

Int Poster J Dent Oral Med 2005, Vol 7 No 04, Poster 295

## Nachweis und Quantifizierung von Parodontitis-assoziierten Sulfat reduzierenden Bakterien (SRB) mittels quantitativer PCR

**Sprache:** Deutsch

**Autoren:**

cand. med. dent. Sebastian Becher

Lehrstuhl und Abteilung für Parodontologie, Fakultät für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universität Witten/Herdecke

Dr. Veronika Homann

Abteilung für Epithelphysiologie, Max Planck-Institut Dortmund

Dr. (Syr) Firass Shihabi

Lehrstuhl und Abteilung für Parodontologie, Fakultät für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universität Witten/Herdecke

Univ.-Prof. Dr. Wolf-D. Grimm

Lehrstuhl und Abteilung für Parodontologie, Fakultät für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde, Universität Witten/Herdecke

**Datum/Veranstaltung/Ort:**

13.-14. Januar 2005

37. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung (AfG) in der DGZMK

Mainz

### Einleitung

1895 berichtete W. M. Beijerick erstmals über die Isolation von Sulfat reduzierenden Bakterien aus einem Kanal in den Niederlanden. Sulfat reduzierende Bakterien sind in der Lage unter strikt anaeroben Bedingungen Sulfat, Schwefelgemische oder elementaren Schwefel, die als Elektronenakzeptoren dienen, dissimilatorisch in Schwefelwasserstoff zu reduzieren. Schwefelwasserstoff wirkt toxisch durch Inaktivierung der Zytochromoxidase. Dieser Prozess wird ebenfalls als Sulfatatmung bezeichnet. 1995 wurde schließlich erstmals dann das Vorkommen von Sulfat reduzierenden Bakterien im subgingivalen Biofilm parodontaler Taschen beschrieben (van der Hoeven et al.1995). Weitere Untersuchungen zeigen, dass SRB bei gesunden Probanden in 10% der Fälle nachzuweisen war. Bei Parodontitispatienten zeigte sich dagegen ein Anstieg der SRB-Prävalenz auf 58-72%. In Pilotstudien konnte unsere Forschungsgruppe eine positive Korrelation zwischen der klinischen Taschentiefe und der SRB-Prävalenz nachweisen(Grimm et al., 2000, 2003, 2004).

### Problemstellung

Ziel unserer Untersuchungen ist, das Vorkommen von zwei SRB-Stämme mittels quantitativer PCR bei Parodontitis-Patienten nach systematischer Parodontitis-Therapie in der Phase der parodontalen Erhaltungstherapie (SPT) nachzuweisen.

### Material und Methoden

An der klinisch-kontrollierten Studie nahmen 15 Patienten teil.

#### Plaque-Isolate:

Die Plaqueisolate wurden mittels der Entnahmetechnik nach SLOTS subgingival vor der SPT entnommen und nach 3 sowie 6 Monaten erfolgte die erneute Entnahme. Die Papierspitzen wurden hier 20 sec. In ausgewählten Sulci belassen und darauf in sterile Glasröhrchen zur Lagerung überführt.

#### DNA Extraktion:

Die Papierspitzen wurden jeweils in 1ml DPBS aufgenommen und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Darauf erfolgte die Entnahme der Papierspitzen und die Zentrifugation bei 10000rpm für 20 min. sowie das anschließende Lösen des Bakterienpellets in 200µl DPBS. Die Extraktion erfolgte mittels dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) entsprechend den Angaben des Herstellers.

#### PCR:

Die Amplifikation der 16S rDNA (350 bp) von *D. orale* erfolgte mittels qualitativer PCR und unter Anwendung von *D. orale* 16S rDNA spezifischen Primern. Pro PCR Ansatz wurden je 1 µl Primer (20 pmol), 1 µl dNTPs (10mM), 50 µl 10x reaction buffer, 0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl) und 20µlDNA bzw 20µl H2O (Wasserkontrolle) zugefügt. Es wurden 35 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 56,9 °C durchlaufen.

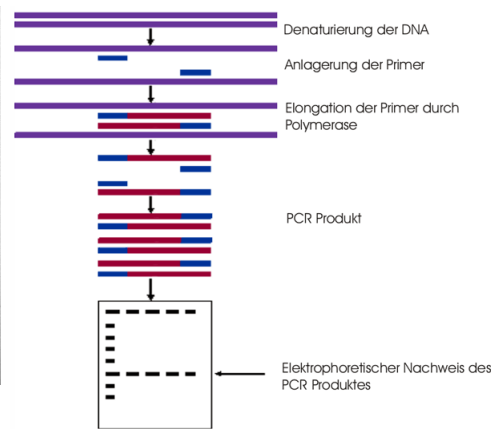
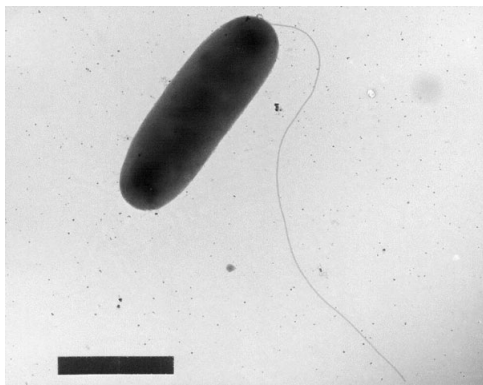


Abb.1: TEM-Darstellung einer negativ angefärbten Zelle eines *Desulfomicrobium orale* sp. Nov., NY 678 (DSM1238). Die Balkengröße entspricht 1 Mikrometer (aus: P.Langendijk-Genevaux, 2001)

Abb.2: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion

### Klonierung der PCR-Fragmente:

Die Klonierung der PCR Fragmente geschah unter Verwendung des TOPO- pCR2.1-Cloning Kits von Invitrogen gemäß den Angaben des Herstellers. In unserem Versuch verwendeten wir die One Shot Chemical Transformation Methode. Nach blau-weiß Selektion erfolgte die Anzucht einzelner weißer Kolonien in je 2ml LB-Amp-Medium (2µl Amp/ml LB). Die Anzucht erfolgte bei über Nacht Inkubation bei 37 °C. Die anschließende Minipräparation der Plasmid DNA erfolgte unter Verwendung der Puffer 1-3 (Qiagen).

- Lösen des zuvor abzentrifugierten Pellets in 300µl P1
- Zugabe von P2 und anschließender Inkubation von 5 min bei RT
- Abschließende Zugabe von P3
- Inkubation auf Eis für 10 min. und Zentrifugation für 10 min. bei 10000 rpm.
- Fällung der DNA in 500µl Isopropanol und Zentrifugation für 20 min. bei 15000 rpm.
- Waschen des Pellets mit 70% EtOH
- anschließendem Trocknen und Aufnahme in 30µl H<sub>2</sub>O
- Herausschneiden des in pCR2.1 klonierten PCR Fragmentes durch EcoRI-Restriktion
- Kontrolle auf einem 1,5% Agarose Gel mit I-HindIII-Marker

Anschließende Sequenzierung des deutlichsten Klon mittels M13 Primern und Abgleich mit der 16S rDNA Sequenz von *D. orale*.

### Quantitative real time PCR:

Die zuvor durch Klonieren gewonnene 16sDNA wurde zur Optimierung der spezifischen real-time Primer und Festlegung eines Standards mittels einer Verdünnungsreihe von  $10^5$  -  $10^2$  mittels dem QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen) im GeneAmp 5700 Sequence Detection System. Es wurde die 2 Step cycling Methode verwendet. Abschließend wurde unter Verwendung der 15 Patientenproben und der SRB spezifischen Primern (*D. orale* und *D.fairfieldensis*) die real-time PCR nach derselben Methode durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde durch die Verwendung spezifischer TaqMan Sonden erreicht. Das amplifizierte Fragment von *D. orale* beträgt eine Länge von 85 bp.

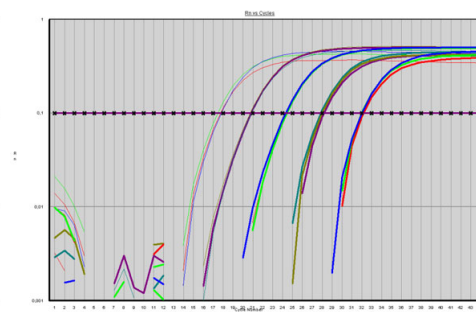
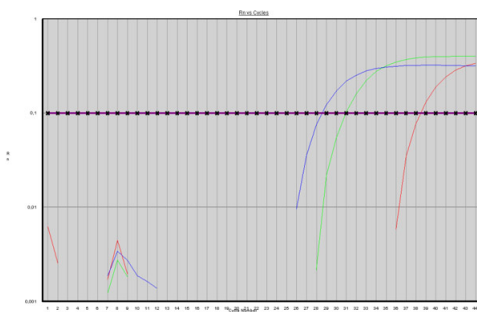


Abb. 3: Quantitative Erfassung von *D. orale* mittels real-time PCR (ein Patient) Rot=baseline grün= 3 Monate blau= 6 Monate

Abb. 4: Verdünnungsreihe für Standard von  $10^5$  -  $10^2$  (*D. orale*)

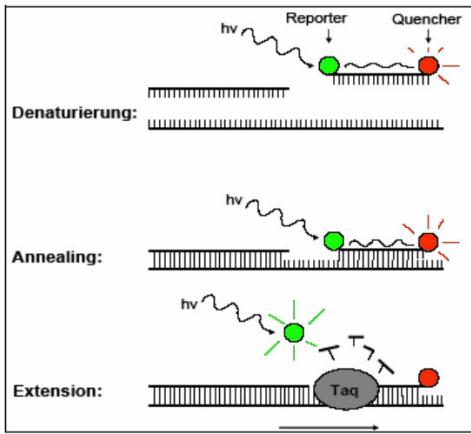


Abb. 5: Prinzip der TaqMan Sonde

## Ergebnisse

**Tab. 1: Thermoprofil der real-time PCR am Beispiel von *D. orale***

Step	Time	Temperature
UNG Carryover Prevention	2 min	50°C
<b>PCR:</b>		
Initial activation Step	15 min	95°C
<b>Two-step-cycling:</b>		
Denaturation	15 s	94°C
Annealing/Extension	60 s	58°C
Number of cycles 44		

**Tab. 2: Reaktionskomponenten für die real-time PCR**

PCR Master mix	12,5µl
Forward Primer 10pmol/µl	1,0µl
Reverse Primer 10pmol/µl	1,0µl
Template DNA	9,0µl
TAQ Sonde 2,5pmol/µl	1,0µl
UNG 1u/µl	0,5µl

**Tab. 3: Primersequenzen PCR und qPCR von *D. orale***

### PCR:

Forward: 5'-ATC TGC CCT TGG ATT TGG GAT AA-3'

Reverse: 5'-TGT TGG ACC CGC ACC ACT TC-3'

### Real-time PCR:

Forward: 5'-ATC TGC CCT TGG ATT TGG GAT AA-3'

Reverse: 5'-GCA TCC TTT ACC GAC TCC TTT TA-3'

Alle untersuchten Patientenproben (n=15) zeigten über alle Untersuchungszeiträume ("base-line", 3 Monate, 6 Monate) einen 100%-igen *D. orale*-Nachweis.

## Schlußfolgerungen

Aus 10 parodontitispezifischen Isolaten konnten Langendijk et al. [2001] die histologischen, biochemischen und genetischen Eigenschaften dieser SRB bestimmen. Sie wurden dann mit den vorher bekannten SRB-Spezies verglichen. Einer der isolierten SRB-Stämme zeigte morphologisch leicht gekrümmte Bakterienzellen mit einer hohen Motilität. Die spezifischen Schwefel-Redox-Reaktionen verwiesen auf inkomplette Laktat- und Pyruvat-Oxidationen im Vergleich zu equimolaren Mengen von Azetaten. Desulfovirdin und Zytochrom C3 waren in diesem mesophilen Vibriod nachweisbar, während die zellulären Lipid-Profile in Übereinstimmung mit dem Genus *Desulfovibrio* standen. 16S rDNS-Untersuchungen zeigten eine Übereinstimmung mit den 16S rDNS-Sequenzen der Spezies "Desulfovibrio fairfieldensis". Die Phänotypisierung und die phylogenetische Analyse unterstrichen, daß dieses stäbchenförmige Bakterium, isoliert aus parodontalen Taschen, als ein neuer SRB-Stamm anzusehen ist, für den die Bezeichnung *Desulfomicrobium orale* vorgeschlagen wurde. Aus den gegenwärtig verfügbaren Publikationen zu den oralen SRB ist abzuleiten, daß die Entwicklung diagnostischer Methoden zum klinischen Nachweis der oralen SRB-Besiedlung neue Möglichkeiten einer parodontologischen Risiko-Diagnostik eröffnet. Die quantitative PCR-Methode ist geeignet, die SRB-Prävalenz bei Parodontitispatienten zu ermitteln.

## Literatur

1. J. S. van der Hoeven, C.W.A. van den Kienboom, M.J.M. Schaecken (1995). Sulphate-reducing bacteria in the periodontal pocket. *Oral Microbiol Immunol* 10: 288-290,
2. Langendijk PS, Grimm W-D, van der Hoeven JS (2001). Sulfate-reducing bacteria in relation with other potential periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 28:1151-1157
3. W.-D. Grimm, P. Cichon, J. S. van der Hoeven, P. S. Langendijk, F. Smith, M. Worley, L. Schmitz, S. Offenbacher (2000). The influence of sulfate-reducing bacteria colonization of 2 different bioresorbable barrier membranes for GTR. An 18-month case-controlled microbiologic and clinical study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 20(1): 91-9.
4. W.-D. Grimm, K. Grimm, J. Hagemann, R.C. Williams, J. S. van der Hoeven, P. S. Langendijk-Genevaux, Auftretenshäufigkeit von Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB) bei verschiedenen Parodontitis-Formen. *Dtsch Zahnärztl Z*, 58(5): 311-315.
5. Grimm WD, Arnold WH, Grimm K, van der Hoeven JS, Shihabi F, Langendijk-Genevaux PS (2004). Vergleichende In-vitro-Untersuchungen zur Adhäsion von Sulfat-reduzierenden Bakterien (SRB) auf verschiedenen resorbierbaren Barriere-Membranen. *Dtsch Zahnärztl Z*. 59(11): 626-32.

## Abkürzungen

SRB = Sulfat reduzierenden Bakterien  
SPT = Supportive Periodontal Treatment

*Dieses Poster wurde übermittelt von [cand. med. dent. Sebastian Becher](#).*

### Korrespondenz-Adresse:

*Univ.-Prof. Dr. Wolf-D. Grimm*

Leiter des Lehrstuhl und Abteilung für Parodontologie Fakultät für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

Universität Witten/Herdecke

A.-Herrhausen-Str. 50

58 448 Witten

Tel.-Nr.: +49 2302 926 608

Fax-Nr.: +49 2302 926 610

[www.uni-wh.de](http://www.uni-wh.de)

## Nachweis und Quantifizierung von Parodontitis-assoziierten Sulfat reduzierenden Bakterien (SRB) mittels quantitativer PCR

Becher S.<sup>1\*</sup>, Homann V.<sup>2</sup>, Shihabi F.<sup>1</sup>, Grimm W.-D.<sup>1</sup>

Universität Witten/Herdecke<sup>1</sup>, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund<sup>2</sup>



**Abstract:** Sulfat reduzierende Bakterien (SRB) stellen eine Gruppe morphologisch unterschiedlicher, strikt anaerober gram-negativer Bakterien dar. Neuere Studien zeigen, dass SRB mit Parodontitis-Erkrankungen assoziiert sind. So konnten wir in Pilotstudien 90% der isolierten parodontalen SRB als Mitglieder der neuen Art *Desulfotomaculum orale* identifizieren, wohingegen *Desulfotomaculum fairfieldensis* oral nur selten nachzuweisen war.

**Einführung und Ziel:** 1895 berichtete W. M. Beijerinck erstmals über die Isolation von Sulfat reduzierenden Bakterien aus einem Kanal in den Niederlanden. Sulfat reduzierende Bakterien sind in der Lage unter strikt anaeroben Bedingungen Sulfat, Schwefelgemische oder elementaren Schwefel, die als Elektronenakzeptoren dienen, dissimilatorisch in Schwefelwasserstoff zu reduzieren. Schwefelwasserstoff wirkt toxisch durch Inaktivierung der Zytochromoxidase. Dieser Prozess wird ebenfalls als Sulfatfäulung bezeichnet. 1995 wurde schließlich erstmals das Vorkommen von Sulfat reduzierenden Bakterien im subgingivalen Biofilm parodontaler Taschen beschrieben. Weitere Untersuchungen zeigen, dass SRB bei gesunden Probanden in 10% der Fälle nachzuweisen war. Bei Parodontitispatienten zeigte sich dagegen ein Anstieg der SRB-Prävalenz auf 58-72%. In Pilotstudien konnte unsere Forschungsgruppe eine positive Korrelation zwischen der klinischen Taschenentfernung und der SRB-Prävalenz nachweisen. Ziel unserer Untersuchungen ist, das Vorkommen von zwei SRB-Stämme mittels quantitativer PCR nachzuweisen. An der klinisch-kontrollierten Studie nahmen 15 Patienten teil.

**Material und Methode:**

**Plaques-Isolate:**

Die Plaquesoliate wurden mittels der Entnahmetechnik nach SLOTS subgingival vor der SPT entnommen und nach 3 sowie 6 Monaten erfolgte die erneute Entnahme. Die Paperspitzen wurden hier 20 sec. in ausgewählten Sulfid belassen und darauf in sterile Eppis zur Lagerung überführt.

**DNA-Extraktion:**

Die Paperspitzen wurden jeweils in 1ml DPBS aufgenommen und 5 min bei RT stehen gelassen. Darauf erfolgte die Entnahme der Paperspitzen und die Zentrifugation bei 10000rpm für 20 min, und anschließendes Lösen des Bakterienpellets in 200µl DPBS. Die Extraktion erfolgte mittels dem High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) entsprechend den Angaben des Herstellers.

**PCR:**

Die Amplifikation der 16S rDNA (350 bp) von *D. orale* erfolgte mittels qualitativer PCR und unter Anwendung von *D. orale* 16S rDNA spezifischen Primern. Pro PCR Ansatz wurden je 1 µl Primer (20 pmol/l), 1 µl dNTPs (10mM), 50 µl 10x reaction buffer, 0.25 µl Taq-Polymerase (5U/µl) und 20µl DNA bzw 20µl H<sub>2</sub>O (Wasserkontrolle) zugefügt. Es wurden 35 Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 55,9 °C durchlaufen.

**Klonierung der PCR-Fragmente:**

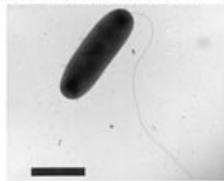
Die Klonierung der PCR Fragmente geschah unter Verwendung des TOPO- pCR2.1-Cloning Kits von Invitrogen gemäß den Angaben des Herstellers. Hier unter Verwendung der One Shot Chemical Transformation Methode.

Nach blau-weiß Selektion erfolgte die Anzucht einzelner weißer Kolonien in je 2ml LB-Amp-Medium (2µl Amp/ml LB). Die Anzucht erfolgte bei 37 °C. Anschließend Minipräparation der Plasmid DNA unter Verwendung der Puffer 1-3 (Qiagen). Hier Lösen des zuvor abzentrifugierten Pellets in 300µl P1, Zugabe von P2 und anschließender Inkubation von 5 min bei RT. Abschließende Zugabe von P3, Inkubation auf Eis für 10 min, und Zentrifugation für 10 min, bei 10000 rpm. Füllen der DNA in 500µl Isopropanol und Zentrifugation für 20 min, bei 15000 rpm. Waschen des Pellets mit 70% EtOH, anschließendem Trocknen und Aufnahme in 30µl H<sub>2</sub>O.

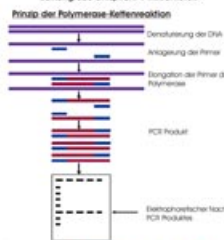
Herausschneiden des in pCR2.1 klonierten PCR Fragmentes durch EcoRI-Restriktion, Kontrolle auf einem 1,5% Agarose Gel mit λ-HindIII-Marker. Anschließend Sequenzierung des deutlichsten Klon mittels M13 Primern und Abgleich mit der 16S rDNA Sequenz von *D. orale*.

**Quantitative real-time PCR:**

Die zuvor durch Klonieren gewonnene 16S rDNA wurde zur Optimierung der spezifischen real-time Primer und Festlegung eines Standards mittels einer Verdünnungsreihe von 10<sup>1</sup> - 10<sup>7</sup> mittels dem Quantifect Probe PCR Kit (Qiagen) im GeneAmp 5700 Sequence Detection System. Es wurde die 2 Step cycling Methode verwendet. Abschließend wurde unter Verwendung der 15 Patientenproben und der SRB spezifischen Primern (*D. orale* und *D. fairfieldensis*) die real-time PCR nach derselben Methode durchgeführt. Die Fluoreszenz wurde durch die Verwendung spezifischer TaqMan Sonden erreicht. Das amplifizierte Fragment von *D. orale* beträgt eine Länge von 85 bp.



TEM-Darstellung einer negativ angefärbten Zelle eines *Desulfotomaculum orale* sp. Nov. NY 678 (DSM 1238). Die Baktergröße entspricht 1 Mikrometer.



**Thermoprofil der real-time PCR am Beispiel von *D. orale***

Step	Time	Temperature	PCR Master mix	12,5µl
UNG				
UNG				
Carryover Prevention	2 min	50°C	Forward Primer	1µl
			10pmol/µl	
Reverse Primer			1µl	
			10pmol/µl	
Initial activation	15 min	95°C	Reverse Primer	1µl
Step			10pmol/µl	
Template DNA			9µl	
Denaturation	15 s	94°C	Taq Sonde	1µl
			2,5pmol/µl	
Annealing/Extension	60s	58°C	UNG	0,5µl
			1µl/µl	
Number of cycles	44			

**Primersequenzen PCR und qPCR von *D. orale*:**

**PCR:**

Forward: 5'-ATC TGC CCT TGG ATT TGG GAT AA-3'

Reverse: 5'-TGT TGG ACC CGC ACC ACT TC-3'

**Real-time PCR:**

Forward: 5'-ATC TGC CCT TGG ATT TGG GAT AA-3'

Reverse: 5'-GCA TCC TTT ACC GAC TCC TTT TA-3'

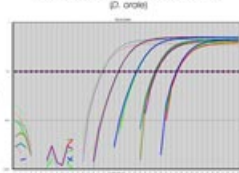
**Ergebnisse:**

Alle untersuchten Patientenproben (n=15) zeigten über alle Untersuchungszeitpunkte ("base-line", 3 Monate, 6 Monate) einen 100%-igen *D. orale*-Nachweis. Die quantitative real-time PCR-Methode ist geeignet, die SRB-Prävalenz bei Parodontitispatienten zu ermitteln.

**Diskussion der Ergebnisse:**

Aus 10 parodontitispezifischen Isolationen konnten Langendijk et al. [2001] die histologischen, biochemischen und genetischen Eigenschaften dieser SRB bestimmen. Sie wurden dann mit den vorher bekannten SRB-Spezies verglichen. Einer der isolierten SRB-Stämme zeigte morphologisch leicht gekrümmte Bakterienzellen mit einer hohen Motilität. Die spezifischen Schwefel-Redox-Reaktionen wiesen auf inkomplette Laktat- und Pyruvat-Oxidationen im Vergleich zu äquivalenten Mengen von Azetaten, Desulfovitidin und Zytochrom C, waren in diesem mesophilen Vibrio nachweisbar, während die zellulären Lipid-Profile in Übereinstimmung mit dem Genus *Desulfotomaculum* standen. 16S rDNA-Sequenzen zeigten eine Übereinstimmung mit den 16S rDNA-Sequenzen der Spezies *Desulfotomaculum fairfieldensis*. Die Phänotypisierung und die phylogenetische Analyse unterstrichen, daß dieses stäbchenförmige Bakterium, isoliert aus parodontalen Taschen, als ein neuer SRB-Stamm anzusehen ist, für den die Bezeichnung *Desulfotomaculum orale* vorgeschlagen wurde. Aus den gegenwärtig verfügbaren Publikationen zu den oralen SRB ist abzuleiten, daß die Entwicklung diagnostischer Methoden zum klinischen Nachweis der oralen SRB-Besiedlung neue Möglichkeiten einer parodontologischen Risiko-Diagnostik eröffnet.

**Verdünnungsreihe für Standard von 10<sup>1</sup> - 10<sup>7</sup> (*D. orale*)**



**Quantitative Erfassung von *D. orale* mittels real-time PCR (ein Patient)**

Rot=base-line grün= 3 Monate blau= 6 Monate



**Prinzip der TaqMan-Sonde**

