

**Zahnflächenspezifische Arealbeimpfung
handelsüblicher Chair-side-Tests zum Nachweis von
Mutans-Streptokokken und Laktobazillen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Anke Richter

geboren am 02. Dezember 1975 in Berlin

10. Mai 2004

Erster Gutachter: Prof. Dr. S. Kneist, Jena

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. W. Pfister, Jena

Dritter Gutachter: PD. Dr. K. Vogt, Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04. Januar 2005

Abkürzungsverzeichnis

CFU	koloniebildende Einheit (colony-forming unit)
CRT [®] <i>bacteria</i>	Kariesrisikotest (Caries risk test)
CRT [®] <i>bacteria</i> LB	CRT [®] Laktobazillen-Seite
CRT [®] <i>bacteria</i> SM	CRT [®] Mutans-Streptokokken-Seite
dmf(t)-Wert	kariöse, fehlende, gefüllte Zähne (decayed/missing/ filled teeth) (Milchgebiss)
DMF(T)-Wert	kariöse, fehlende, gefüllte Zähne (decayed/missing/ filled teeth) (permanentes Gebiss)
I.E.	internationale Einheit
is/ IS	Initialläsion (initial surface) Milch (is) - und bleibendes Gebiss (IS)
Kkl	Keimzahlklasse
LB	Laktobazillen
MS	Mutans-Streptokokken
MSB-Agar	Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin
MS41B-Agar	MSB-Agar mit 41 % Saccharose
ns	nicht signifikant
PBI	Papillen-Blutungs-Index
QHI	Quigley-Hein-Index
SD	Standardabweichung
SM	S. mutans
t/T	Milchzähne (t)/ bleibende Zähne (T)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
\bar{x}	Mittelwert

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	3
	Inhaltsverzeichnis	4
1	Zusammenfassung	6
2	Einleitung	8
2.1	Zur Ätiologie der Karies	8
2.2	Biologische Variablen in der Mundhöhle	8
2.2.1	Speichel	12
2.2.2	Plaque	13
2.2.3	Kariogene Mikroorganismen – Mutans-Streptokokken und Laktobazillen	16
3	Ziele der Arbeit	23
4	Methodik	25
4.1	Bakterienstämme	25
4.2	Quantitative und semiquantitative Keimzahlbestimmungen	26
4.3	Praktisches Vorgehen	28
4.4	Auswertung der Befunde und Statistik	33
4.5	Pilotstudie zur Pinseltechnik	34
4.5.1	Ablauf der Pilotstudie	35
5	Ergebnisse	37
5.1	In-vitro-Studie zur Plaqueentnahmetechnik	37
5.1.1	Mutans-Streptokokken	37
5.1.2	Laktobazillen	47
5.2	Pilotstudie zur Pinseltechnik	58
6	Diskussion	65
6.1	Mutans-Streptokokken – In-vitro-Studie	67
6.2	Laktobazillen – In-vitro-Studie	75
6.3	Pilotstudie zur Pinseltechnik	78
7	Schlussfolgerungen	84

8	Literatur- und Quellenverzeichnis	86
9	Anhang	102
	Tabellen	103
	Ethik-Antrag - Pilotstudie	121
	Befundblatt - Pilotstudie	128
	Patientenfragebogen - Pilotstudie	132
	Lebenslauf	135
	Danksagung	136
	Ehrenwörtliche Erklärung	137

1 Zusammenfassung

Die Bedeutung der Mutans-Streptokokken (MS) und Laktobazillen (LB) für die Entstehung einer Karies ist heute unumstritten. Der Nachweis dieser Keimgruppen im Speichel und in der Plaque steht seither im Interesse der präventionsorientierten Praxis und Forschung. Für den Zahnarzt stehen unter anderem die Kultursysteme Dentocult[®] SM und LB (Orion Diagnostica, Espoo Finnland) und CRT[®] *bacteria* (Ivoclar Vivadent GmbH, Schaan, Liechtenstein) als „Chair-side-Test“ zur Untersuchung kariogener Keime zur Verfügung. Die mikrobiologische Untersuchung einzelner Zahnflächen mit diesen Kultursystemen erfolgte bislang nur für Mutans-Streptokokken auf Dentocult[®] SM in situ. Laktobazillen wurden fast ausschließlich im Speichel untersucht. Da sie jedoch auch in Zusammenhang mit der Auslösung der Fissurenkaries stehen könnten, wurde ihr mikrobiologischer Nachweis in die Studie miteinbezogen.

Ziel der vorliegenden Studie war die Erprobung eines Plaqueentnahmeverfahrens, das das flächenspezifische mikrobiologische Monitoring von Zahnflächen, insbesondere Okklusalfächen, auf semiquantitativen Kultursystemen erlaubt.

In vitro wurde eine Arealbeimpfung der Kultursysteme Dentocult[®] und CRT[®] *bacteria* mittels Pinselstrich bzw. Holz- oder Plastikspatelabdruck und verschiedener Keimsuspensionen von Referenzstämmen vorgenommen. Als Impfkultur dienten Verdünnungsstufen 24- (MS) und 48-stündiger (LB) Keimsuspensionen bis 10^{-6} der Stämme *S. mutans* NCTC 10449, *S. sobrinus* OMZ 65 und OMZ 176, *L. plantarum* IMET 10691, *L. casei* IMET 10692 und *L. paracasei* E50/242. Verimpft wurde jede Verdünnungsstufe jeweils mit einem Pinsel (Einwegpinsel, Ivoclar Vivadent GmbH, Schaan, Liechtenstein) auf den unterteilten Arealen des Dentocult[®] SM Strip mutans und analog dazu strichförmig auf den Agaroberflächen des Dentocult[®] LB und des CRT[®] *bacteria*. Zusätzlich wurde jede Verdünnungsstufe als Abdruck mit einem Einmal-Holzmundspatel (Dahlhausen, Köln) auf dem CRT[®] *bacteria* und dem Dentocult[®] LB sowie mit einem Plastikspatel (Dentocult[®] SM Strip mutans) auf Dentocult[®] LB verimpft bzw. „gestempelt“. Die den kommerziellen Kultursystemen adäquaten Kulturmedien – Mitis-salivarius-Agar mit 41 % Saccharose und Bacitracin (MS41B) (Mast), Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin (Difco) und Rogosa-Agar der Firmen Mast und Difco - wurden parallel mit den verwendeten Keimsuspensionen auf konventionelle Art inokuliert. Alle Untersuchungen wurden dreifach ausgeführt. Nach

2- bzw. 4-tägiger aerober Inkubation bei 35 ± 2 °C wurden die Keimzahlklassen der Kultursysteme von zwei kalibrierten Untersuchern entsprechend der Koloniedichte als Keimzahlklassen (Kkl) SM 0 - 3 und LB 1 - 4 abgelesen. Nach 4-tägiger anaerober Inkubation (GasPack, BBL) wurden die koloniebildenden Einheiten (colony forming unit, CFU) pro ml Keimsuspension bestimmt. Den Keimzahlklassen wurde stammbezogen die entsprechende CFU zugeordnet, daraus der geometrische Mittelwert mit Standardabweichung berechnet und mit dem Wilcoxon-Test geprüft, ob sich die semiquantitativen Keimzahlklassen quantitativ unterscheiden. Mit der Kreuzklassifikation wurden die verschiedenen Impfmethode und Kultursysteme verglichen. Die hohen Keimzahlklassen SM 2 und 3 bzw. LB 3 und 4 entsprachen Mutans-Streptokokken von 10^{5-6} und Laktobazillen von 10^{5-7} CFU pro Milliliter Keimsuspension. Mit dem Wilcoxon-Test konnten signifikante Unterschiede in den Streptokokken- und Laktobazillenzahlen zwischen den Risiko- (SM 2 und 3; LB 3 und 4) und den Nichtrisikokeimzahlklassen (SM 0 und 1; LB 1 und 2) aufzeigt werden (p-Wert 0,0001).

In der nachfolgenden Pilotstudie wurde das Pinselverfahren zur Plaqueentnahme auf den zuvor in vitro untersuchten Kultursystemen Dentocult[®] und CRT[®] *bacteria* klinisch erprobt. Mutans-Streptokokken und Laktobazillen aus Fissurenplaque der Okklusalfächen von 26 vollständig durchgebrochenen Sechs-Jahr-Molaren und aus dem paraffinstimulierten Speichel von 7 Kindern im Alter von 6 bis 7 Jahren wurden auf den Kultursystemen auf separaten Arealen (Plaque) und auf der gesamten Kulturträgerfläche (Speichel) angezüchtet. Die Befunde wurden wiederum in semiquantitativen Keimzahlklassen bewertet und fotografisch dokumentiert. Zusätzlich wurde der orale Gesundheitsstatus der Kinder ($d_{3,4mft}$) registriert, Initialläsionen wurden dokumentiert und der Mundhygienestatus wurde mit dem Quigley-Hein-Index (QHI) und dem Papillen-Blutungs-Index (PBI) erhoben. Beide Kultursysteme - Dentocult[®] und CRT[®] *bacteria* - eigneten sich für den Nachweis von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen aus Okklusalfächen der ersten Molaren. Die „Chair-side-Methode“ erwies sich als wenig zeitaufwendig und kostengünstiger im Vergleich zum konventionellen mikrobiologischen Vorgehen und kann für die Untersuchung von Plaque und Speichel einer großen Anzahl von Patienten, beispielsweise zum Monitoring präventiver Maßnahmen, empfohlen werden.

2 Einleitung

2.1 Zur Ätiologie der Karies

Karies ist eine Erkrankung multifaktorieller Genese. Ihr Entstehen ist an das Zusammenwirken der Faktoren Wirt, Mikroorganismen, Substrat und Zeit gebunden. Fehlt nur ein Glied dieser Faktorenkette, ist das Entstehen einer Karies praktisch nicht möglich.

Um die Bedeutung des Zuckers in unserer Ernährung im Zusammenhang mit der Kariesätiologie zu demonstrieren, stellte Keyes (1962) als erster ein graphisches Modell zum Entstehen der Karies vor. König brachte 1971 die Zeit als 4. Komponente mit ein.

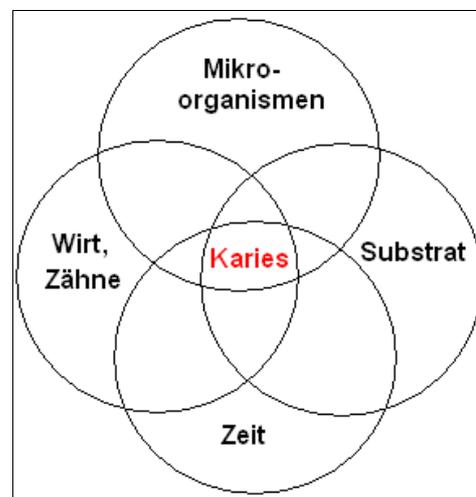


Abb. 1: Multifaktorielle Ätiopathogenese der Karies (Keyes 1962, König 1971)

2.2 Biologische Variablen in der Mundhöhle

Die Anfälligkeit der Zahnhartsubstanz gegenüber bakteriellen Stoffwechselprodukten - insbesondere gegenüber Säuren - wird durch viele Faktoren positiv wie auch negativ beeinflusst.

Die Mundhöhle bietet mit ihrer relativ konstanten Temperatur (35-36 °C) und verschiedenen ökologischen Nischen einer großen Gruppe von Mikroorganismen optimale Bedingungen für Wachstum und Stoffwechsel. Lebensräume werden dabei durch die unterschiedlichen Schleimhautoberflächen an Gaumen, Zunge, Lippen und Wangen sowie den verschiedenen Oberflächen der Zähne für eine Vielzahl verschiedener Spezies bereitgestellt.

Innerhalb von 4 bis 12 Stunden nach der Geburt wird die Mundhöhle von Streptokokken (*S. salivarius*) (Krasse 1988) und wenig später von Laktobazillen besiedelt. Nach Carlsson et al. (1975) ist die Besiedlung mit Laktobazillen (*L. acidophilus* und *L. jensenii*) bei Kindern bis zum zweiten Lebensjahr als transiente mütterliche Flora nach der Geburt anzusehen. Nach vorangegangener Streptokokkenübertragung siedelt sich hauptsächlich *L. casei* an (Carlsson et al. 1975).

Mit dem Durchbruch der Zähne, den ersten Retentionsstellen, ändert sich die mikrobielle Zusammensetzung der Mundhöhle. Aktinomyzeten, *S. sanguis*, anaerobe Spirochäten, Vibrionen und Fusobakterien können nun die Zahnflächen kolonisieren und besonders *S. mutans* findet dort eine ökologische Nische. Gibbons (1984) führte die Reihenfolge der Besiedlung der Zahnflächen auf die unterschiedliche Adhäsionsfähigkeit der Keime zurück.

Caufield et al. (1993) bestimmten im Median den 26. Lebensmonat (19. bis 31. Lebensmonat) als „window of infectivity“ (Infektionsfenster) für die Transmission von Mutans-Streptokokken. Arbeiten aus dem Schrifttum zeigen die Zunahme positiver Mutans-Streptokokken-Nachweise mit dem Alter der Kinder und dem Durchbruch der unterschiedlichen Zahngruppen. Im Mittel lag nach Durchbruch der Schneidezähne bei 20 % der Kinder im 11. Lebensmonat eine Mutans-Streptokokken-Infektion vor, die nach Durchbruch der Eckzähne und der ersten Molaren bis zum 23. Lebensmonat auf 30 % anstieg. Im 35. Lebensmonat nach Durchbruch der zweiten Molaren waren 45 % der Kinder infiziert; dieser Anteil veränderte sich auch nach Erreichen der Okklusionsebene im 48. Lebensmonat nicht (Berkowitz et al. 1975, Carlsson et al. 1975, Catalonotto et al. 1975, Stiles et al. 1976, Edwardsson und Mejare 1978, Masuda et al. 1979, Berkowitz et al. 1980, Alaluusua und Renkonen 1983, Fujiwara et al. 1991, Caufield et al. 1993, Roeters et al. 1995b). Erfurter Kinder mit im Mittel 19 Zähnen waren zu 37 % infiziert (Borutta et al. 2002). Bei noch zahnlosen Kleinkindern konnte hingegen kein Nachweis von Mutans-Streptokokken geführt werden (Berkowitz et al. 1975, Carlsson et al. 1975, Catalonotto et al. 1975, Stiles et al. 1976, Berkowitz et al. 1980, Fujiwara et al. 1991).

Duchin und Van Houte (1978) und Köhler und Bratthall (1978) maßen hohen Mutans-Streptokokken-Keimzahlen im Speichel von Müttern große Bedeutung für die Übertragung der Keime in die Mundhöhle der Kinder zu. Später konnten Berkowitz

et al. (1981) bestätigen, dass die Mutans-Streptokokken-Infektion von der Höhe der kariogenen Speichelkeimzahl der Mutter abhängt. Kinder mit mehr als 6 Schneidezähnen waren häufiger infiziert, wenn der Speichel der Mütter ca. 10^5 Mutans-Streptokokken pro Milliliter enthielt. Die kariogene Bedeutung hoher Speichelkeimzahlen bei den Müttern wurde auch von Köhler et al. (1984) betont. Sie empfahlen den Nachweis und die Beobachtung kariogener Keime bei Müttern als primäre kariespräventive Maßnahme für ihre Kinder.

Der pathogenen Aktivität der Mutans-Streptokokken und der Kolonisation der Zahnflächen wirken immunologische Schutzmechanismen entgegen; das Zahnhartgewebe selbst ist immunologisch inaktiv (Smith und Taubmann 1991). Die Immunmechanismen schließen neben den spezifischen Immunfaktoren des Speichels (sekretorisches IgA) oder des Serums (IgG) auch unspezifische antimikrobielle Systeme des Speichels sowie phagozytierende Zellen der Sulkusflüssigkeit ein. Sekretorisches IgA verhindert die Adhärenz und/oder die Agglutination der Mikroorganismen und neutralisiert die bakteriellen Enzyme (McGhee und Kiyono 1993). Weiterhin aktiviert es antibakterielle Faktoren wie das Laktoferrin, die Laktoperoxidase und das Lysozym (Kilian und Russell 1994).

Die Beziehung zwischen humoralen Schutzmechanismen und dem Kariesbefall wird in der Literatur unterschiedlich dargestellt; so konnten Michalek und Childers (1990) den sIgA-Antikörpern in vivo nur eine geringe kariesprotektive Wirkung nachweisen. Brandtzaeg (1983) berichtete, dass die Höhe des sIgA nicht mit der Kariesprävalenz korreliert; demgegenüber konnten Huis in't Veld et al. (1979) und Challacombe (1980) eine positive Beziehung zwischen sIgA und unversorgten kariösen Läsionen aufzeigen.

Billep (2000) untersuchte die gegen *S. mutans* gerichtete Antikörperhöhe im Speichel mittels ELISA-Technik bei 115 Patienten im Alter von 17 bis 89 Jahren. Die Autorin konnte signifikant steigende IgA- und IgM-Antikörper bei fallenden DMFT-Werten und signifikant steigende IgG-Antikörper bei zunehmenden DMFT-Werten bzw. der steigenden Zahl der D-Komponente aufzeigen.

Bei gesunder Gingiva ist IgG allerdings nur in geringen Konzentrationen in der Sulkusflüssigkeit vorhanden (Scully 1980, Scully et al. 1980, Cimasoni 1983). Eine besonders protektive Bedeutung hat das IgG in der Zeit des Zahndurchbruches und

während der ersten Stadien der Kolonisierung der Zahnflächen durch Mutans-Streptokokken (Tenovuo und Aaltonen 1991). IgG kann das Komplementsystem aktivieren und fördert als Opsonin die Phagozytose der Mutans-Streptokokken durch neutrophile Granulozyten. Kneist et al. (1999b) untersuchten mit dem S.-mutans-ELISA-Test den Speichel von 105 kariesfreien Kindern im Alter zwischen 3 und 9 Jahren hinsichtlich der Höhe von IgA-, IgG- und IgM-spezifischen Antikörpern gegen S. mutans; begleitend wurde die Höhe der Mutans-Streptokokken im Speichel der Kinder bestimmt. Die S.-mutans-spezifischen Antikörper IgA, IgG und IgM stiegen mit dem Alter der Kinder signifikant an. Weiterhin konnte ein signifikanter Unterschied bei Kindern mit geringen und hohen Mutans-Keimzahlen und S.-mutans-spezifischem IgA und IgM im Speichel nachgewiesen werden (Kneist et al. 1999b).

Michalek et al. (1987) registrierten bei Versuchstieren einen geringeren Kariesbefall, wenn die Tiere Muttermilch mit S.-mutans-spezifischen IgA-Antikörpern als Diät verabreicht bekamen. Die Arbeitsgruppe um Tenovuo (Aaltonen et al. 1988, Aaltonen 1991, Aaltonen und Tenovuo 1994) und Anderson (2002) hoben in diesem Zusammenhang die Bedeutung der Mütter für die Modulation des Immunsystems von Kleinkindern hervor. Mütter übertragen vor dem Zahndurchbruch ihre Antikörper, die sich protektiv auf die spätere Transmission der Mutans-Streptokokken nach dem Zahndurchbruch auswirken. Tenovuo empfiehlt den Müttern, ihre Kinder durch Stillen mit Muttermilch und später - während des Zahndurchbruches - durch Reduktion ihrer eigenen Speichelkeimzahlen an Mutans-Streptokokken auf weniger als 10^5 CFU pro ml zu schützen (Tenovuo et al. 1992).

Die Durchbruchzeit und der Mineralisationsgrad (posteruptive Schmelzreifung, Bildung von Fluorapatit) eines Zahnes sind für seine spätere Resistenz gegen äußere Einflüsse mitbestimmend. Nach Kneist et al. (1998a) besteht die höchste Kariesanfälligkeit nach dem Zahndurchbruch bis zum Erreichen der Okklusionsebene.

Die Morphologie der Zähne beeinflusst ihre bakterielle Besiedlung entscheidend. Die Krone eines Zahnes besitzt, mit Ausnahme der Frontzähne, fünf Flächen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Die Glattflächen zur Wange bzw. zum Gaumen und zur Zunge neigen am stärksten zur Plaqueretention, sind aber kaum kariesanfällig. Die mesialen und distalen Approximalflächen, die ebenfalls zur Plaqueretention neigen, sind dagegen die am meisten kariesgefährdeten Zahnflächen (Loesche 1986).

Die Okklusalfächen der Molaren und Prämolaren mit ihren mehr oder weniger tiefen Fissuren und Grübchen sind besondere Prädektionsstellen für die Besiedlung mit kariogenen Mikroorganismen. Sie neigen am häufigsten zur Ausbildung kariöser Läsionen (Loesche 1986, Steiner et al. 1994).

Nach Analysen von Lussi und Schaffner (2002, 2003) waren Fissuren mehrheitlich aufgrund ihrer Morphologie einer Zahnreinigung nicht zugänglich. Die Autoren hatten 120 Zahnschliffe untersucht; nur 20 % der untersuchten Zähne zeigten ausladende Fissuren, hingegen wiesen 30 % sehr enge, schwer zu reinigende Fissurenformen auf (Abb. 2).



Abb. 2: Histologischer Schliff durch eine enge Molarenfissur (Lussi und Schaffner 2002)

Zähne bestehen aus einem Kalziumphosphat-Kristallgefüge (Schmelz), in dem sich das lebende Gewebe des Zahns (Dentin und Pulpa) befindet. Für die Kariesätiologie ist die Zusammensetzung von Dentin und Schmelz entscheidend. Störungen der Mineralisation und bestimmte Anomalien der Zahnhartsubstanz sowie weitere lokale Faktoren begünstigen die Entstehung kariöser Läsionen (Seow 1991). Speichel spielt hier als Kofaktor eine besondere Rolle.

2.2.1 Speichel

Speichel, mit seiner weitesten räumlichen Verbreitung in der Mundhöhle, besteht zu 94 % aus Wasser und ist die Quelle mikrobieller Nährstoffe. Viele Faktoren, wie seine mechanische Reinigungsfunktion, seine Pufferkapazität (Bikarbonatsystem,

Phosphatpuffer etc.), viele antibakterielle Faktoren (Lysozym-Aktivität, Peroxidase-System, Laktoferrin-, Komplement- und Leukozytenkonzentration, Immunglobuline), organische und anorganische Bestandteile sowie seine Fließrate spielen eine Rolle für die Erhaltung der oralen Gesundheit (Edgar et al. 1994).

Der pH-Wert des Speichels variiert mit der Sekretionsrate und der Aufnahme zuckerhaltiger Nahrung. Im Ruhespeichel beträgt der pH-Wert durchschnittlich 6,7 bei einer Fließrate von ca. 19 ml in der Stunde (Marsh und Martin 2003).

Die Sekretionsrate wird von (1) der Art, Dauer und Intensität der Stimulation, (2) der Tageszeit, (3) der Nahrung, (4) dem Alter, (5) dem Geschlecht, (6) verschiedenen Krankheiten und (7) vielen Arzneimitteln beeinflusst (Mandel 1974). Der Normalbereich der Sekretionsrate liegt nach Stößer (1998) im Ruhespeichel bei 0,25 - 0,35 ml pro Minute und sollte im stimulierten Speichel auf 1,0 - 3,0 ml pro Minute ansteigen. Die täglich produzierte Gesamtmenge des Speichels beträgt ca. 700 - 800 ml. Die Bedeutung der Sekretionsrate des Speichels wird meist erst deutlich, wenn kaum noch Speichel fließt, wie beispielsweise bei radiologisch oder pharmakologisch bedingter Xerostomie, dem Sjögren-Syndrom sowie der beim Nursing-Bottle-Syndrom auftretenden Speichelmangelsituation an den oberen Frontzähnen. Häufig ist ein steiler Anstieg der Kariesaktivität die Folge (Newbrun 1996, Stößer et al. 1998).

Newbrun (1983) sieht in der Pufferkapazität des Speichels einen wichtigen Faktor für die Kariesentstehung. Die Pufferkapazität wird hauptsächlich vom Bikarbonat bestimmt. Der Bikarbonatpuffer wird von der Glandula parotis und der Glandula submandibularis sezerniert. Bei steigender Speichelsekretion ist der Bikarbonatgehalt erhöht und der Speichel-pH-Wert steigt an. Da das Bikarbonat auch durch die Plaque diffundiert, können die dort gebildeten organischen Säuren ebenso neutralisiert werden. Messungen der Pufferkapazität und der Speichelsekretionsrate können deshalb nach Laurisch und Schneider (1998) eine Kariesrisikoprognose ergänzen.

2.2.2 Plaque

Der amerikanische Zahnarzt G. V. Black (1836-1915), der als einer der Begründer der wissenschaftlichen Zahnheilkunde angesehen wird, beschrieb gelatineartige mikrobielle

Zahnbeläge als Ursache der Karies und führte den Terminus Plaque in die Zahnheilkunde ein (Black 1886, Black 1914). Heute wird Plaque als ein gewachsener, fest haftender und histologisch strukturierter Belag von lebenden und toten Mikroorganismen in einer polysaccharid-glycoproteinreichen Matrix definiert, die das Produkt mikrobieller Stoffwechselaktivität und Vermehrung darstellt und wasserstrahlfest ist (Riethe 1994, Hoffmann-Axthelm 2000). Ohne Selbstreinigung des Gebisses durch Kauen und ohne regelmäßige hygienische Maßnahmen - wie das mechanische Entfernen der Mikroorganismen - setzt eine rasche Vermehrung der Bakterien ein. Die Zahnoberflächen werden mit einem weichen Aggregat, der Zahnplaque, bedeckt.

Plaque modifiziert sich mit der zeitlichen Länge der Bakterieninvasion und der Dicke der Plaque in mehreren Stufen. Klinisch imponiert sie durch einen meist hell- bis dunkelgelben Belag, der in dünner Schicht nur schwer erkennbar ist. Durch die besondere Anatomie der Zähne etabliert sich die supragingivale und - durch den Zahnfleischrand bedingt - die subgingivale Plaque, zwei verschiedene mikrobielle Ökosysteme (Loesche 1986).

Die Plaquebildung setzt zunächst die Bildung eines exogenen Schmelzoberhäutchens (acquired pellicle) voraus (Scannapieco 1994). Dieses ca. 0,1 - 1µm dicke Schmelzoberhäutchen bildet sich unmittelbar (10 Sekunden) nach gründlicher Zahnreinigung auf den Zahnoberflächen aus. Es besteht aus Speichelglycoproteinen, Phosphoproteinen und Lipiden (Buddecke 1981), enthält Komponenten aus der Sulkusflüssigkeit (Cimasoni 1985) und bakterielle Bestandteile wie die Glycosyltransferasen (GTF) (Schilling und Bowen 1992, Vacca-Smith et al. 1996). Diese Moleküle können aufgrund ihrer Eigenladungen an die Kalzium- und Phosphatgruppen des Apatits der Zahnhartsubstanzen elektrostatisch binden. Mutans-Streptokokken produzieren mit Hilfe extrazellulärer Glycosyltransferasen in Anwesenheit von Saccharose wasserunlösliche, extrazelluläre Polysaccharide vom Glukantyp. Die Saccharose wird hydrolysiert und das Hydrolyseprodukt Glukose zu polymeren Homoglukanen aufgebaut. Das Homoglukan setzt sich aus α -1,6-gebundenen Glukosemolekülen mit unterschiedlich α -1,3- oder α -1,2-glykosidisch verknüpften Seitenketten zusammen (Buddecke 1981, de Soet et al. 1992).

Neben der Modulation der oralen Flora (Tabak et al. 1982) hat die Pellikel auch die

Funktion eines Gleitmittels (Meckel 1965). So wird der Zahnschmelz vor Säureattacken geschützt (Gibbons und Hay 1988), und dies wiederum ermöglicht ein besseres Kristallwachstum an den Schmelzoberflächen (Moreno et al. 1979); für die Remineralisation des Zahnschmelzes ist dies von Bedeutung.

Innerhalb weniger Stunden lagern sich dann erste Mikroorganismen an das Schmelzoberhäutchen an. Ihre Adhärenz ist selektiv; bakterielle Oberflächenadhäsine sind involviert, die physiko-chemische Wechselwirkungen mit den Proteinen des Schmelzoberhäutchens eingehen (Gibbons und Hay 1988, Bowen et al. 1991). In humanen In-vivo-Studien konnte erkannt werden, dass die Streptokokkenarten *S. sanguis*, *S. oralis* und *S. mitis* zu den Erstbesiedlern der Zahnflächen zählen (Nyvad und Kilian 1987, Macpherson et al. 1991). Letztere repräsentieren etwa 96 % der Streptokokken und etwa 56 % der initialen mikrobiellen Flora (Nyvad und Fejerskov 1996). Zu den Erstbesiedlern zählen auch Aktinomyzeten und Gramnegative (Nyvad und Fejerskov 1996). Während der Plaquereifung entwickelt sich eine Dynamik zugunsten der Aktinomyzeten. Streptokokken sind nur noch mit geringerer Prävalenz vorhanden.

Die Arbeitsgruppe um Løe befasste sich mit der Entwicklung der Gingivitis und der sich damit verändernden Zusammensetzung der subgingivalen Plaque (Løe et al. 1965). Zunächst registrierten die Autoren einen relativ stabilen Kokkenrasen. Nach 2 bis 3 Tagen etablierten sich Stäbchenbakterien und Filamente, und nach 7 Tagen gewann die Plaque mehr und mehr einen anaeroben Charakter mit Spirillen und Spirochäten (Løe et al. 1965).

Ausgereifte Plaque besteht zu 60 – 70 Volumenprozent aus dicht gepackten Bakterien, die in die Plaquematrix eingebettet sind. Je mehr kariogene Bakterien in der Plaque etabliert sind, desto länger anhaltend ist der durch Säurebildung aus den Kohlenhydraten der Nahrung entstehende pH-Abfall. Die Säureproduktion in der Plaque wird zusätzlich durch die Ernährungsgewohnheiten des Wirtes beeinflusst; Frequenz, Menge und Dauer des Zuckerkonsums tragen entscheidend zur Kariesauslösung bei (Gizani et al. 1999).

Gustafsson et al. (1954) erkannten in ihrer Vipeholm Studie die Bedeutung des frequenten Zuckerkonsums. Der pH-Abfall in der Plaque kann bei häufiger Aufnahme

kleinerer Mengen kohlenhydrathaltiger Speisen so kurzfristig nicht neutralisiert werden und hat ein Andauern des sauren pH-Wertes zur Folge. Den generellen pH-Abfall in der Plaque nach Zuckerkonsum und die nachfolgende Neutralisation der Säuren hatte bereits Stephan (1944) erkannt und graphisch dargestellt (Abb. 3).

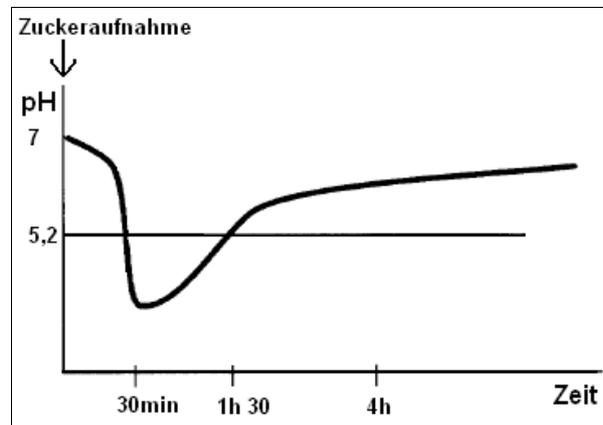


Abb. 3: „Stephan-Kurve“ - Änderung des pH-Wertes nach Zuckeraufnahme (Stephan 1944)

Der andauernde saure pH-Wert führt einerseits zur Selektion der kariogenen Mikroorganismen, da diese den niedrigen pH-Wert tolerieren können, und andererseits zu einer Demineralisation des Apatits im Zahnschmelz. Aus einer zunächst unspezifischen Plaqueflora entwickelt sich entsprechend der spezifischen Plaquehypothese also eine spezifische kariogene Plaqueflora. In dieser Phase wird klinisch zunächst ein weißer opaker Schmelzfleck sichtbar, da die Demineralisation unter der intakten Schmelzoberfläche abläuft. Eine Remineralisation dieser initial kariösen Läsionen ist noch möglich. Schreitet der Prozess aber fort, so kommt es zum Einbruch in das Dentin und letztendlich zur Kavitation und Manifestation einer Karies. Kariöses Dentin ist nicht mehr remineralisierbar. Eine solche Entwicklung vollzieht sich nach Newbrun (1978) häufig innerhalb von 12 - 14 Monaten.

2.2.3 Kariogene Mikroorganismen – Mutans-Streptokokken und Laktobazillen

Mutans-Streptokokken, Laktobazillen und Aktinomyzeten werden heute zu unterschiedlichen Kariesformen in Beziehung gesetzt. Während Mutans-Streptokokken Bedeutung für die koronale Kariesinitiation und -progression beigemessen wird, werden Laktobazillen als Indikator des Zuckerkonsums angesehen. Sie sind bedeutsam für die

Kariesprogression und Auslösung der Sekundärkaries. Aktinomyzeten sind für die Auslösung der Wurzelkaries bedeutsam (Loesche 1986, Russell et al. 1991, Botha et al. 2001).

Clarke isolierte bereits 1924 *S. mutans* aus kariösen Läsionen und wählte die lateinische Form „mutare“ als Artbezeichnung, da er in Abhängigkeit von der Anzucht im Mikroskop kokkoide Stäbchenformen bis hin zu Kettenkokken beobachtete (Clarke 1924). Die Neubeschreibung wurde lange Zeit angezweifelt und *Streptococcus mutans* ging verloren. Erst durch die gnotobiotischen Tierexperimente von Orland et al. (1954, 1955) und die Kariesmodellexperimente an Versuchstieren von Fitzgerald und Keyes (1960) kam die Streptokokke wieder in die Diskussion. Als Typusstamm wurde *S. mutans* durch Sims (1961) in der Nationalen Stammsammlung Englands in London als NCTC 10449 hinterlegt.

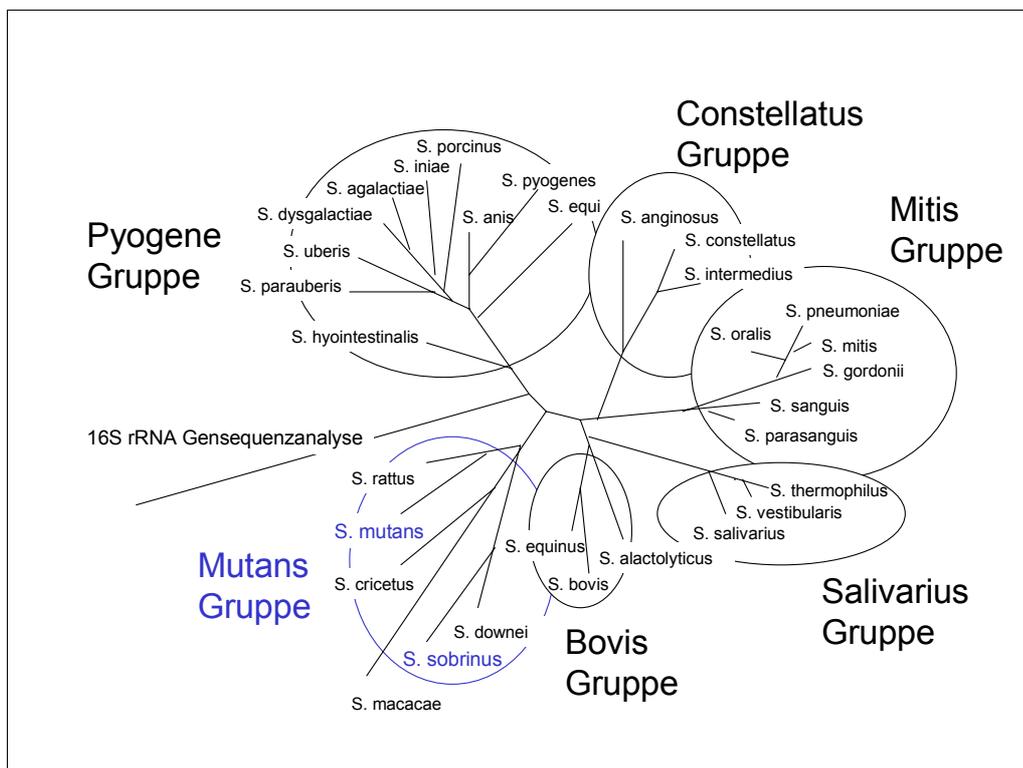


Abb. 4: Phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Streptokokken (Kawamura et al. 1995)

Heute nimmt die Mutans-Gruppe unter den Streptokokken einen festen Platz ein (Abb. 4). *S. mutans* kann die Serotypen c, e und f besitzen. Der Serotyp c stellt mit

70-100 % den am häufigsten gefundenen Serotyp beim Menschen dar. *S. sobrinus* kommt mit den Serotypen d und g vor. Unter den Mutans-Streptokokken sind nur die beiden Arten *S. mutans* und *S. sobrinus* humanpathogen. *S. rattus* mit dem Serotyp b und *S. ferus*, *S. macacae* und *S. downei* (Serotyp h) und *S. cricetus* (Serotyp a) kommen in der Tierwelt vor (Marsh und Martin 2003).

Mutans-Streptokokken besitzen ein weites Spektrum virulenter Eigenschaften, die die Kariogenität der Plaque bestimmen und sie in ihrer ökologischen Bedeutung vor andere orale Keime stellen (Tanzer 1989, Marsh 1994). So produzieren Mutans-Streptokokken wasserunlösliche Glucane aus Saccharose, die ihre irreversible Adhäsion und Kolonisation in der Plaque fördern (Mattos-Graner et al. 2000). Bei zunehmender Plaquedicke diffundiert die Saccharose in tiefere Plaqueschichten und die dortige Säureproduktion steigt (Freedman und Coykendall 1975, Tanzer 1989, van Houte et al. 1989). Die bei der enzymatischen Hydrolyse der Saccharose entstehende Fruktose kann *S. mutans* - im Vergleich zu *S. sobrinus* - aufnehmen und produziert daraus intrazellulär ein Reservekohlenhydrat (Lävan). In Phasen der Nahrungskarenz, in denen das exogene Substrat nur in geringen Mengen oder überhaupt nicht vorliegt, ist ein Überleben und eine kontinuierliche Säureproduktion möglich (Spatafora et al. 1995). Diese Eigenschaft garantiert zugleich eine gleichbleibende Azidogenität der Keime in der Plaque und fördert die Demineralisation der Zahnhartgewebe in Phasen niedriger Speichelsekretion, zum Beispiel im Schlaf (Tanzer et al. 1976, Johnson et al. 1980).

Mutans-Streptokokken verstoffwechseln Saccharose dabei schneller als alle anderen oralen Keime (Minah und Loesche 1977), und vorwiegend entsteht dabei Laktat als die stärkste organische Säure (Iwami und Yamada 1985). Weiterhin erlaubt ihnen ihre extrem hohe Säuretoleranz eine Persistenz unter kariogenen Bedingungen (Spatafora et al. 1995). Es ist vorstellbar, dass Mutans-Streptokokken aufgrund ihrer Bakteriozinogenität gegenüber oralen Streptokokken, besonders gegen *S. oralis*, *S. sanguis* und *S. mitis*, ihre eigene Etablierung in der Plaque begünstigen (Kneist et al. 1999b, Scharff 2004). Nach Tanzer (1989) werden frühe Besiedler der Zahnflächen, wie *S. mitis* und *S. sanguis*, durch die Dextranaseproduktion von Mutans-Streptokokken wieder verdrängt. Auch Marsh (1994) schlussfolgerte, dass veränderte Bedingungen, beispielsweise ein niedriger pH-Wert und ein großes Angebot an fermentierbaren Zuckern, das Wachstum von *S. sobrinus* fördern, zumal eine gleichzeitige

Wachstumshemmung vieler anderer Bakterien durch den niedrigen pH-Wert einsetzt. Diese Situation wird durch die gleichzeitige Präsenz von *S. mutans* verstärkt, der durch seine Säureproduktion den pH-Wert niedrig hält und nebenbei sein eigenes Wachstum stimuliert (Marsh 1994).

Über die Prävalenz der beiden Mutans-Streptokokken-Arten liegen widersprüchliche Angaben im Schrifttum vor. De Soet et al. (1992) zeigten in ihrer Übersichtsarbeit, dass *S. mutans* im Vergleich zu *S. sobrinus* in Plaque und Speichel häufiger vorkommt; in den von den Autoren analysierten Studien lag die Prävalenz von *S. sobrinus* zwischen 0 % und 52 % (de Soet et al. 1992). Bei Erfurter Kindern und Jugendlichen konnten Kneist et al. (2004) eine Prävalenz von *S. sobrinus* bei 17 % der Studienteilnehmer nachweisen, und letztere wiesen einen signifikant höheren Kariesbefall auf als Studienteilnehmer mit positivem Nachweis von *S. mutans*. Dabei scheint *S. mutans* bevorzugt Fissuren und *S. sobrinus* proximale Zahnflächen zu kolonisieren (Huis in 't Veld et al. 1979, Masuda et al. 1979, Lindquist et al. 1989, Lindquist und Emilson 1991). In klinisch-mikrobiologischen Untersuchungen konnten beide Mutans-Streptokokken (*S. sobrinus* und *S. mutans*) aus gleichen kariösen Läsionen isoliert werden. Nach de Soet et al. (1990) und Holbrook et al. (1993) war *S. mutans* auch oft allein in kariösen Läsionen nachweisbar. *S. sobrinus* kann keine intrazellulären Polysaccharide bilden und wird nach Homer et al. (1993) auch durch das im Speichel häufig vorkommende N-Acetylglucosamin in seinem Wachstum unterdrückt. Dies dürfte die weltweit niedrigere Prävalenz von *S. sobrinus* im Vergleich zu *S. mutans* erklären (Koga et al. 1986).

Auch bezüglich der Säureproduktion und Säuretoleranz beider Arten gibt es im Schrifttum widersprüchliche Aussagen. So berichteten Harper und Loesche (1983, 1984), Denepitiya und Kleinberg (1984) und van Houte und Russo (1985) von gleich hoher Säureproduktion bei beiden Arten. Nach Stößer et al. (1988, 1989), de Soet und de Graaff (1988), de Soet et al. (1991), Satou (1992) und Köhler et al. (1995) produziert *S. sobrinus* größere Säuremengen als *S. mutans* in einem umgebenden Milieu mit einem pH-Wert zwischen pH 5,0 und 6,0. Satou konnte *S. mutans* bei einem pH-Wert von pH 4,8 jedoch noch eine größere Säuretoleranz und -produktivität nachweisen (Satou 1992). Bei Stämmen von *S. mutans* aus der Mundhöhle von Kindern mit hohen Speichelkeimzahlen konnte bislang auch eine deutlich höhere Säuretoleranz

nachgewiesen werden als bei Stämmen von Kindern mit niedrigen Keimzahlen im Speichel (Kneist et al. 1999c, Bergholz 2002). Letztere Untersuchungen schlossen mehrheitlich Stämme von *S. mutans* mit dem Serotyp c ein, der nach Nikiforuk (1985) auch weltweit am häufigsten vorkommt. Auch Kneist et al. (1999b) wiesen bei Kindern und Jugendlichen sowohl im Zahnbelag als auch im Speichel den Serotyp c am häufigsten nach.

Im Vergleich zu *Mutans*-Streptokokken sind Laktobazillen grampositive Stäbchenbakterien, die ebenso eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Karies einnehmen, obwohl sie gewöhnlich nur mit etwa 1 % im gesamten mikrobiellen Spektrum der Mundhöhle vertreten sind (London 1976) und als apathogene Schleimhautparasiten angesehen werden. Sie machen weniger als 0,1 % der Population von Wange und Zunge aus; in der Plaque liegt ihr Vorkommen unter 0,005 % und in der subgingivalen Plaque unter 1 % (Marsh und Martin 2003). Laktobazillen sind als transiente mütterliche Keime unmittelbar nach der Geburt in der Mundhöhle eines Neugeborenen nachweisbar. Sie etablieren sich aber erst zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr in der Mundhöhle. Rogosa et al. (1953) konnten aus Speichelproben von 130 Schulkindern etwa 500 Stämme oraler Laktobazillen isolieren. Unter ihnen waren *L. casei* (59 %), *L. fermentum* (45 %), *L. acidophilus* (22 %) und *L. brevis* (17 %) am häufigsten vertreten. Seltener waren dagegen die Stämme *L. buchneri*, *L. salivarius*, *L. plantarum* und *L. cellobiosus* nachweisbar (Rogosa et al. 1953). Später beschrieb auch London (1976) die gleichen Laktobazillenarten in der Mundhöhle von Kindern und Erwachsenen; identifiziert wurden vorwiegend *L. casei* und *L. fermentum*.

Kneist et al. (1998d) konnten aufzeigen, dass eine Zunahme des Kariesbefalls mit einer steigenden Laktobazillenzahl im Speichel einhergeht. Viele weitere Untersuchungen konnten diese Korrelation zwischen der Anzahl vorhandener Laktobazillen im Speichel und der Anzahl kariöser Läsionen bestätigen. Dies gelang sowohl bei Kindern (Klock und Krasse 1977, Bánóczy et al. 1983, Larmas 1992, Roeters et al. 1995a) als auch bei Jugendlichen (Beighton et al. 1991, Loesche et al. 1995).

Dass in einer kariösen Kavitation gehäuft Laktobazillen vorkommen, wurde bereits von Hemmens und Mitarbeitern in den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben (Hemmens et al. 1946). Shovlin und Gillis (1972) isolierten vorwiegend *L. casei* aus kariösem Dentin. Hardie et al. (1977) registrierten im kariösen Dentin neben der

Zunahme der Laktobazillen eine veränderte Proportion der Mutans-Streptokokken. Heute ist es unumstritten, dass Mutans-Streptokokken für die Kariesinitiation verantwortlich sind, während Laktobazillen, die als Schleimhautparasiten an den Zahnflächen nicht haften können, eine schnelle Progression der Karies in das Dentin bewirken (Edwardsson 1974, Loesche 1986, Heinrich und Kneist 1987, Beighton und Brailsford 1998). Nach Shovlin und Gillis (1972) wurde *L. casei* wiederholt in kariösem Dentin nachgewiesen (Basson und van Wyk 1982, Depaola 1989, Hahn et al. 1989, Wijeyeweera und Kleinberg 1989). Kneist et al. (1988) konnten in weichem und hartem kariösen Dentin auch am häufigsten *L. casei* ss *rhamnosus* nachweisen und weiterhin die Arten *L. plantarum*, *L. casei* ss *casei*, *L. xylosum*, *L. coryniformis* und *L. curvatus*.

Zumindest konnten Heinrich und Kneist (1988) in ihren histologisch-mikrobiologischen Untersuchungen auch erstmalig die gemeinsame ätiopathogenetische Bedeutung der Mutans-Streptokokken und Laktobazillen für die kariöse Progression aufzeigen. Beide Keimgruppen waren mit pulpalen Entzündungen vergesellschaftet. So vermuteten auch Michalek et al. schon 1981, dass kariogene Streptokokken in der Kavität kompetitiv durch Laktobazillen verdrängt werden. Bei sanierten Kindern fanden weiterhin Kneist et al. (1998d) um etwa 20 % weniger häufig hohe Laktobazillenzahlen ($> 10^5$ pro ml) im Speichel als bei behandlungsbedürftigen Kindern. Zuvor konnten Petti et al. (1997) kariogene Speichelkeimzahlen nach Sanierung kariöser Läsionen bei 6- bis 7-jährigen Kindern senken. Van Lunsen et al. (2000) bestätigten die Reduktion von Mutans-Streptokokken- und Laktobazillenzahlen im Speichel von 3½ Jahre alten Kindern nach der Sanierung. Zu analogen Befunden kamen zuvor auch Wright et al. (1992) und Hetzer (1995).

Im Vergleich zur Kavität ist auch die tiefe Fissur mit kleinem Öffnungswinkel ($< 70^\circ$) als Nische für die Laktobazillen vorstellbar. Bei der nahezu unmöglichen Reinigung solcher Fissuren könnten die azidogenen und säuretoleranten Laktobazillen in der Fissur mitverantwortlich für eine Kariesauslösung sein (Baake 2003). Immerhin konnten Fitzgerald et al. (1966) und später Seppä et al. (1989) aufzeigen, dass Laktobazillen beim Versuchstier Fissurenkaries auslösen. Die Autoren hatten mit *L. salivarius* und *L. acidophilus* bei keimfreien Ratten Fissurenkaries ausgelöst; der Fissurenkariesbefall der Tiere lag allerdings niedriger als nach Infektion der Ratten mit Mutans-Streptokokken.

Die vorliegende Arbeit widmet sich dem gezielten mikrobiologischen Nachweis von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen in der Plaque, speziell an besonders gefährdeten Zahnflächen wie beispielsweise den Fissuren und Grübchen der Molaren. Untersucht wurde eine flächenspezifische Anwendungsmöglichkeit mikrobiologischer Speicheltests, die eine Ergänzung zur herkömmlichen Anwendungsweise dieser Testmethoden darstellt. Prophylaktische Maßnahmen können dadurch noch gezielter, nämlich an der Zahnfläche, kontrolliert werden.

3 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Studie widmete sich dem Nachweis von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen in Plaque und Speichel. Es sollte insbesondere ein Verfahren erprobt werden, dass die flächenspezifische mikrobiologische Kontrolle von Zahnflächen – insbesondere der Okklusalfächen – erlaubt. Neben konventionellen mikrobiologischen Methoden sollten die für die Zahnarztpraxis entwickelten Kultursysteme Dentocult[®] und der CRT[®] *bacteria* Verwendung finden, um Zahnärzten ein zusätzliches Instrument zum zahnflächenbezogenen Keimnachweis in die Hand geben zu können.

Im ersten Teil der Studie sollten zunächst verschiedene Probeentnahmen (Plaque, Speichel) mit Bakteriensuspensionen simuliert und hinsichtlich ihrer Praktikabilität vergleichend überprüft werden. Dazu wurden Referenzstämme von Mutans-Streptokokken (*S. mutans* NCTC 10449, *S. sobrinus* OMZ 176, *S. sobrinus* OMZ 65) und Laktobazillen (*L. paracasei* ss *paracasei* E50/242, *L. casei* IMET 10692, *L. plantarum* IMET 10691) herangezogen.

Mit einem Einmalpinsel sollten standardisierte Streptokokkensuspensionen und deren Verdünnungsstufen systematisch auf die vorgegebenen Impfareale des Dentocult[®]-SM-Strip-mutans-Spatel verimpft werden; die erzeugten Keimzahlklassen sollten konventionell bestimmten Keimzahlen gleicher Suspensionen gegenübergestellt werden.

Dentocult[®] LB und der CRT[®] *bacteria* SM und LB wurden mit in Bakteriensuspensionen von Laktobazillen und Mutans-Streptokokken getauchten Plastik- bzw. Holzspateln beimpft (Abdruck); die hervorgerufenen Keimzahlklassen sollten wiederum mit quantitativen Keimzahlen unteretzt werden.

Analog den auf dem Dentocult[®] SM Strip mutans-Spatel vorgegebenen Impfarealen waren die Bakteriensuspensionen auf dem CRT[®] *bacteria* bzw. auf dem Dentocult[®]-LB-Kultursystem pinselstrichförmig zu verimpfen und die Befunde quantitativ zu skalieren. Für die Standardmethode – also das konventionelle mikrobiologische Vorgehen – wurden die den kommerziellen Kultursystemen adäquaten Kulturmedien ausgewählt.

In einer Pilotstudie sollte nachfolgend die klinische Erprobung des In-vitro-Vorgehens mit der Entnahme und Anzucht von Plaque- und Speichelproben erfolgen. Mutans-

Streptokokken und Laktobazillen aus Fissurenplaque der Okklusalfächen vollständig durchgebrochener Sechs-Jahr-Molaren und aus dem Speichel von Kindern im Alter von 6 bis 7 Jahren sollten auf den kommerziellen Kultursystemen auf separaten Arealen (Plaque) und großflächig (Speichel) angezüchtet und semiquantitativ bewertet werden.

Als Hypothese für die In-vitro-Untersuchungen wurde angenommen, dass

- sich die Keimzahlklassen von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen unabhängig vom Impfverfahren auf den unterschiedlichen Kultursystemen nicht unterscheiden.
- sich die semiquantitativen Keimzahlklassen auf den Kultursystemen quantitativ unterscheiden.
- sich die Keimzahlklassen kleiner Arealbeimpfungen ebenso gut ablesen lassen wie die Keimzahlklassen von großflächig verimpften Bakteriensuspensionen.

Als Hypothese für die Pilotstudie wurde angenommen, dass

- die mikrobiologischen Befunde in Beziehung zum oralen Gesundheitsstatus der Kinder stehen.
- das Vorkommen von Mutans-Streptokokken im Speichel ihr Vorkommen in der Fissurenplaque reflektiert.
- Laktobazillen als Speichelkeime im Vergleich zur Approximalplaque in der Fissurenplaque vermehrt nachweisbar sind.

4 Methodik

4.1 Bakterienstämme

Die In-vitro-Studie wurde im mikrobiologischen Labor der Poliklinik für Präventive Zahnheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena durchgeführt. Zur Simulation von Plaque- und Speichelproben wurden Referenzstämme eingesetzt (Tab. 1).

Tab. 1: In die Untersuchung einbezogene Bakterienstämme

Taxon	Stammnummer
Streptococcus mutans (c)	NCTC ¹ 10449,
Streptococcus sobrinus (d)	OMZ 176 ²
Streptococcus sobrinus (g)	OMZ 65 ²
Lactobacillus plantarum	IMET 10691 ³
Lactobacillus casei	IMET 10692 ³
Lactobacillus paracasei ss paracasei	E50/242 ⁴

¹ National Collection of Type Cultures, London, UK

² Dept. of Oral Microbiology and General Immunology, Dental Institute, Zürich, Schweiz, Prof. B. Guggenheim

³ Zentralinstitut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie, Jena, Deutschland, Prof. W. Köhler

⁴ Speichelisolat, Mikrobiologisches Labor der Poliklinik für Präventive Zahnheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Dr. S. Kneist

Die Bakterien lagen als Stammkonserven in MicrobanksTM (Mast Diagnostica, Reinfeld) bei $\leq -18^{\circ}\text{C}$ im Tiefkühlschrank vor (Abb. 5). Für jeden Versuch wurden je zwei Keramikperlen eines Stammes entnommen und in ein Kulturröhrchen mit 10 ml Balmelli-Bouillon (10 g Bacto-Tryptose, 5 g Hefe-Extrakt, 5 g K_2HPO_4 , 3 g Fleischextrakt, 50 g Saccharose, ad 1000 ml Aqua dest.; pH 7,2) verimpft. Die Kulturen wurde 24 Stunden (Streptokokken) bzw. 48 Stunden (Laktobazillen) im Anaerobierbrutschrank (95 % N_2 , 5 % CO_2 ; Heraeus VT 5042) bei 37°C angezüchtet.

Um für die nachfolgenden Untersuchungen immer Kulturen am Ende ihrer logarithmischen Wachstumsphase zu garantieren und vergleichbare Dreifachbestimmungen vornehmen zu können, wurden die Stämme immer zur gleichen Tageszeit an unterschiedlichen Tagen verimpft. Jeweils vormittags und nachmittags wurde eine Versuchsserie durchgeführt.

Die so gewonnenen Impfsuspensionen wurden auf ihre Reinheit im Grampräparat kontrolliert.

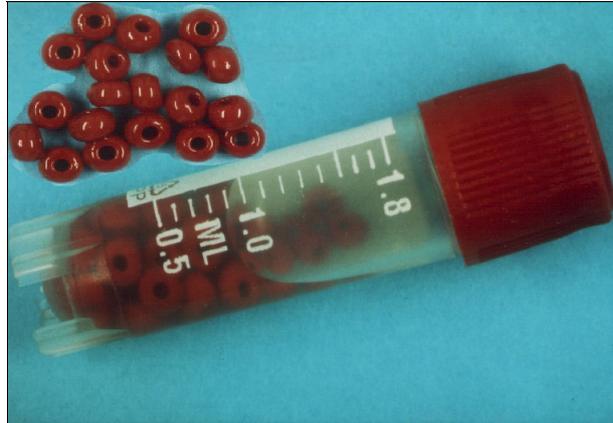


Abb. 5: Microbanks™ (rechts) mit Keramikperlen (links) zur Haltung der Bakterienstämme

4.2 Quantitative und semiquantitative Keimzahlbestimmungen

Quantitative Keimzahlbestimmungen

Von den 24- (Streptokokken) bzw. 48-Stunden-Kulturen (Laktobazillen) wurden Verdünnungsreihen in steriler Kochsalzlösung zur Keimzahlbestimmung angefertigt. Dazu wurden sie in Dezimalschritten bis 10^{-5} bzw. 10^{-6} verdünnt.

Je 0,1 ml aus den Verdünnungsstufen der Streptokokken wurden auf drei Petrischalen mit Mitis-salivarius-Agar (Difco) mit 0,2 I.E. pro ml Bacitracin (Serva) (MSB, Gold et al. 1973) ausgespatelt und weiterhin auf drei Petrischalen mit Mitis-salivarius-Agar (Difco) mit 41 % Saccharose und 0,2 I.E. pro ml Bacitracin (Serva) (MS41B, Laurisch 1997). Insgesamt wurden für jeden Stamm Dreifachbestimmungen vorgenommen.

Analog der Streptokokken-Suspensionen wurden die Laktobazillen-Suspensionen behandelt. Auf jeweils drei Petrischalen mit Rogosa-Agar der Firma Difco und mit Rogosa-Agar der Firma Mast Diagnostica wurde je 0,1 Milliliter aus den Verdünnungsstufen ausgespatelt. Auch für alle drei Stämme der Laktobazillen wurden Dreifachbestimmungen vorgenommen.

Die Bebrütung der Streptokokken und Laktobazillen erfolgte vier Tage bei 35 ± 2 °C (Heraeus B 6760) in Anaerobiertöpfen (BBL GasPak®-Anaerobic System, Maryland, USA).

Semiquantitative Keimzahlbestimmungen

Zur semiquantitativen Keimzahlbestimmung der Bakteriensuspensionen wurden die beiden Kulturbestecke Dentocult[®] SM Strip mutans und LB (Orion Diagnostica, Espoo, Finnland) und der CRT[®] *bacteria* (Ivoclar Vivadent GmbH, Schaan, Liechtenstein) herangezogen.

- Das Kultursystem Dentocult[®] SM Strip mutans dient der Anzucht von Mutans-Streptokokken an einem angerauten Plastikspatel (flächenmäßig unterteilt und nicht unterteilt) in einer Mitis-salivarius-Bouillon mit Bacitracin. Der Dentocult[®] LB-Kulturträger ist mit Rogosa-Agar beschickt und dient der Anzucht von Laktobazillen.
- Der CRT[®] *bacteria* ist ein Doppeltest mit je einer Agaroberfläche zur Anzucht von Mutans-Streptokokken auf Mitis-salivarius-Agar mit 41 % Saccharose und Bacitracin und gleichzeitiger Anzucht von Laktobazillen auf Rogosa-Agar.

Zur besseren Übersicht und Vergleichbarkeit sind die Kulturmedien der quantitativen und semiquantitativen Keimzahlbestimmungen in Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 2: Kulturmedien der Chair-side-Tests und ihr Äquivalent

Chair-side-Test	Äquivalente Kulturmedien	
	Semiquantitative Keimzahlbestimmung	Quantitative Keimzahlbestimmung
Dentocult [®] SM	MSB-Bouillon (Difco, Gold et al. 1973)	MSB-Agar (Difco, Gold et al. 1973)
CRT [®] <i>bacteria</i>	MS41B-Agar (Mast, Laurisch 1997)	MS41B-Agar (Mast, Laurisch 1997)
Dentocult [®] LB	Rogosa-Agar (Difco)	Rogosa-Agar (Difco)
CRT [®] <i>bacteria</i>	Rogosa-Agar (Mast)	Rogosa-Agar (Mast)

Zum einen wurden die semiquantitativen Kulturbestecke nach den Angaben des Herstellers ganzflächig mit den jeweiligen Bakteriensuspensionen (analog zum Speichel) beimpft und zum anderen die Bakteriensuspensionen mit verschiedenen Hilfsmitteln entnommen und auf ausgewählte Areale der Kulturbestecke verimpft bzw. „gestempelt“.

Als Hilfsmittel für das Beimpfen von Arealen wurden

- ein Pinsel mit Pinselhalter (Einwegpinsel hart, Art.-Nr.: 533664, Ivoclar Vivadent GmbH, Ellwangen) (Abb. 6),

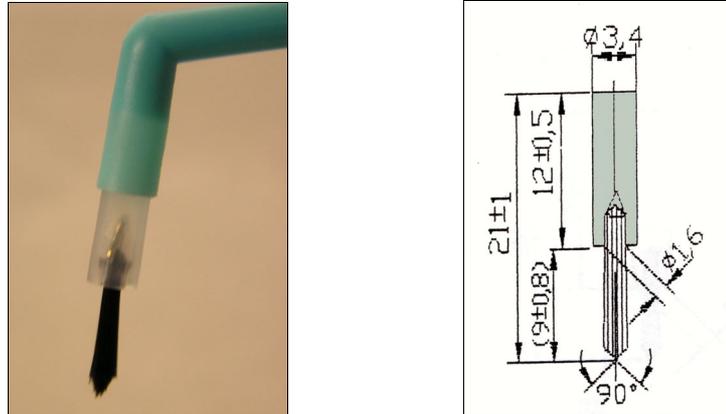


Abb. 6: Pinsel mit Pinselhalter (links) und Maße des Pinsels (rechts) (Ivoclar Vivadent GmbH)

- ein Holzmundspatel (Einmal-Holzmundspatel, Dahlhausen, Köln) und
- ein Plastikspatel (Strip mutans, Dentocult[®] SM, Orion Diagnostica, Espoo, Finnland) verwendet.

4.3 Praktisches Vorgehen

Es wurden die unter Kapitel 4.2 beschriebenen Verdünnungsstufen der Mutans-Streptokokken und Laktobazillen eingesetzt. Unter aseptischen Bedingungen in der Werkbank (Heraeus Lamin Air, HBB 2448, Hanau, Deutschland) wurden, wie in den Abbildungen 7 bis 9 dargestellt, die folgenden Schritte durchgeführt:

In jede/r Verdünnungsstufe wurde jeweils

- ein Holzspatel und ein Pinsel eingetaucht (etwa 5 Sekunden) und auf die MS41B-Agarfläche eines CRT[®] bacteria-Tests gestempelt bzw. oberhalb des Spatelabdruckes auf der MS41B-Agarfläche des CRT[®] bacteria-Tests ausgestrichen; analog zur Verimpfung der Mutans-Streptokokken wurde der Rogosa-Agar auf dem CRT[®] bacteria mit den entsprechenden Verdünnungsstufen der Laktobazillen-Suspensionen beimpft.

- je ein Pinsel eingetaucht und auf die MS41B-Agarfläche eines CRT[®] *bacteria*-Tests untereinander ausgestrichen (4 Verdünnungsstufen passen auf einer Seite des CRT[®] untereinander); analog zur Verimpfung der Mutans-Streptokokken wurde der Rogosa-Agar auf dem CRT[®] *bacteria* mit den entsprechenden Verdünnungsstufen der Laktobazillen-Suspensionen beimpft.
- ein Plastikspatel (Strip mutans, Dentocult[®] SM) eingetaucht und im Dentocult[®] SM Kulturröhrchen bebrütet; zum Verimpfen der Laktobazillen-Suspensionen wurde ein Holzspatel und ein Plastikspatel eingetaucht und auf den Dentocult[®] LB gestempelt. Oberhalb des Stempelabdruckes wurde analog zum Vorgehen auf dem CRT[®] *bacteria* ein Pinsel ausgestrichen.
- ein Pinsel eingetaucht und auf den unterteilten Arealen des Plastikspatels (Strip mutans, Dentocult[®] SM) ausgestrichen. Vier Verdünnungsstufen wurden je Plastikspatel verimpft und nachfolgend im Dentocult[®]-SM-Kulturröhrchen bebrütet. Auf der Rogosa-Agarfläche des Dentocult[®]-LB-Tests wurden gleichfalls vier Verdünnungsstufen mit dem Pinsel verimpft.

Die Bebrütung der Kultursysteme CRT[®] *bacteria* und Dentocult[®] SM und LB erfolgte stehend 48 Stunden bei 35 ± 2 °C (Heraeus B 6760).

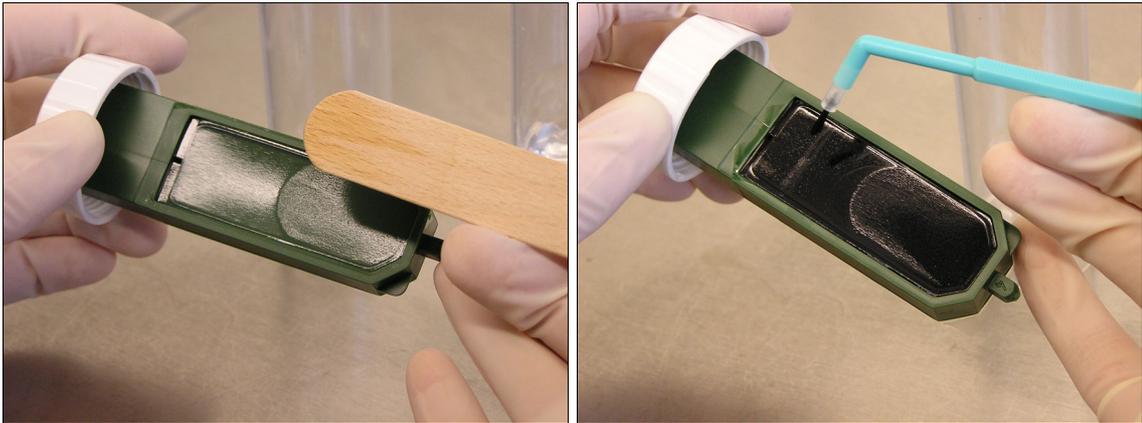
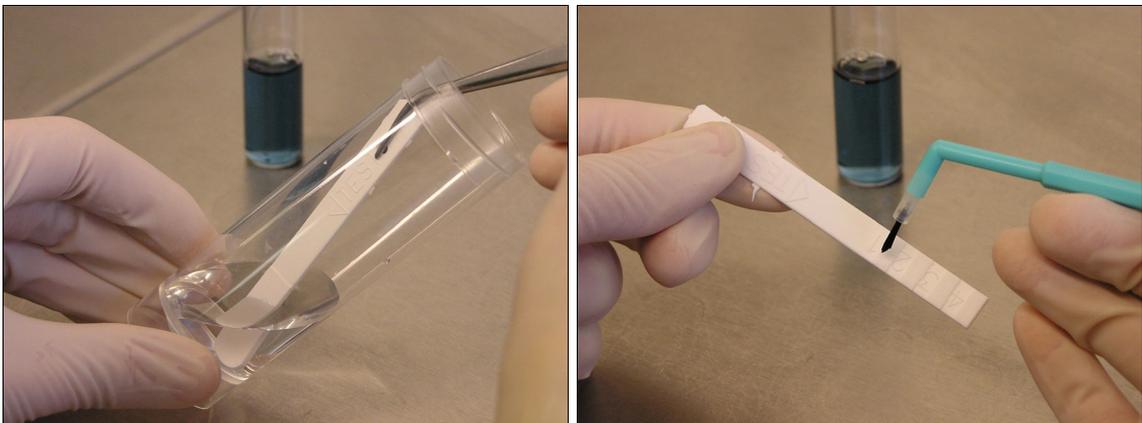
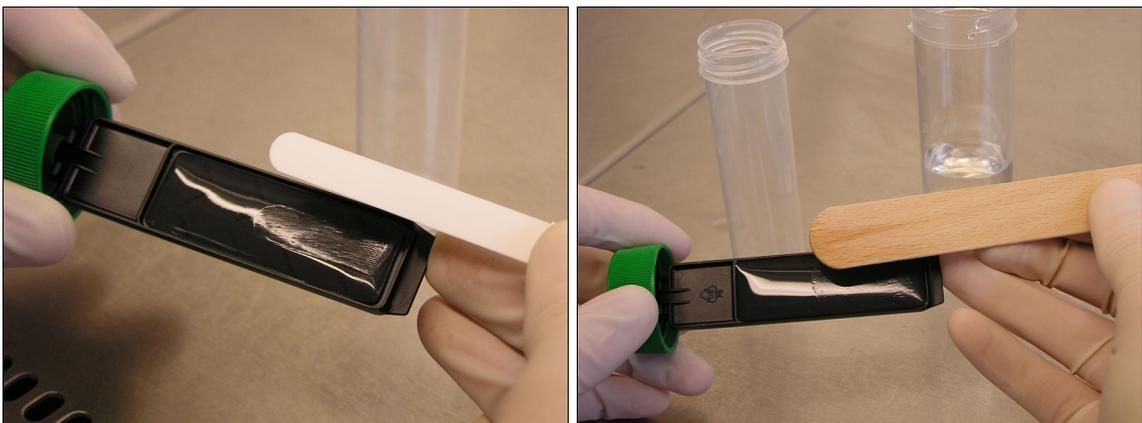
CRT[®] *bacteria*Dentocult[®] SMDentocult[®] LB

Abb. 7: CRT[®] *bacteria*: Abdruck eines Holzspatels auf die LB-Oberfläche (oben links) und Ausstrich des Pinsels oberhalb des Holzspatelabdrucks auf die SM-Oberfläche (oben rechts); Dentocult[®] SM: Eintauchen des Plastikspatels in eine Verdünnungsstufe (Mitte links) und Verimpfung der Suspension auf dem geteilten Plastikspatel (Mitte rechts); Dentocult[®] LB: Abdruck eines Plastikspatels (unten links) und Abdruck eines Holzspatels (unten rechts)

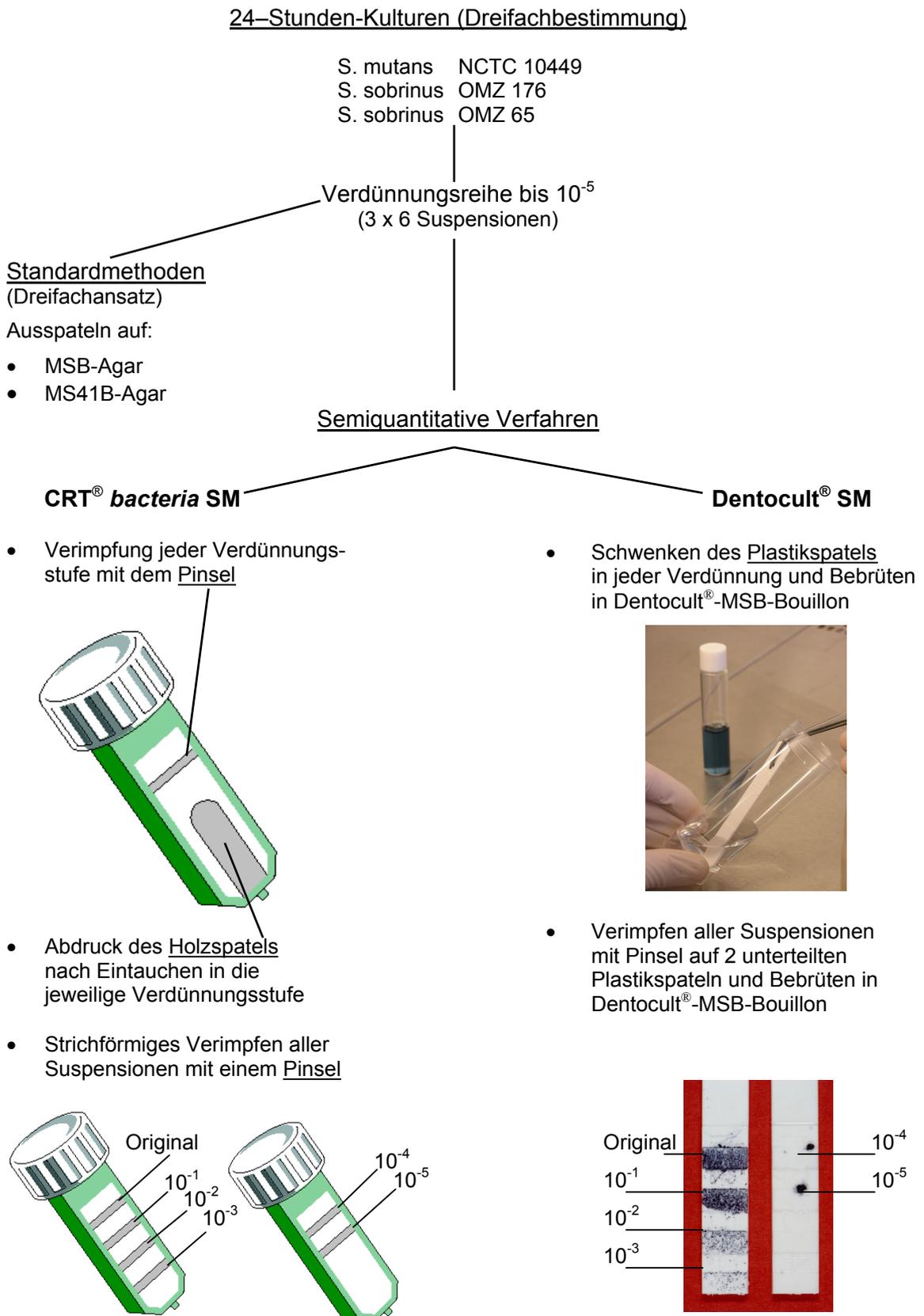


Abb. 8: Übersicht zur unterschiedlichen Verimpfung der Bakteriensuspensionen der Mutans-Streptokokken

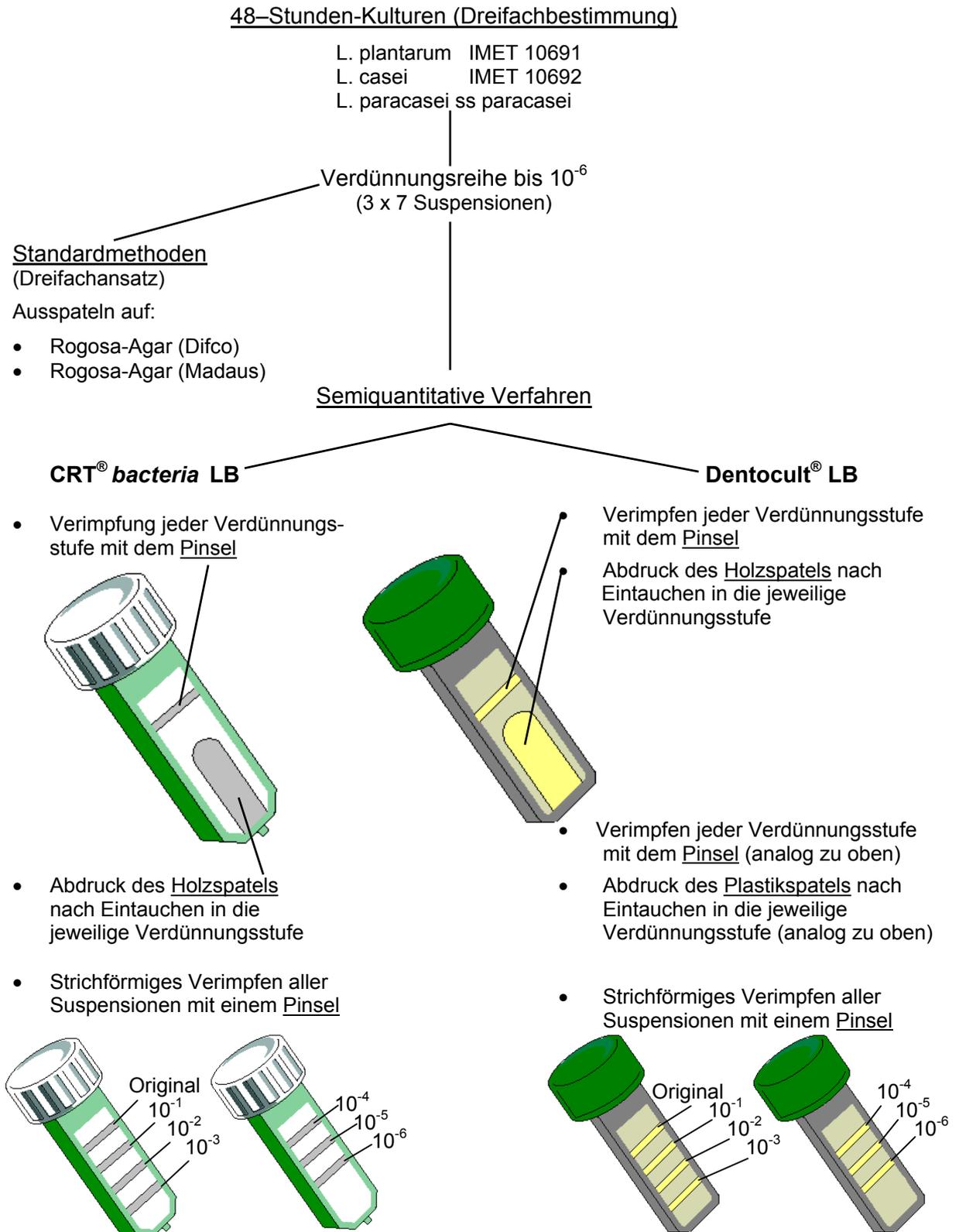


Abb. 9: Übersicht zur unterschiedlichen Verimpfung der Bakteriensuspensionen der Laktobazillen

4.4 Auswertung der Befunde und Statistik

Die Befundbewertung auf den Chair-side-Tests erfolgte nach den Angaben der Hersteller in semiquantitativen Keimzahlklassen von SM 0 bis SM 3 und LB 1 bis LB 4 durch zwei kalibrierte Untersucher (Abb. 10, 11, Tab. 3, Anhang Tab. 1 - 4).

Die beimpften Areale sollten ebenso nach der Dichte der Kolonien in Keimzahlklassen abgelesen werden.

Tab. 3: Semiquantitative Keimzahlklassen mit Kariesrisikoeinschätzung

	Kariesrisiko-Keimzahlklassen		
	<i>niedrig</i>	<i>mittel</i>	<i>hoch</i>
Mutans-Streptokokken Keimzahl pro Milliliter	SM 0 $< 10^{3-5}$	SM 1	SM 2 SM 3 $\geq 10^{5-6}$
Laktobazillen Keimzahl pro Milliliter	LB 0/1 $< 10^{3-5}$	LB 2	LB 3 LB 4 $\geq 10^{5-6}$

Das Auszählen der Kolonien auf den Petrischalen erfolgte von geeigneten Verdünnungsstufen (50 bis 150 Kolonien). Die CFU pro ml wurde als dekadischer Logarithmus ausgedrückt und für alle entsprechenden Verdünnungsstufen berechnet. Aus den dreifach bestimmten Keimzahlen pro Milliliter Stammsuspension der jeweiligen Stämme wurde der Mittelwert (\bar{x}) und die Standardabweichung (SD) berechnet.

Die durch die semiquantitativen Verfahren erhobenen Keimzahlklassen wurden, geordnet nach Referenzstamm, Impfareal und Keimzahlklasse, der entsprechenden Verdünnungsstufe und konventionell bestimmten Keimzahl auf den jeweiligen Agaren zugeordnet. Die Kreuzklassifikation (Kontingenztafel) (Hartung 1986) wurde herangezogen, um die Übereinstimmung der Ergebnisse nach den unterschiedlichen Impfverfahren und verwendeten Kulturbestecken zu überprüfen. Der Wilcoxon-Test wurde zur Prüfung signifikanter Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ herangezogen.

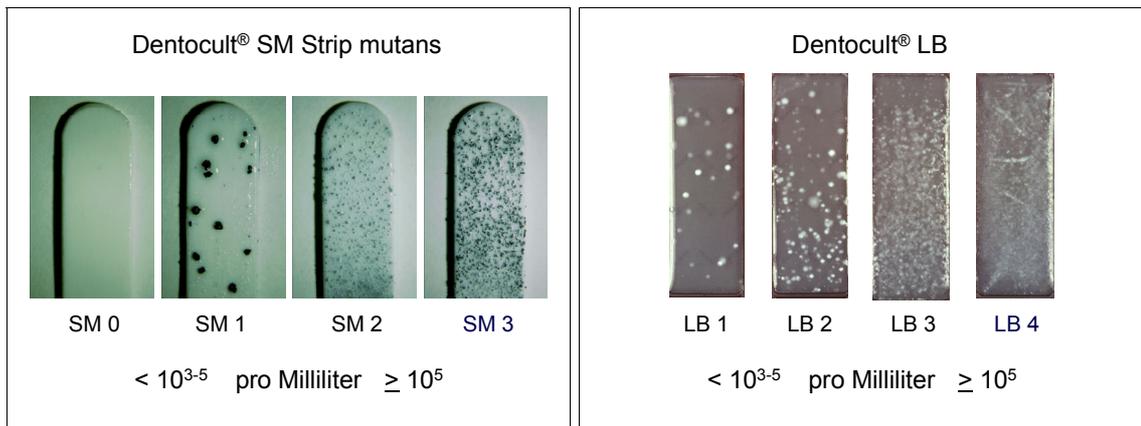


Abb. 10: Semiquantitative Keimzahlklassen von Mutans-Streptokokken (links) und Laktobazillen (rechts) des Dentocult®-Kultursystems

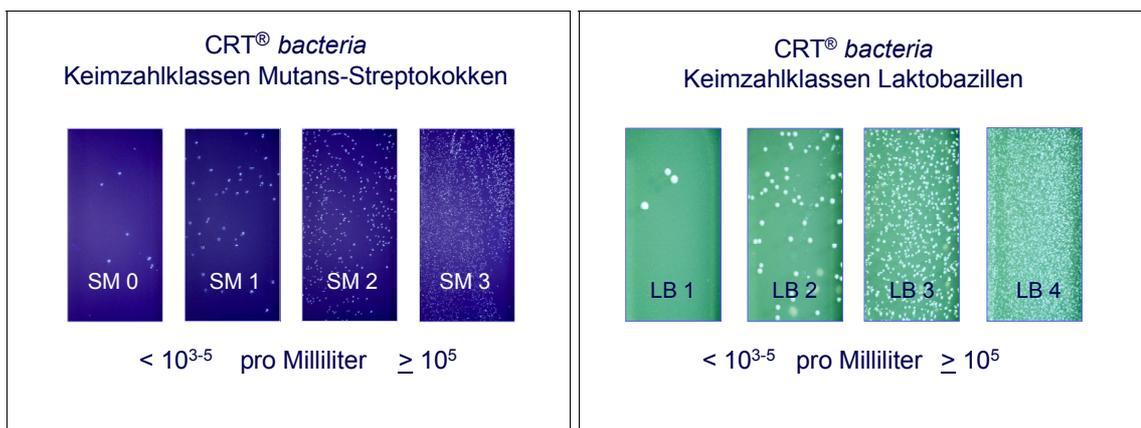


Abb. 11: Semiquantitative Keimzahlklassen von Mutans-Streptokokken (links) und Laktobazillen (rechts) des CRT® *bacteria*

4.5 Pilotstudie zur Pinseltechnik

Die Pilotstudie wurde in einer Brandenburger Zahnarztpraxis (A. Pawandenat, Prenzlauer Chaussee 155, 16348 Wandlitz) durchgeführt. Mit der zuvor in vitro skalierten Pinseltechnik wurden 26 Sechsjahrmolaren von 7 Kindern im Alter von 6 bis 7 Jahren hinsichtlich des Vorkommens von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen untersucht. Die Molaren waren kariesfrei und unversiegelt. Zur Anwendung kamen wiederum die Chair-side-Tests CRT® *bacteria* und Dentocult® SM und LB.

Die Plaqueentnahme erfolgte mit jeweils einem Pinsel aus den Fissuren der Molaren in der Reihenfolge von 16, 26, 36 und 46; die vier Plaqueproben wurden auf beiden Chair-side-Tests strichförmig verimpft. Stimulierte Speichelproben der Kinder wurden auf herkömmliche Art ebenso mit beiden Kultursystemen hinsichtlich der Keimzahl von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen untersucht.

Die Pilotstudie wurde von der Ethik-Kommission des Virchow-Klinikums genehmigt (Anhang).

4.5.1 Ablauf der Pilotstudie

Der orale Gesundheitsstatus der Kinder ($d_{3,4mft}$) (Marthaler 1966) wurde nach WHO-Kriterien erhoben (WHO 1987). Initialläsionen (is/IS) wurden registriert. Mit einem Fragebogen für die Eltern wurden die Mundhygiene- und Ernährungsgewohnheiten sowie die allgemeinmedizinische Anamnese und die Fluoridanamnese der Kinder erhoben (Anhang Fragebogen Pilotstudie).

Anschließend erfolgte die Entnahme einer Plaqueprobe mittels Pinsel von okklusal aus den Fissuren der Zähne 16, 26, 36 und 46. Die Verimpfungsfolge der Plaqueproben auf dem CRT[®] *bacteria* (SM, LB) und Dentocult[®] SM und LB für jeden Zahn ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tab. 4: Zahnbezogene Verimpfungsfolge der Fissurenplaque auf den Kulturbestecken

Plaqueentnahme	Zahn 16	Zahn 26	Zahn 36	Zahn 46
1. Entnahme	CRT [®] -SM-Seite	Dentocult [®] -SM-Spatel	CRT [®] -LB Seite	Dentocult [®] -LB-Fläche
2. Entnahme	CRT [®] -LB-Seite	Dentocult [®] -LB-Fläche	CRT [®] -SM Seite	Dentocult [®] -SM-Spatel
3. Entnahme	Dentocult [®] -SM-Spatel	CRT [®] -SM-Seite	Dentocult [®] -LB-Fläche	CRT [®] -LB-Seite
4. Entnahme	Dentocult [®] -LB-Fläche	CRT [®] -LB-Seite	Dentocult [®] -SM-Spatel	CRT [®] -SM-Seite

Zunächst erfolgte die Trockenlegung des Zahnes 16 mit Watterollen und durch vorsichtiges Trockenblasen.

Mit einem sterilen Pinsel (Einwegpinsel hart, Art.-Nr.: 533664, Ivoclar Vivadent GmbH, Ellwangen, Abb. 6) wurde die Plaque von distal nach mesial durch 6-maliges „Bürsten“ unter leichtem Druck aus der Fissur entnommen.

Nach gleichem Vorgehen wurde erneut Plaque entnommen, bis pro Zahn alle Kulturbestecke inokuliert waren (Abb. 7-9, Tab. 4). In der Reihenfolge 16, 26, 36, 46 wurden die Plaqueproben quer zur langen Seite der Kulturträger separat von oben (immer der Deckel) nach unten verimpft.

Es folgte die Durchführung beider Speicheltests (CRT[®] *bacteria* und Dentocult[®] SM Strip mutans und LB) auf herkömmliche Art mit paraffinstimuliertem Speichel. Für das Dentocult[®]-SM-System wurde ein Plastikspatel auf der Zunge 10-mal gedreht und entnommen. Alle Kultursysteme wurden 48 Stunden im Brutschrank (Cultura, Ivoclar Vivadent GmbH) bei 35 ± 2 °C bebrütet. Die Befunde wurden wiederum in semiquantitativen Keimzahlklassen abgelesen und fotografisch dokumentiert (Abb. 10, 11).

Zum Abschluss erfolgte die Erhebung des Mundhygienestatus der Kinder mit dem von Turesky und Mitarbeitern (1970) modifizierten Plaqueindex nach Quigley und Hein (QHI) (1962) und dem Papillen-Blutungs-Index (PBI) nach Saxer und Mühlemann (1975). Die Befunde wurden im dafür erstellten Befundblatt dokumentiert (Anhang).

5 Ergebnisse

5.1 In-vitro-Studie zur Plaquentnahmetechnik

5.1.1 Mutans-Streptokokken

Quantitative Keimzahlbestimmungen

Die ermittelten Keimzahlen schwankten nach 48-stündiger Kultivierung auf beiden Agaren um 2 bis 3 Zehnerpotenzen. Mit MS41B-Agar, der einen höheren Saccharoseanteil gegenüber dem herkömmlichen MSB-Agar aufwies, wurden tendenziell (um eine Zehnerpotenz) höhere Keimzahlen angezüchtet (p-Wert: 0,25 ns).

Abbildung 12 zeigt die unverdünnte *S. sobrinus*-OMZ-176-Suspension auf MSB- und MS41B-Agar bei gleicher Vergrößerung (10-fach); die höhere Keimausbeute auf MS41B wird bereits makroskopisch sichtbar.

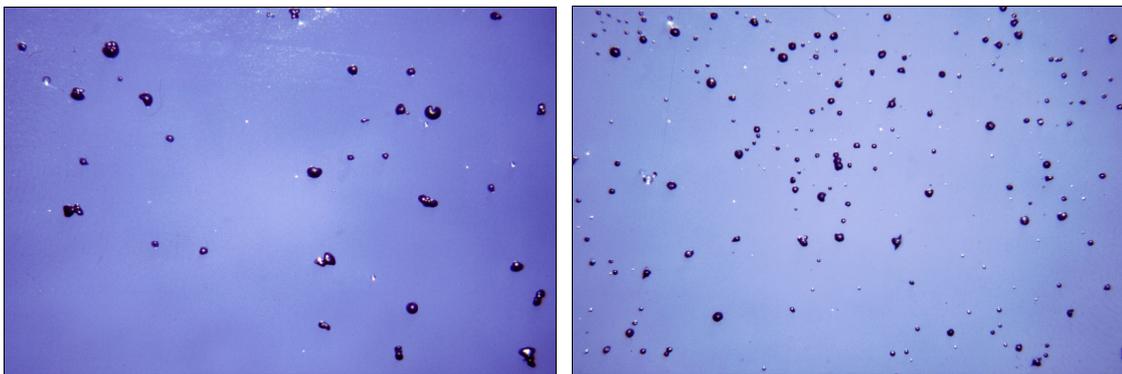


Abb. 12: 24-Stunden-Kultur von *S. sobrinus* OMZ 176 auf Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin (MSB) (links) und Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin und 41 % Saccharose (MS41B) (rechts) (10-fache Vergrößerung)

Die auf den konventionellen Kulturmedien (MSB- und MS41B-Agar) erreichten Keimzahlen (\bar{x} log CFU pro ml) der 24-Stunden-Kulturen der ausgewählten Stämme und ihrer Verdünnungsstufen bis 10^{-5} sind in den Abbildungen 13 bis 15 dargestellt. Die Keimzahlen lagen mit einem mittleren log CFU 7.2231 pro ml für *S. sobrinus* OMZ 176 am höchsten, gefolgt von *S. mutans* NCTC 10449 mit einem log CFU von 6.1501 pro ml und *S. sobrinus* OMZ 65 mit einem log CFU von 4.9826 pro ml (Anhang Tab. 5).

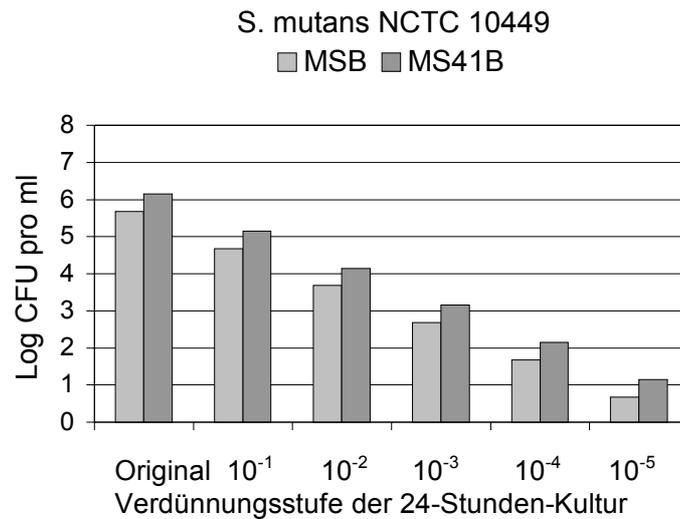


Abb. 13: Log CFU pro ml Keimsuspension von Verdünnungsstufen einer 24-Stunden-Kultur von *S. mutans* NCTC 10449 auf Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin (MSB) (Gold et al. 1973) und Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin und 41 % Saccharose (MS41B) (Laurisch 1997) (n = 3 Versuchsserien)

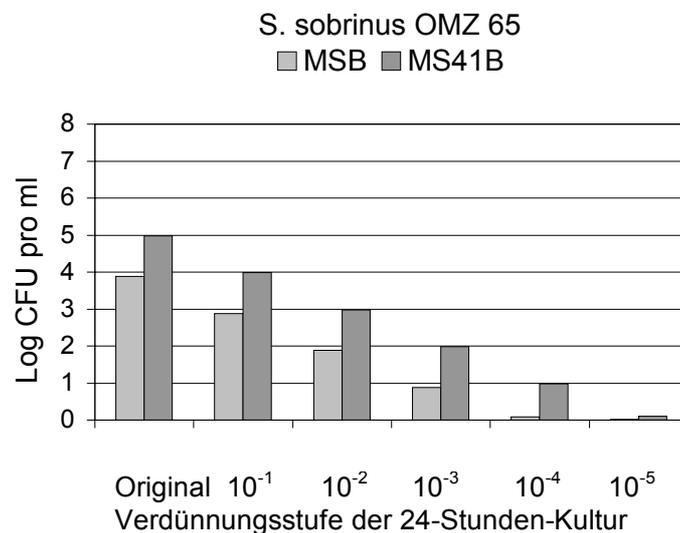


Abb. 14: Log CFU pro ml Keimsuspension von Verdünnungsstufen einer 24-Stunden-Kultur von *S. sobrinus* OMZ 65 auf Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin (MSB) (Gold et al. 1973) und Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin und 41 % Saccharose (MS41B) (Laurisch 1997) (n = 3 Versuchsserien)

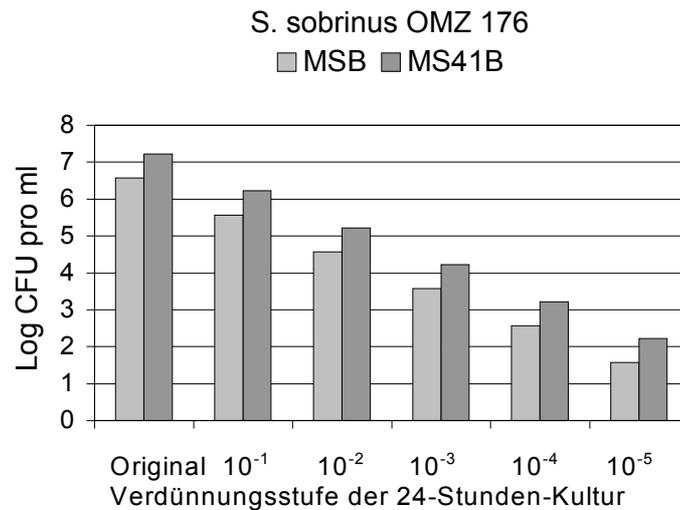


Abb. 15: Log CFU pro ml Keimsuspension von Verdünnungsstufen einer 24-Stunden-Kultur von *S. sobrinus* OMZ 176 auf Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin (MSB) (Gold et al. 1973) und Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin und 41 % Saccharose (MS41B) (Laurisch 1997) (n = 3 Versuchsserien))

Semiquantitative Keimzahlbestimmungen - Dentocult[®] SM

Die Ergebnisse des Dentocult[®]-SM-Kultursystems unter herkömmlicher Anwendung (Beimpfen der gesamten Spatelfläche) im Vergleich zur strichförmigen Verimpfung mit einem Pinsel (site-spezifischer Plastikspatel) sind in Abbildung 16 veranschaulicht und in Tabelle 5 dargestellt.

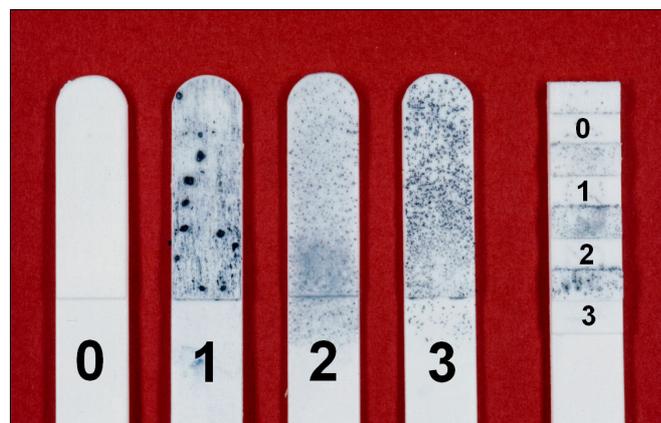


Abb. 16: Keimzahlklasse SM 0 bis SM 3 nach Inokulation mit Suspensionen von *S. sobrinus* OMZ 65 auf Dentocult[®] SM Strip mutans und dem site-spezifischen Plastikspatel (rechts außen)

Die Übereinstimmung der Ergebnisse nach beiden Impfmethoden (Gesamtfläche, site-spezifisch mit Pinsel) wurde mit der Kreuzklassifikation geprüft. Dazu konnten 54 Befundpaare einbezogen werden.

In vier Fällen lagen für *S. mutans* NCTC 10449 und für *S. sobrinus* OMZ 176 die Pinselkeimzahlklassen (Kkl 1, niedriges Risiko) unter den Spatelkeimzahlklassen (Kkl 2, hohes Risiko). Für *S. sobrinus* OMZ 65 lagen in drei Fällen die Spatelkeimzahlklassen (Kkl 1, niedriges Risiko) unter den Pinselkeimzahlklassen (Kkl 2, hohes Risiko).

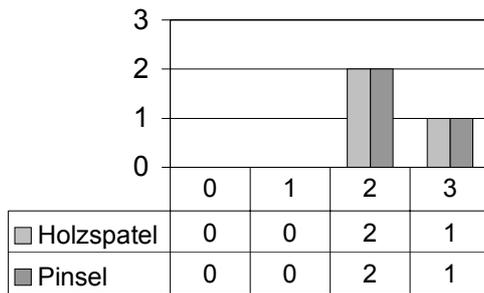
Tab. 5: Übereinstimmung der Keimzahlklassen (Kkl) einer 24-Stunden-Kultur von ausgewählten Streptokokken auf Dentocult® SM bei unterschiedlicher Verimpfung (n = 3 Versuchsserien)

S. mutans NCTC 10449					S. sobrinus OMZ 65					S. sobrinus OMZ 176				
Kkl Plastikspatel					Kkl Plastikspatel					Kkl Plastikspatel				
	0	1	2	3		0	1	2	3		0	1	2	3
Kkl Pinsel 0	7				Kkl Pinsel 0	3				Kkl Pinsel 0	1	5		
1	3	1	1		1	1	5			1			3	
2			4		2		3	1	1	2			1	2
3				1	1				4	3				6

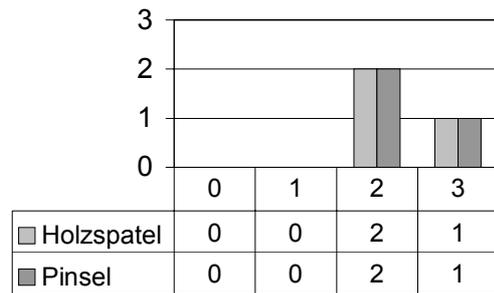
Semiquantitative Arealbeimpfung der Kultursysteme - CRT® bacteria

In den Abbildungen 17 bis 19 sind die Keimzahlklassen der Bakteriensuspensionen der drei Stämme auf dem CRT® bacteria nach beiden Impfmethoden dem dekadischen Logarithmus der konventionell erreichten CFU auf MS41B-Agar zugeordnet (Anhang Tab. 6 bis 8). Für jeden Stamm wurden Dreifachbestimmungen vorgenommen.

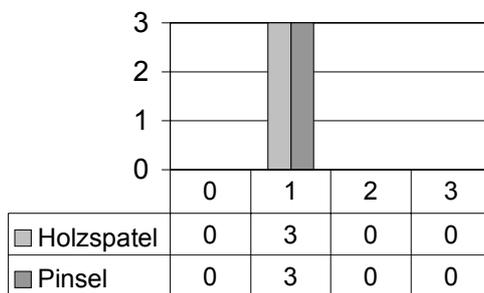
S. mutans NCTC 10449



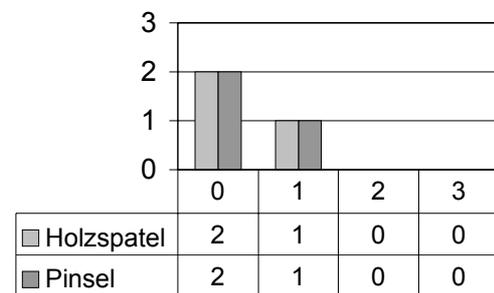
log CFU pro ml der 24-Stunden-Kultur
auf MS41B-Agar: 6.1501



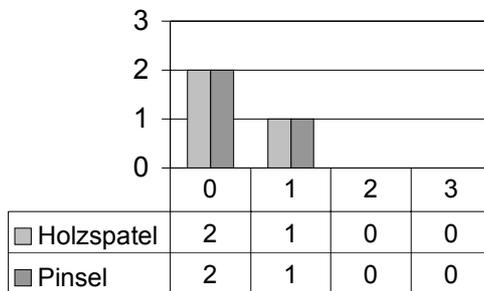
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-1}
auf MS41B-Agar: 5.1501



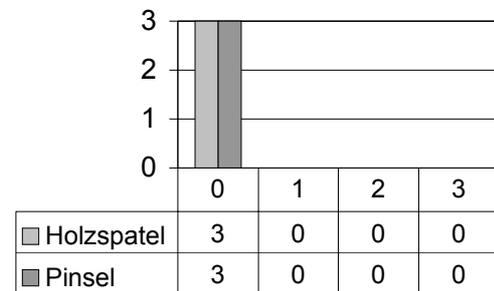
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-2}
auf MS41B-Agar: 4.1501



log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-3}
auf MS41B-Agar: 3.1501



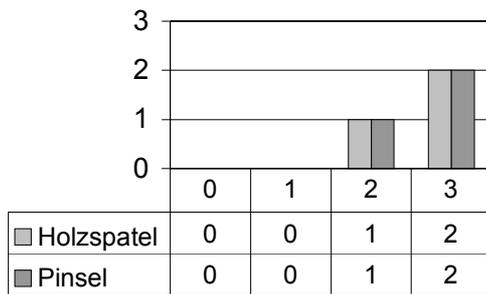
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-4}
auf MS41B-Agar: 2.1501



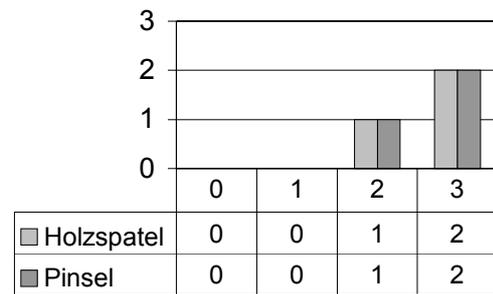
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-5}
auf MS41B-Agar: 1.1501

Abb. 17: Häufigkeit (Ordinate) der semiquantitativen Keimzahlklassen (Abszisse) einer 24-Stunden-Kultur und deren Verdünnungsstufen bis 10^{-5} von *S. mutans* NCTC 10449 nach Verimpfung mit einem Holzspatel und einem Pinsel auf dem CRT[®] *bacteria* und konventionell auf MS41B-Agar im Ergebnis von Dreifachbestimmungen (Anhang Tab. 6)

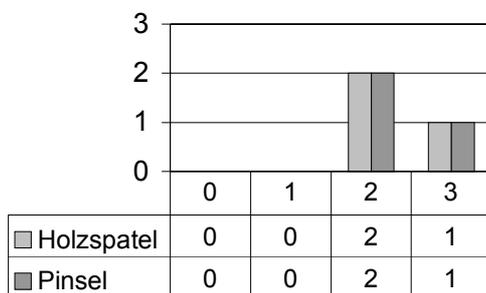
S. sobrinus OMZ 65



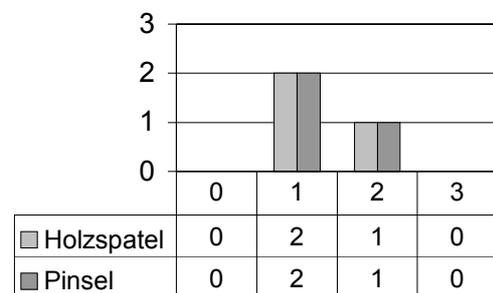
log CFU pro ml der 24-Stunden-Kultur
auf MS41B-Agar: 4.9826



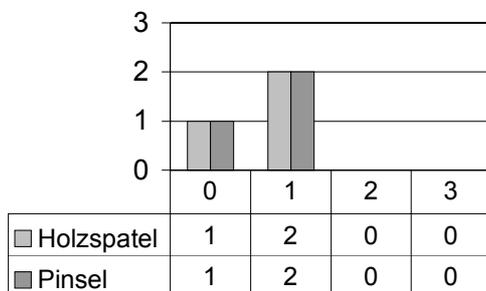
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-1}
auf MS41B-Agar: 3.9826



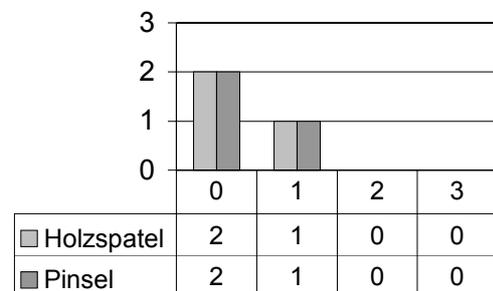
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-2}
auf MS41B-Agar: 2.9826



log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-3}
auf MS41B-Agar: 1.9826



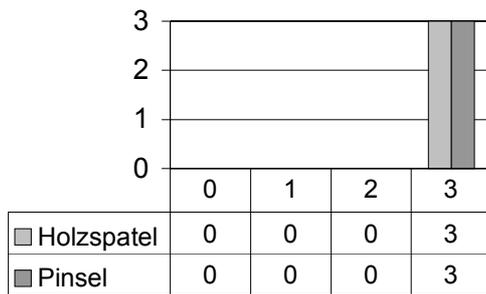
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-4}
auf MS41B-Agar: 0.9826



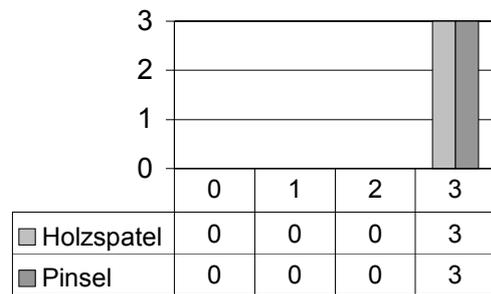
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-5}
auf MS41B-Agar: 0.0982

Abb. 18: Häufigkeit (Ordinate) der semiquantitativen Keimzahlklassen (Abszisse) einer 24-Stunden-Kultur und deren Verdünnungsstufen bis 10^{-5} von *S. sobrinus* OMZ 65 nach Verimpfung mit einem Holzspatel und einem Pinsel auf dem CRT[®] *bacteria* und konventionell auf MS41B-Agar im Ergebnis von Dreifachbestimmungen (Anhang Tab. 7)

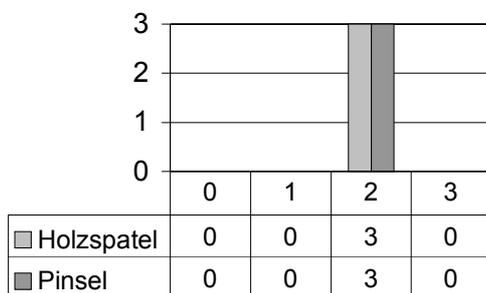
S. sobrinus OMZ 176



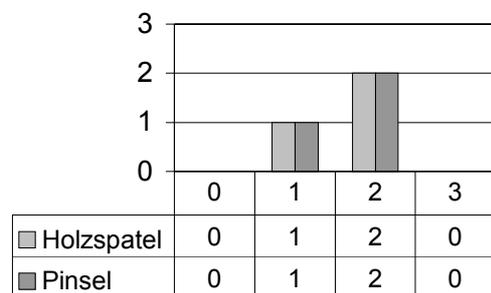
log CFU pro ml der 24-Stunden-Kultur
auf MS41B-Agar: 7.2231



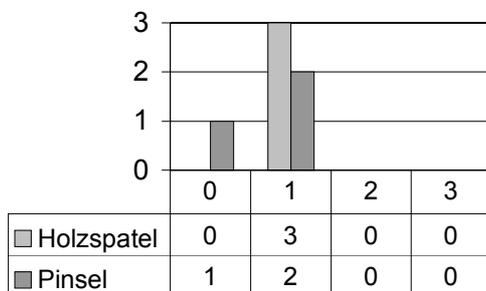
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-1}
auf MS41B-Agar: 6.2231



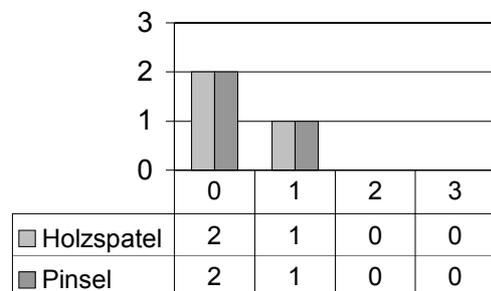
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-2}
auf MS41B-Agar: 5.2231



log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-3}
auf MS41B-Agar: 4.2231



log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-4}
auf MS41B-Agar: 3.2231



log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-5}
auf MS41B-Agar: 2.2231

Abb. 19: Häufigkeit (Ordinate) der semiquantitativen Keimzahlklassen (Abszisse) einer 24-Stunden-Kultur und deren Verdünnungsstufen bis 10^{-5} von *S. sobrinus* OMZ 176 nach Verimpfung mit einem Holzspatel und einem Pinsel auf dem CRT[®] *bacteria* und konventionell auf MS41B-Agar im Ergebnis von Dreifachbestimmungen (Anhang Tab. 8)

So wurde pars pro toto mit *S. mutans* NCTC 10449 die Keimzahlklasse SM 2 mit der unverdünnten Keimsuspension und der ersten Verdünnungsstufe (Original: $1,4 \times 10^6$ CFU pro ml; Verdünnung 10^{-1} : $1,4 \times 10^5$ CFU pro ml) sowohl nach Pinselstrichverimpfung als auch mit dem Holzspatelabdruck zweimal erzeugt und die Keimzahlklasse SM 3 einmal. Mit der zweiten Verdünnungsstufe ($1,4 \times 10^4$ CFU pro ml) wurden nur noch die Keimzahlklassen SM 1 und SM 0 erzielt. Die Keimzahlklassen stimmten bei allen drei Stämmen in allen Verdünnungsstufen unabhängig von der Impfmethode (Pinsel, Holzspatel) überein.

Abbildung 20 zeigt beispielhaft das Impfergebnis unterschiedlicher Verdünnungen einer 24-Stunden-Kultur von *S. mutans* NCTC 10449 nach Holzspatelabdruck und Pinselstrich in den Keimzahlklassen SM 0 bis SM 3.

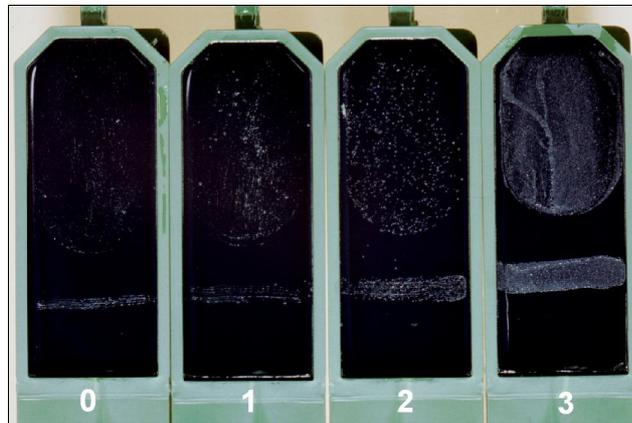


Abb. 20: Koloniedichte der Keimzahlklasse SM 0 (links) bis SM 3 (rechts) von *S. mutans* NCTC 10449 nach Inokulation der unverdünnten 24-Stunden-Kultur und von Verdünnungsstufen bis 10^{-3} nach Beimpfen mit Pinsel und Holzspatel auf dem CRT[®] *bacteria*

Die Übereinstimmung der Keimzahlklassen der drei Streptokokkenstämme in Abhängigkeit von der Methode der Verimpfung der Stammsuspensionen auf dem CRT[®] *bacteria* ist zusammenfassend in Tabelle 6 dargestellt. Nur in einem Fall (*S. sobrinus* OMZ 176) ging die Holzspatelmethode mit der Keimzahlklasse SM 1 einher und die Pinselmethode mit der Keimzahlklasse SM 0.

Tab. 6: Übereinstimmung der Keimzahlklassen (Kkl) einer 24-Stunden-Kultur von ausgewählten Streptokokken auf dem CRT[®] *bacteria* bei unterschiedlicher Verimpfung (n = 3 Versuchsserien)

S. mutans NCTC 10449					S. sobrinus OMZ 65					S. sobrinus OMZ 176				
Kkl Holzspatel					Kkl Holzspatel					Kkl Holzspatel				
	0	1	2	3		0	1	2	3		0	1	2	3
Kkl Pinsel	0	7			Kkl Pinsel	0	3			Kkl Pinsel	0	2	1	
	1		5			1		5			1		4	
	2			4		2			5		2			5
	3					3			5		3			5

Gegenüberstellung beider Kultursysteme - Dentocult[®] SM und CRT[®] bacteria

Tabelle 7 zeigt, dass durch alleinige Pinselverimpfung - mit Ausnahme von vier Fällen - auf beiden Kultursystemen gleiche Einteilungen in hohe (SM 2 und 3) und niedrige (SM 0 und 1) Keimzahlklassen vorgenommen werden konnten. In den vier Ausnahmefällen wurden die durch einen Pinsel beimpften Areale auf dem CRT[®] *bacteria* als Kkl SM 2 eingestuft und auf dem Dentocult[®] SM Kulturbesteck als Kkl SM 1.

Tab. 7: Übereinstimmung der Keimzahlklassen (Kkl) einer 24-Stunden-Kultur von ausgewählten Streptokokken mit den Kultursystemen CRT[®] *bacteria* und Dentocult[®] SM bei unterschiedlicher Verimpfung der Suspensionen (n = 3 Versuchsserien)

Verimpfung mit dem Pinsel

S. mutans NCTC 10449					S. sobrinus OMZ 65					S. sobrinus OMZ 176				
Kkl CRT					Kkl CRT					Kkl CRT				
	0	1	2	3		0	1	2	3		0	1	2	3
Kkl Dento-	0	5	2		Kkl Dento-	0	3	1		Kkl Dento-	0	3	3	
cult [®] SM	1	2	3			1		4	2		1		1	2
	2			3		2			3		2			3
	3			1		3			2		3			6

Skalierung der semiquantitativen Keimzahlklassen nach Pinselstrichverimpfung

In je 18 Fällen wurden mit den drei Stämmen Keimzahlklassen von SM 0 bis SM 3 durch Pinselstrichverimpfung auf den Kultursystemen erzeugt. Parallel dazu wurde die Keimzahl der verwendeten Bakteriensuspensionen auf MSB-Agar (Basismedium Dentocult[®] SM) und MS41B-Agar (Basismedium CRT[®] *bacteria*) bestimmt. Somit ließen sich insgesamt 54 Keimzahlklassen den entsprechenden Keimzahlen auf den zugehörigen Kulturmedien gegenüberstellen. Getrennt nach den verwendeten Stämmen (Abb. 21, Anhang Tab. 9 und 10) wurde in allen Fällen deutlich, dass jede höhere Keimzahlklasse mit einer deutlichen Zunahme der Mutans-Streptokokken vergesellschaftet war. Die hohen Keimzahlklassen SM 2 und SM 3 entsprechen im Mittel einer Keimzahl von 10^5 bis 10^6 pro ml Keimsuspension. Beim Dentocult[®]-SM-Kultursystem waren die Keimzahlklassen allerdings von niedrigeren mittleren Keimzahlen auf MSB-Agar begleitet im Vergleich zum CRT[®]-*bacteria*-Kultursystem mit höheren mittleren Keimzahlen auf MS41B-Agar.

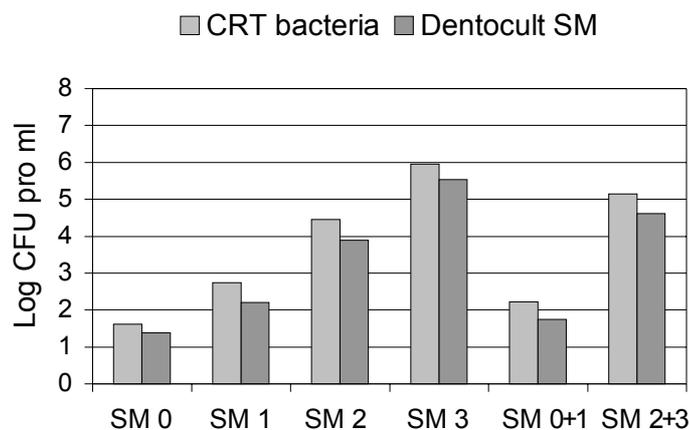


Abb. 21: Skalierung der Keimzahlklassen der Mutans-Streptokokken nach Verimpfung mit einem Pinsel auf dem CRT[®] *bacteria* und auf Dentocult[®] SM (54 Befundpaare von *S. mutans* NCTC 10449, *S. sobrinus* OMZ 176 und *S. mutans* OMZ 65)

Beim Dentocult[®]-SM-Kultursystem existierte ein signifikanter quantitativer Unterschied zwischen der Keimzahlklasse SM 1 und SM 3 (p-Wert 0,0001). Der Einzelvergleich innerhalb der Keimzahlklassen SM 0 und SM 1 ließ jedoch keine signifikante Trennung zu.

Hingegen waren die Keimzahlklassen SM 1 und SM 2 (p-Wert 0,013) sowie SM 2 und SM 3 (p-Wert 0,0058) quantitativ signifikant verschieden. Ein quantitativer Unterschied lag auch zwischen hohen (SM 3 und SM 2) und niedrigen (SM 1 und SM 0) Keimzahlklassen vor (p-Wert 0,0001) (Anhang Tab. 9).

Die auf dem CRT[®] *bacteria* ermittelten Werte unterschieden sich in den Keimzahlklassen SM 1 und SM 3 signifikant (p-Wert 0,0001). Auch zwischen den Keimzahlklassen für ein hohes (SM 2 und SM 3) und denen für ein niedriges Kariesrisiko (SM 1 und SM 0) wurde ein signifikanter Unterschied auf dem CRT[®] *bacteria* belegt (p-Wert 0,0001). Im Einzelvergleich der benachbarten Keimzahlklassen waren die Unterschiede ebenfalls signifikant (SM 0 : SM 1 p-Wert 0,036; SM 1 : SM 2 p-Wert 0,002; SM 2 : SM 3 p-Wert 0,0043) (Anhang Tab. 10).

In allen Keimzahlklassen lagen die mittleren Keimzahlen (CFU pro ml) des CRT[®] *bacteria* über denen des Dentocult[®] SM Systems. Im direkten Vergleich erwiesen sie sich jedoch nicht als signifikant unterschiedlich (SM 0 p-Wert 0,53; SM 1 p-Wert 0,35; SM 2 p-Wert 0,20; SM 3 p-Wert 0,25).

5.1.2 Laktobazillen

Quantitative Keimzahlbestimmungen

Zur Überprüfung der koloniebildenden Einheiten (CFU pro ml) wurden die Suspensionen der 48-Stunden-Kulturen der drei Laktobazillenstämmen auf Rogosa-Agar der Firma Mast Diagnostica (Kulturmedium des CRT[®] *bacteria*) und der Firma Difco (Dentocult[®] LB Kultursystem) verimpft; Dreifachbestimmungen wurden vorgenommen. Beide Kulturmedien ergaben nach 48-stündiger Anzucht eine gleich hohe Keimausbeute (Abb. 22).

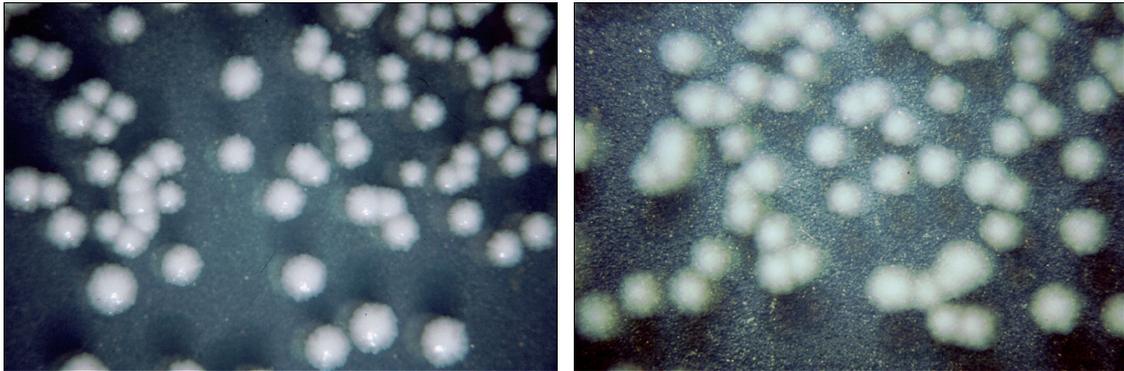


Abb. 22: Kolonien von *L. plantarum* IMET 10691 auf Rogosa-Agar der Firma Mast Diagnostica (links) und der Firma Difco (rechts) (Verdünnungsstufe 10^{-5} , 25-fache Vergrößerung)

Die Abbildungen 23 bis 25 (Anhang Tab. 11) zeigen die mittleren Keimzahlen der Stämme *L. plantarum* IMET 10691, *L. casei* IMET 10692 und *L. paracasei* ss *paracasei* E50/242 (\bar{x} log CFU pro ml) bis zur Verdünnungsstufe 10^{-6} der 48-Stunden-Kulturen.

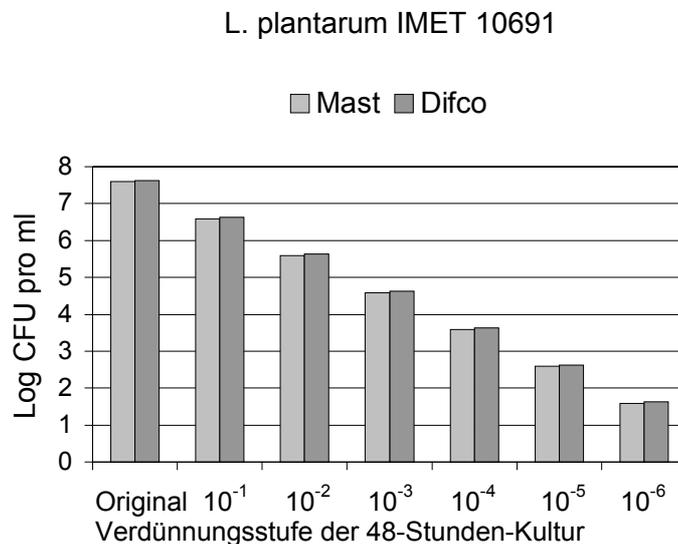


Abb. 23: Log CFU pro ml Keimsuspension von Verdünnungsstufen einer 48-Stunden-Kultur von *L. plantarum* IMET 10691 auf Rogosa-Agar (Rogosa et al. 1951) der Firmen Difco und Mast (n = 3 Versuchsserien)

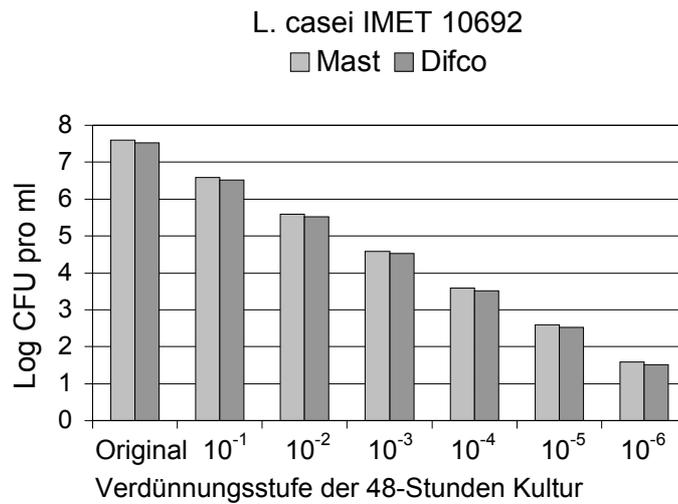


Abb. 24: Log CFU pro ml Keimsuspension von Verdünnungsstufen einer 48-Stunden-Kultur von *L. casei* IMET 10692 auf Rogosa-Agar (Rogosa et al. 1951) der Firmen Difco und Mast (n = 3 Versuchsserien)

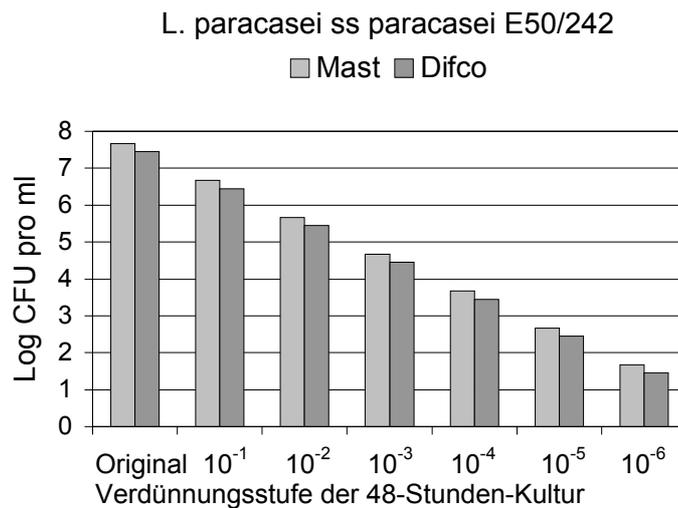


Abb. 25: Log CFU pro ml Keimsuspension von Verdünnungsstufen einer 48-Stunden-Kultur von *L. paracasei* ss *paracasei* E50/242 auf Rogosa-Agar (Rogosa et al. 1951) der Firmen Difco und Mast (n = 3 Versuchsserien)

Semiquantitative Keimzahlbestimmungen - Dentocult[®] LB

Die Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse auf Dentocult[®] LB nach Beimpfung mit unterschiedlichen Laktobazillen-Suspensionen durch Holzspatel und Pinsel bzw. Plastikspatel und Pinsel und durch den Pinsel allein. Eine optische Trennung der Keimzahlklassen war ohne Probleme möglich.

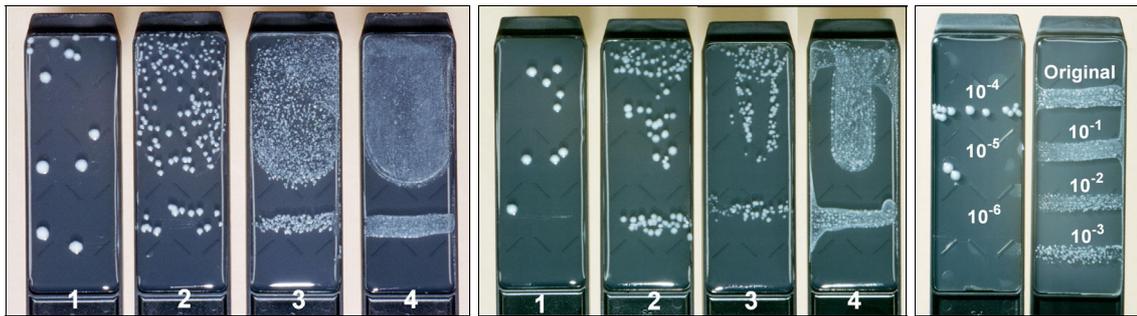


Abb. 26: auf Dentocult® LB: Holzspatelabdruck und Pinselstrich in den Keimzahlklassen LB 1 bis 4 (links), Plastikspatelabdruck und Pinselstrich der Keimzahlklassen LB 1 bis LB 4 (Mitte) und Pinselstriche aller Verdünnungsstufen allein (rechts)

Die für das Dentocult®-LB-Kulturbesteck untersuchten Impfmethode sind in den Tabellen 8 bis 10 in Form von Kreuzklassifikationen einander gegenübergestellt. Bis auf zwei Ausnahmen bestand auch hier eine vollständige Übereinstimmung und somit Gleichwertigkeit der angewandten Methoden. Die Verimpfung mit dem Holzspatel im Vergleich zum Plastikspatel führte in zwei von 63 Fällen zur Einstufung in eine höhere Keimzahlklasse. Eine daraus resultierende Einstufung in die Gruppe „hohes Risiko“ lag jedoch nur einmal vor.

Tab. 8: Übereinstimmung der Keimzahlklassen (Kkl) einer 48-Stunden-Kultur von ausgewählten Laktobazillen auf Dentocult® LB bei unterschiedlicher Verimpfung (n = 3 Versuchsserien)

		L. plantarum IMET 10691				L. casei IMET 10692				L. paracasei ss paracasei E50/242			
		Kkl Holzspatel				Kkl Holzspatel				Kkl Holzspatel			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Kkl Plastik spatel	1	7				6				5	1		
	2		2				3				2	1	
	3			4				3				2	
	4				8				9				10

Tab. 9: Übereinstimmung der Keimzahlklassen (Kkl) einer 48-Stunden-Kultur von ausgewählten Laktobazillen auf Dentocult® LB bei Verimpfung mit Holzspatel und Pinsel (n = 3 Versuchsserien)

L. plantarum IMET 10691		L. casei IMET 10692		L. paracasei ss paracasei E50/242											
Kkl Holzspatel		Kkl Holzspatel		Kkl Holzspatel											
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
Kkl	1	7				Kkl	1	6			Kkl	1	6		
Pinsel	2		2			Pinsel	2		3		Pinsel	2		3	
	3			4			3			3		3			3
	4				8		4				9				9

Tab. 10: Übereinstimmung der Keimzahlklassen (Kkl) einer 48-Stunden-Kultur von ausgewählten Laktobazillen auf Dentocult® LB bei Verimpfung mit Plastikspatel und Pinsel (n = 3 Versuchsserien)

L. plantarum IMET 10691		L. casei IMET 10692		L. paracasei ss paracasei E50/242											
Kkl Plastikspatel		Kkl Plastikspatel		Kkl Plastikspatel											
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4	
Kkl	1	7				Kkl	1	6			Kkl	1	6		
Pinsel	2		2			Pinsel	2		3		Pinsel	2		3	
	3			4			3			3		3			3
	4				8		4				9				9

Semiquantitative Keimzahlbestimmungen - CRT® bacteria

Die Abbildung 27 zeigt die Rogosa-Agar-Oberfläche des CRT® bacteria nach Verimpfung unterschiedlicher Verdünnungsstufen der Laktobazillen-Suspensionen und Abbildung 28 die entsprechenden Ausschnitte.

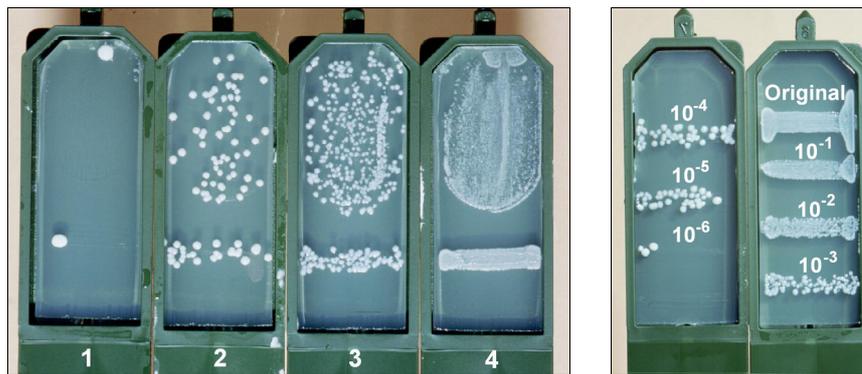


Abb. 27: Holzspatelabdruck und Pinselstrich in den Keimzahlklassen LB 1 bis LB 4 (links) und Pinselverimpfung (rechts) mit der Originalsuspension und Verdünnungsstufen bis 10^{-6} der Keimsuspensionen einer 48-Stunden-Kultur von *L. plantarum* IMET 10691 auf dem CRT[®] *bacteria*

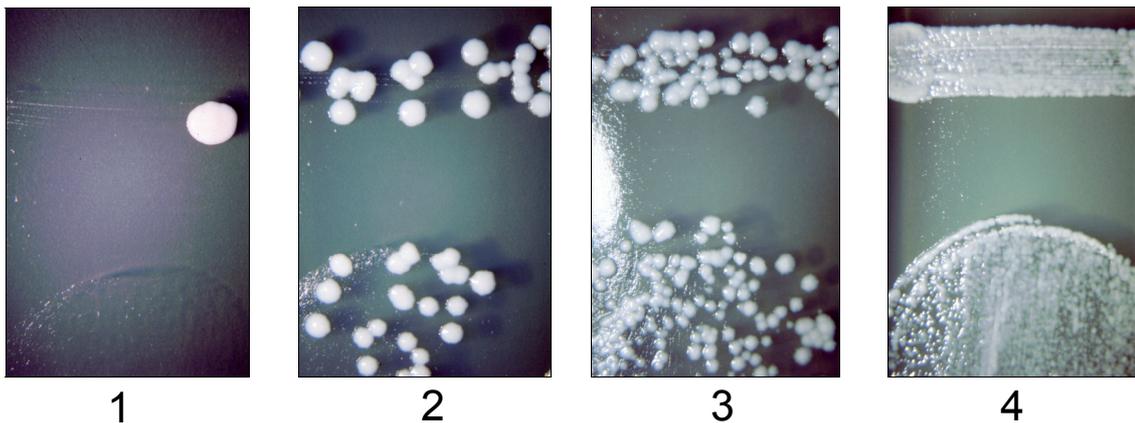
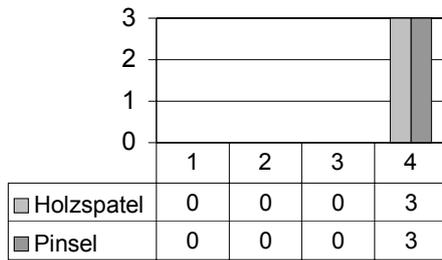
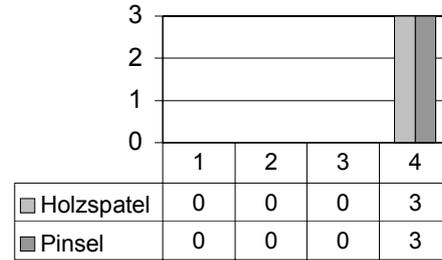


Abb. 28: Holzspatelabdruck und Pinselstrich in den Keimzahlklassen LB 1 bis LB 4 (von links nach rechts) auf dem CRT[®] *bacteria* mit einer 48-Stunden-Kultur von *L. plantarum* IMET 10691 (Ausschnitt aus Abb. 27)

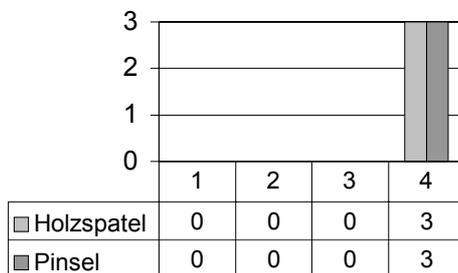
In den Abbildungen 29 bis 31 (Anhang Tab. 12 bis 14) wurden die dreifach mit einem Pinsel und einem Holzspatel verimpften Keimzahlklassen stammbezogen dem dekadischen Logarithmus der konventionell parallel angezüchteten CFU pro ml auf Rogosa-Agar der Firma Mast zugeordnet. Der Zusammenhang zwischen Verdünnungsstufe, log CFU pro ml und Keimzahlklasse wird damit eindeutig dargestellt.

L. plantarum IMET 10691

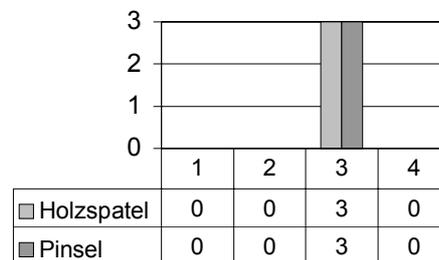
log CFU pro ml der 48-Stunden-Kultur
auf Rogosa-Agar (Mast): 7.5934



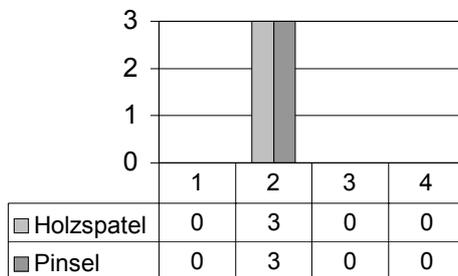
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-1}
auf Rogosa-Agar (Mast): 6.5934



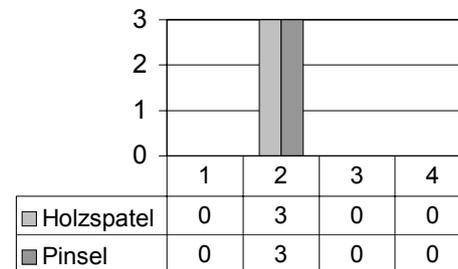
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-2}
auf Rogosa-Agar (Mast): 5.5934



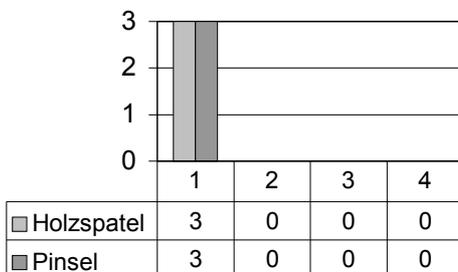
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-3}
auf Rogosa-Agar (Mast): 4.5934



log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-4}
auf Rogosa-Agar (Mast): 3.5934



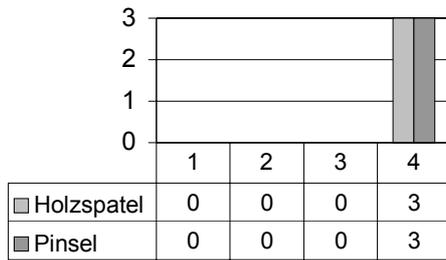
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-5}
auf Rogosa-Agar (Mast): 2.5934



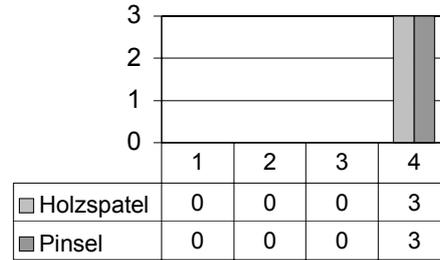
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-6}
auf Rogosa-Agar (Mast): 1.5934

Abb. 29: Häufigkeit (Ordinate) der semiquantitativen Keimzahlklassen (Abszisse) einer 48-Stunden-Kultur und deren Verdünnungsstufen bis 10^{-6} von *L. plantarum* IMET 10691 nach Verimpfung mit einem Holzspatel und einem Pinsel auf dem CRT[®] *bacteria* und konventionell auf Rogosa-Agar im Ergebnis einer Dreifachbestimmung (Anhang Tab. 12)

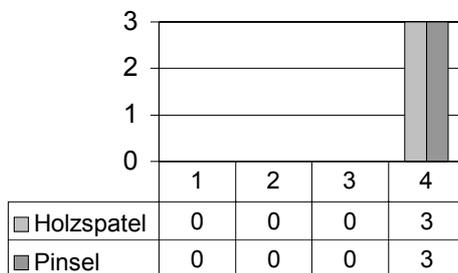
L. casei IMET 10692



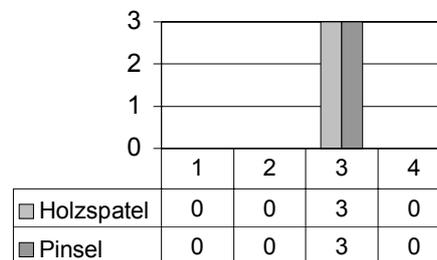
log CFU pro ml der 48-Stunden-Kultur
auf Rogosa-Agar (Mast): 7.5904



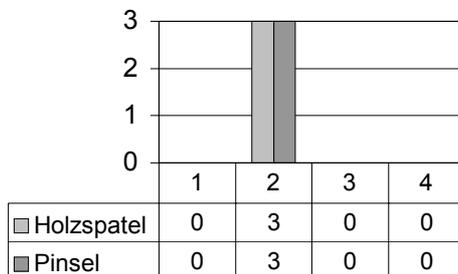
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-1}
auf Rogosa-Agar (Mast): 6.5904



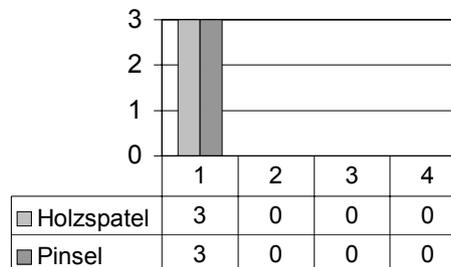
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-2}
auf Rogosa-Agar (Mast): 5.5904



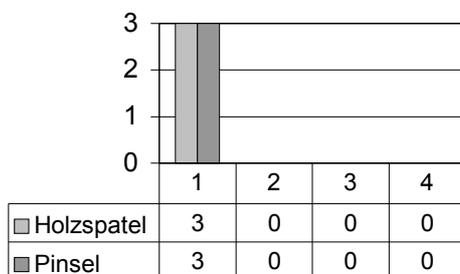
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-3}
auf Rogosa-Agar (Mast): 4.5904



log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-4}
auf Rogosa-Agar (Mast): 3.5904

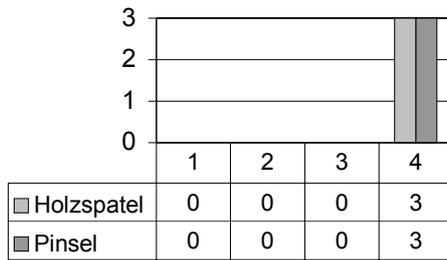


log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-5}
auf Rogosa-Agar (Mast): 2.5904

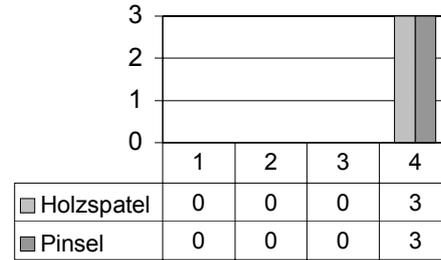


log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-6}
auf Rogosa-Agar (Mast): 1.5904

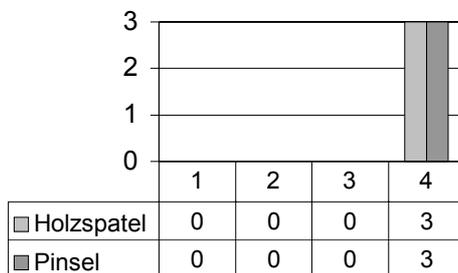
Abb. 30: Häufigkeit (Ordinate) der semiquantitativen Keimzahlklassen (Abszisse) einer 48-Stunden-Kultur und deren Verdünnungsstufen bis 10^{-6} von *L. casei* IMET 10692 nach Verimpfung mit einem Holzspatel und einem Pinsel auf dem CRT[®] *bacteria* und konventionell auf Rogosa-Agar im Ergebnis einer Dreifachbestimmung (Anhang Tab. 13)

L. paracasei ss paracasei E50/242

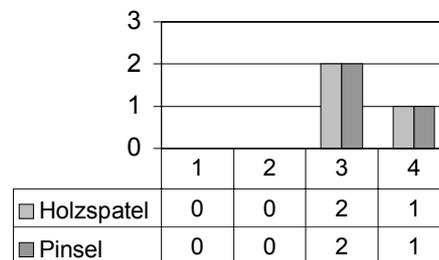
log CFU pro ml der 48-Stunden-Kultur
auf Rogosa-Agar (Mast): 7.6710



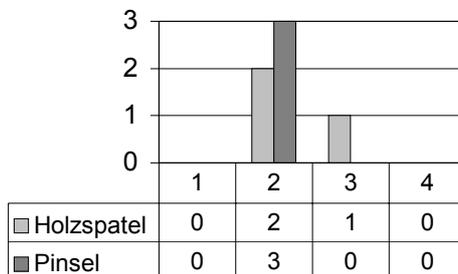
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-1}
auf Rogosa-Agar (Mast): 6.6710



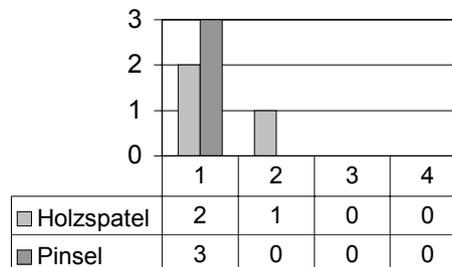
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-2}
auf Rogosa-Agar (Mast): 5.6710



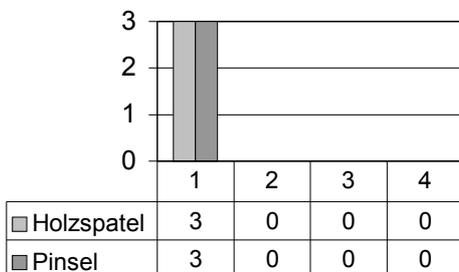
log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-3}
auf Rogosa-Agar (Mast): 4.6710



log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-4}
auf Rogosa-Agar (Mast): 3.6710



log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-5}
auf Rogosa-Agar (Mast): 2.6710



log CFU pro ml der Verdünnungsstufe 10^{-6}
auf Rogosa-Agar (Mast): 1.6710

Abb. 31: Häufigkeit (Ordinate) der semiquantitativen Keimzahlklassen (Abszisse) einer 48-Stunden-Kultur und deren Verdünnungsstufen bis 10^{-6} von *L. paracasei* ss *paracasei* E50/242 nach Verimpfung mit einem Holzspatel und einem Pinsel auf dem CRT[®] *bacteria* und konventionell auf Rogosa-Agar im Ergebnis einer Dreifachbestimmung (Anhang Tab.14)

Durch die zunehmende Verdünnung der Suspensionen sanken die Keimzahlklassen, so dass mit der Verdünnungsstufe 10^{-5} bei einer CFU von $3,9 \times 10^2$ pro ml die Kkl LB 1 erreicht war. Die Keimzahlklassen LB 4 und LB 3 entsprachen dabei im Mittel einer CFU von $\geq 10^{5-7}$ pro ml. Nur bei zwei von 42 Befundpaaren pro Stamm lag eine Diskordanz vor. Während für *L. paracasei* ss *paracasei* E50/242 mit dem Holzspatel noch die Kkl LB 3 (Verdünnungsstufe 10^{-4}) bzw. die Kkl LB 2 (Verdünnungsstufe 10^{-5}) abgelesen werden konnte, lagen bei je weiteren fünf Befunden der gleichen Verdünnungsstufen (10^{-4} , 10^{-5}) bereits die Kkl von LB 2 bzw. LB 1 vor.

Für eine direkte Gegenüberstellung der Pinsel- und der Holzspatelmethode wurde die Kreuzklassifikation zur Darstellung gewählt (Tab. 11). Die zu fast hundert Prozent erreichte Übereinstimmung innerhalb der hohen und niedrigen Keimzahlklassen wurde für alle drei Stämme besonders deutlich. Lediglich bei *L. paracasei* ss *paracasei* E50/242 wurde zweimal mit dem Holzspatelabdruck im Vergleich zur Pinselverimpfung eine um eine Einheit höhere Keimzahlklasse abgelesen. Dies führte jedoch nur einmalig zu einem Wechsel von niedrigen (LB 1 und LB 2) zu hohen Keimzahlklassen (LB 3 und LB 4). Die innerhalb der niedrigen Risiko-Kkl liegenden Differenzen waren bedeutungslos.

Tab. 11: Übereinstimmung der Keimzahlklassen (Kkl) einer 48-Stunden-Kultur von ausgewählten Laktobazillen auf dem CRT[®] *bacteria* bei Verimpfung mit Holzspatel und Pinsel (n = 3 Versuchsserien)

L. plantarum IMET 10691					L. casei IMET 10692					L. paracasei ss paracasei E50/242				
Kkl Pinsel	Kkl Holzspatel				Kkl Pinsel	Kkl Holzspatel				Kkl Pinsel	Kkl Holzspatel			
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4
1	6				6					5	1			
2		3				3					2	1		
3			3				3					2		
4				9				9					10	

Gegenüberstellung beider Kultursysteme – Dentocult[®] LB und CRT[®] bacteria

Der Vergleich beider Kultursysteme bei unterschiedlicher Verimpfung der Laktobazillen mittels Pinsel und Holzspatel ist in Tabelle 12 dargestellt. Sowohl die angewandten Impfmethode als auch beide Kultursysteme erwiesen sich hinsichtlich

der Laktobazillenausbeute als gleichwertig. Von 126 Paarvergleichen stimmten nur 8 nicht überein. Allerdings wechselte dabei nur ein Befund zwischen niedriger und hoher Keimzahlkategorie.

Tab. 12: Übereinstimmung der Keimzahlklassen (Kkl) einer 48-Stunden-Kultur von ausgewählten Laktobazillen mit dem CRT[®] *bacteria* und dem Dento-cult[®] LB bei Verimpfung der Keimsuspensionen mit Pinsel bzw. Holzspatel (n = 3 Versuchsserien)

Verimpfung mit dem Pinsel

L. plantarum IMET 10691					L. casei IMET 10692					L. paracasei ss paracasei E50/242				
Kkl CRT					Kkl CRT					Kkl CRT				
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4
Kkl	1	6	1		Kkl	1	6			Kkl	1	6		
Dento-					Dento-					Dento-				
cult [®] LB	2	2			cult [®] LB	2	3			cult [®] LB	2	3		
	3		3	1		3		3			3		2	1
	4			8		4			9		4			9

Verimpfung mit dem Holzspatel

L. plantarum IMET 10691					L. casei IMET 10692					L. paracasei ss paracasei E50/242				
Kkl CRT					Kkl CRT					Kkl CRT				
	1	2	3	4		1	2	3	4		1	2	3	4
Kkl	1	6	1		Kkl	1	6			Kkl	1	5	1	
Dento-					Dento-					Dento-				
cult [®] LB	2	2			cult [®] LB	2	3			cult [®] LB	2	2	1	
	3		3	1		3		3			3		2	1
	4			8		4			9		4			9

Skalierung der semiquantitativen Keimzahlklassen nach Pinselstrichverimpfung

Mit den wiederum aus Dreifachbestimmungen auf Rogosa-Agar der Firma Mast bestimmten CFU-Werten (log CFU pro ml) konnten die Pinsel-Keimzahlklassen LB 1 bis LB 4 der Laktobazillen auf dem CRT[®] *bacteria* quantitativ unterlegt werden (Abb. 32). Insgesamt konnten 63 Befundpaare gegenübergestellt werden (Anhang Tab. 15). In allen Fällen war eine höhere Keimzahlklasse auch mit einer deutlichen Zunahme der LB-Zahlen verbunden. Die Keimzahlklassen LB 3 und LB 4 entsprachen im Mittel einer Keimzahl von 10^5 - 10^7 CFU pro ml Keimsuspension.

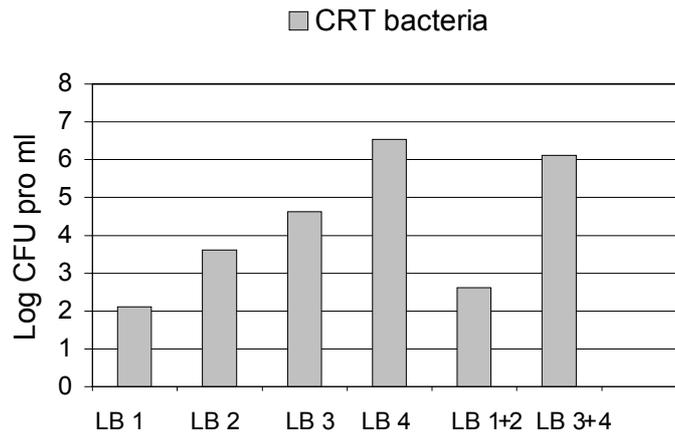


Abb. 32: Skalierung der LB-Keimzahlklassen bei Verimpfung mit einem Pinsel auf dem CRT[®] *bacteria*; mittlere Keimzahlen (log CFU pro ml) aller drei Laktobazillenstämme (Anhang Tab. 15)

Signifikante Unterschiede bestanden sowohl zwischen den niedrigen (LB 1 und LB 2) und hohen Keimzahlklassen (LB 3 und LB 4) (p-Wert 0,0001) wie auch innerhalb der paarweise betrachteten Keimzahlklassen (Kkl LB 1 : LB 2 p-Wert 0,0001; Kkl LB 2 : LB 3 p-Wert 0,0006; Kkl LB 3 : LB 4 p-Wert 0,0001).

5.2 Pilotstudie zur Pinseltechnik

Bei 7 Kindern wurden 26 durchgebrochene Sechsjahrmolaren mit den Kulturbestecken Dentocult[®] SM Strip mutans und LB und mit dem CRT[®] *bacteria* site-spezifisch nach vorgegebenem Schema (Tab. 4, Kap. 6.5) mikrobiologisch kontrolliert und weiterhin der Speichel der Kinder nach herkömmlichen Vorgehen untersucht. Die Auswertung des Elternfragebogens ist im Anhang in den Tabellen 16 und 17 wiedergegeben. Vor Beginn der Untersuchung waren die Kinder in kein Präventionsregime eingebunden, eine regelmäßige Fluoridierung der Zähne durch den Zahnarzt erfolgte nicht. Bis auf eine Familie wurde mit fluoridiertem Speisesalz gekocht. Alle Kinder putzten mindestens zweimal täglich ihre Zähne, bis auf zwei Ausnahmen (Patient Nr. 6 und 7) benutzten sie Kinderzahnpaste. Die Angabe zum Wechsel der Zahnbürste reichte von „alle 3 Wochen“ bis zu „alle 3 Monate“. Eine Kontrolle des Putzerfolges durch die Eltern erfolgte gelegentlich, die Zähne wurden dazu jedoch nie angefärbt. Alle Kinder bekamen in den letzten Jahren Nuckelflaschen mit gesüßten Getränken; mehrheitlich

konnte auch eine hohe Frequenz süßer Zwischenmahlzeiten registriert werden. Eine Beeinträchtigung der mikrobiologischen Untersuchung durch die vorherige Einnahme von Antibiotika wurde ausgeschlossen (Anhang Tab. 16 und 17).

Die Abbildungen 33 und 34 (Anhang Tab. 18 bis 20) veranschaulichen die Gebissituation und den Mundhygienezustand für jedes Kind, sowie die Höhe der Keimzahlklassen von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen in der Fissurenplaque der jeweiligen Molaren und im Speichel. Im Mittel hatten die Kinder noch 16 Milchzähne (t) und bereits 7 Zähne der permanenten Dentition (T). Die bleibenden Zähne waren bis auf vier Molaren bei drei Kindern kariesfrei ($D_{1-4} = 0$). An den vier Molaren wurden bereits initial kariös verfärbte Fissuren (IS) registriert. Die Milchzähne der Kinder hatten einen dmf(t) zwischen 4 und 17, wobei die d(t)-Komponente im Mittel bei 1, die m(t)-Komponente bei 4 und die f(t)-Komponente bei 2 lag. Zwei Milchzähne (Pat. Nr. 1) hatten auch initial kariöse Läsionen (is). Eine gute bis mäßige Mundhygiene wurde mit dem Plaqueindex (QHI) von 0,5 bis 2,9 und dem Papillen-Blutungs-Index (PBI) von 8 bis 38 registriert.

In der Fissurenplaque aller Molaren lagen mit Ausnahme eines Kindes (Pat.-Nr. 4) hohe Keimzahlklassen der Mutans-Streptokokken vor, die mit ebenso hohen Keimzahlklassen im Speichel einhergingen.

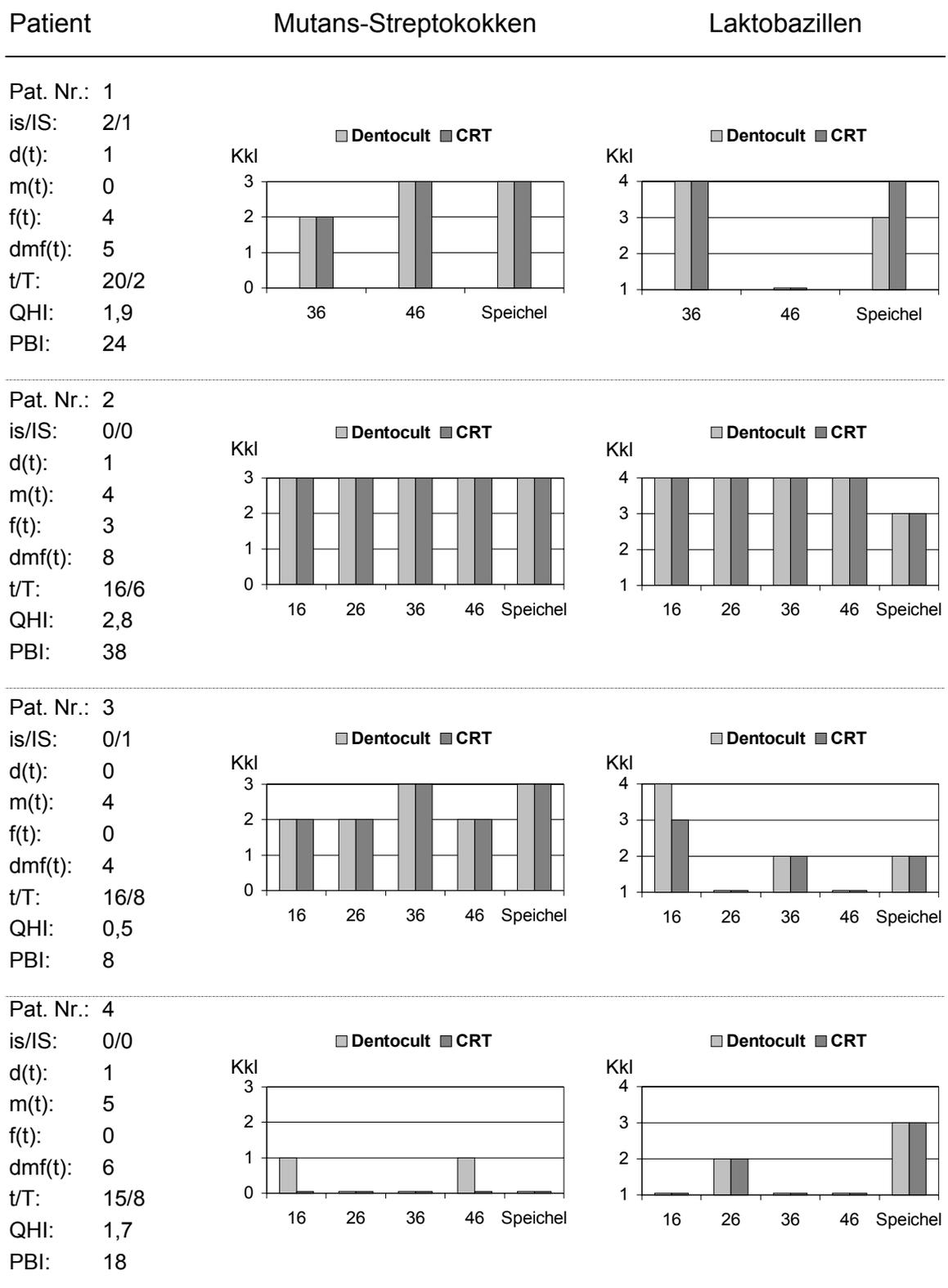


Abb. 33: Patient Nr. 1 bis Nr. 4 (von oben nach unten): Mundhygiene Status (links); Keimzahlklassen (Kkl) von Mutans-Streptokokken (Mitte) und Laktobazillen (rechts) in der Fissurenplaque der Molaren (16 bis 46) und im Speichel

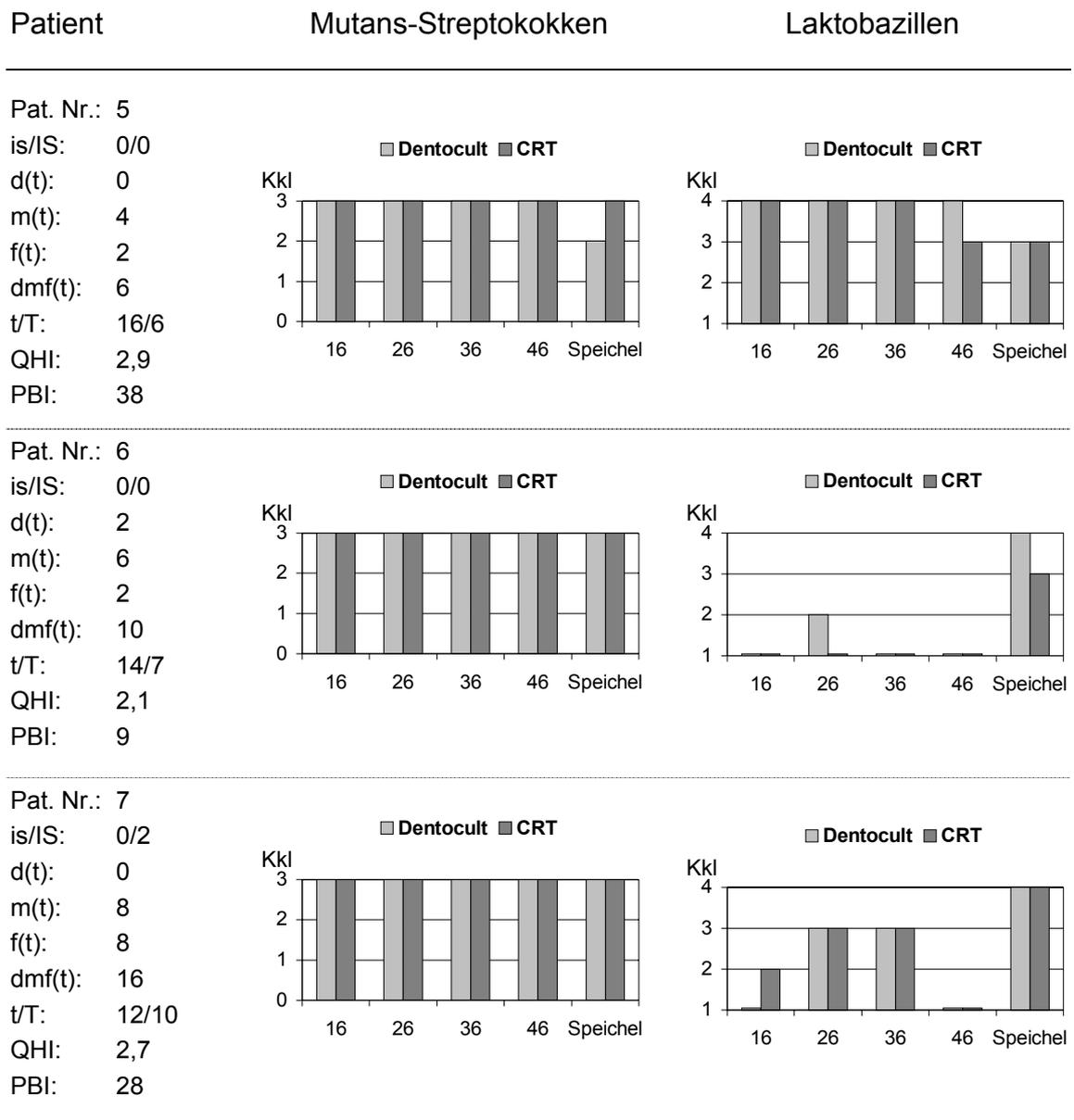


Abb. 34: Patient Nr. 5 bis Nr. 7 (von oben nach unten): Mundhygiene Status (links); Keimzahlklassen (Kkl) von Mutans-Streptokokken (Mitte) und Laktobazillen (rechts) in der Fissurenplaque der Molaren (16 bis 46) und im Speichel

Die beiden Kulturbestecke (Dentocult® SM Strip mutans und CRT® *bacteria*) kamen zu übereinstimmenden Ergebnissen; eine zusammenfassende Übersicht zeigt Tabelle 13.

Tab. 13: Gegenüberstellung der Keimzahlklassen (Kkl) an Mutans-Streptokokken auf dem CRT® *bacteria* und Dentocult® SM nach strichförmiger Verimpfung der Fissurenplaque mit einem Pinsel (n = 26) (links) und nach Speichelverimpfung (n = 7) (rechts)

CRT-SM Pinsel					CRT-SM Speichel						
	Kkl	0	1	2	3		Kkl	0	1	2	3
Dentocult-SM Pinsel	0	2				Dentocult-SM Speichel	0	1			
	1	2					1				
	2			4			2				1
	3				18		3				5

Beim Laktobazillennachweis wurden von vier Okklusalfächen (Pat.-Nr. 3: Zahn 16, Pat.-Nr. 5: Zahn 46, Pat.-Nr. 6: Zahn 26 und Pat.-Nr. 7: Zahn 16) unterschiedliche semiquantitative Befunde auf den Kultursystemen erhoben, die sich aber innerhalb der Kategorien niedriger (LB 1 und LB 2) oder hoher (LB 3 und LB 4) Keimzahlklassen bewegten. Im Speichel eines der letzteren Kinder (Pat.-Nr. 6) und bei einem weiteren Kind (Pat.-Nr. 1) differierten die Kulturbestecke um eine Keimzahlklasse innerhalb der Kategorie hoher Keimzahlklassen von LB 3 und LB 4. Bei 6 Kindern lagen auch hohe Laktobazillen-Keimzahlklassen im Speichel vor. Beide Kulturbestecke führten zu gleich hohen Risikoeinstufungen; die Übersicht zeigt Tabelle 14.

Tab. 14: Gegenüberstellung der Keimzahlklassen (Kkl) an Laktobazillen auf dem CRT® *bacteria* und Dentocult® LB nach strichförmiger Verimpfung der Fissurenplaque mit einem Pinsel (n = 26) (links) und nach Speichelverimpfung (n = 7) (rechts)

CRT-LB Pinsel					CRT-LB Speichel						
	Kkl	1	2	3	4		Kkl	1	2	3	4
Dentocult-LB Pinsel	1	10	1			Dentocult-LB Speichel	1				
	2	1	2				2		1		
	3			2			3			3	1
	4			2	8		4			1	1

In der Abbildung 35 sind zur Veranschaulichung Ergebnisse nach flächenspezifischer Plaqueuntersuchung der Molaren (16, 26, 36, 46) und nach Speicheluntersuchung eines Patienten (Pat. Nr. 3) auf beiden Kulturbestecken dokumentiert. Die Übereinstimmung der Befunde ist deutlich erkennbar.

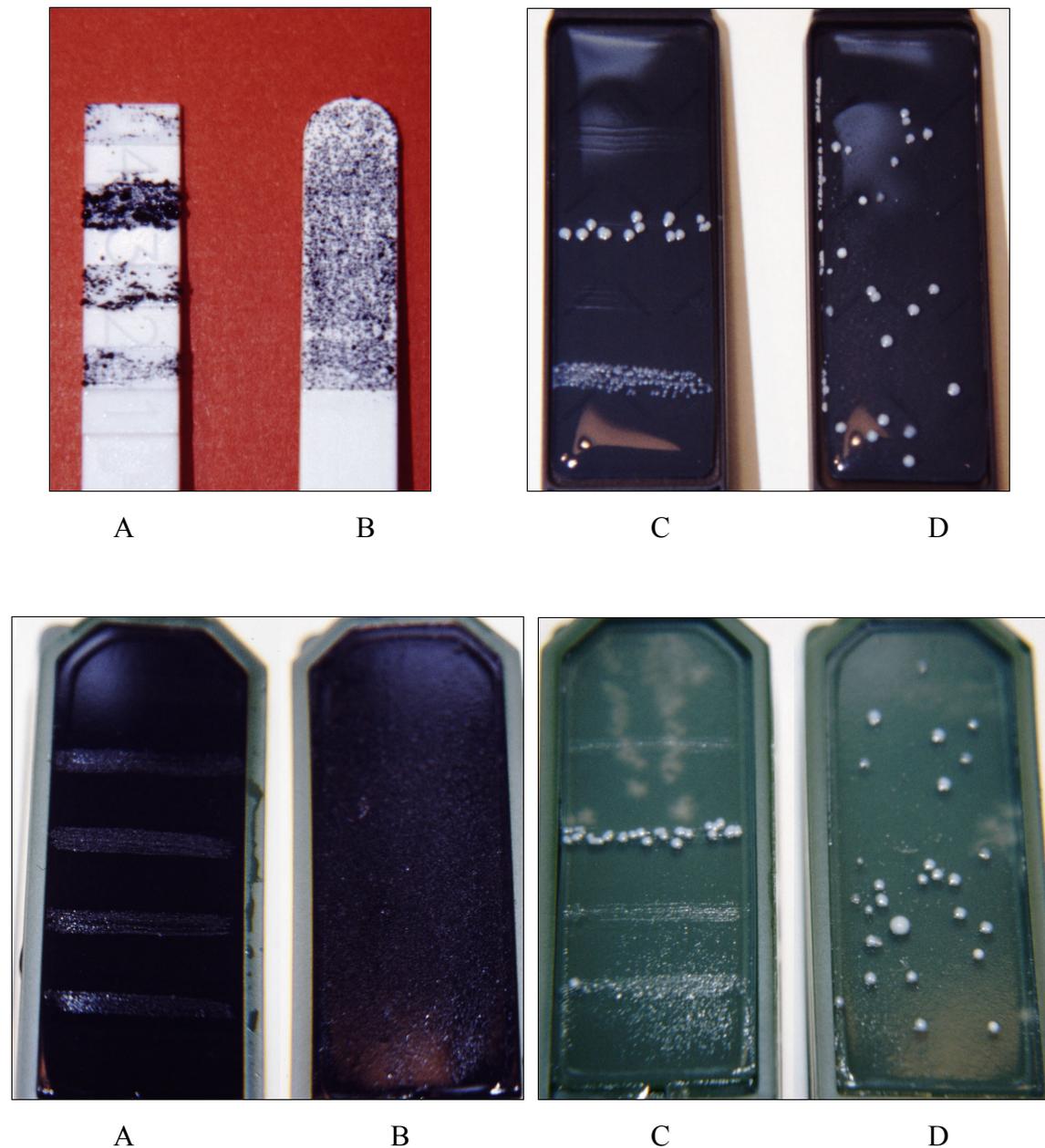
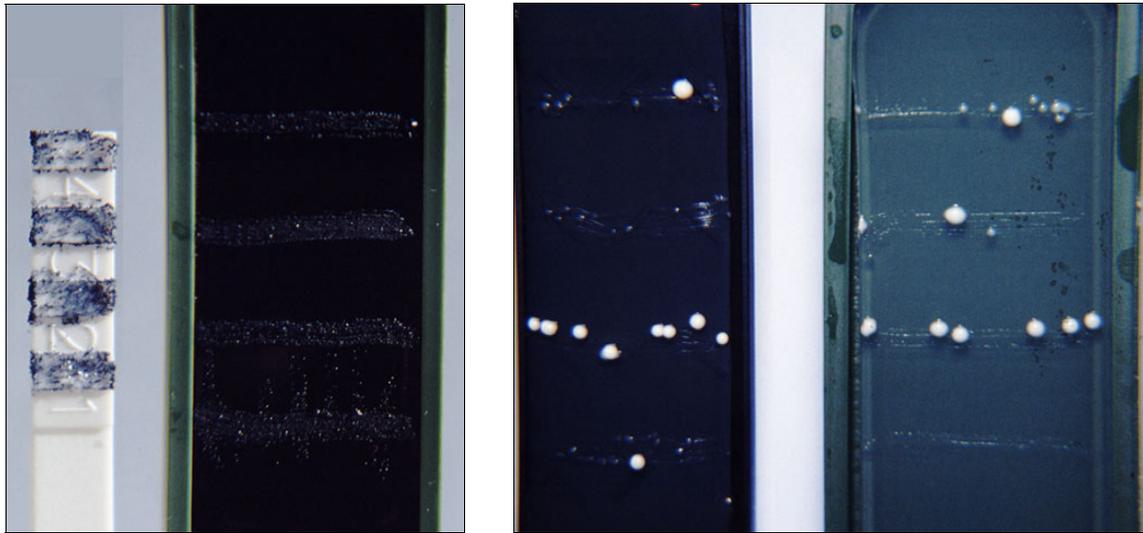


Abb. 35: Mutans-Streptokokken- (links) und Laktobazillenbefunde (rechts) auf Dentocult[®] SM und LB (oben) und CRT[®] bacteria (unten) von Zahn 16, 26, 36 und 46 nach strichförmiger Verimpfung aus Plaque (A + C) im Vergleich zum Speichelbefund auf der gesamten Agaroberfläche (B + D) (Patient Nr. 3)

Abschließend zeigt Abbildung 36 die direkte Gegenüberstellung der Kultursysteme nach Arealbeimpfung mit einem Pinsel. Sowohl die Mutans-Streptokokken-Befunde auf Dentocult[®] SM und CRT[®] *bacteria* SM (links, Pat. Nr. 5) als auch die Befunde für Laktobazillen auf Dentocult[®] LB und CRT[®] *bacteria* LB (rechts, Pat. Nr. 4) stimmten überein.



A

B

C

D

Abb. 36: Keimzahlklassen in der Fissurenplaque vom Zahn 16, 26, 36 und 46 nach strichförmiger Verimpfung auf dem Dentocult[®] SM (A) im Vergleich zum CRT[®] *bacteria* (B) (Patient Nr. 5) (links) und auf Dentocult[®] LB (C) im Vergleich zum CRT[®] *bacteria* (D) (Patient Nr. 4) (rechts)

6 Diskussion

Karies ist zwar so alt wie die Menschheit, aber erst Mitte der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde in Kariesmodellexperimenten mit konventionell und gnotobiotisch gehaltenen Versuchstieren die Bedeutung der Mutans-Streptokokken für die Kariesauslösung und -progression bewiesen (Orland et al. 1954, Orland et al. 1955, Fitzgerald und Keyes 1960). Bis dahin wurden Laktobazillen als die Verursacher der Karies angesehen, die heute als Indikatoren eines hohen Zuckerkonsums (Larmas 1985) gelten, die Progression der Karies fördern bzw. für die Auslösung einer Sekundärkaries von Bedeutung sein können.

Es ist daher nicht verwunderlich, dass die wissenschaftliche Zahnheilkunde seit dieser Zeit am Nachweis beider Keimgruppen interessiert war und eine symptomatisch ausgerichtete Kariesprävention durch kausale Strategien, nämlich die Kontrolle der kariogenen Keime, ergänzen wollte. Die kariesprotektive Wirkung von Fluoriden war immerhin seit vielen Jahrzehnten bekannt. So empfahl der Pariser Hofzahnarzt Malagou-Antoine Désirabode (*1781, †1851) Fluoridsalze direkt in die kariöse Kavität einzubringen, um erweichtes Dentin zu härten (Désirabode 1843). Eager erkannte 1902 den Zusammenhang zwischen der Trinkwasserqualität und dem Auftreten von geflecktem Zahnschmelz (mottled enamel). Black (1914) sah in erhöhtem Fluoridgehalt dieser Zähne einen „Schlüssel zur Lösung des Kariesproblems“. Dean (*1893, †1962) konnte mit epidemiologischen Untersuchungen zwischen 1933 und 1942 die Beziehung zwischen Kariesfrequenz und Trinkwasserfluoridgehalt statistisch gesichert belegen (Dean 1933, Dean 1934, Dean 1936, Dean und Elvolve 1936, Dean 1938, Dean et al. 1941, Dean et al. 1942). Die kontinuierliche Anwendung von Fluoriden zur Erhöhung der Schmelzresistenz in Fluoridanwendungsprogrammen und Zahnpasten könnte eine Ursache für den Kariesrückgang in europäischen und außereuropäischen Industrieländern sein (Glass 1982, Guggenheim 1984, Künzel 1997).

In den letzten 50 Jahren wurde nun verstärkt der Frage nachgegangen, ob der Nachweis der beiden Keimgruppen im Speichel tatsächlich einen Wert für eine zielgerichtete Kariesprävention hat oder nicht. So forderte Krasse (1954) eine Untersuchung von Plaqueproben, weil er keine Korrelation zwischen den Keimzahlen von oralen Streptokokken in stimulierten Speichelproben und in dazugehörigen Plaqueproben fand. Krasse (1954) schrieb: „In studies of oral streptococci in relation to dental caries it is

essential that plaque material be used.” (In Studien oraler Streptokokken im Zusammenhang mit Karies ist es wichtig, Plaqueproben als Untersuchungsmaterial zu nutzen). Es konnte aber später nachgewiesen werden, dass das Vorkommen der Mutans-Streptokokken im Speichel tatsächlich ihr Vorkommen in der Plaque reflektiert und dass mit einfachen Speicheluntersuchungen die kariogene Situation in der Plaque erfassbar ist (Togelius et al. 1984, Lindquist et al. 1989, Lindquist und Emilson 1990, Mundorff et al. 1990, Sullivan et al. 1996, Kneist et al. 1998c). Powell (1998) konnte in ihrer Meta-Analyse von 42 Kariesrisikostudien Mutans-Streptokokken als die besten Prädiktoren für den Erhalt der Zahngesundheit im Milchgebiss aufzeigen. Dennoch ist für den Kliniker heute noch die Karieserfahrung der beste Prädiktor für eine zukünftige Kariesgefährdung; allerdings ist dann die Chance einer primären Zahngesundheit schon verspielt.

Vor etwa 20 Jahren berichtete erstmals Glass (1982) von einer „Polarisierung“ des Kariesbefalls. Bei einem nachweisbaren Kariesrückgang in den Industriestaaten der Welt vereinen 20 % der Bevölkerung etwa 80 % der Karies auf sich. Die Polarisierung des Kariesbefalls basiert dabei auch auf der Polarisierung einzelner Zahnflächen (Anderson 2002). Die Okklusalflächen der Molaren mit ihren Grübchen und Fissuren sind die Zahnflächen mit dem höchsten Kariesrisiko (Heinrich-Weltzien et al. 1998b, Heinrich-Weltzien und Kneist 2000, Oehme et al. 2001, Anderson 2002). Bereits Loesche (1986) und Lindquist und Emilson (1990) führten die besondere Gefährdung der Okklusalflächen auf die Kolonisationsfolge der Mutans-Streptokokken zurück. Posterior stehende Zähne und ihre Zahnflächen wiesen eine stärkere Besiedlung auf als der anteriore Bereich. Eine bilaterale Symmetrie, wie sie bereits von Keene et al. (1981) und Kristoffersson et al. (1984) für die Approximalflächen beschrieben wurde, konnte ebenfalls bestätigt werden. Vergleiche von Ober- und Unterkiefer zeigten, dass die Prämolaren und die Frontzähne im Oberkiefer stärker besiedelt waren, während im Unterkiefer die Molaren eine signifikant höhere Besiedlung mit Mutans-Streptokokken zeigten.

Die frühkindliche Karies ist bei dem beobachteten Kariesrückgang aber weltweit im Ansteigen und die Milchzähne bleiben mehrheitlich unbehandelt (Borutta et al. 2002). Epidemiologische Angaben für Deutschland schwanken zwischen 5 und 32 % und lassen die frühkindliche Karies zu einer ernstzunehmenden epidemiologischen Größe

ansteigen. Grund dafür ist die Störung der biologischen Kolonisierungsfolge der Mutans-Streptokokken durch Zuckerabusus via Babyflasche; die oberen Schneidezähne der Kinder sind zuerst betroffen. Die vorliegende Studie sollte sich daher erneut dem Nachweis von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen im Speichel bzw. in der Plaque von Kindern widmen. Ein flächenspezifischer Nachweis der Keime sollte *in vitro* erprobt und in einer Pilotstudie umgesetzt werden. Die herkömmlichen Kultursysteme Dentocult[®] und CRT[®] *bacteria* wurden am konventionellen mikrobiologischen Vorgehen gemessen.

6.1 Mutans-Streptokokken – In-vitro-Studie

Die Grundlage für das heute gebräuchlichste Selektivmedium zur Anzucht von Mutans-Streptokokken geht auf Chapman et al. (1944) zurück. Die Autoren führten den Mitis-salivarius-Agar zur Trennung α -hämolyzierender Streptokokken von fäkalen Streptokokken in die klinische Mikrobiologie ein. Gold et al. (1973) modifizierten den Agar zur Anzucht von Mutans-Streptokokken durch Zusatz von 20 % Saccharose und 0,2 Einheiten Bacitracin pro ml (MSB-Agar). Der Saccharoseanteil fördert das Wachstum von *S. mutans* und *S. sobrinus* (Abb. 37), während durch das Bacitracin ein großer Anteil der übrigen Begleitflora unterdrückt wird. Dieses Kulturmedium ist bis heute der „Goldstandard“ zum mikrobiologischen Nachweis von Mutans-Streptokokken und findet auf allen Kultursystemen zum semiquantitativen Keimnachweis von Mutans-Streptokokken Verwendung.

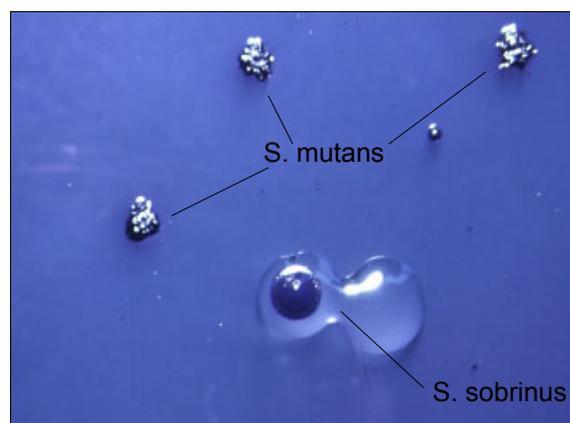


Abb. 37: Mutans-Streptokokken (*S. sobrinus* in einem Exsudattropfen extrazellulärer Polysaccharide und *S. mutans* mit maulbeerförmiger Kolonie) auf Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin (25-fache Vergrößerung)

Köhler und Bratthall (1979) führten als erstes semiquantitatives „Schnellverfahren“ die Holzspatelmethode ein. Ein Holzspatel wurde auf der Zunge mehrfach gedreht und anschließend auf MSB-Agar gestempelt. Nach Bebrütung wurden die Mutans-Streptokokken nach der Dichte der Kolonien auf dem Holzspatelabdruck als Keimzahlklassen abgelesen. Parallel dazu untersuchten Köhler und Bratthall 1 ml stimulierten Speichel der gleichen Probanden auf MSB-Agar und quantifizierten die Keimzahlklassen von SM 0 bis SM 3. Damit war der erste, schnelle und semiquantitative Nachweis von Mutans-Streptokokken aus Speichelproben etabliert. Das Verfahren erforderte aber Rodac-Platten, die im Vergleich zu Petrischalen bis zum oberen Rand mit Agar beschickt sind, so dass auf der gewölbten Agaroberfläche ein Holzspatelabdruck möglich ist. In der Praxis stehen solche Rodac-Platten dem Zahnarzt gewöhnlich nicht zur Verfügung.

Alaluusa et al. stellten 1984 den ersten „Dip-slide-Test“ für die zahnärztliche Praxis auf der Basis von Mitis-salivarius-Agar vor. Der Agar war zunächst ohne Bacitracinzusatz gegenüber MSB-Agar (Haltbarkeit maximal eine Woche) länger haltbar und wurde deshalb bevorzugt. Erst unmittelbar nach dem Beimpfen mit Speichel wurden zwei Bacitracinblättchen (5 µg) auf die Agarfläche gelegt. Allein Mutans-Streptokokken konnten in der Hemmzone des Peptidantibiotikums wachsen und wurden wiederum semiquantitativ in Keimzahlklassen abgelesen (Abb. 38).

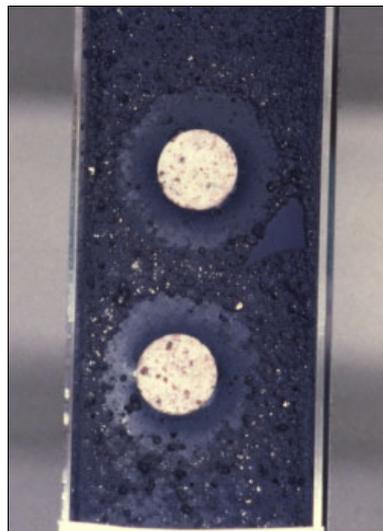


Abb. 38: „Dip-slide-Test“ nach Alaluusa et al. (1984) (L. Laurisch, Korschebroich)

Auf Jensen und Bratthall (1989) geht der heute weit verbreitete Dentocult[®] SM Strip mutans (Abb. 39) (Orion Diagnostica, Espoo, Finnland) zurück. Der Test nutzt die Eigenschaften der Mutans-Streptokokken, nämlich ihre Adhärenz, hohe Saccharosetoleranz und Bacitracinresistenz. In einer Mitis-salivarius-Bouillon (30 % Saccharose) adhären die Mutans-Streptokokken an einem Plastikspatel; die unerwünschte Begleitflora kann nicht adhären bzw. wird durch das Bacitracin, das auf einem Filterpapierblättchen (0,36 Einheiten Bacitracin pro ml) zugesetzt wird, unterdrückt. Der Plastikspatel wird mehrmals auf der Zunge gedreht, bei geschlossenen Lippen entnommen und in der Bouillon bebrütet. Das Verfahren stellt eine Weiterentwicklung der von Köhler und Bratthall (1979) vorgestellten Holzspatelmethode und der von Matsukubo et al. (1981, 1983) empfohlenen Adhärenztechnik dar.

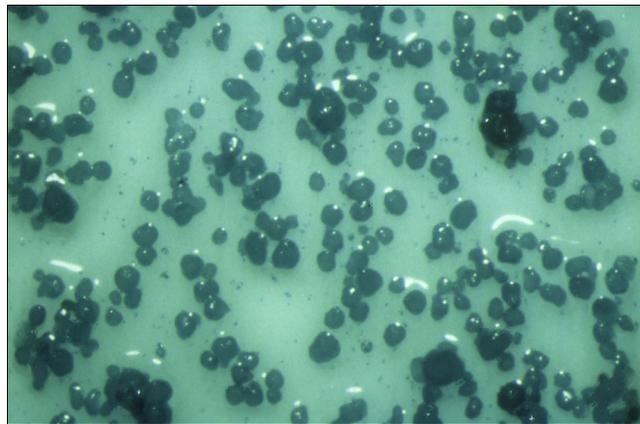


Abb. 39: Makrokolonien von Mutans-Streptokokken auf dem Plastikspatel von Dentocult[®] SM Strip mutans (25-fache Vergrößerung)

Im Jahre 1995 führte die Firma Hain Diagnostika mit dem CarioCheck[®] den ersten Doppeltest zur Bestimmung von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen ein. Zum Mutans-Streptokokken-Nachweis ist eine Seite des Kulturträgers mit MSB-Agar beschickt. Mit der Einführung des Kariesrisikotests (Caries risk Test; CRT[®] *bacteria*) der Firma Ivoclar Vivadent GmbH (Schaan, Lichtenstein) 1998 kam ein weiterer Doppeltest zum semiquantitativen Nachweis der Mutans-Streptokokken und Laktobazillen auf den Markt. Der MSB-Agar wurde bei diesem Kultursystem von Laurisch (1997) in seinem Saccharosegehalt auf 41 Prozent (MS41B-Agar) angehoben.

Die Nachweisgrenze für Mutans-Streptokokken wurde damit noch empfindlicher gestaltet (Kneist et al. 1999a).

Wallmann und Krasse (1993) führten erste zahnflächenspezifische Chair-side-Verfahren in die Zahnmedizin ein. Die Autoren nutzten einen spitzen Zahnstocher zur Plaqueentnahme und verimpften die Plaque auf dem Chair-side-Test Dentocult[®] SM Strip mutans. Die Methode wurde besonders zur Untersuchung von Kronenrändern empfohlen (Wallman und Krasse 1993). Eine Qualitätskontrolle, also der Vergleich der Ergebnisse mit Ergebnissen einer Standardmethode, lag damals noch nicht vor.

Das zunehmende Interesse an seitenspezifischen Plaqueuntersuchungen wurde anlässlich des internationalen Kongresses der „International Health Care Foundation“ 1997 in Leipzig dokumentiert; die wissenschaftlichen Beiträge fanden ihren Niederschlag in dem Buch mit dem Titel „Plaque – Prophylaxe und Therapie“ (Schneider 1998). Billings und Moss (1998) berichten darin über das Sammeln von Plaqueproben aus okklusalen Fissuren zweiter Molaren von 12-jährigen Kindern. Die Autoren verimpften die Plaqueproben auf dem gerade erst auf den Markt gebrachten „seitenspezifischen“ Dentocult[®] SM Strip mutans, der auf erhobenen Arealen des Plastikspatels das separate Verimpfen von vier Plaqueproben erlaubte (Bratthall et al. 1996). Billings und Moss (1998) untersuchten parallel dazu Speichelproben der Kinder auf MSB-Agar und konnten wie zuvor Togelius et al. (1984), Lindquist et al. (1989), Lindquist und Emilson (1990), Mundorff et al. (1990), Sullivan et al. (1996) und Kneist et al. (1998c) einen positiven Zusammenhang von Speichelkeimzahlen an Mutans-Streptokokken und ihrem zahnflächenbezogenen Vorkommen nachweisen.

Auch Twetman (1998) berichtete über die zahnflächenbezogene Plaquekontrolle. Als Hilfsmittel schlug er den bekannten Interdentalkeil, einen Zahnstocher, Zahnseide oder eine Einmalbürste zur Plaqueentnahme vor. Splieth (1998) empfahl einen Einmalpinsel zur Entnahme und Verimpfung von Plaqueproben auf dem unterteilten Plastikspatel des Dentocult[®]-SM-Kulturbesteckes.

In der vorliegenden Studie sollten die Kultursysteme Dentocult[®] SM und CRT[®] *bacteria* SM zum zahnflächenbezogenen Nachweis von Mutans-Streptokokken in Kombination mit unterschiedlichen Plaqueentnahmeverfahren vergleichend beurteilt werden. Die Keimzahl einer flächenspezifischen Arealbeimpfung wurde bislang nur

wenig hinterfragt (Bratthall et al. 1996) und Erfahrungen mit dem CRT[®] *bacteria* lagen nicht vor. 2002 schlug Laurisch den CRT[®] *bacteria* zum Monitoring wurzelkariesgefährdeter Zahnhalsflächen vor (Laurisch 2002). Die Auswertung flächenspezifischer Befunde erfolgte analog der Bewertung des Gesamtspeichelbefundes in Keimzahlklassen nach der Dichte der Kolonien. Es wurde nicht geklärt, ob eine kleinere Fläche das Ablesen und die damit vorgenommene Risikoeinstufung beeinflusst.

Mit der vorliegenden Pilotstudie sollte weiterhin der Frage nachgegangen werden, ob eine unerwünschte Begleitflora die Zuordnung des Befundes zu einer Keimzahlklasse stört.

So beschrieben El-Nadeef (1991) und Kneist (1998) häufig auftretende Begleitphänomene in der mikrobiologischen Speicheldiagnostik. Durch den Einfluss einer unerwünschten Begleitflora, beispielsweise Staphylokokken, kann es zwar zur Trübung der Dentocult[®]-SM-Bouillon kommen, aber am Plastikspatel selbst haften nur Mutans-Streptokokken. Analog zur Trübung können Nicht-Mutans-Streptokokken auf dem MS41B-Agar des CRT[®] *bacteria* Kolonien bilden, die von Mutans-Streptokokken oder Laktobazillen makroskopisch abgegrenzt werden müssen. Bei den hohen Keimzahlklassen von Mutans-Streptokokken oder Laktobazillen kommt dies nach Kneist und Heinrich-Weltzien (2001) aber nur in weit unter 5 % der Fälle vor.

Die vorliegende Untersuchung schloss zunächst Referenzstämme ein. Standardisiert angezüchtete Stämme der Mutans-Streptokokken, *S. mutans* NCTC 10449 und *S. sobrinus* OMZ 176 bzw. *S. sobrinus* OMZ 65 wurden zum Vergleich der Impfverfahren herangezogen. In Anlehnung an Köhler und Bratthall (1979), Twetman (1998) und Splieth (1998) wurde ein Einmalpinsel zum flächenspezifischen Verimpfen der Bakteriensuspensionen auf dem unterteilten Plastikspatel des Dentocult[®]-SM-Kulturbestecks angewandt, der runde Plastikspatel des Dentocult[®]-SM-Kulturbestecks sowie ein Holzspatel und ein Einmalpinsel auf dem CRT[®]-*bacteria*-SM-Test. Parallel dazu wurden die Suspensionen der 24-Stunden-Kulturen auf den adäquaten Kulturmedien ausgespatelt.

Die quantitative Bestimmung der Keimzahlen auf den adäquaten Kulturmedien der Kulturbestecke zeigte tendenziell eine für Mutans-Streptokokken um etwa eine

Zehnerpotenz höhere Keimausbeute auf dem MS41B-Agar im Vergleich zum herkömmlichen MSB-Agar (Kap. 5.1.1, Abb. 13-15; Anhang Tab. 5).

Auch Kneist et al. (1998b) konnten zuvor in einer vergleichenden Untersuchung beider Agare mit Referenzstämmen und 31 Speichelproben auf MS41B-Agar eine höhere Selektivität und Keimausbeute für Mutans-Streptokokken im Vergleich zu MSB-Agar nachweisen. In einer nachfolgenden Untersuchung von 150 Speichelproben 7- bis 8-jähriger Kinder im Rahmen der Erfurter Kariesrisikostudie bestätigten Kneist et al. (1998) die Überlegenheit des CRT[®] *bacteria* SM (MS41B-Agar) gegenüber dem Dentocult[®]-SM-Kulturbesteck (MSB-Bouillon) in 11 % der Fälle.

Die hohe Übereinstimmung der angezüchteten Keimzahlen der drei Stämme auf Arealen bzw. der gesamten Oberfläche der beiden Kultursysteme unter Verwendung eines Pinsels, Holz- oder Plastikspatels sprach für die Gleichwertigkeit der Kultursysteme und Impfmethode.

Die Kultursysteme erwiesen sich zur Anzucht von Mutans-Streptokokken bei Betrachtung der 54 Fälle, die ausschließlich auf der Pinselverimpfung basierten, ebenso als gleichwertig (Kap. 5.1.1, Tab. 7). Nur vier der mit dem Pinsel auf dem CRT[®] *bacteria* SM erreichten Keimzahlklassen führten zur Einschätzung „hohes Kariesrisiko“, während sie auf dem Dentocult[®] SM mit „niedrigem Kariesrisiko“ eingeschätzt wurden. Diese bei 54 Befundpaaren geringfügigen Abweichungen dürften auf die tendenziell erhöhte Keimausbeute auf dem MS41B-Agar zurückzuführen sein.

Auf Dentocult[®] SM Strip mutans lagen nur in vier von 54 Befundpaaren bei Verwendung von *S. mutans* NCTC 10449 und *S. sobrinus* OMZ 176 die Pinselkeimzahlklassen (niedriges Risiko) unter den Plastikspatelkeimzahlklassen (hohes Risiko) (Kap. 5.1.1, Tab. 5). Mit dem Pinsel wurden unter Verwendung von *S. sobrinus* OMZ 65 allerdings auch dreimal höhere Keimzahlklassen als mit dem Plastikspatel erreicht, so dass keiner dieser beiden Methoden der Vorzug eingeräumt werden kann.

Die Keimzahlklassen auf dem CRT[®] *bacteria* - verimpft mit Holzspatel bzw. Pinsel - waren nahezu gleich. Nur einmal wurde mit dem Holzspatel eine höhere Keimzahlklasse als mit dem Pinsel erzeugt, dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Risikoeinstufung (Kap. 5.1.1, Tab. 6).

Eine größere Impffläche bei Verwendung des Spatels (Holz/ Plastik) besaß gegenüber der kleineren Fläche unter Verwendung des Pinsels keinen Vorteil; signifikante Unterschiede in den Keimzahlklassen lagen nicht vor.

Kneist et al. (1996) konnten in vorangegangenen Untersuchungen zeigen, dass kommerzielle Speicheltests zum Nachweis von Mutans-Streptokokken den klassischen Labormethoden gleichwertig sind. Die Verwendung der Chair-side-Tests zum flächenspezifischen Nachweis der Mutans-Streptokokken konnte mit den In-vitro-Untersuchungen bestätigt werden.

Jensen und Bratthall (1989) hatten mit Einführung des Dentocult[®] SM Strip mutans die Keimzahlklassen quantitativ durch Mitführung des MSB-Agars mit Speichelproben von 302 7- bis 12-jährigen Kindern untersucht und weiterhin mit der Holzspatelmethode verglichen. Basis des Vergleichs war die Bildung von vier quantitativen Keimzahlgruppen ($< 10^4$, 10^{4-5} , 10^{5-6} und $> 10^6$), denen Keimzahlklassen von SM 0 bis SM 3 zugeordnet wurden. Die Autoren wiesen eine über 80-prozentige Übereinstimmung der Methoden nach. Sie entnahmen die Speichelproben weiterhin auch zweifach; Keimzahlunterschiede traten nicht auf.

1996 empfahlen Bratthall et al. die zahnflächenspezifische Plaquekontrolle. Sie untersuchten Personal und Patienten der „Dental School“ (Universität Lund, Schweden) im mittleren Alter von 35 ± 12 Jahren. Mit dem „Te-Pe“-Zahnholzkeil (Te-Pe Röd, EkMalmö and Petersson, Malmö, Schweden) entnahmen sie von den Approximalräumen der Zähne 27 mesial, 26 mesial, 44 mesial und 43 distal Plaqueproben. Die Zahnflächen wurden zuvor durch leichtes Luftblasen getrocknet. Durch den dreieckigen Querschnitt passen diese Zahnholzkeile gut in Approximalräume (Abb. 40, links) (Kristoffersson und Bratthall 1982, Bratthall et al. 1996). Die Holzkeile wurden dann auf dem Plastikspatel (seitenspezifische Plastikspatel des Dentocult[®]-SM-Kulturbesteckes) in kreisförmigen Bewegungen unter leichtem Druck verimpft. Dabei wurde die Plaque der mesialen und distalen Zahnfläche auf den separaten Bereichen des Plastikspatels aufgebracht (Abb. 40, rechts).

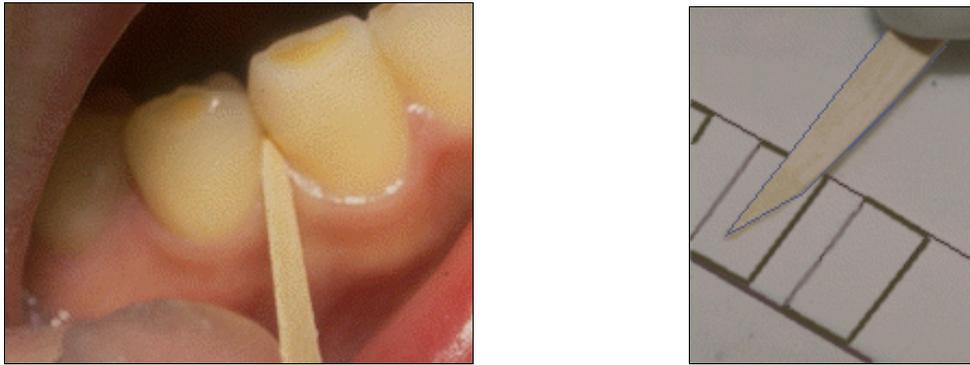


Abb. 40: Plaqueentnahme mit Interdentalkeil (links) und schematisches Verimpfen der Plaqueprobe (rechts) (Bratthall et al. 1996)

Alternierend zum Plastikspatel wurden Rodac-Platten mit dem Holzkeil beimpft. Auf die quantitative Bestimmung der Keimzahl (CFU pro ml) durch mikrobiologische Standardmethoden (Verdünnung der Plaqueproben) wurde verzichtet. So konnte nur eine signifikante Korrelation zwischen hohen Keimzahlen an Mutans-Streptokokken auf der beimpften Fläche des Plastikspatels und der dazugehörigen Abdruckfläche auf der Rodac-Platte nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Studie konnte eine Zuordnung der CFU zu den durch verschiedene Impfmethode erreichten Keimzahlklassen auf MSB- und MS41B-Agar vorgenommen werden. Eine signifikante Zunahme der Mutans-Streptokokken-Zahlen mit jeder Keimzahlklasse wurde deutlich. Nur die Keimzahlklassen SM 0 und SM 1 auf dem Dentocult[®]-SM-Kulturbesteck ließen keine signifikante Trennung zu. Sowohl auf dem CRT[®] *bacteria* SM, als auch auf Dentocult[®] SM, konnten die Kkl SM 0 und SM 1 (niedriges Kariesrisiko) mit einer CFU pro ml von 10^2 - 10^3 unterlegt werden. Die Kkl SM 3 und SM 4 entsprachen im Mittel einer CFU pro ml von 10^5 - 10^6 . Die tendenziell höhere Keimausbeute auf dem CRT[®] *bacteria* SM hatte in Übereinstimmung mit Kneist et al. (1998c) auf die Zuordnung der CFU pro ml zu den entsprechenden Kkl im Vergleich zum Dentocult[®] SM keinen signifikanten Einfluss. Kneist et al. (1998c) unterlegten die Kkl SM 2 und SM 3 mit einer CFU von $>10^5$ Mutans-Streptokokken pro ml Speichel. In der vorliegenden Studie wurden die Ergebnisse mit Referenzstämmen bestätigt (Kap. 4.1, Tab.1).

6.2 Laktobazillen – In-vitro-Studie

Bis Mitte des letzten Jahrhunderts wurden Laktobazillen auf Tomatensaft-Agar angezüchtet. Das erste synthetische Selektivmedium geht auf Rogosa et al. (1951) zurück. Ein besonders niedriger pH-Wert von 5,5 fördert das Wachstum der Laktobazillen und unterdrückt die meisten anderen oralen Keime. Wachstumshemmend wirkt auch die hohe Azetatkonzentration des Mediums. Laktobazillen wachsen auf Rogosa-Agar als weiße, runde und glänzende Kolonien (Abb. 41).



Abb. 41: Kolonien von Laktobazillen auf Rogosa-Agar (30-fache Vergrößerung)

Rogosa-Agar wird heute auf allen mikrobiologischen Chair-side-Tests zur Anzucht von Laktobazillen verwendet. Auf Larmas (1975) geht das älteste Verfahren zum Laktobazillennachweis in der zahnärztlichen Praxis zurück. Diese einfache Methode wird bis heute im Dentocult[®]-LB-Besteck genutzt. Grundlage ist ein mit Rogosa-Agar (Rogosa et al. 1951) beschichteter Träger, der mit paraffinstimuliertem Speichel beimpft und 48 Stunden bei 35 ± 2 °C bebrütet wird.

Den Grundstein für einen schnellen, semiquantitativen Screening-Test legten Westergren und Krasse (1978). Die Autoren verimpften verdünnte Speichelproben auf Rogosa-Agar und lasen die Keimzahlen - wie später auch bei den Mutans-Streptokokken - in semiquantitativen Keimzahlklassen ab (Abb. 42).

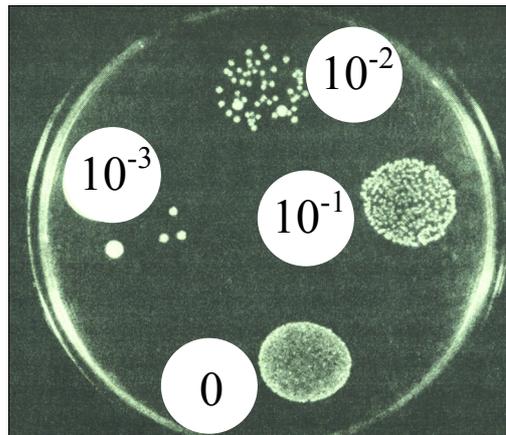


Abb. 42: Erster semiquantitativer Nachweis von Laktobazillen im Speichel (Westergren und Krasse 1978)

Auch der CRT[®] *bacteria* LB ist mit Rogosa-Agar beschickt. In der vorliegenden Untersuchung wurde für das konventionelle Vorgehen, also das Ausspateln der Bakteriensuspensionen, Rogosa-Agar der Firmen Mast (CRT[®] *bacteria* LB) und Difco (Dentocult[®] LB) eingesetzt, um Fehler in der Keimzahlbestimmung aufgrund herstellerepezifischer Unterschiede in den Kulturmedien zu vermeiden.

Für die In-vitro-Untersuchungen wurden die Stämme *L. plantarum* IMET 10691, *L. casei* IMET 10692 und *L. paracasei* ss *paracasei* E50/242 verwendet.

In der Erfurter Kariesrisikostudie konnten Kneist et al. (1998d) unter anderem *L. paracasei* ss *paracasei* mit 68 % als dominierende Spezies unter 18 weiteren Laktobazillenarten ausmachen. Auch Botha et al. (1998) konnten *L. paracasei* als dominierende Art aus kariösem Dentin isolieren. Nach Beighton und Brailsford (1998) gehören neben weiteren auch *L. casei* und *L. plantarum* zu den in der Mundhöhle häufig vorkommenden Arten. Smith et al. (2001) isolierten aus Speichelproben von 93 Patienten 104 Bakterienstämme, von denen 65 % zu den Laktobazillen zählten; bei 17 % der Stämme handelte es sich um *L. casei* und bei 9 % der Stämme um *L. plantarum*. Insofern wurden repräsentative Laktobazillenarten in die Untersuchung einbezogen.

Die Kulturmedien der Firma Difco und der Firma Mast führten nach 48-stündiger Bebrütung zu einer gleich hohen Keimausbeute. Dies steht in Übereinstimmung mit Kneist und Heinrich-Weltzien (1998), die in vergleichenden Studien mit dem Dentocult[®] LB und dem CRT[®] *bacteria* LB gleich hohe bzw. niedrige Keimzahlklassen registrierten.

Im Gegensatz zur Untersuchung von Laktobazillen im Speichel ist ihr Nachweis in der Plaque von bestimmten Zahnflächen eher ungewöhnlich, da sie meist versteckt in tiefen Fissuren und Grübchen, kariösen Läsionen oder auf der Zunge zu finden sind. Loesche und Straffon untersuchten bereits 1979 die Plaque aus okklusalen Fissuren von Molaren auch hinsichtlich des Vorkommens von Laktobazillen. Große Mengen Laktobazillen stellten sich im Verlauf der longitudinalen Studie als Vorboten einer Fissurenkaries dar (Loesche und Straffon 1979). Die Entnahme solcher Proben ist jedoch immer wieder mit Schwierigkeiten verbunden, da adäquate Hilfsmittel zur Plaqueuntersuchung in der Tiefe der Fissur fehlen oder ihre Anwendung nicht erprobt wurde. Daher wurde ein Pinsel, ein Holzspatel und ein Plastikspatel als Hilfsmittel in die In-vitro-Untersuchung der Laktobazillen miteinbezogen.

Nach Verimpfung der Laktobazillen-Suspensionen mit einem Pinsel erwiesen sich in der vorliegenden Studie beide Kulturbestecke ebenso als gleichwertig. Dies traf auch für das Beimpfen beider Systeme mit dem Holzspatel zu (Kap. 5.1.2, Tab. 12).

Die Impfmethode selbst führten gleichfalls zu übereinstimmenden Ergebnissen (Kap. 5.1.2, Tab. 9 und 10). Nur in zwei von 63 Fällen wurde auf dem Dentocult[®]-LB-Kulturträger mit dem Holzspatel eine höhere Keimzahlklasse erzeugt als mit dem Plastikspatel, die nur in einem Fall zu einer veränderten Risikoeinstufung führte (Kap. 5.1.2, Tab. 8). Mit dem Holzspatel wurde trotz seiner größeren Fläche im Vergleich zum Pinsel auf dem CRT[®] *bacteria* LB nur zweimal aus 63 Proben eine höhere Keimzahlklasse abgelesen (Kap. 5.1.2, Tab. 11). Analog zu den Mutans-Streptokokken konnte weder dem Holzspatel noch dem Plastikspatel ein Vorteil gegenüber der Verimpfung mit einem Pinsel eingeräumt werden. Dies bestätigte sich für beide Kultursysteme (Kap. 5.1.2, Tab. 9-11).

Die Größe des Impfareals hat demnach keinen Einfluss auf die zugeordnete Keimzahlklasse. Auch kleinere Areale lassen eine sichere Zuordnung in die entsprechende Risikogruppe zu. Im direkten Vergleich konnte keiner Impfmethode der Vorzug gegeben werden.

Die Zuordnung der mit den Standardverfahren ermittelten CFU pro ml Bakteriensuspension zu den semiquantitativ erzeugten Keimzahlklassen zeigte, dass die Keimzahlklassen LB 3 und LB 4 im Mittel einer CFU von $\geq 10^{5-7}$ pro ml entsprachen. Die Keimzahlklassen LB 1 und LB 2 konnten einer CFU von $10^3 - 10^4$ pro ml zugeordnet werden.

Larmas (1975) schlug eine Vergleichstafel zum Ablesen der Laktobazillenbefunde auf dem Dentocult[®]-Kulturbesteck vor, um eine kontinuierliche und reproduzierbare Befundung zu garantieren. In Übereinstimmung mit Larmas (1975) entsprachen die Keimzahlen der hohen Keimzahlklassen in der vorliegenden In-vitro-Studie einer CFU von $\geq 10^5$ pro ml Bakteriensuspension.

Eine signifikante Trennung der mit der Pinselmethode erreichten LB-Keimzahlen und der dazugehörigen Keimzahlklassen war im Vergleich zum Dentocult[®]-Kulturbesteck auch auf dem CRT[®] *bacteria* möglich. Die hier vorgenommene Skalierung der LB-Keimzahlklassen bei Verimpfung mit einem Pinsel zeigte, dass die Kkl LB 3 und LB 4 (hohes Kariesrisiko) selbst auf den kleineren Arealen des Pinselstriches einer CFU von $\geq 10^5$ entsprachen und gut ablesbar waren.

6.3 Pilotstudie zur Pinseltechnik

Die vorliegende Pilotstudie widmete sich der Frage, ob sich der neu auf dem Markt befindliche CRT[®] *bacteria* und das bereits für Keimzahluntersuchungen des Speichels etablierte Dentocult[®]-SM- und LB-Kultursystem zum zahnflächenspezifischen mikrobiologischen Monitoring eignen und bei Vorschulkindern und Schulanfängern frühzeitig zum Erkennen einer Kariesgefährdung der Sechs-Jahr-Molaren eingesetzt werden können.

Die dazu in vitro mit Referenzstämmen durchgeführten Untersuchungen bestätigten zunächst die prinzipielle Eignung der Testsysteme.

Für die nachfolgende Pilotstudie konnten mit Einverständnis der Eltern 7 Kinder im Alter von 6 bis 7 Jahren gewonnen werden. Die Kinder hatten im Mittel 16 Milchzähne und 7 bleibende Zähne. Die permanenten Zähne der Kinder waren kariesfrei; an vier Molaren wurde jedoch schon eine Initialkaries registriert. Insgesamt konnten 26 erste Molaren in die vorliegende Untersuchung einbezogen werden.

Das Vorkommen der Mutans-Streptokokken auf den Okklusalfächen der Molaren und im Speichel der Kinder als auch der Laktobazillen sollte erfasst werden. Laktobazillen, als Schleimhautparasiten und Standortflora des Speichels, wurden deshalb in die Untersuchung einbezogen, weil sie besonders in Fissuren eine Nische finden können. Laktobazillen bilden unter neutralen Bedingungen zwar gleich viel Milchsäure wie Mutans-Streptokokken, sind letzteren aber in ihrer Säuretoleranz überlegen (Bergholz 2002, Baake 2003). Da tiefe Fissuren einer mangelnden Selbstreinigung unterliegen bzw. nur schwer gereinigt werden können (Nagano 1960, Lussi und Schaffner 2002, Lussi et al. 2003), spielt dort das mangelnde Adhärenzvermögen der Laktobazillen keine Rolle. Sie werden weder mit dem Speichel verschluckt noch aus der Fissur ausgespült und können Mutans-Streptokokken bei tiefen pH-Werten sogar überleben und mit ihrer weiteren Milchsäureproduktion den Zahnschmelz auflösen. Milchsäure, das gemeinsame Agens von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen, ist immerhin die stärkste organische Säure.

Mit der Pilotstudie konnte aufgezeigt werden, dass sich sowohl das Dentocult[®]- als auch das CRT[®]-*bacteria*-Kultursystem für den flächenspezifischen Nachweis - hier bei Okklusalfächen der ersten Molaren mit ihren Fissuren - von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen auf kleinen Arealen eignet, wenn ein Pinsel zur Entnahme und zum Verimpfen der Plaque verwendet wird. Ein störender Einfluss der Begleitflora wurde nicht registriert.

Die Notwendigkeit der mikrobiologischen Kontrolle der Okklusalfächen der Molaren empfahl schon Twetman (1998), um prophylaktische Maßnahmen, wie die Applikation von Chlorhexidin- und Fluoridlacken, gezielt auf diese Zahnflächen konzentrieren und deren Wirkung überprüfen zu können. Auch Petersson (1998) empfahl zur Kariesprävention die gezielte Applikation von Fluorid- und Chlorhexidinlacken auf die besonders gefährdeten Okklusalfächen der Molaren und Approximalflächen und deren Kontrolle.

Keene et al. (1981) hatten zur mikrobiologischen Kontrolle der Approximalflächen Plaque mittels Zahnseide entnommen. Die Zahnseide wurde unter den Approximalkontakt der zu untersuchenden Zähne platziert, an der mesialen und distalen Zahnfläche mehrmals gerieben und dann vorsichtig aus dem Zahnzwischenraum entfernt. Die Autoren kultivierten die Approximalplaque auf MSB-Agar und lasen die Befunde nach der optischen Dichte der Kolonien in sieben Keimzahlklassen ab; eine hohe Besiedlung der Approximalflächen mit *S. mutans* konnte nachgewiesen werden.

Auch in der longitudinalen Erfurter Kariesrisikostudie wurde Approximalplaque mittels Dental floss entnommen. Eine Beziehung zwischen Mutans-Streptokokken in der Approximalplaque, im Speichel und den klinischen Befunden konnte aufgezeigt werden. Allerdings wurden nur 60 Probanden mikrobiologisch kontrolliert, da das konventionelle mikrobiologische Vorgehen sehr umfassend und damit sehr zeitaufwendig war (Heinrich-Weltzien et al. 1998b, Kneist et al. 1998d, Stöber et al. 1998). Das hier vorgestellte Vorgehen ist bei Beschränkung auf den Nachweis von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen weitaus zeit- und kostengünstiger und erlaubt damit die Untersuchung von Plaque und Speichel einer großen Anzahl von Probanden in einem kurzen Zeitraum.

Obwohl heute die positive Beziehung zwischen Mutans-Streptokokken-Zahlen in Plaque und Speichel unumstritten ist und sich der im Vergleich zur Plaqueentnahme in situ leichter zugängliche Speichel zur mikrobiologischen Kontrolle besser eignet, legt Twetman (1998) nach wie vor besonderen Wert auf die Plaqueuntersuchung. Dies hält der Autor zur Effizienzbewertung von Präventionsprogrammen für erforderlich, weil besonders nach antibakteriellen Lackapplikationen die kariogenen Keimzahlen in der Plaque schon reduziert sein können, die Reduktion sich aber noch nicht im Speichelbefund widerspiegelt. Laurisch und Schneider (1998) halten eine Untersuchung des Gesamtspeichels allein beispielsweise auch nicht für aussagefähig, wenn nur noch wenige Zähne vorhanden oder die Zähne nur vereinzelt von viel Plaque bedeckt sind. Eine Kariesgefährdung einzelner Zahnflächen kann aus der Sicht letzterer Autoren leicht verkannt werden. Zuvor haben Macpherson et al. (1990) und Bratthall et al. (1995) bei zahnflächenspezifischen mikrobiologischen Untersuchungen Zahnflächen mit hoher und niedriger kariogener Keimbesiedlung nachgewiesen. Ein hohes Kariesrisiko von Zahnflächen stand dabei in Beziehung zu einer hohen mikrobiellen

Belastung. Die Autoren hielten die mikrobiologische Kontrolle einzelner Zahnflächen zur Erkennung einer Kariesgefährdung für wichtig.

Die vorliegende Untersuchung sollte sich aus kariespräventiver Sicht ebenso der zahnflächenspezifischen mikrobiologischen Kontrolle widmen. Für die Pilotstudie wurden wiederum die Kultursysteme Dentocult® und CRT® *bacteria* eingesetzt. Bei 6 der 7 Kinder wurden hohe Mutans-Streptokokken-Zahlen sowohl in den Fissuren als auch im Speichel nachgewiesen (Abb. 33, 34). Die Kinder hatten mehrheitlich eine gute bis mäßige Mundhygiene, was die hohen Keimzahlen erklären dürfte. So konnte Görbert 2003 mit dem Approximal-Plaque-Index (API) von Jugendlichen in kieferorthopädischer Behandlung zeigen, dass eine gute Mundhygiene bereits mit der hohen Keimzahlklasse von SM 2 einhergeht; hohe Keimzahlen eilen hohen Plaqueindizes mindestens vier Wochen voraus. Die Kinder der vorliegenden Untersuchung waren vor ihrer Teilnahme an der Studie in kein Präventionsregime eingebunden (Anhang Tab. 16 und 17). Sie hatten im Mittel einen kariösen und zwei gefüllte Milchzähne. Bei einem Kind (Pat.-Nr. 4, Abb. 34) wurden niedrige Keimzahlen an Mutans-Streptokokken in der Fissurenplaque und im Speichel nachgewiesen; die kariösen Zähne waren zuvor extrahiert worden. Bei einem weiteren Kind (Pat.-Nr. 3, Abb. 33) wurden bei einem sehr guten Mundhygienestatus hohe Keimzahlen nachgewiesen, allerdings wurde bereits eine Initialkaries am linken unteren ersten Molaren registriert. Bei diesem Kind dürfte die Zahngesundheit des bleibenden Gebisses gefährdet sein, wenn individualprophylaktische Maßnahmen ausbleiben. So konnten Stürcke (2001) und Sterba (2002) die Effizienz gruppenprophylaktischer Maßnahmen nur für primär gesunde oder sanierte Kinder aufzeigen ($\Delta dmfs$ 0,2 in zwei Jahren). Primär gesunde und sanierte Kinder mit hohen Keimzahlen an Mutans-Streptokokken entwickelten im Zeitraum von zwei Jahren im Mittel zwei neue kariöse Zahnflächen und bei unsanierten Kindern mit hohen Keimzahlen wurden acht neue kariöse Flächen registriert. Eine 80-prozentige Teilnahme der Kinder an den gruppenprophylaktischen Maßnahmen wurde dokumentiert (Stürcke 2001).

Mehrheitlich lagen bei den hier untersuchten Kindern hohe Laktobazillenbefunde im Speichel vor (Abb. 33, 34). Auch hier stimmen die Befunde weitestgehend mit den Ergebnissen von Görbert (2003) überein. Der Papillen-Blutungs-Index (PBI) der von ihr untersuchten Jugendlichen war bereits ab einem Wert von 9 (gute Mundhygiene) mit

Laktobazillenbefunden von LB 2 und ab einem Wert von 14 (mäßige Mundhygiene) bereits mit der Keimzahlklasse LB 3 vergesellschaftet. Bis auf eine Ausnahme (Pat. Nr. 6) wurde dies auch in der vorliegenden Pilotstudie beobachtet. Lagen hohe Laktobazillenbefunde in der Fissurenplaque vor, so korrelierte dies bis auf eine Ausnahme (Pat.-Nr. 3) mit der d(t)- bzw. f(t)-Komponente. Die vorhandenen Füllungen waren provisorisch (rauhe Oberfläche) und überstehende Füllungsrän­der bildeten neue Retentionsstellen für orale Keime. Bei zwei Kindern (Pat.-Nr. 2, Pat.-Nr. 5) waren in den Fissuren aller vier Molaren hohe Laktobazillenzahlen nachweisbar. In den übrigen Fällen betraf dies nur einzelne Molaren. Eine hohe Laktobazillenbesiedlung stand in Beziehung zu tiefen Fissuren, häufigem Zuckerkonsum und/oder schlechter Mundhygiene (Anhang Tabelle 17 bis 20).

Fissuren mit mangelnder Selbstreinigung besitzen gewöhnlich V-, U-, I- und IK-Formen mit einem Öffnungswinkel von weniger als 70°, die kariesanfällig sind, wenn sie mikrobiell besiedelt werden. Nach Nagano et al. (1960) sind die unterschiedlichen Fissurenformen epidemiologisch zwischen 7 % und 34 % verbreitet. Dem hohen Kariesrisiko tiefer Fissuren wurde durch die Einführung der Fissurenversiegelung als kassenzahnärztliche Leistung (IP5-Position) seit 1993 Rechnung getragen. Die Fissurenversiegelung hat nachweislich zur Senkung der Kariesprävalenz beigetragen (Irmisch 1992, Heinrich-Weltzien et al. 1998a). Allerdings arbeiten Zahnarztpraxen immer noch zu wenig präventionsorientiert: ca. 8 % der Zahnärzte in Deutschland betreiben Prophylaxe (Reichenbach 2003) und nach Kluckhuhn (2003) werden weniger als 5 % der Mittel im Gesundheitssystem für Prävention ausgegeben. Den Analysen der Kassenzahnärztlichen Bundesvereinigung (KZBV) zufolge betragen die Kosten für Zahnersatz und zahnärztliche Behandlung im Jahr 2001 rund 12 Milliarden Euro (Weißig et al. 2003). Karies ist mit ihren Folgeerkrankungen damit immer noch die sehr kostspielige Einzelerkrankung in Deutschland. Ein hoher Informationsbedarf der Bevölkerung über die Ursachen der Karies besteht weiterhin. Die kürzlich von Borutta et al. (2002) publizierte Studie zur Mundgesundheit von 30 Monate alten Kleinkindern konnte dies zeigen. Die Mütter der Kinder hatten zwar mehrheitlich eine gute Schul- und Berufsausbildung erhalten, aber 45 % von ihnen bestätigten die Frage nach der „Vererbung guter oder schlechter Zähne“, 39 % wussten es nicht, und die übrigen verneinten eine Vererbung der Karies. Auch Logan et al. (1996) befragten Studenten, die das Wissen ihrer Mütter reflektieren sollten, ob ihnen die frühkindliche Karies ein

Begriff sei. 39 % der Studenten hatten von dem Krankheitsbild gehört, aber die Mehrzahl hielt die frühkindliche Karies für einen konstruierten Begriff. Im Kontrast dazu kannten 89 % der Studenten das Syndrom des plötzlichen Kindstodes. Da die Erfurter Mütter darüber hinaus durch Merte (2003) mittels Bacteriocin-Fingerprinting der Mutans-Streptokokken-Paare von Mutter und Kind auch als hauptsächliche Quelle der kariogenen Speichelkeime ihrer Kinder aufgezeigt werden konnten, bedürfen gerade Mütter im Zeitalter der Prävention eine verstärkte Aufklärung durch Zahnärzte, Hausärzte und Pädiater. Auch in der vorliegenden Studie wurde die mangelnde Aufklärung der Mütter durch ihre Antworten im Elternfragebogen deutlich (Anhang Tab. 16 und 17). Bereits Goepel et al. (1991) verwiesen in diesem Zusammenhang auf die Bedeutung der Mütter für die Weitergabe von Gesundheitswissen in der Familie. Immerhin ist, wie eingangs schon gesagt, die Karies so alt wie die Menschheit, aber selbst Zahnärzte lernen die Ursachen der Karies mit ihrem multifaktoriellen Ursachengefüge erst seit den letzten 50 Jahren an den Hochschulen bzw. Universitäten.

Wird die frühzeitige Transmission der Mutans-Streptokokken verzögert, weil Mütter selbst nicht mehr die infektiöse Keimzahl von 10^6 beherbergen, so bleibt die Chance der Erhaltung der Gebissgesundheit der Kinder, wenn darüber hinaus Mütter nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde die Zähne ihrer Kleinkinder reinigen und bis hin zum Schulalter der Kinder kontrollieren (Gülzow et al. 2002). Ein anfängliches Monitoring von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen im Speichel der Kinder könnte dann in der Zahnarztpraxis zum Schutz der kariesgefährdeten Molaren flächenspezifisch durch die Untersuchung von Fissuren- bzw. Approximalplaque ergänzt werden.

7 Schlussfolgerungen

Nach wie vor ist der mikrobiologische Nachweis von kariogenen Keimen im Speichel und in der Plaque ein wichtiges Instrument zur Einschätzung des individuellen Kariesrisikos. Semiquantitative Kultursysteme zum alleinigen Nachweis von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen - angeboten als Chair-side-Test für die zahnärztliche Praxis - erleichtern dabei den zeitlichen und finanziellen Aufwand erheblich.

In der vorliegenden Studie konnte zunächst die prinzipielle Eignung der Kultursysteme Dentocult[®] SM und LB und CRT[®] *bacteria* bestätigt und ihr Einsatz weiterführend auch für eine zahnflächenbezogene mikrobiologische Untersuchung empfohlen werden.

In vitro konnte mit Bakteriensuspensionen ausgewählter Referenzstämme gezeigt werden, dass die beiden Kultursysteme sowohl für den Nachweis von Mutans-Streptokokken als auch für den Nachweis von Laktobazillen als gleichwertig zu betrachten sind. Die nur tendenziell höhere Keimausbeute der Mutans-Streptokokken auf Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin und 41 % Saccharose (MS41B; Nährmedium des CRT[®] *bacteria*) im Vergleich zum herkömmlichen Mitis-salivarius-Agar mit Bacitracin (MSB; Nährmedium des Dentocult[®] SM) führte dabei nicht zu höheren Keimzahlklassen und damit auch nicht zu anderen Risikoeinstufungen. Die Keimausbeute der Laktobazillen auf Rogosa-Agar der Firmen Difco und Mast stimmte auf beiden Kultursystemen nahezu überein.

Durch die parallelen Ergebnisse konventioneller Labormethoden konnte eine quantitative Zuordnung der semiquantitativen Keimzahlklassen der Kultursysteme getroffen werden. Dabei konnten die Keimzahlklassen SM 0 und SM 1 mit einer mittleren CFU von 10^2 - 10^3 pro ml unterlegt werden. Die Keimzahlklassen SM 2 und SM 3 entsprachen im Mittel einer CFU von 10^5 - 10^6 pro ml. Eine signifikante Zunahme der Mutans-Streptokokken-Zahlen wurde mit jeder Keimzahlklasse - auch bei unterschiedlicher Verimpfung - deutlich. Die Keimzahlklassen der Laktobazillen ließen untereinander ebenfalls eine signifikante Trennung zu. Dabei entsprachen die Keimzahlklassen LB 1 und LB 2 einer mittleren CFU von 10^3 - 10^4 pro ml; die „Risiko“-Keimzahlklassen LB 3 und LB 4 konnten einer CFU von $\geq 10^{5-7}$ pro ml zugeordnet werden.

Kleinere Arealbeimpfungen, z.B. durch Verimpfen der Bakteriensuspension mit einem Pinsel, wirkten sich nicht auf die später abgelesenen Keimzahlklassen aus. Die hohe Übereinstimmung der angezüchteten Keimzahlen der jeweils drei Stämme von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen auf den kleinen Impfarealen bzw. auf der gesamten Agaroberfläche der beiden Kultursysteme unter Verwendung eines Pinsels, Holz- oder Plastikspatels sprach für die Gleichwertigkeit der Kultursysteme und Impfmethode.

In der nachfolgenden Pilotstudie wurde die Plaqueentnahme mit einem Pinsel aus den Fissuren unmittelbar durchgebrochener Sechsjähriger Molaren von Erstklässlern mit den gleichen Kultursystemen erprobt. Parallel dazu wurde der Speichel der Kinder untersucht. Beide Kultursysteme - Dentocult[®] SM und LB und CRT[®] *bacteria* - eigneten sich für den Nachweis von Mutans-Streptokokken und Laktobazillen von den Okklusalfächen der ersten Molaren. Die durch Verimpfen der Fissurenplaque mit einem Pinsel entstandenen kleinen Areale mit Bakterienwachstum ließen sich genauso gut ablesen wie die Gesamtoberfläche des Agars, wenn der Kulturträger zur Speicheluntersuchung genutzt wurde.

Die bei den Kindern erhobenen mikrobiologischen Befunde standen in Beziehung zur Mundhygiene der Kinder und zu ihrem oralen Gesundheitsstatus. Sowohl hohe Mutans-Streptokokken- als auch hohe Laktobazillenbefunde verdeutlichten die Kariesgefährdung, der insbesondere die Okklusalfächen der ersten Molaren ausgesetzt sind.

Die „Chair-side-Methode“ erwies sich zusammenfassend als wenig zeitaufwendig und kostengünstiger im Vergleich zum konventionellen mikrobiologischen Vorgehen und kann für die Untersuchung von Plaque und Speichel einer großen Anzahl von Patienten, beispielsweise zum Monitoring präventiver Maßnahmen, empfohlen werden.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Aaltonen AS. 1991. The frequency of mother-infant salivary close contacts and maternal caries activity affect caries occurrence in 4-year-old children. *Proc Finn Dent Soc*, 87 (3):373-382.
2. Aaltonen AS, Tenovuo J. 1994. Association between mother-infant salivary contacts and caries resistance in children: a cohort study. *Pediatr Dent*, 16 (2):110-116.
3. Aaltonen AS, Tenovuo J, Lehtonen OP. 1988. Antibodies to the oral bacterium *Streptococcus mutans* and the development of caries in children in relation to maternal dental treatment during pregnancy. *Arch Oral Biol*, 33 (1):33-39.
4. 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 (6):453-457.
5. Alaluusua S, Savolainen J, Tuompo H, Gronroos L. 1984. Slide-scoring method for estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. *Scand J Dent Res*, 92 (2):127-133.
6. Anderson M. 2002. Risk assessment and epidemiology of dental caries: review of the literature. *Pediatr Dent*, 24 (5):377-385.
7. Baake K. 2003. Erfurter Kariesrisiko-Studie - Zur Säureproduktion und Säuretoleranz verschiedener Laktobazillenarten. [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
8. Bánóczy J, Gábris K, Nyárasdy I, Pienihäkkinen K, Rigó O, Scheinin A. 1983. Zusammenhang zwischen Laktobazillenzahl, Candida-Zahl des Speichels und Karies. *Zahn-, Mund- und Kieferheilkd*, 71 (8):787-795.
9. Basson N, van Wyk C. 1982. Colonization of the tooth surfaces by lactobacilli. *J Dent Res*, 61:603.
10. Beighton D, Brailsford S. 1998. Lactobacilli and Actinomyces: their role in the caries process. In: Stöber L, Hrsg. *Kariesdynamik und Kariesrisiko*. Aufl. Berlin: Quintessenz, 130-136.
11. Beighton D, Hellyer PH, Lynch EJ, Heath MR. 1991. Salivary levels of mutans streptococci, lactobacilli, yeasts, and root caries prevalence in non-institutionalized elderly dental patients. *Community Dent Oral Epidemiol*, 19 (5):302-307.
12. Bergholz T. 2002. Erfurter Kariesrisikostudie - Säureproduktion und Säuretoleranz als Virulenzfaktoren bei Mutans-Streptokokken. [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

13. Berkowitz RJ, Jordan HV, White G. 1975. The early establishment of *Streptococcus mutans* in the mouth of infants. *Arch Oral Biol*, 20:171-174.
14. Berkowitz RJ, Turner J, Green P. 1980. Primary oral infection of infants with *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 25 (4):221-224.
15. Berkowitz RJ, Turner J, Green P. 1981. Maternal salivary levels of *Streptococcus mutans* and primary oral infection of infants. *Arch Oral Biol*, 26 (2):147-149.
16. Billep H. 2000. Untersuchungen zur Antikörper-Prävalenz gegenüber *Streptococcus mutans* im Speichel erwachsener Probanden. [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
17. Billings RJ, Moss ME. 1998. Site-spezifischer Vergleich der Besiedlung mit Mutans-Streptokokken bei kariesfreien und kariesgefährdeten Kindern. In: Schneider H, Hrsg. *Plaque*. Erste Aufl. Linnich: Apollonia Verlag, 83-90.
18. Black GV. 1886. Gelatine forming microorganisms. *Independent Practitioner*:546-562.
19. Black GV. 1914. *Konservierende Zahnheilkunde*. Erste Aufl. Berlin: Meusser.
20. Borutta A, Kneist S, Kischka P, Eherler D, Chemnitius P, Stößer L. 2002. Die Mundgesundheit von Kleinkindern in Beziehung zu relevanten Einflussfaktoren. *Dtsch Zahnärztl Z*, 57 (12):682-687.
21. Botha FS, Botha SJ, Kroon J, Steyn PL. 2001. Caries prediction factors in children with primary dentition. *SADJ*, 56 (8):348-352.
22. Botha SJ, Boy SC, Botha FS, Senekal R. 1998. *Lactobacillus* species associated with active caries lesions. *J Dent Assoc S Afr*, 53 (1):3-6.
23. Bowen WH, Schilling K, Giertsen E, Pearson S, Lee SF, Bleiweis A, Beeman D. 1991. Role of a cell surface-associated protein in adherence and dental caries. *Infect Immun*, 59 (12):4606-4609.
24. Brandtzaeg P. 1983. The oral secretory immune system with special emphasis on its relation to dental caries. *Proc Finn Dent Soc*, 79 (2):71-84.
25. Bratthall D, Hoszek A, Zhao X. 1996. Evaluation of a simplified method for site-specific determination of mutans streptococci levels. *Swed Dent J*, 20 (6):215-220.
26. Bratthall D, Serinirach R, Rapisuwon S, Kuratana M, Luangjarmekorn V, Luksila K, Chaipanich P. 1995. A study into the prevention of fissure caries using an antimicrobial varnish. *Int Dent J*, 45 (4):245-254.
27. Buddecke E. 1981. *Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin*. Erste Aufl. Berlin: de Gruyter.

28. Carlsson J, Grahnen H, Jonsson G. 1975. Lactobacilli and streptococci in the mouth of children. *Caries Res*, 9 (5):333-339.
29. Catalonotto FA, Shklair IL, Keene HJ. 1975. Prevalence and localisation of *Streptococcus mutans* in infants and children. *J Am Dent Assoc*, 91 (3):606-609.
30. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. 1993. Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*, 72 (1):37-45.
31. Challacombe SJ. 1980. Serum and salivary antibodies to *Streptococcus mutans* in relation to the development and treatment of human dental caries. *Arch Oral Biol*, 25 (7):495-502.
32. Chapman GH. 1944. The isolation and testing of fecal streptococci. *Am J Digestive Disease*, 13:105.
33. Cimasoni G. 1983. Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci*, 12:III-VII, 1-152.
34. Cimasoni G. 1985. Fluorures et gravidité. *Schweiz Rundsch Med Prax*, 74 (7):137-139.
35. Clarke JK. 1924. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol*, 5:141-146.
36. de Soet JJ, de Graaff J. 1988. An improved method with computer registration of fermentation activities of microorganisms. *J Ferment Technol*, 66:239-242.
37. de Soet JJ, van Steenberghe T, de Graaff J. 1992. *Streptococcus sobrinus*: taxonomy, virulence and pathogenicity. *Alpe Adria Microbiol*, 3:127-145.
38. de Soet JJ, Holbrook WP, van Amerongen WE, Schipper E, Homburg CH, de Graaff J. 1990. Prevalence of *Streptococcus sobrinus* in relation to dental caries in children from Iceland and The Netherlands. *ASDC J Dent Child*, 57 (5):337-342.
39. de Soet JJ, van Loveren C, Lammens AJ, Pavicic MJ, Homburg CH, ten Cate JM, de Graaff J. 1991. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 25 (2):116-122.
40. Dean HT. 1933. Distribution of mottled enamel in the United States. *J Am Dent Assoc*, 20:319-333.
41. Dean HT. 1934. Classification of mottled enamel diagnosis. *J Am Dent Assoc*, 21:1421-1426.
42. Dean HT. 1936. Chronic endemic dental fluorosis (mottled enamel). *J Am Med Assoc*, 107:1269-1273.
43. Dean HT. 1938. Endemic fluorosis and its relation to dental caries. *Publ Health Rep*, 53:1443-1452.

44. Dean HT, Elvolve E. 1936. Some epidemiological aspects of chronic endemic dental fluorosis. *Am J Publ Health*, 26:567-575.
45. Dean HT, Arnold FA, Elvolve E. 1942. Domestic water and dental caries. Additional studies of the relation of fluoride domestic waters to dental caries experience in 4425 white children, aged 12 to 14 years, of 13 cities in 4 states. *Publ Health Rep*, 57:1155-1179.
46. Dean HT, Jay P, Arnold FA, Elvolve E. 1941. Domestic water and dental caries. II. A study of 2832 white children, aged 12-14 years, of 8 suburban Chicago communities, including *Lactobacillus acidophilus* studies of 1761 children. *Publ Health Rep*, 56:761-792.
47. Denepitiya L, Kleinberg I. 1984. A comparison of the acid-base and aciduric properties of various serotypes of the bacterium *Streptococcus mutans* associated with dental plaque. *Arch Oral Biol*, 29 (5):385-393.
48. Depaola PF. 1989. Integration of host and environmental factors associated with root caries. *J Dent Res*, 68 (Spec. Iss.):178.
49. Désirabode MA. 1843. *Nouveaux éléments complets de la science et de l'art du dentiste*. Paris
50. 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 (1):120-125.
51. Eager JM. 1902. Chiaie teeth. *Dent Cosmos*, 44:300-301.
52. Edgar WM, Higham SM, Manning RH. 1994. Saliva stimulation and caries prevention. *Adv Dent Res*, 8 (2):239-245.
53. Edwardsson S. 1974. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine. *Odontol Revy Suppl*, 32:1-143.
54. 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 (9):811-814.
55. el-Nadeef MA, Bratthall D. 1991. Intraindividual variations in counts of mutans streptococci measured by "Strip mutans" method. *Scand J Dent Res*, 99 (1):8-12.
56. 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.
57. Fitzgerald RJ, Jordan HV, Archard HO. 1966. Dental caries in gnotobiotic rats infected with a variety of *Lactobacillus acidophilus*. *Arch Oral Biol*, 11 (5):473-476.

58. Freedman ML, Coykendall AL. 1975. Variation in internal polysaccharide synthesis among *Streptococcus mutans* strains. *Infect Immun*, 12 (3):475-479.
59. Fujiwara T, Sasada E, Mima N, Ooshima T. 1991. Caries prevalence and salivary *mutans streptococci* in 0-2-year-old children of Japan. *Community Dent Oral Epidemiol*, 19 (3):151-154.
60. Gibbons RJ. 1984. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *J Dent Res*, 63:378-385.
61. Gibbons RJ, Hay DI. 1988. Human salivary acidic proline-rich proteins and statherin promote the attachment of *Actinomyces viscosus* LY7 to apatitic surfaces. *Infect Immun*, 56 (2):439-445.
62. Gizani S, Vinckier F, Declerck D. 1999. Caries pattern and oral health habits in 2- to 6-year-old children exhibiting differing levels of caries. *Clin Oral Investig*, 3 (1):35-40.
63. Glass R. 1982. The first international conference on the declining prevalence of dental caries. The evidence and the impact on dental education, dental research and dental practice. *J Dent Res*, 61:1301-1383.
64. Goepel E, Goepel K, Stock KH, Gunay H. 1991. Die Notwendigkeit der Zusammenarbeit zwischen Gynäkologen und Zahnarzt in der Schwangerschaft. *Frauenheilkunde*, 51 (3):231-235.
65. Gold OG, Jordan HV, van Houte J. 1973. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 18 (11):1357-1364.
66. Görbert A. 2003. Sind kieferorthopädische Apparaturen Retentionsstellen für kariogene Keime - eine klinisch-mikrobiologische Studie. [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
67. Guggenheim B, Hrsg. 1984. Note by the editor. Erste Aufl. Basel: Karger.
68. Gülzow HJ, Hellwig E, Hetzer G. 2002. Empfehlungen zur Kariesprophylaxe mit Fluoriden [Stellungnahme der DGZMK].
69. Gustafsson BE, Quensel CE, Lanke LS, Lundqvist CH, Grahn H, Bonow BE, Krasse B. 1954. The Vipeholm dental caries study; the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand*, 11 (3-4):232-264.
70. Hahn C, Falker W, Minah G, Palmer J. 1989. Clinical and bacteriological studies of dental caries. *J Dent Res*, 68:214.
71. Hardie JM, Thomson PL, South RJ, Marsh PD, Bowden GH, McKee AS, Fillery ED, Slack GL. 1977. A longitudinal epidemiological study on dental plaque and the development of dental caries - interim results after two years. *J Dent Res*, 56 Spec No:C90-98.

72. Harper DS, Loesche WJ. 1983. Effect of pH upon sucrose and glucose catabolism by the various genogroups of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*, 62 (5):526-531.
73. Harper DS, Loesche WJ. 1984. Growth and acid tolerance of human dental plaque bacteria. *Arch Oral Biol*, 29 (10):843-848.
74. Hartung J. 1986. Statistik. Fünfte Aufl. München: Oldenburg Verlag.
75. Heinrich R, Kneist S. 1987. Die Vitalerhaltung des Milchzahnendodontes - Eine klinisch-mikrobiologische und histologische Studie. [Habilitation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
76. Heinrich R, Kneist S. 1988. Mikrobiologisch-histologisch kontrollierte Therapiestudie zur Effektivitätsbewertung der einzeitigen und schrittweisen Caries-profunda-Therapie. *Stomatol*, 38:693-698.
77. Heinrich-Weltzien R, Kneist S. 2000. Kariesrisiko-Diagnostik. In: Splieth C, Hrsg. Professionelle Prävention. Erste Aufl. Berlin: Quintessenz-Verlag, 31-46.
78. Heinrich-Weltzien R, Kneist S, Fischer T, Stößer L. 1998a. Ist eine effektive Kariesprävention ohne Fissurenversiegelung möglich? *Quintessenz*, 49 (11):1099-1108.
79. Heinrich-Weltzien R, Tawfiq H, Schumann V, Stößer L. 1998b. Erfurter Kariesrisiko-Studie - Klinische Befunde zur Charakterisierung eines erhöhten Kariesrisikos. In: Stößer L, Hrsg. Kariesdynamik und Kariesrisiko. Erste Aufl. Berlin: Quintessenz-Verlag, 179-193.
80. Hemmens ES, Blayney JR, Bradel SF, Harrison RW. 1946. The microbiologic flora of the dental plaque in relation to the beginning of caries. *J Dent Res*, 25:195.
81. Hetzer G. 1995. Zur primären Prävention oraler Erkrankungen. *Zahnärztl Gesundheitsdienst*, 26:8.
82. Hoffmann-Axthelm, Hrsg. 2000. Lexikon der Zahnmedizin. Sechste Aufl. Berlin: Quintessenz-Verlag.
83. Holbrook WP, de Soet JJ, de Graaff J. 1993. Prediction of dental caries in pre-school children. *Caries Res*, 27 (5):424-430.
84. Homer KA, Patel R, Beighton D. 1993. Effects of N-acetylglucosamine on carbohydrate fermentation by *Streptococcus mutans* NCTC 10449 and *Streptococcus sobrinus* SL-1. *Infect Immun*, 61 (1):295-302.
85. Huis in 't Veld JH, van Palenstein Helderma WH, Dirks OB. 1979. *Streptococcus mutans* and dental caries in humans: a bacteriological and immunological study. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 45 (1):25-33.

86. Irmisch B. 1992. Kariesprophylaxe mittels Fissurenversiegelung. *Dtsch Zahnärztl Z*, 47:790-793.
87. 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*, 50 (2):378-381.
88. Jensen B, Bratthall D. 1989. A new method for the estimation of mutans streptococci in human saliva. *J Dent Res*, 68 (3):468-471.
89. Johnson CP, Gross SM, Hillman JD. 1980. Cariogenic potential in vitro in man and in vivo in the rat of lactate dehydrogenase mutants of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 25 (11-12):707-713.
90. 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 (2):406-408.
91. Keene HJ, Horton IM, Handler SF. 1981. *Streptococcus mutans* approximal plaque index as a new epidemiologic tool for defining the parameters of *Streptococcus mutans* infection in human populations. *Arch Oral Biol*, 26 (5):345-355.
92. Keyes PH. 1962. Recent advances in dental caries research. *Int Dent J*, 12:443-446.
93. Kilian M, Russell MW. 1994. Function of mucosal immunoglobulins. In: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, McGhee JR, Bienenstock J, Hrsg. *Handbook of mucosal immunology*. Erste Aufl. San Diego: Academic Pr, 127-137.
94. Klock B, Krasse B. 1977. Microbial and salivary conditions in 9- to 12-year-old children. *Scand J Dent Res*, 85 (1):56-63.
95. Kluckhuhn C. 2003. Gezielte Vorsorge hilft sparen. *ZM*, 10:137.
96. Kneist S. 1998. Begleitphänomene in der mikrobiologischen Speicheldiagnostik. *Oralprophylaxe*, 20 (4):208-217.
97. Kneist S, Heinrich-Weltzien R. 1998. Möglichkeiten und Grenzen handelsüblicher mikrobiologischer Speicheltests für die Kariesrisiko-Diagnostik. *tzb*, 10:443-452.
98. Kneist S, Heinrich-Weltzien R. 2001. Rund um den Speicheltest. *ZM*, 17:40-49.
99. Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Stößer L. 1996. A comparison between commercial kits and conventional methods for the enumeration of mutans streptococci. *Caries Res*, 30:286.

100. Kneist S, Laurisch L, Heinrich-Weltzien R. 1999a. Der neue CRT - Mikrobiologischer Hintergrund zum Nachweis von *S.mutans*. *Oralprophylaxe*, 21 (4):180-185.
101. Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Fischer T, Stößer L. 1998a. Mikrobiologische Speicheltests - mehr als eine Motivation? *Quintessenz*, 49 (2):139-148.
102. Kneist S, Laurisch L, Heinrich-Weltzien R, Stößer L. 1998b. A modified mitis salivarius medium for a caries diagnostic test. *J Dent Res*, 77:970.
103. Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Fischer T, Stößer L. 1998c. Correlation between numbers of *S. mutans* in plaque and in saliva. *Caries Res*, 32:287.
104. Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Fischer T, Klein C. 1999b. Handelsübliche Speicheltests zum Mutans-Nachweis - Übersicht und Effizienzbewertung. *Quintessenz*, 50 (1):33-43.
105. Kneist S, Bergholz T, Fischer T, Stößer L. 1999c. Acid production by human strains of mutans streptococci. *Caries Res*, 33:290.
106. Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Tietze W, Schumann V, Stößer L. 1998d. Die mikrobielle Mundhöhlenbesiedlung als Grundvoraussetzung des Kariesrisikos - Eine Übersicht der Befunde aus der Erfurter Studie. In: Stößer L, Hrsg. *Kariesdynamik und Kariesrisiko*. Erste Aufl. Berlin: Quintessenz-Verlag, 201-213.
107. Kneist S, Heinrich-Weltzien R, Rupf R, Eschrich K, Merte K. 2004. Die Bedeutung von *S. sobrinus* für die Kariesentwicklung bei Kindern. *Oralprophylaxe*, 26 (1):24-28.
108. Kneist VS, Heinrich R, Jacobi S. 1988. Zur Bedeutung unterschiedlicher Serotypen von *Streptococcus mutans* für die Kariesprogression im Dentin. *Zahn Mund Kieferheilkd*, 76 (1):29-31.
109. Koga T, Asakawa H, Okahashi N, Hamada S. 1986. Sucrose-dependent cell adherence and cariogenicity of serotype c *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol*, 132 (Pt 10):2873-2883.
110. Köhler B, Bratthall D. 1978. Intrafamilial levels of *Streptococcus mutans* and some aspects of the bacterial transmission. *Scand J Dent Res*, 86 (1):35-42.
111. Köhler B, Bratthall D. 1979. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. *J Clin Microbiol*, 9 (5):584-588.
112. Köhler B, Andreen I, Jonsson B. 1984. The effect of caries-preventive measures in mothers on dental caries and the oral presence of the bacteria *Streptococcus mutans* and lactobacilli in their children. *Arch Oral Biol*, 29 (11):879-883.
113. Köhler B, Birkhed D, Olsson S. 1995. Acid production by human strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res*, 29 (5):402-406.

114. König K. 1971. Karies und Kariesprophylaxe. Erste Aufl. München: Goldmann.
115. Krasse B. 1954. Studies on acidogenic micro-organisms in the mouth with special reference to dental caries activity. *Acta Odontol Scand*, 12 (14):1-32.
116. Krasse B. 1988. Biological factors as indicators of future caries. *Int Dent J*, 38 (4):219-225.
117. Kristoffersson K, Bratthall D. 1982. Transient reduction of *Streptococcus mutans* interdentally by chlorhexidine gel. *Scand J Dent Res*, 90 (6):417-422.
118. Kristoffersson K, Axelsson P, Bratthall D. 1984. Effect of a professional tooth cleaning program on interdentally localized *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 18 (5):385-390.
119. Künzel W, Hrsg. 1997. Karies decline in Deutschland. Erste Aufl. Heidelberg: Hüthig.
120. Larmas M. 1975. A new dip-slide method for the counting of salivary lactobacilli. *Proc Finn Dent Soc*, 71 (2):31-35.
121. Larmas M. 1985. Simple tests for caries susceptibility. *Int Dent J*, 35 (2):109-117.
122. Larmas M. 1992. Saliva and dental caries: diagnostic tests for normal dental practice. *Int Dent J*, 42 (4):199-208.
123. Laurisch L. 1997. Neues selektives Nährmedium zum Nachweis von *Streptococcus mutans*. München: Patentschrift Nr. 197 24 970.1.
124. Laurisch L. 2002. Diagnostik und Therapie der Wurzelkaries. *Quintessenz*, 53 (4):337-350.
125. Laurisch L, Schneider H. 1998. Speicheltests als Grundlage moderner Prävention. In: Schneider H, Hrsg. *Plaque*. Erste Aufl. Linnich: Apollonia Verlag, 7-24.
126. Lindquist B, Emilson CG. 1990. Distribution and prevalence of *mutans streptococci* in the human dentition. *J Dent Res*, 69 (5):1160-1166.
127. Lindquist B, Emilson CG. 1991. Interactions between and within *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* isolated from humans harboring both species. *Scand J Dent Res*, 99 (6):498-504.
128. Lindquist B, Emilson CG, Wennerholm K. 1989. Relationship between *mutans streptococci* in saliva and their colonization of the tooth surfaces. *Oral Microbiol Immunol*, 4 (2):71-76.
129. Loe H, Theilade E, Jensen SB. 1965. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol*, (36):177-187.

130. Loesche WJ. 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, 50 (4):353-380.
131. Loesche WJ, Straffon LH. 1979. Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. *Infect Immun*, 26 (2):498-507.
132. Loesche WJ, Schork A, Terpenning MS, Chen YM, Stoll J. 1995. Factors which influence levels of selected organisms in saliva of older individuals. *J Clin Microbiol*, 33 (10):2550-2557.
133. Logan HL, Baron RS, Kanellis M, Brennan N, Brunsmann BA. 1996. Knowledge of male and female midwestern college students about baby bottle tooth decay. *Pediatr Dent*, 18 (3):219-223.
134. London J. 1976. The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. *Annu Rev Microbiol*, 30:279-301.
135. Lussi A, Schaffner M. 2002. Diagnose und Therapie der Karies. *Schweiz Med Forum*, 8:166-170.
136. Lussi A, Francescut P, Schaffner M. 2003. Neue und konventionelle Methoden zur Diagnose der Fissurenkaries. *Quintessenz*, 54 (10):1037-1046.
137. Macpherson LMD, MacFarlane TW, Stephen KW. 1990. An intra-oral Appliance Study of the Plaque microflora Associated with Early Enamel Demineralization. *J Dent Res*, 69 (11):1712-1716.
138. Macpherson LMD, MacFarlane TW, Stephen KW. 1991. An in situ microbiological study of the early colonisation of human enamel surfaces. *Microbiol Ecol Health Dis*, (4):39-46.
139. Mandel ID. 1974. Relation of saliva and plaque to caries. *J Dent Res*, 53 (2):246-266.
140. Marsh P, Martin MV, Hrsg. 2003. *Orale Mikrobiologie*. Vierte Aufl. Stuttgart: Thieme.
141. Marsh PD. 1994. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res*, 8 (2):263-271.
142. Marthaler TM. 1966. A standardized system of recording dental conditions. *Helv Odontol Acta*, 10 (1):1-18.
143. Masuda N, Tsutsumi N, Sobue S, Hamada S. 1979. Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants. *J Clin Microbiol*, 10 (4):497-502.
144. Matsukubo T, Ohta K, Maki Y, Takeuchi M, Takazoe I. 1981. A semi-quantitative determination of *Streptococcus mutans* using its adherent ability in a selective medium. *Caries Res*, 15 (1):40-45.

145. Matsukubo T, Saito H, Ohta K, Maki Y, Sazuka JI, Takaesu Y, Takazoe I, Asami K. 1983. A practical method for differentiating the salivary levels of *Streptococcus mutans* using a stabilized selective broth. *Bull Tokyo Dent Coll*, 24 (4):195-202.
146. 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 (6):1371-1377.
147. McGhee JR, Kiyono H. 1993. New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. *Infect Agents Dis*, 2 (2):55-73.
148. Meckel AH. 1965. The formation and properties of organic films on teeth. *Arch Oral Biol*, 10 (4):585-598.
149. Merte A. 2003. Zur Transmission von *Mutans-Streptokokken* [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
150. Michalek SM, Childers NK. 1990. Development and outlook for a caries vaccine. *Crit Rev Oral Biol Med*, 1 (1):37-54.
151. Michalek SM, Hirasawa M, Kiyono H, Ochiai K, McGhee JR. 1981. Oral ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. *Infect Immun*, 33 (3):690-696.
152. Michalek SM, Gregory RL, Harmon CC, Katz J, Richardson GJ, Hilton T, Filler SJ, McGhee JR. 1987. Protection of gnotobiotic rats against dental caries by passive immunization with bovine milk antibodies to *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*, 55 (10):2341-2347.
153. Minah GE, Loesche WJ. 1977. Sucrose metabolism by prominent members of the flora isolated from cariogenic and non-cariogenic dental plaques. *Infect Immun*, 17 (1):55-61.
154. Moreno EC, Varughese K, Hay DI. 1979. Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calcif Tissue Int*, 28 (1):7-16.
155. Mundorff SA, Eisenberg AD, Leverett DH, Espeland MA, Proskin HM. 1990. Correlations between numbers of microflora in plaque and saliva. *Caries Res*, 24 (5):312-317.
156. Nagano T. 1960. Relation between the form and pit and fissure and the primary lesion of caries. *Shikwa Gakuto*, 60:80-90.
157. Newbrun E. 1978. *Cariology*. Erste Aufl. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.
158. Newbrun E. 1983. *Cariology*. Zweite Aufl. Baltimore: The Williams & Wilkins Company.

159. Newbrun E. 1996. Current treatment modalities of oral problems of patients with Sjogren's syndrome: caries prevention. *Adv Dent Res*, 10 (1):29-34.
160. Nikiforuk G. 1985. 2. Prevention, basic and clinical aspects. In: Nikiforuk G, Hrsg. *Understanding dental caries*. Erste Aufl. Basel: Karger,
161. Nyvad B, Kilian M. 1987. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res*, 95 (5):369-380.
162. Nyvad B, Fejerskov O. 1996. Development, structure and pH of dental plaque. In: Thylstrup A, Fejerskov O, Hrsg. *Textbook of clinical cariology*. Erste Aufl. Copenhagen: Munsgaard, 89-110.
163. Oehme T, Künisch J, Heinrich-Weltzien R. 2001. Verfärbte Fissur = Pigmentation = Schmelzkaries = Dentinkaries? *Quintessenz*, 52 (6):581-589.
164. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Wagner M, Gordon HA, Luckey TD. 1954. Use of the germfree animal technic in the study of experimental dental caries. I. Basic observations on rats reared free of all microorganisms. *J Dent Res*, 33 (2):147-174.
165. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF, Gordon HA, Wagner M. 1955. Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. *J Am Dent Assoc*, 50 (3):259-272.
166. Petersson L. 1998. Der Effekt der site-spezifischen kombinierten Anwendung von antimikrobiellen und fluoridierten Lacken. In: Schneider H, Hrsg. *Plaque*. Erste Aufl. Linnich: Apollonia Verlag, 155-166.
167. Petti S, Pezzi R, Cattaruzza MS, Osborn JF, D'Arca AS. 1997. Restoration-related salivary *Streptococcus mutans* level: a dental caries risk factor? *J Dent*, 25 (3-4):257-262.
168. Powell LV. 1998. Caries prediction: a review of the literature. *Community Dent Oral Epidemiol*, 26 (6):361-371.
169. Quigley GA, Hein JW. 1962. Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing. *J Am Dent Assoc*, 65:26-29.
170. Reichenbach R. 2003. Persönliche Mitteilung
171. Riethe P. 1994. "Kariesprophylaxe und konservierende Therapie". In: Rateitschak KH, Hrsg. *Farbatlant der Zahnmedizin*. Zweite Aufl. Stuttgart: Thieme,
172. Roeters FJ, van der Hoeven JS, Burgersdijk RC, Schaeken MJ. 1995a. Lactobacilli, mutans streptococci and dental caries: a longitudinal study in 2-year-old children up to the age of 5 years. *Caries Res*, 29 (4):272-279.
173. Roeters FJ, Burgersdijk R, Truin GJ, van't Hof M. 1995b. Dental caries and its determinants in 2-to 5-year-old children. *ASDC J Dent Child*, 62 (6):401-408.

174. Rogosa M, Mitchell JA, Wisemann RF. 1951. A selective medium for isolation and enumeration of oral lactobacilli. *J Dent Res*, 30 (5):682-689.
175. Rogosa M, Wiseman RF, Mitchell JA, Disraely MN, Beaman AJ. 1953. Species differentiation of oral lactobacilli from man including description of *Lactobacillus salivarius* nov spec and *lactobacillus Cellobiosus* nov spec. *J Bacteriol*, 65 (6):681-699.
176. Russell JI, MacFarlane TW, Aitchison TC, Stephen KW, Burchell CK. 1991. Prediction of caries increment in Scottish adolescents. *Community Dent Oral Epidemiol*, 19 (2):74-77.
177. Satou N. 1992. Acidogenicity of streptococci grown at different chemostat pH conditions. *J Dent Res*, 70 ((Spec Issue) P1748):122.
178. Saxer UP, Mühlemann HR. 1975. Motivation und Aufklärung. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*, 85 (9):905-919.
179. Scannapieco FA. 1994. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med*, 5 (3-4):203-248.
180. Scharff S. 2004. Zur Bacteriocinproduktion von Mutans- und oralen Streptokokken [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
181. Schilling KM, Bowen WH. 1992. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect Immun*, 60 (1):284-295.
182. Schneider H, Hrsg. 1998. *Plaque*. Erste Aufl. Linnich: Apollonia Verlag.
183. Scully CM. 1980. Comparative opsonic activity for *Streptococcus mutans* in oral fluids, and phagocytic activity of blood, crevicular, and salivary polymorphonuclear leucocytes in rhesus monkeys. *Immunology*, 39 (1):101-107.
184. Scully CM, Russell MW, Lehner T. 1980. Specificity of opsonizing antibodies to antigens of *Streptococcus mutans*. *Immunology*, 41 (2):467-473.
185. Seow WK. 1991. Enamel hypoplasia in the primary dentition: a review. *ASDC J Dent Child*, 58 (6):441-452.
186. Seppä L, Luoma H, Forss H, Spets-Happonen S, Markkanen S, Pelkonen K. 1989. Invasion of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus salivarius* in early caries lesions of gnotobiotic rats. *Caries Res*, 23 (5):371-374.
187. Shovlin FE, Gillis RE. 1972. Biochemical and antigenic studies of lactobacilli isolated from deep dentinal caries. II. Antigenic aspects. *J Dent Res*, 51 (2):583-587.

188. Sims W. 1961. Taxonomy of streptococcus mutans. In: Coykendall AL, Gustafson KB, Hrsg. Microbiology and Immunology of streptococcus mutans. Erste Aufl. Amsterdam: Elsevier Science Publisher,
189. Smith DJ, Taubmann MA. 1991. Association of specific host immun factors with dental caries experience. In: Johnson NW, Hrsg. Risk markers for oral diseases. Erste Aufl. Cambridge: Cambridge Univ Pr, 341-357.
190. Smith SI, Awesh AJ, Coker AO, Savage KO, Abosede DA, Oyedeji KS. 2001. Lactobacilli in human dental caries and saliva. Microbios, 105 (411):77-85.
191. Spatafora G, Rohrer K, Barnard D, Michalek S. 1995. A Streptococcus mutans mutant that synthesizes elevated levels of intracellular polysaccharide is hypercariogenic in vivo. Infect Immun, 63 (7):2556-2563.
192. Splieth C. 1998. Site-spezifisches Kariesrisikomanagement und bedarfsorientierte Prävention. In: Schneider H, Hrsg. Plaque. Erste Aufl. Linnich: Apollonia Verlag, 179-188.
193. Steiner M, Menghini G, Curilovic Z, Marthaler T. 1994. Der Kariesbefall der Schüler der Stadt Zürich im Zeitraum 1970-1993. Schweiz Monatsschr Zahnmed, 104 (10):1210-1218.
194. Stephan RM. 1944. Intra-oral hydrogen-ion concentrations associated with dental caries activity. J Dent Res, 23:257-266.
195. Sterba C. 2002. Präventionsmaßnahmen bei primär gesunden Jenaer Vorschulkindern - Eine klinisch-mikrobiologisch kontrollierte Studie [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
196. Stiles HM, Meyers R, Brunelle JA, Witig AR. 1976. Occurrence of Streptococcus mutans and Streptococcus sanguis in the oral cavity and feces of young children. In: Stiles HM, Loesche WJ, O'Brien TC, Hrsg. Proceedings: microbial aspects of dental caries. Erste Aufl. Washington DC: 187-199.
197. Stößer L. 1988. Die kariogene Bedeutung der acidogenen und acidurischen Eigenschaften des Streptococcus mutans. Stomatol, 38 (10):679-683.
198. Stößer L. 1998. Nichtbakterielle Parameter des Speichels als Instrument zum Kariesrisikomanagment. In: Schneider H, Hrsg. Plaque. Erste Aufl. Linnich: Apollonia Verlag, 53-82.
199. Stößer L, Katzmann M, Grosser W. 1989. Die acidurischen Eigenschaften des Streptococcus mutans. Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl, 77 (6):576-577.
200. Stößer L, Tietze W, Heinrich-Weltzien R, Kneist S, Schumann V, Möller M, Busse H. 1998. Studiendesign und Repräsentativität der Erfurter Kariesrisikostudie mit Schülern der ersten und fünften Klasse. In: Stößer L, Hrsg. Kariesdynamik und Kariesrisiko. Erste Aufl. Berlin: Quintessenz, 168-178.

201. Stürcke R. 2001. Präventionsmaßnahmen bei Erfurter Vorschulkindern - Eine klinisch-mikrobiologische Untersuchung [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
202. Sullivan A, Borgstrom MK, Granath L, Nilsson G. 1996. Number of mutans streptococci or lactobacilli in a total dental plaque sample does not explain the variation in caries better than the numbers in stimulated whole saliva. *Community Dent Oral Epidemiol*, 24 (3):159-163.
203. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. 1982. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol*, 11 (1):1-17.
204. Tanzer J. 1989. On changing the cariogenic chemistry of coronal plaque. *J Dent Res*, 68:1576-1587.
205. Tanzer J, Freedman ML, Woodiel F, Eifert R, Rhinehimer L. 1976. Association of *Streptococcus mutans* virulence with synthesis of intracellular polysaccharide. In: Stiles HM, Loesche WJ, O'Brien TC, Hrsg. *Proceedings: microbial aspects of dental caries*. Erste Aufl. Washington DC: IRI, 597-616.
206. Tenovuo J, Aaltonen AS. 1991. Antibody responses to mutans streptococci in children. *Proc Finn Dent Soc*, 87 (4):449-461.
207. Tenovuo J, Hakkinen P, Paunio P, Emilson CG. 1992. Effects of chlorhexidine-fluoride gel treatments in mothers on the establishment of mutans streptococci in primary teeth and the development of dental caries in children. *Caries Res*, 26 (4):275-280.
208. Togelius J, Kristoffersson K, Anderson H, Bratthall D. 1984. *Streptococcus mutans* in saliva: intraindividual variations and relation to the number of colonized sites. *Acta Odontol Scand*, 42 (3):157-163.
209. Turesky S, Gilmore ND, Glickman I. 1970. Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C. *J Periodontol*, 41 (1):41-43.
210. Twetman S. 1998. Site-spezifische Bestimmung von *Streptococcus mutans* und gezielte Behandlung mit antibakteriellem Lack. In: Schneider H, Hrsg. *Plaque*. Erste Aufl. Linnich: Apollonia Verlag, 145-153.
211. Vacca-Smith AM, Venkitaraman AR, Schilling KM, Bowen WH. 1996. Characterization of glucosyltransferase of human saliva adsorbed onto hydroxyapatite surfaces. *Caries Res*, 30 (5):354-360.
212. van Houte J, Russo J. 1985. Effect of oral nutrient limitation of gnotobiotic rats on acidogenic properties of dental plaque formed by oral streptococci. *J Dent Res*, 64 (5):815-817.
213. van Houte J, Russo J, Proatak KS. 1989. Increased pH-lowering ability of *Streptococcus mutans* cell masses associated with extracellular glucan-rich matrix material and the mechanisms involved. *J Dent Res*, 68 (3):451-459.

214. van Lunsen DM, de Soet JJ, Weerheijm KL, Groen HJ, Veerkamp JS. 2000. Effects of dental treatment and single application of a 40% chlorhexidine varnish on mutans Streptococci in young children under intravenous anaesthesia. *Caries Res*, 34 (3):268-274.
215. Wallman C, Krasse B. 1993. A simple method for monitoring mutans streptococci in margins of restorations. *J Dent*, 21 (4):216-219.
216. Weißig H, Scheibe L, Thieme R, Hobert R, Hofer N. 2003. GKV: Ausgaben für zahnärztliche Behandlung. In: Kassenzahnärztliche-Bundesvereinigung, Hrsg. KZBV Jahrbuch 2003: Statistische Basisdaten zur vertragszahnärztlichen Versorgung. Vierte Aufl. Köln: 58.
217. Westergren G, Krasse B. 1978. Evaluation of a Micromethod for Determination of Streptococcus mutans and Lactobacillus infection. *J Clin Microbiol*, 7 (1):82-83.
218. WHO. 1987. Basic Methods. In: WHO, Hrsg. Oral health surveys. Dritte Aufl. Geneva: World Health Organization,
219. Wijeyeweera RL, Kleinberg I. 1989. Acid-base pH curves in vitro with mixtures of pure cultures of human oral microorganisms. *Arch Oral Biol*, 34 (1):55-64.
220. Wright JT, Cutter GR, Dasanayake AP, Stiles HM, Caufield PW. 1992. Effect of conventional dental restorative treatment on bacteria in saliva. *Community Dent Oral Epidemiol*, 20 (3):138-143.

9 Anhang

Tabellen

Tab. 1: Kalibrierung zur Ablesung der Dentocult[®]-SM-Befunde (n = 75)

Dentocult[®] SM	Untersucher K			
	0	1	2	3
Untersucher R				
0	24	4		
1	10	11	1	
2		2	15	2
3			1	5

Tab. 2: Kalibrierung zur Ablesung der Dentocult[®]-LB-Befunde (n = 74)

Dentocult[®] LB	Untersucher K			
	1	2	3	4
Untersucher R				
1	22	1		
2	5	23	1	
3		2	11	
4			3	5

Tab. 3: Kalibrierung zur Ablesung der CRT[®] *bacteria*-SM-Befunde (n = 42)

CRT [®] <i>bacteria</i> SM	Untersucher K			
	0	1	2	3
Untersucher R				
0	14	7		
1	5	9	1	
2			4	1
3				1

Tab. 4: Kalibrierung zur Ablesung der CRT[®] *bacteria*-LB-Befunde (n = 42)

CRT [®] <i>bacteria</i> LB	Untersucher K			
	1	2	3	4
Untersucher R				
1	12			
2	8	10		
3		2	6	
4			1	3

Tab. 5: log CFU pro ml einer 24-stündigen Kultur ausgewählter Streptokokken auf MSB- und MS41B-Agar nach Laurisch (n = 3 Versuchsserien)

Agar	log CFU pro ml Keimsuspension $\bar{x} \pm SD$					
	Original	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
<i>S. mutans</i>						
NCTC 10449						
MSB	5.6821 ±0.9620	4.6821 ±0.9620	3.6821 ±0.9620	2.6821 ±0.9620	1.6821 ±0.9620	0.6821 ±0.9620
MS41B	6.1501 ±0.8194	5.1501 ±0.8194	4.1501 ±0.8194	3.1501 ±0.8194	2.1501 ±0.8194	1.1501 ±0.8194
<i>S. sobrinus</i>						
OMZ 65						
MSB	3.883 ±0.7990	2.883 ±0.7990	1.883 ±0.7990	0.883 ±0.7990	0.0883 ±0.7990	0.0088 ±0.7990
MS41B	4.9826 ±0.6507	3.9826 ±0.6507	2.9826 ±0.6507	1.9826 ±0.6507	0.9826 ±0.6507	0.0982 ±0.6507
<i>S. sobrinus</i>						
OMZ 176						
MSB	6.5748 ±0.2135	5.5748 ±0.2135	4.5748 ±0.2135	3.5748 ±0.2135	2.5748 ±0.2135	1.5748 ±0.2135
MS41B	7.2231 ±0.2930	6.2231 ±0.2930	5.2231 ±0.2930	4.2231 ±0.2930	3.2231 ±0.2930	2.2231 ±0.2930

Tab. 6: Keimzahlklassen einer 24-stündigen Kultur und ihrer Verdünnungsstufen von *S. mutans* NCTC 10449 auf dem CRT® *bacteria* bei unterschiedlicher Verimpfung in Beziehung zur konventionell bestimmten Keimzahl auf MS41B-Agar (Laurisch) (n = 3 Versuchsserien)

	log CFU pro ml Keimsuspension $\bar{x} \pm SD$					
	Original	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
MS41B Agar						
MS41B	6.1501 ±0.8194	5.1501 ±0.8194	4.1501 ±0.8194	3.1501 ±0.8194	2.1501 ±0.8194	1.1501 ±0.8194
<i>Keimzahl- klasse</i>	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Holzspatel ¹	2 1	2 1	3	2 1	2 1	3
Pinsel ¹	2 1	2 1	3	2 1	2 1	3

¹ Häufigkeit der Keimzahlklasse

Tab. 7: Keimzahlklassen einer 24-stündigen Kultur und ihrer Verdünnungsstufen von *S. sobrinus* OMZ 65 auf dem CRT® *bacteria* bei unterschiedlicher Verimpfung in Beziehung zur konventionell bestimmten Keimzahl auf MS41B-Agar (Laurisch) (n = 3 Versuchsserien)

MS41B Agar	log CFU pro ml Keimsuspension $\bar{x} \pm SD$					
	Original	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
MS41B	4.9826 ±0.6507	3.9826 ±0.6507	2.9826 ±0.6507	1.9826 ±0.6507	0.9826 ±0.6507	0.0982 ±0.6507
<i>Keimzahl- klasse</i>	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Holzspatel ¹	1 2	1 2	2 1	2 1	1 2	2 1
Pinsel ¹	1 2	1 2	2 1	2 1	1 2	2 1

¹ Häufigkeit der Keimzahlklasse

Tab. 8: Keimzahlklassen einer 24-stündigen Kultur und ihrer Verdünnungsstufen von *S. sobrinus* OMZ 176 auf dem CRT® *bacteria* bei unterschiedlicher Verimpfung in Beziehung zur konventionell bestimmten Keimzahl auf MS41B-Agar (Laurisch) (n = 3 Versuchsserien)

	log CFU pro ml Keimsuspension $\bar{x} \pm SD$					
	Original	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
MS41B Agar						
MS41B	7.2231 ±0.2930	6.2231 ±0.2930	5.2231 ±0.2930	4.2231 ±0.2930	3.2231 ±0.2930	2.2231 ±0.2930
<i>Keimzahl- klasse</i>	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3	0 1 2 3
Holzspatel ¹	3	3	3	1 2	3	2 1
Pinself ¹	3	3	3	1 2	1 2	2 1

¹ Häufigkeit der Keimzahlklasse

Tab. 9: Skalierung der SM-Keimzahlklassen des CRT® *bacteria* bei Verimpfung der Keimsuspension von ausgewählten Streptokokken mit einem Pinsel

Stamm	Caries Risk Test - Keimzahlklassen			3	Niedriges Risiko 0 und 1	Hohes Risiko 2 und 3
	0	1	2			
S. mutans NCTC 10449	1.7990 ±0.9700 (n = 7)	3.8416 ±0.7994 (n = 5)	5.2857 ±0.8351 (n = 4)	6.3789 ±0.7071 (n = 2)	2.6501 ±1.3608 (n = 12)	5.6501 ±0.9149 (n = 6)
S. sobrinus OMZ 65	0.2666 ±0.3565 (n = 3)	1.4826 ±0.7730 (n = 6)	3.4711 ±0.8640 (n = 5)	4.6348 ±0.8973 (n = 4)	1.0773 ±0.8803 (n = 9)	3.9883 ±1.0252 (n = 9)
S. sobrinus OMZ 176	2.5758 ±0.7787 (n = 3)	3.2580 ±0.8761 (n = 4)	4.7837 ±0.6583 (n = 5)	6.7231 ±0.6072 (n = 6)	2.9656 ±0.8478 (n = 7)	5.8416 ±1.1762 (n = 11)
Σ	1.6247 ±1.1392 (n = 13)	2.7424 ±1.3222 (n = 15)	4.4583 ±1.0724 (n = 14)	5.9697 ±1.1919 (n = 12)	2.2234 ±1.3437 (n = 28)	5.1559 ±1.3466 (n = 26)

Tab. 10: Skalierung der SM-Keimzahlklassen von Dentocult® SM bei Verimpfung der Keimsuspension von ausgewählten Streptokokken mit einem Pinsel

Stamm	Caries Risk Test - Keimzahlklassen			Niedriges Risiko 0 und 1	Hohes Risiko 2 und 3	
	0	1	2			3
S. mutans NCTC 10449	1.5652 ±1.139 (n=7)	3.1401 ±1.1345 (n=5)	5.1584 ±1.3092 (n=4)	5.2295 ±0.2300 (n=2)	2.2213 ±1.3538 (n=12)	5.1821 ±1.0200 (n=6)
S. sobrinus OMZ 65	0.0242 ±0.0289 (n=4)	0.7674 ±0.5972 (n=6)	2.7163 ±0.6759 (n=6)	4.2708 ±0.7071 (n=2)	0.4701 ±0.5880 (n=10)	3.1050 ±0.9568 (n=8)
S. sobrinus OMZ 176	2.0748 ±0.5801 (n=6)	3.5748 ±0.2135 (n=3)	4.5748 ±0.2135 (n=3)	6.0748 ±0.5801 (n=6)	2.5748 ±0.8855 (n=9)	5.5748 ±0.8855 (n=9)
Σ	1.3824 ±1.1167 (n=17)	2.2164 ±1.5044 (n=14)	3.8966 ±1.4031 (n=13)	5.5449 ±0.9046 (n=10)	1.7590 ±1.3505 (n=31)	4.6133 ±1.4514 (n=23)

Tab. 11: log CFU pro ml einer 48-stündigen Kultur ausgewählter Laktobazillen auf Rogosa-Agar nach Difco und Mast (n = 3 Versuchsserien)

Rogosa-Agar	log CFU pro ml Keimsuspension $\bar{x} \pm SD$						
	Original	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
<i>L. plantarum</i> IMET 10691							
Madaus/Mast	7.5934 ± 0.2164	6.5934 ± 0.2164	5.5934 ± 0.2164	4.5934 ± 0.2164	3.5934 ± 0.2164	2.5934 ± 0.2164	1.5934 ± 0.2164
Difco	7.6356 ± 0.2533	6.6356 ± 0.2533	5.6356 ± 0.2533	4.6356 ± 0.2533	3.6356 ± 0.2533	2.6356 ± 0.2533	1.6356 ± 0.2533
<i>L. casei</i> IMET 10692							
Madaus/Mast	7.5904 ± 0.4500	6.5904 ± 0.4500	5.5904 ± 0.4500	4.5904 ± 0.4500	3.5904 ± 0.4500	2.5904 ± 0.4500	1.5904 ± 0.4500
Difco	7.5279 ± 0.2833	6.5279 ± 0.2833	5.5279 ± 0.2833	4.5279 ± 0.2833	3.5279 ± 0.2833	2.5279 ± 0.2833	1.5279 ± 0.2833
<i>L. paracasei ss</i> <i>paracasei</i> E50/242							
Madaus/Mast	7.6710 ± 0.0644	6.6710 ± 0.0644	5.6710 ± 0.0644	4.6710 ± 0.0644	3.6710 ± 0.0644	2.6710 ± 0.0644	1.6710 ± 0.0644
Difco	7.4589 ± 0.0154	6.4589 ± 0.0154	5.4589 ± 0.0154	4.4589 ± 0.0154	3.4589 ± 0.0154	2.4589 ± 0.0154	1.4589 ± 0.0154

Tab. 12: Keimzahlklassen einer 48-stündigen Kultur und ihrer Verdünnungsstufen von *L. plantarum* IMET 10691 auf dem CRT[®] bacteria bei unterschiedlicher Verimpfung in Beziehung zur konventionell bestimmten Keimzahl auf Rogosa-Agar (Mast) (n = 3 Versuchsserien)

Rogosa-Agar	log CFU pro ml Keimsuspension $\bar{x} \pm SD$					
	Original	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵ 10 ⁻⁶
Madaus/ Mast	7.5934 ± 0.2164	6.5934 ± 0.2164	5.5934 ± 0.2164	4.5934 ± 0.2164	3.5934 ± 0.2164	2.5934 ± 0.2164 1.5934 ± 0.2164
<i>Keimzahl- klasse</i>	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4
Holzspatel¹	3	3	3	3	3	3
Pinsel¹	3	3	3	3	3	3

¹ Häufigkeit der Keimzahlklasse

Tab. 13: Keimzahlklassen einer 48-stündigen Kultur und ihrer Verdünnungsstufen von *L. casei IMET 10692* auf dem CRT[®] *bacteria* bei unterschiedlicher Verimpfung in Beziehung zur konventionell bestimmten Keimzahl auf Rogosa-Agar (Mast) (n = 3 Versuchsserien)

Rogosa-Agar	log CFU pro ml Keimsuspension $\bar{x} \pm SD$					
	Original	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵ 10 ⁻⁶
Madaus/ Mast	7.5904 ± 0.4500	6.5904 ± 0.4500	5.5904 ± 0.4500	4.5904 ± 0.4500	3.5904 ± 0.4500	2.5904 ± 0.4500 1.5904 ± 0.4500
<i>Keimzahl- klasse</i>	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4
Holzpatel¹	3	3	3	3	3	3
Pinsel¹	3	3	3	3	3	3

¹ Häufigkeit der Keimzahlklasse

Tab. 14: Keimzahlklassen einer 48-stündigen Kultur und ihrer Verdünnungsstufen von *L. paracasei ss paracasei E50/242* auf dem CRT[®] *bacteria* bei unterschiedlicher Verimpfung in Beziehung zur konventionell bestimmten Keimzahl auf Rogosa-Agar (Mast) (n = 3 Versuchsserien)

Rogosa-Agar	log CFU pro ml Keimsuspension $\bar{x} \pm SD$					
	Original	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵ 10 ⁻⁶
Madaus/ Mast	7.6710 ± 0.0644	6.6710 ± 0.0644	5.6710 ± 0.0644	4.6710 ± 0.0644	3.6710 ± 0.0644	2.6710 ± 0.0644 1.6710 ± 0.0644
<i>Keimzahl- klasse</i>	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4
Holzspatel¹	3	3	3	2 1	2 1	2 1 3
Pinsel¹	3	3	3	2 1	3	3 3

¹ Häufigkeit der Keimzahlklasse

Tab. 15: Skalierung der LB-Keimzahlklassen des CRT® *bacteria* bei Verimpfung der Keimsuspension von ausgewählten Laktobazillen mit einem Pinsel

Stamm	Caries Risk Test - Keimzahlklassen				Niedriges Risiko 1 und 2	Hohes Risiko 3 und 4
	1	2	3	4		
L. plantarum IMET 10691	2.0934 ±0.5809 (n = 6)	3.5934 ±0.2164 (n = 3)	4.5934 ±0.2164 (n = 3)	6.5934 ±0.8861 (n = 9)	2.5934 ±0.8861 (n = 9)	6.0934 ±1.1822 (n = 12)
L. casei IMET 10692	2.0904 ±0.6796 (n = 6)	3.5904 ±0.4499 (n = 3)	4.5904 ±0.4499 (n = 3)	6.5904 ±0.9496 (n = 9)	2.5904 ±0.9496 (n = 9)	6.0904 ±1.2292 (n = 12)
L. paracasei ss para- casei E50/242	2.1710 ±0.5507 (n = 6)	3.6710 ±0.0644 (n = 3)	4.7073 ±0.0201 (n = 2)	6.4638 ±1.0483 (n = 10)	2.6710 ±0.8678 (n = 9)	6.1710 ±1.1690 (n = 12)
Σ	2.1183 ±0.5708 (n = 18)	3.6183 ±0.2548 (n = 9)	4.6208 ±0.2722 (n = 8)	6.5461 ±0.9328 (n = 28)	2.6183 ±0.6873 (n = 27)	6.1183 ±1.1598 (n = 36)

Tab. 16: Pilotstudie: Antworten der Eltern im Fragebogen zur Allgemeinanamnese und zur Mundhygiene der Kinder, Patient 1 bis 7

Pat.-Nr.	Allgemeinerkrankungen	Stillzeit	Fluorid in der Schwangerschaft	Antibiotika-einnahme	Dauer der Flaschen-ernährung	Teeflasche	Putzfrequenz pro Tag
1	Harnwegserkrankung mit 4 Monaten	8 Monate	nein	vor 4 Monaten	2 Jahre	ja	2 mal
2	keine	3 Monate	ja	keine	9 Monate	?	2 mal
3	Herzkrankung	1 Monat	nein	vor 1 Jahr	3 Jahre	ja	2 mal
4	keine	4 Monate	ja	keine	2 Jahre	ja	2 mal
5	keine	3 Monate	nein	vor 1 Jahr	1 Jahr	ja	2 mal
6	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine	keine Angabe	ja	2 mal
7	Bronchitis, Pseudo-Krupp	1 Monat	nein	vor 1 Jahr	1 Jahr	ja	3 mal

Tab. 17: Pilotstudie: Antworten der Eltern im Fragebogen zu Ernährungsgewohnheiten und zur Mundhygiene der Kinder; Patient 1 bis 7

Pat.-Nr.	Zahnpaste	Zahnbürsten- wechsel	Putzkontrolle durch Eltern	Häufigkeit süßer Zwischenmahlzeiten	fluoridiertes Speisesalz	Elmex- Gelee	Fluoridierung beim ZA
1	Kinderzahnpaste	6-8 Wochen	manchmal	sehr häufig!	ja	1x/ Woche	nein
2	Kinderzahnpaste	4-6 Wochen	manchmal	normaler Bereich	ja	1x/ Woche	nein
3	Kinderzahnpaste	alle 3 Monate	manchmal	häufig Gummibärchen	ja	1x/ Monat	nein
4	Kinderzahnpaste	2-3 Wochen	immer	häufig, Kaubonbons	nein	nein	nein
5	Kinderzahnpaste	4-5 Monate	manchmal	häufig, beim Fernsehen	ja	nein	nein
6	Erwachsenen- zahnpaste	4-6 Wochen	manchmal	zum Kaffee	ja	ja	nein
7	Erwachsenen- zahnpaste	alle 2 Monate	manchmal	2x pro Woche	ja	nein	nein

ZA = Zahnarzt

Tab. 18: Pilotstudie: intraoraler Befund, Plaqueindex nach Quigley und Hein (QH) und Papillenblutungsindex (PBI) der Patienten 1 bis 7

Pat.-Nr.	Anzahl der Füllungen	defekte Füllungen	Füllungs-material	kariöse Läsionen	Initialkaries	Anzahl Milchzähne	Anzahl bleib. Zähne	PBI	QHI
1	4	3	IRM/ GIZ	1	3	20	2	24	1,9
2	3	0	IRM	1	0	16	6	38	2,8
3	0	0	-	-	1	16	8	8	0,5
4	0	0	-	1	0	15	8	18	1,7
5	2	0	GIZ	0	0	16	6	38	2,9
6	2	0	AM	2	0	14	7	9	2,1
7	8	0	IRM	0	2	12	10	28	2,7

IRM = provisorische Füllung

AM = Amalgam

GIZ = Glasionomerzement

Tab. 19: Pilotstudie: Einzelbefunde der ersten Molaren, Patient 1 bis 7

Pat.-Nr.	dunkle Verfärbung			kreibige Verfärbung			sichtbare Plaque			Fissurenrelief							
	16	26	36	46	16	26	36	46	16	26	36	46	16	26	36	46	
1	-	-	nein	nein	-	-	nein	ja	-	-	nein	ja	-	-	nein	ja	tief
2	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	tief
3	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	ja	tief
4	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	flach
5	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	flach
6	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	flach
7	nein	nein	ja	nein	ja	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	ja	nein	ja	ja	tief

Tab. 20: Pilotstudie: Mikrobiologischer Einzelbefund an den Sechs-Jahr-Molaren und Gesamtspeichelbefund von Mutans-Streptokokken (MS) und Laktobazillen (LB) auf den Kultursystemen Dentocult[®]SM Strip mutans, Dentocult[®] LB und CRT[®]bacteria; Patient Nr. 1 bis 7

Pat.-Nr.	Keimzahlklasse MS			Keimzahlklasse MS			Keimzahlklasse LB			Keimzahlklasse LB			Gesamtspeichelbefund					
	Dentocult [®]	CRT [®] bacteria	MS	Dentocult [®]	CRT [®] bacteria	MS	Dentocult [®]	CRT [®] bacteria	LB	Dentocult [®]	CRT [®] bacteria	LB	Dentocult [®]	CRT [®] -MS	Dentocult [®]	CRT [®] -LB		
	16	26	36	46	16	26	36	46	16	26	36	46	16	26	36	46		
1	-	-	2	3	-	-	2	3	-	-	4	1	-	-	4	1	3/3	3/4
2	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	3/3	3/3
3	2	2	2	3	2	2	2	3	4	1	2	1	3	1	2	1	3/3	1/1
4	1	0	0	1	0	0	0	0	1	2	1	1	1	2	1	1	0/0	3/3
5	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	2/3	3/3
6	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	1	1	1	1	1	1	3/3	4/3
7	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	1	2	3	3	1	3/3	4/4

Ethik-Antrag - Pilotstudie



UNIVERSITÄTSKLINIKUM · MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN

CHARITÉ · D-13344 BERLIN

Herrn
Dr. Finke
Campus Virchow-Klinikum
Zentrum für Zahnheilkunde
Abt. Kinderzahnmedizin
Augustenburger Platz 1

13353 Berlin

**Ethik-Kommission
Der Vorsitzende
Campus Virchow-Klinikum**

Telefon: (0 30) 450-76108
Telefax: (0 30) 450-76988
e-mail: karin.knop@charite.de

E/Kn

25. November 1999

Betrifft: „Mikrobiologische Bestimmung des Kariesrisikos mittels Keimzahlbestimmung der Approximalplaque mit einer zuvor im Labor erprobten neuen Plaqueentnahmetechnik und dem CRT (Vivadent)“

Antrags.-Nr.: 157/99

Beachten Sie bitte, daß eine weitere Bearbeitung nur mit Angabe der entsprechenden Antrags-Nr. erfolgen kann.

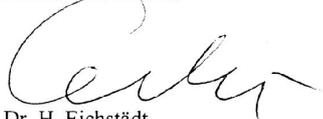
Sehr geehrter Herr Doktor Finke,

Nach ausführlicher Diskussion faßt die Ethik-Kommission folgenden Beschluß:

Die Ethik-Kommission hält das Studienvorhaben vorbehaltlich des Einganges der folgenden Nachbesserungen für ethisch vertretbar:

- S. 7: In der Einwilligungserklärung fehlt die Datennutzung und das Rücktrittsrecht.
- S. 8: Es fehlt der Inhalt der Studie sowie das Rücktrittsrecht.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. H. Eichstädt
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Virchow-Klinikum
Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin
An den Dekan: Ethikkomitee
z. Hd. Frau Knoop
Augustenburger Platz 1
13353 Berlin

Berlin, den 21.10.1999

A Allgemeine Formalitäten

1. Bezeichnung des Vorhabens

Mikrobiologische Bestimmung des Kariesrisikos mittels Keimzahlbestimmung der Approximalplaque mit einer zuvor im Labor erprobten neuen Plaqueentnahmetechnik und dem CRT (Vivadent)

2. Verantwortliche Leiter des Vorhabens

OA Dr. med. dent. Christian Finke,
cand. med. dent. Anke Richter

3. Klinische Prüfung

Entfällt, da keine Arzneimittelprüfung

4. Namen, Anschriften und Tätigkeiten der bei der Planung, Durchführung und Auswertung beteiligten Ärzte und Wissenschaftler

- OA Dr. med. dent. Christian Finke
Leiter der Abteilung Kinderzahnmedizin, Zentrum für Zahnmedizin, Medizinische Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin
- Anke Richter, Doktorandin, Abteilung Kinderzahnmedizin, Zentrum für Zahnmedizin

5. Stellungnahme des ärztlichen Abteilungsleiters

Es liegt im Interesse der Abteilung für Kinderzahnmedizin und Primärprophylaxe Forschung in bezug auf Kariesrisikotests durchzuführen, um frühzeitiges Erkennen von Karies zu ermöglichen und damit verbunden gezielte Prophylaxe und Therapie betreiben zu können. Die angestrebte Untersuchung bietet vielfältige Möglichkeiten, die Ergebnisse besonders auf sehr kleine Patienten zu übertragen. Sie sind in den meisten Fällen nicht in der Lage, aktivierte Speichelproben abzugeben.

6. Drittmittelfinanzierung

Die geplante Studie wird von der Firma Vivadent finanziert, dem Klinikum entstehen keine Kosten.

7. Anderweitige Antragstellung

In gleicher Sache wurde kein weiterer Ethikantrag gestellt.

B Untersuchungsplan

1. Ziel des Vorhabens, konkrete Fragestellung bzw. Hypothesen

In einer vorhergehenden Studie wurde der Speicheltest der Firma Vivadent hinsichtlich der Anwendung mit einer neuen Plaquentnahmetechnik *in vitro* geprüft. In der nun geplanten Untersuchung soll diese Technik auch klinisch erprobt werden.

Der CRT (Caries Risk Test) ist ein bereits in der Praxis anerkannter Chair-side-Test. Er dient zur Ermittlung der Streptokokken- und Laktobazillenzahlen im Speichel und stellt somit ein Frühwarnsystem zum Erkennen eines hohen Kariesrisikos dar. Kariesrisikostudien belegen, daß Kinder mit hohen Mutans-Streptokokken- und Laktobazillenzahlen im Speichel innerhalb von 2 Jahren im Mittel vier neue kariöse Flächen entwickelten [1].

Bisher wurde der Test auf den gesamten Mundbereich angewandt, d. h.: Der Patient mußte auf einem Stück Paraffin eine gewisse Zeit kauen, um die Speichelsekretion anzuregen und um die Bakterien gleichzeitig durch das Kauen in den Speichel zu überführen. Der Speichel wurde in einem Gefäß gesammelt. Nachfolgend wurden die Agarträger des Chair-side-Tests mit dem Speichel beimpft.

Das Kultursystem wurde 48 Stunden bebrütet und danach anhand eines Modelchart abgelesen bzw. es wurde eine Risikoprognose vorgenommen.

Das Ergebnis der herkömmlichen Anwendung des Tests war auf alle Zähne im Mund des Patienten bezogen und ließ keine Schlußfolgerung auf eine bestimmte Lokalisation hoher oder niedriger Keimzahlen zu.

Die Tatsache, daß ein eindeutiger Zusammenhang zwischen einer hohen Besiedlung einer Zahnoberfläche mit Mutans Streptokokken und/oder Laktobazillen und der Entwicklung bzw. dem Fortschreiten einer Karies besteht, wurde bereits vielfach belegt [2, 3] und soll nicht Grundlage dieser Untersuchung sein.

Ziel dieser Arbeit ist die Verwendung des CRT zur Plaquekultivierung aus dem Approximalraum im Vergleich zur Speicheluntersuchung. Ist das Verfahren erfolgreich, wird man gezielt die stark besiedelten Zahnoberflächen identifizieren können und damit die Möglichkeit haben, mit prophylaktischen Maßnahmen Problemzonen bedarfsgerecht zu therapieren.

Hypothesen/Fragen

- a) Besteht eine Übereinstimmung der Keimzahlklassen in bezug auf die Keime Mutans Streptokokken beim Pinselabstrich aus dem Approximalraum mit dem Speicheltest? Beide Kariesrisikotests werden mit dem CRT durchgeführt. Keimzahlen von weniger als 10^5 CFU (Colony forming units) werden als niedriges Kariesrisiko eingestuft, Keimzahlen über 10^5 CFU werden als hohes Kariesrisiko eingeschätzt.
- b) Korrelieren die klinisch aufgenommenen Befunde (DMFS der betroffenen Approximalflächen) mit den mikrobiologischen Ergebnissen?

2. Methodik

Untersuchungsmethode:

Bei den freiwilligen Probanden werden Plaqueproben mittels Pinsel aus den Approximalräumen aller 4 Quadranten entnommen. Der Pinselabstrich erfolgt zwischen den Zähnen 5 und 6. Die entnommenen Proben werden auf 2 CRTs verimpft (siehe In-vitro-Test). Zusätzlich wird auf herkömmliche Art der Speichelfluß mittels Paraffin stimuliert und eine Kariesrisikobestimmung durchgeführt. Anschließend erfolgt eine Untersuchung aller Zähne. Besondere Beachtung finden hier überstehende Füllungsrän­der, kariöse - und Initialläsionen (white spots). Die parodontale Gesundheit wird durch Taschentiefenmessung überprüft.

Statistik:

Zur Überprüfung der Übereinstimmung der beiden mikrobiologischen Untersuchungsverfahren wird das Kappa nach Cohen errechnet. Das Ausmaß der Korrelation zwischen dem DMFS und den Keimzahlen wird mit entsprechenden Korrelationskoeffizienten nach Pearson oder Spearman bestimmt.

Stichprobenumfangschätzung: $n = 30$ wurde nicht aus biometrischen Modellen errechnet, sondern aus Gründen der Praktikabilität festgelegt. Korrelationen und Cohen's Kappa sind bei einem $n = 30$ statistisch ausreichend interpretierbar.

3. Probandenauswahl

Einschlußkriterien:

- Personen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren, männliche und weibliche Individuen zu gleichen Teilen
- eine normale Mundhygiene (1-2 mal Zähneputzen pro Tag, nicht mehr)

Ausschlußkriterien:

- Benutzen von Zahnseide (nach der Untersuchung wird es den Personen empfohlen)
- Benutzen von Mundspülungen
- Benutzen von chlorhexidin­haltigen Zahnpasten und Spülungen
- Fluoridierung durch Fluorid-Gelées oder Duraphat-Lack innerhalb der letzten 3 Monate
- parodontalen Taschen von mehr als 5 mm (führt zum nachträglichen Ausschluß)

- Schwangere
- Personen, deren Eltern Zahnärzte sind
- Studenten der Zahnmedizin
- Personen mit Allgemeinerkrankungen, die das Untersuchungsergebnis verfälschen könnten (z. B.: Epilepsie, Stoffwechselerkrankungen, z. B. Diabetes, Erkrankungen der Schilddrüse etc.)
- Personen, die innerhalb der letzten 3 Monate eine Behandlung mit Antibiotika hatten.

4. Ablauf der Untersuchung (Design, Dauer)

siehe auch unter Methodik (B2)

Dauer: Ein Versuchsdurchlauf wird ca. 1 Stunde in Anspruch nehmen.

Die Untersuchung wird im Zentrum für Zahnmedizin in der Abteilung für Kinderzahnmedizin durchgeführt.

Die mikrobiologischen Speicheltests werden nach 48 Stunden Bebrütungszeit abgelesen und dann fachgerecht entsorgt (mit handelsüblichen Desinfektionslösungen [4]).

Nach der Auswertung wird jeder Proband schriftlich über die Ergebnisse informiert und über eine eventuelle Notwendigkeit einer Behandlung aufgeklärt. Eine Fluoridierung erfolgt bei allen Probanden als zusätzliche Prophylaxemaßnahme nach der Untersuchung. Anwendung von Zahnseide oder anderer approximaler Hygienehilfsmittel wird erklärt und bei Bedarf empfohlen.

5. Abbruchkriterien

Darlegung der Bedingungen, die zum vorzeitigen Abbruch der Untersuchung führen

- entfällt

C Spezielle Formalitäten

1. Art des Vorhabens

Heilversuch

Es handelt sich hierbei um ein Verfahren zur Diagnosesicherung mit dem Ziel, dem Probanden nach Ablauf der Untersuchung eine Einschätzung seines Gebißzustandes geben zu können, ihn weitergehenden diagnostischen Untersuchungen oder bei einer festgestellten kariösen Läsion einer Therapie zuzuführen. Ergänzende Empfehlungen zur Mundhygiene werden dem Probanden mit auf den Weg gegeben.

Humanexperiment

- entfällt

2. Folgende Bestimmungen finden Anwendung

- entfällt

3. Erprobungsmöglichkeiten

- entfällt

4. Klinische Prüfungen

- (a-e) entfallen

5. Komplikationen und Risiken

- keine

6. Einwilligungserklärung

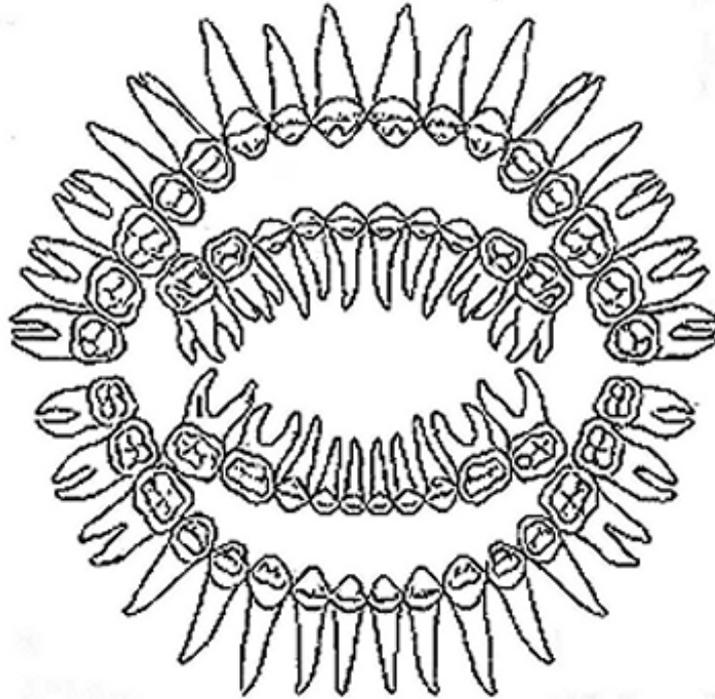
- siehe Anlage

7. Versicherung

- siehe Anlage

D Literatur

1. Kneist, S. et al., Mikrobiologische Speicheltests - mehr als eine Motivation? Quintessenz, 1998. 49(2): p. 139-148.
2. Lindquist, B. and Emilson, C.G., Distribution and Prevalence of Mutans Streptococci in the Human Dentition. J Dent Res, 1990. 69(5): p. 1160-1166.
3. Kritoffersson, K., Gröndahl, H.-G. and Bratthall, D., The More Streptococcus mutans, the More Caries on Approximal Surfaces. J Dent Res, 1985. 64(1): p. 58-61.
4. Kneist, S., Begleitphänomene in der mikrobiologischen Speicheldiagnostik. Oralprophylaxe, 1998. 20(4): p. 208-217.

Befundblatt - Pilotstudie

spezieller Befund an :

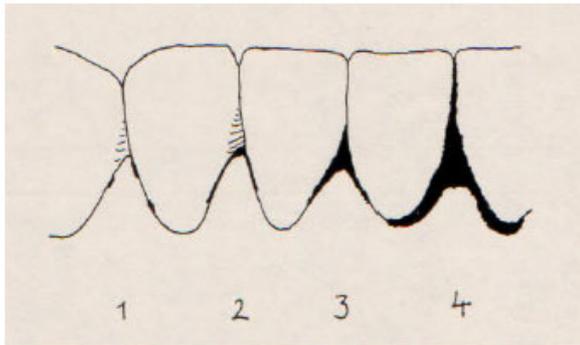
16: Okklusionsebene erreicht? _____ vollständiger Durchbruch: _____
 Fissuren verfärbt? _____ Fissuren entmineralisiert? _____
 Sichtbare Plaque? _____

26: Okklusionsebene erreicht? _____ vollständiger Durchbruch: _____
 Fissuren verfärbt? _____ Fissuren entmineralisiert? _____
 Sichtbare Plaque? _____

36: Okklusionsebene erreicht? _____ vollständiger Durchbruch: _____
 Fissuren verfärbt? _____ Fissuren entmineralisiert? _____
 Sichtbare Plaque? _____

46: Okklusionsebene erreicht? _____ vollständiger Durchbruch: _____
 Fissuren verfärbt? _____ Fissuren entmineralisiert? _____
 Sichtbare Plaque? _____

- Verzahnung (transversal)
 links: _____
 rechts: _____
- Flaches Höckerfissurenrelief steiles Höckerfissurenrelief
- Milchgebiss: primär lückig primär lückenlos
- Gingivitis: ja nein
- Speichel: Menge: _____
 Konsistenz: _____

PBI nach Saxer und Mühlemann 1975

Grad 0 = Keine Blutung

Grad 1 = Auftreten isolierte Blutpunkte

Grad 2 = Auftreten einer dünnen Blutlinie oder eines diskreten interdentalen Blutflecks

Grad 3 = das interdentale Dreieck füllt sich nach der Sondierung mit Blut

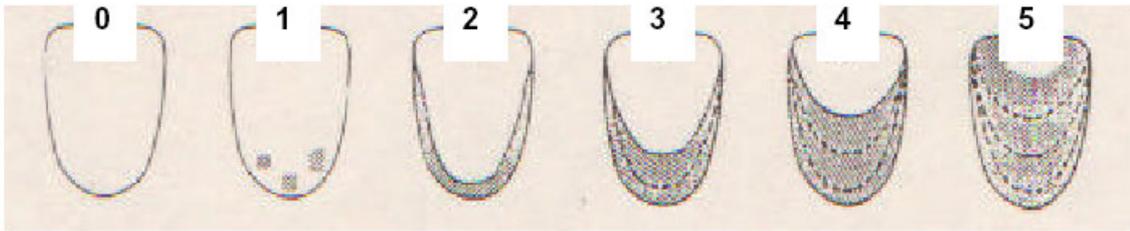
Grad 4 = profuse Blutung beim Sondieren, das Blut fließt sofort in den marginalen Sulkus

16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26
	55	54	53	52	51	61	62	63	64	65	
	85	84	83	82	81	71	72	73	74	75	
46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36

Bebrütung der Kultursysteme:

Beginn: Datum: _____ / _____ Uhr

Ende: Datum: _____ / _____ Uhr

Plaque-Index nach Quigley und Hein

16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26
	55	54	53	52	51	61	62	63	64	65	
	85	84	83	82	81	71	72	73	74	75	
46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36

PI (QH) = $\frac{\text{Summe der Bewertungsgrade}}{\text{Zahl der bewerteten Flächen}}$ = _____

Auswertung:

1. gezielte Plaqueentnahme mit einem Pinsel

Pinsel\Kkl	16a	16b	26a	26b	36a	36b	46a	46b
CRT - SM								
CRT - LB								
DentocultSM								
DentocultLB								

Untersucher a: Anke Richter

Untersucher b:

2. herkömmliche Speicheluntersuchung

Normal\Kkl	Untersucher a	Untersucher b
CRT - SM		
CRT - LB		
DentocultSM		
DentocultLB		

Patientenfragebogen - Pilotstudie

Bitte beantworten Sie die folgenden Fragen über die Gesundheit Ihres Kindes möglichst genau und leserlich! Vielen Dank!

Allgemeine Anamnese:

Allgemeinerkrankungen:

Allergien: _____

Kinderkrankheiten: _____

Erkrankungen in der Schwangerschaft: _____

Fluorid in der Schwangerschaft: ja nein

Stillzeit

bis: _____

Flaschenernährung

bis: _____

Bekam ihr Kind zwischendurch die Nuckelflasche (mit gesüßtem Tee oder Saft)?

Wie oft und wie lange?

1. Wie oft (*täglich, ein- oder zweimal pro Tag*) und wie lange putzt Ihr Kind seine Zähne?

2. Womit putzt Ihr Kind (Angabe der Zahnbüstenart und des Herstellers)?

3. Wie oft wird die Zahnbürste erneuert?

4. Welche Zahnpasta wird benutzt (Kinderzahnpasta oder für Erwachsene)?

5. Wie oft und in welchen Mengen isst oder trinkt ihr Kind Süßes oder stark zuckerhaltige Speisen und Getränke (auch Senf, Ketchup etc)?

Welche Art Süßes?

Wie oft und wieviel?

Putz ihr Kind danach die Zähne, oder benutzt es einen Zahnpflegekaugummi?

6. Benutzen Sie im Haushalt fluoridiertes Speisesalz?

7. Benutzt ihr Kind Elmex Gelee / Fluid

andere Fluoridierungsmöglichkeiten

_____?

wenn ja, wie oft?

8. Bekam Ihr Kind Fluoridtabletten?

nein ja seit _____; Dosierung: _____;

Unterbrechung: _____

9. Wie regelmäßig ist ihr Kind beim Zahnarzt?

10. Wurden die Zähne vom Zahnarzt fluoridiert ?

11. Wann hat Ihr Kind das letzte Mal Antibiotika eingenommen (z. B. Penicillin)

12. Kontrollieren Sie nach dem Zähneputzen ihres Kindes, ob alles sauber ist?

- nein
- ja, immer
- ja, manchmal

Färben Sie die Zähne dazu an? Ja Nein

Vielen Dank für Ihre Geduld! Die Auswertung der Daten erfolgt anonym! Über die Ergebnisse werden Sie selbstverständlich genauestens informiert!

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Richter, Anke
 Geburtsdatum: 02. Dezember 1975
 Geburtsort: Berlin-Mitte
 Nationalität: deutsch
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

1982-1990 Hans-Grundig-Oberschule, Berlin-Weißensee
 1990-1993 Paul-Oestreich-Gymnasium, Berlin-Weißensee
 1993-1995 Heinrich-Schliemann-Gymnasium, Berlin-Prenzlauerberg
 Juni 1995 Abitur

Studium:

10/1995-11/2000 Studium der Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät
 der Humboldt-Universität zu Berlin, Charité
 18.12.2000 Approbation als Zahnarzt

Berufstätigkeit:

01.01.2001 Assistenz Zahnarzt in der Zahnarztpraxis
 A. Pawandenat, Wandlitz
 01.09.2001 Assistenz Zahnarzt in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgischen Praxis Dr. med. Irina Brzenska, Berlin
 seit 03.04.2002 3-jährige Weiterbildung zum Fachzahnarzt für Oralchirurgie in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgischen Praxis Dr. med. Irina Brzenska, Berlin
 01.09.2003 Klinisches Jahr im Rahmen der Fachzahnarztausbildung in der Privatklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Prof. Dr. Dr. V. Strunz, am Hohenzollerndamm Berlin

Berlin, den 10. Mai 2004 Anke Richter

Danksagung

Frau Privat-Dozent Dr. Susanne Kneist danke ich für die Vergabe des Themas, für ihre fachliche Beratung bei der Vorbereitung und Durchführung der mikrobiologischen Untersuchungen sowie für ihr Engagement bei der Niederschrift der Arbeit. Mein besonderer Dank gilt auch Frau Privat-Dozent Dr. Konstanze Vogt, die mich ebenso konstruktiv bei der Fertigstellung der Arbeit unterstützt hat.

Den Assistentinnen des mikrobiologischen Labors der Poliklinik für Präventive Zahnheilkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Frau Katrin von Brandenstein, Frau Regina Mäuer und Frau Pötschke, danke ich herzlich für die Hilfe und fachliche Beratung während der Einarbeitung in die mikrobiologischen Arbeitstechniken.

Herrn Dr. Christian Finke und Herrn Andreas Pawandenat danke ich für die Unterstützung im klinischen Teil der Studie und ihrem Interesse am Gelingen der Arbeit. Der Firma Ivoclar Vivadent GmbH – insbesondere Frau Dr. Monika Reichenbach - danke ich für die Bereitstellung der Kulturbestecke und die materielle Unterstützung in Form eines Forschungsstipendiums.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. habil. Susanne Kneist sowie die in der Danksagung genannten Personen,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Berlin, am 10. Mai 2004

Anke Richter, Verfasserin