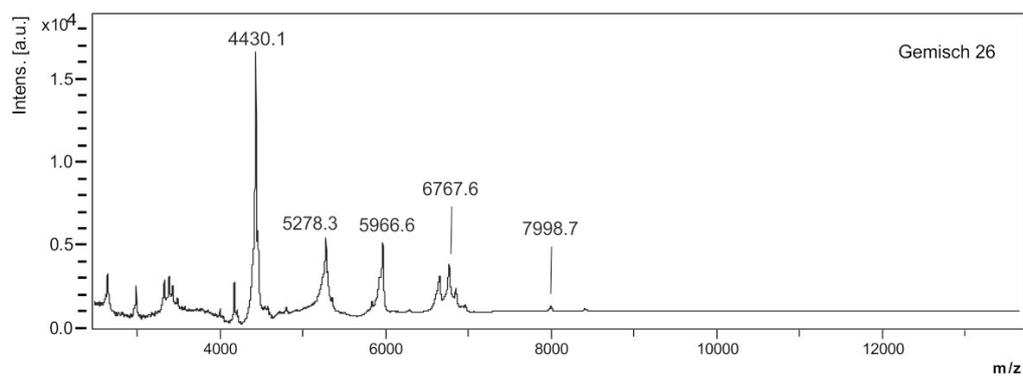
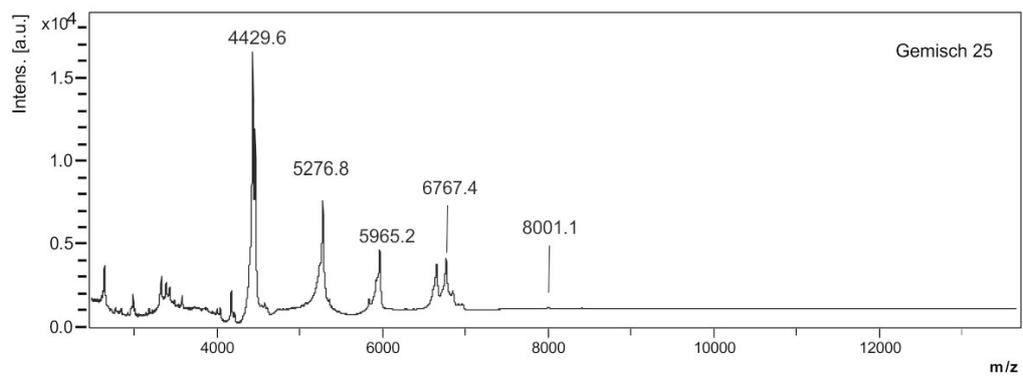
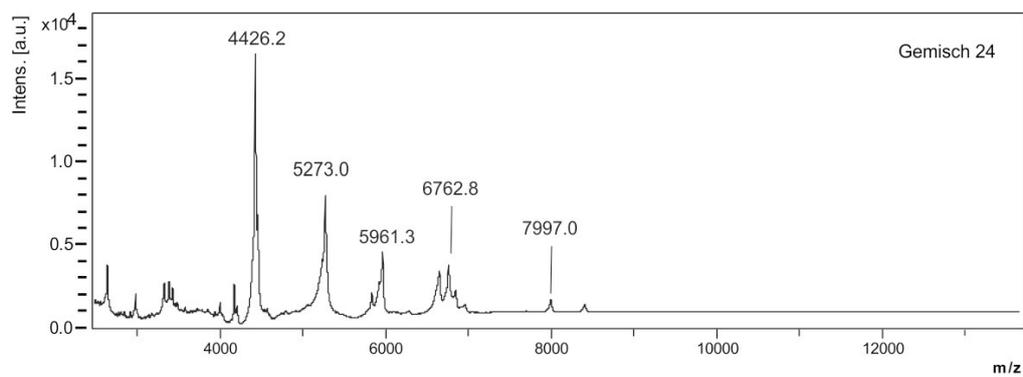


Abbildung 7g: MALDI-TOF-Masterspektren der Gemische 24-27. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Messergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

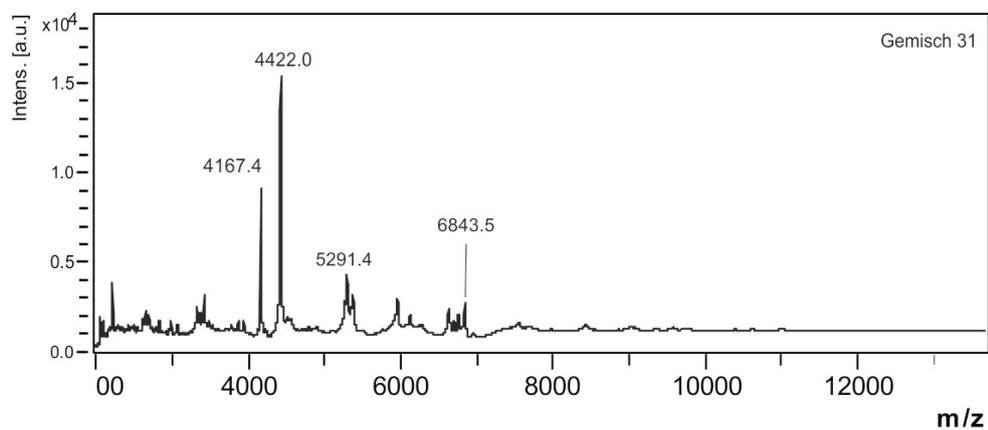
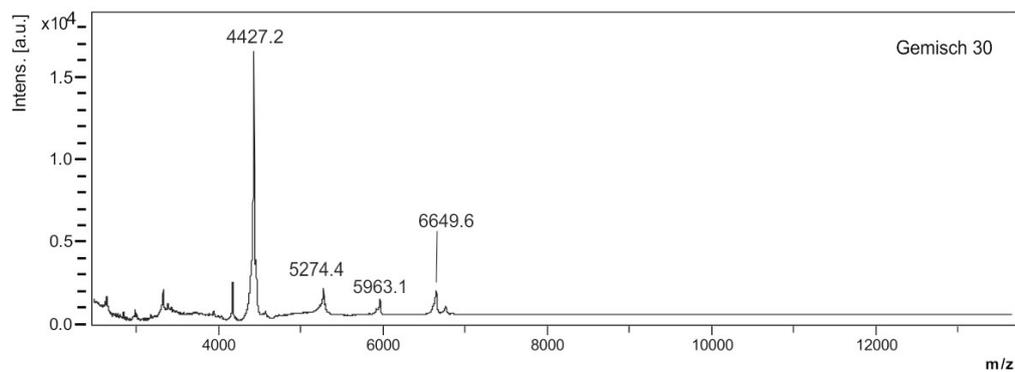
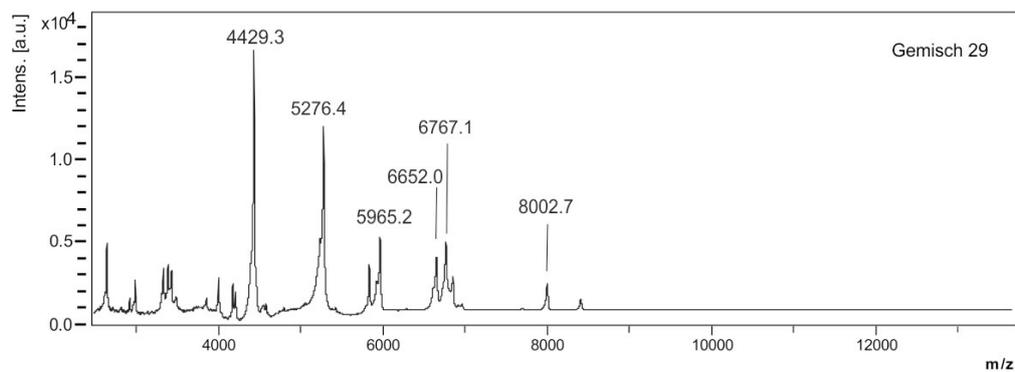
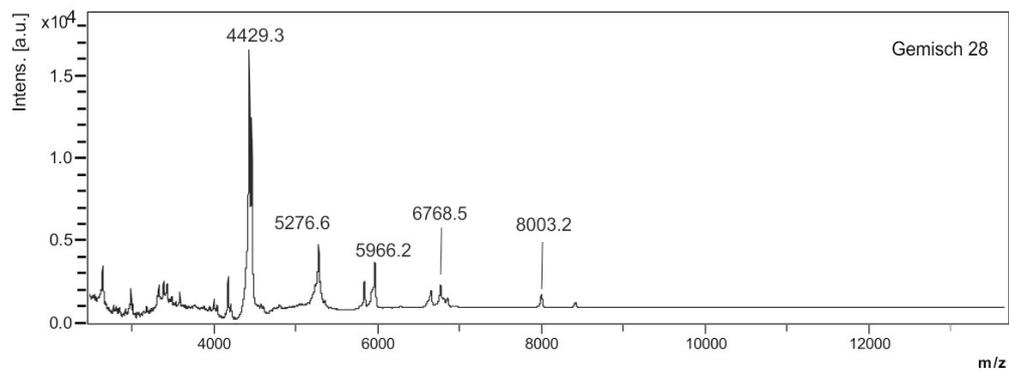


Abbildung 7h: MALDI-TOF-Masterspektren der Gemische 28-31. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Messergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

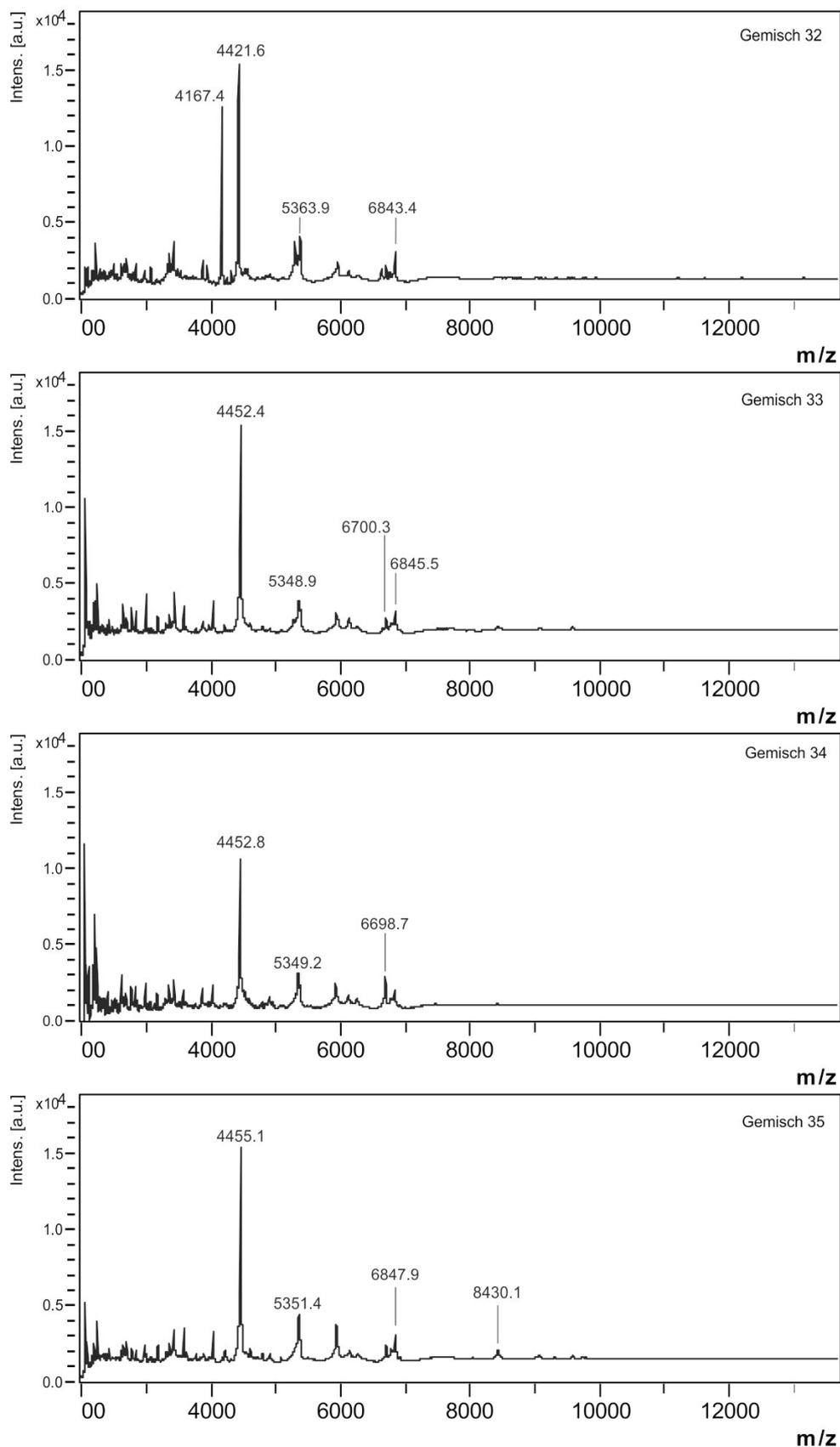


Abbildung 7i: MALDI-TOF-Masterspektren der Gemische 32-35. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Messergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

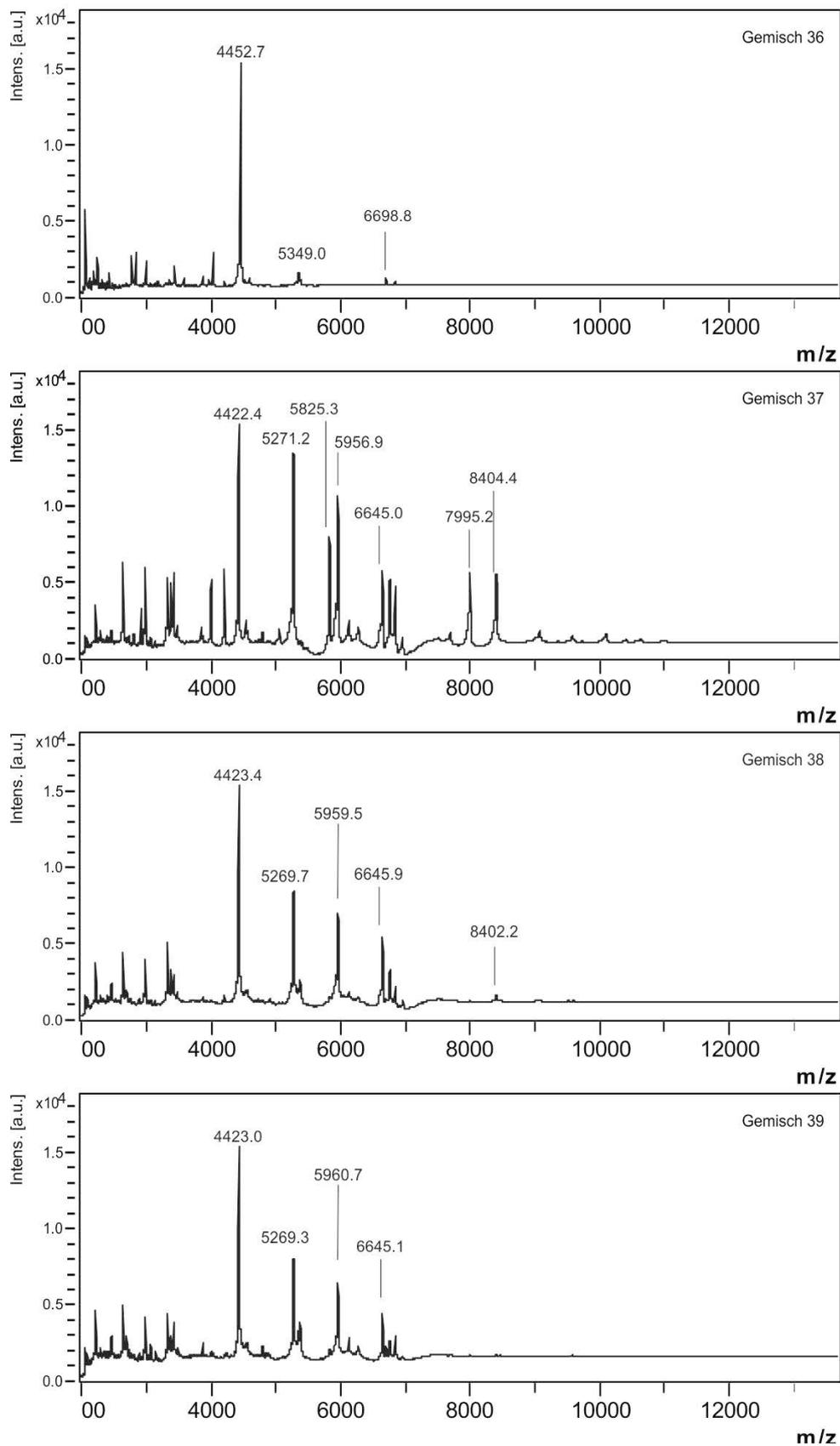


Abbildung 7j: MALDI-TOF-Masterspektren der Gemische 36-39. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Messergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

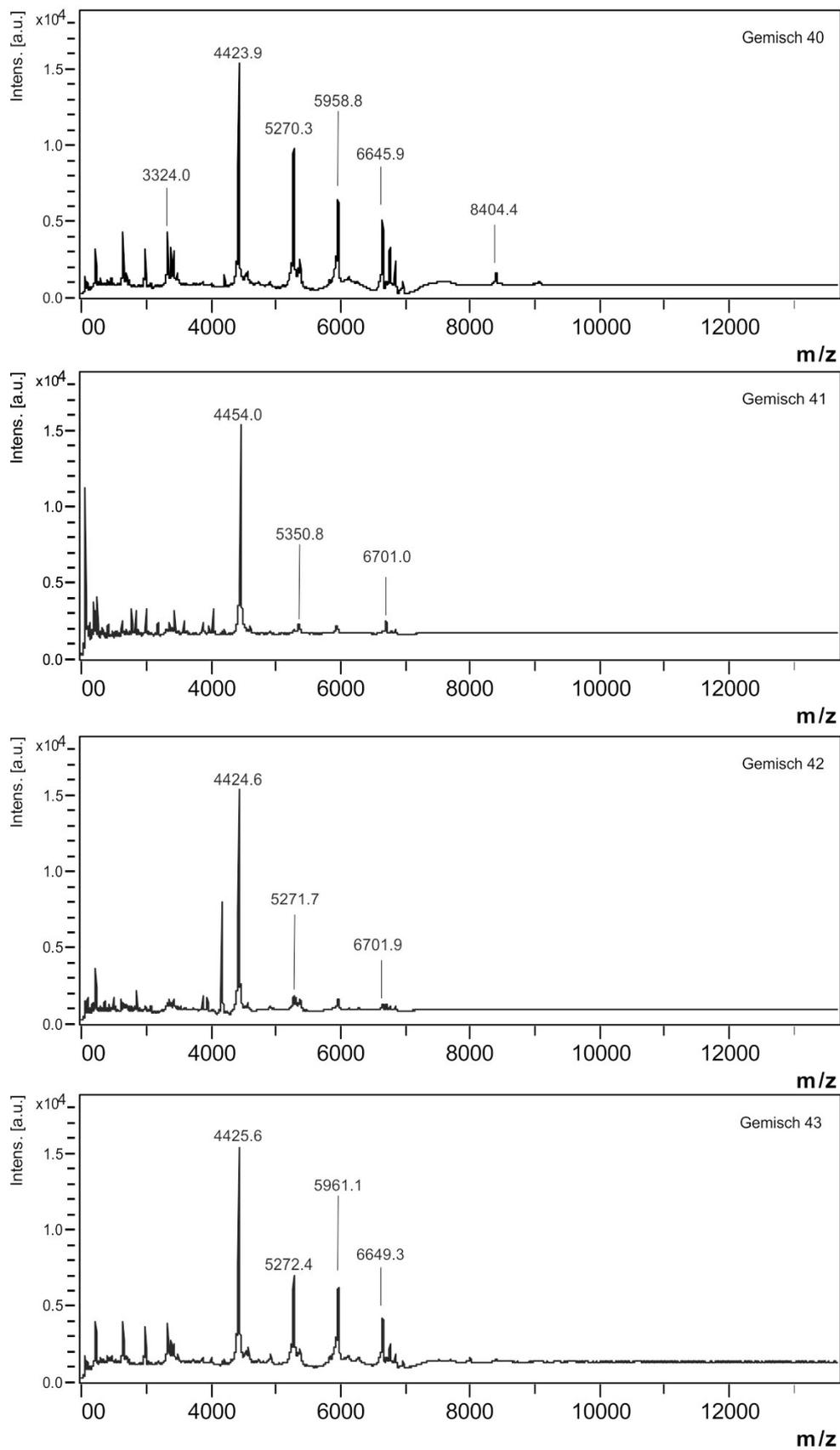


Abbildung 7k: MALDI-TOF-Masterspektren der Gemische 40-43. Dargestellt auf der x-Achse ist das Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) und auf der y-Achse die Intensität der Messergebnisse als artifizielle Einheit (a.u.).

Unterschieden wurde bei der Analyse zwischen binären und ternären Gemischen, welche entsprechend Tabelle 6 hergestellt wurden.

Die Qualität der Analyseergebnisse wurde dahingehend beurteilt, ob die im Gemisch enthaltenen Bakterienarten korrekt identifiziert wurden. Ein „falsch positives“ Analyse-Ergebnis ergab das Vorhandensein von Bakterien, die im Gemisch nicht enthalten waren, ein „falsch negatives“ Ergebnis hingegen lag vor, wenn im Gemisch enthaltene Arten bei der Analyse nicht erkannt wurden.

Die binären Gemische wurden schon ab einem prozentualen Anteil des zweiten Bakteriums von 1 % als Gemisch erkannt, allerdings wurde hier in allen fünf Fällen auch das dritte, nicht vorhandene Bakterium im Gemisch „falsch positiv“ identifiziert. Der Schwellenwert zur exakten Erkennung eines binären Gemisches als solches lag somit bei einem 5%-igen Anteil des zweiten zugefügten Bakteriums.

Oberhalb einer qualitativen Nachweisgrenze von 10 % konnten alle Bakterienarten mit der MALDI-TOF MS sicher nachgewiesen werden.

Von den insgesamt erhaltenen 129 Werten erwiesen sich 10 (7,75 %) als falsch positiv und 1 (0,775 %) als falsch negativ. 30 Gemische (23,25 %) wurden in ihrer prozentualen Zusammensetzung exakt analysiert. Die übrigen 88 (68,22 %) Ergebnisse zeigten die korrekte Beteiligung der Bakterienarten an, wiesen jedoch prozentuale Abweichungen auf (Abb. 8).

4.3.1 Qualität der Analyse-Ergebnisse

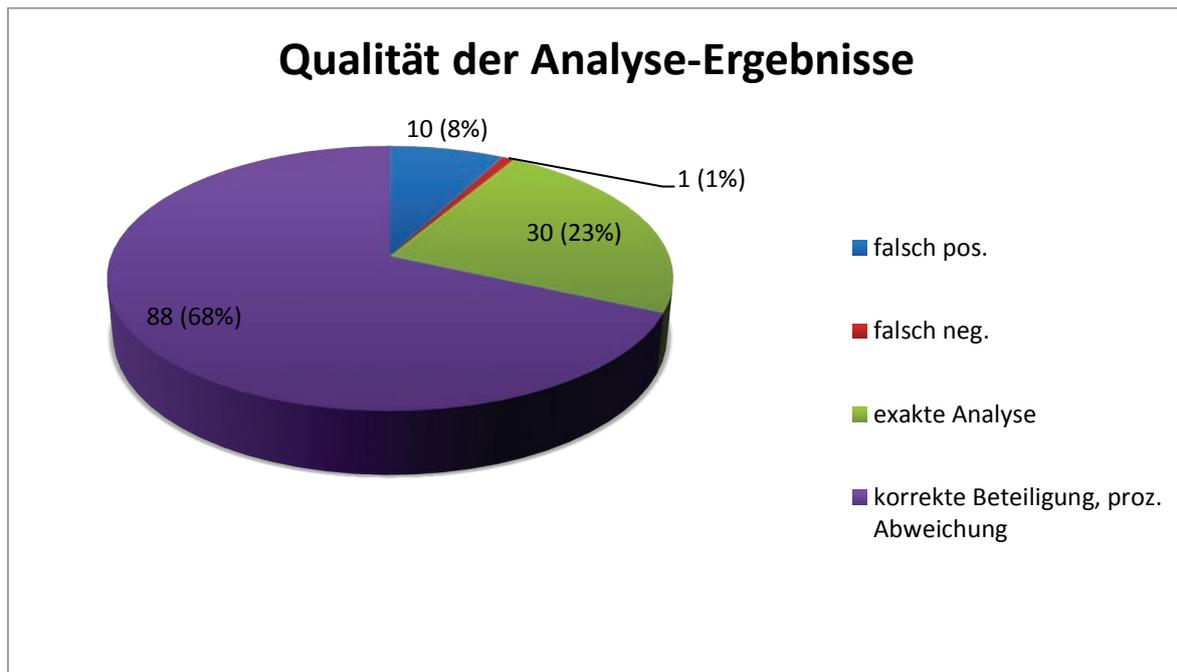


Abbildung 8: Qualität der Analyseergebnisse der Bakteriengemische (gesamt).

Unterteilt in falsch positive (kein Anteil am Gemisch, aber Anteil durch Analyse), falsch negative (Anteil am Gemisch, aber kein Anteil in der Analyse), exakte Analyse und korrekte Beteiligung, aber eine prozentuale Abweichung enthaltend.

Differenziert man weiter zwischen binären und ternären Gemischen, ergaben sich bei den binären Gemischen nur 3 % (2/66) falsch positive Ergebnisse, 0 % falsch negative (0/66) und mit 44 % (29/66) eine große Anzahl exakter Analysen. 53 % (35/66) zeigten die korrekten Beteiligungen mit Abweichungen in den prozentualen Anteilen (s. Abb. 9).

Bei den ternären Gemischen lagen dagegen 12,7 % (8/63) falsch positive Ergebnisse, sowie 1 falsch negatives (1,6 %) Ergebnis vor. Nur 8 % (5/63) der Gemische wurden exakt analysiert und 78 % (49/63) zeigten die korrekten Beteiligungen bei abweichender Prozentzahl (s. Abb. 10).

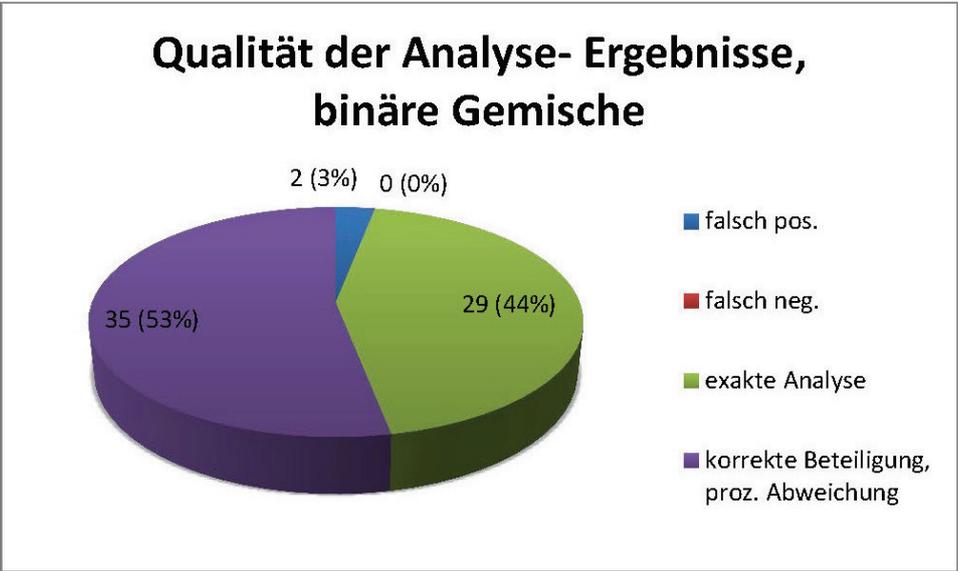


Abbildung 9: Qualität der Analyseergebnisse der binären Bakteriengemische, unterteilt in falsch positive (kein Anteil am Gemisch, aber Anteil durch Analyse), falsch negative (Anteil am Gemisch, aber kein Anteil in der Analyse), exakte Analyse und korrekte Beteiligung, aber eine prozentuale Abweichung enthaltend.

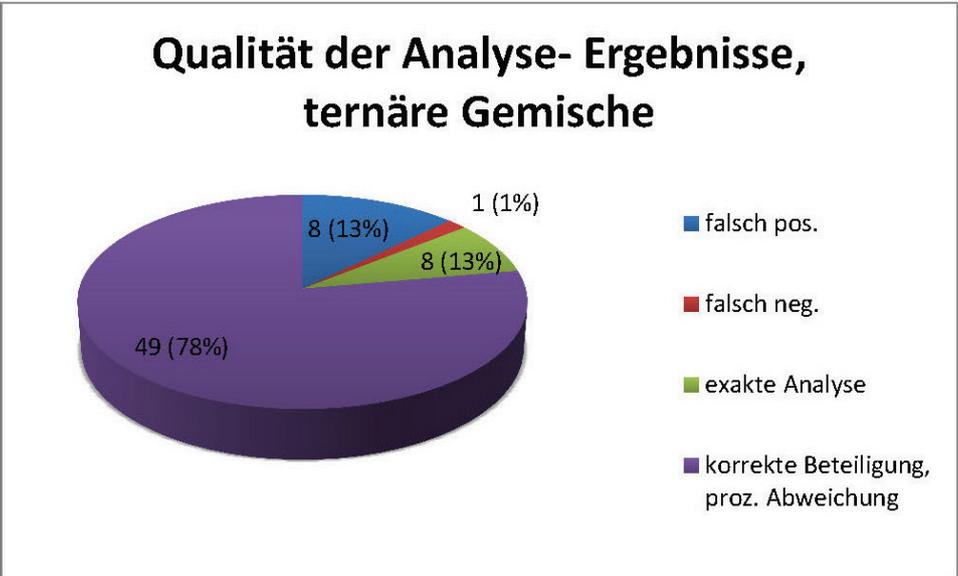


Abbildung 10: Qualität der Analyseergebnisse der ternären Bakteriengemische, unterteilt in falsch positive (kein Anteil am Gemisch, aber Anteil durch Analyse), falsch negative (Anteil am Gemisch, aber kein Anteil in der Analyse), exakte Analyse und korrekte Beteiligung, aber eine prozentuale Abweichung enthaltend.

Tabelle 9 zeigt in den farbig hinterlegten Zeilen die originale Gemischzusammensetzung. Die Ergebniszeilen enthalten die vom Analyseprogramm ermittelten zugehörigen Werte.

Tabelle 9: Bakteriengemische und dazugehörige quantitative Analysewerte (Angabe in Mikrolitern), grün hervorgehoben sind Abweichungen nach oben, rot nach unten, gelb hinterlegt mit falsch positiven Ergebnissen (kein Anteil am Gemisch, aber Anteil durch Analyse) und gelb hinterlegt mit roter Zahl sind falsch negative Ergebnisse (Anteil am Gemisch, aber kein Anteil in der Analyse).

| | Anteil im Gemisch | Anteil durch Analyse | Anteil im Gemisch | Anteil durch Analyse | Anteil im Gemisch | Anteil durch Analyse |
|------------|-------------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| | DSM 20523 <i>S. mutans</i> | | DSM 20567 <i>S. sanguinis</i> | | DSM 20627 <i>S. oralis</i> | |
| Gemisch 01 | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Gemisch 02 | 0 | 0 | 100 | 100 | 0 | 0 |
| Gemisch 03 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 |
| Gemisch 04 | 50 | 51 | 50 | 53 | 0 | 0 |
| Gemisch 05 | 50 | 40 | 0 | 0 | 50 | 60 |
| Gemisch 06 | 0 | 0 | 50 | 13 | 50 | 86 |
| Gemisch 07 | 0 | 1 | 40 | 20 | 60 | 78 |
| Gemisch 08 | 0 | 0 | 30 | 25 | 70 | 75 |
| Gemisch 09 | 0 | 0 | 20 | 9 | 80 | 91 |
| Gemisch 10 | 0 | 0 | 10 | 10 | 90 | 90 |
| Gemisch 11 | 0 | 0 | 60 | 22 | 40 | 77 |
| Gemisch 12 | 0 | 0 | 70 | 49 | 30 | 50 |
| Gemisch 13 | 0 | 0 | 80 | 43 | 20 | 55 |
| Gemisch 14 | 0 | 2 | 90 | 30 | 10 | 70 |
| Gemisch 15 | 40 | 35 | 0 | 0 | 60 | 65 |
| Gemisch 16 | 30 | 22 | 0 | 0 | 70 | 76 |
| Gemisch 17 | 20 | 25 | 0 | 0 | 80 | 75 |
| Gemisch 18 | 10 | 10 | 0 | 0 | 90 | 90 |
| Gemisch 19 | 40 | 56 | 60 | 44 | 0 | 0 |
| Gemisch 20 | 30 | 37 | 70 | 64 | 0 | 0 |
| Gemisch 21 | 20 | 35 | 80 | 65 | 0 | 0 |

| | Anteil im Gemisch | Anteil durch Analyse | Anteil im Gemisch | Anteil durch Analyse | Anteil im Gemisch | Anteil durch Analyse |
|------------|-------------------------------|----------------------|----------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| | DSM 20523 <i>S. mutans</i> | | DSM 20567 <i>S. sanguinis</i> | | DSM 20627 <i>S. oralis</i> | |
| Gemisch 22 | 10 | 24 | 90 | 77 | 0 | 0 |
| Gemisch 23 | 30 | 26 | 30 | 22 | 40 | 51 |
| Gemisch 24 | 30 | 6 | 40 | 25 | 30 | 69 |
| Gemisch 25 | 40 | 25 | 30 | 12 | 30 | 60 |
| Gemisch 26 | 20 | 5 | 40 | 20 | 40 | 75 |
| Gemisch 27 | 40 | 25 | 20 | 10 | 40 | 65 |
| Gemisch 28 | 40 | 10 | 40 | 25 | 20 | 65 |
| Gemisch 29 | 10 | 25 | 40 | 25 | 50 | 50 |
| Gemisch 30 | 10 | 0 | 50 | 50 | 40 | 50 |
| Gemisch 31 | 0 | 4 | 95 | 88 | 5 | 7 |
| Gemisch 32 | 0 | 5 | 99 | 93 | 1 | 0,7 |
| Gemisch 33 | 95 | 74 | 0 | 0 | 5 | 25 |
| Gemisch 34 | 99 | 88 | 0 | 5 | 1 | 6 |
| Gemisch 35 | 95 | 89 | 5 | 4 | 0 | 5 |
| Gemisch 36 | 99 | 78 | 1 | 10 | 0 | 11 |
| Gemisch 37 | 0 | 0 | 5 | 7 | 95 | 92 |
| Gemisch 38 | 0 | 8 | 1 | 8 | 99 | 82 |
| Gemisch 39 | 5 | 17 | 0 | 10 | 95 | 78 |
| Gemisch 40 | 1 | 11 | 0 | 9 | 99 | 78 |
| Gemisch 41 | 90 | 78 | 5 | 8 | 5 | 13 |
| Gemisch 42 | 5 | 22 | 90 | 70 | 5 | 8 |
| Gemisch 43 | 5 | 13 | 5 | 13 | 90 | 74 |

Die folgenden Diagramme 11-14 stellen die tatsächlichen und die ermittelten %-Anteile der Bakteriengemische nebeneinander dar: Die Reihenfolge wurde auch hier der Übersicht halber gewählt.

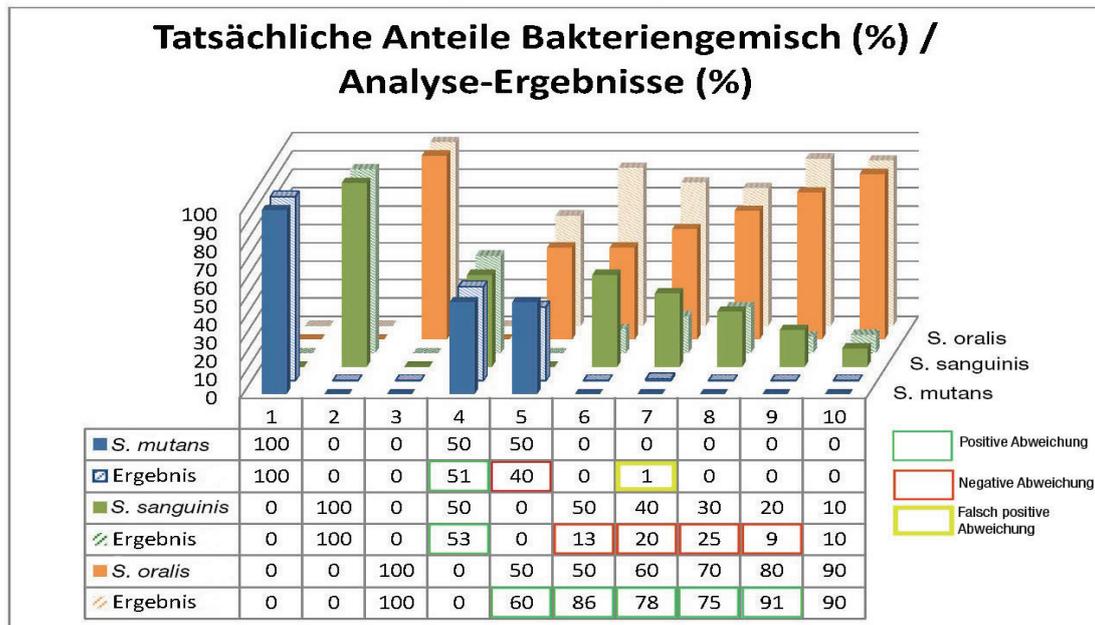


Abbildung 11: Prozentuale Bakterienanteile am Originalgemisch / Analyse-Ergebnisse (Gemische 1-10). Dargestellt an der y-Achse ist die prozentuale Abweichung und an der x-Achse das jeweilige Gemisch. Grün hinterlegt sind positive Abweichungen, rot negative und gelb falsch positive (Anteil an der Analyse, aber kein Anteil am Gemisch), falsch negativ (Anteil am Gemisch, aber kein Anteil an der Analyse).

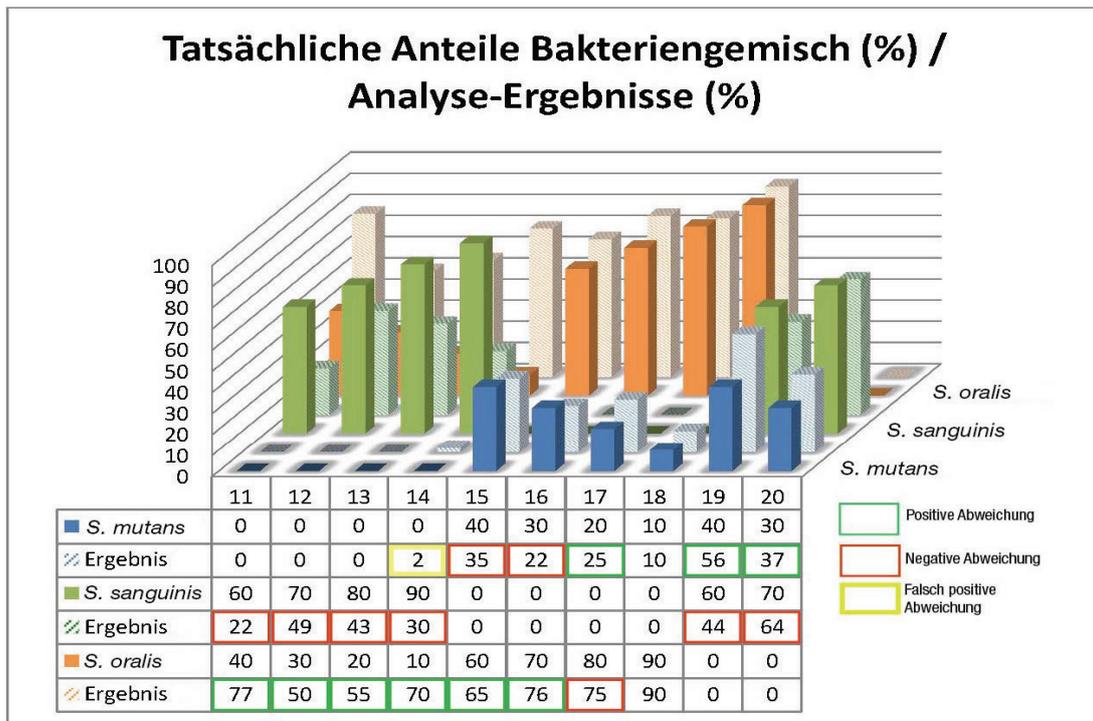


Abbildung 12: Prozentuale Bakterienanteile am Originalgemisch / Analyse-Ergebnisse (Gemische 11-20). Dargestellt an der y-Achse ist die prozentuale Abweichung und an der x-Achse das jeweilige Gemisch. Legende siehe Abbildung 11.

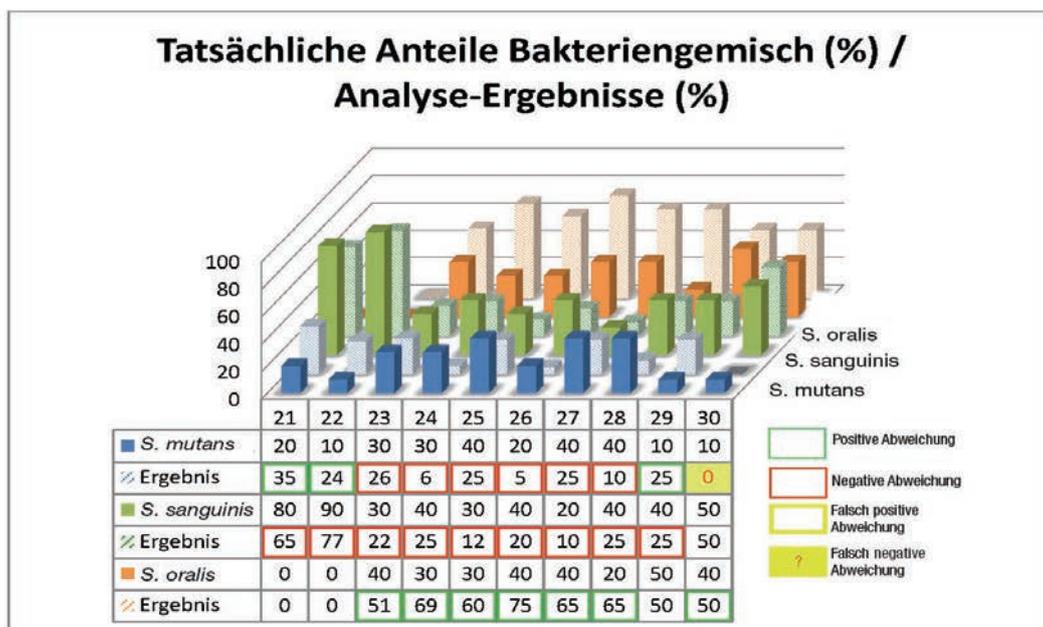


Abbildung 13: Prozentuale Bakterienanteile am Originalgemisch / Analyse-Ergebnisse (Gemische 21-30). Dargestellt an der y-Achse ist die prozentuale Abweichung und an der x-Achse das jeweilige Gemisch. Legende siehe Abbildung 11.

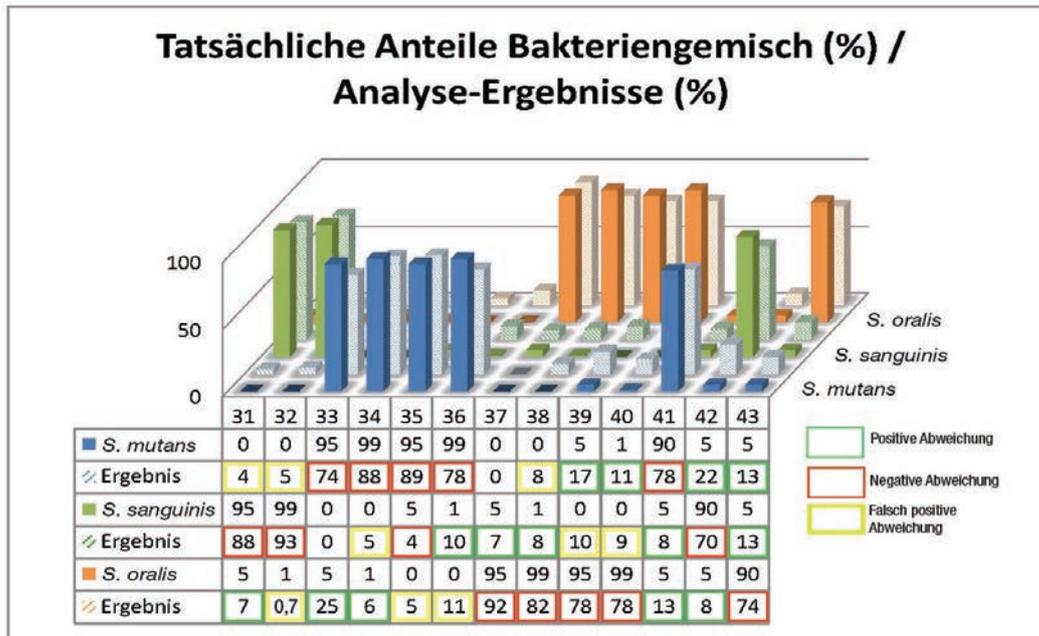


Abbildung 14: Prozentuale Bakterienanteile am Originalgemisch / Analyse-Ergebnisse (Gemische 31-43). Dargestellt an der y-Achse ist die prozentuale Abweichung und an der x-Achse das jeweilige Gemisch. Legende siehe Abbildung 11.

Bei Betrachtung der prozentualen Abweichungen in den Analyseergebnissen innerhalb der Mutans- (*S. mutans*) und der Mitis-Gruppe (*S. sanguinis* und *S. oralis*) (Abb. 11 bis 14) fällt auf, dass die Abweichungen von 0 bis maximal 60 % differieren. Größere Abweichungen imponieren vor allem bei den ternären Gemischen und hier vermehrt bei gleichzeitiger Beteiligung beider Bakterien der Mitis-Gruppe. Hierbei erfolgt die Verschiebung zumeist zu Gunsten von *S. oralis*, wie die Abbildungen 15 bis 17 verdeutlichen. Die prozentualen Abweichungen variieren demnach entsprechend der Beteiligung und dem Verwandtschaftsgrad der im Gemisch vorhandenen Bakterien.

S. mutans wurde in 33 % (14/43) mit exakter prozentualer Beteiligung analysiert, während ebenfalls in jeweils 33 % (14/43 und 15/43) positive und negative Abweichungen auftraten. Durchschnittlich lag die positive Abweichung bei +14 % (Min +4 %, Max +24 %), die negative Abweichung bei -9 % (Min -2 %, Max -17 %).

Die Beteiligung von *S. sanguinis* wurde in 26 % (11/43) exakt identifiziert, in 53 % (23/43) traten positive und in 21 % (9/43) negative Abweichungen auf. Die durchschnittliche positive Abweichung lag hier bei +18 % (Min +1 %, Max +60 %), die negative Abweichung betrug durchschnittlich -6 % (Min -2 %, Max -10 %).

S. oralis wurde ebenfalls in 26 % (11/43) korrekt analysiert. Positive Abweichungen traten in 7 Fällen auf (16 %), negative Abweichungen in 25 Fällen (58 %). Die durchschnittliche Höhe der positiven Abweichungen betrug +12 % (Min +3 %, Max +21 %), der negativen -3 % (Min -2 %, Max -60 %).

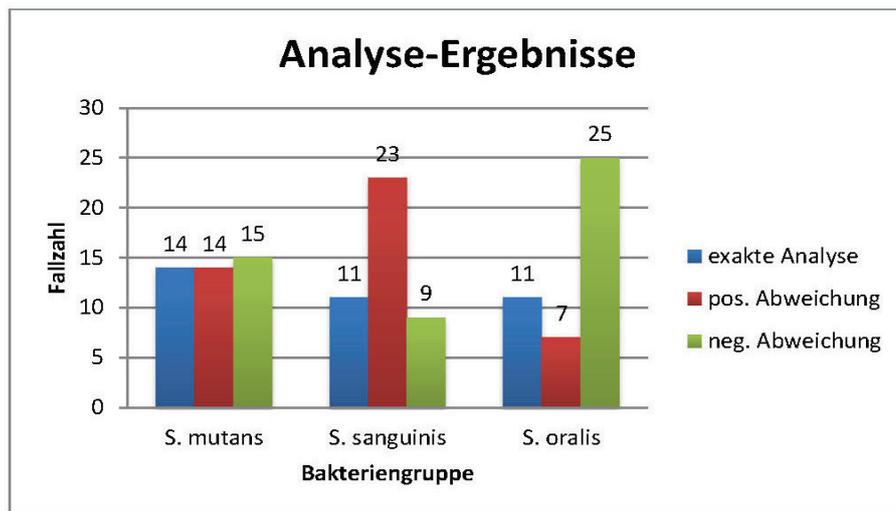


Abbildung 15: Unterteilung der Gemisch - Analyseergebnisse in pos. / neg. Abweichungen und exakte Analysen. An der y-Achse sind die Fallzahlen dargestellt, aufgetragen gegen die jeweilige Bakteriengruppe an der x-Achse.

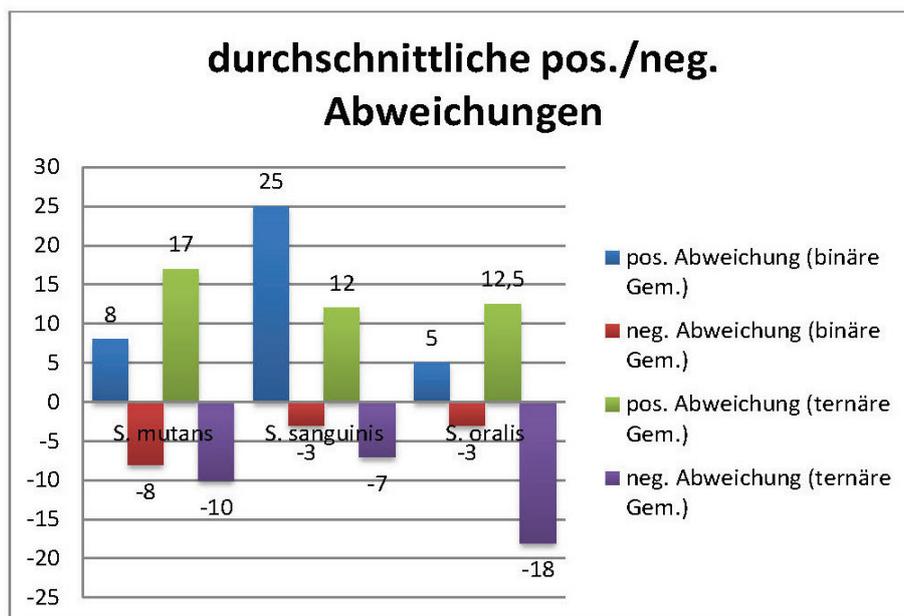


Abbildung 16: Durchschnittliche Abweichungen binäre / ternäre Gemische dargestellt an der y-Achse sind die Fallzahlen aufgetragen an der x-Achse sind die Bakterien *S. mutans*, *S. sanguinis* und *S. oralis* mit der jeweiligen Beteiligung.

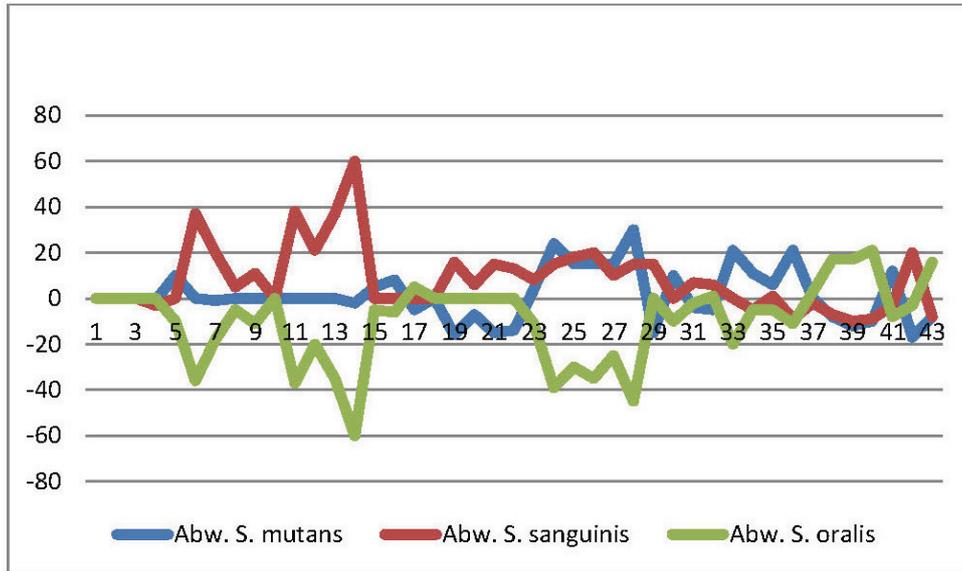


Abbildung 17: Prozentuale Abweichungen aller Gemische. Die y-Achse stellt die prozentuale Abweichung dar und die x-Achse das jeweilige Gemisch 1-43.

5. Diskussion

5.1 Fragestellungen

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit war, zu überprüfen, ob die Identifizierung und Quantifizierung des Keimes *S. mutans* mittels MALDI-TOF MS aus artifiziellen Bakteriengemischen möglich ist.

Insgesamt wurden 43 artifizielle Bakteriengemische aus Mutans- und Non-Mutans-Streptokokken mit der MALDI-TOF MS klassifiziert. Die qualitative Nachweisgrenze lag bei einem 10%-igen Anteil der Einzelstämme am Bakteriengemisch.

Oberhalb dieser Nachweisgrenze konnten die untersuchten Bakterien sicher mit der MALDI-TOF MS nachgewiesen werden. Einzig die prozentuale Abweichung divergierte abhängig von dem Verwandtschaftsgrad und der Anzahl der beteiligten Bakterienarten, wobei binäre und ternäre Gemische untersucht wurden. Eine genaue quantitative Auswertung ternärer Gemische war demzufolge nur dann möglich, wenn die untersuchten Arten in gleichen Anteilen vorlagen. Somit lag die Zahl der falsch positiven Ergebnisse in den ternären Gemischen vier Mal höher als in den binären Gemischen, und die Zahl der exakten Übereinstimmungen bei der Analyse ternärer Gemische erreichte nur ca. ein Fünftel derer binärer Gemische. Auch ein Vergleich der prozentualen Abweichungen innerhalb der Mitis- und der Mutans-Gruppe zeigte größere Differenzen in ternären Gemischen, die vor allem durch ein gleichzeitiges Vorkommen beider Arten der Mitis-Gruppe (*S. sanguinis* und *S. oralis*) verstärkt wurden. Eine Verschiebung erfolgte hier hauptsächlich zu Gunsten von *S. oralis* gegenüber *S. sanguinis*, was auf häufigere exklusive Peaks von *S. oralis* (16) im Vergleich zu *S. sanguinis* (9) zurückzuführen ist. Dies bedeutet für die Identifikation von Bakteriengemischen mit hohem Verwandtschaftsgrad Folgendes: Je näher die enthaltenen Bakterienisolate innerhalb des Gemisches verwandt sind, desto schwieriger gestaltet sich ihre Differenzierung. Die quantitative Analyse wird sich demnach zu Gunsten des Bakteriums verschieben, das mehr exklusive Peaks aufweist, so wie es sich bei den Experimenten zur vorliegenden Arbeit verhielt. Besonders erschwert wird die quantitative Analyse, wenn diese Peaks sehr nah beieinander liegen, da dies zu Überschneidungen führen kann. Gemische von Bakterien, die keine Ähnlichkeiten aufweisen, können nach Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit leichter qualitativ und auch quantitativ identifiziert werden. Es kann vermutet werden, dass eine exakte Identifikation mit sinkender Anzahl unterschiedlicher Bakterienarten im Gemisch an Genauigkeit zunimmt. Die in dieser Arbeit ermittelte Nachweisgrenze von 10 % sollte in künftigen Untersuchungen dazu

führen, dass Ergebnisse mit kleinerer Beteiligung am analysierten Gemisch sehr kritisch betrachtet werden, insbesondere unter Berücksichtigung der verwandtschaftlichen Ähnlichkeiten der betreffenden Arten. Bei der Erstellung der Datenbank wurden 60 Massenpeaks zur Analyse herangezogen. Diese Anzahl wurde u.a. gewählt, da die zu erweiternde Datenbank mit 60 Massenpeaks begonnen worden war und ein Ziel dieser Promotion war, eine einheitliche Datenbank zu erstellen und zum anderen wegen der in Abb. 4 dargestellten Ergebnisse zur Bestimmung der optimalen Anzahl von Massenpeaks zur Identifizierung von Mutans Streptokokken. Anhand dieser Anzahl war eine Identifizierung unbekannter Proben über einen paarweisen Vergleich der Peakmassenliste des unbekanntes Isolates mit der Artenliste und eine Bildung des „simple matching“-Koeffizienten möglich, was auch in künftigen Arbeiten weitergeführt werden kann. Die Art mit dem größten „simple matching“-Koeffizienten kann dann als identifizierte Art angesehen werden. Hier war entscheidend, dass sowohl die „Artenlisten“ in der Datenbank als auch die Peakmassenlisten unbekannter Isolate die gleiche Länge aufwiesen. Auf diese Weise konnten der Datenbank im Zuge der vorliegenden Arbeit 539 Wildtypisolate der Art *S. mutans* hinzugefügt werden. Zusätzlich wurden nicht eindeutige Ergebnisse sequenziert. Die ermittelten Ergebnisse stimmten mit den Ergebnissen früher durchgeführter artspezifischer PCR-Untersuchungen von Rupf et al. (2000) überein.

Darüber hinaus hatte die Arbeit zum Ziel, spezifische Peakmassen für drei Bakterienarten zu finden, um diese dann zur Identifikation in Gemischen zu nutzen. Die zuvor angewendete Technik unter Verwendung ganzer Cluster von Peakmassen konnte hier nicht angewandt werden, da Gemische zu veränderten Massenspektren führten, die mit Hilfe der Datenbank nicht mehr identifiziert werden konnten. Diese sogenannten „exklusiven“ Peaks sollten eine exakte Identifikation gewährleisten. Für jedes untersuchte Bakterium gab es solche artspezifischen Peaks. Diese waren in ihrer Häufigkeit pro Bakterium allerdings divergent. Das angewandte Verfahren erwies sich als nicht geeignet, um eine sehr große Datenbank zu erstellen. Mit zunehmender Anzahl der Bakterienarten tendierte die Anzahl der exklusiven Peaks gegen 0, da die unterschiedlichen Arten jeweils einen gemeinsamen und einen unterschiedlichen Anteil von Peakmassen aufwiesen, was bei großen Datenmengen zu Überschneidungen führt.

Die zweite Fragestellung der Arbeit war, ob bei der Identifizierung des Keims *S. mutans* aus klinischen Isolaten bisher angewandte molekulargenetische Methoden durch die ergänzende Anwendung von MALDI-TOF MS verbessert werden können. Dies konnte bestätigt werden, da bei nahezu allen untersuchten Isolaten eine korrekte Identifikation der Bakterien erzielt wurde und man somit von einem sicheren Verfahren zur Speziesidentifikation sprechen kann.

5.2 Methodik

Die Speziesdiagnostik von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS wird schon seit 1996 beschrieben (Claydon et al. 1996, Krishnamurthy et al. 1996a, Krishnamurthy u Ross 1996b), gewann aber in den letzten Jahren enorm an Bedeutung. Mehrere Autoren beschrieben bereits Verfahren zur Identifizierung nicht bekannter Isolate mit Hilfe der MALDI-TOF MS. Die Verfahren reichen von der Aufbereitung ganzer Bakterien (ICM-MS) und Bakterienlysate bis zum Auffinden bestimmter Proteine (Allmaier et al. 1995, Madonna et al. 2003). Edwards-Jones et al. verwendeten die ICM-MS 2003 zur Identifizierung methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* Stämme. In einer jüngeren Arbeit aus dem Jahr 2008 verwendeten Sen-Yung Hsieh et al. die MALDI-TOF MS zur Bestimmung und Klassifizierung von sechs humanpathogenen Bakterien aus Isolaten. Ebenfalls im Jahre 2008 wurde von einer Arbeitsgruppe um Sauer eine Datenbank mit 2.800 Bakterien erstellt, welche hauptsächlich aus einer Gattung gram-negativer Stäbchenbakterien (*Erwinia*) aus der Familie der Enterobakterien (*Enterobacteriaceae*) besteht (Sauer 2008).

Aktuelle Studien konnten die Verlässlichkeit der MALDI-TOF MS als kostengünstige, schnelle und zuverlässige Form der Diagnostik in der medizinischen Mikrobiologie für eine große Zahl von Bakterienspezies nachweisen (Alatoom et al. 2011, Brabuddhe et al. 2008, Bizzini et al. 2010, Cherkaoui et al. 2010, Cherkaoui et al. 2011, Couturier et al. 2011, Neville et al. 2011, Saffert et al. 2011, Saleeb et al. 2011). Sie ermöglicht eine Differenzierung zwischen pathogenen und nicht pathogenen Keimen, was sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin von entscheidender Bedeutung ist. Die Vorteile der MALDI-TOF MS liegen in dem geringen Aufwand nach der Kultivierung sowie in der Teilautomatisierung des Verfahrens.

Die geringen Mengen von Ziel-DNA in vielen Proben bringen herkömmliche DNA basierende quantitative Analysemethoden an ihre Grenzen. Auch bei der MALDI-TOF MS, welche nicht DNA basierend ist, ist eine exakte quantitative Analyse grundsätzlich bislang nur eingeschränkt gewährleistet, da die einzelnen Bestandteile des Gemisches unterschiedliche Ionisationswahrscheinlichkeiten aufweisen, was zu Suppressionseffekten führen kann (Krause et al. 1999). Des Weiteren kann es aufgrund einer ungleichmäßigen Analytenverteilung auf dem Target zu signifikanten Variationen der gemessenen Ionenintensitäten kommen. Weitere potentielle Probleme liegen in dem nicht reproduzierbaren Applikationsvorgang der Probe, der heterogenen Oberfläche des Targets sowie Schwankungen der Laserintensität. Einige Studien

beschäftigen sich daher mit der Einführung verbesserter Versuchsbedingungen, wie dem Einsatz von ionischen Matrices, was zu guten Kalibrierungen sowie einer guten Linearität und Reproduzierbarkeit führte (Armstrong et al. 2001, Li und Gross 2004).

Andere Studien zeigten wiederum gute Ergebnisse beim Einsatz der MALDI-TOF MS in der quantitativen Analyse (Wittmann und Heinzle 2001, Duncan et al. 1993, Sleno und Volmer 2005, 2006). Zusammenfassend muss gesagt werden, dass diese vielversprechende Methode weitergehend untersucht werden muss, um aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können.

Im Rahmen der Vorversuche wurden Auswertungsparameter untersucht und modifiziert. Zur Identifizierung der Mutans-Streptokokken-Isolate wurden zwei statistische Verfahren untersucht: Das erste beruhte auf gesamten Peakmassenlisten klinischer Isolate, das zweite auf dem Vergleich artspezifischer Peakmassen, die in den zusammengefassten Peakmassenlisten der Vertreter einer Art gesucht wurden.

Die Erstellung einer Datenbank mit artspezifischen Peakmassen war abhängig von der Anzahl der verwendeten Arten in der Datenbank.

Es wurden artspezifische Peakmassen aus den Artenlisten der Mutans-Streptokokken und der untersuchten oralen Streptokokken gebildet. Mit steigender Anzahl der in die Auswertung einbezogenen Arten sank die Anzahl spezifischer Peakmassen für die einzelnen Arten. Somit erwies es sich als sinnvoll, gesamte Peakmassenlisten als Fingerprint für die Erstellung der Datenbank zu nutzen, da die artspezifischen Peakmassen mit zunehmender Größe der Datenbank gegen null tendiert hätten (siehe Tabelle 7).

Zur statistischen Auswertung wurde das hierarchische Clustering mit agglomerativem Ansatz gewählt. Die Clusteranalyse ist eine Technik des *Data Mining*, welches die Analyse großer Datenmengen bezeichnet, indem sie zuvor reduziert und damit interpretierbar gemacht werden. Die Clusteranalyse bedient sich der Algorithmen, um Strukturen in den Daten erkennen, sie danach zu gruppieren und so auf die relevanten Informationen zu reduzieren. Ziel der Analyse ist es, ein den Daten zugrunde liegendes Modell zu finden, das deren Interpretation erleichtert, wofür die betreffenden Objekte zunächst anhand vorhandener Ähnlichkeiten bestimmter Merkmale klassifiziert werden. Die so entstehenden Gruppen werden *Cluster* genannt. Im Unterschied zur *Klassifikation* stehen hierbei die Gruppen nicht schon im Vorhinein fest und die Objekte werden ihnen systematisch zugeordnet, sondern sie werden erst implizit vom jeweiligen Algorithmus gebildet. Man spricht daher von „unüberwachtem Lernen“. Bei der Zuordnung wird, wie bei der Klassifikation, davon ausgegangen, dass Objekte einer Gruppe sich ähnlich sind, während Objekte unterschiedlicher Gruppen sich unähnlich sind. Clusteralgorithmen beruhen somit auf der Berechnung der Ähnlichkeit der zu untersuchenden

Objekte. In dieser Arbeit galten die gemessenen Spektren als Input für die Ähnlichkeitsberechnung.

Es existieren zwei große Gruppen von Clusteralgorithmen: die hierarchischen Algorithmen und das Partitionierungsverfahren. Das Partitionierungsverfahren bildet nur eine Ebene von Clustern.

Bei der vorliegenden Arbeit kam das hierarchische Clustering zum Einsatz. Hierbei wird eine Struktur von Clustern gebildet, bei der kleinere Cluster in größeren Clustern enthalten sind, wobei die kleinsten jeweils nur ein Objekt enthalten. Dieses Verfahren wird in agglomerative und divisive Methoden unterteilt. Typen von hierarchischen Verfahren sind die Bottom-Up-Konstruktion eines Dendrogramms (agglomerative) oder die Top-Down-Konstruktion des Dendrogramms (divisive).

Beim agglomerativen hierarchischen Clustering werden initiale Cluster gebildet, die jeweils aus einem Objekt bestehen und die Distanzen zwischen allen Paaren dieser Cluster bestimmen. Danach wird ein neuer Cluster generiert aus den zwei Clustern, die die geringste Distanz zueinander haben. Zum Schluss wird die Distanz zwischen dem neuen Cluster und allen anderen generiert. Das Ziel ist, dass sich alle Objekte in einem Cluster befinden (Ester et al 2003). Kaufman und Rousseeuw (1990) beschreiben eine Divisive Clustering Procedure (Diana) wie folgt: Starte mit einem Cluster, der alle Beobachtungen enthält. Berechne den Durchmesser aller Cluster. Der Durchmesser ist die maximale Distanz oder Unähnlichkeit aller Objekte innerhalb des Clusters. Der Cluster mit dem größten Durchmesser wird in zwei Cluster geteilt. Dazu wird das Objekt in dem Cluster bestimmt, das die größte durchschnittliche Distanz oder Unähnlichkeit zu allen anderen Objekten hat. Es bildet den Kern der "Splittergruppe". Jedes Objekt, das näher an der Splittergruppe liegt als an den restlichen Objekten, wird nun der Splittergruppe zugeordnet. Die Schritte 2-5 werden solange wiederholt, bis alle Cluster nur noch ein Objekt enthalten. Die agglomerative Methode fasst, ausgehend von allen Daten, die ähnlichsten schrittweise zusammen, die divisive beginnt mit einem Cluster, welches in immer heterogenere Cluster aufgeteilt wird.

In dieser Arbeit wurde das agglomerative Verfahren angewendet.

Eine weitere Aufteilung der Verfahren kann in harte und weiche Clusteralgorithmen erfolgen. Bei der harten Methode wird jeder Datenpunkt exakt einem Cluster zugeordnet, während bei der weichen Methode jedem Datenpunkt eine Wahrscheinlichkeit zugeordnet wird, mit der er zu jedem existierenden Cluster gehört.

Die Arbeit beschäftigte sich nicht mit der Identifikation der Bakterien bis auf Subspezies-Ebene, sondern mit der Identifikation auf Ebene der Art (syn. Spezies). Die taxonomische

Einteilung der Bakterien erfolgt mittels phylogenetischer Analyse des 16S rRNS Gens (Woese et al. 1985). Um Bakterien mit Hilfe der MALDI-TOF-Technologie identifizieren zu können, muss zunächst die Reproduzierbarkeit der Spektren gewährleistet werden. Daher wurden die Messparameter standardisiert, um die Spektren untereinander vergleichbar zu machen. Hierzu zählt sowohl die Standardisierung in den Vorbereitungsschritten, die Faktoren wie die Konstanz der Wachstums- und Kulturbedingungen der Bakterien (Krader und Emerson, 2004) und die Probenpräparation beinhaltet, als auch identische Geräteeinstellungen vor den Messungen. Die erhaltenen Summenspektren wurden zu Masterspektren addiert und auf ein Superspektrum angepasst.

Bei den Peakmassen wurde die Häufigkeit und Intensität ihres Vorkommens betrachtet. Solche, die in jedem Summenspektrum vorkamen, erhielten im Masterspektrum ein stärkeres Gewicht als solitär vorkommende Peakmassen. So war es möglich genauere und reproduzierbarere Daten zu erhalten. Innerhalb der Masterspektren kam es durch eine Mittelung der relativen Intensitäten zu einer Verbesserung der Reproduzierbarkeit gegenüber den Summenspektren. Da in vorhergegangenen Arbeiten beobachtet werden konnte, dass es einen Unterschied macht, ob die Spektren aus einem Flüssigmedium oder von einem Festmedium gewonnen wurden (Conway et al. 2001), entschieden wir uns einheitlich für das Flüssigmedium. Die in der klinischen Studie erhaltenen Bakterienkolonien wurden von einem Festmedium (MSB-Agar) in ein Flüssigmedium überführt. Vor jeder Messung wurde das Gerät mittels eines *E. coli* Standards kalibriert. Hierbei üben nach Williams et al. (2003) vor der Messung einwirkende Größen den größten Einfluss auf die Qualität und Reproduzierbarkeit der Spektren aus. Als Matrix wurde ausschließlich α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure verwendet. Die Vorteile liegen hier in der höheren Messgenauigkeit, vor allem im Messbereich zwischen 2000-5000 Da, und der größeren Homogenität. Andere Matrices weisen ab 5000 Da eine höhere Genauigkeit auf. In der Literatur beschrieben wurden α -Cyano-4-Hydroxymizim-, Sinapin- und Ferulasäure für die Aufnahme der Spektren (Jarman et al. 1999, Lynn et al. 1999, Nilsson 1999).

5.3 Folgerungen

Zusammenfassend kann anhand der Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden, dass mit der MALDI-TOF MS ein relativ sicheres Verfahren zur Speziesidentifikation auf Taxon-Ebene vorliegt, da fast alle untersuchten Bakterienisolate korrekt identifiziert werden konnten. Bedingt eignet sich das Verfahren auch für die Identifikation von Bakteriengemischen, wobei hier eine große Anzahl von Bakterienarten im Gemisch sowie eine Verwandtschaft zwischen den zu analysierenden Spezies klar als limitierende Faktoren angesehen werden müssen. Die Problematik der Identifikation eng verwandter Arten ist auch in der Literatur beschrieben (Saleeb et al. 2011). Hier gälte es in nachfolgenden Arbeiten zu überprüfen, ob die Aufnahme weiterer Datenbankeinträge pro Spezies zu einer verbesserten Identifikation mit der MALDI-TOF MS führen könnte. Einige Autoren fordern für eine valide Identifikation mit diesem Verfahren einen Ausbau der existierenden Datenbanken mit mindestens fünf bis zehn Einträgen pro Bakterienart, um die Unterschiede innerhalb einzelner Spezies besser zu dokumentieren (Alatoom et al. 2011, Lartigue et al. 2009). In diversen aktuellen Studien sind Berichte über falsche Speziesidentifikationen zu finden, die auf ungenaue und falsche Datenbankeinträge zurückzuführen sind (Seng et al. 2009, Bizzini et al. 2010, van Veen et al. 2011).

Die Vorteile der MALDI-TOF MS, die anhand der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnten, liegen zum Einen in den geringen Mengen, die von einer gewachsenen Kolonie oder einem Bakteriengemisch für die Analyse zur Verfügung stehen müssen, und zum Anderen im zeitlichen Erhalt des Ergebnisses. Der mikrobiologische Befund ist bis zu zwei Tage schneller verfügbar als bei herkömmlichen biochemischen Methoden zur Identifizierung von Bakterienarten. Besonders bei Krankheitserregern, die eine schnelle Therapie erfordern, ist dies von großem Interesse für die Humanmedizin und kann mitunter einen schweren Krankheitsverlauf mit möglicher Todesfolge verhindern. Darüber hinaus greift die MALDI-TOF MS das Problem der Selektivkultivierung auf. Sie ermöglicht eine Bestimmung und Zuordnung sowohl bekannter als auch unbekannter Isolate und Gemische, was einer Fehlinterpretation durch ausschließliche Selektivkultivierung vorbeugen kann. Mit einem Zeitaufwand von ca. 1 Minute für den Probenauftrag auf die Targetplatte und weiteren 2 Minuten für die Messung handelt es sich weiterhin um ein sehr schnelles Verfahren. Die Materialverbrauchskosten für die MALDI-TOF MS sind überdies sehr gering. All diese Eigenschaften sprechen für einen routinemäßigen Einsatz zur Identifikation von *S. mutans* und auch anderer Mikroorganismen in Ergänzung zu herkömmlichen molekulargenetischen Methoden.

6. Literaturverzeichnis

1. Aas JA, Griffen AL, Diadis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Paster BJ (2008) Dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 46: 1407–1417
2. Addy M, Dummer PM, Griffiths G, Hicks R, Kingdom A, Shaw WC (1986) Prevalence of plaque, gingivitis and caries in 11-12-year-old children in South Wales. *Comm Dent Oral Epidemiol.* 14: 115-118
3. Adriaens PA, de Boever JA, Loesche WJ (1988) Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J Periodontol* 59: 222-230
4. Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najjar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferretti JJ (2002) Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 14434-14439
5. Al-Robaity S, Rupf S, Eschrich K. (2001) Rapid competitive PCR using melting curve analysis for DNA quantification. *Biotechniques* 31: 1382-1388
6. Alaluusua S, Renkonen OV (1983) *Streptococcus mutans* establishment and dental caries experience in children from 2 to 4 years old. *Scand J Dent Res* 91: 453-457
7. Alatoon AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R (2011) Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 49: 2868-2873
8. Allmaier G, Schaffer C, Messner P, Rapp U, Mayer-Posner FJ (1995) Accurate determination of the molecular weight of the major surface layer protein isolated from *Clostridium thermosaccharolyticum* by time-of-flight mass spectrometry. *J Bacteriol* 177: 1402-1404
9. Anhalt JP, Fenselau C (1975) Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* 47: 219-225
10. Arnold RJ, Reilly JP (1998) Fingerprint matching of *E. coli* strains with Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of whole cells using a modified correlation approach. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12: 630-636
11. Attin T, Siegel S, Buchalla W, Lennon AM, Hannig C, Becker K (2004) Brushing abrasion of softened and remineralised dentin: An in situ study. *Caries Res* 38: 62-66

12. Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simón-Soro A, Pignatelli M, Mira A (2012)
The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 1: 46-56
13. Banas JA und Vickerman MM (2003)
Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med.* 14: 89–99
14. Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, Chakraborty T, Hain T (2008)
Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 74: 5402-5407
15. Baron EJ (1996)
Section 1: Bacteriology, Chapter 3: Classification. In: Baron S. *Medical Microbiology.* University of Texas Medical Branch, Galveston
16. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL (2002)
Bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 40: 1001–1009
17. Becker MR, Weizenegger M, Bartel J (1999)
Reverse Hybridization Assay for Rapid Identification of Periodontitis-Associated Interleukin-1 Allele. *Clin Lab* 9+10: 499-505
18. Beighton D, Hardie JM, Whiley RA (1991)
A scheme for the identification of viridans streptococci. *J Med Microbiol* 35: 367–372
19. Beighton D, Russell RR, Hayday H (1981)
The isolation and characterization of *Streptococcus mutans* serotype h from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Gen Microbiol* 124: 271-279
20. Beltran-Aguilar ED, Goldstein JW, Lockwood SA (2000)
Fluoride varnishes. A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *J Am Dent Assoc* 131: 589-596
21. Berkowitz RJ, Jordan HV, White G (1975b)
The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouths of infants. *Arch Oral Biol* 20: 171-174
22. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'homme G (2010)
Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 48: 1549-1554
23. Blagus R, Lusa L (2013)
Improved shrunken centroid classifiers for high-dimensional class-imbalanced data. *BMC bioinformatics* 14: 64
24. Bowden GH (1997)
Possibilities for modifying the caries attack by altering the oral microflora. *J Can Dent Assoc* 50: 169–172

25. Bowden GH, Hamilton IR (1987)
Environmental pH as a factor in the competition between strains of the oral streptococci *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, and „*S. mitior*“ growing in continuous culture. *Can J Microbiol* 33: 824-827
26. Bowen WH (1996)
Salivary influences on the oral microflora. In: *Saliva and oral health*. Edgar WM, O’Mullane DM, eds. 2nd ed. *British Dental Journal*: 95-103
27. Bowen WH, Koo H (2011)
Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 45: 69-86
28. Brailsford SR, Sheehy EC, Gilbert SC, Clark DT, Kidd EA, Zoitopoulos L, Adams SE, Visser JM, Beighton D (2005)
The microflora of the erupting first permanent molar. *Caries Res* 39: 78-84
29. Breitung K (2007)
Untersuchung von Mutans-Streptokokken mittels “Intakt cell matrix- assisted laser desorption/ ionisation time-of-flight Massenspektrometrie. Zahnmedizinische Dissertation Universität Leipzig
30. Busse HJ, Denner EB, Lubitz W (1975)
Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem. Overview of methods used in bacterial systematics. *J Biotechnol* 47: 3-38
31. Catalanotto FA, Shklair IL, Keene HJ (1975)
Prevalence and localization of *Streptococcus mutans* in infants and children. *J Am Dent Assoc* 91: 606-609
32. Caufield PW, Walker TM (1989)
Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphism. *J Clin Microbiol* 27: 274-278
33. Caufield PW, Wannemuehler Y, Hansen JB (1982)
Familial clustering of the *Streptococcus mutans* cryptic plasmid strain in a dental clinic population. *Infect Immun* 38: 785-787
34. Chen P, Novak J, Kirk M, Barnes S, Qu F, Caufield PW (1998)
Structure-activity study of the lantibiotic mutacin II from *Streptococcus mutans* T8 by a gene replacement strategy. *Appl Environ Microbiol* 64: 2335-2340
35. Chen T, Abbey K, Deng WJ, Cheng MC (2005)
The bioinformatics resource for oral pathogens. *Nucleic Acids Res* 33 (Web Server issue): W734-740
36. Chen T, Hosogi Y, Nishikawa K, Abbey K, Fleischmann RD, Walling J, Duncan MJ (2004)
Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 186: 5473-5479

37. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, Schrenzel J (2010) Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol* 48(4): 1169–75
38. Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N (2005) Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol* 43: 843–849
39. Cirino SM, Scantlebury S (1998) Dental caries in developing countries. Preventive and restorative approaches to treatment. *N Y State Dent J* 64: 32-39
40. Clarke JK (1924) On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *British J Exp Pathol* 5: 141-147
41. Claydon MA, Davey SN, Edwards-jones V, Gordon DB (1996) The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 14: 1584-1586
42. Conway GC, Smole SC, Sarracino DA, Arbeit RD, Leopold PE (2001) Phyloproteomics: species identification of *Enterobacteriaceae* using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 103-112
43. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995) Microbial biofilms. *Ann Rev Microbiol* 49: 711-745
44. Cotter RJ (1992) *Anal Chem* 64: 1027A-1039A
45. Couturier MR, Mehinovic E, Croft AC, Fisher MA (2011) Identification of HACEK clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 49: 1104-1106
46. Coykendall JB (1989) Classification and identification of the viridans streptococci. *Clin Microbiol Rev* 2: 315-328
47. Davis CP (1996) Section 1: Bacteriology. Chapter 6: Normal Flora. In: Baron S. *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch, Galveston
48. de Soet JJ, van Dalen PJ, Russell RR, de Graaff J (1990) Identification of mutans streptococci with monoclonal antibodies. *Antonie Van Leeuwenhoek* 58: 219-225
49. de Soet JJ, Weerheijm KL, van Amerongen WE, de Graaff J (1995) A comparison of the microbial flora in carious dentine of clinically detectable and undetectable occlusal lesions. *Caries Res* 29: 46-49
50. Demirev PA, Lin JS, Pineda FJ, Fenselau C (2001) Bioinformatics and mass spectrometry for microorganism identification: proteome-wide

post-translational modifications and database search algorithms for characterization of intact *H. pylori*. *Anal Chem* 73: 4566-4573

51. Dreizen S, Brown LR, Handler S, Levy BM (1976)
Radiation-induced xerostomia in cancer patients. Effect on salivary and serum electrolytes. *Cancer* 38: 273-278
52. Duchin S, van Houte J (1978)
Colonization of teeth in humans by *Streptococcus mutans* as related to its concentration in saliva and host age. *Infect Immun* 20: 120-125
53. Duncan MJ (2003)
Genomics of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 14: 175-187
54. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB (2000)
Identifizierung methicillinresistenter *Staphylococcus aureus* Stämme . *J Med Microbiol* 49 (3): 295-300
55. Edwardsson S, Mejare B (1978)
Streptococcus milleri (Guthof) and *Streptococcus mutans* in the mouths of infants before and after tooth eruption. *Arch Oral Biol* 23: 811-814
56. Ekstrand KR, Zero DT (2012)
Die Ökologie der Mundhöhle. In: *Karies -Wissenschaft und Klinische Praxis*, 1. Auflage
Stuttgart: Thieme-Verlag 2012
57. Ericson D, Zimmerman M, Raber H, Gotrick B, Bornstein R, Thorell J (1999)
Clinical evaluation of efficacy and safety of a new method for chemo-mechanical removal of caries. A multi-centre study. *Caries Res* 33: 171-177
58. Ester M, Sander J, Aßfalg J, Böhm C, Borgwardt K, Januzaj E, Kailing K, Kröger P, Schubert M, Zimek A (2003) *Knowledge Discovery in Databases, KDD I : Kapitel 5 Clustering*.
59. Evason DJ, Claydon MA, Gordon DB (2001)
Exploring the limits of bacterial identification by intact cell-mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 12: 49-54
60. Facklam R (2002)
What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 15: 613-30
61. Fenselau C, Demirev PA (2001)
Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 20: 157-171
62. Fitzgerald RJ, Keyes PH (1960)
Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J Am Dent Assoc* 61: 9-19
63. Flemmig TF, Christgau M, Karch H (1999)
Mikrobiologische Diagnostik marginaler Parodontopathien, (Gemeinsame Stellungnahme von DGP und DGZMK), *Hygiene und Mikrobiologie* 4/99: 15-16

64. Foster KR (2005)
Hamiltonian Medicine: Why the social lives of pathogens matter. *Science* 308: 1269-1270
65. Fox GE, Pechmann KR, Woese CR (1977)
Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: Molecular approach to procar-
yotic systematics. *Int J Syst Bacteriol* 27: 44-57
66. Gibbons RJ (1989)
Bacterial adhesion to oral tissue: a model for infectious diseases. *J Dent Res* 68: 750–760
67. Gold OG, Jordan HV, van Houte J (1973)
A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 18: 1357-1364
68. Goldman M, Kronman JH (1976)
A preliminary report on a chemomechanical means of removing caries. *J Am Dent Assoc*
93: 1149-1153
69. Gorm Jensen T, Bossen Konradsen H, Bruun B (1999)
Evaluation of the Rapid ID 32 Strep system. *Clin Microbiol Infect* 5: 417–423
70. Gorski A, Weber-Dabrowska B (2005)
The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. *Cell*
Mol Life Sci 62: 511-519
71. Greiss HK und Ivanusch L (2006)
Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Adhärenz von *Streptococcus mutans* an
zahnärztlichen Werkstoffen .Medizinische Dissertation, Universität Heidelberg
72. Grönroos L, Alaluusua S (2000)
Site-specific oral colonization of mutans streptococci detected by arbitrarily primed PCR
fingerprinting. *Caries Res* 34: 474-480
73. Grönroos L, Saarela M, Mättö J, Tanner-Salo U, Vuorela A, Alaluusua S (1998)
Mutacin production by *Streptococcus mutans* may promote transmission of bacteria from
mother to child. *Infect Immun* 66: 2595-2600
74. Gu F, Lux R, Anderson MH, del Aguila MA, Wolinsky L, Hume WR, Shi W (2002)
Analyses of *Streptococcus mutans* in saliva with species-specific monoclonal antibodies.
Hybrid Hybridomics 21: 225-232
75. Guilhaus M (1995)
J Mass Spectrom 30: 1519-1532
76. Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz T, Suerbaum S (2009)
Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 6. Auflage, Springer 2009
77. Hamada S, Slade HD (1980b)
Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 44:
331-384
78. Hannig M (1999)
Effect of Carisolv solution on sound, demineralized and denatured dentin—an ultrastruc-
tural investigation. *Clin Oral Investig* 3: 155-159

79. Hannig C, Ruggeri A, Al-Khayer B, Schmitz P, Spitzmüller B, Deimling D, Huber K, Hoth-Hannig W, Bowen WH, Hannig M (2008)
Electron microscopic detection and activity of glucosyltransferase B, C, and D in the in situ formed pellicle. *Arch Oral Biol* 53: 1003-10
80. Hardie JM (1986)
Oral streptococci. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 2. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, Hrsg. Baltimore, Maryland: Williams & Wilkins: 1059-1063
81. Hellwig E (1999)
Einführung in die Zahnerhaltung / Elmar Hellwig, Joachim Klimek, Thomas Attin. - 2. Aufl. - München; Jena: Urban und Fischer 1999
82. Henderson B, Wilson M (1998)
Commensal communism and the oral cavity. *J Dent Res* 77: 1674-1683
83. Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT (1991)
Anal Chem 63: A1193-A1203
84. Hillenkamp F, Karas M (1988)
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem* 60: 2299-2301
85. Hillman JD, Novak J, Sagura E, Guierrez JA, Brooks TA, Crowley PJ, Hess M, Azizi A, Leung K, Cvitkovitch D, Bleiweis AS (1998)
Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 66: 2743-2749
86. Holt JG (1984-1989)
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. First edition. Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore
87. Hsieh SY, Tseng CL, Lee YS, Kuo AJ, Sun CF, Lin YH, Chen JK (2008)
Highly Efficient Classification and Identification of Human Pathogenic Bacteria by MALDI-TOF MS, *Mol Cell Proteomics*. 7(2): 448-56
88. Ida H, Igarashi T, Goto N, Sasa R (1998)
Identification of *Streptococcus mutans* by dexA DNA probe. *Pediatr Dent J* 8: 1-5
89. Ida H, Igarashi T, Yamamoto A, Goto N, Sasa R (1999)
A DNA probe specific to *Streptococcus sobrinus*. *Oral Microbiol Immunol* 14: 233-237
90. Iwami Y, Yamada T (1985)
Regulation of glycolytic rate in *Streptococcus sanguis* grown under glucose-limited and glucose-excess conditions in a chemostat. *Infect Immun* 2: 378-381
91. Jarman KH, Cebula ST, Saenz AJ, Petersen CE, Valentine NB, Kingsley MT, Wahl KL (2000)
An algorithm for automated bacterial identification using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 72: 1217-1223

92. Jensen B, Bratthall D (1989)
A new method for the estimation of mutans streptococci in human saliva. *J Dent Res* 68, 468-471.
93. Jordan HV (1986)
Cultural methods for the identification and quantitation of *Streptococcus mutans* and lactobacilli in oral samples. *Oral Microbiol Immunol* 1: 23-27
94. Jordan C, LeBlanc DJ (2002)
Influences of orthodontic appliances on oral populations of mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 17: 65-71
95. Kaetzke A, Eschrich K (2002)
Simultaneous determination of different DNA sequences by mass spectrometric evaluation of Sanger sequencing reactions. *Nucleic Acids Res* 30: e117
96. Kalsbeek H und Verrips GH (1990)
Dental caries prevalence and the use of fluorides in different European countries. *J Dent Res* 69 Spec No: 728-32: discussion 820-823
97. Karoly P, Orsolya S, Kiss A and Naar Z (2012)
Comparison and evaluation of molecular methods used for identification and discrimination of lactic acid bacteria. *J Sci Food Agric* 92: 1931–1936
98. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T (1995)
Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* 45: 406-408
99. Kaufman L, Rousseeuw PJ (1990)
Finding Groups in Data. An Introduction to Cluster Analysis. Wiley, New York
100. Kelstrup J, Richmond S, West C, Gibbons RJ (1970)
Fingerprinting human oral streptococci by bacteriocin production and sensitivity. *Arch Oral Biol* 15: 1109-1116
101. Kikuchi K, Enari T, Totsuka K, Shimizu K (1995)
Comparison of phenotypic characteristics, DNA-DNA hybridization results, and results with a commercial rapid biochemical and enzymatic reaction system for identification of viridans group streptococci. *J Clin Microbiol* 33: 1215–1222
102. Kilian M (2001)
Recommended conservation of the names *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus cricetus*, and seven other names included in the Approved List of Bacterial Names. Request for an opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 723-724
103. Klein SP, Bohannon HM, Bell RM, Disney JA, Foch CB, Graves RC (1985)
The cost and effectiveness of school-based preventive dental care. *Am J Public Health* 75: 382-391
104. Kleinberg I (2002)
A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in den-

- tal caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. Crit Rev Oral Biol Med 13: 108-125
105. Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Tietze W, Stöber L (1998)
Die mikrobielle Mundhöhlenbesiedlung als Grundvoraussetzung des Kariesrisikos – Eine Übersicht der Befunde der Kinder aus der Erfurter Studie. In: Stöber, L. (Hrsg.): Kariesdynamik und Kariesrisiko. Berlin: Quintessenz-Verl.: 201-213
 106. Köhler B, Bratthall D (1978)
Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. Scand J Dent Res 86: 35-42
 107. Kolenbrander PE (2000)
Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annu Rev Microbiol 54: 413–437
 108. König KG (1990)
Root lesions. Int Dent J. 40: 283-288
 109. König KG (1971)
Karies und Kariesprophylaxe. München: Goldmann
 110. Krishnamurthy R, Ross PL (1996b)
Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry analysis of whole cells. Rap Commun Mass Spectrom 10: 1992-1996
 111. Krishnamurthy T, Ross PL, Rajamani U (1996 a)
Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rap Commun Mass Spectrom 10: 883-888
 112. Kuramitsu HK (1993)
Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. Crit Rev Oral Biol Med 4: 159-176
 113. Lager A, Thornqvist E, Ericson D (2003)
Cultivable bacteria in dentine after caries excavation using rose-bur or carisolv. Caries Res 37: 206-211
 114. Lartigue M-F, Héry-Arnaud G, Haguenoer E, Domelier A-S, Schmit P-O, van der Meer-Marquet N, Lanotte P, Mereghetti L, Kostrzewa M, Quentin R (2009)
Identification of *Streptokokkus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 47: 2284-2287
 115. Larzul D, Guigue F, Sninsky JJ, Mack DH, Brechot C, Guesdon JL (1998)
Detection of hepatitis B virus sequences in serum by using in vitro enzymatic amplification. J Virol Methods 20: 227-237
 116. Laurisch L (1997)
Neues selektives Nährmedium zum Nachweis von *Streptococcus mutans*. München: Patentschrift Nr. 197 24 970.1

117. Len AC, Harty DW, Jacques NA (2004)
Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology* 150: 1339-1351
118. Li J, Helmerhorst, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socrasnsky SS, Oppenheim FG (2004)
Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 97: 1311–1318
119. Li Y, Caufield PW (1995)
The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res* 74: 681-685
120. Li Y, Caufield PW (1998)
Arbitrarily primed polymerase chain reaction fingerprinting for the genotypic identification of mutans streptococci from humans. *Oral Microbiol Immunol* 13, 17-22
121. Li Y, Wang W, Caufield PW (2000)
The fidelity of mutans streptococci transmission and caries status correlate with breast-feeding experience among Chinese families. *Caries Res* 34: 123-132
122. Listgarten MA (1986)
Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 13: 418-430
123. Loesche WJ (1986)
Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50: 353-380
124. Lottspeich F, Zorbas H (1998a)
Bioanalytik. Kapitel 14: Massenspektrometrie. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
125. Lottspeich F, Zorbas H (1998b)
Bioanalytik. Kapitel 24: Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum. Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
126. Ma Y, Marquis RE (1997)
Thermophysiology of *Streptococcus mutans* and related lactic-acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 72: 91-100
127. Madonna AJ, Voorhees KJ, Taranenko NI, Laiko VV, Doroshenko VM (2003)
Detection of cyclic lipopeptide biomarkers from *Bacillus* species using atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 75: 1628-1637
128. Marquis RE (1990)
Diminished acid tolerance of plaque bacteria caused by fluoride. *J Dent Res* 69 672-675, Diskussion 682-683
129. Marsh P, Martin MV, Deutsche Übersetzung von Callaway A (2003)
Orale Mikrobiologie. 1. Aufl. Stuttgart: Thieme-Verlag

130. Marsh PD (1989)
Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions. *J Dent Res* 68: 1567-1575
131. Marvin LF, Roberts MA, Fay LB (2003)
Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* 337: 11-21
132. Matsumoto K, Hossain M, Hossain MM, Kawano H, Kimura Y (2002)
Clinical assessment of Er,Cr:YSGG laser application for cavity preparation. *J Clin Laser Med Surg* 20: 17-21
133. Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP (2000)
Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Res* 79: 1371-1377
134. Minah GE, Loesche WJ (1977)
Sucrose metabolism by prominent members of the flora isolated from cariogenic and non-cariogenic dental plaques. *Infect Immun* 17: 55-61
135. Mombelli A, Samaranayake LP (2004)
Topical and systemic antibiotics in the management of periodontal diseases. *Int Dent J* 54: 3-14
136. Monjardino J (1996)
Replication of hepatitis delta virus. *J Viral Hepat* 3: 163-166
137. Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann AM, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, Prévost G (2010)
Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin Microbiol Infect.* 16 (11): 1631-1638
138. Mullis K, Fallona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986)
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273
139. Munson MA, Banerjee A, Watson, TF, Wade WG (2004)
Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 42: 3023–3029
140. Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Kolonay JF, Nelson WC, Mason T, Tallon L, Gray J, Granger D, Tettelin H, Dong H, Galvin JL, Duncan MJ, Dewhirst FE, Fraser CM (2003)
Complete genome sequence of the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *J Bacteriol* 185: 5591-5601. Erratum in: *J Bacteriol* 186: 593
141. Neville SA, Le Cordier A, Ziochos H, Chater MJ, Gosbell IB, Maley MW, van Hal SJ (2011)
Utility of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry fol-

- lowing introduction for routine laboratory bacterial identification. *J Clin Microbiol* 49: 2980-2984
142. Nilsson CL (1999)
Fingerprinting of *Helicobacter pylori* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 13: 1067-1071
 143. Novak J, Kirk M, Caufield PW, Barnes S, Morrison K, Baker J (1996)
Detection of modified amino acids in lantibiotic peptide mutacin II by chemical derivation and electrospray ionization-mass spectroscopic analysis. *Anal Biochem* 236: 358-360
 144. Nyvad B (1993)
Microbial colonization of human tooth surfaces. *APMIS* 1993; 101(suppl 32): 7-45
 145. Nyvad B, Kilian M (1987)
Microbiology of the early microbial colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95: 369-380
 146. Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA (1986)
Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol.* 40: 337-365
 147. Page RC, Kornman KS (1997)
The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontology* 2000, 14: 9-11
 148. Page RC, Schroeder H (1982)
Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Basel and New York, S. Karger
 149. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE (2006)
The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000, 42: 80-87
 150. Perch B, Kjems E, Ravn T (1974)
Biochemical and serological properties of *Streptococcus mutans* from various human and animal sources. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* 82: 357-370
 151. Porter SR (2003)
Prion disease: possible implications for oral health care. *J Am Dent Assoc* 134: 1486-1491
 152. Raoult D, Fournier PE, Drancourt M (2004)
What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol.* 2: 151-159
 153. Raskin L, Rirrrman BE, Stahl DA (1996)
Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 62: 3847-3857
 154. Raßhofer R (1999)
Mikrobiologische Diagnostik bei Parodontopathien; *ZMK*, 3/ 99: 1-6
 155. Reischl U , Lehn N, Simnacher U, Marre R, Essig A (2003)
Rapid and standardized detection of *Chlamydia pneumoniae* using LightCycler real-time fluorescence PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 22(1): 54-57.

156. Rhodin NR, Cutalo JM, Tomer KB, McArthur WP, Brady LJ (2004)
Characterization of the *Streptococcus mutans* P1 epitope recognized by immunomodulatory monoclonal antibody 6-11A. *Infect Immun* 72: 4680-4688
157. Rickard GD, Richardson R, Johnson T, McColl D, Hooper L (2004)
Ozone therapy for the treatment of dental caries. *Cochrane Database Syst Rev*. :CD004153
158. Risch M, Radjenovic D, Han JN, Wydler M, Nydegger U, Risch L (2010)
Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria *Swiss Med Wkly.*: 140
159. Robbins JB, Schneerson R, Szu SC (1996)
Section 1: Bacteriology. Chapter 6: Specific Acquired Immunity. In: Baron S. *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch, Galveston
160. Roeters FJ, van der Hoeven JS, Burgersdijk RC, Schaeken MJ (1995)
Lactobacilli, mutants streptococci and dental caries: a longitudinal study in 2-year-old children up to the age of 5 years. *Caries Res* 29: 272-279
161. Ruby JD, Li Y, Luo Y, Caufield PW (2002)
Genetic characterization of the oral Actinomyces. *Archives of Oral Biology* 47: 457–463
162. Rudney JD, Larson CJ (1999)
Identification of oral mitis group streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 14: 33-42
163. Rupf S, Kneist S, Merte K, Eschrich K (1999)
Quantitative determination of *Streptococcus mutans* by using competitive polymerase chain reaction. *Eur J Oral Sci* 107: 75-81
164. Rupf S, Merte K, Eschrich K, Stösser L, Kneist S (2001)
Peroxidase reaction as a parameter for discrimination of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res* 35: 258-264
165. Rupf S, Breitung K, Schellenberger W, Merte K, Kneist S, Eschrich K (2005)
Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Oral Microbiol Immunol* 20(5): 267-73
166. Rupf S (2006)
Geno- und Phänotypisierung oraler Bakterien mit Polymerasekettenreaktion und Massenspektrometrie – Einsatz moderner diagnostischer Methoden in der Zahnerhaltung. *Habilitationschrift Universität Leipzig*
167. Rupf S, Hannig M, Breitung K, Schellenberger W, Eschrich K, Remmerbach T, Kneist S (2008)
Phenotypic heterogeneity of *Streptococcus mutans* in dentin. *J Dent Res* 87(12): 1172-1176
168. Ryzhov V, Fenselau C (2001)
Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal Chem* 73: 746-750

169. Saarela M, Alaluusua S, Takei T, Asikainen S (1993)
Genetic diversity within isolates of mutans streptococci recognized by an rRNA gene probe. *J Clin Microbiol* 31: 584-587
170. Saarela M, Hannula J, Mättö J, Asikainen S, Alaluusua S (1996)
Typing of mutans streptococci by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol* 41: 821-826
171. Saffert RT, Cunningham SA, Ihde SM, Monson Jobe KE, Mandrekar J, Patel R (2011)
Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 49: 887-892
172. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM (2011)
Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 49: 1790-1794
173. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467
174. Sansone C, van Houte J, Joshipura K, Kent R, Margolis HC (1993)
The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *J Dent Res* 72: 508–516
175. Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K (2008)
Classification and Identification of Bacteria by Mass Spectrometry and Computational Analysis *PLoS One*. 3(7): e2843
176. Sbordone L, Bortolaia C (2003)
Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig*. 7: 181-188
177. Schenkein H, Cochran DL, Dyke van TE, Blieden T, Cohen RE, Hallmon WW, Hinrichs JE, Mariotti A, Raulin LA, Somerman MJ, Genco RJ, Greenstein G, Iacono VJ (1999)
The pathogenesis of periodontal disease. Academy Report. The Committee on Research, Science and Therapy of the American Academy of Periodontology
178. Schriemer DC, Li L (1996)
Detection of high molecular weight narrow polydisperse polymers up to 1, 5 million daltons by MALDI Mass Spectrometry. *J Anal Chem* 68: 2721-2725
179. Schröder HE (2000)
Orale Strukturbiologie. Stuttgart: Thieme-Verlag
180. Schubert S, Wieser A (2010)
Molekulare Speziesdifferenzierung: MALDI-TOF MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *BIOspektrum Special: Molekulare Diagnostik*: 760-762
181. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, Raoult D (2009)
Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 49: 543-551

182. Shah HN, Keys CJ, Schmid O, Gharbia SE (2002)
Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology. *Clin Infect Dis* 35: 58-64
183. Siebert PD, Larrick JW (1993)
PCR MIMICS : competitive DNA fragments for use as internal standards in quantitative PCR. *Biotechniques* 14: 244-249
184. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Oliveira JC, Santos KR (2001a)
Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* 27: 563-566
185. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Oliveira JC, Santos KR (2001b)
Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-directed polymerase chain reaction. *J Endod* 27: 164-167
186. Sissons CH (1997)
Artificial dental plaque biofilm model systems. *Adv Dent Res* 11: 110-126
187. Sundqvist G, Figdor D (2003)
Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Topics* 6: 3-28
188. Svensater G, Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Hamilton IR (2001)
Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans* *FEMS Microbiol Lett* 205: 139-146
189. Takahashi N, Horiuchi M, Yamada T (1997)
Effects of acidification on growth and glycolysis of *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 12: 72-76
190. Tanzer JM (1992)
Microbiology of dental caries. In: Slots J. und Taubman M. A. Hrsg. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. St. Louis: Mosby-Verlag: 377-424
191. Tardif G, Sulavik MC, Jones GW, Clewell DB (1989)
Spontaneous switching of the sucrose-promoted colony phenotype in *Streptococcus sanguis*. *Infect Immun* 57: 3945-3948
192. Ten Cate JM (1990)
In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J Dent Res* 69 Spec No: 614-619; discussion 634-636
193. Tenovuo J (1998)
Antimicrobial function of human saliva--how important is it for oral health? *Acta Odontol Scand* 56: 250-256
194. Tibshirani RJ (2002)
Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *PNAS* 99: 6567-6572

195. Tost J, Gut IG (2005)
Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem* 38: 335-350
196. Trimpin S (2002)
Methodische Entwicklung der MALDI-TOF- Massenspektrometrie für Grenzbereiche der Makromolekülanalytik
197. Tronstad L, Sunde PT (2003)
The evolving new understanding of endodontic infections. *Endodontic Topics* 6: 57–77
198. van Houte J, Lopman J, Kent R (1994)
The predominant cultivable flora of sound and carious human root surfaces. *J Dent Res* 73: 1727–1734
199. van Houte J, Lopman J, Kent R (1996)
The final pH of bacteria comprising the predominant flora on sound and carious human root and enamel surfaces. *J Dent Res* 75: 1008–1014
200. van Palenstein Helderma WH, Ijsseldijk M, Huis in 't Veld JHJ (1983)
A selective medium for the two major subgroups of the bacterium *Streptococcus mutans* isolated from human dental plaque and saliva. *Arch Oral Biol* 28: 599-603
201. van Veen SQ, Claas ECJ, Kuijper EJ (2010)
High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 48: 900-907
202. van Winkelhoff AJ, Goene RJ, Benschop C, Folmer T (2000)
Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res.* 11: 511-520
203. Vocca-Smith AM, Ng-Evans L, Wunder D, Bowen WH (2000)
Studies concerning the glucosyltransferase of *Streptococcus sanguis*. *Caries Res* 34: 295–302
204. Wahl KL, Wunschel SC, Jarman KH, Valentine NB, Petersen CE, Kingsley MT, Zartolas KA, Saenz AJ (2002)
Analysis of microbial mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 74: 6191-6199
205. Wan AK, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehope DI (2001)
Oral colonization of *Streptococcus mutans* in six-month-old pre-erupted infants. *J Dent Res* 80: 2060-2065
206. Wang Z, Russon L, Li L, Roser DC, Long SR (1998)
Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12: 456-464

207. Welham KJ, Domin MA, Scannell DE, Cohen E, Ashton DS (1998)
The characterization of micro-organisms by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 12: 176
208. Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Svensater G (2004)
Protein expression by *Streptococcus mutans* during initial stage of biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 70: 3736-3741
209. Welsh J, McClelland M (1990)
Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-7218
210. Whelton H. (1996)
The anatomy and physiology of the salivary glands. In: *Saliva and oral health*. Edgar WM, O'Mullane DM, eds. 2nd ed. British Dental Journal: London : 1-8
211. Whiley RA, Beighton D (1998)
Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiol Immunol* 13: 195-216
212. Wilkins JC, Homer KA, Beighton D (2002)
Analysis of *Streptococcus mutans* proteins modulated by culture under acidic conditions. *Appl Environ Microbiol* 68: 2382-2390
213. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990)
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535
214. Woese CR, Stackebrandt E, Macke TJ, Fox GE (1985)
A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst Appl Microbiol*. 6: 143-151
215. Zbinden A, Mueller NJ, Tarr PE, Gerhard Eich B, Schulthess A, Bahlmann S, Keller PM, Bloemberg GV (2012)
Streptococcus tigurinus, a novel member of the *Streptococcus mitis* group, causes invasive infections. *J. Clin. Microbiol.* doi10: 1128/JC

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Stefan Rupf möchte ich für die Vergabe des Themas, die fachliche Beratung bei der Vorbereitung und Durchführung der Untersuchungen, sowie für seine Hilfe bei der Niederschrift dieser Arbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Klaus Eschrich, Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, der mich ebenso konstruktiv bei der Erstellung der Arbeit unterstützt hat. Der gesamten Arbeitsgruppe Prof. Eschrich am Institut für Biochemie danke ich für die nette Zusammenarbeit, die ständige Hilfsbereitschaft und die angenehme Atmosphäre. Für die Unterstützung und Hilfe, besonders bei der Auswertung der MALDI-TOF-Massenspektren, möchte ich Prof. Dr. Wolfgang Schellenberger meinen Dank aussprechen. Des Weiteren möchte ich der Arbeitsgruppe „Vaskuläre Biologie“ am Fraunhoferinstitut für Zelluläre Immunologie (IZI) in Leipzig unter Leitung von Herrn Dr. Andreas Schubert für die Hilfe bei der Kultivierung der Bakterien danken. Frau Zahnärztin Susanne Nowak gilt der Dank für die Beschaffung der klinischen Isolate.

Ich möchte meiner Mutter Silke und meinem Vater Dietrich sowie meiner Frau Karolin danken, die mich während des gesamten Studiums und besonders in der Zeit meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

