

Justus-Liebig-Universität Gießen
Fachbereich Medizin

Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

**Das Mikrobiom odontogener
Infektionen**

Kumulative Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia legendi
für das Fach Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Dr. med. Dr. med. dent. Sebastian Böttger
aus Siegen

Gießen 2022

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Inhaltsverzeichnis | 2 |
| 1. Einleitung | 4 |
| 1.1. Die odontogene Infektion als endogene Infektion | 4 |
| 1.2. Die Bedeutung odontogener Infektionen | 6 |
| 1.3. Einteilung der odontogenen Infektionen..... | 8 |
| 1.4. Zielsetzung | 9 |
| 1.5. Verzeichnis eigener Publikation zur kumulativen Habilitation | 10 |
| 2. Typische odontogene Infektionen | 12 |
| 2.1. Verlauf einer typischen odontogenen Entzündung..... | 13 |
| 2.2. Therapie einer typischen odontogenen Infektion..... | 14 |
| 2.3. Publikation 1: Indication for an additional postoperative treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses. | 16 |
| 3. Atypische odontogene Infektionen | 24 |
| 3.1. Aktinomykose der Kiefer und der Weichteile | 25 |
| 3.2. Akute und chronische Kieferosteomyelitis | 28 |
| 3.3. Superinfizierte medikamenten-assoziierte Kiefernekrose | 32 |
| 3.4. Superinfizierte Osteoradionekrose der Kiefer | 36 |
| 3.5. Andere atypische odontogene Infektionen | 39 |
| 3.6. Publikation 2: A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics | 42 |
| 4. Das Mikrobiom odontogener Infektionen..... | 56 |
| 4.1. Molekulare Methoden zur Identifikation von Bakterien..... | 59 |
| 4.2. Die 16S-rRNA-Gen-Analyse | 60 |
| 4.3. Next-Generation-Sequencing und Bioinformatik..... | 62 |
| 4.4. Publikation 3: Microbiome of Odontogenic Abscesses..... | 66 |
| 5. Relevanz des Mikrobioms odontogener Infektionen..... | 87 |
| 5.1. Kulturbasierte Analyse odontogener Abszesse | 87 |
| 5.2. Vergleich von kulturbasierter und molekularer Bakterienidentifikation..... | 90 |
| 5.3. Publikation 4: Relevance of the Microbiome of odontogenic Abscesses..... | 92 |
| 6. Schwere und komplizierte odontogenen Infektionen | 107 |

| | | |
|------|---|-----|
| 6.1. | Obstruktion der oberen Luftwege | 111 |
| 6.2. | Kieferhöhlenempyem, Orbitaphlegmone und Orbitaabszess | 113 |
| 6.3. | Sinus cavernosus Thrombose und Hirnabszess | 114 |
| 6.4. | Sepsis bei odontogenen Infektionen | 115 |
| 6.5. | Nekrotisierende Entzündungen..... | 118 |
| 6.6. | Publikation 5: Odontogenic Cervicofacial Necrotizing Fasciitis: Microbiological Characterization and Management of Four Clinical Cases. | 119 |
| 7. | Diskussion | 135 |
| 7.1. | Abgrenzung zwischen typischer und atypischer odontogener Infektion .. | 135 |
| 7.2. | Limitationen der mikrobiologischen Diagnostik..... | 138 |
| 7.3. | Sinnvolle Anwendung der mikrobiologischen Diagnostik..... | 142 |
| 7.4. | Optimierung der mikrobiologischen Diagnostik | 148 |
| 7.5. | Fazit | 155 |
| 8. | Zusammenfassung..... | 158 |
| 9. | Summary | 162 |
| 10. | Literatur | 166 |
| 11. | Tabellenverzeichnis | 179 |
| 12. | Abbildungsverzeichnis | 179 |
| 13. | Erklärung | 180 |
| 14. | Danksagung..... | 181 |

1. Einleitung

1.1. Die odontogene Infektion als endogene Infektion

Infektiöse Erkrankungen stellen im Kopf-Hals-Bereich eine häufige Krankheitsentität dar. Neben den sehr häufigen viral bedingten Erkrankungen der oberen Atemwege sind zahlreiche bakteriell bedingte Erkrankungen bekannt, die zur Inanspruchnahme von ärztlichen Leistungen führen können. Die Mundhöhle mit den Zähnen und der Rachen stellen hierbei ein Einfallstor für zahlreiche Krankheitserreger dar. Typische bakterielle Erreger sind zum Beispiel *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium diphtheriae* oder *Bordetella pertussis*. Die hierdurch ausgelösten Infektionskrankheiten wie Scharlach, eitrige Tonsillitis, Diphtherie und Keuchhusten sind bekannt und stellen in der Regel exogene Infektionen dar. Die Mundhöhle und die Zähne sind jedoch ähnlich wie die Haut und der Darm von einer Vielzahl von Bakterien besiedelt, die ebenfalls als Erreger möglicher Infektionskrankheiten fungieren können. Døving et al. beschreiben in ihrer Übersichtsarbeit, dass die Mundhöhle über 700 bakterielle Spezies beherbergen kann [1]. Man spricht von einer endogenen Infektion, wenn infektiöse Erkrankungen durch Bakterien der körpereigenen physiologischen bakteriellen Flora, also zum Beispiel durch die Bakterien der Mundhöhle, ausgelöst werden. Als Ursache für derartige Infektionen werden unter anderem ein Standortwechsel der Bakterien (vom Speichel über Zahnplaque nach endodontal) oder ein Ungleichgewicht in der bakteriellen Zusammensetzung, z.B. durch die Verabreichung von Antibiotika, genannt. In Hinblick auf die Entstehung einer odontogenen Infektion gibt es bislang keine fächerübergreifende, einheitliche Festlegung, ab wann genau eine bakterielle Besiedlung tatsächlich als odontogene Infektion zu definieren ist. Während in den chirurgischen Fächern eher eine tatsächlich sichtbare Entzündung mit den fünf klassischen Entzündungszeichen wie Calor, Dolor, Rubor, Tumor und Functio laesa (Überwärmung, Schmerzen, Rötung, Schwellung und Fehlfunktion) gemeint ist, wird in den eher konservativen Fächern unter einer odontogenen Infektion bereits schon eine Vorstufe der klassischen Entzündung verstanden, bei der die Entzündungszeichen häufig verdeckt sein können. So kann bereits die Entstehung

einer Karies durch die Bakterien in dem Biofilm der Zahnplaque als odontogene Infektion angesehen werden, da die Karies ohne das Wirken der Mikroorganismen gar nicht erst entstehen würde. Ebenso besteht ein wesentlicher Baustein der Kariestherapie darin, die Zahnplaque und damit auch die „schuldigen“ Mikroorganismen zu beseitigen. Spätestens, wenn die Bakterien jedoch über einen kariösen Defekt in das Innere des Zahnes eingedrungen sind und eine Pulpitis oder gar eine apikale Parodontitis verursacht haben, ist die Verwendung des Begriffes einer odontogenen Infektion zweifelsfrei gerechtfertigt, auch wenn von den klassischen Entzündungszeichen zu diesem Zeitpunkt möglicherweise weiterhin nur der Zahnschmerz eindeutig feststellbar ist. Ähnlich verhält es sich auch bei der Betrachtung der marginalen Parodontitis. Über das Vorstadium einer durch Bakterien in der Zahnplaque bedingten Gingivitis kommt es zur Entstehung eines Attachmentverlustes des Zahnhalteapparates und dadurch zur Ausbildung von bakteriell besiedelten Zahnfleischtaschen. Auch hier handelt es sich um eine odontogene Infektion, die ohne das Wirken der Mikroorganismen in der Mundhöhle nicht zustande käme und auch hier zeigt sich anfänglich der Zahnschmerz möglicherweise als einziges Symptom der klassischen fünf Entzündungszeichen. Wie bei der Karies, so besteht auch hier ein wesentlicher Baustein der Therapie in der Entfernung der schuldigen Bakterien um die Infektion zur Ausheilung zu bringen. Die Zahnkaries mit den Folgeerkrankungen der Pulpitis und der apikalen Parodontitis auf der einen Seite und die marginale Parodontitis auf der anderen Seite stellen damit die häufigsten bakteriell bedingten Erkrankungen der Mundhöhle dar [1]. Obwohl sie wie oben beschrieben häufig selbst noch nicht als eigentliche odontogene Infektion gewertet werden [2], stellen sie doch als sogenannter odontogener Focus die Ausgangsbedingung für die eigentliche odontogene Infektion dar. Die durch einen „schuldigen Zahn“ ausgelöste „dicke Backe“ stellt dann das klassische Bild einer endogenen odontogenen Infektion mit der vollen Ausprägung aller klinischen Entzündungszeichen nach Galen dar. Calor, Rubor, Dolor, Tumor und Functio laesa lassen sich dann leicht beim Patienten feststellen und es besteht dann häufig ein

immenser Leidensdruck. Neben der Eliminierung des odontogenen Focus sind dann häufig weitere therapeutische Maßnahmen wie die chirurgische Inzision und Drainage eines entstandenen Abszesses oder die Verabreichung eines Antibiotikums für eine erfolgreiche Behandlung der odontogenen Infektion notwendig. Auch wenn die meisten odontogen bedingten Infektionen lokal begrenzt bleiben und gut ambulant beherrschbar sind, können derartige Erkrankungen ein beträchtliches Ausmaß annehmen und mitunter sogar zu lebensgefährlichen Zuständen führen [3]. Zahlreiche odontogene Infektionen müssen daher im Krankenhaus und dort teilweise sogar intensivmedizinisch behandelt werden. Im Extremfall kann die über einen einzigen schuldigen Zahn ausgelöste odontogene Infektion sogar zum Tod des Patienten führen [4].

1.2. Die Bedeutung odontogener Infektionen

Odontogene Infektionen treten im klinischen Alltag sehr häufig auf [5,6]. In einer acht Jahre überspannenden Untersuchung von Cachovan et al. aus dem Jahr 2013 wurden 58161 Notfall-Patienten eines ambulanten zahnärztlichen Zentrums untersucht [2]. Der Anteil der diagnostizierten odontogenen Infektionen lag bei diesen Patienten bei 9,2%. Wenn man zusätzlich den Anteil für die Patienten mit einer apikalen Parodontitis (31,1%) und einer Pulpitis (36,7%) als Vorstadien der eigentlichen odontogenen Infektion mit hinzurechnet, ergibt sich ein Gesamtanteil von 77% an entzündlichen Erkrankungen [2]. Damit waren in dieser Untersuchung fast vier von fünf Patienten aufgrund einer odontogenen Infektion vorstellig geworden [2] und hierbei wurden postoperative Wundinfektionen nach Zahnentfernungen noch gar nicht mitberücksichtigt. Dies zeigt, welche große Bedeutung odontogene Infektionen im ambulanten klinischen Alltag haben. In der Studie von Seppänen et al. [3] wurde die Inzidenz für die stationäre Therapie einer odontogenen Infektion mit 5,3 bis 7,2 pro 100.000 Einwohnern pro Jahr für eine Region in Finnland angegeben. In einer Untersuchung von Opitz et al. aus dem Jahr 2015 wird für eine deutsche Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie beschrieben, dass der Anteil der Patienten mit

einer odontogenen Infektion an allen dort hospitalisierten Patienten immerhin 4,3% (814 von 18981 Patienten) betrug [7]. Überträgt man diesen Wert auf die Gesamtzahl der in deutschen Kliniken für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie pro Jahr behandelten Patienten von etwa 114.000 [8], so ergibt sich eine Anzahl von 4902 Patienten, die pro Jahr aufgrund von odontogenen Infektionen stationär in den Kliniken behandelt werden müssen. Bezogen auf eine Gesamtbevölkerung Deutschlands von 82,8 Millionen Einwohnern [9] ergibt sich rechnerisch somit eine mit der von Seppänen et al. vergleichbare Inzidenz von 5,92 pro 100.000 Einwohnern pro Jahr. Dabei muss berücksichtigt werden, dass zusätzlich auch in Kliniken für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und Kinderkliniken noch einige Patienten mit odontogenen Infektionen behandelt werden. Eine Fallzahlschätzung von etwa 5000 stationär behandelten odontogenen Infektionen pro Jahr in Deutschland scheint somit absolut gerechtfertigt zu sein. Bei einem DRG-Fall-Erlös von etwa 4000 Euro für einen typischen odontogenen Abszess [10] ergeben sich damit in Deutschland Kosten von etwa 20.000.000 Euro pro Jahr allein für die stationäre Behandlung von odontogenen Infektionen. In einer in den vereinigten Staaten durchgeführten Untersuchung ergaben sich sogar noch deutlich höhere Kosten [11]. Über die Kosten der ambulanten Versorgung von odontogenen Infektionen in Deutschland gibt es bislang keine belastbaren Zahlen [12]. Wenn man die Ausbildung eines odontogenen Focus durch Karies oder marginale Parodontitis sowie die Eliminierung desselben bei der Betrachtung odontogener Infektionen mitberücksichtigt, lohnt sich ein Blick auf die jährlichen Gesamtkosten der zahnärztlichen Therapie in Deutschland. Im Jahrbuch 2020 der kassenzahnärztlichen Bundesvereinigung werden die jährlichen Ausgaben der gesetzlichen Krankenkassen für zahnärztliche Behandlung mit 15.013 Millionen Euro angegeben [13]. Davon entfallen 8.605 Millionen Euro auf die konservierende und chirurgische Zahnbehandlung. Wenn man davon ausgeht, dass der überwiegende Teil dieser Behandlungen letztlich auf odontogene Infektionen zurückgeführt werden kann, dann erscheint die Annahme gerechtfertigt, dass die Kosten für die ambulante

Therapie odontogener Infektionen in Deutschland jährlich einige Milliarden Euro betragen.

1.3. Einteilung der odontogenen Infektionen

Døving et al. haben in Ihrer Übersichtsarbeit zu bakteriellen odontogenen Infektionen den Begriff der typischen odontogenen Infektion verwendet [1]. Hierunter zählen die Autoren die marginale Parodontitis, die apikale Parodontitis und die Pericoronitis auf [1], die durch typische Erreger der physiologischen Mundflora verursacht werden. Insbesondere werden von den Autoren *alpha-hämolyisierende Streptokokken* wie *S. mitis*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* und *S. anginosus* als typische opportunistische Erreger genannt [1], die zu den polymikrobiellen endogenen Infektionen beitragen. Während in der Frühphase der odontogenen Infektion die schuldigen Mikroorganismen vor allem der normalen Mundflora entsprechen, werden die Infektionen beim Voranschreiten vor allem durch anaerobe Spezies dominiert [1]. Typische odontogene Infektionen zeigen demnach ein charakteristisches Keimspektrum und sind durch zahnärztliche Maßnahmen in der Regel gut zu beherrschen [1]. Der Infektionsweg verläuft dabei typischerweise über den Zahn bis hin in die Knochen- und Weichgewebe hinein. In den meisten Fällen kann der zugehörige dentale Focus eindeutig mittels klinischer und radiologischer Diagnostik nachgewiesen werden [12]. Selbst ausgedehnte odontogene Infektionen, die einen Krankenhausaufenthalt erforderlich machen, sind durch chirurgische Maßnahmen und eine begleitende antibiotische Therapie in der Regel gut zu therapieren [12]. Demgegenüber zeigen sich in deutlich geringerer Häufigkeit odontogene Infektionen mit atypischen klinischen Erscheinungsbildern [14] oder atypischen klinischen Krankheitsverläufen. Al Asaadi et al. haben darauf hingewiesen, dass es von besonderer Wichtigkeit ist, bei derartigen atypischen odontogenen Infektionen eine Immunsuppression, die Beteiligung von atypischen Bakterien, wie zum Beispiel Mykobakterien und eine maligne Grunderkrankung, auszuschließen [14]. Die Autoren weisen aber darauf hin, dass solche Erkrankungen auch bei Gesunden durch ungewöhnliche Erreger ausgelöst sein

können und unterstreichen daher die Wichtigkeit von Abstrichen und Gewebeproben für die Mikroskopie, die Kultur und die Resistenztestung gegenüber Antibiotika [14]. Atypische odontogene Infektionen zeichnen sich ferner dadurch aus, dass sie, anders als die typischen odontogenen Infektionen, durch die gebräuchlichen Therapiemaßnahmen (Focus-Sanierung, Abszess-Inzision und antibiotische Therapie) in der Regel nicht einfach zur Ausheilung gebracht werden können. Es ist daher von besonderer Bedeutung, diese Erkrankungsgruppen vor allem in Hinblick auf die Diagnostik und die Therapie gut voneinander unterscheiden zu können. Schlussendlich stellen Komplikationen, die von odontogenen Infektionen ausgehen können, eine dritte Erkrankungsgruppe dar, die abhängig von ihrer Ausdehnung eine besondere Aufmerksamkeit des Behandlers und meistens auch besondere Therapiemaßnahmen erfordern. Al Nawas et al. unterscheiden hier zwischen lokalen Komplikationen im Bereich der Kiefer wie zum Beispiel der Osteomyelitis und der Sinusitis und systemischen Komplikationen wie zum Beispiel dem Orbitaabszess, der nekrotisierenden Fasziiitis, der Sepsis oder dem Hirnabszess [12]. Die Übergänge zwischen einer lokalen und einer systemischen Komplikation auf der einen Seite sowie die Übergänge zwischen chronischen verlaufenden Komplikationen und atypischen Infektionen auf der anderen Seite sind dabei fließend.

1.4. Zielsetzung

Die obigen Ausführungen zeigen auf, dass vor allem bei atypischen odontogenen Infektionen und bei komplizierten Verläufen besondere Anforderungen an die mikrobiologische Diagnostik gestellt werden müssen. Obwohl bereits einzelne auf molekularen Methoden basierende Nachweisverfahren verfügbar sind [15], besteht der Standard der klinisch-mikrobiologischen Diagnostik bei odontogenen Infektionen nach wie vor aus der Entnahme von Abstrichen für eine kulturbasierte Analyse im mikrobiologischen Labor [12,16,17].

Neuere Untersuchungen mit kulturunabhängigen molekularbiologischen Methoden haben jedoch gezeigt, dass an odontogenen Infektionen möglicherweise viel mehr

Bakterien beteiligt sind, als dies auf der Basis der herkömmlichen Diagnostik zu erwarten wäre [18-20]. Ziel dieser Arbeit soll es daher sein, neue molekulare Methoden der Bakterienidentifikation bei verschiedenen odontogenen Infektionen zur Anwendung zu bringen und deren Wertigkeit für eine sinnvolle klinische Anwendung darzustellen. Dabei soll mit Hilfe der oben bereits vorgestellten Gliederung der Infektionen in typische, atypische und komplizierte Verläufe ein direkter Bezug zum klinischen Alltag geschaffen werden. Es soll insbesondere auf die Fragestellung eingegangen werden, wann welches Keimspektrum zu erwarten ist und wann welche diagnostische Methode sinnvoll eingesetzt werden sollte, um therapeutische Bemühungen möglichst optimieren zu können. In Hinblick auf die klinische und die mikrobiologische Diagnostik sollen ferner sowohl bestehende Limitationen als auch mögliche Verbesserungen der bisherigen Standards in der Zukunft aufgezeigt werden. Die Arbeit stützt sich dabei auf die in den folgenden Kapiteln aufgeführten Publikationen.

1.5. Verzeichnis eigener Publikation zur kumulativen Habilitation

Die folgenden fünf Publikationen wurden in englischsprachigen, international anerkannten peer-review Journalen mit Impact-Faktor veröffentlicht:

Publikation 1: Böttger, S.; Lautenbacher, K.; Domann, E.; Howaldt, H.P.; Attia, S.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.F. Indication for an additional postoperative antibiotic treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses. *J Craniomaxillofac Surg.* **2020**, *48*, 229-234. doi: 210.1016/j.jcms.2020.1001.1009. Epub 2020 Jan 1031.

Publikation 2: Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Streckbein, P.; Knitschke, M.; Hain, T.; Weigel, M.; Wilbrand, J.F.; Domann, E.; Howaldt, H.P.; Attia, S. A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene

Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics. *Pathogens*. **2020**, *9*, 798. doi: 710.3390/pathogens9100798.

Publikation 3: **Böttger, S.;** Zechel-Gran, S.; Schmermund, D.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F.; Knitschke, M.; Pons-Kühnemann, J.; Hain, T.; Weigel, M.; Howaldt, H.-P.; Domann, E.; Attia, S. Microbiome of Odontogenic Abscesses. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1307.

Publikation 4: **Böttger, S.;** Zechel-Gran, S.; Schmermund, D.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F.; Knitschke, M.; Pons-Kühnemann, J.; Hain, T.; Weigel, M.; Imirzalioglu, C.; Howaldt, H.-P.; Domann, E.; Attia, S. Clinical Relevance of the Microbiome in Odontogenic Abscesses. *Biology* **2021**, *10*, 916.

Publikation 5: **Böttger, S.;** Zechel-Gran, S.; Schmermund, D.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F.; Knitschke, M.; Pons-Kühnemann, J.; Hain, T.; Weigel, M.; Imirzalioglu, C.; Howaldt, H.-P.; Domann, E.; Attia, S. Odontogenic Cervicofacial Necrotizing Fasciitis: Microbiological Characterization and Management of Four Clinical Cases. *Pathogens* **2022**, *11*(1), 78. doi.org/10.3390/pathogens11010078

2. Typische odontogene Infektionen

Odontogene Infektionen werden durch die physiologische Flora der Mundhöhle ausgelöst [1]. Hierbei gelingt es einzelnen bakteriellen Gemeinschaften über die Ausbildung von Biofilmen in Form von Zahnplaque zunächst ökologische Nischen zu schaffen, in denen dann zunehmend pathogene Bakterien proliferieren können [21]. Durch die Entstehung von Zahnkaries und tiefen Zahnfleischtaschen gelingt es den bakteriellen Gemeinschaften schließlich, anatomische Barrieren zu überwinden und damit aus dem Habitat der Mundhöhle in das Körperinnere einzudringen [22]. Aus einer Zahnkaries wird hierbei zunächst eine Pulpitis und über den weiteren Progress zur Zahnwurzelspitze schließlich eine apikale Parodontitis [21]. Aus einer apikalen oder marginalen Parodontitis wiederum oder aber aus einer Pericoronitis kann dann wie von Døving et al. beschrieben, eine typische odontogene Infektion mit der Ausbildung der klassischen fünf Entzündungszeichen nach Galen entstehen [1]. Dabei wird von den meisten Autoren, wie auch in der aktuellen S3-Leitlinie „Odontogene Infektionen“ der Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) beschrieben, erst das Auftreten dieser Entzündungszeichen in Form von Calor, Rubor, Dolor, Tumor und Functio laesa als eigentliche odontogene Infektion gewertet [2,12,23]. Obwohl hierbei der Begriff der odontogen bedingten Inflammation vielleicht richtiger wäre, soll der Begriff der odontogenen Infektion im Weiteren synonym dafür Verwendung finden. Eine typische odontogene Infektion stellt damit eine bakteriell bedingte, endogene lokale Entzündung in der Kopf-Hals-Region dar, deren Ursache in oder an einem erkrankten Zahn zu suchen ist. Odontogene Infektionen treten am häufigsten zwischen dem 20. und dem 40. Lebensjahr auf, sie können jedoch in jedem Lebensalter auftreten [12]. Männer sind in den meisten Untersuchungen häufiger betroffen als Frauen [12]. Als Risikofaktoren werden Adipositas, Diabetes mellitus, chronischer Alkohol- und Nikotinabusus, Rheumatismus und vor allem schlechte Mundhygiene angegeben [24]. Global betrachtet, stellen odontogen verursachte Infektionen die häufigste Ursache für bakteriell bedingte entzündliche Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich dar [25].

2.1. Verlauf einer typischen odontogenen Entzündung

Nachdem bakterielle Gemeinschaften aus der Mundhöhle in das Innere des Körpers eingedrungen sind, kommt es zunächst zu einer lokalen Entzündungsreaktion. Hierbei kommt es zu einer gesteigerten Durchblutung sowie zu einer Anreicherung von Entzündungszellen im Bereich der eingedrungenen Bakterien. Auch kommt es durch die Ausschüttung von Schmerzmediatoren zu einer deutlichen Zunahme der Sensibilität und zu Schmerzen im entzündeten Bereich. Bei der klinischen Untersuchung eines „schuldigen“ Zahnes mit einer apikalen Parodontitis entsteht klassischerweise ein Aufbiss- oder ein vertikaler Perkussionsschmerz, während bei einer marginalen Parodontitis eher ein horizontaler Perkussionsschmerz empfunden wird. Wenn sich die Entzündung von der Zahnwurzel kommend durch den Knochen bis hin zum Periost ausgedehnt hat, kommt es meist zu starken Schmerzen durch die Dehnung des gut innervierten Periostes. Spätestens jetzt zeigen sich auch ausgedehnte intra- und extraorale Schwellungen im Sinne einer „dicken Backe“. Wenn sich die Entzündung weiter über das Periost hinaus ausdehnt, kommt es meistens zu einer deutlichen Schwellungszunahme bei gleichzeitigem Nachlassen der Schmerzen. In der frühen Phase der Entzündung kommt es durch das Einwandern der Entzündungszellen zunächst zur Ausbildung eines entzündlichen Infiltrates. Im weiteren Verlauf entsteht dann bei einer typischen odontogenen Infektion regelmäßig ein odontogener Abszess. Wenn dieser Abszess intraoral unter der Mundschleimhaut lokalisiert ist, so spricht man von einem submukösen Abszess. Wenn sich der Abszess nach extraoral unter die Haut entwickelt, handelt es sich um einen subkutanen Abszess und wenn die Abszess-Ausdehnung in die tiefen Weichteile hinein verläuft, so entstehen tiefe Logenabszesse, die häufig mit einer erheblichen Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes einhergehen.

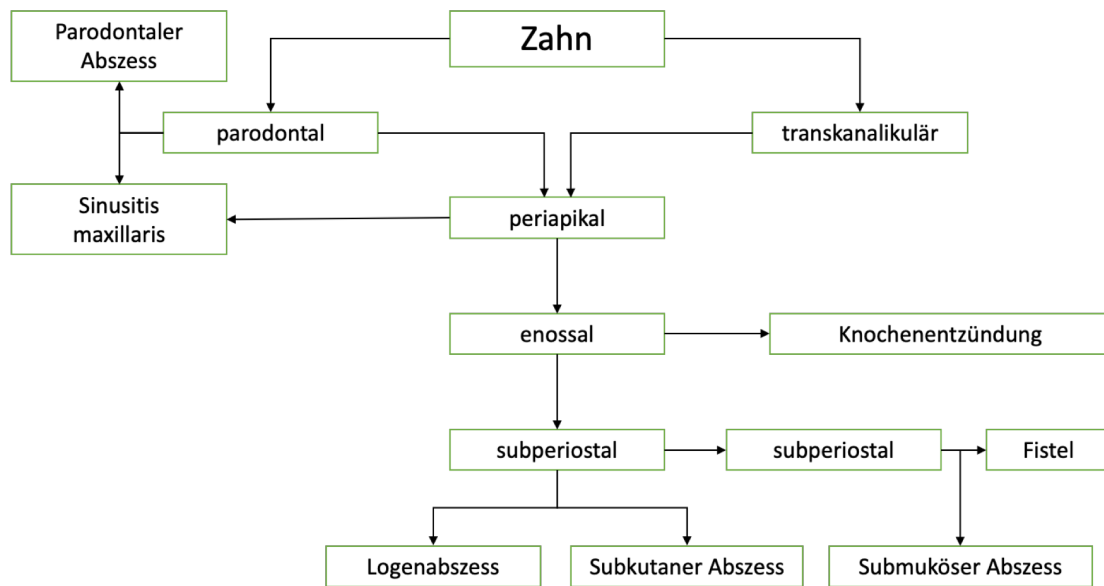


Abbildung 1: Ausbreitungsmöglichkeiten einer odontogenen Infektion nach Schwenzer und Ehrenfeld [26].

2.2. Therapie einer typischen odontogenen Infektion

Die meisten odontogenen Infektionen können ambulant gut behandelt werden [27]. Während am Anfang der Erkrankung im Stadium der entzündlichen Infiltration vor allem eine antibiotische Therapie von Nutzen ist, stellt im Stadium der Ausbildung eines Abszesses die chirurgische Inzision mit anschließender Drainage den Eckstein der Therapie dar [23,28]. Es gibt jedoch Hinweise, dass auch bereits eine Inzision im Stadium der Infiltration hilfreich ist [29]. Submuköse Abszesse können in der Regel einfach in Lokalanästhesie von der Mundhöhle aus inzidiert werden während direkt subkutan liegende Abszesse ebenfalls meist einfach in Lokalanästhesie durch die äußere Haut inzidiert werden können. Die tiefer liegenden Logenabszesse stellen therapeutisch hingegen eine größere Herausforderung dar. Bei Ihnen zeigt sich meist eine reflektorische Kieferklemme mit einer deutlichen Einschränkung der Mundöffnung. Zudem ist es mit Lokalanästhetika in der Regel kaum möglich, die Tiefe des entzündeten Gebietes ausreichend zu betäuben, so dass in aller Regel eine Abszessinzision von extraoral in Narkose durchgeführt werden muss. Bei der Eröffnung der Abszesskapsel entleert sich in der Regel Eiter, der zur mikrobiologischen Keimbestimmung abgestrichen wird [30,31]. Zumindest beim narkotisierten Patienten kann in gleicher Sitzung auch der „schuldige Zahn“ und

damit das Einfallstor der Bakterien in das Körperinnere entfernt werden. Bei einer Behandlung in Lokalanästhesie kann der „schuldige Zahn“ zwar ebenfalls entfernt werden, dies ist jedoch aufgrund der starken Schmerzen im entzündeten Bereich oft nicht möglich, so dass der dentale Focus hier häufig erst nach dem Abklingen der entzündlichen Symptomatik entfernt werden kann. Es empfiehlt sich, zumindest bei Vorhandensein eines intravenösen Zuganges, intraoperativ unmittelbar nach der Inzision und der Entnahme der Abstriche eine antibiotische Prophylaxe zur Vorbeugung einer hämatogenen Aussaat der Bakterien durchzuführen. Postoperativ kann unter Umständen eine begleitende antibiotische Therapie durchgeführt bzw. weitergeführt werden. Die aktuelle S3-Leitlinie „Odontogene Infektionen“ empfiehlt, hierbei zwischen lokal begrenzten odontogenen Infektionen ohne Ausbreitungstendenz und odontogenen Infektionen mit Ausbreitungstendenz zu unterscheiden [12]. Sofern es sich um eine odontogene Infektion ohne Ausbreitungstendenz handelt und während der Inzision Eiter entleert werden kann, soll auf eine zusätzliche antibiotische Therapie verzichtet werden, wenn keine allgemeinmedizinischen Risikofaktoren bestehen [12]. Eine odontogene Infektion ohne Ausbreitungstendenz zeichnet sich dabei durch das Fehlen der folgenden klinischen Symptome aus, die typisch für eine Ausbreitungstendenz sind und damit letztlich im Wesentlichen die Ausbildung oder Entwicklung eines Logenabszesses anzeigen [12] (Tabelle 1).

Zeichen der Ausbreitungstendenz bei odontogenen Infektionen

| |
|---|
| Mundöffnungseinschränkung |
| Druckschmerz auf Kieferwinkel/Augenwinkel (V. angularis) |
| Extraorale Schwellung (Ist der Unterkieferrand durchtastbar?) |
| Schluckbeschwerden/ Atemnot / angehobener Mundboden |
| Kloßige Sprache |
| Fieber/ Exsikose |

Tabelle 1: Zeichen der Ausbreitungstendenz bei odontogenen Infektionen gemäß der aktuellen Leitlinie der AWMF [12].

Zeigen sich hingegen Zeichen einer Ausbreitungstendenz, so wird von der Leitlinie neben der stationären Überwachung der Patienten auch eine generelle antibiotische Therapie empfohlen [12], die jedoch zum Teil im Widerspruch zu den Ergebnissen der zu diesem Thema veröffentlichten Studien steht. So konnten zum Beispiel Warnke et al. zeigen, dass etwa ein Drittel ihrer Patienten mit schweren odontogenen Infektionen allein durch Inzision und Drainage und ohne zusätzliche antibiotische Therapie behandelt werden konnten [32]. Andere Autoren empfehlen, zumindest bei Infektionen, die sich medial des Unterkieferknochens befinden, eine zusätzliche antibiotische Therapie zu verabreichen [33]. Al-Nawas et al. haben in ihrer Arbeit beschrieben, dass nach klinischer Erfahrung die meisten odontogenen purulenten Infektionen keine antiinfektive Therapie nach effektiver chirurgischer Intervention benötigen. Es stellt sich daher die Frage, was unter einer effektiven chirurgischen Therapie genau zu verstehen ist und wann tatsächlich eine antibiotische Therapie auch bei Vorhandensein einer odontogenen Infektion mit Ausbreitungstendenz erforderlich ist. Dies wurde in der Arbeit „Indication for an additional postoperative treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses“ näher untersucht.

2.3. Publikation 1: Indication for an additional postoperative treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses.

Einleitung: Ausgedehnte Abszesse odontogenen Ursprungs treten in den Abteilungen für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie häufig auf. Eine rasche chirurgische Inzision sowie die Drainage stellen die wichtigsten therapeutischen Maßnahmen dar. Häufig wird zusätzlich zur chirurgischen Therapie eine ergänzende Antibiotikatherapie durchgeführt. Es stellt sich die Frage, wie bedeutend diese zusätzliche antibiotische Therapie bei ausgedehnten odontogenen Abszessen ist.

Methoden: Für diese retrospektive Studie wurden alle Patienten zwischen Januar 2008 bis August 2014 mit schweren odontogenen Infektionen rekrutiert, die eine chirurgische Behandlung unter Vollnarkose erhielten. Es wurde untersucht, ob sie im

Rahmen der postoperativen stationären Therapie eine zusätzliche Antibiotikatherapie erhielten und ob die Behandlung dadurch verkürzt werden konnte.

Ergebnisse: Insgesamt wurden 258 Patienten mit einer ausgedehnten odontogenen Infektion in die Untersuchung eingeschlossen. Der am häufigsten beobachtete Abszess war ein submandibulärer Abszess (56%), gefolgt von einem perimandibulären Abszess (18%) und einem submentalen Abszess (9%). Etwa 65% der Patienten wurden zusätzlich zur Operation mit Antibiotika behandelt. Weder präoperativ noch postoperativ konnte ein signifikanter Unterschied bezüglich der Höhe des CRP-Wertes zwischen den Patienten, die keine antibiotische Behandlung erhielten und Patienten die zusätzlich antibiotisch behandelt wurden, nachgewiesen werden. Patienten, die eine zusätzliche intravenös verabreichte antibiotische Therapie erhielten, hatten jedoch einen signifikant längeren Krankenhausaufenthalt (Median: 6 Tage; Range: 1-22 Tage) als Patienten, die keine zusätzliche antibiotische Therapie erhielten (Median: 4 Tage; Range: 1-19 Tage) ($p=0.002$).

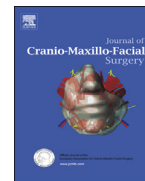
Schlussfolgerungen: In dieser Studie konnte keine Verbesserung des therapeutischen Ergebnisses durch die Verabreichung zusätzlicher Antibiotika zusätzlich zur Operation nachgewiesen werden. Daher stellt die chirurgische Inzision eines Abszesses auch weiterhin die wichtigste therapeutische Maßnahme bei ausgedehnten odontogenen Infektionen dar. Die unkritische automatisierte Verabreichung von Antibiotika, so wie sie von manchen Autoren empfohlen wird, sollte hingegen kritisch hinterfragt werden.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery

journal homepage: www.jcmfs.com



Indication for an additional postoperative antibiotic treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses



Sebastian Böttger^{a,*}, Katharina Lautenbacher^a, Eugen Domann^b, Hans-Peter Howaldt^a, Sameh Attia^a, Philipp Streckbein^a, Jan-Falco Wilbrand^a

^a Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Justus-Liebig-University Giessen, University Hospital Giessen and Marburg, Location Giessen, Klinikstrasse 33, D-35392, Giessen, Germany

^b Institute of Medical Microbiology, Justus-Liebig-University Giessen, Institute of Hygiene and Environmental Medicine, DZIF – German Centre for Infection Research, Biomedical Research Facility Seltersberg (BFS), Schubertstrasse 81, D-35392, Giessen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Paper received 5 February 2019

Accepted 22 January 2020

Available online 31 January 2020

Keywords:

Odontogenic infection

antibiotic treatment

Abscess

surgical incision

ABSTRACT

Introduction: Serious abscesses of an odontogenic origin occur frequently in the oral and maxillofacial surgery departments. Rapid surgical incision and drainage constitutes the most important therapeutic action. However, additional surgical therapy and supplementary administration of antibiotics is often carried out, such that the efficiency of this supplementary therapeutic option has been questioned.

Methods: All patients with severe odontogenic infections who received surgical treatment under general anaesthesia were recruited to this retrospective study. We determined whether they received additional antibiotic therapy on the ward and if it was possible to improve therapeutic outcomes using this option. **Results:** A total of 258 patients with a severe odontogenic infection between January 2008 and August 2014 were included. The most frequent infection observed was a submandibular abscess (56%), followed by a perimandibular abscess (18%) and a submental abscess (9%). About 65% of the patients were treated with antibiotics in addition to surgery. The median CRP level prior to surgical treatment was 87.8 mg/l (Q₁: 40.3 mg/l; Q₃: 143.5 mg/l) in patients who were administered an additional antibiotic and 83.8 mg/l (Q₁: 37.3 mg/l; Q₃: 135.0 mg/l) in those who received no antibiotic treatment after surgery. The postoperative median CRP levels were 116.5 mg/l (Q₁: 52.1 mg/l; Q₃: 159.3 mg/l) and 106.5 mg/l (Q₁: 40.6 mg/l; Q₃: 152.6 mg/l), respectively. Neither the preoperative CRP level ($p = 0.546$) nor the postoperative CRP level ($p = 0.450$) differed significantly between the groups. But patients who received additional antibiotic therapy had a significantly longer hospital stay (median: 6 days; range: 1–22 days) than patients who had no additional antibiotic therapy (median: 4 days; range: 1–19 days) ($p = 0.002$).

Conclusions: This study did not show an improvement in the therapeutic outcome with administration of supplementary antibiotics in addition to surgery. Thus, surgically incising an abscess is the most important therapeutic action and administration of antibiotics must be critically scrutinised.

© 2020 European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Surgical incision and drainage remains the gold standard for an advanced odontogenic abscess (Wagner et al., 2006; Mucke et al., 2015). However, this therapy is often accompanied by antibiotics, which are administered on a general basis rather than to target a specific pathogen (Eckert et al., 2000).

(Flynn, 2000) recommended a surgical intervention and the use of antibiotics if the infection is associated with pus. Other authors have made the same recommendation (Flynn et al., 2006a, 2006b; Poeschl et al., 2010; Lee and Kanagalingam, 2011; Kataria et al., 2015; Han et al., 2016; Bertossi et al., 2017; Heim et al., 2017). Eckert and colleagues recommended the additional use of antibiotics in cases of an abscess in the medial position of the lower jaw for multiple neck space infections and generalised disease (Eckert et al., 2005). In contrast, Al-Nawas and colleagues stated that most odontogenic purulent infections do not require antibiotic therapy after surgical treatment (Al-Nawas and Maeurer, 2008).

* Corresponding author.

E-mail address: sebastian.boettger@uniklinikum-giessen.de (S. Böttger).

According to Warnke and colleagues, about one-third of patients with severe odontogenic infections are treated successfully with an incision and drainage only (Warnke et al., 2008). Nevertheless, they suggested that additional intravenous penicillin should be given for rapid resolution of clinical symptoms in the majority of patients with significant odontogenic abscesses.

The internal guidelines of Giessen University Hospital state that perioperative antibiotic prophylaxis should be carried out in all patients directly after incision and drainage, but that additional postoperative intravenous antibiotic therapy can be avoided in cases of effective surgical treatment of pus (Fig. 6) or a crumbling, putrid secretion (Fig. 7), and in the absence of risk factors, such as immunosuppressive therapy, poorly controlled diabetes mellitus, antiresorptive therapy and signs of generalised sepsis (Bali et al., 2015). Otherwise, additional intravenous therapy should be carried out if the surgery results only in the flow of blood (Fig. 8). The antibiotic prophylaxis consists of a single-dose application of 2 g Ampicillin with 1 g Sulbactam or of 600 mg Clindamycin in case of a Penicillin allergy. It should be given directly after incision and specimen collection to prevent a falsification of the microbiological sample.

According to these internal guidelines, we investigated how many patients were treated with additional antibiotic therapy after surgery, and if they had better outcomes resulting in a shorter length of hospital stay (LOS) and a shorter time between surgery and removal of the drainage tube in the outpatient clinic.

2. Materials and Methods

As our local ethics committee was concerned about possible withholding of necessary antibiotic therapy, we were allowed to use only retrospective data. These data were collected from the operating room records and reports for all adult patients. The main inclusion criterion was diagnosis of a serious odontogenic infection that caused admission to the University Hospital and that required incision and drainage under general anaesthesia (Fig. 9). Therefore, specialists in oral and maxillofacial surgery were always called upon to confirm diagnoses of serious odontogenic abscesses and to determine the indications for surgical treatment. Patients with special risks or diseases, such as bisphosphonate-associated infections or immunodeficiency syndromes, and patients with preoperative septic shock syndrome, were not included in the study because in such cases, additional antibiotics were considered essential.

The patients were divided into two groups according to whether or not they had received an additional postoperative antibiotic treatment during their hospital stay. Following the recommendations of many other authors (Al-Nawas and Maeurer, 2008; Warnke et al., 2008; Celakovsky et al., 2015), ampicillin combined with sulbactam was used as the standard antibiotic drug. Clindamycin was used in cases of an allergy to penicillin. The final decision as to whether to prescribe a postoperative antibiotic was made by the surgeon, depending principally on the outcome of the incisional procedure but also on the clinical presentation. Surgeons were asked to follow the internal guidelines of the university hospital (as mentioned above), but this directive was not binding.

Statistical analyses were performed with SPSS for Windows software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The antibiotic prescriptions were examined with the chi-square test, and differences between patients who received an antibiotic versus those who did not were examined with the non-parametric Mann–Whitney *U* test and the Kruskal–Wallis test. A *p*-value < 0.05 was considered significant.

3. Results

A total of 258 patients were enrolled between January 2008 and August 2014 with a severe odontogenic infection. It was possible to retrospectively collect a full dataset for evaluation of 206 of these cases. Thus, 58% of the patients were male and 42% were female. The median age was 47 years (range: 4–97 years; Fig. 1). About 65% of the patients were additionally treated with an antibiotic after incision and drainage, while 34.6% did not receive any antibiotic after surgical treatment. Data concerning a prehospital application of antibiotics were not available. The most frequent infection observed was a submandibular abscess (56%), followed by a peri-mandibular abscess (18%) and a submental abscess (9%) (Fig. 2).

Each postoperative antibiotic therapy decision (yes or no) was made in the context of the surgical procedure and was therefore based principally on the outcome of abscess incision. As this study was retrospective in nature, making randomised patient assignment impossible, there was a risk of a selection bias in terms of the assignment of patients with more advanced disease to the group receiving postoperative antibiotics. To determine whether patients who received a postoperative antibiotic treatment in reality had a higher severity of illness than patients who had no additional antibiotic treatment, we compared the pre- and postoperative C-reactive protein (CRP) levels and the white blood cell count (WBC) between the groups.

The median CRP level prior to surgical treatment was 87.8 mg/l (Q₁: 40.3 mg/l; Q₃: 143.5 mg/l) in patients who were administered an additional antibiotic and 83.8 mg/l (Q₁: 37.3 mg/l; Q₃: 135.0 mg/l) in those who received no antibiotic treatment after surgery. The postoperative median CRP levels were 116.5 mg/l (Q₁: 52.1 mg/l; Q₃: 159.3 mg/l) and 106.5 mg/l (Q₁: 40.6 mg/l; Q₃: 152.6 mg/l), respectively. Neither the preoperative CRP level (*p* = 0.546) nor the postoperative CRP level (*p* = 0.450) differed significantly between the groups. The median WBC prior to surgery was $11.5 \times 10^9/L$ in patients who underwent additional antibiotic therapy and $12.3 \times 10^9/L$ in those who received no antibiotics. The postoperative median WBCs were 9.65×10^9 and $9.60 \times 10^9/L$ respectively.

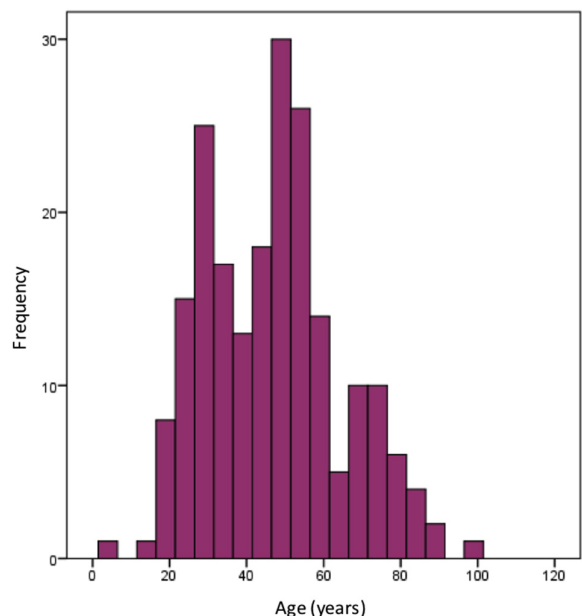


Fig. 1. Age distribution of the patients with a serious abscess of dental origin.

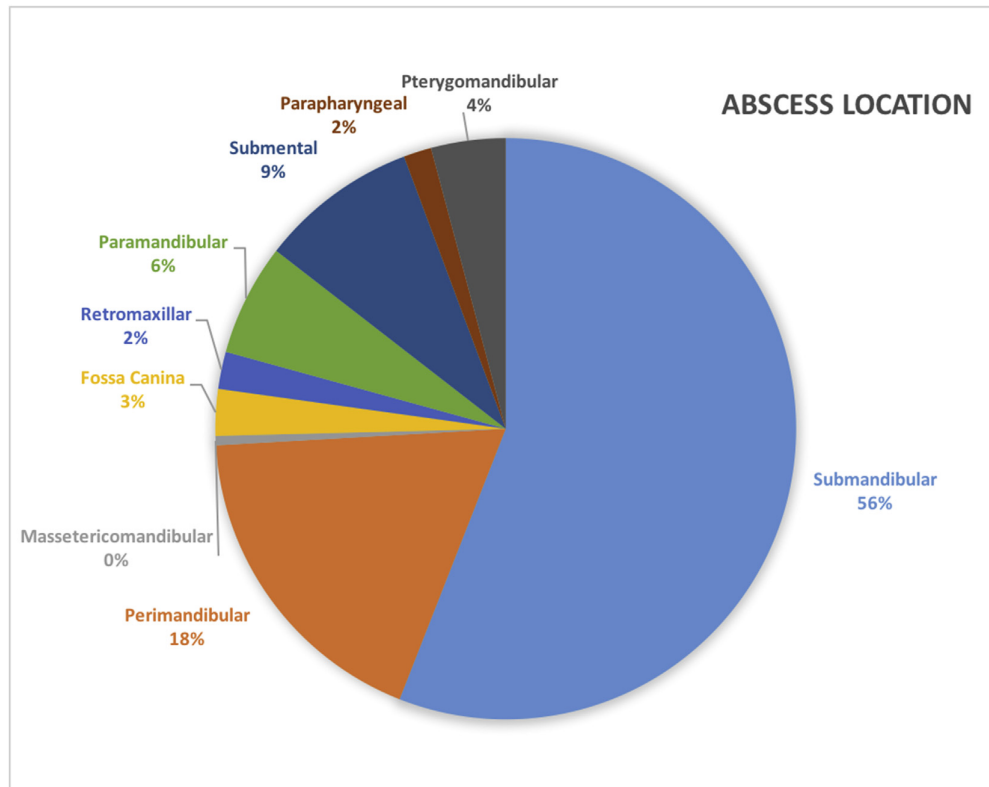


Fig. 2. Location of the abscesses. The most common abscess locations were the submandibular and perimandibular areas.

Neither the preoperative ($p = 0.276$) nor the postoperative ($p = 0.944$) WBC differed significantly between the groups.

Hence, it was assumed that there was no significant difference in illness severity between patients who received an additional antibiotic treatment and patients who had no postoperative antibiotic treatment.

According to the internal guidelines of Giessen University Hospital, we investigated whether the postoperative antibiotic prescriptions were in reality dependent on the surgical result. Data from 162 of the 206 patients were available. Table 1 shows that antibiotics were prescribed more frequently in cases without successful relief of pus than in cases with successful relief of pus. The chi-square statistic for six fields was significant ($p = 0.008$). Thus, it was concluded that the internal guidelines were considered in most cases.

LOS was measured in all patients. The median LOS was 5 days (range: 1–22 days). No difference was detected between the LOS of

patients with and without successful relief of pus ($p = 0.962$) (Fig. 3). The median LOS in patients who received a postoperative antibiotic was 6 days (range: 1–22 days), while the LOS of patients without antibiotic treatment was only 4 days (range: 1–19 days) ($p = 0.002$) (Fig. 4). A trend towards a longer treatment duration in patients who received a postoperative antibiotic was also observed in the outpatient clinic after the hospital stay. However, no significant difference was observed in the time of drainage removal between the groups ($p = 0.378$) (Fig. 5).

4. Discussion

Due to excessive use of antibiotics in the medical, veterinary and agricultural fields (Sandegren, 2014; Akindolire et al., 2015), selection pressure on bacteria has increased, and physicians find themselves facing the problem of antibiotic resistance more frequently. Abscesses are encapsulated entities; thus, it remains questionable whether antibiotics can reach them to improve treatment outcomes. Wiese and colleagues showed that, if an abscess cavity has developed, a hypertonic and acidic space bounded by the abscess capsule represents an osmotic system with its own dynamics that can operate independently of vital microorganisms, such that antibiotic therapy would not have any effect (Wiese et al., 1999). Thus, Al-Nawas and colleagues reported that 20% of severe odontogenic abscesses are culture-negative (Al-Nawas and Maeurer, 2008). However, another explanation was the rapid death of obligate anaerobes immediately after sampling.

Wiese and colleagues suggested that several mechanisms may reduce the efficacy of a systemic antibiotic even in the presence of microorganisms. If the antibiotic molecules are bigger than the pores of the abscess membrane, they are unable to diffuse into the

Table 1

Cross table between the postoperative administration of antibiotics and the surgical results (no pus, crumbling putrid secretion or pus). Data from 162 of 206 patients were available. The chi-square statistic for six fields showed a significant result ($p = 0.008$).

| | | Result of the surgical incision | | | Total |
|----------------|-------|---------------------------------|-----------------------------|-------|--------|
| | | No pus | Crumbling, putrid secretion | Pus | |
| No antibiotics | Total | 3 | 8 | 45 | 56 |
| | % | 10.7% | 30.8% | 41.7% | 34.6% |
| Antibiotics | Total | 25 | 18 | 63 | 106 |
| | % | 89.3% | 69.2% | 58.3% | 65.4% |
| | Total | 28 | 26 | 108 | 162 |
| | % | 17.3% | 16.0% | 66.7% | 100.0% |

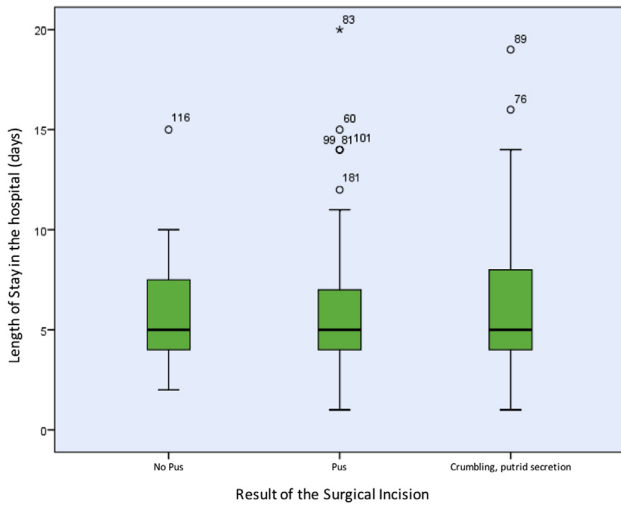


Fig. 3. Length of hospital stay (LOS) according to the surgical incision result ($p = 0.962$; Kruskal–Wallis test).

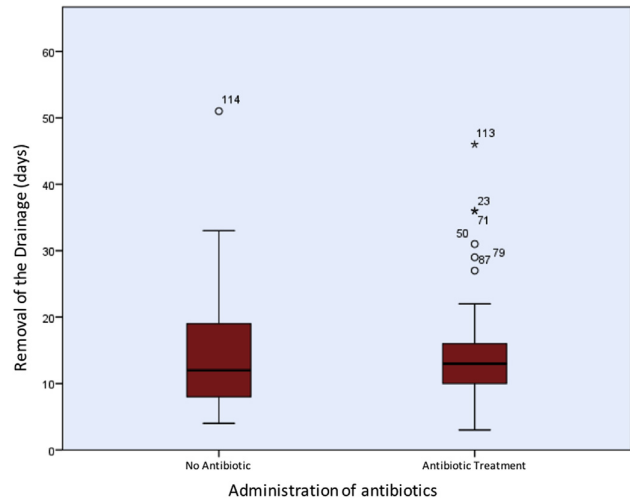


Fig. 5. Time between surgical incision and drainage removal. Only a trend towards a longer treatment time in patients who received an additional antibiotic treatment was observed ($p = 0.378$; Mann–Whitney U test).

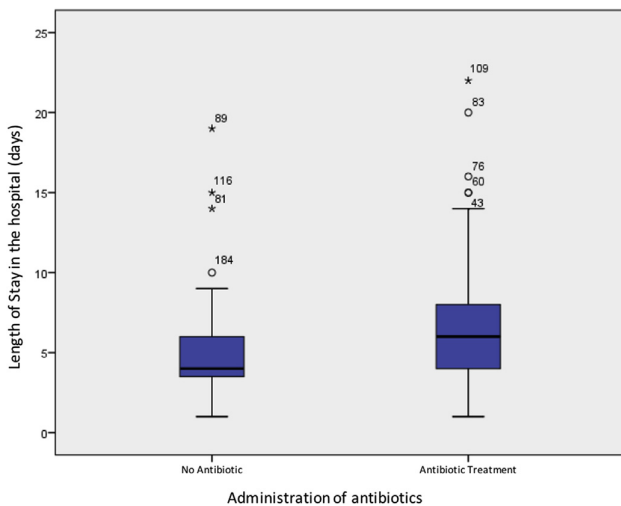


Fig. 4. The LOS according to the administration of antibiotics after the surgical incision ($p = 0.002$; Mann–Whitney U test).



Fig. 6. Surgical incision of an odontogenic abscess. Successful relief of pus.



Fig. 7. Surgical incision of an odontogenic abscess. Successful relief of crumbling, putrid secretion.

abscess cavity (mechanical exclusion) (Wiese et al., 1999). Ionised antibiotic molecules may also interfere with electrically charged proteins and may be repelled from the abscess (electrochemical exclusion) (Wiese et al., 1999). As a consequence of the high osmotic pressure in the abscess cavity, hydrostatic pressure may increase to such an extent that the particle stream into the abscess may decrease or stop. Thus, the antibiotic molecules would not reach the interior of the abscess (hydrostatic exclusion) (Wiese et al., 1999). Finally, it was concluded that the nearly 2,000 year old statement of Galen, “ubi pus, ibi evacua” (where [there is] pus, there evacuate [it]) has timeless validity (Wiese et al., 1999).

In the present study, the additional prescription of antibiotics after surgical treatment did not decrease therapy time, and the LOS of the antibiotic-treated patients was longer than that of the patients without additional antibiotic treatment. However, no significant difference was observed in the time of drain removal. Thereby, additional antibiotic therapy after an effective surgical treatment seems not to be necessary in most cases of serious

odontogenic abscesses if risk factors, such as immunosuppressive therapy, antiresorptive therapy (i.e. bisphosphonates), poorly controlled diabetes mellitus or symptoms of sepsis are absent.



Fig. 8. Surgical incision of an odontogenic abscess: In this situation, it was not possible to relieve the pus.



Fig. 9. Drainage of an odontogenic abscess with an easy-flow drain. The drain is fixed with a safety pin and adhesive tape to avoid stitches adjacent to the pus.

Overall, the results indicate that additional intravenous administration of antibiotics can lead to a longer treatment time. Warnke and colleagues treated about one-third of 94 patients successfully without antibiotic therapy and they recommended additional administration of intravenous penicillin for the rapid resolution of clinical symptoms in the majority of patients with significant odontogenic abscesses (Warnke et al., 2008). However, this recommendation cannot be supported by the data of the present study because we did not show an improvement in the outcome after the additional administration of antibiotics. The results of this study rather confirm the utility of the existing internal guidelines of Giessen University Hospital, which state that no additional antibiotic therapy is needed if successful surgical drainage is achieved in normal cases without the above-mentioned risk factors.

Additional antibiotic therapy is useful if it is not possible to treat the pus or crumbling putrid secretion during surgical incision. Such a situation does not dovetail with an effective surgical therapy. Although the patient may be suffering from severe swelling, the abscess may not have finished developing. In this case, the odontogenic infection represents an inflammatory infiltrate that without adequate therapy could abscess in the future. In contrast, it is also possible that an already existing abscess will not be relieved by

surgical incision. In both cases, additional antibiotic therapy is desirable from a pathophysiological perspective. In cases of an inflammatory infiltrate, the above mentioned considerations regarding the development of an osmotic system (Wiese et al., 1999) do not apply and greater efficacy of the antibiotic therapy would be expected than in presence of a mature abscess. In cases of an already existing abscess that is not sufficiently relieved by a surgical incision, it is better to administer antibiotics rather than apply no therapy at all.

In the framework of this retrospective study, it is difficult to understand the reasons for postoperative administration of antibiotics. No significant difference was observed in the pre- or postoperative CRP levels and the WBCs of patients who received additional antibiotic therapy and those who did not. Table 1 shows that only the result of the incision procedure itself had a significant effect on the therapeutic modality chosen. Thus, it was concluded that patients who received additional antibiotic therapy did not have a more severe illness than those who did not, and the two patient groups were thus comparable to each other. The LOS and time to remove the drainage also did not point to an advantage of applying antibiotic therapy.

Many studies have described ways to apply antibiotics in odontogenic infections in consideration of the increasing number of resistant bacteria (Warnke et al., 2008; Moloney and Stassen, 2009; Dinsbach, 2012; Cope et al., 2014a). However, other studies have found that even dental surgeons frequently prescribe inappropriate antibiotics that ultimately promote the development of antimicrobial resistance (Cope and Chestnutt, 2014b; Haque et al., 2019). Overall, at least 30–50% of all antimicrobials were prescribed without clear justification (Shapiro et al., 2014; Haque et al., 2019). Given the often polymicrobial spectra of odontogenic infections (Plum et al., 2018) and the increasing extent of antimicrobial resistance (Haque et al., 2019), the effectiveness of empirical antimicrobial therapy may be compromised (Bahl et al., 2014). Thus, ampicillin resistance attained almost 90% (Bahl et al., 2014; Plum et al., 2018) and clindamycin and metronidazole resistance up to 15% (Bahl et al., 2014; Shakya et al., 2018). In particular, beta-lactamase inhibitor-induced resistance was evident in obligate anaerobic bacteria such as *Prevotella* spp. (Kuriyama et al., 2007), which are often not reliably identified using standard microbiological diagnostic procedures (Jagadish Chandra et al., 2017). The antimicrobial-resistance problem may thus be even more severe than previously thought, and its frequency may explain the lack of efficacy of additional antibiotic therapy found in the present study. We have treated every patient with a single course of a perioperative antibiotic prophylaxis to reduce the hematogenous spread of bacteria caused by the incision procedure itself. De Jonge et al. (de Jonge et al., 2017) have shown that perioperative antibiotic prophylaxis is best timed if the administration is carried out in a time frame of 120 min before surgery. To prevent a falsification of the microbiological sample of the pus, we have delayed the prophylaxis for a short moment to the time directly after incision as a compromise. Cohen et al. (2017) have shown that the use of surgical antibiotic prophylaxis was not associated with post-operative antibiotic-resistant infections. As described above, antibiotic resistance rather results from inappropriate prehospital administration of antibiotics.

Furthermore, in cases of deficient use of antibiotic agents, there is also the possibility of a chronification of the infection (Al-Nawas and Karbach, 2016), which can result in a longer recovery time. Hence, the latest German guidelines (Al-Nawas and Karbach, 2016) recommend not applying antibiotics after successful surgical incision of an odontogenic abscess if it shows no tendency toward expansion (e.g. lockjaw, extra-oral swelling, difficulties in swallowing, fever or extra-oral pressure pain) and if general risk factors

(immunosuppression, diabetes mellitus, antiresorptive therapy or reduced general condition) are absent. The present study showed that additional antibiotic therapy can also be waived if patients exhibit symptoms of expansion (e.g. lockjaw, extra-oral swelling, difficulties in swallowing, or fever) and if surgery must be performed under general anaesthesia, as long as the above-mentioned general risk factors are still absent. In this way, about one-third of the patients in the present study were treated successfully without postoperative antibiotics, and no disadvantage for these patients was evident. Nevertheless, the clinical decision as to whether a patient should receive additional antibiotic therapy can be difficult, although it may never be a mistake to administer an antibiotic to a patient who suffers from a severe odontogenic infection. In cases of general risk factors or local or systemic complications, an effective intravenous antibiotic therapy is always necessary in addition to rapid surgical incision and drainage (Opitz et al., 2015).

5. Conclusion

Given the increasing numbers of antibiotic-resistant bacterial strains, the possible side effects of antibiotic therapy, and the risk of chronification, we would recommend our proven guideline in routine treatment of patients with serious odontogenic abscesses, even in the presence of expansion signs (e.g. lockjaw, extra-oral swelling, difficulties in swallowing, or fever) and the need for treatment under general anaesthesia.

Rapid incision and drainage including microbiological sampling directly followed by a single course of perioperative antibiotic prophylaxis remains the cornerstone of therapy. If surgery is successful, additional postoperative antibiotic treatment can be avoided in the absence of risk factors (immunosuppression, poorly controlled diabetes mellitus, any antiresorptive therapy, or signs of generalized sepsis). The overall topic and our results should be further investigated prospectively.

Declaration of Competing Interest

None.

References

- Akindolire MA, Babalola OO, Ateba CN: Detection of antibiotic resistant staphylococcus aureus from milk: a public health implication. *Int J Environ Res Public Health* 12: 10254–10275, 2015
- Al-Nawas B, Karbach J: S3-leitlinie (langversion): odontogene infektionen. Leitlinien Zahnmedizin. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, www.awmf.org; 2016
- Al-Nawas B, Maeurer M: Severe versus local odontogenic bacterial infections: comparison of microbial isolates. *Eur Surg Res* 40: 220–224, 2008
- Bahl R, Sandhu S, Singh K, Sahai N, Gupta M: Odontogenic infections: microbiology and management. *Contemp Clin Dent* 5: 307–311, 2014
- Bali RK, Sharma P, Gaba S, Kaur A, Ghanghas P: A review of complications of odontogenic infections. *Natl J Maxillofac Surg* 6: 136–143, 2015
- Bertossi D, Barone A, Iurlaro A, Marconcini S, De Santis D, Finotti M, Procacci P: Odontogenic orofacial infections. *J Craniofac Surg* 28: 197–202, 2017
- Celakovsky P, Kalfert D, Smatanova K, Tucek L, Cermakova E, Mejzlik J, Kotulek M, Vrbacky A, Matousek P, Stanikova L, Hoskova T: Bacteriology of deep neck infections: analysis of 634 patients. *Aust Dent J* 60: 212–215, 2015
- Cohen ME, Salmasian H, Li J, Liu J, Zachariah P, Wright JD, Freedberg DE: Surgical antibiotic prophylaxis and risk for postoperative antibiotic-resistant infections. *J Am Coll Surg* 225: 631–638, 2017 e633
- Cope A, Francis N, Wood F, Mann MK, Chestnutt IG: Systemic antibiotics for symptomatic apical periodontitis and acute apical abscess in adults. *Cochrane Database Syst Rev* Cd010136, 2014a
- Cope AL, Chestnutt IG: Inappropriate prescribing of antibiotics in primary dental care: reasons and resolutions. *Prim Dent J* 3: 33–37. <https://doi.org/10.1308/205016814813877333>, 2014b
- de Jonge SW, Gans SL, Ateba JJ, Solomkin JS, Dellinger PE, Boermeester MA: Timing of preoperative antibiotic prophylaxis in 54,552 patients and the risk of surgical site infection: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* 96: e6903, 2017
- Dinsbach NA: Antibiotics in dentistry: bacteremia, antibiotic prophylaxis, and antibiotic misuse. *Gen Dent* 60: 200–207, 2012 quiz 208–209
- Eckert AW, Hohne C, Schubert J: [pathogen spectrum and resistance status of exclusively anaerobic odontogenic infections]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4: 153–158, 2000
- Eckert AW, Maurer P, Wilhelms D, Schubert J: [soft tissue infections in oral, maxillofacial, and plastic surgery. Bacterial spectra and antibiotics]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 9: 389–395, 2005
- Flynn TR: The swollen face. Severe odontogenic infections. *Emerg Med Clin North Am* 18: 481–519, 2000
- Flynn TR, Shanti RM, Hayes C: Severe odontogenic infections, part 2: prospective outcomes study. *J Oral Maxillofac Surg* 64: 1104–1113, 2006a
- Flynn TR, Shanti RM, Levi MH, Adamo AK, Kraut RA, Trieger N: Severe odontogenic infections, part 1: prospective report. *J Oral Maxillofac Surg* 64: 1093–1103, 2006b
- Han X, An J, Zhang Y, Gong X, He Y: Risk factors for life-threatening complications of maxillofacial space infection. *J Craniofac Surg* 27: 385–390, 2016
- Haque M, Sartelli M, Haque SZ: Dental infection and resistance-global health consequences. *Dent J (Basel)* 7(1), 2019 dj7010022
- Heim N, Faron A, Wiedemeyer V, Reich R, Martini M: Microbiology and antibiotic sensitivity of head and neck space infections of odontogenic origin. Differences in inpatient and outpatient management. *J Craniomaxillofac Surg* 45: 1731–1735, 2017
- Jagadish Chandra H, Sripathi Rao BH, Muhammed Manzoor AP, Arun AB: Characterization and antibiotic sensitivity profile of bacteria in orofacial abscesses of odontogenic origin. *J Maxillofac Oral Surg* 16: 445–452, 2017 Epub 12016 Sep. 12623
- Kataria G, Saxena A, Bhagat S, Singh B, Kaur M, Kaur G: Deep neck space infections: a study of 76 cases. *Iran J Otorhinolaryngol* 27: 293–299, 2015
- Kuriyama T, Williams DW, Yanagisawa M, Iwahara K, Shimizu C, Nakagawa K, Yamamoto E, Karasawa T: Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol* 22: 285–288, 2007
- Lee YQ, Kanagalingam J: Bacteriology of deep neck abscesses: a retrospective review of 96 consecutive cases. *Singapore Med J* 52: 351–355, 2011
- Moloney J, Stassen LF: Antibiotics in odontogenic infection. *J Ir Dent Assoc* 55: 242–245, 2009
- Mucke T, Dujka N, Ermer MA, Wolff KD, Kesting M, Mitchell DA, Ritschl L, Deppe H: The value of early intraoral incisions in patients with perimandibular odontogenic maxillofacial abscesses. *J Craniomaxillofac Surg* 43: 220–223, 2015
- Opitz D, Camerer C, Camerer DM, Raguse JD, Menneking H, Hoffmeister B, Adolphs N: Incidence and management of severe odontogenic infections—a retrospective analysis from 2004 to 2011. *J Craniomaxillofac Surg* 43: 285–289, 2015
- Plum AW, Mortelliti AJ, Walsh RE: Microbial flora and antibiotic resistance in odontogenic abscesses in upstate New York. *Ear Nose Throat J* 97: E27–E31. <https://doi.org/10.1177/0145561318097001-0145561318097207>, 2018
- Poeschl PW, Spusta L, Russmueller G, Seemann R, Hirschl A, Poeschl E, Klug C, Ewers R: Antibiotic susceptibility and resistance of the odontogenic microbiological spectrum and its clinical impact on severe deep space head and neck infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 110: 151–156, 2010
- Sandegren L: Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations. *Ups J Med Sci* 119: 103–107, 2014
- Shakya N, Sharma D, Newaskar V, Agrawal D, Shrivastava S, Yadav R: Epidemiology, microbiology and antibiotic sensitivity of odontogenic space infections in central India. *J Maxillofac Oral Surg* 17: 324–331, 2018 Epub 12017 Apr 12611
- Shapiro DJ, Hicks LA, Pavia AT, Hersh AL: Antibiotic prescribing for adults in ambulatory care in the USA, 2007–09. *J Antimicrob Chemother* 69: 234–240, 2014 Epub 2013 Jul 1025.
- Wagner C, Saueremann R, Joukhadar C: Principles of antibiotic penetration into abscess fluid. *Pharmacology* 78: 1–10, 2006
- Warnke PH, Becker ST, Springer IN, Haerle F, Ullmann U, Russo PA, Wiltfang J, Fickenscher H, Schubert S: Penicillin compared with other advanced broad spectrum antibiotics regarding antibacterial activity against oral pathogens isolated from odontogenic abscesses. *J Craniomaxillofac Surg* 36: 462–467, 2008
- Wiese KG, Merten HA, Wiltfang J, Luhr HG: [clinical studies on the pathophysiology of odontogenic abscesses]. *Mund Kiefer Gesichtschir* 3: 242–246, 1999

3. Atypische odontogene Infektionen

Das Kennzeichen einer typischen odontogenen Infektion ist, dass diese durch geeignete Maßnahmen unkompliziert und effektiv zur Ausheilung gebracht werden kann. Die Sanierung des odontogenen Focus durch eine Wurzelkanalbehandlung, eine Zahnextraktion oder eine geeignete parodontale Behandlung sowie im akuten Stadium durch eine chirurgische Therapie, die gegebenenfalls durch eine antibiotische Therapie ergänzt werden kann, führt in der Regel zu einer Ausheilung ohne Langzeitfolgen für den Patienten. Dem gegenüberstellen kann man atypisch verlaufende odontogenen Infektionen, die als wesentliches gemeinsames Kennzeichen haben, dass sie durch die oben genannten Maßnahmen nicht oder nicht unkompliziert zur Ausheilung gebracht werden können [34,35]. Wie der Begriff der odontogenen Infektion selbst, so ist auch der Begriff der atypischen odontogenen Infektion bislang nicht eindeutig definiert worden. Er wird jedoch von vielen Autoren immer dann verwendet, wenn sich in der täglichen Praxis der sehr häufig auftretenden typischen odontogenen Infektionen solche zeigen, die primär oder sekundär chronisch verlaufen und sich als therapierefraktär erweisen. Nicht selten wird in solchen Fällen ein potentiell dentogener Focus-Zahn nach dem nächsten entfernt, ohne, dass dies jedoch zum Persistieren der Beschwerden führen würde. Die betroffenen Patienten werden typischerweise von (Zahn-)Arzt zu (Zahn-)Arzt überwiesen und landen am Ende nicht selten in den Universitätskliniken, weil die Erkrankungen im gesamten ambulanten medizinischen Sektor nicht erfolgreich behandelt werden konnten. Es handelt sich bei diesen Erkrankungen um eine heterogene Gruppe von Infektionen, die durch chronische Knochen- und Weichgewebeschwellungen, Lymphknotenschwellungen, Fistelbildungen, rezidivierende Exazerbationen und vor allem durch chronische Schmerzen gekennzeichnet sind. Fast immer zeigt das Röntgenbild der Kiefer pathologische Auffälligkeiten, die auch bei einer normalen odontogenen Infektion auftreten können. Der Leidensdruck dieser Patienten ist häufig erheblich und die Anamnese zeichnet sich bei ihnen typischerweise durch zahlreiche vorausgegangene Therapieversuche aus. Nicht selten zeigen mikrobiologische und

pathologische Untersuchungen von Abstrichen und Gewebsproben ein unspezifisches Bild, ohne die Ursache der Erkrankung klären zu können [35]. Gelegentlich können aber auch pathogene Keime nachgewiesen werden, die für eine odontogene Infektion absolut untypisch sind [36,37]. Folgende Erkrankungen präsentieren sich typischerweise unter dem Bild einer atypischen odontogenen Infektion (Tabelle 2):

Atypische odontogene Infektionen

Aktinomykose der Kiefer und der Weichteile

Akute und chronische Kieferosteomyelitis

Superinfizierte medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen

Superinfizierte Osteoradionekrose der Kiefer

Andere atypische odontogene Infektionen

Tabelle 2: Atypische odontogene Infektionen.

Davon abzugrenzen sind die Differentialdiagnosen der nicht odontogenen Infektionen, die normalerweise auch keine röntgenologischen Veränderungen der Kieferknochen hervorrufen. Hierzu zählen die akute und die chronische Sialadenitis, die Tuberkulose, die Katzenkratzkrankheit, die infektiöse Mononukleose, die Toxoplasmose, die Brucellose sowie die atypische Mycobacteriose [38]. Auch ein malignes Lymphom als nicht infektiöse Erkrankung muss in der Differentialdiagnostik berücksichtigt werden [38]. All diesen Erkrankungen ist wie bereits angedeutet gemeinsam, dass die Diagnostik oft schwierig ist [35] und die einfache Entfernung eines potentiellen odontogenen Focus unter der Annahme einer typischen odontogenen Infektion keine merkliche Auswirkung auf den Verlauf der Erkrankung hat.

3.1. Aktinomykose der Kiefer und der Weichteile

Die Aktinomykose ist eine spezifische Erkrankung, die durch Bakterien der Gattung *Actinomyces* ausgelöst wird [39]. Sie ist insgesamt selten [40], sie kommt aber mit mehr

als 50% der Fälle am häufigsten im cervicofacialen Bereich vor [41]. Actinomyceten sind nicht sporenbildende fakultativ anaerobe Bakterien der normalen physiologischen Mundflora, die sich an den Zahnfleischsäumen, in tonsillären Krypten und besonders in parodontalen Taschen, Zahnplaque und kariösen Zähnen befinden [42]. Dementsprechend gelten eine schlechte Mundhygiene, sowie Traumata der oralen Mukosa und zahnärztlich-chirurgische Maßnahmen als prädisponierende Faktoren für diese Erkrankung [41]. Auch wird eine Häufung im Zusammenhang mit Immunsuppressionen und der Applikation von Bisphosphonaten diskutiert [43]. Die Eintrittspforte der Bakterien muss nicht immer zwingend ein dentaler Focus sein, sie ist es vermutlich aber in den allermeisten Fällen. Hierbei kann zunächst nur eine nicht abheilende Zahnalveole nach der Extraktion eines Focus-Zahnes das einzige Zeichen der Erkrankung sein, bevor sich die Erkrankung dann in typischer Weise ausbreitet [35,44]. Die meisten zervikofazialen Aktinomykosen betreffen den Unterkiefer [40]. In einer Studie der Universität Köln wurde die Häufigkeit der Lokalisationen mit 53,6% für den Unterkiefer, mit 16,4% für die Wange, mit 13,3% für das Kinn, mit 10,7% für den aufsteigenden Unterkieferast, mit 5,7% für die Maxilla und mit 0,3% für das Kiefergelenk angegeben [40]. Eine Aktinomykose präsentiert sich klinisch typischerweise als langsam progrediente Entzündung, die anatomische Barrieren nicht respektiert und häufig zu Fistelbildungen führt [45]. Im cervikofazialen Bereich zeigen sich häufig brettharte, livide Schwellungen die nach einem schmerzhaften Initialstadium auch vollständig schmerzfrei sein können [44]. Die Erkrankung kann auch das Vorhandensein eines malignen Tumors oder einer spezifischen granulomatösen Entzündung vortäuschen [40,43]. Obwohl sie in der Regel primär chronisch verläuft, sind auch akute Verläufe möglich [34], insbesondere wenn es zu Superinfektionen mit anderen Keimen kommt [40]. Hierbei könnte auch die typischerweise begleitende Flora aus anaeroben *Streptokokken*, fusiformen Bakterien, *Haemophilus*, *Actinobacillus actinomycetem comitans* und anderen gramnegativen Bakterien eine Rolle spielen [39]. Viele Autoren haben daraufhin gewiesen, dass die Diagnose einer Aktinomykose eine große Herausforderung darstellt [35,39,40,46].

Röntgenologisch, computertomographisch und kernspintomographisch sieht man häufig Zeichen einer Osteomyelitis und einer Osteolyse mit extensiven, bis an die äußere Haut heranreichenden, entzündlichen Veränderungen des umgebenden Weichgewebes, die jedoch keine akkurate Diagnose für die Ursache der Infektion liefern [41,47]. Das Fehlen einer Lymphadenopathie trotz des Vorhandenseins einer großen aggressiv erscheinenden Gewebsmasse mit entzündlichen Veränderungen kann ein hilfreicher Hinweis dabei sein, eine zervikofaziale Aktinomykose von einer malignen Erkrankung zu unterscheiden [40]. Entscheidend für die Diagnose ist jedoch die Durchführung von Inzisionsbiopsien zur Gewinnung von Gewebeproben für pathologische und mikrobiologische Untersuchungen [40]. Der typische mikroskopische Befund besteht aus einer äußeren Zone der Granulation und einer zentralen Zone der Nekrose, die multiple basophile Granula enthält, die wiederum lobulierte Mikrokolonien von *Actinomyces* darstellen [48]. Im Vergleich zur pathologischen Diagnostik stellt die kulturelle Diagnostik aufgrund der niedrigen Erfolgsraten eine besondere Herausforderung dar [40]. Auch unter Verwendung von geeigneten anaeroben Medien gelingt die Kultur von *Actinomyces* aufgrund des Überwachsens durch andere Keime, durch ungeeignete Medien, unsachgemäßen Probentransport oder durch eine vorausgegangene antibiotische Therapie in weniger als 50% der Fälle, so dass der pathologischen Untersuchung eine weitaus größere Bedeutung bei der Diagnostik einer Aktinomykose zukommt als der Kultur [49]. In jedem Fall wird empfohlen sowohl den Pathologen als auch den Mikrobiologen über den Verdacht auf eine Aktinomykose in Kenntnis zu setzen, um die Wahrscheinlichkeit eines positiven Untersuchungsergebnisses bei einem tatsächlichen Vorliegen der Erkrankung möglichst zu erhöhen. Im Vergleich zu einer typischen odontogenen Infektion bilden chirurgische Maßnahmen bei einer Aktinomykose nicht den Eckstein der Therapie [40]. Die Inzision von Abszessen und die Exzision von Fisteln stellen zwar ebenfalls wesentliche Therapiemaßnahmen dar [43], der Versuch einer alleinigen chirurgischen Resektion ohne eine gleichzeitige antibiotische Therapie führt jedoch häufig zur Ausbildung von Rezidiven [40]. Die primäre Therapie besteht

bei einer Aktinomykose daher aus einer langzeitigen Verabreichung von Antibiotika [43], wobei hier klassischer Weise die intravenöse und im Verlauf orale Verabreichung von Penicillin für einen Zeitraum von mindestens sechs bis zwölf Wochen empfohlen wird [40,50]. Es gibt jedoch aufgrund der begleitenden Bakterienflora, die ihrerseits auch wieder pathogen sein kann, auch Empfehlungen, Antibiotika mit einem breiteren Wirkungsspektrum wie etwa der Kombination aus einem Aminopenicillin und einem Betalaktamase-Inhibitor wie zum Beispiel Clavulansäure zu verwenden [43] und es werden zum Teil auch kürzere Therapiedauern empfohlen [49,51]. In jedem Fall stellt das Vorliegen einer Aktinomykose für den Behandler eine große Herausforderung sowohl bezüglich der Diagnostik als auch der Therapie dar, die sich deutlich vom Schwierigkeitsgrad einer typischen odontogenen Infektion abhebt.

3.2. Akute und chronische Kieferosteomyelitis

Bei der Osteomyelitis der Kiefer handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Knochenentzündungen, die ganz überwiegend den Unterkiefer betreffen und eine Vielzahl von klinischen Symptomen hervorrufen können [52-54]. Es wurden zahlreiche Klassifikationen publiziert [54] und es erfolgt oft keine einheitliche Abgrenzung zu anderen hier beschriebenen Krankheitsentitäten wie der Aktinomykose, der Osteoradionekrose oder der medikamenten-assoziierten Nekrose der Kiefer [35,55-57], die ihrerseits häufig mit einer begleitenden Osteomyelitis assoziiert sind [35,57]. Eine einfache und gebräuchliche Klassifikation ist die auf klinischen und radiologischen Aspekten basierende Zürich-Klassifikation, die die primär chronische von der akuten und der sekundär chronischen Osteomyelitis unterscheidet [54]. Dabei handelt es sich bei der primär chronischen Osteomyelitis um eine eigene, seltene Krankheitsentität unklarer Ursache, die durch einen nicht eitrigen Verlauf und keinen direkten Bezug zu einem odontogenen Focus gekennzeichnet ist [58], während die akute und sekundär chronische Osteomyelitis regelmäßig mit einem odontogenen Focus in Zusammenhang gebracht werden können [53] oder sogar als Komplikation einer odontogenen Infektion beschrieben werden [4]. Obwohl eine Osteomyelitis der Kiefer

nicht zwangsläufig durch einen odontogenen Focus verursacht sein muss [54,59], so ist doch davon auszugehen, dass bei der Mehrzahl der Kieferosteomyelitiden der Knochen über einen odontogenen Focus infiziert wird. Nach Bernier et al. ist die Osteomyelitis als Entzündung des Knochens und des Knochenmarkes definiert, die sich in den Kiefern nach einer chronischen odontogenen Infektion oder aufgrund diverser anderer Ursachen ergeben kann [52]. Die Situation kann akut, subakut oder chronisch sein, was völlig unterschiedliche klinische Bilder hervorrufen kann [52]. Während eine akute Osteomyelitis sich mit den akuten Entzündungszeichen damit weitgehend analog zur typischen odontogenen Infektion präsentiert, zeichnet sich die (sekundär) chronische Osteomyelitis entweder durch einen nicht suppurativen, diffus sklerosierenden Verlauf oder durch einen chronisch eitrigen Prozess aus [53]. Typische Befunde bestehen aus dem lokalen Schmerz, Fieber, Schwellung, dem Abgang von Eiter, intra- und extraoralen Fistelbildungen, fehlender Abheilung von Weichgewebsdefekten in der Mundhöhle, Hypästhesie in der betroffenen Gegend, pathologischen Frakturen und Trismus [59]. Die Diagnose der suppurativen chronischen Osteomyelitis basiert auf dem Vorhandensein von schmerzhaften Sequestrierungen und eitrigen Bereichen im zahntragenden Kiefer, die typischerweise resistent gegen gewöhnliche chirurgische und konservative Therapien sind [59,60]. Bei der nicht suppurativen, sklerosierenden Form zeigt sich hingegen typischerweise eine lange Anamnese mit intermittierendem Schmerz, Trismus, Druck und Parästhesien, wobei besonders der chronische Schmerz als Kardinalsymptom der Erkrankung gilt [53]. Radiologisch zeigt sich bei der suppurativen Form eine radioluzente Läsion, die sich vom Focus-Zahn aus im spongiösen Knochen ausbreitet, den kortikalen Knochen perforiert und lamellierte Periostreaktionen hervorruft [53]. Bei der chronisch sklerosierenden Form zeigen sich vermischte sklerotische und osteolytische Läsionen mit einer soliden Periostreaktion oder externen Knochenresorptionen, wobei die Sklerosierung im Laufe der Zeit immer ausgeprägter wird und die normale Knochenarchitektur verloren geht [53]. Histopathologische Untersuchungen zeigen in

der Regel einen pathologischen Knochenumbau (Bone-Remodeling) und die Präsenz von chronischen Entzündungszellen [59].

Neben dem klinischen, dem radiologischen und pathologischen Befund spielt aber auch der mikrobiologische Befund eine entscheidende Rolle in der Diagnostik. Hudson beschreibt hierzu, dass eine Kieferosteomyelitis, anders als Osteomyelitiden in anderen Bereichen des Körpers, in der Regel nicht durch eine Monoinfektion, wie zum Beispiel durch eine Infektion mit *Staphylococcus aureus*, ausgelöst wird [60,61]. Zahlreiche Autoren haben gezeigt, dass eine Kieferosteomyelitis wie eine typische odontogene Infektion polymikrobiell bewirkt wird [53,60], wobei die isolierten Bakterien mit *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* und anderen Opportunisten typisch für die Mundhöhle sind [60]. Es wird aber darauf hingewiesen, dass die mikrobiologischen Ergebnisse normalerweise nur wenig weiterhelfen, weil es die Kontamination der Knochenproben durch den Speichel schwierig macht, zwischen echten pathogenen Keimen im Knochengewebe und Kontaminationen aus dem Speichel zu unterscheiden [56]. Es ergibt sich daher eine ähnliche Situation wie bei der Aktinomykose: Die Erkrankung wird durch Bakterien der Mundhöhle verursacht, der kulturelle Nachweis der „schuldigen Bakterien“ gestaltet sich jedoch genau wie die Therapie als ausgesprochen schwierig bis unmöglich. Mit Hilfe der histopathologischen Untersuchung kann möglicherweise zwischen einer Osteomyelitis und einer Aktinomykose unterschieden werden, aber ein unauffälliger pathologischer Befund schließt weder eine Osteomyelitis noch eine Aktinomykose aus [56]. Vor diesem Hintergrund halten einige Autoren bakterielle Untersuchungen bei Verdacht auf eine Kieferosteomyelitis sogar für verzichtbar [56]. Andere Autoren haben Optimierungen in der Probenentnahme vorgeschlagen, ohne jedoch, dass hierdurch ein wesentlicher Fortschritt in der antiinfektiven Therapie abgeleitet werden konnte [56]. Wie oben beschrieben durchlaufen Patienten mit einer Kieferosteomyelitis häufig eine Odyssee an erfolglosen chirurgischen und antibiotischen Therapien und können am Ende doch nicht geheilt werden, weil die wahre Ursache für den chronischen Verlauf immer noch nicht ausreichend erforscht

ist [53]. Häufig wird dennoch eine Kombination aus einer Langzeitantibiotikatherapie und chirurgischen Maßnahmen empfohlen [59,60]. So sollen auf chirurgischer Seite alle potentiellen Infekt-Foci und Fremdkörper entfernt werden [53,60]. Ebenso sollen nekrotisches Gewebe und Knochensequester entfernt werden sowie multiple Proben zur histopathologischen und mikrobiologischen Untersuchung gewonnen werden [53,60]. Die mikrovaskuläre Perfusion kann gegebenenfalls durch Trepanation oder Decortikation des Knochens [53,60] sowie durch gut durchblutete Muskellappen und hyperbare Sauerstofftherapie verbessert werden [60]. Bei Frakturen oder Frakturgefährdung kann zuweilen eine stabile Osteosynthese erforderlich werden [60]. Bei protrahiertem Verlauf mit therapierefraktären Schmerzen kann ein befallener Bereich auch komplett reseziert und mittels eines mikrovaskulär anastomosierten Knochentransplantates rekonstruiert werden [60]. Bezüglich einer begleitenden antibiotischen Therapie gibt es weder bezüglich der Auswahl der Medikamente noch bezüglich der Dauer der Therapie einen einheitlichen Standard [53,54]. In der Regel kann eine chronische Osteomyelitis aber nicht mit Antibiotika allein erfolgreich zur Ausheilung gebracht werden [54]. Es wird empfohlen, während der chirurgischen Maßnahmen mindestens drei Gewebeproben zur anaeroben und aeroben Kultur zu entnehmen um hiervon abgeleitet eine möglichst zielgerichtete antibiotische Therapie durchführen zu können, auch wenn es wie oben beschrieben fraglich ist, ob durch mikrobiologische Untersuchungen ein „schuldiger Keim“ ermittelt werden kann. In jedem Fall sollte die verwendete Antibiotika-Kombination das gemischt aerob-anaerobe Spektrum odontogener Infektionen abdecken [54], weshalb wie bei der typischen odontogenen Infektion vorrangig eine Therapie mit einem Aminopenicillin und einem Betalaktamase-Inhibitor oder Clindamycin empfohlen wird [54]. Die Dauer der Therapie hängt vom Ausmaß der Entzündung, dem Vorhandensein von Implantaten und der Qualität der vorausgegangenen chirurgischen Maßnahmen ab [54]. In der Regel wird, wie bei der Behandlung einer Aktinomykose, eine Therapiedauer von 6 bis 12 Wochen angestrebt [54]. Auch die Kieferosteomyelitis stellt für den Behandler

eine große Herausforderung bezüglich der Diagnostik und der Therapie dar, die sich deutlich vom Schwierigkeitsgrad einer typischen odontogenen Infektion abhebt.

3.3. Superinfizierte medikamenten-assoziierte Kiefernekrose

Die medikamenten-assoziierte Knochennekrose der Kiefer (MRONJ) wird als eine eigene Krankheitsentität zunehmend etwa seit der Jahrtausendwende beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine Erkrankung, die an sich eigentlich keine Infektion, sondern eine medikamentöse Nebenwirkung darstellt. Obwohl die Stoffklasse der Bisphosphonate und die davon abgeleitete bisphosphonat-assoziierte Nekrose des Kiefers (BRONJ) die wohl bekannteste sein dürfte, weisen Kishimoto et al. darauf hin, dass ähnliche Nekrosen der Kieferknochen auch durch Denusomab, einen monoklonalen Antikörper gegen den Rezeptor Aktivator des NF-kappa B-Liganden (RANKL), hervorgerufen werden können (DRONJ) [62]. Weitere Substanzen, die ebenfalls Nekrosen der Kieferknochen hervorrufen oder auch in Kombination verstärken können, sind Bevacizumab und Sunitinib [62], aber auch Kortikosteroide [63], Methotrexat [64] und Drogen wie Kokain, Amphetamin und Metamphetamin [62]. Die Kieferknochen sind im Unter- und im Oberkiefer von den überaus zahlreichen Bakterien der Mundhöhle nur durch eine dünne Periostschicht und eine Mundschleimhaut mit einem dünnen Epithel mit einer abgeschwächten Bindegewebsschicht getrennt, während andere Knochen des Körpers durch wesentlich dickere Weichgewebe und die Haut deutlich besser geschützt werden [62]. Gleichzeitig ist bekannt, dass der Knochenstoffwechsel im alveolären Knochen der Kiefer etwa zehnmal höher ist als in den langen Röhrenknochen [65]. Obwohl die Pathogenese der medikamenten-assoziierten Kiefernekrose bislang nicht vollständig verstanden ist, spielt der deutlich höhere Knochenstoffwechsel der Kiefer vermutlich eine zentrale Rolle bei der körpereigenen Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen der Mundhöhle [62]. Hierzu werden zwei wesentliche Theorien zur Entstehung von Knochennekrosen in den Kiefern diskutiert. Die „Inside-Out“-Theorie beschreibt, dass die medikamentös bedingte Hemmung der Osteoklasten und der knöchernen

Angiogenese zu einer Hemmung des alveolären Knochenumbaus führt. Hier kann es, auch unter einer möglichen Beteiligung von Mikroorganismen zu einer Knochennekrose kommen, die dann sekundär zu freiliegenden Knochenarealen in der Mundhöhle führt [65]. Diese Areale können sich dann über Biofilmbildung infizieren und zu einem vorwiegend entzündlichen Krankheitsbild führen [65]. Die „Outside-In“-Theorie besagt hingegen, dass die Hemmung des Knochenstoffwechsels selbst noch keine Nekrose bewirkt. Erst das Eindringen von Bakterien aus der Mundhöhle über einen Focus-Zahn, eine Zahnalveole oder über Schleimhautdefekte führt über eine lokale Infektion des Knochens bei ausgebremstem Knochenstoffwechsel zur Ausbildung von infizierten Knochennekrosen [65]. Unabhängig von der Theorie spielen pathogene Bakterien der Mundhöhle letztlich sowohl bei der Entstehung der Erkrankung als auch im weiteren Verlauf eine große Rolle [62]. Es überrascht hierbei nicht, dass insbesondere auch *Actinomyces* in infizierten Kiefernekrosen gefunden wurde [62,66] und es überrascht ebenso wenig, dass 90% der Patienten mit einer medikamenten-assoziierten Kiefernekrose unter einer dauerhaften antibiotischen Therapie beschwerdefrei waren [67]. Kishimoto et al. weisen darauf hin, dass man einen weniger entzündlichen „Osteonekrosotyp“ von einem mehr entzündlichen „Osteomyelitistyp“ der Erkrankung unterscheiden kann [62]. Diese Unterscheidung beschreibt jedoch vermutlich mehr den Entzündungsgrad und das Erfordernis einer antibiotischen Therapie bei ein und derselben Erkrankung. Bertrand et al. hingegen sehen die medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen sogar als Untergruppe der Osteomyelitiden an [56]. Wie bei der Entstehung einer Osteomyelitis muss der Eintrag der kausativen Mikroorganismen in den Kieferknochen nicht zwangsläufig durch einen odontogenen Focus geschehen. Vermutlich wird dies aber in den aller meisten Fällen so sein [65], so dass die hier vorgenommene Klassifikation als odontogene Infektion durchaus ihre Berechtigung hat. So wurde in einer Untersuchung von knapp 3200 Patienten mit medikamenten-assoziiierter Kiefernekrose in 61,7% der Fälle eine Zahnextraktion als auslösendes Ereignis angegeben, während die Erkrankung nur in 14,8% der Fälle spontan auftrat [65]. Die übrigen Fälle ließen sich auf zahnärztliche

oder zahnärztlich-chirurgische Maßnahmen zurückführen [65]. Daher sollten gerade entzündliche odontogene Erkrankungen als potentieller Risikofaktor für die Entstehung einer medikamenten-assoziierten Knochennekrose nach einer Zahnextraktion angesehen werden [62]. In den meisten Fällen folgt auf die dann durchgeführten zahnärztlichen Maßnahmen eine entzündliche Reaktion, die dann nicht mehr zur Ausheilung gebracht werden kann. Das häufigste Symptom ist die nicht abheilende Extraktionswunde beziehungsweise die im Röntgenbild nicht verknöchernde Zahnalveole. Im Weiteren kommt es dann, wie von zahlreichen Autoren beschrieben, zum Bild des freiliegenden intraoralen Kieferknochens mit einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Osteomyelitis mit Fistelbildungen, Sequestrierungen und rezidivierenden Abszessen in den umgebenden Weichgeweben [62,65,67]. Je stärker der entzündliche Aspekt ist, desto deutlicher verschlechtert sich die Gesamtsituation des Patienten und desto weiter schreitet der Prozess voran [62].

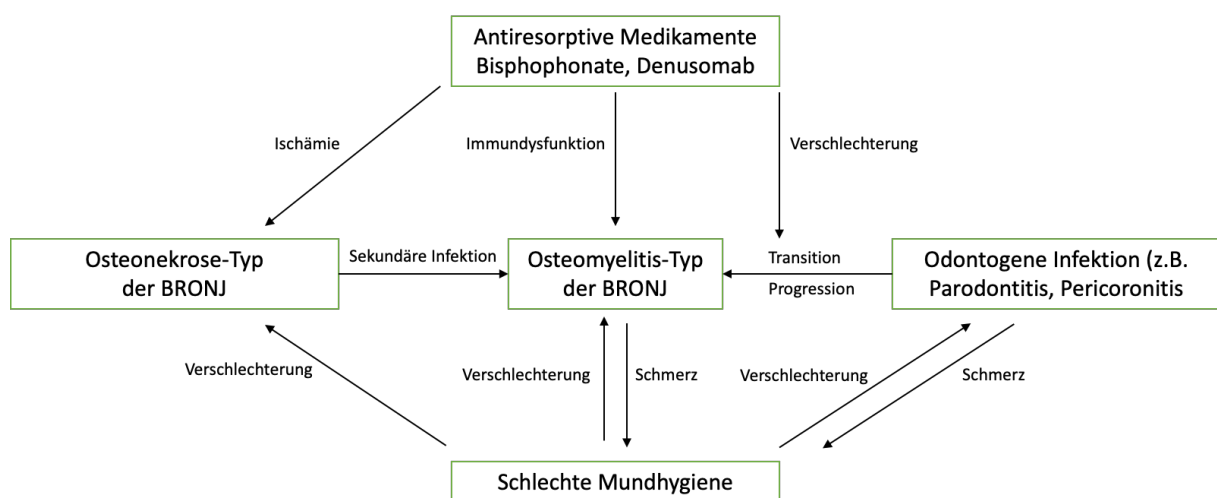


Abbildung 2: Pathophysiologie der medikamenten-assoziierten Kiefernekrosen nach Kishimoto et al. [62].

Viele Studien haben beschrieben, dass die Infektion das Schlüsselereignis in der Entwicklung einer medikamenten-assoziierten Kiefernekrose darstellt und dass entzündliche Erkrankungen der Zähne schon vor der ersten Verabreichung von Bisphosphonaten oder Denusomab durch eine Mundsanierung behandelt werden sollen [62]. Das Management der bereits aufgetretenen Erkrankung bleibt jedoch ein

kontrovers diskutiertes Thema. Es wurden zahlreiche Behandlungsprotokolle vorgeschlagen, aber es gibt bis heute keinen allgemeinen Konsens in Bezug auf viele entscheidende Fragen, etwa ob und wann eine chirurgische Therapie durchgeführt werden sollte [65]. Konservative Therapiestrategien bestehen darin, die entzündliche Aktivität der Erkrankung zu reduzieren, um den Progress der Erkrankung zu verhindern. Hierzu gehören antiseptische Mundspüllösungen, die lokale Desinfektion und Reinigung freiliegender Knochenoberflächen, die Verabreichung von Antibiotika und eine adäquate Schmerztherapie [62,67]. Weitere konservative Therapieansätze bestehen in der Verabreichung von Wachstumsfaktoren oder Teriparatide (N-terminal 34-amino acid recombinant human parathyroid hormone) [65,68] sowie in der Anwendung der hyperbaren Sauerstofftherapie [69].

Chirurgische Therapien reichen von kleineren, wenig invasiven Maßnahmen wie Knochenkürretage, Debridement und Sequestrotomie bis hin zu radikalen Maßnahmen wie der segmentalen Mandibulektomie oder der partialen Maxillektomie, wobei hier häufig umfangreiche Rekonstruktionsmaßnahmen der plastischen Chirurgie erforderlich werden, für die die oft kranken Patienten nicht immer geeignet sind [65]. Untersuchungen zeigen, dass sowohl die konservative als auch die chirurgische Therapie häufig keine zufriedenstellenden Ergebnisse hervorbringen [65]. Unklar bleibt auch die genaue Bedeutung der Mikroorganismen für das Auftreten und Voranschreiten der Erkrankung. De Ceulaer et al. haben in ihrer Übersichtsarbeit dargestellt, wie häufig *Actinomyces* bei Patienten mit medikamentenassoziierten Kiefernekrosen auftritt [66]. Demnach konnten invasive *Actinomyces* in 73,2% der metanalytisch untersuchten Patienten nachgewiesen werden, wobei die Autoren aufgrund der Schwierigkeiten beim Nachweis von *Actinomyces* noch von einer deutlichen Unterschätzung ausgingen [66]. Sie sahen sogar die Henle-Koch-Postulate als erfüllt an, nach denen der Organismus und die Krankheit gleichzeitig und in der richtigen Reihenfolge auftreten müssen und nach denen die Wirkung des Organismus auf die Erkrankung spezifisch bezüglich physiologischer, pathologischer, experimenteller und epidemiologischer Kriterien sein muss [66]. Für die Stoffklasse der

Bisphosphonate schlussfolgerten sie, dass das *Actinomyces* eine wesentliche Rolle in der Entwicklung der Erkrankung spielt und die bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose somit eine bisphosphonat-induzierte Osteomyelitis des Kiefers darstellt [66]. Sie konkludierten ferner, dass medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen gut auf antibiotische Langzeittherapien gegen *Actinomyces* anzusprechen scheinen, was von anderen Autoren auch bestätigt werden konnte [67].

In Hinblick auf die zuvor beschriebene Aktinomykose und die Kieferosteomyelitis wird klar, dass die Grenzen zwischen den Erkrankungen unscharf sind und hohe Anforderungen an die mikrobiologische Diagnostik gestellt werden. Wie die beiden zuvor genannten Erkrankungen, stellt auch die medikamenten-assoziierte Kiefernekrose hohe Anforderungen an den Behandler, da sie keinesfalls durch eine einfache zahnärztlich-chirurgische Focus-Sanierung zur Ausheilung gebracht werden kann.

3.4. Superinfizierte Osteoradionekrose der Kiefer

Eine Osteoradionekrose der Kiefer kann nach einer Bestrahlung der Kiefer auftreten, die häufig im Rahmen der Therapie von malignen Tumoren der Kopf- und Halsregion zur Anwendung kommt. Männer sind hierbei häufiger als Frauen und der Unterkiefer ist häufiger als der Oberkiefer betroffen [70]. Das Auftreten einer Osteoradionekrose wird um so wahrscheinlicher, je höher die applizierte Strahlendosis im Kieferknochen ausfällt [71]. Als Risikofaktoren werden, ähnlich wie bei der medikamenten-assoziierten Kiefernekrose, ein hohes Alter, Diabetes mellitus, vorexistierende orale Infektionen, schlechte Mundhygiene, Chemotherapie, Therapien mit Kortikosteroiden, Malnutrition, Immunsuppression und Rauchen angegeben [70]. Wie bei der medikamenten-assoziierten Kiefernekrose scheint am Beginn der Erkrankung in den allermeisten Fällen eine Zahnextraktion oder eine zahnärztlich-chirurgische Maßnahme zu stehen, über die es den Bakterien aus der Mundhöhle ermöglicht wird, in den vorgeschädigten Knochen einzudringen [70]. Meyer et al. haben hierzu die klassische Triade aus Bestrahlung, Trauma und Infektion beschrieben [72], wobei der

Infektion eine wesentliche Rolle für die Entstehung der Erkrankung zugeschrieben wurde. Die Erkenntnis, dass Osteoradionekrosen auch weniger stark oder nur oberflächlich infiziert sein können, hat dazu geführt, dass weitere Theorien zur Entstehung der Osteoradionekrose veröffentlicht wurden. Nach Marx kommt es nach der Bestrahlung zunächst zur Formation von hypoxisch-hypovaskulären und hypozellulären Gewebsarealen [71]. Dies kann zu Gewebsuntergängen und damit zu chronischen, nicht heilenden Wunden führen [71], die dann erst sekundär durch Mikroorganismen aus der Mundhöhle infiziert werden [73]. Die aktuell weitgehend akzeptierte Theorie der Pathogenese der Osteoradionekrose beschreibt einen radiogen induzierten fibro-atrophischen Prozess in drei Phasen [73,74]. In der ersten prä-fibrotischen Phase kommt es zu einer chronischen Inflammation mit einem Abbau von Kollagen und einer Destruktion von Endothelzellen, die durch freie Sauerstoffradikale aus der Wechselwirkung zwischen Strahlen und Gewebe entstehen [73]. In der zweiten, konstitutiv organisierenden Phase kommt es zu einer überschießenden fibroblastischen Aktivierung mit einer Desorganisation der extrazellulären Knochenmatrix und in der dritten, der späten fibroatrophischen Phase, zeigt sich abschließend ein fragiles und schlecht vaskularisiertes Gewebe, welches dann nach lokalen Verletzungen einer sekundären Infektion durch die Mikroorganismen der Mundhöhle ausgeliefert ist [73]. Ein solches lokales Trauma besteht wie oben beschrieben häufig aus einer zahnärztlichen Maßnahme wie etwa einer Zahnextraktion [75], auch wenn diese Konstellation für eine medikamenten-assoziierte Kiefernekrose als häufiger beschrieben wurde [76]. Wenn der vorgeschädigte Knochen im Sinne einer odontogenen Infektion über die offene Wunde von Bakterien der Mundhöhle superinfiziert wird, entsteht eine infizierte Osteoradionekrose [75,77]. Diese zeigt, wie eine superinfizierte medikamenten-assoziierte Kiefernekrose, das klinische und radiologische Bild einer Kieferosteomyelitis mit Osteolysen und Knochensequestern [78,79]. Die Patienten leiden unter Kieferschmerzen, Zahnlockerungen, Schleimhautschwellungen, Hautrötungen, Ulzerationen, Dysphagie, Kieferklemme und Parästhesien des Nervus alveolaris inferior [70]. In

fortgeschrittenen Stadien treten häufig intra- und extraorale Fisteln und besonders auch pathologische Frakturen auf [70]. Radiologisch zeigt sich im Vergleich zur medikamenten-assoziierten Kiefernekrose häufig eine stärkere Osteolyse und eine ausgedehntere Beteiligung der Weichgewebe, während eine periostale Reaktion eher nur bei der medikamenten-assoziierten Osteonekrose auftritt [76]. Histopathologische Untersuchungen zeigen, dass die Osteoradionekrose ein eher homogenes Bild mit einer deutlich ausgeprägten Fibrose zeigt, während man bei der medikamenten-assoziierten Knochennekrose eine Störung der normalen Knochenarchitektur mit einem Nebeneinander von vitalen und avitalen Bereichen nachweisen kann [76]. Wie bei der medikamenten-assoziierten Kiefernekrose ist auch bei der Osteoradionekrose in den meisten Fällen ein histopathologischer Nachweis von *Actinomyces* möglich [80]. Es konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von *Actinomyces* mit einer verschlechterten Prognose bezüglich einer erfolgreichen Therapie einhergeht [77]. Wie bei der medikamenten-assoziierten Kiefernekrose scheint die Infektion damit einen entscheidenden Einfluss auf den Progress der Erkrankung zu haben. In Hinblick auf die Therapie der Osteoradionekrose werden wie bei den medikamenten-assoziierten Kiefernekrosen präventive zahnärztliche Maßnahmen meist als wichtiger angesehen als die eigentliche Therapie [70]. Hierzu werden Mundhygieneinstruktionen, regelmäßige gründliche klinische und radiologische Untersuchungen der Zähne, die Behandlung von Karies und die atraumatische Entfernung von nicht erhaltungsfähigen Zähnen gezählt [70]. Die Entfernung nicht erhaltenswürdiger Zähne soll dabei mindestens 14 bis 21 Tage vor der geplanten Bestrahlung durchgeführt werden und es soll ferner sichergestellt werden, dass die chirurgischen Wunden vor dem Therapiebeginn einen sicheren Weichgewebsverschluss zeigen [70]. Zur eigentlichen Therapie der Osteoradionekrose existieren keine allgemein akzeptierten Therapiestandards und die Therapie hängt in vielen Fällen vom Ausmaß der Erkrankung ab [73]. Während in weniger ausgeprägten Fällen vor allem konservative Therapien durchgeführt werden, besteht die Therapie in schwereren Fällen vor allem in der Anwendung von chirurgischen Maßnahmen [73]. Konservative Therapien

bestehen in der Verabreichung von Antibiotika, der Anwendung von antiseptischen Mundspüllösungen und der Verbesserung der Mundhygiene [73]. Weitere Optionen bestehen in der Anwendung der hyperbaren Sauerstofftherapie und der Applikation von Ultraschall zur Verbesserung der lokalen Durchblutung und Sauerstoffversorgung [73]. In jüngerer Zeit wurde eine Langzeittherapie mit Pentoxifyllin, Tocopherol und Clodronat in Kombination mit Prednisolon und Ciprofloxacin vorgestellt, die selbst bei therapierefraktären Fällen noch gute Ergebnisse erzielen konnte [73,81]. Unter einer mehrmonatigen Therapiedauer konnte in Kombination mit Sequestrotomien eine Heilungsrate von 100% erreicht werden [81]. Als chirurgische Maßnahmen kommen die Entfernung von kleinen Knochensequestern, die Sequestrotomie, die Alveolektomie mit primärem Wundverschluss, die Exzision von oro-kutanen Fisteln und ausgedehnte Resektionen nekrotisch-infizierter Knochenareale zur Anwendung [73]. Wie bei der medikamenten-assoziierten Kiefernekrose können diese Maßnahmen der klinischen Situation entsprechend mit den konservativen Maßnahmen kombiniert werden [73]. Die Resektion des gesamten nekrotischen Knochens gilt hierbei als Ultima Ratio, die meist aufwändige rekonstruktive Maßnahmen nach sich zieht, für die die betroffenen Patienten aber aufgrund ihres Allgemeinzustandes und der vorausgegangenen Bestrahlung oft nur bedingt geeignet sind.

3.5. Andere atypische odontogene Infektionen

Atypische odontogene Infektionen zeichnen sich vor allem dadurch aus, dass sie nicht durch die Sanierung eines odontogenen Focus zur Ausheilung gebracht werden können und die Patienten prolongiert unter einer chronischen Infektion leiden. Wie oben beschrieben kann eine sorgfältige Anamnese dabei helfen, die Ursache für einen atypischen Verlauf zu klären. Wenn die Anamnese die Ursache der Erkrankung jedoch nicht aufklären kann, sollten neben einer sorgfältigen Beurteilung der klinischen und radiologischen Befunde auch pathologische und mikrobiologische Untersuchungen mit in die Diagnostik eingeschlossen werden. Wie bei der Diagnostik der

Aktinomykose zu sehen, kann der histopathologische Befund dabei wegweisend sein und zur Klärung der Ätiologie einer Erkrankung beitragen. Wie oben beschrieben, wird eine Aktinomykose unter Verwendung der gebräuchlichen Diagnostik eher durch den histopathologischen Befund als durch die mikrobiologische Untersuchung diagnostiziert [40]. Häufig kann bei einer atypischen Infektion der histopathologische Befund jedoch auch nur das Vorhandensein einer akuten oder chronischen Infektion mit den entsprechenden Entzündungszellen bestätigen, so dass zur Klärung der eigentlichen Krankheitsursache besondere Anforderungen an die mikrobiologische Untersuchung gestellt werden müssen. Wie bei der Aktinomykose zu sehen, kann die mikrobiologische Diagnostik aber auch nicht immer zuverlässig den oder die ursächlichen pathogenen Keime nachweisen [82]. So beschreiben mehrere Autoren, dass der Nachweis von *Actinomyces* mittels Kultur selbst unter optimalen Bedingungen nur in etwa 50% der Fälle gelingt [39,49]. Eckert et al. haben darauf hingewiesen, dass auch bei einer „normalen“ typischen odontogenen Infektion nicht immer alle beteiligten Keime suffizient bestimmt werden können [82]. Sie wiesen hierbei darauf hin, dass aber gerade die Kenntnis aller an dem entzündlichen Prozess beteiligten Mikroorganismen wichtig für die Auswahl einer gezielten antibiotischen Therapie sei [82]. Dies gilt insbesondere für die hier beschriebenen therapieresistenten atypischen odontogenen Infektionen. Wiese et al. beschreiben zudem, dass trotz des Vorliegens einer ausgeprägten abszedierenden odontogenen Infektion die mikrobiologische Untersuchung auch komplett ohne einen Bakteriennachweis ausfallen kann [28] und Bertrand et al. haben gezeigt, dass mikrobiologische Proben leicht durch gut kultivierbare Bakterien aus dem Speichel kontaminiert werden können und diese dann die eigentlichen pathogenen Keime in der Kultur überwachsen können [56]. Wenn man sich diese möglichen Fehlerquellen bei der mikrobiologischen Untersuchung vor Augen hält, wird deutlich, dass das Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung einer Probe anders und vorsichtiger interpretiert werden sollte als das histopathologische Ergebnis einer Biopsie. Während eine Biopsie beim Vorliegen einer tumorösen Raumforderung meist Klarheit über den

zugrunde liegenden pathologischen Prozess bringt, kann man vor allem bei einer odontogenen Infektion möglicherweise nicht automatisch davon ausgehen, dass das Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung mittels Kultur auch das „schuldige Bakterium“ nachweist. Möglicherweise werden keine oder zumindest nicht alle beteiligten Keime nachgewiesen und möglicherweise besteht das Ergebnis bei einem positiven Keimnachweis auch nicht aus dem ursächlichen Keim, sondern einer bakteriellen Kontamination aus dem Speichel oder von der Haut [56]. Da eine typische odontogene Infektion, wie im ersten Kapitel beschrieben, im Normalfall auch ohne Kenntnis des zugrunde liegenden Keimspektrums gut therapiert werden kann, spielen diese Fehlerquellen im klinischen Alltag nur selten eine Rolle. Bei der hier beschriebenen Gruppe von atypischen odontogenen Infektionen kann bei diagnostischer Unsicherheit die Anforderung an den mikrobiologischen Befund jedoch groß sein und in einem solchen Fall ist es wichtig, die möglichen Fehlerquellen bei der mikrobiologischen Diagnostik zu kennen. Dies zeigt der im Folgenden beschriebene Fall einer Delayed-Onset-Wundinfektion nach vorausgegangener Entfernung eines Weisheitszahnes, bei dem alle Kriterien einer atypischen odontogenen Infektion erfüllt waren. Erst unter Anwendung einer zusätzlichen, auf dem Nachweis von bakterieller Desoxyribonucleinsäure (DNA) basierenden Untersuchung, der 16S-rRNA-Gen-Analyse [83], konnte in diesem Fall die Ursache der Erkrankung im Nachhinein und abseits der klinischen Routinediagnostik geklärt werden.

3.6. Publikation 2: A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics

Einleitung: Delayed-Onset Infektionen treten als seltene postoperative Komplikationen nach der Extraktion von unteren Weisheitszähnen auf. In dem folgenden Artikel wird ein Fall einer chronischen kombinierten Hart- und Weichgewebeinfektion nach der Entfernung eines unteren Weisheitszahnes beschrieben, bei dem die verursachenden Organismen nur durch molekulare Methoden abseits der klinischen Routine nachgewiesen werden konnten.

Methodik: Eine experimentelle 16S-rRNA-Gen-Analyse mit Next-Generation-Sequencing und Bioinformatik wurde zur Identifizierung des bakteriellen Spektrums der Infektion eingesetzt. Die 16S-rRNA-Gen-Analyse lieferte das Mikrobiom der abszedierenden Entzündung, während die in der klinischen Routine durchgeführten kulturellen Analysen keinen Bakteriennachweis erbringen konnten.

Ergebnis: Das Mikrobiom zeigte eine bakterielle Mischinfektion mit einer Dominanz von *Delftia* und *Alcanivorax* neben anderen Bakterien der normalen Mundflora. Mittels der 16S-rRNA-Gen-Analyse, Next-Generation-Sequencing und Bioinformatik wurde eine neue, bislang unbekannte Art der chronischen Wundinfektion nach Weisheitszahn-Extraktion nachgewiesen.

Diskussion: Die Eigenschaft von *Delftia* und *Alcanivorax* als Wasser- und Umweltbakterien lässt den Verdacht auf eine Infektion durch kontaminiertes Wasser aus einer zahnärztlichen Einheit aufkommen. Daher sollten Osteotomien von Zähnen stets nur mit sterilem Kühlwasser durchgeführt werden. Die 16S-rRNA-Gen-Analyse sollte Teil der Routinediagnostik in der medizinischen Mikrobiologie werden.

Article

A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics

Sebastian Böttger ^{1,*}, Silke Zechel-Gran ², Philipp Streckbein ¹, Michael Knitschke ¹,
Torsten Hain ^{2,3}, Markus Weigel ², Jan-Falco Wilbrand ⁴, Eugen Domann ^{2,3},
Hans-Peter Howaldt ¹ and Sameh Attia ¹

- ¹ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Justus-Liebig-University Giessen, University Hospital Giessen and Marburg, Location Giessen, Klinikstrasse 33, D-35392 Giessen, Germany; Philipp.Streckbein@uniklinikum-giessen.de (P.S.); Michael.Knitschke@uniklinikum-giessen.de (M.K.); hp.howaldt@uniklinikum-giessen.de (H.-P.H.); sameh.attia@dentist.med.uni-giessen.de (S.A.)
 - ² Institute of Medical Microbiology, Justus-Liebig-University Giessen, Biomedical Research Facility Seltersberg (BFS), Schubertstrasse 81, D-35392 Giessen, Germany; Silke.Zechel@mikrobio.med.uni-giessen.de (S.Z.-G.); Torsten.Hain@mikrobio.med.uni-giessen.de (T.H.); Markus.Weigel@mikrobio.med.uni-giessen.de (M.W.); Eugen.Domann@mikrobio.med.uni-giessen.de (E.D.)
 - ³ German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Giessen-Marburg-Langen, Schubertstrasse 81, D-35392 Giessen, Germany
 - ⁴ Department for Cranio-Maxillofacial Surgery-Plastic Surgery, Diakonie Klinikum Jung-Stilling, Wichernstr. 40, D-57074 Siegen, Germany; jan-falco.wilbrand@uniklinikum-giessen.de
- * Correspondence: Sebastian.Boettger@uniklinikum-giessen.de; Tel.: +49-641-9854-6271

Received: 20 August 2020; Accepted: 26 September 2020; Published: 28 September 2020



Abstract: Delayed-onset infections are rare postoperative complications of lower third molar extractions. This article presents a case of a chronic combined hard and soft tissue infection after the extraction of a third molar, where the causative organisms could only be elucidated by molecular methods. Experimental 16S-rRNA gene analysis with next-generation sequencing and bioinformatics was used to identify the bacterial spectrum of the infection. 16S-rRNA gene analysis delivered the microbiome of the abscessing inflammation while standard culture and laboratory examinations were all sterile. The microbiome showed a mixed bacterial infection with a dominance of *Delftia* and *Alcanivorax* (spp.) besides other bacteria of the normal oral flora. Using 16S-rRNA-gene analysis, next-generation sequencing, and bioinformatics, a new type of chronic wound infection after wisdom tooth extraction was found. The property of *Delftia* and *Alcanivorax* (spp.) as water-affine environmental bacteria raises suspicion of infection from contaminated water from a dental unit. Thus, osteotomies of teeth should only be done with sterile cooling water. The 16S-rRNA gene analysis should become a part of the routine diagnostics in medical microbiology.

Keywords: 16S-rRNA gene analysis; third molar surgery; environmental bacteria; postoperative wound infection

1. Introduction

Bacterial infections in the field of oral and maxillofacial surgery are very common. With the application of antibiotics, the implementation of incision and drainage of abscesses, and with the removal of infected teeth, most infections can usually be treated fast and successfully [1–5]. Nevertheless, sometimes persistent subacute and chronic infections occur, where adequate therapy

can be a great challenge for practitioners and where treatment can take a long time [6]. Especially, delayed-onset wound infections after third molar extraction, which occur several weeks after suture removal and after discharge [7], can cause varying symptoms affecting hard and soft tissues [7–11]. Figueiredo et al. reported that those infections are normally caused by anaerobic bacteria of the oral flora, e.g., *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, and *Prevotella* strains, which in most cases can be successfully treated with combinations of surgical revision and antibiotics [9]. Other authors have shown that specific infections like Actinomycosis, which need specific therapy, have to be considered [6,12,13]. Additionally, cases of osteomyelitis of the jaw after third molar surgery have been previously described [14]. As delayed-onset infections occur only several weeks post-intervention [7,10], other diseases of non-odontogenic origin like atypical mycobacteriosis, tuberculosis, or cat scratch disease, which can present with similar symptoms, also have to be taken into account [15,16].

The present study shows a new type of delayed-onset wound infection after third molar surgery. This infection was resistant to antibiotic therapy and surgical revision. It was not possible to clarify the cause with standard culture and laboratory examinations. The study aimed to clarify this enigmatic infection by using 16S-rRNA gene analysis with next-generation sequencing and bioinformatics.

2. Patient and Methods

A 23-year-old woman in otherwise good general condition without any pre-existing illness visited the ambulance of oral and maxillofacial surgery at the university hospital. She suffered from inflammatory swelling and pain in the area of the wisdom tooth 38, which had been extracted by her dentist in a dental practice six months ago. After a post-operative symptom-free interval of several weeks, renewed swelling in the area of the extracted tooth and the adjacent cheek appeared. Thus, the dentist decided to start an antibiotic therapy on the patient, which was unsuccessful as an oral abscess formed, which was incised and drained. Since all attempts to treat the delayed-onset infection failed, the patient was referred to the university hospital.

At the first consultation, chronic inflammatory and rough tissue could be investigated in the area of the former tooth 38 without evidence of abscessing. Panoramic radiograph (Figure 1) showed a non-ossified alveolus of tooth 38 while the other alveoli of the wisdom teeth were already ossified regularly.

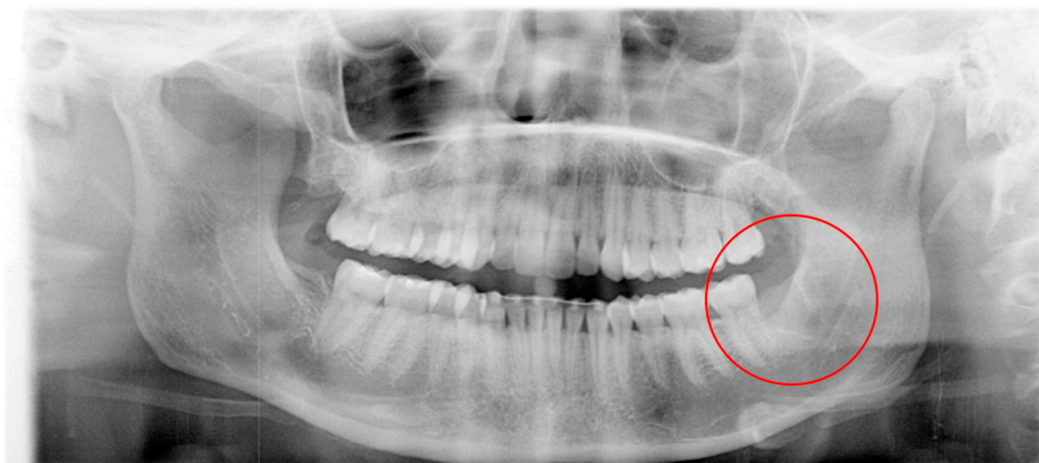


Figure 1. Panoramic radiograph at the first consultation. Alveolus of tooth 48 shows complete healing while ossification is missing in the area of tooth 38.

With the suspicion of an inflammatory tumor, a surgical incision was first carried out and tissue samples were harvested for histopathologic analysis. Histopathologic investigation revealed chronic inflammation with the formation of histiocytic and epithelioid cell granuloma. Molecular testing with polymerase chain reaction (PCR), especially the IS6110 profile, was unable to identify mycobacterial DNA fragments and there was no hint for an actinomycosis.

Wound revision led to a temporary improvement of the patient's complaints. However, after three weeks, the patient suffered from a renewed flare of the inflammation process with a rough extraoral swelling on the left cheek (Figure 2).



Figure 2. Development of an extra-oral swelling and redness despite surgical therapy.

Since antibiotic therapy failed, we decided to perform shortwave radiation (10 min; 5 times a day) with the intention of a purulent melting of the inflammation. After five days of therapy, heavy inflammatory signs could be observed. So, we decided to carry out an abscess incision in general anesthesia (Figure 3).

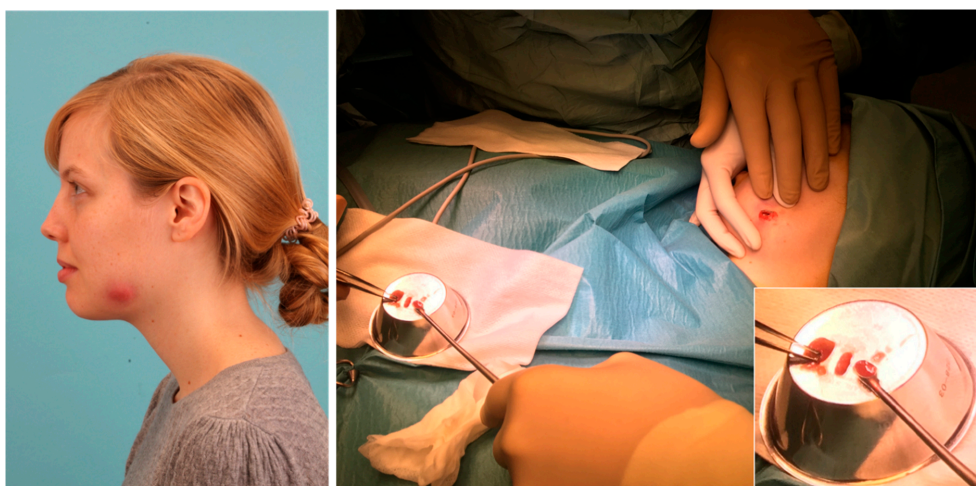


Figure 3. Red swelling of the left low mandible after five days of shortwave radiation therapy (left) and an interoperative picture of abscess incision (right).

During surgery, microbiological swabs from pus and native wound tissue were taken and subjected to microbiological culture. A further tissue sample was taken for a histopathological examination and some pus was preserved in a cuvette in a medical freezer at -80 degrees centigrade ($^{\circ}\text{C}$) for later experimental use.

Matching the clinical course, histopathological examination delivered the description of a chronically granulating partially purulent inflammation of the soft tissue, but there were no histopathological hints for actinomycosis. Molecular testing of the IS6110 profile for mycobacterial DNA fragments (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. microti*, *M. africanum*) was negative again. Microbiological culture was not able to detect any aerobic or anaerobic bacteria and the culture on *Actinomyces* was sterile too. Additionally, the culture on atypical mycobacteria was sterile after multiple weeks of culturing. Serological tests for *Bartonella henselae* and *Toxoplasma gondii* as well as a Quantiferon Gold for tuberculosis testing were also negative. Thus, the cause of the infection remained unclear despite the numerous examinations.

The patient was released from hospital two days after surgery. Postoperatively, we applied a calculated antibiotic therapy with Sultamicillin (750 mg BID) for 10 days. Nevertheless, healing of the inflammation could not be observed in the following weeks (Figure 4). Thus, we presented the case in the local interdisciplinary infection board about two months after surgery. Since all cultures were negative and even molecular and laboratory testing was inconspicuous, we decided to treat the infection as a soft tissue actinomycosis with Penicillin V (1.5 Mega TID) for six months.



Figure 4. Patient profile depicting the clinical picture of the infection before long-term antibiotic therapy (left), after three months of long-term penicillin application (middle), and after the termination of therapy after six months (right).

Applying the long-term antibiotic therapy, slow recovery with fading of the inflammatory redness could be observed (Figure 4). After six months, only a small reddish scar without signs of inflammation remained (Figure 4). Thus, we decided to discontinue the antibiotic therapy and to observe the situation for the next months. We did not observe a relapse during the next six months and we were able to complete the case at about one year after the first consultation. Only a small white scar of rough consistency remained in the area of former inflammation (Figure 5). Although our therapy was successful, the triggering cause was still unknown. Only by determining the microbiome of the pus by a subsequent experimental trial, we could retrospectively clarify the cause of this extraordinary delayed-onset infection after third molar surgery.



Figure 5. Final result: situation after 2.5 years after the first consultation.

The determination of the microbiome was carried out with 16S-rRNA amplicon sequencing and bioinformatics [17]. In prokaryotes, the 16S-rRNA gene carries the genetic information of the 16S ribosomal ribonucleic acid of the 30S subunit of the ribosome. This gene consists of variable and conserved areas. Conserved areas are not different between various bacterial genera while variable areas have high specificity for different bacterial genera. Based on the sequence of the variable areas of the gene, it is possible to assign bacterial DNA to a specific genus. Thus, 16S-rRNA amplicon sequencing works like a fingerprint, if the base sequence can be matched with a ribosomal database. It is particularly useful in identifying unusual bacteria that are difficult to identify by conventional methods, providing genus identification in >90% of cases [18]. In our case, bacterial DNA was first extracted from the initially frozen pus. Then, the variable area “V4” of the 16S-rRNA-genes was amplified by PCR using primers in the conserved flanking areas. The resulting amplicons of an approximate length of 350 to 370 bps were then equipped with indices and adapters for next-generation sequencing using the Illumina MiSeq System as described by the vendor (Illumina). After the sequencing of these amplicons, the bacteria-specific sequences were known and ready for bioinformatic analysis.

Bioinformatic analysis was carried out with the open-source software “Mothur” (mothur.org) and the SILVA ribosomal RNA gene database (www.arb-silva.de). In this way, the assignment of the amplicon sequence to the respective bacterial gene was managed, which enabled the determination of the microbiome of the pus sample. In addition to this qualitative identification, the frequencies of the identified amplicons were detected. With this quantitative approach, it was possible to conclude the frequencies of the individual bacterial genera in the pus sample.

After sequencing on the MiSeq platform using the MiSeq Reagent Kit v2, a total of 314,578 paired end reads with a length of about 250 nucleotides (nt) were obtained. As mentioned above, microbiome analysis was executed using Mothur (https://mothur.org/wiki/miseq_sop/, accessed on 20/09/2017) [19]. Paired end reads were joined, primer regions removed, and filtered for the expected amplicon length of $253 \text{ nt} \pm 10 \text{ nt}$ excluding sequences that contained ambiguous nucleotides. Joined paired end reads were aligned to the SILVA ribosomal RNA gene database [20], trimmed to contain only the hypervariable regions V4, and clustered with a similarity threshold of 97%. After chimera removal using the Mothur implementation of VSEARCH [21], a total of 59 operational taxonomic units (OTUs) representing 681 paired end reads were obtained. OTUs were finally classified against the SILVA ribosomal RNA gene database and exported in csv format.

Tables and graphs were created with Microsoft Excel 2016 and Microsoft Office Professional Plus 2016 (Microsoft, Washington, WA, USA).

The investigations used in this study were approved by the ethics committee of the Faculty of Medicine at Justus-Liebig University (Giessen, Germany; approval no. 191/16).

3. Results

The result of the 16S-rRNA gene sequencing elucidated the microbiome of the abscess. Although cultures were sterile, the microbiome shows a dominance of the genera *Delftia*, *Alcanivorax*, and *Porphyromonas*. An infection with *Actinomyces* or atypical Mycobacteria could be excluded. We could identify and prove a polymicrobial infection with a dominance of aerobic water-affine environmental bacteria as the cause of the delayed-onset infection after third molar surgery in the here discussed case (Table 1). The results are presented in a pie chart with relative frequencies (Figure 6). Figure 7 shows the metabolism of the bacterial genera in the pus sample.

Table 1. Relative frequency of DNA reads in the pus sample.

| Bacterial Genus | DNA-Reads (Relative in %) | Metabolism |
|---------------------------|---------------------------|-----------------------|
| <i>Alcanivorax</i> | 22.40 | aerobic |
| <i>Delftia</i> | 22.40 | aerobic |
| <i>Porphyromonas</i> | 11.20 | anaerobic |
| <i>Methylophilus</i> | 5.60 | aerobic |
| <i>Staphylococcus</i> | 4.27 | facultative anaerobic |
| <i>Oxalobacter</i> | 4.27 | anaerobic |
| <i>Ralstonia</i> | 4.27 | aerobic |
| <i>Prevotella</i> | 4.00 | anaerobic |
| <i>Bacillus</i> | 3.47 | aerobic |
| <i>Veillonella</i> | 3.47 | anaerobic |
| <i>Bradyrhizobium</i> | 2.40 | aerobic |
| <i>Haemophilus</i> | 2.40 | facultative anaerobic |
| <i>Sphingomonas</i> | 1.60 | aerobic |
| <i>Brevibacterium</i> | 1.33 | aerobic |
| <i>Corynebacterium</i> | 1.33 | facultative anaerobic |
| <i>Slackia</i> | 1.07 | anaerobic |
| <i>Stenotrophomonas</i> | 1.07 | aerobic |
| <i>Intrasporangium</i> | 0.80 | aerobic |
| <i>Peptostreptococcus</i> | 0.53 | anaerobic |
| <i>Rickettsia</i> | 0.53 | aerobic |
| <i>Streptococcus</i> | 0.53 | facultative anaerobic |
| <i>Atopobium</i> | 0.27 | facultative anaerobic |

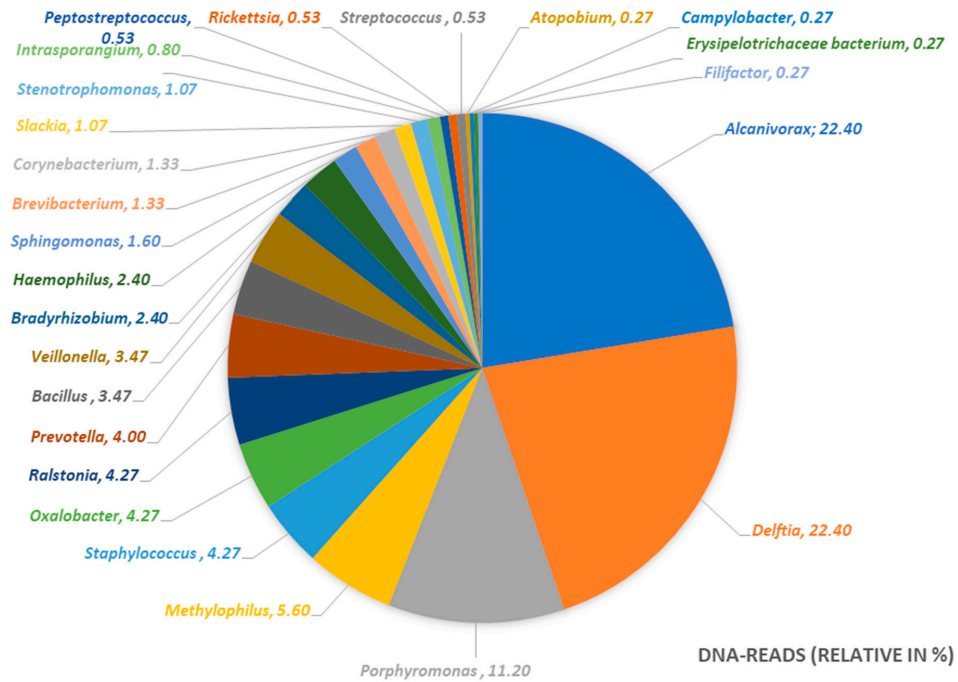


Figure 6. The microbiome of the pus sample. Relative frequencies show a predominance of *Alcanivorax*, *Delftia*, and *Porphyromonas* (spp.).

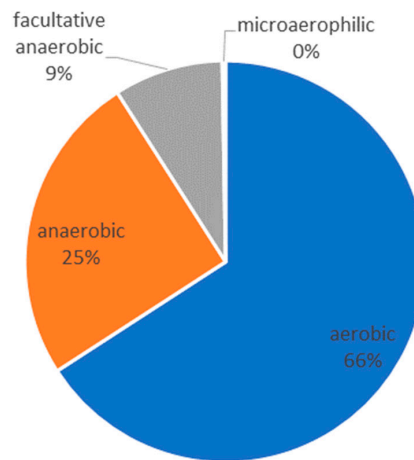


Figure 7. Metabolism of the bacterial genera in the pus sample. The identified bacteria predominantly have aerobic metabolism.

4. Discussion

Wound infections after third molar surgery can be classified into early onset infections and delayed-onset infections. While early onset infections occur in the early healing phase, delayed-onset infections do not appear until a time of about four to six weeks post-surgery and are almost only seen in the lower jaw [11]. The probability of the occurrence of a delayed-onset infection after third molar surgery is calculated with a frequency of 0.49% to 2.2% [7,11]. The cause of such infections often cannot be clarified [7,11]. Possible causes of infection include food impaction into the wound [11] and the formation of a hematoma under the flap [22]. Risk factors described in the literature include the

depth of inclusion of wisdom teeth [7,22,23], lack of distal space [8], a vertical or mesioangular tilt of the tooth [8], the need for intraoperative hemostasis [11], and total and tight wound closure [9]. Additionally, the changes in oral flora caused by systemic and topical antibacterial therapy could favor the development of opportunistic infections [7,24], which can result in a higher postoperative infection rate [25]. It was pointed out that in the context of abscess formation, improper use of antibiotics can even increase the risk of a chronification of inflammation [4].

As causal pathogens, Figueiredo et al. most frequently identified *Fusobacterium* sp., *Prevotella* sp., and *Peptostreptococcus* sp. in delayed-onset infections after lower third molar surgery [9]. Thus, typical anaerobic bacteria of the oral cavity seem to play a major role in delayed-onset infections [9]. The fact that for all patients of this study multiple bacteria could be found shows that delayed-onset infections are polymicrobial infections, in which rare bacteria like *Actinomyces israelii* can also be found [9]. In another work, Figueiredo et al. described that about two-thirds of the patients with delayed-onset infections could be successfully treated with antibiotics alone [8]. One third, however, needed an additional surgical procedure in terms of a wound revision and this was particularly true after a prolonged period of initial postoperative antibiotic treatment [8]. The fact that also persistent chronic infections with a very difficult treatment were reported [6,14,26,27] points out that in such cases, the practitioner is occasionally confronted with a difficult diagnostic and therapeutic situation.

The here presented patient developed a delayed-onset infection in the left third molar region some weeks after an initially unremarkable course. Since antibiotic therapy and surgical revision failed, we decided to discontinue antibiotic treatment and to start shortwave radiation with the goal of a purulent melting of the process instead. After five days, an abscessing formation was seen on clinical examination, which allowed incision and acquisition of pus samples, smears, and tissue samples for microbiological and pathological examination. As described above, cultures for aerobe and anaerobe bacteria were negative and even special cultures for *Actinomyces* and atypical mycobacteria did not reveal any bacterial growth. Numerous authors have pointed out that diagnosing actinomycosis can be a great challenge [6,12,13,28]. Successful isolation and identification of these bacteria only occurs in a minority of cases. The rate of falsely negative cultures is high due to previous antibiotic therapy, inhibition of *Actinomyces* growth by concomitant microorganisms or contamination, inadequate culture conditions, or inadequate short-term incubation [12,28]. Due to the long atypical course of the chronic disease, infection with atypical mycobacteria was also considered in the differential diagnosis [15]. These infections present with non-tender unilateral lymphadenopathy in otherwise healthy patients. Initially, this disease may be mistaken for a staphylococcal or streptococcal infection leading to inappropriate incision and drainage, which can cause cosmetic complications as in the present case [16].

In the here described case, neither microbiological nor histopathological nor serological examinations led to a diagnosis of a specific infection. Thus, antibiotic therapy was finally carried out in a calculated manner, which resulted in a cure after several months. However, the correct diagnosis could only be found afterwards using an experimental 16S-rRNA gene analysis with next-generation sequencing and bioinformatics as an additional tool. In this way, the microbiome of the pus sample from the abscessing inflammation was determined. As shown in Table 1 and Figure 6, the disease of the present case was not caused by one specific bacterium. As described in the work of Figueiredo et al., we found a polymicrobial infection as the reason for the delayed-onset infection after third molar surgery [9]. Apart from the typical bacterial spectrum of odontogenic infections like *Peptostreptococcus* (spp.), *Porphyromonas* (spp.), or *Prevotella* (spp.), we observed that almost 56% of the DNA originated from the genera *Alcanivorax*, *Delftia* [9,29,30], and *Porphyromonas*. According to our research, no human pathogenicity has yet been demonstrated for *Alcanivorax* while numerous diseases have been linked to *Delftia*, especially to *Delftia acidovorans*. Even if no cultural evidence for such a polymicrobial infection can be provided and the abundance of bacteria in the microbiome of the pus alone does not provide any evidence of pathogenicity of individual bacteria, the findings of the here described case suggest that the patient did not have a typical odontogenic infection. The following three points should indicate that we have found a separate disease entity:

1. The infection of the patient was completely atypical from the clinical point of view. A typical odontogenic infection can usually be managed well with surgery and antibiotic therapy. In the present case, it took more than a year to cure the patient.
2. In the case of a normal odontogenic infection, bacteria can usually be cultured from the pus. However, the culture, in this case, was negative, which is probably because the cultural conditions were not optimal or sufficient for the later detected atypical bacterial genera.
3. The determined microbiome was completely different from the one we would expect in a normal odontogenic abscess. As described by Figueiredo et al. [9], odontogenic infections show a polymicrobial spectrum with mostly obligate anaerobic bacteria. In the microbiome of the abscess of the present case, we mostly found aerobic environmental bacteria in combination with anaerobic bacteria of the oral cavity. Taking into account that the pus sample was taken from an extra-oral incision, we assume that the infection can be caused by a combination of these bacteria.

Delftia acidovorans is an aerobic, non-fermentative, Gram-negative rod that is classified in the *Pseudomonas* rRNA homology group III [31]. It is usually a non-pathogenic environmental organism that rarely is clinically significant [32]. Although *Delftia acidovorans* infections most commonly occur in hospitalized or immunocompromised patients, there are several reports documenting the infection in immunocompetent patients [32]. In this context, diseases like pneumonia, intravascular catheter-associated bacteremia, endocarditis, peritonitis, ocular infections, and urinary tract infections have been reported in the literature [31–36]. Due to its attribute as an environmental organism with a great affinity to water and damp surroundings [37], its occurrence was also described for water distribution systems in medical institutions [38]. It was also proven that *Delftia acidovorans* and other species of the *Pseudomonadaceae* family are often found in biofilms of dental unit waterlines and that they are prone to be transmitted with aerosols and splatters, generated by working unit handpieces [39].

The species of *Alcanivorax* was first described by Yakimov et al., who described *Alcanivorax borkumensis* as a hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine environmental bacterium [40]. It became known as an oil-degrading bacterium in oil spills [41–43].

With *Delftia* and *Alcanivorax* (spp.), two water-affine environmental bacteria were identified as dominant rods in the pus sample of the delayed-onset infection after third molar surgery in the present case. It could be argued that this was a result of the contamination of the pus sample. However, since the sample was taken under strictly aseptic conditions in the operating room and without the use of cooling water (Figure 3), we suspect that contamination with environmental bacteria is very unlikely. Numerous authors have reported that *Delftia* (spp.) can be found in dental unit waterlines [39,44]. With the lubricant oil of working unit handpieces, the main nutrient for *Alcanivorax* was also present. It can be suspected that these environmental bacteria were transferred during the initial removal of the wisdom tooth or in the context of a surgical revision and that these bacteria developed a symbiosis with other bacteria of the microbiome of the oral cavity. To our knowledge, this is the first case of such an odontogenic polymicrobial infection with a dominance of the environmental bacteria *Delftia* (spp.) and *Alcanivorax* (spp.). Since no human pathogenicity has yet been reported for *Alcanivorax* (spp.) and as *Delftia* (spp.) has often been associated with infections in immunosuppressed individuals, we want to emphasize that in the present case the infection was observed in a young and otherwise healthy woman without any pre-existing diseases [32,34,37]. It cannot be excluded that there is a real risk for an opportunistic bacterial infection from dental unit waterlines even in young and healthy patients if possibly harmless environmental bacteria are transferred to an open wound. This results in the recommendation to perform invasive procedures, like the osteotomy of an impacted wisdom tooth, only with sterile cooling water and not with the water of a normal dental unit. Even if the risk of infection from a dental unit seems to be very low, the present case shows that in some cases perioperative wound infections with normally harmless environmental bacteria are possible, even in immunocompetent patients. If such a wound infection occurs, it can be difficult to find the correct diagnosis and to find a suitable therapy. In the present case, it finally took six months to heal the patient.

In the future, 16S-rRNA gene analysis could be integrated into the normal clinical routine. This could facilitate the diagnosis of atypical odontogenic infections when the disease-causing bacteria are difficult to cultivate. Furthermore, 16S-rRNA gene analysis seems to provide a more comprehensive and complete picture of the involved bacteria than previously possible with the use of cultural methods only. Further studies on the analysis of odontogenic abscess microbiomes could increase our knowledge and facilitate diagnosis and advance treatment options.

5. Conclusions

The cause of a persistent delayed-onset infection after third molar surgery could in the present case only be clarified by experimental use of 16S-rRNA gene analysis with next-generation sequencing and bioinformatics. A new type of chronic wound infection with a predominance of the environmental bacteria *Delftia* and *Alcanivorax* (spp.) in combination with an odontogenic polymicrobial flora was found. Since there is reasonable suspicion that the environmental bacteria were transferred from a dental unit waterline, we recommend to always perform invasive oral surgical procedures with sterile cooling water. The 16S-rRNA gene analysis should become a part of the routine diagnostics in medical microbiology.

Author Contributions: Conceptualization, S.B., H.-P.H. and S.A.; methodology, S.Z.-G., T.H., M.W. and E.D.; writing—original draft preparation, S.B., M.K. and S.A.; writing—review and editing, H.-P.H., P.S. and J.-F.W.; All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors would like to thank the patient presented in the study for her consent to present X-rays and clinical images and Antonia Howaldt for the English editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wiese, K.G.; Merten, H.A.; Wiltfang, J.; Luhr, H.G. Clinical studies on the pathophysiology of odontogenic abscesses. *Mund Kiefer Gesichtschir.* **1999**, *3*, 242–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Warnke, P.H.; Becker, S.T.; Springer, I.N.; Haerle, F.; Ullmann, U.; Russo, P.A.; Wiltfang, J.; Fickenscher, H.; Schubert, S. Penicillin compared with other advanced broad spectrum antibiotics regarding antibacterial activity against oral pathogens isolated from odontogenic abscesses. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **2008**, *36*, 462–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Al-Nawas, B.; Maeurer, M. Severe versus local odontogenic bacterial infections: Comparison of microbial isolates. *Eur. Surg. Res.* **2008**, *40*, 220–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Al-Nawas, B.; Karbach, J. S3-Leitlinie (Langversion): Odontogene Infektionen. In *Leitlinien Zahnmedizin*; Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, 2016; Available online: www.awmf.org (accessed on 10 March 2020).
5. Böttger, S.; Lautenbacher, K.; Domann, E.; Howaldt, H.-P.; Attia, S.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F. Indication for an additional postoperative antibiotic treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2020**, *43*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Figueiredo, L.M.; Trindade, S.C.; Sarmiento, V.A.; de Oliveira, T.F.; Muniz, W.R.; Valente, R.O. Actinomycotic osteomyelitis of the mandible: An unusual case. *Oral Maxillofac. Surg.* **2013**, *17*, 299–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Figueiredo, R.; Valmaseda-Castellon, E.; Berini-Aytes, L.; Gay-Escoda, C. Incidence and clinical features of delayed-onset infections after extraction of lower third molars. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2005**, *99*, 265–269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Figueiredo, R.; Valmaseda-Castellon, E.; Laskin, D.M.; Berini-Aytes, L.; Gay-Escoda, C. Treatment of delayed-onset infections after impacted lower third molar extraction. *J. Oral Maxillofac Surg.* **2008**, *66*, 943–947. [[CrossRef](#)]

9. Figueiredo, R.; Valmaseda-Castellon, E.; Formoso-Senande, M.F.; Berini-Aytes, L.; Gay-Escoda, C. Delayed-onset infections after impacted lower third molar extraction: Involved bacteria and sensitivity profiles to commonly used antibiotics. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **2012**, *114*, 43–48. [[CrossRef](#)]
10. Brunello, G.; De Biagi, M.; Crepaldi, G.; Rodrigues, F.I.; Sivoilella, S. An Observational Cohort Study on Delayed-Onset Infections after Mandibular Third-Molar Extractions. *Int. J. Dent.* **2017**, *2017*, 1435348. [[CrossRef](#)]
11. Sukegawa, S.; Yokota, K.; Kanno, T.; Manabe, Y.; Sukegawa-Takahashi, Y.; Masui, M.; Furuki, Y. What are the risk factors for postoperative infections of third molar extraction surgery: A retrospective clinical study? *Med. Oral Patol Oral Cir. Bucal.* **2019**, *24*, e123–e129. [[CrossRef](#)]
12. Valour, F.; Sénéchal, A.; Dupieux, C.; Karsenty, J.; Lustig, S.; Breton, P.; Gleizal, A.; Bousset, L.; Laurent, F.; Braun, E.; et al. Actinomycosis: Etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infect. Drug Resist.* **2014**, *7*, 183–197. [[CrossRef](#)]
13. Wong, V.K.; Turmezei, T.D.; Weston, V.C. Actinomycosis. *BMJ* **2011**, *343*, d6099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Gonzalez-Navarro, B.; Arranz-Obispo, C.; Albuquerque, R.; Jane-Salas, E.; Lopez-Lopez, J. Osteomyelitis of the jaw (with pathological fracture) following extraction of an impacted wisdom tooth. A case report. *J. Stomatol Oral Maxillofac Surg.* **2017**, *118*, 306–309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bayazit, Y.A.; Bayazit, N.; Namiduru, M. Mycobacterial cervical lymphadenitis. *ORL J. Otorhinolaryngol Relat Spec.* **2004**, *66*, 275–280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Thavagnanam, S.; McLoughlin, L.M.; Hill, C.; Jackson, P.T. Atypical Mycobacterial infections in children: The case for early diagnosis. *Ulster Med. J.* **2006**, *75*, 192–194.
17. Keller, P.M.; Hombach, M.; Bloemberg, G.V. 16S-rRNA-Gen-basierte Identifikation bakterieller Infektionen. *Biospektrum: Das Magazin für Biowissenschaften* **2010**, *16*, 755–758.
18. Woo, P.C.; Lau, S.K.; Teng, J.L.; Tse, H.; Yuen, K.Y. Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14*, 908–934. [[CrossRef](#)]
19. Kozich, J.J.; Westcott, S.L.; Baxter, N.T.; Highlander, S.K.; Schloss, P.D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 5112–5120. [[CrossRef](#)]
20. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D596. [[CrossRef](#)]
21. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* **2016**, *4*, e2584. [[CrossRef](#)]
22. Goldberg, M.H.; Nemarich, A.N.; Marco, W.P., 2nd. Complications after mandibular third molar surgery: A statistical analysis of 500 consecutive procedures in private practice. *J. Am. Dent. Assoc.* **1985**, *111*, 277–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Christiaens, I.; Reyckler, H. [Complications after third molar extractions: Retrospective analysis of 1,213 teeth]. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* **2002**, *103*, 269–274.
24. Goldberg, M.H.; Galbraith, D.A. Late onset of mandibular and lingual dysesthesia secondary to postextraction infection. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **1984**, *58*, 269–271. [[CrossRef](#)]
25. Piecuch, J.F.; Arzadon, J.; Lieblich, S.E. Prophylactic antibiotics for third molar surgery: A supportive opinion. *J. Oral Maxillofac Surg.* **1995**, *53*, 53–60. [[CrossRef](#)]
26. Boon, L.C. Late presentation of actinomycosis after third molar surgery. *Med. J. Malaysia* **1987**, *42*, 207–208. [[PubMed](#)]
27. Bonnefond, S.; Catroux, M.; Melenotte, C.; Karkowski, L.; Rolland, L.; Trouillier, S.; Raffray, L. Clinical features of actinomycosis: A retrospective, multicenter study of 28 cases of miscellaneous presentations. *Medicine (Baltimore)* **2016**, *95*. [[CrossRef](#)]
28. Bennhoff, D.F. Actinomycosis: Diagnostic and therapeutic considerations and a review of 32 cases. *Laryngoscope* **1984**, *94*, 1198–1217. [[CrossRef](#)]
29. Eckert, A.W.; Hohne, C.; Schubert, J. Pathogen spectrum and resistance status of exclusively anaerobic odontogenic infections. *Mund Kiefer Gesichtschir.* **2000**, *4*, 153–158. [[CrossRef](#)]

30. Riggio, M.P.; Aga, H.; Murray, C.A.; Jackson, M.S.; Lennon, A.; Hammersley, N.; Bagg, J. Identification of bacteria associated with spreading odontogenic infections by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2007**, *103*, 610–617. [[CrossRef](#)]
31. Khan, S.; Sistla, S.; Dhodapkar, R.; Parija, S.C. Fatal Delftia acidovorans infection in an immunocompetent patient with empyema. *Asian Pac. J. Trop Biomed.* **2012**, *2*, 923–924. [[CrossRef](#)]
32. Bilgin, H.; Sarmis, A.; Tigen, E.; Soyletir, G.; Mulazimoglu, L. Delftia acidovorans: A rare pathogen in immunocompetent and immunocompromised patients. *Can. J. Infect. Dis Med. Microbiol.* **2015**, *26*, 277–279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kawamura, I.; Yagi, T.; Hatakeyama, K.; Ohkura, T.; Ohkusu, K.; Takahashi, Y.; Kojima, S.; Hasegawa, Y. Recurrent vascular catheter-related bacteremia caused by Delftia acidovorans with different antimicrobial susceptibility profiles. *J. Infect. Chemother.* **2011**, *17*, 111–113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chotikanatis, K.; Backer, M.; Rosas-Garcia, G.; Hammerschlag, M.R. Recurrent intravascular-catheter-related bacteremia caused by Delftia acidovorans in a hemodialysis patient. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 3418–3421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mahmood, S.; Taylor, K.E.; Overman, T.L.; McCormick, M.I. Acute infective endocarditis caused by Delftia acidovorans, a rare pathogen complicating intravenous drug use. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 3799–3800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lee, S.M.; Kim, M.K.; Lee, J.L.; Wee, W.R.; Lee, J.H. Experience of Comamonas acidovorans keratitis with delayed onset and treatment response in immunocompromised cornea. *Korean J. Ophthalmol.* **2008**, *22*, 49–52. [[CrossRef](#)]
37. Camargo, C.H.; Ferreira, A.M.; Javaroni, E.; Reis, B.A.; Bueno, M.F.; Francisco, G.R.; Gallo, J.F.; Garcia Dde, O. Microbiological characterization of Delftia acidovorans clinical isolates from patients in an intensive care unit in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *80*, 330–333. [[CrossRef](#)]
38. Muchesa, P.; Leifels, M.; Jurzik, L.; Hoorzook, K.B.; Barnard, T.G.; Bartie, C. Coexistence of free-living amoebae and bacteria in selected South African hospital water distribution systems. *Parasitol. Res.* **2017**, *116*, 155–165. [[CrossRef](#)]
39. Szymanska, J.; Sitkowska, J.; Dutkiewicz, J. Microbial contamination of dental unit waterlines. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2008**, *15*, 173–179.
40. Yakimov, M.M.; Golyshin, P.N.; Lang, S.; Moore, E.R.; Abraham, W.R.; Lunsdorf, H.; Timmis, K.N. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1998**, *48*, 339–348. [[CrossRef](#)]
41. Naether, D.J.; Slawtschew, S.; Stasik, S.; Engel, M.; Olzog, M.; Wick, L.Y.; Timmis, K.N.; Heipieper, H.J. Adaptation of the hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 to alkanes and toxic organic compounds: A physiological and transcriptomic approach. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 4282–4293. [[CrossRef](#)]
42. Kasai, Y.; Kishira, H.; Sytsubo, K.; Harayama, S. Molecular detection of marine bacterial populations on beaches contaminated by the Nakhodka tanker oil-spill accident. *Environ. Microbiol.* **2001**, *3*, 246–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Godfrin, M.P.; Sihlabela, M.; Bose, A.; Tripathi, A. Behavior of Marine Bacteria in Clean Environment and Oil Spill Conditions. *Langmuir* **2018**, *34*, 9047–9053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Williams, J.F.; Johnston, A.M.; Johnson, B.; Huntington, M.K.; Mackenzie, C.D. Microbial contamination of dental unit waterlines: Prevalence, intensity and microbiological characteristics. *J. Am. Dent. Assoc.* **1993**, *124*, 59–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



pathogens

an Open Access Journal by MDPI



CERTIFICATE OF PUBLICATION



Certificate of publication for the article titled:

A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics

Authored by:

Sebastian Böttger; Silke Zechel-Gran; Philipp Streckbein; Michael Knitschke; Torsten Hain; Markus Weigel;
Jan-Falco Wilbrand; Eugen Domann; Hans-Peter Howaldt; Sameh Attia

Published in:

Pathogens 2020, Volume 9, Issue 10, 798



Academic Open Access Publishing
since 1996

Basel, September 2020

4. Das Mikrobiom odontogener Infektionen

In den vorausgegangenen Kapiteln wurde beschrieben, dass zur erfolgreichen Behandlung der überwiegenden Mehrzahl odontogener Infektionen vor allem chirurgische und zahnärztliche Maßnahmen notwendig sind. Selbst bei schweren Infektionen, die eine Krankenhausbehandlung erfordern, stellen die chirurgischen Maßnahmen den Eckstein der Therapie dar, so dass eine zusätzliche antibiotische Therapie häufig vermieden werden kann [23]. Bei ausgedehnten oder atypischen odontogenen Infektionen kann und sollte aber auf die mikrobiologische Erregerdiagnostik und die Erstellung eines AntibioGRAMMS zur zielgenauen Antibiotikatherapie nicht verzichtet werden. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die ursächlichen Erreger einer typischen odontogenen Infektion einer gemischt aerob-anaeroben Mischflora entsprechen, wobei obligat anaerobe Bakterien deutlich überwiegen [18,23,82,84,85]. Um diese Bakterien nachzuweisen, wird nach der Entnahme von Abstrichen oder Nativgewebe aktuell in den meisten mikrobiologischen Laboratorien zunächst standardisiert eine kulturelle Analyse durchgeführt [17]. Hierbei können, wie von Eckert et al. beschrieben, durchschnittlich zwei bis drei Erreger nachgewiesen werden [82], wobei es jedoch selten möglich ist, vom phänotypischen Erscheinungsbild der Bakterien direkt auf die genaue Identifikation der Spezies zu schließen [18]. Hierzu werden häufig weitere Verfahren angewendet mit denen dann eine genaue Identifikation bewerkstelligt werden kann. Hierzu zählen zum einen die Verwendung der MALDI-TOF-Methode und zum anderen auf molekularen Methoden basierende Verfahren, wie zum Beispiel spezielle erregerspezifische PCR-Techniken. Mittels Kultivierung und Subkultivierung können AntibioGRAMME angefertigt werden, wobei vor allem die Subkultivierung aufwändig ist und häufig mehrere Tage in Anspruch nimmt. Gerade bei anaeroben Bakterien wurde aber immer wieder beschrieben, wie schwierig der kulturelle Nachweis dieser Bakterien im Vergleich zu klassischen Krankheitserregern wie zum Beispiel zu *Staphylococcus aureus* sein kann [16]. So werden schon an die Entnahme der Proben und auch an den Transport und die Transportzeit sehr hohe Anforderungen gestellt, so

dass viele dieser Bakterien bereits abgestorben sein dürften, bevor die Proben das mikrobiologische Labor erreichen [16]. Während der kulturellen Anzucht können dann ein Mangel oder ein Überangebot an essentiellen Nährstoffen oder Wachstumsfaktoren im Kulturmedium, die Toxizität des Kulturmediums selbst, eine Hemmung durch andere, in der Probe vorhandene Bakterien oder die metabolische Abhängigkeit von anderen Bakterienarten dazu führen, dass bestimmte Bakterien gar nicht kultiviert werden können [18]. Nach Siquera und Roças basiert die kulturabhängige Identifikation von Erregern zudem auf phänotypischen Merkmalen, die für Referenzstämme mit vorhersagbaren biochemischen und physikalischen Eigenschaften unter optimalen Wachstumsbedingungen bestimmt wurden [18]. Es ist jedoch selbst bei erfolgreicher Anzucht möglich, dass Bakterien ein und derselben Spezies ein untypisches Verhalten oder Bakterien verschiedener Spezies ein gleichartiges Verhalten zeigen, so dass die korrekte Identifikation trotz einer erfolgreichen Kultur misslingt [18]. Wie schon durch frühe mikroskopische Untersuchungen in Verbindung mit kulturellen Analysen geschätzt [86] und später durch molekulare Techniken elegant nachgewiesen, sind daher 40% bis 70% der Mundbakterien noch nicht kultiviert und phänotypisch charakterisiert worden [18,87]. Da der Nachweis von Bakterien in der klinischen Routine eine erfolgreiche kulturelle Anzucht der Bakterien zu Beginn der Diagnostik voraussetzt, besteht aber auch unter zusätzlicher Verwendung von molekularen Methoden und der MALDI-TOF-Methode der begründete Verdacht, dass die auslösenden Erreger odontogener Infektionen in den Kliniken möglicherweise nicht hinreichend und vollständig nachgewiesen werden. Gerade aber bei atypischen odontogenen Infektionen kann dies, wie an der im vorherigen Kapitel beschriebenen, nicht abheilenden Infektion nach der Entfernung eines Weisheitszahnes zu sehen, wegweisend oder entscheidend sein. Die in diesem Fall zur Anwendung gebrachte 16S-rRNA-Gen-Analyse beschreibt einen andersartigen diagnostischen Ansatz, der ohne vorherige Kultur der Bakterien durchgeführt werden kann. Im Ergebnis zeigten sich bei diesem Fall nicht etwa zwei bis drei verschiedene Bakterienspezies wie von Eckert et al. beschrieben [82], sondern

22 verschiedene Bakteriengattungen und dabei auch solche, die mit großer Wahrscheinlichkeit ursächlich für die Erkrankung waren und der kulturellen Analyse komplett entgingen [88]. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beschreibung von anderen Autoren, die über den Einsatz von molekularen Methoden bei odontogenen Infektionen berichtet haben [18,89]. Siquera und Roças beschreiben in ihrer Übersichtsarbeit, dass bei akuten apikalen Entzündungen mittels kultureller Analyse bis zu acht bakterielle Spezies nachweisbar waren, während mittels molekularer Methoden über 100 Gattungen identifiziert werden konnten [18]. Auch in den Wurzelkanälen von marktoten Zähnen konnte mittels der 16S-rRNA-Gene-Analyse eine vergleichbare Vielzahl von Bakterien nachgewiesen werden [20]. Da die Besiedlung der Wurzelkanäle marktoter Zähne durch die Bakterien der Mundhöhle einen wesentlichen Meilenstein auf dem Weg zur Ausbildung einer odontogenen Infektion darstellt [18], kann somit durchaus die Frage gestellt werden, ob die an die Henle- und Koch-Postulate angelehnte Suche nach einem oder nach einigen krankheitsauslösenden Keimen noch zeitgemäß ist, oder ob es in odontogenen Infektionen ein eigenes Mikrobiom, ähnlich zum Mikrobiom der Mundhöhle [90,91] oder zum Mikrobiom des Darmes [92] gibt. Sofern sich in odontogenen Infektionen tatsächlich ein eigenes Mikrobiom nachweisen lässt, stellt sich ferner die Frage, ob es sich hierbei einfach um beliebige Bakterien der Mundhöhle handelt, oder ob es innerhalb des normalen oralen Mikrobioms bestimmte Bakterien gibt, die quasi als „pathologische Community“ ein typisches Abszess-Mikrobiom ausbilden können. In Hinblick auf die oben beschriebene atypische odontogene Infektion stellt sich außerdem die Frage, ob bei einer atypischen Infektion, die anamnestisch nicht aufgeklärt werden kann (z.B. durch Medikamenten-Einnahme oder Bestrahlung des Kieferknochens), andere Bakterien als bei einer typischen odontogenen Infektion identifiziert und gegebenenfalls therapiert werden können. Angesichts des technischen Fortschrittes stellt sich zusammenfassend die generelle Frage, ob molekulare Methoden wie die 16S-rRNA-Gen-Analyse zur Diagnostik und zur effektiven Therapie odontogener Abszesse beitragen können.

4.1. Molekulare Methoden zur Identifikation von Bakterien

Siquera und Roças haben in Ihrer Übersichtsarbeit zur Mikrobiologie der akuten periapikalen Entzündungen fünf Generationen von Studien zur mikrobiologischen Diagnostik vorgestellt, die auf unterschiedlichen strategischen Ansätzen beruhen [18]. Die erste Generation von Studien bediente sich hierbei offener, breit angelegter klassischer Kulturmethode, bei denen viele kultivierbare Bakterien als Krankheitserreger odontogener Abszesse identifiziert werden konnten [18]. Die zweite Generation von Studien stützte sich darüber hinaus auf geschlossene molekulare Nachweismethoden, bei denen eine große Anzahl von Proben auf das Vorhandensein bestimmter Zielarten untersucht werden konnte. Zu diesen Methoden zählten DNA-Hybridisierungs-Arrays (z.B. Checkerboard-Array) sowie verschiedene diagnostische PCR-Techniken (z.B. artenspezifische PCR, nested PCR, Multiplex-PCR und andere). Auf diese Weise konnten, anders als durch rein kulturbasierte Methoden, erstmals auch die Bakterien in großem Umfang nachgewiesen werden, die sonst nur schwer mittels kultureller Analyse nachweisbar sind [18]. Die dritte Generation von Studien wendete erstmals offene molekulare Methoden an, mit denen zum ersten Mal zumindest experimentell das tatsächliche Ausmaß der bakteriellen Diversität in odontogenen Abszessen beschrieben werden konnte [18]. Hierbei kamen Breitband-PCR-Techniken mit anschließender Klonierung und Sequenzierung sowie Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus-Tests (RFLP-Tests) zum Einsatz, wodurch auch der Nachweis von bis dahin noch nicht charakterisierten und noch nicht kultivierten Bakterien gelang [18,87]. Diese Techniken waren zwar aufwändig und für einen großen Probenumfang nicht geeignet, lieferten jedoch bakterienspezifische Gensequenzen, die für die Herstellung von Primern und Oligonukleotidsonden für weitergehende geschlossene Analysen verwendet werden konnten [18]. In der vierten Generation von Studien wurden solche Daten dann für großangelegte Untersuchungen mit geschlossenen molekularen Verfahren zur Bestimmung der Häufigkeit und der Assoziation bestimmter Bakterien mit odontogenen Infektionen verwendet. Erst in der fünften Generation von Studien war

es dann mit Hilfe der Pyrosequenzierungstechnologie erstmals möglich, eine offene und flächendeckende molekulare Analyse von Abszessproben durchzuführen [18,93]. Diese offene molekulare Analyse stützt sich in der Regel auf die oben bereits beschriebene 16S-rRNA-Gen-Analyse [94], für die gewöhnlich ein bestimmter Abschnitt des 16S-rRNA-Gens der Bakterien sequenziert wird. Durch die Bestimmung der Basensequenz kann mit Hilfe von Datenbanken, in denen entsprechende Sequenzierungsdaten hinterlegt sind, eine Identifikation der Bakterien bis auf die taxonomische Ebene der Bakteriengattung erfolgen [20,83]. Siquera und Roças beschreiben in Ihrer Arbeit aus dem Jahr 2013, dass molekulare Methoden zur bakteriellen Identifikation zu Forschungszecken zwar bereits eine weite Verbreitung erlangt haben, dass ein flächendeckender Einsatz dieser Verfahren zur klinischen Routine-Diagnostik bislang aber noch nicht erfolgt ist [18]. Hier könnte eine mögliche sechste Generation von Studien der Wegbereiter für den Einsatz in der klinischen Routinediagnostik werden. Durch die Weiterentwicklung der Sequenzierungstechniken bis hin zu den aktuellen Next-Generation-Sequencing-Techniken werden die Analysen sowohl unter technischen als auch unter finanziellen Gesichtspunkten zunehmend einfacher zu bewerkstelligen, so dass den molekularen Techniken für die Zukunft auch eine große Bedeutung in der klinischen Routine vorausgesagt wird [18].

4.2. Die 16S-rRNA-Gen-Analyse

Die Analyse des 16S-rRNA-Gens von Bakterien wurde in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts ursprünglich betrieben, um phylogenetische Untersuchungen an Bakterienstämmen durchzuführen [95,96]. Durch den Vergleich der Basensequenz des Gens von verschiedenen Keimen konnten bakterielle Stammbäume erstellt und dadurch wesentliche evolutionsbiologische Erkenntnisse über Prokaryonten gewonnen werden [94,95]. Das 16S-rRNA-Gen trägt die genetische Information der 16S-ribosomalen Nukleinsäure (16S-rRNA) der 30S-Untereinheit des Ribosoms [88]. Bezüglich der Basensequenz besteht das Gen aus mehreren konstanten und mehreren

variablen Anteilen [94,97]. Während die konstanten Bereiche sich zwischen den verschiedenen Bakteriengattungen nicht unterscheiden, sind die variablen Bereiche hochspezifisch für die verschiedenen Bakteriengattungen [83,88,94,97]. Basierend auf der Sequenz der variablen Bereiche ist es daher nicht nur möglich, phylogenetische Untersuchungen durchzuführen, sondern auch die bakterielle DNA des 16S-rRNA-Gens mit Hilfe einer Datenbank einer bestimmten Bakteriengattung zuzuordnen [88,94]. Die Bestimmung der Sequenz wirkt damit wie ein bakterieller Fingerabdruck, der zur Identifikation auf der taxonomischen Ebene der Gattung verwendet werden kann [88]. Natürlich kann eine Identifikation nur dann gelingen, wenn die entsprechende Sequenz in der hierzu abgefragten Datenbank auch vorhanden ist [83,94]. Neben mehreren kommerziellen Datenbanken existieren hierzu inzwischen auch frei zugängliche Datenbanken, die ständig um neue DNA-Sequenzen erweitert werden und schon jetzt eine umfassende Identifikation der Bakterien einer Probe ermöglichen [83]. Die Sammlung an Sequenzdaten ist inzwischen derart groß, dass der Einsatz der 16S-rRNA-Gen-Analyse vor allem dann empfohlen wird, wenn klassische kulturbasierte Analysen bei klinischen Problemfällen keine Klärung der Ätiologie ermöglichen [83]. Dies gilt damit insbesondere auch für alle atypisch verlaufenden odontogenen Infektionen. Die 16S-rRNA-Gen-Analyse eignet sich ferner wie oben beschrieben zur vollständigen Erfassung der bakteriellen Diversität in einer Probe und wurde daher vor allem auch zur Bestimmung von Mikrobiomen wie etwa dem oralen Mikrobiom eingesetzt [97]. Hierbei müssen jedoch viele Moleküle gleichzeitig einer Sequenzierung zugeführt werden, was mit älteren Sequenzierungstechniken nur mit größerem zeitlichen und finanziellen Aufwand zu bewerkstelligen war [97]. Mit der Einführung der Next-Generation-Sequencing-Technologien wurde hier eine erhebliche Erleichterung und damit die Grundlage für eine flächendeckende Anwendung geschaffen [97].

4.3. Next-Generation-Sequencing und Bioinformatik

Um eine Bakterienidentifikation mittels der 16S-rRNA-Gene-Analyse ohne kulturelle Anzucht durchführen zu können, müssen zunächst die bakteriellen 16S-rRNA-Gene einer Probe mit Hilfe der PCR amplifiziert werden. Hierzu eignen sich Primer-Moleküle, die sich in den konstanten Bereichen des 16S-rRNA-Gens anlagern können [94]. Nach der Amplifikation der Genabschnitte kann die genaue Bestimmung der Basensequenz aller in der Probe vorhandenen 16S-rRNA-Gene mit den Methoden der DNA-Sequenzierung erfolgen. Eine DNA-Sequenzierung wurde zum ersten Mal in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts durch Maxam und Gilbert (1976) sowie durch Sanger (1977) durchgeführt [98-100]. Nach Sanger konnten hierbei zunächst kleinere DNA-Stränge mit Hilfe der Kettenabbruchmethode [99] untersucht werden. Hierbei entstanden verschieden lange Teilkopien des zu untersuchenden DNA-Stranges mit endständig radioaktiv oder fluoreszierend markierten Basen. Mittels Gel-Elektrophorese konnten die unterschiedlich langen Kopien aufgetrennt und nach ihrer endständigen Base auf dem Gelträger identifiziert werden. Auf diese Weise konnte man immerhin analog die Basensequenz einzelner Abschnitte des bakteriellen Genoms bestimmen [98]. Die Methode war jedoch technisch anspruchsvoll und ermöglichte bei großem Aufwand anfangs jeweils immer nur die Sequenzierung eines einzelnen DNA-Klons. Dennoch wurden auf der Basis dieses Prinzips Ende der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts die ersten Sequenzierungs-Geräte entwickelt, die immerhin DNA-Stränge mit einer Länge von bis zu einer Kilobase sequenzieren konnten [98]. Mit den Geräten der ABI PRISM-Reihe, die ebenfalls auf dem Prinzip der Sanger-Sequenzierung basierten, konnten später immerhin hunderte von Proben gleichzeitig prozessiert werden, so dass die Erforschung des humanen Genoms seinerzeit viel schneller durchgeführt werden konnte als ursprünglich angenommen [98]. Parallel zur Weiterentwicklung der auf der Sanger-Sequenzierung basierenden Geräte wurde mit der Pyrosequenzierung eine neue Methode vorgestellt, die auf eine Gel-Elektrophorese verzichten konnte. Mit dieser Methode war es erstmals möglich, die Polymerisierung der DNA in Echtzeit zu beobachten, weshalb diese erstmals als

Sequenzierung der nächsten Generation (Next-Generation-Sequencing) bezeichnet wurde. Hierzu wurde ein Zwei-Enzym-Prozess verwendet, bei dem mittels der ATP-Sulfurylase zunächst Pyrophosphat aus der DNA-Polymerisation in Adenosintriphosphat (ATP) umwandelt wird. Das ATP kann zusammen mit Sauerstoff durch das Enzym Luciferase zu Adenosinmonophosphat (AMP) und Kohlendioxid abgebaut werden, wobei messbares Licht proportional zur ursprünglich bei der DNA-Polymerisation erzeugten Pyrophosphatmenge entsteht [98]. Mit diesem Prinzip wurde von dem Unternehmen 454 Life Sciences die erste kommerziell erfolgreiche Next-Generation-Sequencing-Technologie auf den Markt gebracht [98]. Diese Sequenzierungs-Geräte ermöglichten erstmals eine massive Parallelisierung der Sequenzierungsreaktionen, wodurch die DNA-Menge, die in einem Umlauf sequenziert werden konnte, erheblich gesteigert werden konnte [98]. Nachteile bestehen bei Pyrophosphatsequenzierung aber dann, wenn in der DNA-Sequenz mehrmals die gleiche Base hintereinander vorkommt, da hier durch Messfehler des entstehenden Lichtes leicht Fehler beim Sequenzieren entstehen können. Durchgesetzt hat sich daher letztlich vor allem die von Illumina verwendete Solexa-Methode. Hierbei werden die zu sequenzierenden DNA-Moleküle mittels eines Adapters auf einer Fließzelle örtlich gebunden und mittels der sogenannten Brückenamplifikation, einer lokal gebundenen PCR, lokal vervielfältigt. Mittels modifizierter fluoreszierender Nukleotide mit „reversiblen Terminator“ erfolgt in den örtlich gruppierten DNA-Klonen ein „Sequencing by Synthesis“, bei dem jedes eingebaute Nukleotid über seine Fluoreszenz bestimmt und registriert werden kann, bevor im nächsten Umlauf ein weiteres Nukleotid eingebaut wird [98]. Populär wurden hierbei insbesondere die Sequenzierungsgeräte „Illumina Hiseq“ und „Illumina Miseq“ die eine weltweite Verbreitung erfuhren und zum Teil fast einen Monopolstatus erhielten [98]. Durch den Einsatz der Next-Generation-Sequencing-Geräte konnte nicht nur die Geschwindigkeit der DNA-Sequenzierung am Ende deutlich gesteigert werden, es konnten auch die dafür anfallen Kosten deutlich gesenkt werden. Nach Stein haben sich die Sequenzierungsfähigkeiten zwischen 2004 und 2010 alle fünf Monate

verdoppelt [101]. Damit war die Entwicklung der Sequenzierung sogar noch schneller als die gleichzeitige Entwicklung der Computertechnik, in der sich die Komplexität der Transistoren im gleichen Zeitraum nur etwa alle zwei Jahre verdoppelte [101]. Heute können durch die massive Parallelisierung in einem Umlauf Gigabasen von Daten erzeugt werden [98]. Statt die Sequenz der Basen mühsam von einem Gel abzulesen, hat sich die Auswertung daher immer mehr auf die Ausführung und Verarbeitung von Programm-Codes verlegt, so dass mit der Entwicklung der Sequenzierung auch die Entwicklung einer weiteren Technologie, nämlich die der Bioinformatik, voranschritt. Die Bioinformatik hatte ihre Ursprünge bereits in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts, lange bevor man DNA-Moleküle sequenzieren konnte [100]. Hierbei wurden zunächst Computerprogramme bei der Ermittlung von Aminosäure-Sequenzen in Proteinen eingesetzt [100]. Dayhoff et al. entwickelten hierzu den Einbuchstaben-Code für Aminosäuren, der auch heute im Einsatz ist und 1965 zum ersten Mal in Dayhoffs und Ecks *Atlas of Protein Sequence und Structure* verwendet wurde. Das Werk gilt als die erste biologische Sequenzdatenbank überhaupt [100]. Mit der Entwicklung der DNA-Sequenzierung Ende der siebziger Jahre verlagerten sich die technischen Bemühungen zunehmend auf die Verarbeitung und Speicherung von Sequenzierungsdaten. So wurde 1984 an der Universität Wisconsin das erste Softwarepaket zur Analyse von DNA-, RNA- und Proteinsequenzen publiziert [100]. Es folgten rasch weitere Programmentwicklungen und statt der Verwendung von schwer zugänglichen Großrechnern wurden zunehmend leicht zugängliche Personal-Computer verwendet, die in den achtziger Jahren zunehmend Verbreitung fanden [100]. Viele Entwickler gingen zudem dazu über, ihre Programmcodes im Sinne des Software-Sharings frei verfügbar zu machen, wodurch diese wiederum von anderen Wissenschaftlern verwendet und weiterentwickelt werden konnten [100]. In diesem Zusammenhang hat die Einrichtung und Entwicklung des Internets einen wesentlichen Beitrag zum Fortschritt der Bioinformatik geleistet, da es nicht nur zu einer effektiven Verbreitung von Wissen und Programm-Codes, sondern auch zur universalen Verfügbarkeit von Datenbanken

beigetragen hat [100]. So konnte bereits 1993 die erste Nukleotid-Sequenzdatenbank, die *EMBL Nucleotide Sequence Data Library* weltweit online verfügbar gemacht werden [100]. Die Entwicklung und der breite Einsatz des Next-Generation-Sequencing nach der Jahrtausendwende führte zu einem exponentiellen Anstieg der Nukleotidsequenzen in öffentlich zugänglichen Datenbanken und bis heute steht mehr als ein Exabyte (10^{18}) an biologischen Daten zur Verfügung, so dass Bezeichnung *Biological Big Data* absolut gerechtfertigt ist [100]. Es existieren heute zahlreiche Datenbanken und Auswertungsprogramme, mit denen es den Wissenschaftlern überall auf der Welt möglich ist, verschiedenste Sequenzierungsdaten zu analysieren [102,103]. Bezogen auf die Identifikation von Bakterien anhand der hypervariablen Bereiche ihres 16S-rRNA-Gens bedeutet dies, dass heute mit beherrschbarer und bezahlbarer Technik ohne den Einsatz der kulturellen Analyse ganze Lebensräume auf Ihre bakterielle Zusammensetzung hin untersucht werden können. Neben der Erforschung des humanen Genoms hat dies auch die Erforschung des humanen Mikrobioms und hierbei insbesondere auch die Erforschung des oralen Mikrobioms ermöglicht [90,103]. Zahlreiche Forschungsaktivitäten beschäftigen sich heute mit dem Zusammenhang zwischen verschiedenen Erkrankungen und der Zusammensetzung von verschiedenen Mikrobiomen [20,91,104]. In Hinblick auf die bereits bekannte bakterielle Diversität bei odontogenen Infektionen stellt sich damit die entscheidende Frage, ob auch der odontogene Abszess als eigener Lebensraum mit einem eigenen Mikrobiom betrachtet werden kann und wenn ja, wie dieser im Verhältnis zum bereits gut erforschten oralen Mikrobiom steht.

4.4. Publikation 3: Microbiome of Odontogenic Abscesses

Einleitung: Ausgedehnte odontogene Abszesse werden regelmäßig durch Bakterien des physiologischen oralen Mikrobioms verursacht. Die Kultur dieser Bakterien ist jedoch aufwändig und fehleranfällig und zeigt manchmal sogar gar kein bakterielles Wachstum. Zudem wurden von verschiedenen Autoren zum Teil völlig unterschiedliche bakterielle Spektren in odontogenen Abszessen beschrieben.

Methodik: Eine experimentelle 16S-rRNA-Gen-Analyse mittels Next-Generation-Sequencing und Bioinformatik wurde eingesetzt, um das orale Mikrobiom des Speichels und die bakterielle Zusammensetzung des Eiters bei Patienten mit einer ausgedehnten odontogenen Infektion zu untersuchen.

Ergebnis: Bei 50 Patienten mit einer ausgedehnten odontogenen Infektion konnte neben dem oralen Mikrobiom das Abszess-Mikrobiom bestimmt werden. Mit jeweils 30% der Fälle waren perimandibuläre und submandibuläre Abszesse die häufigsten Erkrankungen. Die überwiegende Mehrzahl der Abszesse (48 Fälle; 96%) zeigte eine eindeutig polymikrobielle Zusammensetzung, während bei 2 Patienten (4%) das mutmaßliche Bild einer Monoinfektion zu sehen war. Im Durchschnitt wurden im Speichel mit 41,32 (\pm 9,00) Gattungen signifikant mehr Gattungen nachgewiesen als im Eiter mit 31,44 (\pm 12,09) ($p < 0,0001$). In den meisten Fällen wurde im Eiter ein überwiegend anaerobes Bakterienspektrum gefunden, während der Speichel ein ähnliches orales Mikrobiom wie bei gesunden Personen zeigte.

Diskussion: In den meisten Fällen handelt es sich bei odontogenen Infektionen um eindeutig polymikrobielle Infektionen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass diese hauptsächlich durch anaerobe Bakterien verursacht werden und dass aerobe und fakultative anaerobe Bakterien eine geringere Rolle zu spielen scheinen als von anderen Autoren beschrieben. Die 16S-rRNA-Gen-Analyse konnte deutlich mehr Bakterien nachweisen als herkömmliche kulturbasierte Methoden. Molekulare Methoden sollten daher Teil der Routinediagnostik in der medizinischen Mikrobiologie werden.



Article

Microbiome of Odontogenic Abscesses

Sebastian Böttger ^{1,*} , Silke Zechel-Gran ², Daniel Schmermund ¹, Philipp Streckbein ¹ , Jan-Falco Wilbrand ¹ , Michael Knitschke ¹ , Jörn Pons-Kühnemann ³, Torsten Hain ^{2,4}, Markus Weigel ² , Hans-Peter Howaldt ¹, Eugen Domann ^{4,5} and Sameh Attia ¹

¹ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Justus-Liebig-University Giessen, University Hospital Giessen and Marburg, Giessen, D-35392 Giessen, Germany; Daniel.Schmermund@uniklinikum-giessen.de (D.S.); Philipp.Streckbein@uniklinikum-giessen.de (P.S.); Jan-Falco.Wilbrand@uniklinikum-giessen.de (J.-F.W.); Michael.Knitschke@uniklinikum-giessen.de (M.K.); HP.Howaldt@uniklinikum-giessen.de (H.-P.H.); sameh.attia@dentist.med.uni-giessen.de (S.A.)

² Institute of Medical Microbiology, Justus-Liebig-University Giessen, D-35392 Giessen, Germany; Silke.Zechel@mikrobio.med.uni-giessen.de (S.Z.-G.); Torsten.Hain@mikrobio.med.uni-giessen.de (T.H.); Markus.Weigel@mikrobio.med.uni-giessen.de (M.W.)

³ Institute of Medical Informatics, Justus-Liebig-University Giessen, D-35392 Giessen, Germany; Joern.Pons@informatik.med.uni-giessen.de

⁴ German Center for Infection Research (DZIF), Justus-Liebig-University Giessen, Partner Site Giessen-Marburg-Langen, D-35392 Giessen, Germany; Eugen.Domann@mikrobio.med.uni-giessen.de

⁵ Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, D-35392 Giessen, Germany

* Correspondence: Sebastian.Boettger@uniklinikum-giessen.de; Tel.: +49-641-98546271



Citation: Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Schmermund, D.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F.; Knitschke, M.; Pons-Kühnemann, J.; Hain, T.; Weigel, M.; Howaldt, H.-P.; et al. Microbiome of Odontogenic Abscesses. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1307. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061307>

Academic Editor: Georgios N. Belibasakis

Received: 6 May 2021

Accepted: 14 June 2021

Published: 16 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Severe odontogenic abscesses are regularly caused by bacteria of the physiological oral microbiome. However, the culture of these bacteria is often prone to errors and sometimes does not result in any bacterial growth. Furthermore, various authors found completely different bacterial spectra in odontogenic abscesses. Experimental 16S rRNA gene next-generation sequencing analysis was used to identify the microbiome of the saliva and the pus in patients with a severe odontogenic infection. The microbiome of the saliva and the pus was determined for 50 patients with a severe odontogenic abscess. Perimandibular and submandibular abscesses were the most commonly observed diseases at 15 (30%) patients each. Polymicrobial infections were observed in 48 (96%) cases, while the picture of a mono-infection only occurred twice (4%). On average, 31.44 (± 12.09) bacterial genera were detected in the pus and 41.32 (± 9.00) in the saliva. In most cases, a predominantly anaerobic bacterial spectrum was found in the pus, while saliva showed a similar oral microbiome to healthy individuals. In the majority of cases, odontogenic infections are polymicrobial. Our results indicate that these are mainly caused by anaerobic bacterial strains and that aerobic and facultative anaerobe bacteria seem to play a more minor role than previously described by other authors. The 16S rRNA gene analysis detects significantly more bacteria than conventional methods and molecular methods should therefore become a part of routine diagnostics in medical microbiology.

Keywords: oral microbiome; odontogenic abscess; 16S rRNA gene analysis; polymicrobial infection; anaerobic infection

1. Introduction

Odontogenic abscesses are among the most common inflammatory diseases in the field of oral and maxillofacial surgery. Most of these abscesses are localized and can be successfully treated simply by abscess incision intraorally. Larger abscesses often show a tendency to spread and are usually incised extraorally using general anesthesia [1]. If left untreated, such abscesses can cause severe local and systemic complications and can even lead to death [1–3].

Although many extensive abscesses can be successfully treated by incision alone [4,5], adjuvant antibiotic therapy is often used [6], especially if the abscessing inflammation is

medial to the mandibular bone [7]. Such an antibiotic therapy is usually carried out as a calculated therapy, as the cultural assessment of the pathogens usually takes a few days and an antibiogram (antibiotic susceptibilities and resistances) is only available after some days. However, in those patients with exceptionally severe progression of the infection, a correct antibiogram can be decisive for the further course of the disease and ultimately also for the patient's outcome [8]. The determination of the causative bacteria is therefore an important component in the diagnosis of odontogenic abscesses, especially if there are indications of an extension or a complicated course of the disease at the beginning of the therapy [9].

However, microbiological diagnostics have weaknesses. It is not always possible to sufficiently identify the causative pathogens by culture-based methods alone [10]—some authors even speak of culture-negative odontogenic abscesses if it is not possible to cultivate any pathogens at all [11]. Recent detection methods, not based on culturing, and particularly 16S rRNA gene analysis with subsequent gene sequencing, have shown that many bacteria of the oral cavity can only be determined with difficulty or even not at all by culture-based methods [3,12,13]. It has also not yet been possible to determine which bacteria of the oral and pharyngeal microbiome are exactly responsible for the acute inflammatory process and if the oral microbiome in these patients is composed differently compared to healthy people.

With advancements in sequencing technology, and particularly in next-generation sequencing-based technologies, the identification of microorganisms and community profiling has become increasingly simple and increasingly effective [14]. With these methods, massive deoxyribonucleic acid (DNA) sequencing has become possible with a much higher throughput compared to older methods, so that a large number of samples can be effectively studied at the same time [15]. Numerous authors have pointed out that previously indistinguishable hidden bacterial species can also be fully detected in this way [10,16].

With regard to extensive odontogenic abscesses, which require inpatient therapy and can occasionally assume life-threatening dimensions, the following questions therefore arise:

1. Does the oral microbiome of these patients show differences compared to the oral microbiome of healthy patients described in the literature?
2. Which bacteria can be detected in pus using 16S rRNA gene next-generation sequencing analysis?

These questions will be addressed in the present study based on patients who were treated for extensive odontogenic abscesses in a University Hospital Department for Oral and Maxillofacial Surgery.

2. Materials and Methods

Fifty patients treated for severe odontogenic abscesses between October 2016 and March 2017 in the Department of Oral and Maxillofacial Surgery of the university hospital Giessen and Marburg, Location Giessen, Germany, were included in the study. For the purpose of the study, a saliva sample was taken from the patients prior to the abscess incision in order to determine the oral microbiome. During abscess incision, pus was obtained from the incised abscess. Both samples, saliva and pus, were initially frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for later evaluation. The patients gave their written consent before the study and the study was authorized by the local Ethics Committee of the Medical Faculty of the Justus-Liebig-University Giessen (Vote 191/16).

The determination of the microbiome was carried out around three months after the collection of the last sample with 16S rRNA amplicon sequencing and bioinformatics analysis [15,17]. First, bacterial DNA was extracted from the initially frozen pus and saliva. Then, the variable area "V4" of the 16S rRNA genes was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers in the conserved flanking areas with adapters. The resulting amplicons of an approximate length of 350 to 370 base pairs (bps) were processed for

next-generation sequencing using the Illumina MiSeq System (San Diego, CA, USA). After sequencing, bioinformatics analysis was performed.

2.1. Nucleic Acid Extraction of Samples, Library Construction, 16S rRNA Amplicon Sequencing

For nucleic acid extraction, 1 mL saliva, 0.5 mL pus and negative controls of water and reaction mixtures were used. To determine the quality of the experiments, a mock community was applied [18].

Samples were centrifuged in 1.5 mL Eppendorf tubes (13,000 rpm, 10 min). Pellets were resuspended in 150 µL lysis buffer (25 mM Tris, pH 8.0; 25 mM EDTA, pH 8.0; 1% Triton ×100). The solution was treated with 20 µL Proteinase K (20 mg/mL, Ambion, Oberursel, Germany) at 55 °C for 2 h and the enzyme was subsequently inactivated at 90 °C for 30 min. After further incubation with 50 µL lysozyme (20 mg/mL, Merck, Darmstadt, Germany), 10 µL lysostaphin (5 U/µL, Sigma, St. Louis, MO, USA) and 10 µL mutanolysin (5 U/µL, Sigma, St. Louis, MO, USA) at 37 °C for 30 min, DNA was extracted by using glass beads and the Power Lyzer DNA Isolation Kit from MoBio as recommended by the vendor (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA, USA). DNA of all samples was eluted in 100 µL of nuclease-free water and concentration was determined using Qubit Fluorometric Quantitation (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The V4 region of 16S rRNA gene was amplified using adapter forward primer 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGCCAGTCCAGCMGCCGCGGTAA-3', and adapter reverse primer 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGTACHVGGGTWTCTAAT-3' and the 2× Kapa HiFi HotStart Ready Mix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA). Amplification profile comprised an initial heating step at 95 °C for 3 min, 25 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, elongation at 72 °C for 30 s and a final elongation step at 72 °C for 5 min. PCR products were purified with Agencourt AMPure XP system as recommended by the vendor (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Size, purity and concentration of amplicons were determined using the Agilent Bioanalyzer as recommended by the vendor (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The index PCR was performed using the Nextera index Kit v2 Set B as recommended by the vendor (Illumina, San Diego, CA, USA). The quality of the index PCR was determined as described above for the adapter PCR. The library was adjusted to 3 pM, and the flow cell was prepared and loaded according to the Reagent Preparation Guide of MiSeq Reagent Kit v2 and sequenced as recommended by the vendor (Illumina).

2.2. Bioinformatics Analysis

Microbiome analysis was performed as previously described [19]. In brief, paired end sequence reads were joined and primer sequences were removed. Saliva sequence reads varied between 8465 and 309,076 and pus reads varied between 28,698 and 751,847 per sample. Reads with ambiguous base calls or with homopolymers longer than eight nucleotides were removed and duplicates were merged and aligned against the SILVA-bases bacterial reference alignment [20]. Applying Mothur implementation of the uchime algorithm, chimeric reads were removed, taxonomy was assigned and non-bacterial reads were removed from the analysis. Operational taxonomic units (OTU) were generated and taxonomy was reassigned using Mothur. In preparation for the analysis, an OTU table in biom format was created.

2.3. Statistical Analysis

Statistical analysis was carried out with Microsoft Excel (Redmond, WA, USA) and the statistical software R-4.0.4 (R Core Team, 2021, Vienna, Austria). For calculation of frequencies, we considered a phylotype to be abundant if it contributed to at least 0.01% of the microbiome. Lilliefors (Kolmogorov–Smirnov) test (R package: nortest) was applied to test for normality distribution. In addition, histograms were used to visualize alpha-diversity in the saliva and pus samples. To describe the composition of the microbiomes, means, standard deviations and medians of the relative frequencies of the

reads were detected and shown in a table and in pie charts. Thus, a median microbiome was calculated for saliva and pus samples to show the median composition of the saliva and pus microbiomes. Alpha diversity was further illustrated with heatmaps directly contrasting the relative frequencies of reads in saliva and pus. Hierarchical clustering (method: ward with Euclidean distance) and principal component analysis (PCA) were used to describe beta diversity among the saliva and pus samples. Heatmaps, hierarchical clustering and PCA were based on the relative frequency of the reads of the most frequent bacterial genera (sum of rows > 20%). This means that the sum of the relative abundances in a row of the heatmaps must be more than 20% for the corresponding bacterial genus to be displayed.

Heatmaps and hierarchical clustering were performed by the R package pheatmap, and PCA was visualized by biplots using the R package ggfortify.

3. Results

In the observation period from October 2016 to March 2017, a total of 50 patients with a severe odontogenic abscess were treated with incision and drainage at the University Hospital. In addition to the normal microbiological standard examination (microbiological smear and culture), a sample of saliva and drained pus was obtained from all 50 patients. Among them, 34 patients (68%) were male and 16 patients (32%) were female. The mean age was 47.42 years (standard deviation: 19.59 years). The Lilliefors test showed that the distribution of the patients' age did not differ significantly from that which was normally distributed ($p = 0.415$). The most frequently observed abscesses were perimandibular and submandibular, occurring in 15 patients (30%) each. Figure 1 shows the frequency of the observed abscesses.

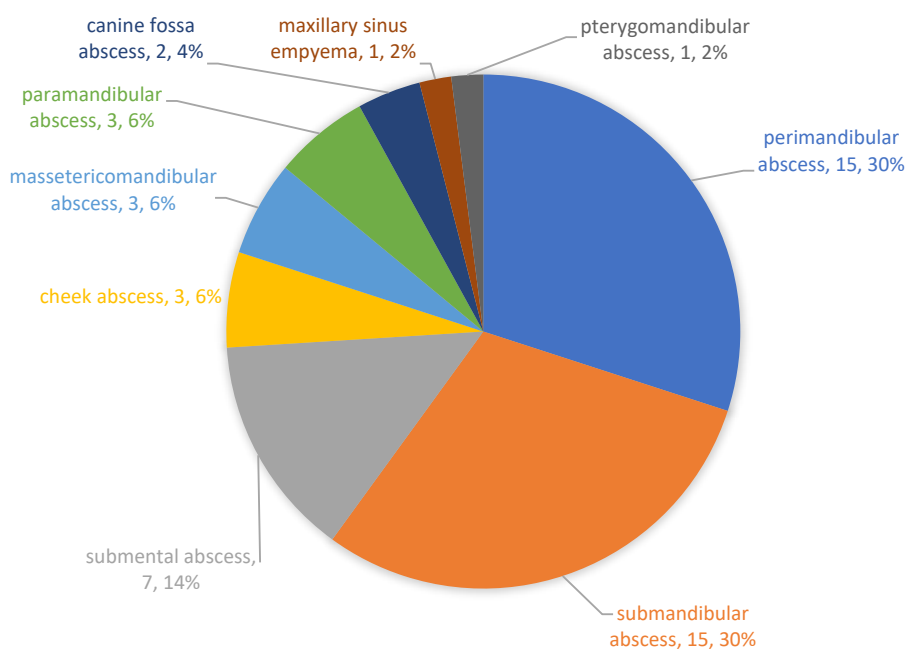


Figure 1. Frequency of the observed abscesses. The most common abscesses were the perimandibular and the submandibular abscess.

Furthermore, 16S rRNA gene analysis revealed the microbiome of the saliva and the drained pus. As in other studies, an abundance of bacterial genera was found, both in saliva and pus. We considered a phylotype to be abundant if it contributed to at least 0.01% of the microbiome. Using this threshold, a mean of 41.32 (± 9.00) bacterial genera was found in the saliva and a mean of 31.44 (± 12.09) was found in the pus. Figure 2 shows the

distribution of the counted bacterial genera in the saliva and the pus. The Lilliefors test showed that the distribution of the number of bacterial genera did not differ significantly from that which was normally distributed (saliva: $p = 0.303$ and pus: $p = 0.321$). The two-tailed paired-samples t -test for means showed that the number of bacterial genera was significantly higher in the saliva than in the pus ($p < 0.0001$).

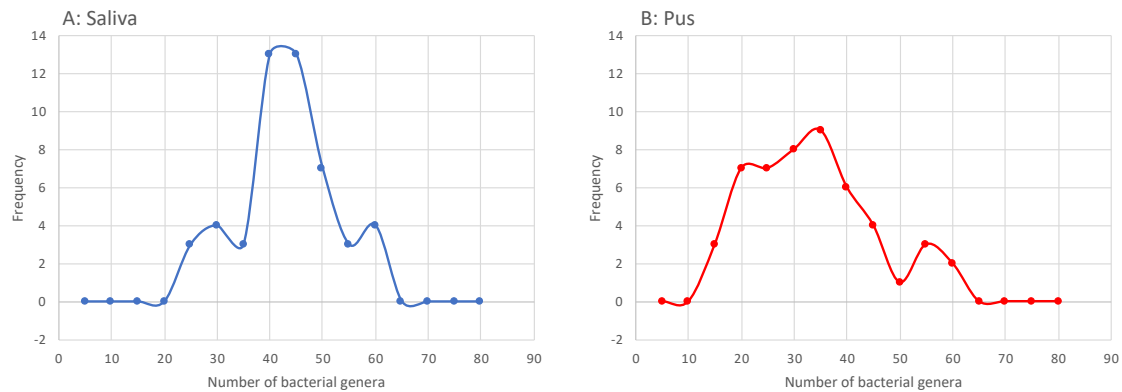
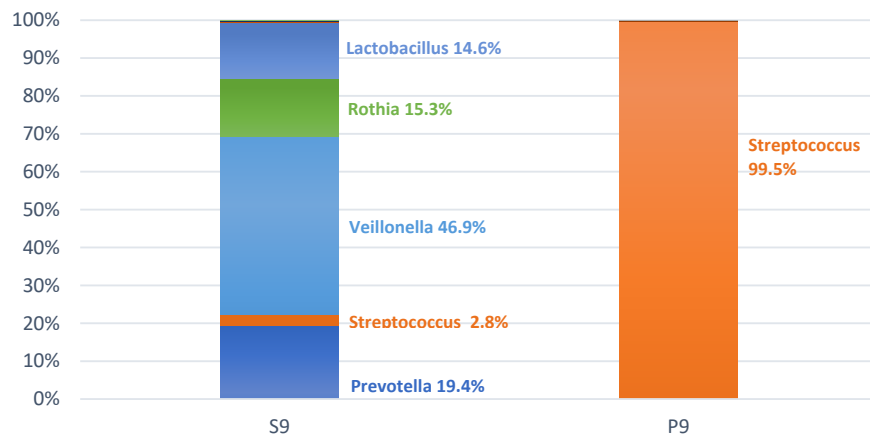


Figure 2. Histogram of the counted bacterial genera in the saliva (A) and the pus (B) to describe alpha diversity. The occurrence of a genus was counted if the genus contributed to at least 0.01% of the microbiome.

Despite the high number of different bacteria even in the pus samples, we found a clear predominance of one genus, namely *Streptococcus*, in two of the 50 (4%) cases. One of these cases is presented in Figure 3. The microbiomes found in the pus of these patients presumably correspond to a bacterial mono-infection with *Streptococcus*, while all other microbiomes of the pus showed the typical picture of a polymicrobial infection without a predominance of a specific genus. Figure 4 outlines a case of a typical polymicrobial infection. Thus, a polymicrobial infection could be observed in 48 of 50 cases (96%).



- | | | |
|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|
| ■ Preotella | ■ Streptococcus | ■ Fusobacterium |
| ■ Porphyromonas | ■ Veillonella | ■ Rothia |
| ■ Neisseria | ■ Alloprevotella | ■ Haemophilus |
| ■ Peptostreptococcus | ■ Parvimonas | ■ Actinomyces |
| ■ Lactobacillus | ■ Atopobium | ■ Treponema |
| ■ Mogibacterium | ■ Gemella | ■ Selenomonas |
| ■ Oribacterium | ■ Bifidobacterium | ■ Erysipelotrichaceae bacterium |
| ■ Lachnospiraceae bacterium | ■ Coriobacterium | ■ Mycoplasma |
| ■ Capnocytophaga | ■ Campylobacter | ■ Tannerella |
| ■ Dialister | ■ Bacteroides | ■ Ruminococcus |
| ■ Lachnoanaerobaculum | ■ Olsenella | ■ Eubacterium |
| ■ Staphylococcus | ■ Corynebacterium | ■ Bacteroidales bacterium |
| ■ Escherichia-Shigella (E.coli) | ■ Delftia | ■ Comamonas |
| ■ Howardella | ■ Ralstonia | ■ Listeria |
| ■ Propionibacterium | ■ Sphingomonas | ■ Halomonas |

Figure 3. Microbiome of the saliva (S9) and the pus (P9) of patient no. 9. Herein, 99.5% of the reads belong to the genus *Streptococcus* and thus show the picture of a mono-infection. The legend contains all detected bacterial genera of the two related samples. The order in the legend corresponds to the total abundance in saliva and pus of all 50 samples (decreasing from left to right).

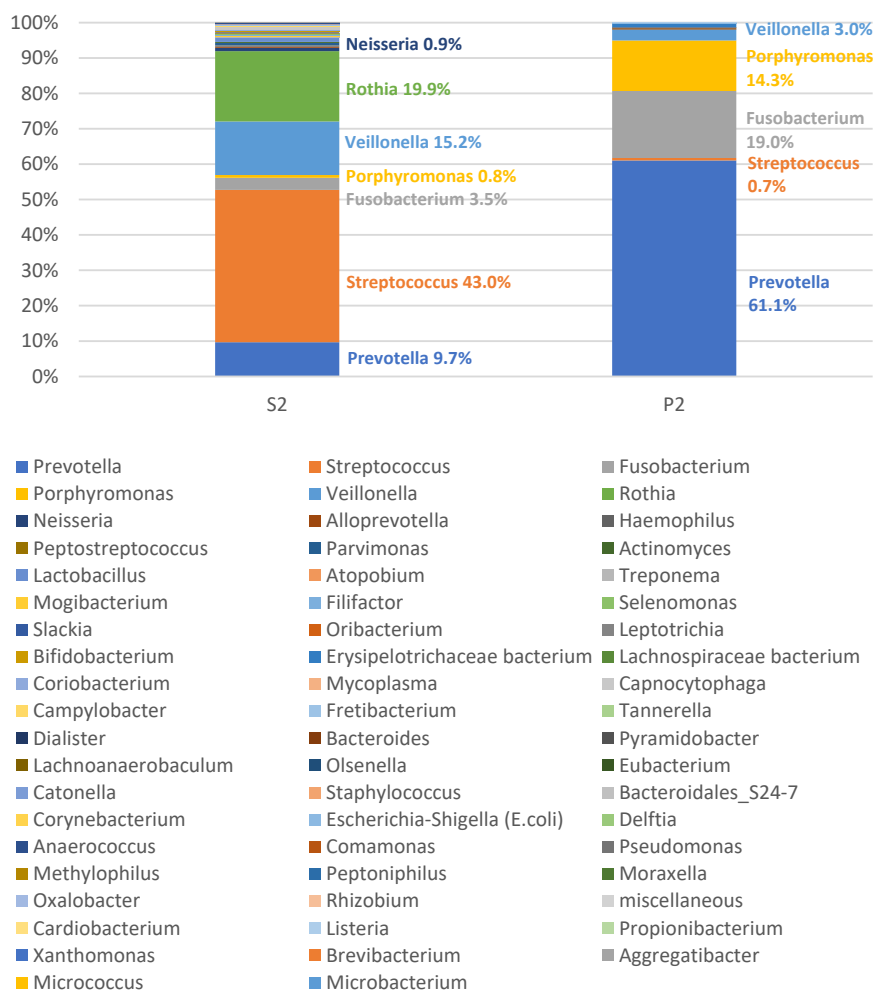


Figure 4. Microbiome of the saliva (S2) and the pus (P2) of patient no. 2. The microbiome of the pus shows the typical picture of a polymicrobial infection. The legend contains all detected bacterial genera of the two related samples. The order in the legend corresponds to the total abundance in saliva and pus of all 50 samples (decreasing from left to right).

In order to show the composition of the microbiomes, Table 1 lists the 50 most frequently detected bacterial genera of the saliva and the pus samples. Since no normal distribution can be assumed for the relative frequencies of the reads, the median can be considered a more suitable measure than the arithmetic mean. Thus, Figures 5 and 6 show the median composition of the saliva and pus microbiomes. It can be clearly seen that the compositions of the microbiomes differ. In particular, the genera *Porphyromonas* and *Fusobacterium* are more common in the pus, while the genus *Streptococcus* is less abundant in the pus. Despite the two described mono-infections with *Streptococcus*, the median relative frequency of the DNA from this genus was only 1.15% in pus.

Table 1. Relative frequencies in percent of the 50 most frequently detected bacterial genera in the saliva and pus samples, sorted in descending order according to the mean value. It is obvious that the median deviates often from the mean and thus a normal distribution of the data cannot be assumed. The column “S.dev.” represents the standard deviation and the column “MM” extrapolates the median to 100% and indicates what percentage of a saliva or pus sample can be assigned to a corresponding bacterial genus.

| Genus (Saliva Samples) | Mean | S.dev | Median | MM | Genus (Pus Samples) | Mean | S.dev. | Median | MM |
|--------------------------------------|-------|-------|--------|-------|--------------------------------------|-------|--------|--------|-------|
| <i>Prevotella</i> | 17.65 | 13.95 | 16.39 | 26.67 | <i>Prevotella</i> | 27.12 | 17.00 | 27.91 | 48.76 |
| <i>Streptococcus</i> | 17.26 | 13.85 | 14.95 | 24.34 | <i>Fusobacterium</i> | 16.03 | 18.92 | 9.13 | 15.95 |
| <i>Veillonella</i> | 9.33 | 8.63 | 6.67 | 10.85 | <i>Porphyromonas</i> | 12.94 | 13.95 | 11.26 | 19.67 |
| <i>Rothia</i> | 8.43 | 11.95 | 4.40 | 7.16 | <i>Streptococcus</i> | 6.57 | 20.07 | 1.15 | 2.00 |
| <i>Neisseria</i> | 7.18 | 10.99 | 2.87 | 4.68 | <i>Peptostreptococcus</i> | 4.91 | 6.97 | 0.17 | 0.30 |
| <i>Haemophilus</i> | 5.85 | 8.47 | 2.25 | 3.66 | <i>Parvimonas</i> | 4.79 | 6.58 | 2.16 | 3.78 |
| <i>Actinomyces</i> | 4.39 | 3.41 | 3.99 | 6.50 | <i>Veillonella</i> | 3.31 | 3.28 | 2.83 | 4.95 |
| <i>Alloprevotella</i> | 4.14 | 8.01 | 0.86 | 1.39 | <i>Alloprevotella</i> | 2.36 | 5.14 | 0.42 | 0.74 |
| <i>Lactobacillus</i> | 4.10 | 6.02 | 1.94 | 3.16 | <i>Mogibacterium</i> | 1.45 | 1.78 | 1.02 | 1.79 |
| <i>Porphyromonas</i> | 2.63 | 4.72 | 0.90 | 1.47 | <i>Filifactor</i> | 1.36 | 2.17 | 0.47 | 0.82 |
| <i>Fusobacterium</i> | 2.35 | 2.91 | 1.47 | 2.39 | <i>Atopobium</i> | 1.32 | 2.09 | 0.14 | 0.24 |
| <i>Atopobium</i> | 2.23 | 2.58 | 1.32 | 2.15 | <i>Erysipelothrix</i> | 1.28 | 3.26 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Gemella</i> | 1.28 | 2.05 | 0.45 | 0.73 | <i>Slackia</i> | 1.24 | 1.86 | 0.24 | 0.42 |
| <i>Leptotrichia</i> | 1.14 | 1.34 | 0.42 | 0.69 | <i>Treponema</i> | 1.18 | 3.10 | 0.05 | 0.08 |
| <i>Bifidobacterium</i> | 1.09 | 1.97 | 0.23 | 0.37 | <i>Oribacterium</i> | 0.99 | 2.70 | 0.02 | 0.03 |
| <i>Peptostreptococcus</i> | 0.93 | 1.64 | 0.14 | 0.24 | <i>Lachnospira</i> | 0.96 | 2.34 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Capnocytophaga</i> | 0.92 | 1.46 | 0.24 | 0.39 | <i>Erysipelotrichaceae bacterium</i> | 0.85 | 2.03 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Treponema</i> | 0.83 | 1.96 | 0.22 | 0.35 | <i>Selenomonas</i> | 0.82 | 4.37 | 0.01 | 0.02 |
| <i>Selenomonas</i> | 0.71 | 1.03 | 0.29 | 0.48 | <i>Coriobacterium</i> | 0.79 | 2.36 | 0.06 | 0.10 |
| <i>Mogibacterium</i> | 0.55 | 0.96 | 0.19 | 0.31 | <i>Family_XIII_ge</i> | 0.74 | 1.33 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Parvimonas</i> | 0.50 | 0.93 | 0.12 | 0.20 | <i>Mycoplasma</i> | 0.71 | 2.21 | 0.00 | 0.01 |
| <i>Oribacterium</i> | 0.49 | 0.65 | 0.18 | 0.29 | <i>Lachnospiraceae bacterium</i> | 0.66 | 1.61 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Campylobacter</i> | 0.46 | 0.49 | 0.34 | 0.55 | <i>Fretibacterium</i> | 0.51 | 2.16 | 0.01 | 0.01 |
| <i>Erysipelothrix</i> | 0.42 | 0.80 | 0.00 | 0.00 | <i>Gemella</i> | 0.48 | 1.42 | 0.01 | 0.01 |
| <i>Lachnospira</i> | 0.41 | 0.90 | 0.00 | 0.00 | <i>Bacteroides</i> | 0.47 | 2.80 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Lachnoanaerobaculum</i> | 0.37 | 0.66 | 0.08 | 0.12 | <i>Pyramidobacter</i> | 0.46 | 2.24 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Lachnospiraceae bacterium</i> | 0.36 | 0.89 | 0.01 | 0.01 | <i>Dialister</i> | 0.41 | 0.89 | 0.04 | 0.08 |
| <i>Pasteurella</i> | 0.30 | 0.88 | 0.00 | 0.00 | <i>Tannerella</i> | 0.33 | 0.84 | 0.00 | 0.01 |
| <i>Mycoplasma</i> | 0.29 | 0.67 | 0.04 | 0.06 | <i>Campylobacter</i> | 0.31 | 0.70 | 0.02 | 0.04 |
| <i>Slackia</i> | 0.25 | 0.45 | 0.08 | 0.14 | <i>Neisseria</i> | 0.31 | 0.75 | 0.01 | 0.01 |
| <i>Erysipelotrichaceae bacterium</i> | 0.24 | 0.53 | 0.00 | 0.00 | <i>Ruminococcus</i> | 0.30 | 1.37 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Filifactor</i> | 0.24 | 0.46 | 0.02 | 0.04 | <i>Eubacterium</i> | 0.29 | 0.51 | 0.01 | 0.01 |
| <i>Fretibacterium</i> | 0.24 | 0.44 | 0.06 | 0.10 | <i>Haemophilus</i> | 0.28 | 0.80 | 0.01 | 0.01 |
| <i>Tannerella</i> | 0.23 | 0.36 | 0.08 | 0.13 | <i>Actinomyces</i> | 0.25 | 1.21 | 0.01 | 0.02 |
| <i>Family_XIII_ge</i> | 0.23 | 0.49 | 0.00 | 0.00 | <i>Catonella</i> | 0.21 | 0.58 | 0.03 | 0.06 |
| <i>Coriobacterium</i> | 0.21 | 0.35 | 0.09 | 0.14 | <i>Olsenella</i> | 0.20 | 0.64 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Olsenella</i> | 0.17 | 0.42 | 0.03 | 0.06 | <i>Rikenella</i> | 0.19 | 0.41 | 0.00 | 0.01 |
| <i>Dialister</i> | 0.14 | 0.28 | 0.04 | 0.07 | <i>Staphylococcus</i> | 0.18 | 0.79 | 0.01 | 0.02 |
| <i>Ruminococcus</i> | 0.13 | 0.27 | 0.02 | 0.03 | <i>Clostridium</i> | 0.17 | 0.73 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Desulfovibrio</i> | 0.09 | 0.27 | 0.00 | 0.00 | <i>Acidaminococcus</i> | 0.16 | 0.79 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Escherichia-Shigella (E.coli)</i> | 0.09 | 0.48 | 0.00 | 0.00 | <i>Clostridiales bacterium</i> | 0.16 | 0.52 | 0.00 | 0.00 |
| <i>SR1_(Absconditabacteria)_ge</i> | 0.09 | 0.37 | 0.00 | 0.00 | <i>Bacteroidales_S24-7</i> | 0.16 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Corynebacterium</i> | 0.08 | 0.15 | 0.03 | 0.05 | <i>Peptococcus</i> | 0.13 | 0.38 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Catonella</i> | 0.08 | 0.14 | 0.02 | 0.04 | <i>Rothia</i> | 0.12 | 0.36 | 0.01 | 0.02 |
| <i>Bacteroides</i> | 0.07 | 0.38 | 0.00 | 0.00 | <i>Stenotrophomonas</i> | 0.12 | 0.82 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Mollicutes</i> | 0.07 | 0.21 | 0.00 | 0.00 | <i>Lactobacillus</i> | 0.12 | 0.31 | 0.02 | 0.03 |
| <i>Sphaerochaeta</i> | 0.07 | 0.36 | 0.00 | 0.00 | <i>Desulfovibrio</i> | 0.11 | 0.55 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Rikenella</i> | 0.07 | 0.15 | 0.01 | 0.01 | <i>Delftia</i> | 0.09 | 0.41 | 0.00 | 0.01 |
| <i>Peptococcus</i> | 0.05 | 0.10 | 0.00 | 0.00 | <i>Bacteroidales bacterium</i> | 0.08 | 0.44 | 0.00 | 0.00 |
| <i>Flavobacterium</i> | 0.04 | 0.08 | 0.00 | 0.00 | <i>Pasteurella</i> | 0.07 | 0.36 | 0.00 | 0.00 |

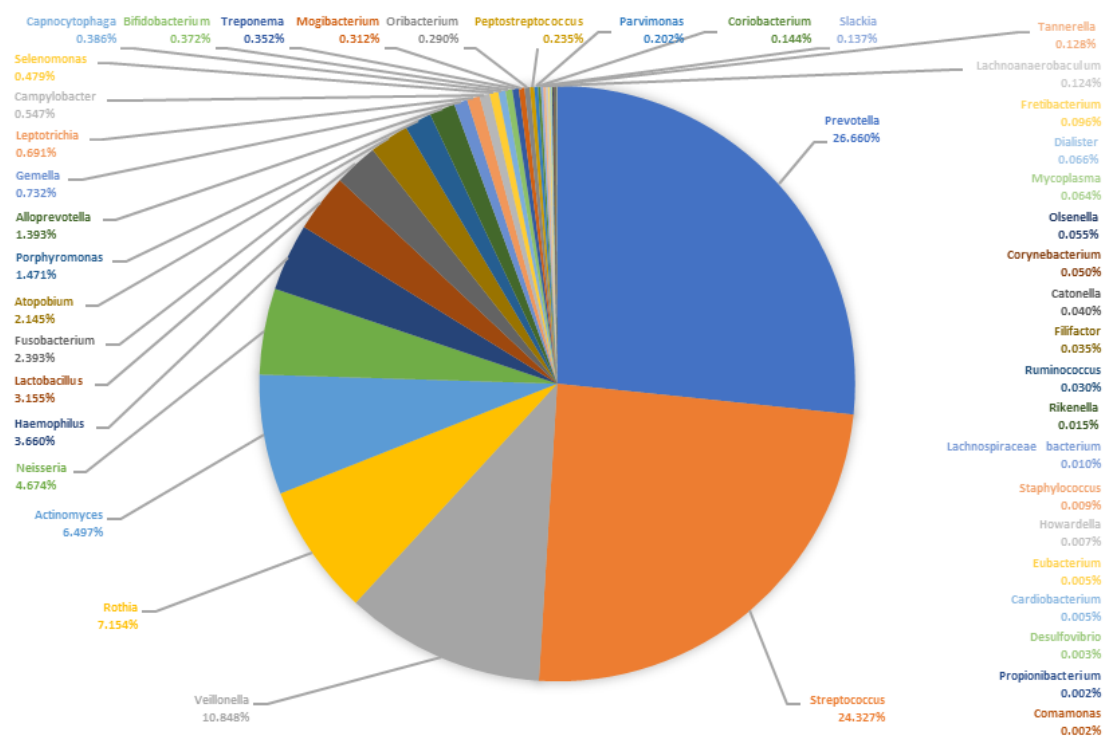


Figure 5. Median microbiome of all saliva samples ($n = 50$). The pie chart shows the proportion of the bacterial genera of the sum of all medians of the relative abundances.

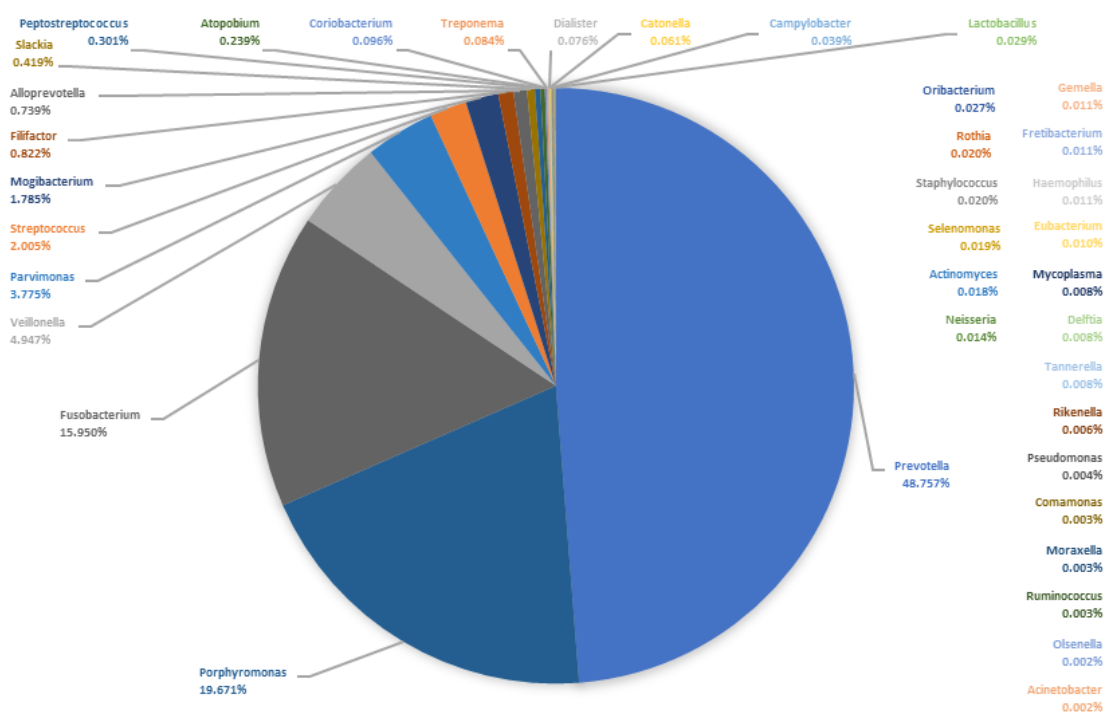


Figure 6. Median microbiome of all pus samples ($n = 50$). The pie chart shows the proportion of the bacterial genera of the sum of all medians of the relative abundances.

To describe the composition of the microbiomes in more detail, Figure 7 shows a heatmap of the saliva and pus samples, where the different samples are separated in terms of content (saliva samples on the left side and pus samples on the right side).

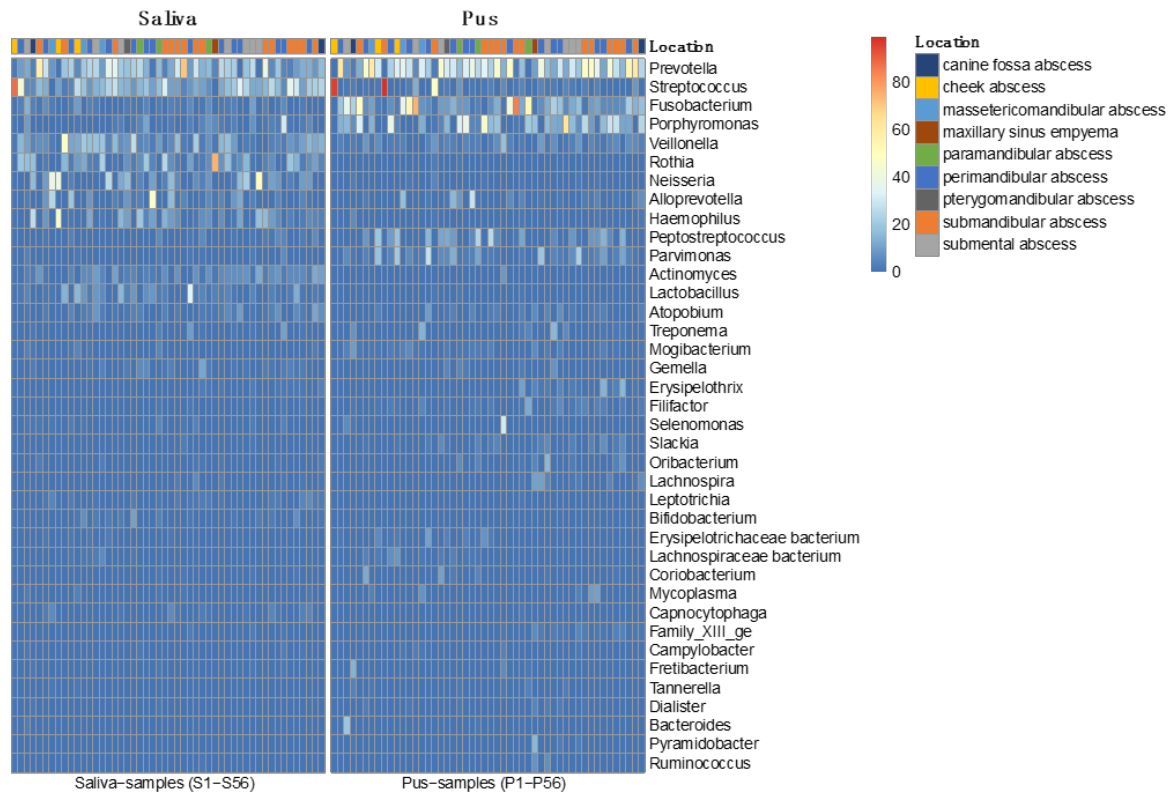


Figure 7. Heatmap of all saliva and pus samples ($n = 100$). Colors show the relative frequencies (sum of rows $> 20\%$). Saliva samples are shown on the left side and pus samples on the right side. It is obvious that the abundance of *Porphyromonas* and *Fusobacterium* is greater in pus while the abundance of *Streptococcus* is greater in saliva.

Figure 8 shows the corresponding heatmap in which the saliva and pus samples are subjected to hierarchical clustering. It is clearly visible that the algorithm separates the samples almost completely due to the different compositions of the samples. It can also be seen that the abscess location has no influence on the composition of the microbiome. Figure 9 shows this clearly using principal component analysis for the bacteria listed in the heatmap. It is clearly recognizable that the saliva samples are separated from the pus samples, showing the predominant bacteria in saliva at the bottom right and the predominant bacteria in pus at the top left, according to the median microbiomes of saliva and pus (Figures 5 and 6).

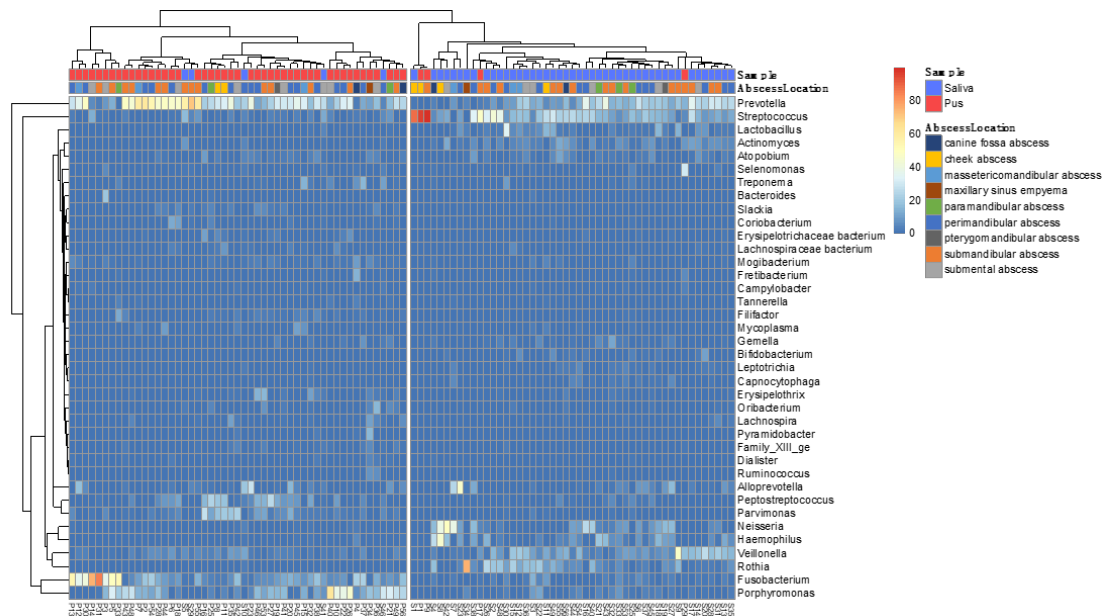


Figure 8. Heatmap of all saliva and pus samples ($n = 100$). Colors show the relative frequency of the reads of the most frequent bacterial genera (sum of rows > 20%). Hierarchical clustering with dendrogram (method: ward with Euclidean distance). It is demonstrated that the samples are almost completely separated by clustering, indicating the different compositions of the samples. The heatmap also shows that abscess location has no significant influence on the composition of the microbiome.

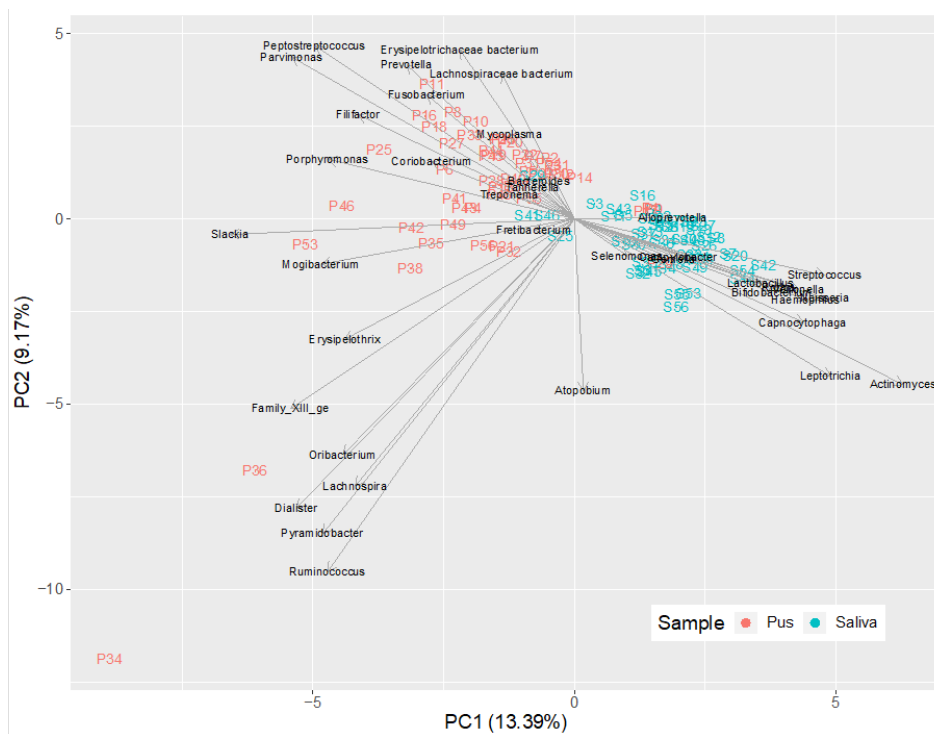


Figure 9. Principal component analysis biplot of all saliva and pus samples ($n = 100$; sum of rows > 20%) in order to visualize the relationship between the bacterial genera and the distances between samples (beta diversity). As can be seen, there is almost a complete separation of the samples (saliva and pus).

Figure 10 displays the oxygen metabolism of the bacteria in the pus and the saliva according to the median microbiome. It is obvious that the pus group contained predominantly anaerobic bacteria, while, in saliva, around half of the bacteria were aerobic and facultative anaerobic.

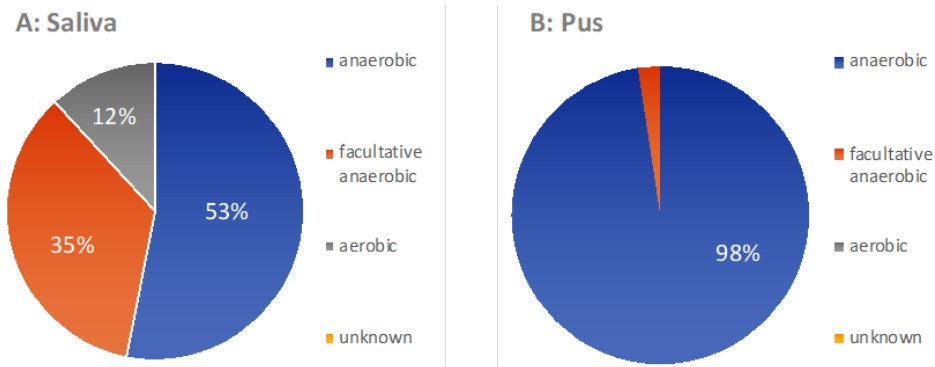


Figure 10. Median metabolism of the saliva samples (A) and the pus samples (B) (n = 50). There is a clear increase in the proportion of anaerobic bacteria in the abscess.

Regarding the median microbiome of the pus, *Prevotella*, *Porphyromonas* and *Fusobacterium* were especially predominant. Individual species of these genera have been described as highly periodontally pathogenic by numerous authors. Thus, Socransky et al. defined bacterial complexes that are supposed to express different degrees of pathogenicity by means of color [21]. In particular, bacteria that can be assigned to the orange and red complexes indicate strong pathogenicity. With the underlying 16S rRNA gene analysis, the bacteria can only be identified down to the level of the genus, so that a definitive classification cannot be made here. However, Figure 11 attempts to outline a potential affiliation with the orange and the red complex in particular. For the genera with no relationship to the complexes and the genus *Streptococcus* (otherwise “the yellow complex”), the natural habitat of the bacteria is indicated, such as “gut” or “oral cavity”. Considering the results, a possible affiliation to the orange or red complex is observed clearly more frequently in pus than in saliva. It can therefore be assumed that the pathogenic potential of the bacteria identified in pus is significantly higher than in saliva.

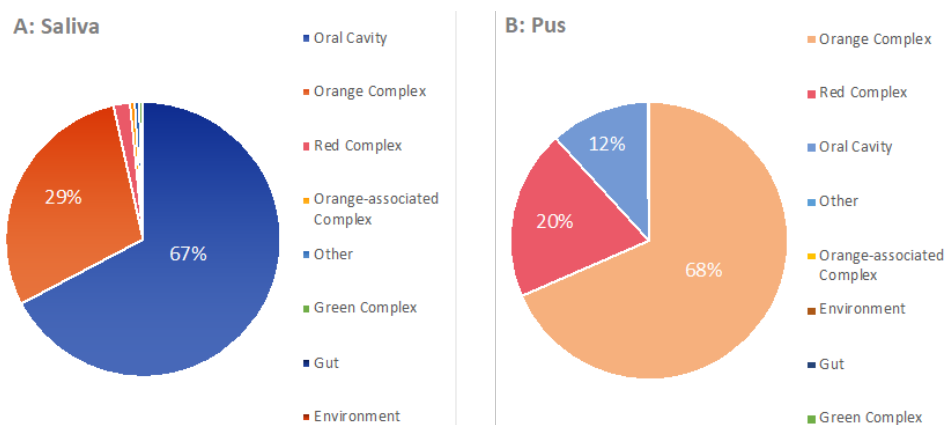


Figure 11. Classification of the median microbiomes ((A) saliva (B) pus) according to the complexes described by Socran-Scheme 50. [21]. Bacteria of the red and orange complex are associated with strong pathogenicity in periodontal disease. The genus *Streptococcus* (otherwise yellow complex) was assigned to the “oral cavity” group in this representation.

Finally, the phylum affiliation of the individual bacterial genera in saliva and pus was determined (Figure 12). In saliva, the results were comparable to those of other investigations [10]. In the pus, the result was also comparable to other studies [3] but with a much clearer predominance of Bacteroidetes.

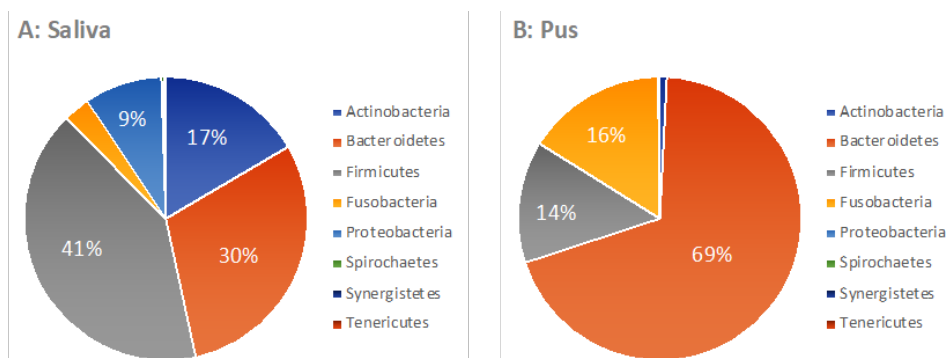


Figure 12. Phylum-level diversity of the oral microbiome (A) and the pus microbiome (B) ($n = 50$).

4. Discussion

Acute odontogenous abscesses are among the most common inflammatory diseases in the head and neck region. Most abscesses are localized and can be successfully treated by local incision from the mouth using local anesthesia [3].

Larger abscesses often show a tendency to spread and are usually incised extraorally using general anesthesia [1]. These abscesses can cause severe local and systemic complications and even lead to death [1–3]. Local complications are osteomyelitis and sinusitis and systemic complications include sepsis, endocarditis, spondylitis, orbital phlegmon, orbital abscess, necrotizing fasciitis, brain abscess, mediastinitis and adult respiratory distress syndrome [1,3]. Rapid and efficient diagnosis and therapy is therefore of great importance, especially in advanced diseases. In addition to adequate imaging, the determination of the microorganisms present in the abscess is of particular importance.

4.1. Culture-Based versus Molecular Detection Methods

Traditionally, culture methods have been used for bacterial detection, which have provided a considerable amount of information on bacterial etiology and the species involved in odontogenic abscesses [3]. Nevertheless, the sole detection of bacteria by means of culture does not seem to provide a fully comprehensive picture of the actually present bacterial spectrum [3]. In order to successfully culture oral bacteria in the laboratory, the culture media must be adapted to their specific variable requirements [12,22]. Since odontogenic abscesses are usually polymicrobial in composition [3], it can be difficult to provide a culture environment that is equally suitable for all relevant bacteria. In addition, bacterial detection may also be incorrect or incomplete due to inadequate transport conditions or delayed start of culture [3]. Early microscopic studies already discussed that the actual number of bacteria in the mouth is probably significantly higher than the number of bacteria that can actually be detected by culture [23]. The introduction of culture-independent molecular biological methods into the analysis of oral bacterial diversity has not only confirmed this picture conveyed by microscopic studies, but also revealed an even broader and more diverse spectrum of oral bacteria [14]. In 2013, Siquera and Rôças described in their review that 40% to 70% of oral bacterial species have not yet been cultivated and phenotypically characterized [3]. To date, a lack of essential nutrients or growth factors in the culture, overfeeding conditions during culture, toxicity of the culture medium itself, inhibition by other microorganisms in the sample and metabolic dependence on other microorganisms have been suggested as possible reasons for the failure of culture-based detection [3]. It is therefore not surprising that only a few species

have been described as causative pathogens, especially in culture-based studies on the microbial spectrum of odontogenic abscesses [24–30]. The review by Siquera and Rôças, for example, reported an average of only 3.3 to 8.5 identified species per abscess using culture-based methods, whereas 77 to 114 genera or species per abscess were found using next-generation sequencing [3]. Despite the widely publicized importance of emergent communities and symbioses [21], the search is ongoing for the “triggering species” to treat effectively with an antibiogram [3]. Numerous authors have demonstrated that endodontic infections such as other endogenous infections are not due to a single bacterial species but usually due to a community of species [31–33]. The search for a causative pathogen with the aim of a suitable antibiotic therapy according to an antibiogram therefore appears to be difficult in odontogenic infections.

4.2. Microbiome of the Saliva

The aim of this study was to determine the oral microbiome in saliva and the microbiome of the pus of abscesses, respectively, in patients with extensive odontogenic infections using 16S rRNA gene analysis, next-generation sequencing and bioinformatics. For this purpose, a saliva sample was obtained prior to incision of the abscess and a pus sample was harvested during the incision and evaluated beyond normal clinical routine. The examination of the oral microbiome from the saliva samples revealed findings comparable to other examinations [10,34–36]. In the review of Verma et al., *Firmicutes* were reported at a maximum of 36.7%, *Bacteroidetes* at 17.1%, *Proteobacteria* at 17.1%, *Actinobacteria* at 11.6%, *Spirochaetes* at 7.9% and *Fusobacteria* at 5.2% [10]. In the present work, the phyla occur with similar frequency (Figure 12), although the frequency of the Spirochaetes was significantly lower. In terms of genus level, several authors have reported an oral core microbiome [10,36]. According to Bik et al. [37], this includes the genera *Actinomyces*, *Atopobium*, *Corynebacterium* and *Rothia* of the phylum *Actinobacteria*; the genera *Bergeyella*, *Capnocytophaga* and *Prevotella* of the phylum *Bacteroidetes*; the genera *Granulicatella*, *Streptococcus* and *Veillonella* of the phylum *Firmicutes*; the genera *Campylobacter*, *Cardiobacterium*, *Haemophilus* and *Neisseria* of the phylum *Proteobacteria* as well as *Fusobacteria* and *TM7*. The genera *Derrxia* and *Leptotrichia* were added later by Chen et al. [10,16]. With the exception of the genera *Bergeyella*, *Derrxia* and *Granulicatella*, these genera were also detected in the present study in correspondingly relevant frequencies. In contrast, the genera *Chryseobacterium*, *Anaeroglobus*, *Filifactor*, *Lactobacillus*, *Johnsonella*, *Shuttleworthia*, *Brachymonas*, *Propiniovibri*, *Scardovia*, *Olsenella*, *Cryptobacterium*, *Bulleidia*, *Peptostreptococcus*, *Dialister*, *Gemella*, *Selenomonas*, *Oribacterium*, *Eikenella*, *Kingella*, *Lautropia*, *Propionibacterium* and *Porphyromonas* are classified as variable oral microbiome [10,37]. In the present study, most of these genera also occurred sporadically, but the genera *Porphyromonas* (1.5%) and *Alloprevotella* (1.4%) were also found here with a notable frequency of more than 1% in the median salivary microbiome. The genera *Tannerella* (0.1%), *Parvimonas* (0.2%) and *Filifactor* (0.02%) were also found consistently and in relevant abundance in the saliva of almost all abscess patients. All five genera have been frequently associated with periodontal or apical inflammatory processes [3,38,39] and could be a possible indicator of a more aggressive variable oral microbiome in patients with extensive odontogenic abscesses.

4.3. Microbiome of the Pus

As in other previously conducted molecular biological studies on the bacterial spectrum in the pus of odontogenic abscesses, it was shown that the odontogenic infections were usually not only polymicrobial in nature, but that a much higher number of bacteria could be detected by molecular biological methods than by conventional culture-based detection [3]. With a mean number of 31.44 (± 12.09) genera in the pus, a separate microbiome of the pus is obvious. There was no case where no bacteria could be detected in the pus. Thus, a situation comparable to a culture-negative abscess could not be observed. In contrast to the polymicrobial nature of odontogenic abscesses, in 2 out of 50 cases, a different scenario emerged, with a strong predominance of only one genus. This was, in both

cases, the genus *Streptococcus*, which played a much smaller role in the pus microbiomes of the other 48 samples, as shown in the heatmaps of Figures 7 and 8. It is possible that the molecular detection method in two samples revealed a real mono-infection with a “culprit bacterium”, which probably belonged to normal oral *Streptococcus*. In the remaining 48 samples, however, as in other studies, there was a strong predominance of anaerobic genera, while the facultative anaerobic genus *Streptococcus* played only a subordinate role (Figure 10). The anaerobic genera were, in particular, associated with the development of acute symptoms in apical periodontal lesions in the work of Siqueira and Rôças [3]. The results of the present study thus underline the assumption that mainly bacteria of the genera *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Veillonella* and *Parvimonas* are involved in the formation of acute dentogenic abscesses, even if these bacteria also occur with equal abundance in the root canal in asymptomatic chronic apical periodontitis [40,41]. Principal component analysis (Figure 9) further shows that even bacteria with a lower abundance, such as *Mogibacterium*, *Filifactor*, *Slackia* and *Peptostreptococcus*, may also be characteristic for the microbiological community of an odontogenic abscess.

Veillonella, the fourth most common genus of the median pus microbiome, is an early colonizer of oral biofilms and a causative agent of opportunistic infections [42]. In the present study, *Veillonella* shows a similar distribution to the genus *Streptococcus* in both saliva and pus. An interaction with *Streptococcus* in the development of caries [43] as well as the typical presence in the root canal with endodontic infections has been described [44]. Rôças et al. have described in their study that *V. parvula* produces menaquinones that can meet the specific nutrient requirements of *Porphyromonas* and *Prevotella* species for this substance [44]. In addition, *V. parvula* was found to promote the growth of *T. denticola* in co-cultures by providing peptidase activities complementary to those of *T. denticola* [44,45]. The genus *Veillonella* thus appears to be an important member of a pathogenic microbial community together with *Porphyromonas*, *Prevotella* and *Treponema*.

The abundance of the genus *Mogibacterium* is also worth mentioning. With a proportion of 1.8% of the median pus microbiome, the frequency is almost as high as that of the genus *Streptococcus* at 2.0%. Although no direct correlation between odontogenic abscesses and an increased occurrence of *Mogibacterium* has been described so far, there are indeed reports that *Mogibacterium* can occur more frequently in association with pathological processes [46,47]. For instance, the genus *Mogibacterium* is thought to play a role in the development of inflammation in bisphosphonate-associated bone necrosis of the jaw, together with the genera *Porphyromonas* and *Treponema* [48]. Another study reports the frequent occurrence of *Mogibacterium* in the root canal before and after endodontic treatment [49]. *Mogibacterium* may therefore play a greater role in the development of odontogenic abscesses than previously thought. Another genus, the eighth most abundant one, was the genus *Filifactor*, accounting for 0.8% of the median microbiome. For the species *Filifactor alocis*, it has been described that the bacterium, which is very difficult to cultivate, plays a role in both marginal periodontitis and endodontic infection [49–52]. It is often reported that this pathogen may play a much more important role in the pathogenesis of inflammatory processes than had been assumed in the past [52].

4.4. Pathogenicity of the Pus Microbiome

Overall, the results of our study seem to show a clear shift in pathogenicity from the microbiome of saliva to the microbiome of pus. Thus, pathogenicity mechanisms have been reported for many of the genera commonly found in pus [48,53–56] and the importance of bacterial communities has often been highlighted [3,10,31]. In this context, the bacterial complexes described by Socransky in the development of periodontal diseases in particular became well-known [21,54]. Figure 11 represents an attempt to assign the bacterial genera to a specific habitat or group. Potentially pathogenic bacteria such as *Prevotella*, *Fusobacterium* or *Parvimonas* were therefore assigned to the “orange complex” because of a possible or probable affiliation and genera such as *Porphyromonas*, *Tannerella* and *Treponema* to the “red complex”. The remaining genera were assigned to their natural habitat

because of their potentially lower pathogenicity. For example, *Neisseria*, *Haemophilus* or *Streptococcus* were assigned to the “oral cavity” habitat according to their importance in the oral microbiome [10]. Looking at these classifications according to potential pathogenicity, a clear shift towards pathogenicity (orange and red complex) can be seen between their frequency in saliva and their frequency in pus. The microbiome of the abscess is therefore by no means a simple dissipated amount of oral or pharyngeal microbiome. Instead, it is obviously a collection of bacteria and bacterial communities with high pathogenicity.

4.5. Phylum-Level Diversity and the Importance of *Streptococcus*

Looking at the median microbiome of the pus at the phylum level, it can be seen that *Bacteroidetes* (including *Prevotella* and *Porphyromonas*) had by far the largest share of 69%, while *Firmicutes* (including *Streptococcus*, *Veillonella* and *Parvoimonas*) had a share of only 14% and *Fusobacteria* had a share of 16%. Compared to other studies based on culture-based methods, the proportion of *Firmicutes* in our work was significantly lower and the proportion of *Bacteroidetes* significantly higher [3,57,58]. In studies based on molecular methods, a lower proportion of *Firmicutes* was also shown, but this was still significantly higher than in our work, at 38% to 64%. [3]. It is remarkable that almost no *Proteobacteria* (*Campylobacter*, *Cardiobacterium*, *Haemophilus*, *Neisseria*, among others) were detected in the abscess by molecular methods, as also seen in this work [3]. It is possible that the detection of these genera by culture is a result of contamination by saliva during sampling. A similar picture emerges looking at the frequently detected genus *Streptococcus*.

In the present molecular study, the genus *Streptococcus* showed a much more dominant occurrence in the salivary microbiome than in the abscess microbiome, which was also confirmed by other authors [10]. However, *Streptococcus* in particular is very frequently detected in pure culture-based detection methods due to their easy cultivation. In contrast, cultivation of anaerobic bacteria is much more delicate, resulting in less frequent detection [24,30,57,59–62]. It can therefore be assumed that the culture-based detection of *Streptococcus* in odontogenic abscesses, as well as the antibiogram produced by this, may be attributed greater importance than is actually the case. It is quite conceivable that bacteria of the genera *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* and *Parvoimonas* are not sufficiently detected by the current culture-based methods and thus no suitable antibiogram can be prepared for the actual “culprit” pathogens of the abscess. This would imply that many culture-based pathogen detection methods for effective therapy adjustment would not only be delayed, but the antibiograms thus generated would even be of questionable relevance. However, predominantly, bacteria of the genera *Fusobacterium* and *Porphyromonas* have been associated with acute exacerbations and strong pathogenicity [3,33,53,55] and frequent resistance to common antibiotics has already been reported for the equally pathogenic bacteria of the genus *Prevotella* [63–65]. The question therefore emerges as to whether the solely culture-based evidence, as currently established in many hospitals, is still up to date given the current technical possibilities. In fact, most odontogenic abscesses are probably treated adequately and successfully by early abscess incision and, if there is a tendency to spread, by additional adequate calculated antibiotic therapy even without the availability of an antibiogram [1]. However, particularly in cases of very extensive abscesses that do not respond adequately to therapeutic efforts, adequate bacterial detection with preparation of an appropriate antibiogram can be of critical importance to patient outcomes. For these cases, it is necessary to demand that prompt bacterial determination by molecular biological methods should be introduced as soon as possible as a part of the clinical routine diagnostics.

5. Conclusions

1. The oral microbiome of patients with odontogenic abscesses was comparable to that of healthy subjects described in the literature, although very individual. However, the individually variable microbiome could possibly contain more bacteria with increased pathogenic potential.

2. Odontogenic infections are mainly polymicrobial (96%) and rarely mono-infections (4%). Similar to saliva, pus showed its own microbiome, with a mean number of 31.44 (± 12.09) genera.
3. Odontogenic abscesses are mainly caused by anaerobic bacterial strains. Aerobic and facultative anaerobic bacteria seem to play a minor role compared to previously published results described by other authors.
4. The most abundant genera in the pus were *Prevotella*, *Porphyromonas* and *Fusobacterium*, followed by *Veillonella*, *Parvimonas*, *Streptococcus*, *Mogibacterium* and *Filifactor*.
5. The pus microbiomes likely have a much higher pathogenic potential than the oral microbiomes derived from saliva.
6. Microbiome analysis detects significantly more bacteria than conventional culture-based methods and shows results even in the case of culture-negative samples. Molecular methods are expected to become the gold standard in medical microbiology diagnostics, particularly for polymicrobial infections with a predominance of anaerobic bacteria.

Author Contributions: Conceptualization, S.B., J.-F.W., H.-P.H., E.D. and S.A.; Data curation, S.B. and M.K.; Formal analysis, J.P.-K.; Investigation, S.B., S.Z.-G., D.S., T.H., M.W. and E.D.; Methodology, P.S. and E.D.; Project administration, S.A.; Supervision, H.-P.H. and S.A.; Validation, S.B. and H.-P.H.; Writing—original draft, S.B.; Writing—review and editing, S.Z.-G., D.S., P.S., J.-F.W., M.K., J.P.-K., T.H., M.W., H.-P.H., E.D. and S.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded collaboratively by the Institute of Medical Microbiology and the Clinic for Oral and Maxillofacial Surgery of the Justus-Liebig-University Giessen. This study was supported by the German Research Foundation DFG (KFO 309 Z01, SFB1021 Z02 and SFB-TR84 B/08) to TH.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the Justus-Liebig-University Giessen (Vote 191/16).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: The authors thank Trinad Chakraborty (Institute of Medical Microbiology) for making sequencing machines available.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interests.

References

1. Al-Nawas, B.; Karch, J. S3-Leitlinie (Langversion): Odontogene Infektionen. In *Leitlinien Zahnmedizin*; Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften: Berlin, Germany, 2016; Available online: www.awmf.org (accessed on 10 March 2020).
2. Al-Nawas, B.; Maeurer, M. Severe versus Local Odontogenic Bacterial Infections: Comparison of Microbial Isolates. *Eur. Surg. Res.* **2007**, *40*, 220–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Siqueira, J.F.; Rôças, I.N. Microbiology and Treatment of Acute Apical Abscesses. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 255–273. [[CrossRef](#)]
4. Warnke, P.H.; Becker, S.T.; Springer, I.N.; Haerle, F.; Ullmann, U.; Russo, P.A.; Wiltfang, J.; Fickenscher, H.; Schubert, S. Penicillin compared with other advanced broad spectrum antibiotics regarding antibacterial activity against oral pathogens isolated from odontogenic abscesses. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2008**, *36*, 462–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Böttger, S.; Lautenbacher, K.; Domann, E.; Howaldt, H.-P.; Attia, S.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F. Indication for an additional postoperative antibiotic treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2020**, *48*, 229–234. [[CrossRef](#)]
6. Flynn, T.R. The swollen face. Severe odontogenic infections. *Emerg. Med. Clin. N. Am.* **2000**, *18*, 481–519. [[CrossRef](#)]
7. Eckert, A.W.; Maurer, P.; Wilhelms, D.; Schubert, J. Soft tissue infections in oral, maxillofacial, and plastic surgery. Bacterial spectra and antibiotics. *Mund. Kiefer Gesichtschir.* **2005**, *9*, 389–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

8. Bali, R.K.; Sharma, P.; Gaba, S.; Kaur, A.; Ghanghas, P. A review of complications of odontogenic infections. *Natl. J. Maxillofac. Surg.* **2015**, *6*, 136–143. [[CrossRef](#)]
9. Palma, D.M.; Giuliano, S.; Cracchiolo, A.N.; Falcone, M.; Ceccarelli, G.; Tetamo, R.; Venditti, M. Clinical features and outcome of patients with descending necrotizing mediastinitis: Prospective analysis of 34 cases. *Infection* **2015**, *44*, 77–84. [[CrossRef](#)]
10. Verma, D.; Garg, P.K.; Dubey, A.K. Insights into the human oral microbiome. *Arch. Microbiol.* **2018**, *200*, 525–540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Wiese, K.G.; Merten, H.A.; Wiltfang, J.; Luhr, H.G. Clinical studies on the pathophysiology of odontogenic abscesses. *Mund Kiefer Gesichtschir.* **1999**, *3*, 242–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N. As-yet-uncultivated oral bacteria: Breadth and association with oral and extra-oral diseases. *J. Oral Microbiol.* **2013**, *5*, 21077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Streckbein, P.; Knitschke, M.; Hain, T.; Weigel, M.; Wilbrand, J.-F.; Domann, E.; Howaldt, H.-P.; Attia, S. A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics. *Pathogens* **2020**, *9*, 798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Siqueira, J.F.; Rôças, I.N. The Oral Microbiota in Health and Disease: An Overview of Molecular Findings. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1537*, 127–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Voelkerding, K.V.; Dames, S.A.; Durtschi, J.D. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 641–658. [[CrossRef](#)]
16. Echen, H.; Ejiang, W. Application of high-throughput sequencing in understanding human oral microbiome related with health and disease. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 508. [[CrossRef](#)]
17. Keller, P.M.; Hombach, M.; Bloemberg, G.V. 16S-rRNA-Gen-basierte Identifikation bakterieller Infektionen. *Biospektrum* **2010**, *16*, 755–758.
18. Griessel, T.; Zechel-Gran, S.; Olejniczak, S.; Weigel, M.; Hain, T.; Domann, E. High-resolution taxonomic examination of the oral microbiome after oil pulling with standardized sunflower seed oil and healthy participants: A pilot study. *Clin. Oral Investig.* **2021**, *25*, 2689–2703. [[CrossRef](#)]
19. Regier, Y.; Komma, K.; Weigel, M.; Kraiczky, P.; Laisi, A.; Pulliainen, A.T.; Hain, T.; Kempf, V.A.J. Combination of microbiome analysis and serodiagnostics to assess the risk of pathogen transmission by ticks to humans and animals in central Germany. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *41*, D590–D596. [[CrossRef](#)]
21. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Cugini, M.A.; Smith, C.; Kent, R.L., Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* **1998**, *25*, 134–144. [[CrossRef](#)]
22. Sizova, M.V.; Hohmann, T.; Hazen, A.; Paster, B.J.; Halem, S.R.; Murphy, C.M.; Panikov, N.S.; Epstein, S.S. New Approaches for Isolation of Previously Uncultivated Oral Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *78*, 194–203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Socransky, S.S.; Gibbons, R.J.; Dale, A.C.; Bortnick, L.; Rosenthal, E.; Macdonald, J.B. The microbiota of the gingival crevice area of man. I. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Arch. Oral Biol.* **1963**, *8*, 275–280. [[CrossRef](#)]
24. Heim, N.; Faron, A.; Wiedemeyer, V.; Reich, R.; Martini, M. Microbiology and antibiotic sensitivity of head and neck space infections of odontogenic origin. Differences in inpatient and outpatient management. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2017**, *45*, 1731–1735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Flynn, T.R.; Shanti, R.M.; Hayes, C. Severe Odontogenic Infections, Part 2: Prospective Outcomes Study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2006**, *64*, 1104–1113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Chandra, H.J.; Rao, B.H.S.; Manzoor, A.P.M.; Arun, A.B. Characterization and Antibiotic Sensitivity Profile of Bacteria in Orofacial Abscesses of Odontogenic Origin. *J. Maxillofac. Oral Surg.* **2016**, *16*, 445–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Opitz, D.; Camerer, C.; Camerer, D.-M.; Raguse, J.-D.; Menneking, H.; Hoffmeister, B.; Adolphs, N. Incidence and management of severe odontogenic infections—A retrospective analysis from 2004 to 2011. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2015**, *43*, 285–289. [[CrossRef](#)]
28. Lee, Y.Q.; Kanagalingam, J. Bacteriology of deep neck abscesses: A retrospective review of 96 consecutive cases. *Singap. Med. J.* **2011**, *52*, 351–355. [[CrossRef](#)]
29. Celakovsky, P.; Kalfert, D.; Smatanova, K.; Tuček, L.; Čermáková, E.; Mejzlik, J.; Kotulek, M.; Vrbacky, A.; Matoušek, P.; Stanikova, L.; et al. Bacteriology of deep neck infections: Analysis of 634 patients. *Aust. Dent. J.* **2015**, *60*, 212–215. [[CrossRef](#)]
30. Poeschl, P.W.; Spusta, L.; Russmueller, G.; Seemann, R.; Hirschl, A.; Poeschl, E.; Klug, C.; Ewers, R. Antibiotic susceptibility and resistance of the odontogenic microbiological spectrum and its clinical impact on severe deep space head and neck infections. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology.* **2010**, *110*, 151–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Siqueira, J.F.; Rôças, I.N. Community as the unit of pathogenicity: An emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology.* **2009**, *107*, 870–878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Munson, M.A.; Pitt-Ford, T.; Chong, B.; Weightman, A.; Wade, W.G. Molecular and Cultural Analysis of the Microflora Associated with Endodontic Infections. *J. Dent. Res.* **2002**, *81*, 761–766. [[CrossRef](#)]
33. Jenkinson, H.F.; Lamont, R.J. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* **2005**, *13*, 589–595. [[CrossRef](#)]
34. Dewhirst, F.E.; Chen, T.; Izard, J.; Paster, B.J.; Tanner, A.C.R.; Yu, W.-H.; Lakshmanan, A.; Wade, W.G. The Human Oral Microbiome. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 5002–5017. [[CrossRef](#)]

35. Chen, T.; Yu, W.-H.; Izard, J.; Baranova, O.V.; Lakshmanan, A.; Dewhirst, F.E. The Human Oral Microbiome Database: A web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database* **2010**, baq013. [[CrossRef](#)]
36. Zaura, E.; Keijsers, B.J.F.; Huse, S.M.; Crielaard, W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Bik, E.M.; Long, C.D.; Armitage, G.C.; Loomer, P.; Emerson, J.; Mongodin, E.F.; Nelson, K.E.; Gill, S.R.; Fraser-Liggett, C.M.; Relman, D.A. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* **2010**, *4*, 962–974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Chen, H.; Liu, Y.; Zhang, M.; Wang, G.; Qi, Z.; Bridgewater, L.; Zhao, L.; Tang, Z.; Pang, X. A *Filifactor alocis*-centered co-occurrence group associates with periodontitis across different oral habitats. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9053. [[CrossRef](#)]
39. Nibali, L.; Sousa, V.; Davrandi, M.; Spratt, D.; Alyahya, Q.; Dopico, J.; Donos, N. Differences in the periodontal microbiome of successfully treated and persistent aggressive periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **2020**, *47*, 980–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Siqueira, J.F.; Rôças, I.N.; Souto, R.; de Uzeda, M.; Colombo, A.P. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.* **2001**, *92*, 451–457. [[CrossRef](#)]
41. Van Winkelhoff, A.J.; Carlee, A.W.; de Graaff, J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infect. Immun.* **1985**, *49*, 494–497. [[CrossRef](#)]
42. Mashima, I.; Kamaguchi, A.; Nakazawa, F. The Distribution and Frequency of Oral *Veillonella* spp. in the Tongue Biofilm of Healthy Young Adults. *Curr. Microbiol.* **2011**, *63*, 403–407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Liu, S.; Chen, M.; Wang, Y.; Zhou, X.; Ren, B.; Li, M.; Cheng, L. Effect of *Veillonella parvula* on the physiological activity of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* **2020**, *109*, 104578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Rôças, I.; Siqueira, J. Culture-Independent Detection of *Eikenella corrodens* and *Veillonella parvula* in Primary Endodontic Infections. *J. Endod.* **2006**, *32*, 509–512. [[CrossRef](#)]
45. Ter Steeg, P.F.; Van Der Hoeven, J.S. Growth stimulation of *Treponema denticola* by periodontal microorganisms. *Antonie Leeuwenhoek* **1990**, *57*, 63–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Coker, O.O.; Dai, Z.; Nie, Y.; Zhao, G.; Cao, L.; Nakatsu, G.; Wu, W.K.; Wong, S.H.; Chen, Z.; Sung, J.J.Y.; et al. Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. *Gut* **2018**, *67*, 1024–1032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Stehlikova, Z.; Tlaskal, V.; Galanova, N.; Roubalova, R.; Kreisinger, J.; Dvorak, J.; Prochazkova, P.; Kostovcikova, K.; Bartova, J.; Libanska, M.; et al. Oral Microbiota Composition and Antimicrobial Antibody Response in Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis. *Microorganisms* **2019**, *7*, 636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Li, Q.; Pu, Y.; Lu, H.; Zhao, N.; Wang, Y.; Guo, Y.; Guo, C. *Porphyromonas*, *Treponema*, and *Mogibacterium* promote IL8/IFN γ /TNF α -based pro-inflammation in patients with medication-related osteonecrosis of the jaw. *J. Oral Microbiol.* **2020**, *13*, 1851112. [[CrossRef](#)]
49. Gomes, B.P.; Berber, V.B.; Kokaras, A.S.; Chen, T.; Paster, B.J. Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation. *J. Endod.* **2015**, *41*, 1975–1984. [[CrossRef](#)]
50. Gomes, B.P.; Louzada, L.M.; Almeida-Gomes, R.F.; Pinheiro, E.T.; Sousa, E.L.; Jacinto, R.C.; Arruda-Vasconcelos, R. Investigation of *Filifactor alocis* in primary and in secondary endodontic infections: A molecular study. *Arch. Oral Biol.* **2020**, *118*, 104826. [[CrossRef](#)]
51. Aruni, A.W.; Mishra, A.; Dou, Y.; Chioma, O.; Hamilton, B.N.; Fletcher, H.M. *Filifactor alocis*—A new emerging periodontal pathogen. *Microbes Infect.* **2015**, *17*, 517–530. [[CrossRef](#)]
52. Aruni, W.; Chioma, O.; Fletcher, H. *Filifactor alocis*: The Newly Discovered Kid on the Block with Special Talents. *J. Dent. Res.* **2014**, *93*, 725–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Han, Y.W. *Fusobacterium nucleatum*: A commensal-turned pathogen. *Curr. Opin. Microbiol.* **2015**, *23*, 141–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Holt, S.C.; Ebersole, J.L. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: The ‘red complex’, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology 2000* **2005**, *38*, 72–122. [[CrossRef](#)]
55. Jun, H.-K.; Jung, Y.-J.; Choi, B.-K. *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythia* induce cell death and release of endogenous danger signals. *Arch. Oral Biol.* **2017**, *73*, 72–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Mysak, J.; Podzimek, S.; Sommerova, P.; Lyuya-Mi, Y.; Bartova, J.; Janatova, T.; Prochazkova, J.; Duskova, J. *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *J. Immunol. Res.* **2014**, *2014*, 1–8. [[CrossRef](#)]
57. Williams, B.L.; McCann, G.F.; Schoenknecht, F.D. Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. *J. Clin. Microbiol.* **1983**, *18*, 770–774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Khemaleelakul, S.; Baumgartner, J.; Pruksakorn, S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.* **2002**, *94*, 746–755. [[CrossRef](#)]
59. Plum, A.W.; Mortelliti, A.J.; Walsh, R.E. Microbial Flora and Antibiotic Resistance in Odontogenic Abscesses in Upstate New York. *Ear Nose Throat J.* **2018**, *97*, E27–E31. [[CrossRef](#)]
60. Shakya, N.; Sharma, D.; Newaskar, V.; Agrawal, D.; Shrivastava, S.; Yadav, R. Epidemiology, Microbiology and Antibiotic Sensitivity of Odontogenic Space Infections in Central India. *J. Maxillofac. Oral Surg.* **2018**, *17*, 324–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Heimdahl, A.; Von Konow, L.; Satoh, T.; Nord, C.E. Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings. *J. Clin. Microbiol.* **1985**, *22*, 299–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Bahl, R.; Sandhu, S.; Sahai, N.; Gupta, M.; Singh, K. Odontogenic infections: Microbiology and management. *Contemp. Clin. Dent.* **2014**, *5*, 307–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Kuriyama, T.; Williams, D.W.; Yanagisawa, M.; Iwahara, K.; Shimizu, C.; Nakagawa, K.; Yamamoto, E.; Karasawa, T. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol. Immunol.* **2007**, *22*, 285–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Liu, C.-Y.; Huang, Y.-T.; Liao, C.-H.; Yen, L.-C.; Lin, H.-Y.; Hsueh, P.-R. Increasing Trends in Antimicrobial Resistance among Clinically Important Anaerobes and *Bacteroides fragilis* Isolates Causing Nosocomial Infections: Emerging Resistance to Carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3161–3168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Sherrard, L.J.; Graham, K.A.; McGrath, S.J.; McIlreavey, L.; Hatch, J.; Muhlebach, M.S.; Wolfgang, M.C.; Gilpin, D.F.; Elborn, J.S.; Schneiders, T.; et al. Antibiotic resistance in *Prevotella species* isolated from patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 2369–2374. [[CrossRef](#)]



5. Relevanz des Mikrobioms odontogener Infektionen

Trotz der rasanten Entwicklung molekularer Methoden zur bakteriellen Identifikation findet die mikrobiologische Untersuchung von Abstrichen oder Nativgewebe in der klinischen Routine weiterhin vor allem mit kulturbasierten Untersuchungen statt. Die kultivierten Bakterien können dabei in weiteren Schritten mittels molekularer Methoden wie zum Beispiel einer erregerspezifischen PCR oder mittels der MALDI-TOF-Methode identifiziert oder unter speziellen Bedingungen weiter subkultiviert werden. Ziel der Untersuchungen ist die Identifikation der krankheitsauslösenden Erreger und die Erstellung eines Antibiogramms, um eine möglichst gezielte antibiotische Therapie durchführen zu können.

5.1. Kulturbasierte Analyse odontogener Abszesse

Die kulturbasierte Analyse aus Blut, Abstrichen und Nativgewebe zur Identifikation von krankheitserregenden Bakterien geht maßgeblich auf die Arbeiten von Robert Koch zurück, der in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts am Beispiel von *Bacillus anthracis* erstmals zeigen konnte, dass eine spezifische Infektionskrankheit durch ein bestimmtes Bakterium ausgelöst werden kann [105]. Koch isolierte Bakterien von einem an Milzbrand gestorbenen Tier und legte erstmals Kulturen in einer feuchten Kammer mit Nährstoffen an. Mittels eines Mikroskops konnte er die Vermehrung der stäbchenförmigen Bakterien beobachten und sogar fotografisch dokumentieren [105]. Entscheidend war jedoch die Erkenntnis, dass die Verabreichung der kultivierten Bakterien bei einem gesunden Tier wiederum Milzbrand auslösen konnte [105]. Dieser experimentelle Nachweis einer Infektionskrankheit, der später als Henle-und-Koch-Postulate bekannt wurde, wird als der Beginn der modernen medizinischen Mikrobiologie angesehen [105]. Die Postulate umfassen die Isolierung des Mikroorganismus aus dem infizierten Gewebe, das Wachstum und den Nachweis des Mikroorganismus mittels Kultur und Mikroskopie und das Auslösen der typischen Krankheitssymptome durch Inokulation der isolierten Bakterien in einen empfindlichen Wirt sowie die erneute Isolierung desselben Mikroorganismus aus dem

neu infizierten Wirt [105,106]. Mit dem neu gewonnenen Wissen konnten Ende des 19. Jahrhunderts viele bakteriell bedingte Erkrankungen wie die Tuberkulose, die Diphtherie und die Cholera erforscht werden [105]. Der britische Chirurg Alexander Ogston, konnte mit der von Koch entwickelten Technik zur Bakterien-Isolation und mit den von Cohn und Pasteur entwickelten Nährlösungen unter oxidischen und anoxischen Bedingungen erstmals *Streptokokken* und *Staphylokokken* aus Eiter kultivieren [105]. Er folgerte daraus, dass diese Bakterien ursächlich für lokale Entzündungen und Eiterungen seien [105]. Die ersten mikrobiologischen Studien über odontogene Abszesse wurden 1914 durch Gilmer und Moody sowie 1919 durch Head und Ross veröffentlicht, die auch bei odontogenen Infektionen *Streptokokken* oder *Staphylokokken* als ursächliche Keime beschrieben [16]. Weitere Studien beschrieben später eine Prädominanz von *Viridans-Streptokokken* und *Staphylococcus aureus*, wobei jedoch zunehmend auch die Möglichkeit von verfälschten Ergebnissen durch Probenkontamination oder Verwendung von inadäquaten Nährmedien diskutiert wurde [16]. Sims et al. wiesen bereits 1974 darauf hin, dass Studienergebnisse zur Bakteriologie odontogener Infektionen aufgrund verschiedenartiger Probeentnahmeverfahren, Kulturtechniken und Identifikationsverfahren mit Vorsicht betrachtet werden müssen [107]. So beschrieben Lewis et al. in Ihrer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 1990, dass in retrospektiven Erhebungen und prospektiven Untersuchungen mit begrenzten kultur-technischen Möglichkeiten wiederum ein Überwiegen von *Viridans-Streptokokken* und *Staphylokokken* zu beobachten war. In prospektiven Untersuchungen hingegen, in denen der Eiter kontaminationsarm durch Aspiration gewonnen wurde und zeitnah mit streng anaeroben Kulturtechniken bearbeitet wurde, zeigte sich hingegen ein starkes Überwiegen von obligat anaeroben Bakterien [16]. Die Autoren forderten daher, dass die mikrobiologische Diagnostik bei odontogenen Infektionen mit einem kontaminationsarmen Aspirat des Eiters, einem schnellen Transport ins Labor und adäquaten anaeroben Kulturtechniken durchgeführt werden soll [16]. Unter derartigen Bedingungen konnten neben den bereits bekannten *Streptokokken* und *Staphylokokken* zahlreiche obligat anaerobe

Bakterien der Gattungen *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Peptococcus* und *Peptostreptococcus* nachgewiesen werden [16]. Auch Bakterien der Gattung *Actinomyces* konnten gelegentlich in den Abszessen nachgewiesen werden [16]. Lewis et al. wiesen darauf hin, dass in Hinblick auf Studienvergleiche und Metaanalysen verschiedene Bakterienspezies zum Teil in neue Gattungen klassifiziert wurden [16]. So wurden zum Beispiel *Bacteroides gingivalis* und *Bacteroides endodontalis* später als *Porphyromonas gingivalis* und *Porphyromonas endodontalis* bezeichnet [16,82,108], während *Bacteroides intermedius* und *Bacteroides melaninogenicus* später in *Prevotella intermedia* und *Prevotella melaninogenica* umbenannt wurden [82,108,109]. Lewis et al. zeigten auch auf, dass die Gattungen *Fusobacterium*, *Prevotella* und *Porphyromonas* ein beträchtliches Potential zur Ausbildung von eitrigen Prozessen besitzen und dass odontogene Abszesse stets eine polymikrobielle Infektion mit einer gemischten Flora aus drei bis vier überwiegend obligat anaeroben Bakterien darstellen [16]. Eckert et al. unterstrichen diese Beobachtungen und führten ihre Studie zu odontogenen Abszessen aus dem Jahr 2000 sogar mit einer Analyse ausschließlich anaerober Bakterien durch [82]. Sie fanden mit kulturbasierten Analyseverfahren im Mittel 2,5 Anaerobier pro Abszess und wiesen ebenfalls auf die überragende Bedeutung der Gattungen *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* und *Peptostreptococcus* hin [82]. Gerade die Spezies *Peptostreptococcus micros*, die später auch als *Parvimonas micra* bezeichnet wurde, schien hierbei eine große Bedeutung haben, die von mehreren Autoren bestätigt wurde [82]. Stephanopoulos et al. fassten die Erkenntnisse über odontogene Infektionen mittels kulturbasierter Analysen zuletzt so zusammen: Odontogene Infektionen sind typischerweise polymikrobiell durch hauptsächlich obligat anaerobe grampositive Kokken (*Peptococcus*, *Peptostreptococcus* und *Parvimonas*) und gramnegative Stäbchen (*Fusobacterium*, *Prevotella* und *Porphyromonas*) sowie fakultativ anaerobe und mikroaerophile *Streptokokken* verursacht [110]. Obwohl keine einzige Gattung konsistent bei allen odontogenen Infektionen beteiligt ist oder für diese verantwortlich gemacht werden kann, ist das pathogene Potential dieser Organismen in zahlreichen Studien gut dokumentiert worden [110,111]. Dieses Potenzial lässt sich durch eine Reihe

von bei anaeroben Bakterien nachgewiesenen Virulenzfaktoren sowie durch synergistische Wechselbeziehungen mit anderen Mitgliedern der pathologischen Gemeinschaft erklären [110].

Heute stehen für die kulturbasierte Analyse von Bakterien aus dem Eiter odontogener Abszesse eine Vielzahl verschiedener Kulturtechniken zur Verfügung [18,89] und dennoch ist es bis dato nicht möglich, alle Bakterien des oralen Mikrobioms zu kultivieren [87]. Das Grundprinzip der Suche nach dem oder den schuldigen Erregern und einer möglichst effektiven antibiotischen Therapie hat sich jedoch kaum verändert. Mit der zunehmenden Verbreitung der molekularen Methoden der Bakterienidentifikation sind jedoch neue Erkenntnisse gewonnen worden [18,20], an denen der in den Kliniken etablierte Standard der kulturbasierten Diagnostik gemessen werden sollte.

5.2. Vergleich von kulturbasierter und molekularer Bakterienidentifikation

Die eigene Untersuchung „Microbiome of Odontogenic Abscesses“ hat mittels der 16S-rRNA-Analyse eindeutig bestätigt, dass odontogene Abszesse nicht nur polymikrobiell verursacht werden, sondern in der Regel sogar ein eigenes Mikrobiom mit einer Vielzahl von Bakterien zeigen, während sich das orale Mikrobiom dieser Patienten nicht wesentlich vom dem von gesunden Probanden in anderen Untersuchungen unterscheidet [112]. Das Mikrobiom des odontogenen Abszesses scheint demnach ein aus dem normalen oralen Mikrobiom fortgeleitetes oder selektiertes Mikrobiom mit einer höheren Pathogenität zu sein [112]. Nur in zwei von 50 Fällen wurde bei odontogenen Abszessen tatsächlich das Bild einer Monoinfektion beobachtet, so dass in diesen Fällen tatsächlich eine Art „schuldige Bakteriengattung“ für die Erkrankung identifiziert werden konnte [112]. Ein sogenannter steriler odontogener Abszess ganz ohne eine Identifikation von Bakterien, wie er beim Einsatz von kulturbasierten Analysemethoden beschrieben wurde [28], konnte hingegen nicht beobachtet werden. In Hinblick auf den in den Kliniken etablierten Standard der kulturellen Analyse stellt sich somit die Frage, wie

ein Vergleich zwischen einer kulturbasierten und einer rein molekularen Bakterienidentifikation aussehen könnte. Entspricht das von der molekularen Analyse erzeugte Bild dem der kulturellen Analyse oder zeigen sich in der Kultur Verdrängungseffekte im Sinne eines „*Survival of the fittest*“? Welche Bakterien können mit der 16S-rRNA-Gen-Analyse nachgewiesen werden, die der Kultur möglicherweise entgehen und welchen Einfluss haben möglicherweise die Bedingungen des Probentransportes und mögliche bakterielle Kontaminationen? Letztendlich stellt sich auch die Frage, ob bei odontogenen Infektionen die häufig zitierten Henle-Koch-Postulate angewendet werden können, nach denen ein krankheitserregender Organismus und die Krankheit selbst zeitlich synchron und in der richtigen Reihenfolge auftreten müssen und nach denen die Wirkung des Organismus auf die Erkrankung spezifisch bezüglich physiologischer, pathologischer, experimenteller und epidemiologischer Kriterien sein muss [66]. Genau auf diese Postulate hin hat die klinisch-mikrobiologische Diagnostik auch heute noch die Suche nach dem „schuldigen krankheitserregenden Organismus“ zum Ziel, um diesen nach der Identifikation oder mit der Erstellung eines AntibioGRAMMs gezielt behandeln zu können. Wie aber soll die Erkrankung eingeordnet werden, wenn es statt eines schuldigen Organismus in der Regel ein ganzes Mikrobiom möglicher Verursacher gibt und diese zudem zur normalen physiologischen Mundflora gehören? Für welches dieser Bakterien sollte dann ein AntibioGRAMM erstellt werden und welche Bedeutung hat dies dann für die klinische Praxis? Diese Fragen sollen im Rahmen der nachfolgenden Publikation adressiert und bestmöglich beantwortet werden.

5.3. Publikation 4: Relevance of the Microbiome of odontogenic Abscesses

Einleitung: Odontogene Abszesse werden in der Regel durch Bakterien des oralen Mikrobioms verursacht. Die hierbei zu diagnostischen Zwecken angefertigte Kultur dieser Bakterien ist jedoch aufwändig und fehleranfällig und scheitert manchmal gänzlich an der Empfindlichkeit der relevanten Bakterienspezies. Es stellt sich die Frage, ob eine zusätzliche Erregerdiagnostik mit molekularen Methoden einen zusätzlichen Nutzen für Diagnostik und Therapie bietet.

Methodik: Mittels einer experimentellen 16S-rRNA-Gen-Analyse, Next-Generation-Sequencing und Bioinformatik wurde das Abszess-Mikrobiom bei Patienten mit schweren odontogenen Infektionen bestimmt und mit dem Ergebnis der kulturbasierten Analyse der klinischen Routinediagnostik verglichen.

Ergebnis: Insgesamt konnte bei 48 Patienten mit einem ausgedehnten odontogenen Abszess das Mikrobiom des Eiters mit dem Ergebnis der kulturbasierten Analyse der klinischen Routinediagnostik verglichen werden. Ein kultureller Bakteriennachweis war bei 41 (85,42%) von 48 Patienten möglich, während die Bestimmung des Abszess-Mikrobioms in allen Fällen möglich war (100%). Die Mikrobiome zeigten in 46 Fällen (95,83%) polymikrobielle Infektionen, während das Bild einer Monoinfektion nur zweimal (4,17%) auftrat. Dabei wurde in den meisten Fällen ein überwiegend anaerobes Spektrum mit einer Fülle von Bakterien gefunden, während in der kulturbasierten Analyse hauptsächlich *Streptococcus*, *Staphylococcus* und *Prevotella spp.* nachgewiesen wurden. Mit der Bestimmung der Abszess-Mikrobiome konnte eine viel größere Anzahl an Bakterien und ein signifikant höherer Anteil an Anaerobiern nachgewiesen werden als bei der kulturbasierten Analyse der klinischen Routine.

Diskussion: Die 16S-rRNA-Gen-Analyse weist deutlich mehr Bakterien nach als herkömmliche kulturbasierte Methoden und liefert auch bei kulturnegativen Proben zuverlässig Ergebnisse. Molekulare Methoden sollten daher als Standard in der medizinischen mikrobiologischen Diagnostik eingesetzt werden, insbesondere bei polymikrobiellen Infektionen mit einer Dominanz anaerober Bakterien.

Article

Clinical Relevance of the Microbiome in Odontogenic Abscesses

Sebastian Böttger ^{1,*} , Silke Zechel-Gran ², Daniel Schmermund ¹, Philipp Streckbein ¹ , Jan-Falco Wilbrand ¹ , Michael Knitschke ¹ , Jörn Pons-Kühnemann ³, Torsten Hain ^{2,4}, Markus Weigel ² , Can Imirzalioglu ^{2,4}, Hans-Peter Howaldt ¹, Eugen Domann ^{4,5}  and Sameh Attia ¹ 

¹ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Justus-Liebig-University Giessen, University Hospital Giessen, Klinikstrasse 33, D-35392 Giessen, Germany; Dael.Schmermund@uniklinikum-giessen.de (D.S.); Philipp.Streckbein@uniklinikum-giessen.de (P.S.); Jan-Falco.Wilbrand@uniklinikum-giessen.de (J.-F.W.); Michael.Knitschke@uniklinikum-giessen.de (M.K.); HP.Howaldt@uniklinikum-giessen.de (H.-P.H.); sameh.attia@dentist.med.uni-giessen.de (S.A.)

² Institute of Medical Microbiology, Justus-Liebig-University Giessen, D-35392 Giessen, Germany; Silke.Zechel@mikrobio.med.uni-giessen.de (S.Z.-G.); Torsten.Hain@mikrobio.med.uni-giessen.de (T.H.); Markus.Weigel@mikrobio.med.uni-giessen.de (M.W.); Can.Imirzalioglu@mikrobio.med.uni-giessen.de (C.I.)

³ Institute of Medical Informatics, Justus-Liebig-University Giessen, D-35392 Giessen, Germany; Joern.Pons@informatik.med.uni-giessen.de

⁴ German Center for Infection Research (DZIF), Justus-Liebig-University Giessen, D-35392 Giessen, Germany; Eugen.Domann@mikrobio.med.uni-giessen.de

⁵ Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, Schubertstrasse 81, D-35392 Giessen, Germany

* Correspondence: Sebastian.Boettger@uniklinikum-giessen.de; Tel.: +49-641-985-46271



Citation: Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Schmermund, D.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F.; Knitschke, M.; Pons-Kühnemann, J.; Hain, T.; Weigel, M.; Imirzalioglu, C.; et al. Clinical Relevance of the Microbiome in Odontogenic Abscesses. *Biology* **2021**, *10*, 916. <https://doi.org/10.3390/biology10090916>

Academic Editors: Huizhong Chen and Maikel P. Peppelenbosch

Received: 26 July 2021

Accepted: 14 September 2021

Published: 15 September 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Odontogenic infections are very common. The course of disease ranges from mild to severe and sometimes even life-threatening infections. Optimal therapy is based on rapid abscess incision and, especially in severe cases, on adjuvant antibiotic therapy that ideally targets the culprit bacteria. In order to identify these bacteria, clinicians usually perform cultural analysis from smears of pus and aim for antibiotic susceptibility testing. In recent years, using new molecular methods, it has become possible to carry out a much more detailed analysis of the bacterial colonization of different parts of the human body by determining a microbiome. In our study, we have, for the first time, compared such a microbiome of odontogenic abscesses with cultural bacterial determination carried out in the clinical routine of a university hospital. The key finding of the study is not only that considerably more bacteria can be detected in the abscess in this way but also that easily cultivated bacteria dominate over the actual fastidious pathogenic bacteria. Thus, routine clinical culture probably only provides a distorted picture of reality and should be supplemented by molecular methods in the future.

Abstract: Odontogenic abscesses are usually caused by bacteria of the oral microbiome. However, the diagnostic culture of these bacteria is often prone to errors and sometimes fails completely due to the fastidiousness of the relevant bacterial species. The question arises whether additional pathogen diagnostics using molecular methods provide additional benefits for diagnostics and therapy. Experimental 16S rRNA gene analysis with next-generation sequencing (NGS) and bioinformatics was used to identify the microbiome of the pus in patients with severe odontogenic infections and was compared to the result of standard diagnostic culture. The pus microbiome was determined in 48 hospitalized patients with a severe odontogenic abscess in addition to standard cultural pathogen detection. Cultural detection was possible in 41 (85.42%) of 48 patients, while a pus-microbiome could be determined in all cases. The microbiomes showed polymicrobial infections in 46 (95.83%) cases, while the picture of a mono-infection occurred only twice (4.17%). In most cases, a predominantly anaerobic spectrum with an abundance of bacteria was found in the pus-microbiome, while culture detected mainly *Streptococcus*, *Staphylococcus*, and *Prevotella* spp. The determination of the microbiome of odontogenic abscesses clearly shows a higher number of bacteria and a significantly higher proportion of anaerobes than classical cultural methods. The 16S rRNA gene analysis detects considerably more bacteria than conventional cultural methods, even in culture-negative samples. Molecular

methods should be implemented as standards in medical microbiology diagnostics, particularly for the detection of polymicrobial infections with a predominance of anaerobic bacteria.

Keywords: oral microbiome; bacteriome; odontogenic abscess; 16S rRNA gene analysis; polymicrobial infection; anaerobic infection; bacterial culture; microbiome analysis

1. Introduction

Odontogenic infections are among the most common inflammatory diseases in the head and neck region [1,2]. Frequently, these infections lead to abscesses, which can usually be treated by incision and drainage and, if necessary, by concomitant antibiotic therapy [3]. The spectrum of these infections ranges from minor abscesses in the oral cavity, which can be easily treated in the dental practice, to extensive and sometimes life-threatening abscesses of the entire head and neck region, which require hospital treatment under general anesthesia and can even lead to death [4,5]. In addition to incision and drainage of the abscess, adjuvant antibiotic therapy is becoming increasingly important in the case of extensive and advanced disease [6].

Odontogenic infections are usually polymicrobial endogenous infections that are generally well amenable to empirical antibiotic therapy. However, as in other fields of medicine, resistance to antibiotics has been increasingly observed in the recent past, which can occasionally complicate such empirical antibiotic therapy [7,8]. Particularly in extensive infections, cultural pathogen diagnostics are performed to enable targeted antibiotic treatment according to an antibiotic susceptibility profile, especially if the initial therapeutic interventions are not optimally effective [7].

Numerous authors have shown that odontogenic infections are mainly caused by anaerobic bacteria [7,9,10]. However, these are very difficult to detect culturally [7]. Therefore, high demands must be placed on pre-analytic considerations such as sampling, the transport medium, and the entire time sequence until pathogen diagnostics in the laboratory. Otherwise, incomplete or even incorrect bacterial determination has to be expected. Thus, culture-negative and possibly sterile abscesses are frequently reported, in which no bacteria are culturally detectable despite an extensive clinical disease appearance [11].

Using modern molecular biological methods, it became possible to show that many pathogens are usually involved in odontogenic infections, even more than could previously be detected with a classical cultivation approach [12,13]. In particular, using such methods in combination with next-generation sequencing procedures has enabled increasingly comprehensive diagnostics, allowing the detection of microorganisms that have not yet been cultivated [14]. The determination of bacterial composition by sequencing amplified 16S rRNA genes is also called the determination of a microbiome [15], which corresponds to the determination of a pus-microbiome in the case of an odontogenic abscess. Since 16S rRNA gene analysis cannot detect any fungi or viruses, the term bacteriome would also be justified. However, molecular amplicon sequencing methods do not allow the prediction of antibiotic susceptibility, as is possible using classical cultural pathogen detection [16]. Concerning the clinical routine of pathogen diagnostics in odontogenic abscesses, the question arises about the diagnostic value of the determination of a pus-microbiome. This study aims to give answers to the following clinical questions:

1. Which bacteria can be detected that may not entirely or partially be detected by cultural methods alone?
2. Is it possible to improve the accuracy and completeness of the established cultural methods with such additional diagnostics?
3. Do biomolecular pathogen diagnostics offer advantages in comparison to classical culture?

2. Materials and Methods

All patients hospitalized and treated for odontogenic abscesses between October 2016 and March 2017 in the Department of Oral and Maxillofacial Surgery of the University Hospital Giessen were included in the study until a maximum possible number of 50 samples was reached. This number corresponded exactly to the capacity that could be made available in terms of finance and personnel for this exploratory study. The patients gave their written consent to participate in the study prior to surgery, and the project was authorized by the local Ethics Committee of the Medical Faculty of the Justus-Liebig-University Giessen (Vote 191/16). Part of the data has already been used for a comparison between oral and pus microbiomes in odontogenic abscesses [17].

Clinical therapy was utterly independent of the study. Swabs (wrapped fiber swabs with gel-based Amies medium) were taken during the abscess incision from drained pus and used for routine microbiological examination by culturing and antimicrobial susceptibility testing (aerobic and anaerobic culture). Additionally, pus was obtained from the incised abscess and frozen at -80° degrees Celsius for later molecular biological evaluation. The abscesses were drained continuously using easy-flow drains, and therapy was monitored clinically and by routine laboratory examination until hospital discharge.

Aerobic and anaerobic culture was performed using Columbia blood agar, chocolate blood agar, McConkey agar, Sabouard glucose agar, Schaedler/Schaedler KV agar (biplate), and Thioglycollate broth. The media were incubated at 37°C and read after 24 and 48 h except for Schaedler/Schaedler KV agar plates, which were incubated for 48 h before reading. An additional Schaedler/Schaedler KV agar plate remained in incubation for 5 days before reading. Bacteria were identified using a MALDI-TOF system (Vitek MS, Biomérieux, Nürtingen, Germany). Antimicrobial susceptibility testing was performed on an automated system (Vitek 2, Biomérieux, Nürtingen, Germany) or by disk diffusion or gradient strip testing according to EUCAST standards. Breakpoint interpretation was also carried out according to EUCAST standards.

Irrespective of the clinical therapy and culture results thereby obtained, the microbiome of the pus was determined from the frozen samples about three months later using 16S rRNA gene analysis [18–20]. 16S rRNA amplicon sequencing works like a bacterial fingerprint if the base sequence can be matched with a ribosomal database. It is particularly useful in identifying unusual bacteria that are difficult to identify by conventional methods, providing genus identification in $>90\%$ of cases [21]. Therefore, nucleic acid was first extracted from the initially frozen pus samples, as previously described [17]. Then, the V4 region of the 16S rRNA gene was amplified by polymerase chain reaction using primers in the conserved flanking areas with adapters [17]. The resulting amplicons of an approximate length of 350 to 370 bps were processed for next-generation sequencing using the Illumina MiSeq system, as described by the vendor (Illumina, San Diego, CA, USA).

For bioinformatic analysis, paired-end sequence reads were joined and primer sequences were removed, as previously described [22]. Sequence reads varied between 28,698 and 751,847 per sample. Reads with ambiguous base calls or with homopolymers longer than eight nucleotides were removed and duplicates were merged and aligned against the SILVA bases' bacterial reference alignment [23]. Applying Mothur implementation of the UCHIME algorithm, chimeric reads were removed, taxonomy was assigned, and non-bacterial reads were removed from the analysis. Operational taxonomic units (OTU) were generated, and taxonomy was reassigned using Mothur. In preparation for the analysis, an OTU table in biom format was created.

Statistical analysis was carried out with Microsoft Excel (Redmond, WA, USA) and the statistical software R-4.0.4 (R Core Team, 2021, Vienna, Austria). For calculation of frequencies, we considered a phylotype to be abundant if it contributed to at least 0.01% of the microbiome [17]. Lilliefors (Kolmogorov–Smirnov) test (R package: nortest) was applied to test normality distribution. Culture results were presented in a pie chart. To describe the composition of the microbiomes, a pie chart with the medians of the relative frequencies of the reads and a heatmap was created. The heatmap was also based

on the relative frequencies of the reads and performed with hierarchical clustering and dendrogram (complete linkage with Euclidean distance; sum of rows > 20%). To compare the culture results with the microbiomes, Fisher's exact test and a tabular comparison of each culture result and the corresponding microbiome were performed.

3. Results

In the observation period from October 2016 to March 2017, a total of 50 hospitalized patients with a severe odontogenic abscess were treated with incision and drainage at the University Hospital. Two patients had to be excluded because of missing swab samples, allowing the evaluation of 48 patients. In total, 16 patients (33.3%) were female, and 32 patients (66.7%) were male. The mean age was 47.79 years (standard deviation: 19.55 years). Lilliefors normality test showed that the distribution of the patient's age did not differ significantly from a normal distribution ($p = 0.3321$). The most observed abscesses were the perimandibular abscess with 15 occurrences (32%) and the submandibular abscess with 14 (29%) occurrences (Figure 1).

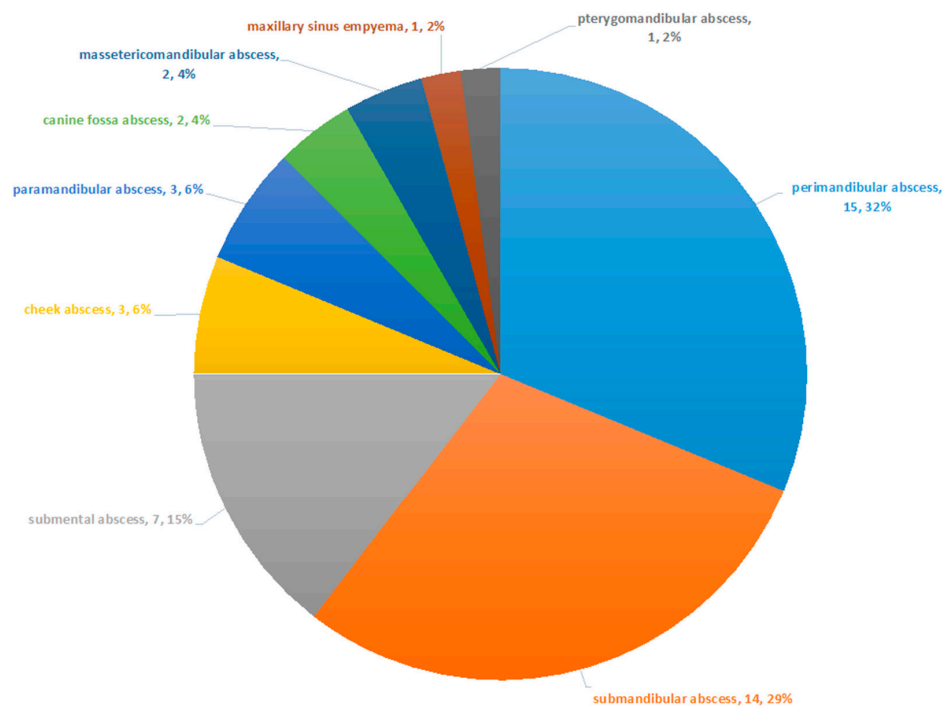


Figure 1. Frequency of observed abscesses. The most common abscesses were the perimandibular and the submandibular abscess.

The information of the microbiological findings was given either by the correct identification of a bacterial species or by information such as “culture-negative” or “pharyngeal flora” (which represents a mixture of commonly colonizing species of the oro-pharyngeal space). In this context, each statement made by the microbiological lab was evaluated as a specification. In most cases, a specification corresponded to a cultural reference. In 48 cases, this resulted in a total of 72 specifications (Figure 2). In 23 cases (47.92%), one specification was submitted; in 12 cases (25.0%), two specifications were given; and in 6 cases (12.5%), a maximum of three specifications was reported. In 7 of 48 cases (14.58%), no microorganisms could be cultured (culture-negative). Thus, cultural bacterial detection was successful in 41 of 48 patients (85.42%). Figure 2 shows the type of specifications and their overall frequency. For later comparison with the pus-microbiome (Figures 3 and 4),

the specifications were summarized at the genus level. In addition, Figure 5 shows the culture results down to the species level for all samples.

Streptococci were cultivated most frequently, with 33.3% of the specifications. Figure 5 shows that these were exclusively *alpha-hemolytic Streptococci*. *Prevotelles* and *Staphylococci* were found, each with 16.6% of the specifications (Figure 2). Figure 5 shows that all recovered *Staphylococci* were coagulase-negative.

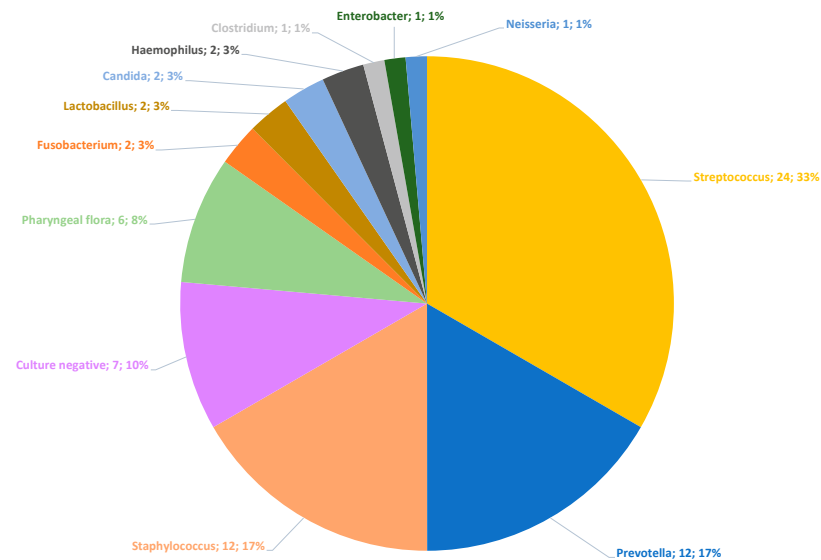


Figure 2. Culture results: The figure shows the absolute and relative frequency of the specifications given by the microbiological lab.

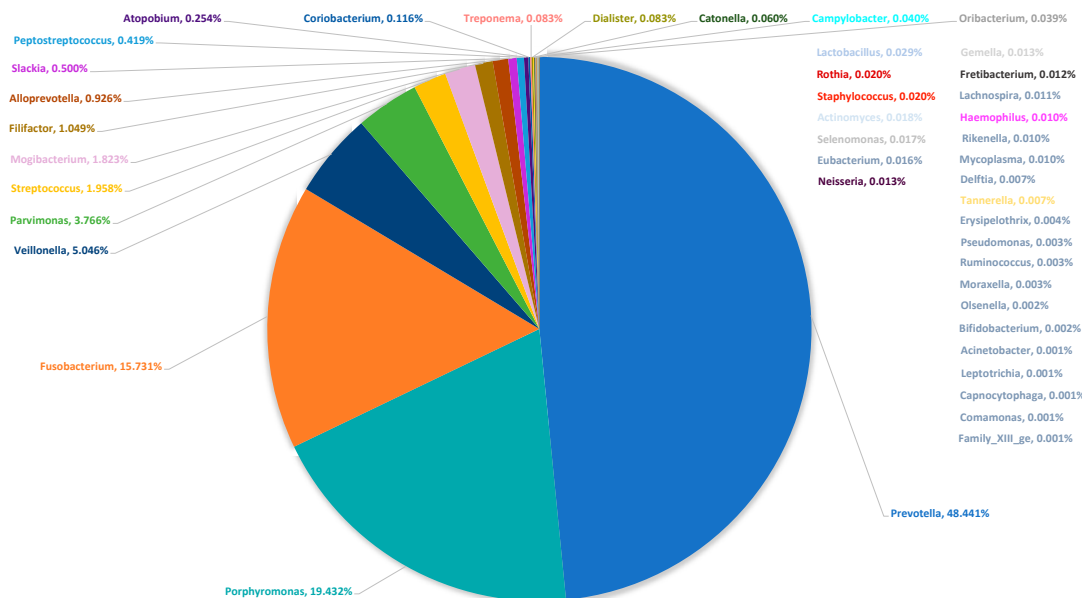


Figure 3. Median microbiome of the pus samples ($n = 48$). The pie chart shows the median of the relative frequencies. The median was used because a normal distribution of the relative frequencies of the genera was not given.

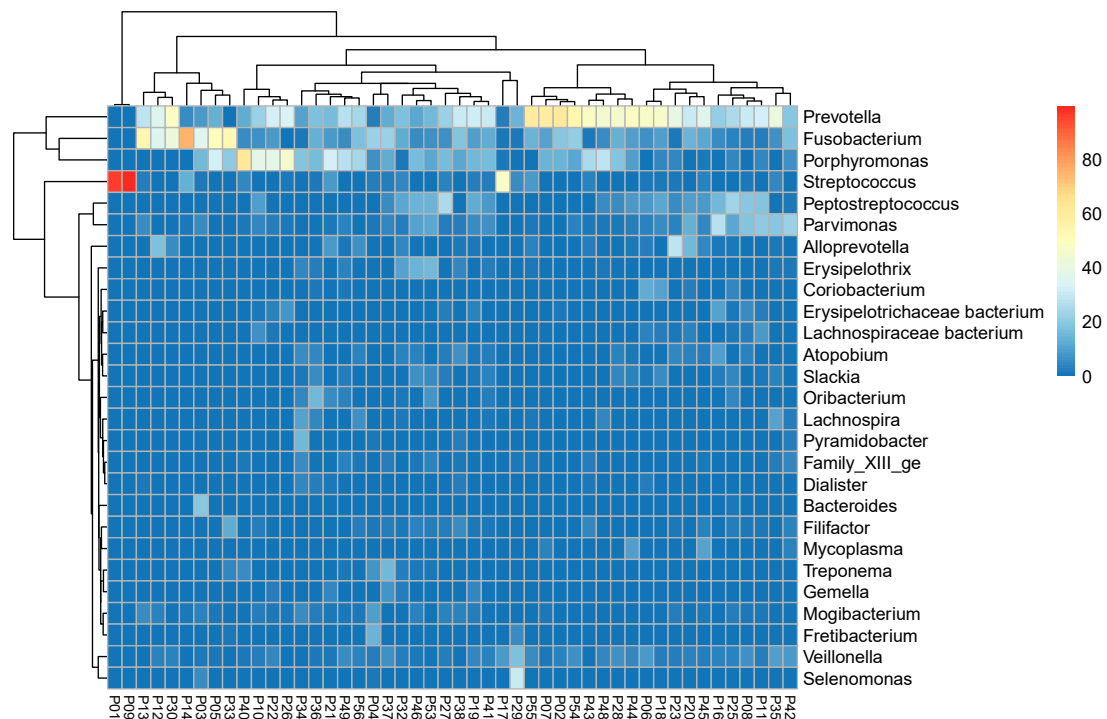


Figure 4. Heatmap of all ($n = 48$) pus samples. Colors show the relative frequency of the reads of the most frequent bacterial genera (sum of rows $>20\%$). Hierarchical clustering with a dendrogram (complete linkage with Euclidean distance).

16S rRNA gene analysis revealed the microbiome of the relieved pus. As described by other authors [12], an abundance of bacterial genera was found in contrast to culture. We considered a phylotype to be abundant if it contributed to at least 0.01% of the microbiome. Using this threshold, a mean of $31.42 (\pm 12.30)$ was found in the pus, and the Lilliefors normality test indicated a normal distribution of the number of bacterial genera in the pus-microbiome ($p = 0.3138$). Figure 3 shows the median microbiome of the pus, in which the median of the relative abundances was summed up and extrapolated to 100%.

In this way, a direct comparison between the results of the culture and the 16S rRNA gene analysis was possible. Figures 2 and 3 show that the detection of easily cultivable *Streptococci* and *Staphylococci* obviously dominates culture results in contrast to the molecular microbiome determination. Here, a strong predominance of typically anaerobic genera such as *Prevotella* (blue color), *Fusobacterium* (orange color), and *Porphyromonas* (turquoise color) is shown. It is also evident that a maximum of three different species was detected in culture, while, on average, more than 30 bacterial genera could be demonstrated in the microbiome. Thus, the routine clinical culture obviously only represented a small part of the potentially present pus-microbiome, in which easily cultivable bacteria such as *Streptococcus* and *Staphylococcus* were overrepresented compared to fastidious anaerobic bacteria. Only in 2 of the 48 cases (4.17%) was a clear predominance of *Streptococcus* observed, while the picture of a polymicrobial infection was seen in all other samples (95.83%).

Figure 4 shows a heatmap regarding the composition of the pus-microbiomes of the most common bacterial genera. Even here, it is evident that *Streptococcus* only occurs twice as an actual “culprit pathogen” (samples P1 and P9) and that *Staphylococcus* is almost totally absent.

Among the specifications given by the microbiological lab, a total of 56 bacterial species could be identified. The genera of these bacteria were tested for differences in their frequency of occurrence using Fisher’s exact test. For this purpose, an occurrence in the microbiome was evaluated as long as the relative frequency of the reads was at least 1%.

Table 1 shows that culture and microbiome differ significantly according to their results ($p < 0.001$).

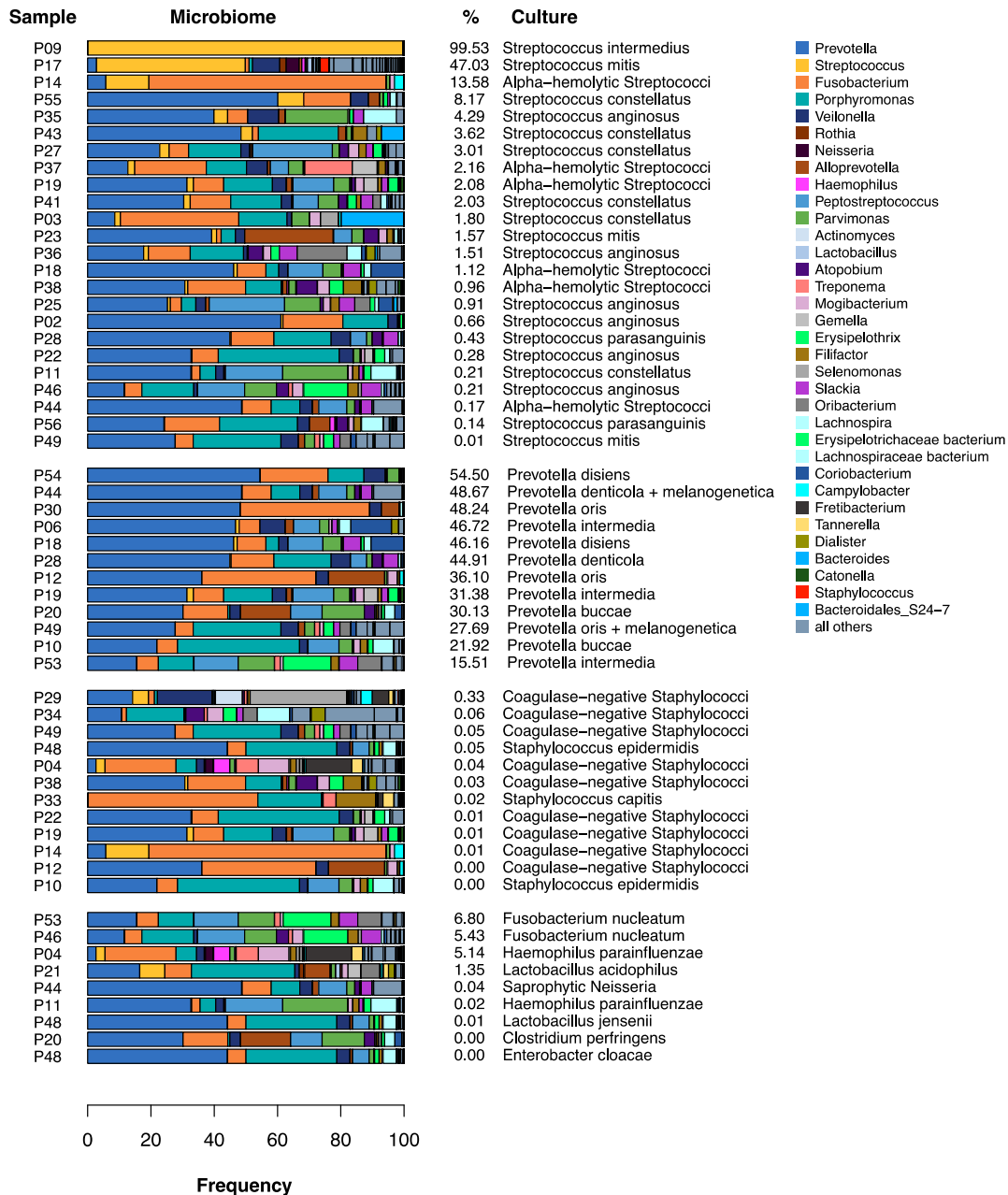


Figure 5. Culture results compared to the corresponding microbiomes. Every culturally detected bacterial species was compared directly with the corresponding microbiome. The percentage number indicates how many reads fall on the genus of the cultured species. The frequently cultured genera *Streptococcus* (yellow) and *Staphylococcus* (red) are only seen very sporadically in the microbiomes.

In Figure 5, the culture results are directly compared to the corresponding microbiomes. The colors show that only in cases of cultural detection of *Prevotella*, there was also a significant proportion of *Prevotella* (blue) in the corresponding microbiome. If *Strep-*

Staphylococcus was detected, the microbiome only showed a more substantial proportion of *Streptococcus* (yellow) in some cases, and *Staphylococcus* (red) was almost not present at all in the microbiomes, although *Staphylococcus* was frequently cultured.

Table 1. 56 specifications of the culture analysis corresponded to a unique bacterial identification. These were compared with the corresponding identifications of the microbiome, requiring a relative abundance of at least 1%. Fisher's exact test shows a significant difference between culture and microbiome ($p < 0.001$).

| | Culture | Culture (%) | Microbiome | Microbiome (%) |
|-----------------------|---------|-------------|------------|----------------|
| <i>Prevotella</i> | 12 | 21.43 | 45 | 39.82 |
| <i>Fusobacterium</i> | 2 | 3.57 | 25 | 22.12 |
| <i>Streptococcus</i> | 24 | 42.86 | 35 | 30.97 |
| <i>Neisseria</i> | 1 | 1.79 | 1 | 0.89 |
| <i>Haemophilus</i> | 2 | 3.57 | 3 | 2.66 |
| <i>Staphylococcus</i> | 12 | 21.43 | 2 | 1.77 |
| <i>Clostridium</i> | 1 | 1.79 | 0 | 0.00 |
| <i>Lactobacillus</i> | 2 | 3.57 | 2 | 1.77 |
| | 56 | 100 | 113 | 100 |

For some of the cultivated bacteria, the Institute of Medical Microbiology also provided antimicrobial susceptibility testing (EUCAST standards) in addition to the culture results. The resistances of the three most frequently cultivated bacterial genera (*Streptococcus*, *Staphylococcus*, and *Prevotella*) are given in Table 2. For the genus *Prevotella*, which showed by far the highest frequency in the median microbiome, resistance to penicillin was shown in almost 79% of cases and to clindamycin in nearly 43% of cases. Genus *Streptococcus* still showed good susceptibility overall. In particular, resistance to the frequently used combination of ampicillin and sulbactam could only be determined in one case.

Table 2. Resistance to the bacterial genera cultivated in this study. For the three most frequent genera, the absolute and relative amounts of resistance were determined. The genus *Prevotella*, which showed by far the highest frequency in the microbiome, showed resistance to penicillin in 79% of cases and clindamycin in 43% of cases.

| | <i>Streptococcus</i> | | <i>Staphylococcus</i> | | <i>Prevotella</i> | | |
|-------------------------|----------------------|------|-----------------------|-------|-------------------|---------|---------|
| Penicillin | 2 | / 17 | 11.76% | | 11 | / 14 | 78.57% |
| Ampicillin/Sulbactam | 1 | / 14 | 7.14% | | 0 | / 14 | 0.00% |
| Clindamycin | 3 | / 16 | 18.75% | 1 / 3 | 33.33% | 6 / 14 | 42.86% |
| Metronidazol | 2 | / 2 | 100.00% | | 0 | / 14 | 0.00% |
| Piperacillin/Tazobactam | 1 | / 11 | 9.09% | | 0 | / 14 | 0.00% |
| Meropenem | 0 | / 8 | 0.00% | | 0 | / 13 | 0.00% |
| Vancomycin | 0 | / 16 | 0.00% | 0 / 3 | 0.00% | 12 / 12 | 100.00% |
| Levofloxacin | 0 | / 11 | 0.00% | 0 / 1 | 0.00% | 0 / 1 | 0.00% |
| Cotrimoxacol | | | | 0 / 3 | 0.00% | | |

4. Discussion

Odontogenic abscesses are the most common inflammatory diseases in the oral and maxillofacial region [2,24]. Such infections are endogenous and can be prevented by adequate pre-emptive care [25,26]. The severity ranges from mild abscesses, which can be treated on an outpatient basis in the dental office, to severe life-threatening conditions requiring hospital or even intensive care [4,5]. If antibiotic therapy is needed, it is usually performed immediately after abscess incision as empirical therapy, often using ampicillin with sulbactam or clindamycin in the case of penicillin allergy [27].

4.1. Does Culture Provide the Identification of the “Culprit Pathogen”?

It is often recommended to take a swab as part of an abscess incision and to aim for cultural bacterial detection with the preparation of an antibiogram. With the knowledge of a “culprit pathogen”, specific antibiotic therapy can then be administered instead of a calculated one, tailored precisely to this pathogen [7]. However, what value does an antibiogram have if instead of one culprit bacterium, there are many potentially culprit bacteria or even a culprit community, and what if many of these bacteria cannot be detected at all or only with particularly great effort?

Many authors have shown that odontogenic abscesses are usually polymicrobial [7,9,10]. While about three to eight bacterial species can be identified by cultural methods, up to 114 bacteria can be identified in odontogenic abscesses by more recent molecular biological techniques [12]. Thus, also in this work, a mean of 31.42 bacterial genera was determined using 16S rRNA gene analysis. As shown in Figure 4, only 2 out of 48 cases (p1 and p9) showed the picture of a real mono-infection with the genus *Streptococcus* as a “culprit pathogen”, while the remaining 46 cases showed a mixed picture, matching the polymicrobial etiology. As reported by other authors [12,13], obligate anaerobic bacteria such as *Prevotella*, *Porphyromonas*, and *Fusobacterium* predominate with regard to the relative frequencies of the reads (Figures 3 and 4).

Other genera that could have played a role in the pathological community due to their relative abundance were *Veillonella*, *Parvimonas*, *Streptococcus*, *Mogibacterium*, and *Filifactor* (Figure 4). Thus, in the vast majority of cases of odontogenic abscess, an appropriate antibiogram would always need to cover a wide range of bacteria or at least identify those pathogens that have clinically relevant resistance to antibiotics. Theoretically, this could also be a key species of the pus-microbiome with a very low abundance, which secondarily enables the proliferation of more abundant species. For instance, it has been reported for *V. parvula* that the species produces menaquinones that can meet the specific nutrient requirements of *Porphyromonas* spp. and *Prevotella* spp. for this substance [28]. Viral co-infections could theoretically also have an influence on the composition of the culprit bacterial community and, thereby, on its susceptibility to antibiotics.

In this study, a scientific analysis of the microbiome of odontogenic abscesses was compared with the results of routine clinical examinations. A possible weakness of the study was that although the samples were taken at the same time from the same patient, culture and 16S rRNA gene analyses were performed from different transport containers. It was also not reasonably possible to determine the influence of a possible antibiotic pretreatment on the culture and microbiome results. Many patients have probably already received orally administered antibiotics prior to hospitalization. However, patients often provide insufficient information in this regard, and, at the same time, a vast choice of possible substances has to be considered, which makes a serious evaluation of this information difficult. On the other hand, it is widely accepted that significant infectious swellings cannot be influenced by applying oral antibiotic medication alone [4,27]. Therefore, it is most likely not of significant importance what kind of antimicrobial oral medication was administered prior to hospital admission and surgical treatment. With regard to aspects of quality assurance, this disadvantage may also be an advantage, as the cultural analysis corresponded to the real conditions of clinical routine. Usually, the surgeon does not have better microbiological diagnostics at his disposal to make therapeutic decisions, and, against this background, additional molecular biological investigations seem to be of particular relevance.

The most frequently identified bacterial genera in the cultural analysis were *Streptococcus*, *Staphylococcus*, and *Prevotella* (Figure 2). Table 1 and Figure 5 show that only the genera *Streptococcus* and *Prevotella* were present to any significant extent in both the microbiome and the culture. The genera *Porphyromonas*, *Parvimonas*, *Veillonella*, *Mogibacterium*, and *Filifactor*, on the other hand, were culturally not detected at all, and *Fusobacterium* was only identified in two cases, even though *Porphyromonas* and *Fusobacterium*, in particular, accounted for a considerable proportion of the median microbiome, with about one-third

(Figure 3), and *Fusobacterium* and *Parvimonas* have been associated with acute apical odontogenic infections by other authors [13]. Thus, cultural analysis performed in routine clinical practice was obviously unable to correctly determine the “culprit pathogen” or “culprit community” of the abscesses.

In contrast, *Staphylococci* were almost not detected in the microbiome, but they were identified in culture as frequently as the genus *Prevotella*. This suggests a contamination of the swabs by the physiological skin flora during swab collection or the proliferation of *Staphylococci* during the time period from sample acquisition until the start of laboratory examination. Even if cultural analysis, if carried out with a more appropriate effort than in clinical routine, can certainly provide better results than this study, it must still be suspected that culture methods alone offer a distorted picture of the relevant microbiota composition. If *Streptococcus* and *Staphylococcus* prevail in culture according to the principle of “survival of the fittest”, the detection of the obligate anaerobic genera *Prevotella*, *Fusobacterium*, and *Porphyromonas* would hardly succeed to a sufficiently reliable degree. Figure 5 shows that if *Streptococci* were culturally detected, the relative abundance of the genus *Streptococcus* in the microbiome was only four times above 5%. This suggests that the readily culturable *Streptococci* have indeed prevailed in culture against the difficult-to-cultivate fastidious anaerobes. Another explanation could be that certain bacteria have special requirements for their culture media so that some of them still could not be cultivated at all [14].

To obtain a valid culture result and an antibiogram with regard to the anaerobes, we suggest the following recommendations:

1. Careful disinfection of the skin (or mucosa) at the incision site: in this way, contamination by *Staphylococci* from the skin can be prevented [29].
2. Swabbing the depth of the abscess cavity instead of the flowing pus on the skin surface of the incision site: Pus itself represents a hostile medium for bacteria. Swabbing the living tissue at the depth of the abscess may increase the likelihood of obtaining living anaerobes for culturing while decreasing the likelihood of contamination by skin flora.
3. Selection of a suitable transport medium: Liquid-based media with a flocked swab can be a better alternative compared to gel-based media with traditional fiber swabs [30]. These media probably allow sufficient survival of the anaerobes and, at the same time, still enable further processing by molecular biological methods [31,32].
4. Cooling to 2–4 °C and fastest possible transport to the microbiological laboratory: The later the transport, the less likely the swabbed bacteria can be recovered in the laboratory [31,32].

4.2. Is Swab Collection Necessary at All?

Even if swab collection and culture are performed under optimal conditions in the case of odontogenic infections, in the end, not all bacteria of the pathological community will always be detectable [14]. The question remains open as to whether a swab should be taken at all. In the authors’ opinion, this is not necessary for simple clearly odontogenic abscesses and otherwise healthy patients, provided that rapid healing can be expected even without the use of antibiotics. Accordingly, the German guideline on odontogenic abscesses recommends that intraoperative pathogen diagnosis can be aimed for, but it is not mandatory [27]. Swabbing becomes important whenever a possible complicated course of the disease is expected or an odontogenic cause of the infection cannot be proven. Particularly in patients with immune insufficiency and systemic (poor general condition, chemotherapy, bisphosphonate therapy) or local damage (radiation therapy), it has to be taken into account that the supposedly odontogenic infection can also be caused by other causes and possibly be based on an entirely different pathogen spectrum [33]. In this case, taking a swab can help distinguish classic mono-infections, which are often caused by easily culturable bacteria, from the typical anaerobic pathogen spectrum of odontogenic infections. In particular, infections with pyogenic *Streptococci* (e.g., peritonsillar abscess), abscesses caused by *Staphylococci* (especially *S. aureus*), and infections with nonfermenting Gram-

negative bacilli (NFGNB) [20] should be mentioned here, in which a possible adjuvant antibiotic therapy may need to be designed differently for the typical odontogenic abscess.

4.3. Does Antibiotic Resistance Have Clinical Relevance in Odontogenic Infections?

The microbiomes indicate that effective antibiotic therapy needs to target typical anaerobic bacterial genera such as *Prevotella*, *Fusobacterium*, and *Porphyromonas* on one hand and the genus *Streptococcus* on the other. The genus *Staphylococcus* has been frequently detected culturally, but due to its low relative abundance in the microbiome, it probably corresponds more to contamination from the skin and, therefore, does not primarily need to be considered when selecting an antibiotic therapy. Table 2 shows that few resistances have been documented against the commonly used and recommended combination of ampicillin and sulbactam [27]. In only one case, the genus *Streptococcus* showed resistance in this study, while the genus *Prevotella* was sensitive without exceptions. This was different when looking at clindamycin, which is frequently used, especially by dentists [16], particularly if penicillin allergy or penicillin intolerance is a concern [16,27]. Here, the genus *Streptococcus* showed resistance in 18.75% of cases and the genus *Prevotella* in 42.86%. Thus, in our study, almost half of the cultured *Prevotella* spp. were resistant to clindamycin. This seems to confirm the trend since anaerobes increasingly develop resistance to antibiotics [16,34]. A recent Belgian study reported that *Prevotella* spp. were resistant to clindamycin in only 9% of cases in the 1990s, whereas in 2012, resistance to clindamycin was observed in 31% of cases [35]. Increasing resistance to clindamycin has also been reported for the genera *Porphyromonas* and *Fusobacterium* [7,8,34]. Brook et al. reported that up to 10% of studied cases showed resistance to clindamycin [16]. In contrast, such extensive resistance has not been described against the combination of an aminopenicillin with a beta-lactamase inhibitor. Hence, it is considered the first-choice therapy for odontogenic infections [27,36].

In the light of resistance developments, a combination of metronidazole and a fluoroquinolone such as moxifloxacin may be a better choice than clindamycin alone in the case of penicillin allergy [37]. In our work, *Prevotella* spp. were shown to be 100% sensitive to metronidazole, while *Streptococci* were sensitive to levofloxacin without exception. In the 2014 study by Wybo et al., 96% of *Prevotella* spp. and 100% of *Fusobacteria* showed sensitivity to metronidazole, and the sensitivity to all anaerobic isolates overall was 92% [35]. However, metronidazole alone shows no effect against microaerophilic *Streptococci*. Thus, a combination with a fluoroquinolone is recommended for polymicrobial infections [16,27]. The fluoroquinolone moxifloxacin shows good efficacy against anaerobes in contrast to older fluoroquinolones, but it is also notable for good efficacy against *Streptococci* in particular [16,38]. Significantly fewer resistance problems should arise overall against the combination of these two antibiotics compared to the use of clindamycin alone as a mono-substance, similar to the combination of an aminopenicillin with a beta-lactamase inhibitor [36].

No resistance problems would be expected using the reserve antibiotics piperacillin/tazobactam and meropenem, as seen in Table 2. With these substances, a resistance of only one *Streptococcus* sp. to piperacillin/tazobactam could be demonstrated. As presented in many studies, both substances show excellent efficacy in polymicrobial combined aerobic-anaerobic infections, with extremely favorable sensitivities. However, in the authors' opinion, these substances should be reserved for particularly extensive cases, namely, patients with pronounced immunosuppression and severe infections that are not clearly of odontogenic origin, because, in such cases, bacteria other than the typical odontogenic pathogenic milieu have to be expected [33].

Finally, we point out that the most essential treatment for odontogenic abscesses is incision and drainage, according to Galen's almost 2000-year-old statement "*ubi pus, ibi evacua*" [11]. Most odontogenic abscesses can be treated in this way without any antibiotics at all, and, even in more extensive abscesses requiring hospitalization, adjuvant antibiotic therapy can often be avoided [6,39].

5. Conclusions

Concerning microbiological pathogen diagnostics, it can be stated that bacterial culture faces limitations based on pre-analytics, methodology, and pathogen specifications and, in many cases, probably represents only a tiny part of reality. A holistic approach, combining biomolecular pathogen diagnostics by 16S rRNA gene analysis, next-generation sequencing, and bioinformatics with cultural pathogen diagnostics should be implemented in clinical routine as soon as possible. Only in this way will it be possible to be informed of the content and origin of abscesses in the oral and maxillofacial region wholly and reliably. Molecular methods are predestined to become the gold standard in medical microbiology diagnostics, particularly for polymicrobial infections with a predominance of anaerobic bacteria.

Author Contributions: Conceptualization, S.B., J.-F.W., H.-P.H., E.D. and S.A.; Data curation, S.B. and M.K.; Formal analysis, J.P.-K.; Investigation, S.B., S.Z.-G., D.S., T.H., M.W. and E.D.; Methodology, P.S. and E.D.; Project administration, S.A.; Supervision, H.-P.H. and S.A.; Validation, S.B. and H.-P.H.; Writing—original draft, S.B.; Writing—review and editing, S.Z.-G., D.S., P.S., J.-F.W., M.K., J.P.-K., T.H., M.W., H.-P.H., C.I., E.D. and S.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The study was funded collaboratively by the Institute of Medical Microbiology and the Clinic for Oral and Maxillofacial Surgery of the Justus-Liebig-University Giessen. This study was supported by German Research Foundation DFG (KFO 309 Z01, SFB1021 Z02, and SFB-TR84 B/08) funding to T.H.

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the Justus-Liebig-University Giessen (Vote 191/16).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors thank Trinad Chakraborty (Institute of Medical Microbiology) for making sequencing machines available.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interests.

References

1. Flynn, T.R. The swollen face. Severe odontogenic infections. *Emerg. Med. Clin. N. Am.* **2000**, *18*, 481–519. [[CrossRef](#)]
2. Connors, W.J.; Rabie, H.H.; Figueiredo, R.L.; Holton, D.L.; Parkins, M.D. Acute dental infections managed in an outpatient parenteral antibiotic program setting: Prospective analysis and public health implications. *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Flynn, T.R.; Shanti, R.M.; Hayes, C. Severe Odontogenic Infections, Part 2: Prospective Outcomes Study. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2006**, *64*, 1104–1113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Al-Nawas, B.; Maeurer, M. Severe versus Local Odontogenic Bacterial Infections: Comparison of Microbial Isolates. *Eur. Surg. Res.* **2007**, *40*, 220–224. [[CrossRef](#)]
5. Bertossi, D.; Barone, A.; Iurlaro, A.; Marconcini, S.; De Santis, D.; Finotti, M.; Procacci, P. Odontogenic Orofacial Infections. *J. Craniofac. Surg.* **2017**, *28*, 197–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Böttger, S.; Lautenbacher, K.; Domann, E.; Howaldt, H.-P.; Attia, S.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F. Indication for an additional postoperative antibiotic treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2020**, *48*, 229–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Eckert, A.W.; Höhne, C.; Schubert, J. Erregerspektrum und Resistenzsituation bei rein anaeroben odontogenen Infektionen. *Mund Kiefer Gesichtschirurgie* **2000**, *4*, 153–158. [[CrossRef](#)]
8. Rasmussen, B.A.; Bush, K.; Tally, F.B. Antimicrobial Resistance in Anaerobes. *Clin. Infect. Dis.* **1997**, *24*, S110–S120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Heimdahl, A.; von Konow, L.; Satoh, T.; Nord, C.E. Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings. *J. Clin. Microbiol.* **1985**, *22*, 299–302. [[CrossRef](#)]
10. Celakovsky, P.; Kalfert, D.; Smatanova, K.; Tuček, L.; Čermáková, E.; Mejzlik, J.; Kotulek, M.; Vrbacky, A.; Matoušek, P.; Stanikova, L.; et al. Bacteriology of deep neck infections: Analysis of 634 patients. *Aust. Dent. J.* **2015**, *60*, 212–215. [[CrossRef](#)]
11. Wiese, K.G.; Merten, H.A.; Wiltfang, J.; Luhr, H.G. Klinische Untersuchungen zur Pathophysiologie dentogen bedingter Abszesse. *Mund Kiefer Gesichtschirurgie* **1999**, *3*, 242–246. [[CrossRef](#)]

12. Siqueira, J.F.; Rôças, I.N. Microbiology and Treatment of Acute Apical Abscesses. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 255–273. [[CrossRef](#)]
13. Siqueira, J.F.; Rôças, I.N. The Oral Microbiota in Health and Disease: An Overview of Molecular Findings. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1537*, 127–138. [[CrossRef](#)]
14. Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N. As-yet-uncultivated oral bacteria: Breadth and association with oral and extra-oral diseases. *J. Oral Microbiol.* **2013**, *5*. [[CrossRef](#)]
15. Chen, T.; Yu, W.-H.; Izard, J.; Baranova, O.V.; Lakshmanan, A.; Dewhirst, F.E. The Human Oral Microbiome Database: A web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database* **2010**, *2010*, baq013. [[CrossRef](#)]
16. Brook, I.; Wexler, H.M.; Goldstein, E.J.C. Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum and Susceptibility Testing. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 526–546. [[CrossRef](#)]
17. Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Schmermund, D.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F.; Knitschke, M.; Pons-Kühnemann, J.; Hain, T.; Weigel, M.; Howaldt, H.-P.; et al. Microbiome of Odontogenic Abscesses. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1307. [[CrossRef](#)]
18. Keller, P.M.; Hombach, M.; Bloemberg, G.V. 16S-rRNA-Gen-basierte Identifikation bakterieller Infektionen. *Biospektrum Mag. Biowiss.* **2010**, *16*, 755–758.
19. Voelkerding, K.V.; Dames, S.A.; Durtschi, J.D. Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics. *Clin. Chem.* **2009**, *55*, 641–658. [[CrossRef](#)]
20. Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Streckbein, P.; Knitschke, M.; Hain, T.; Weigel, M.; Wilbrand, J.-F.; Domann, E.; Howaldt, H.-P.; Attia, S. A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics. *Pathogens* **2020**, *9*, 798. [[CrossRef](#)]
21. Woo, P.C.Y.; Lau, S.K.P.; Teng, J.L.L.; Tse, H.; Yuen, K.-Y. Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin. Microbiol. Infect.* **2008**, *14*, 908–934. [[CrossRef](#)]
22. Regier, Y.; Komma, K.; Weigel, M.; Kraiczy, P.; Laisi, A.; Pulliainen, A.T.; Hain, T.; Kempf, V.A.J. Combination of microbiome analysis and serodiagnostics to assess the risk of pathogen transmission by ticks to humans and animals in central Germany. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 11. [[CrossRef](#)]
23. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *41*, D590–D596. [[CrossRef](#)]
24. Bahl, R.; Sandhu, S.; Sahai, N.; Gupta, M.; Singh, K. Odontogenic infections: Microbiology and management. *Contemp. Clin. Dent.* **2014**, *5*, 307–311. [[CrossRef](#)]
25. Preda, C.; Butera, A.; Pelle, S.; Pautasso, E.; Chiesa, A.; Esposito, F.; Oldoini, G.; Scribante, A.; Genovesi, A.; Cosola, S. The Efficacy of Powered Oscillating Heads vs. Powered Sonic Action Heads Toothbrushes to Maintain Periodontal and Peri-Implant Health: A Narrative Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 1468. [[CrossRef](#)]
26. Butera, A.; Gallo, S.; Maiorani, C.; Molino, D.; Chiesa, A.; Preda, C.; Esposito, F.; Scribante, A. Probiotic Alternative to Chlorhexidine in Periodontal Therapy: Evaluation of Clinical and Microbiological Parameters. *Microorganisms* **2020**, *9*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Al-Nawas, B.; Karbach, J. S3-Leitlinie (Langversion): Odontogene Infektionen. In *Leitlinien Zahnmedizin*; Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften: Berlin, Germany, 2016; Available online: www.awmf.org (accessed on 10 March 2020).
28. Rôças, I.; Siqueira, J. Culture-Independent Detection of *Eikenella corrodens* and *Veillonella parvula* in Primary Endodontic Infections. *J. Endod.* **2006**, *32*, 509–512. [[CrossRef](#)]
29. Dargère, S.; Cormier, H.; Verdon, R. Contaminants in blood cultures: Importance, implications, interpretation and prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, *24*, 964–969. [[CrossRef](#)]
30. Miller, J.M.; Binnicker, M.J.; Campbell, S.; Carroll, K.C.; Chapin, K.C.; Gilligan, P.H.; Gonzalez, M.D.; Jerris, R.C.; Kehl, S.C.; Patel, R.; et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *67*, e1–e94. [[CrossRef](#)]
31. Demuyser, T.; De Geyter, D.; Van Dorpe, D.; Vandoorslaer, K.; Wybo, I. Extensive evaluation of fastidious anaerobic bacteria recovery from the Copan eSwab[®] transport system. *J. Microbiol. Methods* **2018**, *144*, 73–78. [[CrossRef](#)]
32. Van Horn, K.G.; Audette, C.D.; Sebeck, D.; Tucker, K.A. Comparison of the Copan eSwab System with Two Amies Agar Swab Transport Systems for Maintenance of Microorganism Viability. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 1655–1658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Eckert, A.W.; Maurer, P.; Wilhelms, D.; Schubert, J. Weichteilinfektionen in der Mund-, Kiefer- und Plastischen Gesichtschirurgie. *Mund Kiefer Gesichtschirurgie* **2005**, *9*, 389–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Schuetz, A.N. Antimicrobial Resistance and Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Clin. Infect. Dis.* **2014**, *59*, 698–705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wybo, I.; Bossche, D.V.D.; Soetens, O.; Vekens, E.; Vandoorslaer, K.; Claeys, G.; Glupczynski, Y.; Ieven, M.; Melin, P.; Nonhoff, C.; et al. Fourth Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *69*, 155–161. [[CrossRef](#)]
36. Brescó-Salinas, M.; Costa-Riu, N.; Berini-Aytés, L.; Gay-Escoda, C. Antibiotic susceptibility of the bacteria causing odontogenic infections. *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.* **2006**, *11*, E70–E75.

37. Heim, N.; Faron, A.; Wiedemeyer, V.; Reich, R.; Martini, M. Microbiology and antibiotic sensitivity of head and neck space infections of odontogenic origin. Differences in inpatient and outpatient management. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2017**, *45*, 1731–1735. [[CrossRef](#)]
38. Sobottka, I.; Cachovan, G.; Stürenburg, E.; Ahlers, M.O.; Laufs, R.; Platzer, U.; Mack, D. In Vitro Activity of Moxifloxacin against Bacteria Isolated from Odontogenic Abscesses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 4019–4021. [[CrossRef](#)]
39. Warnke, P.H.; Becker, S.T.; Springer, I.N.; Haerle, E.; Ullmann, U.; Russo, P.A.; Wiltfang, J.; Fickenscher, H.; Schubert, S. Penicillin compared with other advanced broad spectrum antibiotics regarding antibacterial activity against oral pathogens isolated from odontogenic abscesses. *J. Cranio-Maxillofac. Surg.* **2008**, *36*, 462–467. [[CrossRef](#)]



6. Schwere und komplizierte odontogenen Infektionen

Die meisten odontogenen Infektionen können, wie in den vorausgegangenen Kapiteln beschrieben, ambulant durch adäquate chirurgische oder zahnärztliche Maßnahmen und die Beseitigung des odontogenen Focus erfolgreich behandelt werden [12]. Ein kleinerer Teil der Erkrankungen benötigt jedoch aufgrund der Erkrankungsschwere eine stationäre Therapie, die in der Regel drei bis sieben Tage andauert und danach ambulant weitergeführt werden kann [113]. Klassische Kriterien für die stationäre Aufnahme sind Fieber, Schwellungen im Halsbereich, Dyspnoe, Dysphagie, Trismus, Leukozytose und massive CRP-Erhöhung [114]. Sehr selten kann es aber trotz einer rechtzeitig eingeleiteten stationären Therapie mit Inzision und Drainage in Kombination mit einer adäquaten antibiotischen Therapie zu Komplikationen kommen, die manchmal sogar ein lebensbedrohliches Ausmaß annehmen können [4,12]. Vereinfacht ausgedrückt bedeutet dies, dass man durchaus an einem odontogenen Focus versterben kann, auch wenn die Wahrscheinlichkeit dafür bei adäquater Therapie relativ gering ist [4,115-117]. Wie der Begriff der odontogenen Infektion selbst, so ist auch die Komplikation bei odontogenen Infektionen nicht genau definiert. Es wurden Gliederungen in lokale und systemische sowie in akute und (sekundär) chronische Komplikationen vorgeschlagen [3,12], wobei die Grenzen jedoch fließend sind. Akute Komplikationen entstehen in der Regel dann, wenn eine odontogene Infektion eine starke Ausbreitungstendenz zeigt und das entzündliche Geschehen nicht lokal auf die Kiefer begrenzt bleibt [12,25]. Häufig geht dies mit einer erheblichen Verschlimmerung der Erkrankung einher, die dann häufig einer Intensivtherapie bedarf und wie oben beschrieben sogar zum Tod des Patienten führen kann [12,117]. Chronische Komplikationen, wie zum Beispiel die Ausbildung einer Kieferosteomyelitis zeigen eher das Bild einer atypischen odontogenen Infektion, da die sekundär chronifizierte Erkrankung wie zuvor beschrieben in der Regel nicht problemlos durch adäquate chirurgische oder zahnärztliche Maßnahmen zur Ausheilung gebracht werden kann. Obwohl bei der Ausbildung von Komplikationen sicherlich auch patientenbedingte Faktoren wie zum Beispiel das individuelle

Potential zur Ausbildung von Schwellungen, der individuelle Immunstatus [3,12,118] und die Lokalisation des odontogenen Focus [118-121] eine Rolle spielen, ist bei schweren Verläufen vor allem die Frage nach einer besonderen Virulenz der ursächlichen Organismen von großem Interesse. Gibt es innerhalb der ursächlichen „pathologischen odontogenen Community“ besondere Keime oder Antibiotikaresistenzen, die für den außergewöhnlichen schweren Verlauf der Erkrankung verantwortlich gemacht werden können? Zahlreiche Autoren haben sich diesbezüglich mit dem Unterschied zwischen den leichteren ambulanten Verläufen und den schwereren stationären Verläufen beschäftigt [23,24,122]. Al-Nawas et al. beschrieben eine Tendenz zu einer höheren Rate an Antibiotikaresistenzen bei schwereren Verläufen, sie konnten diesbezüglich jedoch keinen statistisch signifikanten Unterschied feststellen [23]. Heim et al. konnten diese Tendenz in einer weiteren Untersuchung etwa zehn Jahre später bestätigen [122]. Einen eindeutigen Unterschied bezüglich der bakteriellen Isolate konnten die Untersuchungen aber nicht aufzeigen. Wie in anderen kulturbasierten Untersuchungen konnten in diesen Studien hauptsächlich die Gattungen *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus* und *Prevotella* identifiziert werden [23,122]. *Porphyromonas*, *Fusobacterium* und *Parvimonas* wurden hingegen vermutlich wegen der Schwierigkeiten bei der kulturellen Anzucht in nicht nennenswertem Ausmaß isoliert. Virulenzfaktoren wurden zwar für einzelne Bakterien, die an den odontogenen Infektionen beteiligt sind, beschrieben [123-126]. Ein direkter Zusammenhang zwischen der Ausbildung einer Komplikation bei odontogenen Abszessen und einem besonderen Virulenzfaktor wurde aber nicht nachgewiesen. Zur Erklärung einer verstärkten Ausbreitungstendenz wurden von vielen Autoren daher eher patientenbedingte Faktoren oder das Ausbleiben einer rechtzeitigen adäquaten Therapie herangezogen [12,24,25,118]. Als Risikofaktoren für die Ausbreitung einer odontogenen Infektion werden hauptsächlich ein Diabetes mellitus [3,12,115,117,118,127,128], chronischer Alkohol- und Drogenabusus [4,12,121,129] und Immunsuppression bzw. Immuninsuffizienz beschrieben [4,118,121,129,130]. Ferner werden auch eine chronische Leberinsuffizienz [4], eine chronische Niereninsuffizienz

[4], eine Herzinsuffizienz [4], konsumierende Erkrankungen und Mangelernährung [4], eine Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich [4,12], Asthma bronchiale [12], eine Anämie [4], Schilddrüsenfunktionsstörungen [4], psychiatrische Erkrankungen [121] und allergische Reaktionen [4,121] als Risikofaktoren angegeben. Insbesondere aber ein Diabetes mellitus scheint mit einem deutlich erhöhten Risiko für einen schweren Verlauf assoziiert zu sein [117,118]. So scheint sich eine unkontrollierte Hyperglykämie zum einen negativ auf die Funktion von neutrophilen Granulozyten und das Komplementsystem auszuwirken [130] und zum anderen die Virulenz verschiedener Pathogene noch zu erhöhen [131]. So wird vor allem bei Patienten mit einem Diabetes mellitus durch eine verminderte Immunreaktion eine schnellere und stärkere Ausbreitung der Infektion beobachtet [118,130]. In einer Untersuchung von Wong et al. traten bei 2790 stationär behandelten Patienten mit odontogenen Infektionen insgesamt 18 Todesfälle auf [117]. Zwei Drittel dieser verstorbenen Patienten litten unter Diabetes mellitus [117]. Zheng et al. untersuchten in ihrer Arbeit direkt den Einfluss von Diabetes mellitus auf schwere Infektionen im Kopf-Hals-Bereich und stellten fest, dass bei diabetischen Patienten im Vergleich zu nicht diabetischen Patienten signifikant mehr Logen betroffen waren [128]. Außerdem kam es signifikant häufiger zu Komplikationen und die Behandlungsdauer im Krankenhaus war signifikant verlängert [128]. Die Autoren forderten daher für diabetische Patienten mit schweren odontogenen Infektionen sogar eigene Behandlungsprotokolle zu erstellen [128]. Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch die Arbeitsgruppe von Huang et al. [132]. Auch diese Autoren beschrieben eine signifikante Zunahme von Komplikationen und eine signifikante Verlängerung der Behandlungsdauer bei diabetischen Patienten und empfahlen daher, bei diesen Patienten besonders aufmerksam zu agieren [132]. Eine besondere Achtsamkeit wird auch im Falle einer Immunsuppression oder einer Immuninsuffizienz empfohlen [121]. Hierzu wird beschrieben, dass das wahre Ausmaß der Infektion bei solchen Patienten oft lange maskiert wird und die Erkrankung somit fälschlicherweise als viel weniger schwerwiegend eingeschätzt wird, als sie in Wirklichkeit ist [121,133]. So konnten Pham Dang et al. in ihrer Arbeit

zeigen, dass bei ausgedehnten odontogenen Infektionen normalerweise ein CRP-Wert von über 200 mg/L mit einem erhöhten Risiko für einen prolongierten Krankheitsverlauf mit Intensivtherapie und multiplen chirurgischen Interventionen einhergeht [121]. Bei immunsupprimierten Patienten hingegen zeigte sich ein solch erhöhtes Risiko bei CRP-Werten unter 50 mg/L [121]. Im Weiteren stellt eine Immunsuppression einen wesentlichen Risikofaktor bezüglich der Ausbildung einer atypischen odontogenen Infektion dar [133]. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Patienten aufgrund einer andauernden Therapie mit Steroiden zusätzlich Bisphosphonate oder Denusomab zur Behandlung einer begleitenden Osteoporose erhalten. Wesentlich für die Ausbildung von Komplikationen ist jedoch auch die Lokalisation des odontogenen Focus. Obwohl schwerwiegende Komplikationen prinzipiell von jedem odontogenen Focus aus entstehen können, konnten zahlreiche Autoren zeigen, dass die größte Gefahr für eine Ausbreitung einer odontogenen Infektion und damit für die Entstehung von Komplikationen von unteren Molaren ausgeht [120,134-136]. Alotaibi et al. sahen daher schon einen vom Unterkiefer ausgehenden odontogenen Abszess als mögliches Kriterium für eine stationäre Therapie an [114]. Flynn schreibt in einer Übersichtsarbeit zu schweren odontogenen Infektionen aus dem Jahr 2000, dass die Letalität bei diffuser Schwellung im Mundboden- und Halsbereich (Angina ludovici) 1940 noch etwa 50% betrug und erst mit der Einführung des Penicillins deutlich auf unter 10% gesenkt werden konnte [137]. Mit den Verbesserungen in der Diagnostik, dem Atemwegsmanagement, der chirurgischen und intensivmedizinischen Therapie sind eine ernsthafte Morbidität und Mortalität durch odontogene Infektionen letztlich so selten geworden, dass der Tod durch eine odontogene Infektion für medizinische Laien praktisch unvorstellbar ist [137]. Dennoch werden vereinzelt immer wieder Todesfälle durch odontogene Infektionen beschrieben [117], so dass die potentiell letalen Komplikationen im Folgenden eingehender betrachtet werden sollen.

6.1. Obstruktion der oberen Luftwege

Die Obstruktion der oberen Luftwege bei odontogenen Infektionen stellt eine erstzunehmende, seltene und potentiell lebensbedrohliche Komplikation dar [4]. Sie tritt vor allem auf, wenn sich die entzündlichen Schwellungszustände medial des Unterkieferknochens und im Halsbereich befinden und damit das Bild einer Angina ludovici (Ludwig's Angina) auslösen [135]. Flynn et al. haben hierzu einen Severity-Score vorgeschlagen, der die verschiedenen Logen des Halses in Hinblick auf das Risiko für den Luftweg und vitale Strukturen bewertet (Tabelle 3). Die Autoren konnten zeigen, dass die Höhe des Scores signifikant mit der Behandlungsdauer im Krankenhaus und damit auch mit der Erkrankungsschwere korrelierte, auch wenn eine direkte Korrelation mit einer Obstruktion des Luftweges nicht nachgewiesen wurde [135].

| Severity-Score | Anatomischer Raum |
|---|--|
| Severity-Score = 1 (niedriges Risiko für den Luftweg und vitale Strukturen) | Vestibulär Subperiostal Korpus mandibulae Infraorbital Buccal |
| Severity-Score = 2 (moderates Risiko für den Luftweg und vitale Strukturen) | Submandibulär Submental Sublingual Pterygomandibulär Submassetär Superficial temporal Tief temporal (oder infratemporal) |
| Severity-Score = 3 (hohes Risiko für den Luftweg und vitale Strukturen) | Lateral pharyngeal Retropharyngeal Prätracheal Danger Space (Space 4) Mediastinum Intrakranielle Infektion |

Tabelle 3: Severity-Score bei schweren Odontogenen Infektionen nach Flynn et al. [135].

Neben der Lokalisation und der Anzahl der betroffenen Logen spielen im Weiteren aber auch anatomische Gegebenheiten sowie die individuelle Veranlagung,

Schwellungen und Weichgewebsödeme auszubilden eine Rolle [4,138]. So wird vor allem eine Adipositas und das Vorhandensein eines obstruktiven Schlafapnoe-Syndroms als Risiko für einen erschwerten Atemweg angesehen [138]. Adipöse Patienten haben eine signifikant höhere Inzidenz einer schwierigen Maskenbeatmung und ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Aspiration und eine Atemwegsobstruktion [138]. Ferner kommt es bei ihnen häufiger zu einem schnellen Abfall der Sauerstoffsättigung nach der Einleitung der Narkose und gehäuft zu einer schwierigen Intubation [138]. Die rechtzeitige Einleitung einer adäquaten chirurgischen Therapie mit einer Eröffnung und Entlastung von Abszessen in Bereichen mit erhöhtem Risiko in Narkose (Tabelle 3) wird daher als wesentlich zur Verhinderung einer Obstruktion der Atemwege angesehen [135]. Die dazu notwendige endotracheale Intubation derartiger Patienten ist jedoch aufgrund der veränderten Anatomie, der Unbeweglichkeit der angeschwollenen Gewebe und des erschwerten Zuganges zum Mundraum durch die regelhaft zu beobachtende Kieferklemme deutlich erschwert [4]. Eine Vielzahl von frustranen Intubationsversuchen kann dabei schnell zu einem weiteren Anschwellen des Gewebes und zur Ausbildung von Larynxödemem führen, was wiederum zu einer dramatischen Verschlechterung der Situation beitragen kann [138]. Zudem kann es durch Intubationsversuche zu einer Abszessperforation kommen, die wiederum eine Aspiration von Eiter zur Folge haben kann [4]. Von blinden nasalen Intubationsversuchen wird daher eingehend abgeraten [4]. Als Goldstandard der Atemwegssicherung wird bei ausgedehnten Schwellungen im Halsbereich die Tracheotomie angesehen, die beim wachen Patienten sicher und kontrolliert in Lokalanästhesie durchgeführt werden kann [4]. Die Tracheotomie kann jedoch in den meisten Fällen durch eine nasale fiberoptische Wachintubation vermieden werden [4,139], deren Erfolgswahrscheinlichkeit immerhin mit etwa 95% Prozent angegeben wird [139]. Cavallone et al. haben in ihrer Übersichtsarbeit zu schwierigen Extubationen darauf hingewiesen, dass Obstruktionen des Atemweges auch postoperativ noch auftreten können [138]. So können Pharynx und Larynx auch postoperativ durch Hämatome, Ödeme und den Verschluss von Drainagen

schwellungsbedingt noch weiter eingeengt werden und somit eine Reintubation oder eine sekundäre Tracheotomie notwendig werden [138,139]. Zusammenfassend sollte die Kombination aus Adipositas, einer starken individuellen Schwellungsdynamik und einem hohen Severity-Score bei gleichzeitig mehreren betroffenen Logen zu einer erhöhten Wachsamkeit bezüglich des Atemwegs des Patienten führen. Im Zweifelsfall sollte ein Patient besser einige Tage intubiert bleiben oder primär tracheotomiert werden, als postoperativ die plötzliche Notwendigkeit einer Notfalltracheotomie zu provozieren.

6.2. Kieferhöhlenempyem, Orbitaphlegmone und Orbitaabszess

Ein Kieferhöhlenempyem entwickelt sich typischerweise aus einem odontogenen Focus im Bereich des Oberkiefers, wenn der physiologische Abtransport von entzündlichen Sekreten und Eiter über die natürliche Öffnung der Kieferhöhle zum mittleren Nasengang nicht ausreichend suffizient ist [140]. Aus einer Sinusitis maxillaris wird in diesem Fall ein Kieferhöhlenempyem als Pendant zu einem Abszess an anderer Lokalisation. Typische Symptome sind Druck- und Perkussionsempfindlichkeit im Bereich der Oberkieferzähne, Schwellung und Druckschmerz im Wangenbereich und eine Verschlimmerung der Symptome beim Bücken, Husten oder Heben [141]. Lechien et al. konnten mit ihrer Übersichtsarbeit zeigen, dass die Entzündungen des Sinus maxillaris in den meisten Fällen vom ersten oder vom zweiten Molaren ausgingen [142]. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit einer Sinusitis maxillaris nach vorausgegangener Extraktion eines odontogenen Focus sogar noch größer als durch das Vorhandensein des Focus allein [143]. Crovetto-Martínez et al. konnten zeigen, dass bei einer odontogenen Sinusitis maxillaris häufig auch die Ethmoidalzellen mit beteiligt sind und somit grundsätzlich die Gefahr einer Ausbreitung auch nach kranial in Richtung Schädelbasis und Orbita besteht [144]. Eine zusätzliche Beteiligung der Ethmoidalzellen geht typischerweise mit der Ausbildung von starken Kopfschmerzen einher [145]. Wenn die Entzündung auf die Orbita übergeht, kann es zur Ausbildung einer Orbitaphlegmone oder seltener zur

Ausbildung eines Orbitaabszesses kommen [141]. Als mögliche Infektionswege hierzu werden die Fissura orbitalis inferior, die Ethmoidalzellen und die Vena angularis angesehen [141], wobei die Infektion der Orbita über die Ethmoidalzellen als mit Abstand wichtigster Infektionsweg angesehen wird [145]. Typische klinische Symptome der Orbitabeteiligung sind eine Chemosis, ein periorbitales Ödem des Augenlides mit Rötung und Schwellung, Hyperthermie, Ptosis, Fehlfunktion der extraokulären Muskeln und eine Visusminderung [4]. Bali et al. haben darauf hingewiesen, dass eine frühzeitige Diagnostik und ein frühzeitiger Therapiebeginn wichtig sind um eine Ausbreitung nach intrakraniell zu vermeiden [4]. Eine CT- oder eine MRT-Untersuchung sind bei entsprechender Symptomatik stets indiziert, um den Zustand der Nasennebenhöhlen, der Orbita und des intrakraniellen Raumes hinreichend beurteilen zu können [4]. Als intrakranielle Komplikationen wurden die Meningitis, die Enzephalitis, die Sinus-Cavernosus-Thrombose und der Hirnabszess beschrieben [4]. Die Behandlung besteht wie beim Logenabszess in einer chirurgischen Inzision und einer Drainage beziehungsweise in einer Fensterung der Nasennebenhöhlen. Im Falle des Sinus maxillaris erfolgt diese entweder über die Alveole eines extrahierten Zahnes oder von endonasal aus über ein zusätzlich angelegtes Fenster zum unteren oder mittleren Nasengang [141]. Ein Orbitaabszess kann über periorbitale Inzisionen von außen oder durch eine endoskopische Operation von den Nasennebenhöhlen aus entlastet werden. Falls die Entlastung über eine oro-antrale Fistel erfolgt, so muss diese in aller Regel sekundär plastisch verschlossen werden.

6.3. Sinus cavernosus Thrombose und Hirnabszess

Sowohl die Thrombose des Sinus cavernosus als auch der Hirnabszess äußern sich in der Regel durch eine Vielzahl möglicher neurologischer Symptome [4]. Während der Hirnabszess eher isoliert mit einer Latenz auftritt und somit meist primär neurochirurgisch behandelt wird, stellt die Sinus-Cavernosus-Thrombose eher eine septische Komplikation einer ausgedehnten odontogenen Infektion dar [4]. Hierzu

wird beschrieben, dass Infektionen aus dem periorbitalen Bereich leicht über die Venae angulares und die Venae ophthalmicae oder über den Plexus pterygoideus und die Venae emissariae in den Sinus cavernosus weitergeleitet werden [4]. Mit der Thrombose, die im CT mit Kontrastmittel multiple irreguläre Füllungsdefekte des Sinus cavernosus erkennen lässt, entstehen auch die neurologischen Symptome. Hierzu gehören verschiedene neurologische Defizite wie etwa Paresen der äußeren Augenmuskeln, Sehstörungen und Visusminderungen, Hemiparesen und fokale Krampfanfälle [4]. Als Spätfolgen werden Hypophysenfunktionsstörungen wie zum Beispiel das Syndrom der inadäquaten Sekretion des antidiuretischen Hormons beschrieben [4]. Trotz Behandlung kommt es nur bei weniger als 40% der Erkrankten zu einer vollständigen Genesung [4]. Unbehandelt kommt es meist nach schon einigen Tagen durch die Ausbildung von Hirnabszessen, einer Meningitis und einer Sepsis zum Tod [4]. Ein isolierter odontogener Hirnabszess tritt hingegen oft mit einigen Tagen oder Wochen Latenz zu einer zahnärztlichen Maßnahme oder einer odontogenen Infektion auf [4]. Anfänglich sind die Symptome meist mild und reichen über Kopfschmerzen und Abgeschlagenheit bis hin zur Apathie [4]. Fokal neurologische Defizite treten dann im Verlauf in Abhängigkeit von der Lokalisation des Abszesses auf [4]. In der CT-Diagnostik des Schädels werden die Zeichen eines Hirnabszesses typischerweise zwei bis drei Wochen nach der Infektion sichtbar, während das Vollbild eines abgekapselten Abszesses nach etwa 6 Wochen zu sehen ist. Die Therapie besteht sowohl bei der Sinus-Cavernosus-Thrombose als auch beim Hirnabszess in einer Breitspektrum-Antibiotikatherapie und der Drainage von Abszessen [4].

6.4. Sepsis bei odontogenen Infektionen

Die Entwicklung einer Sepsis im Rahmen einer schweren odontogenen Infektion hängt wesentlich von der Ausbreitung der Infektion ab [4,24]. Insbesondere wenn mehrere Logen betroffen sind oder sich die Infektion auf andere Gebiete des Körpers wie zum Beispiel das Neurokranium, das Mediastinum oder auf die oberflächlichen

Hals- und Thoraxfaszien ausbreitet, besteht die Gefahr, dass sich eine Sepsis entwickelt [24]. Hierbei kommt es zu einer progredienten Verschlechterung des Allgemeinzustandes und schließlich zu einer Hypotension mit einem nachfolgenden Ausfall verschiedener Organsysteme [146]. Die Sepsis stellte in einer Untersuchung von Wong et al. an 2790 Patienten mit odontogenen Infektionen, von denen 18 Patienten starben, mit 55% die häufigste Todesursache dar. Die Mortalität des septischen Schocks wird trotz der Möglichkeiten der modernen Intensivmedizin immer noch mit 35% bis 40% angegeben [146]. Zur Definition des potentiell lebensbedrohlichen Zustandes einer Sepsis wurden mit der Zeit verschiedene Kriterien publiziert [146]. Nach der Übersichtsarbeit von Bali zu Komplikationen bei odontogenen Infektionen müssen zur Definition eines Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS) mindestens zwei der folgenden Konditionen erfüllt sein [4]:

1. Temperatur $< 36^{\circ}\text{C}$ oder $> 38^{\circ}\text{C}$,
2. Herzfrequenz $> 90/\text{min}$,
3. Atemfrequenz $> 20/\text{min}$ oder $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$,
4. Leukozytenzahl im Blut $> 12.000/\text{l}$ oder $< 4.000/\text{l}$ oder mehr als 10% unreife Leukozyten.

Diese Definition zeigt bezüglich einer Sepsis eine gute Sensitivität [146]. Da Fieber, Tachykardie, Tachypnoe, Leukozytose und Hypotension aber auch bei anderen Krankheitszuständen auftreten, zeigten die Kriterien eine unzureichende Spezifität [146]. Für Intensivstations-Patienten wurde 2016 daher eine Verschlechterung des Sequential Organ Failure Assessment Scores (SOFA) um zwei oder mehr Punkte bei gleichzeitigem Vorliegen einer relevanten Infektion als neue Definition der Sepsis vorgeschlagen [146]. Da die Ermittlung des Scores aber aufwendig ist und damit außerhalb von Intensivstationen nicht unbedingt praktikabel ist, wurde zuletzt der Quick Sequential Organ Failure Assessment Score (QSOFA) vorgestellt, der auch außerhalb einer Intensivstation beim Einschätzen des Patientenzustandes bezüglich einer Sepsis helfen soll [146]. Hierbei müssen mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt sein:

1. Glasgow Coma Score < 13,
2. Systolischer Blutdruck < 100 mmHg,
3. Atemfrequenz \geq 22/min.

Bei der klinischen Einschätzung eines Patienten mit einer schweren odontogenen Infektion können neben den schon älteren SIRS-Kriterien auch die neueren QSOFA-Kriterien helfen [146]. Kim et al. haben darauf hingewiesen, dass die Leukozytenanzahl und die Höhe des C-reaktiven Proteins im Blut allein nicht geeignet sind um einen septischen Zustand zu ermitteln [147]. Sie empfahlen daher, bei schweren odontogenen Infektionen zusätzlich den Procalcitoninwert zu bestimmen, um im Zweifelsfall eine septische Kondition erkennen zu können. Sie beschrieben ein Maximum für die Sensitivität und die Spezifität des Laborwertes bei einem Cutoff-Wert von 0,87 ng/ml [147]. Ein darüber hinaus erhöhter Procalcitoninwert kann die klinische Diagnose daher im Zweifelsfall untermauern oder bestätigen. Zahlreiche Autoren beschreiben, dass es von größter Wichtigkeit ist, einen septischen Zustand möglichst frühzeitig zu erkennen und eine umgehende Behandlung einzuleiten [24,146,148]. Hierzu gehört ganz wesentlich auch die chirurgische Therapie mit einer möglichst schnellen und effektiven Beseitigung der Infektionsquelle [24,146]. Die Inzision und die Drainage von Abszessen, die Beseitigung von nekrotischem Gewebe und die Sanierung des odontogenen Focus sollten hierbei nicht nur dringlich oder aufgeschoben dringlich, sondern unverzüglich als Notfall eingeleitet werden, um die Überlebenschancen des Patienten zu optimieren [24,149]. Ferner ist bei septischen Patienten stets eine adäquate antibiotische Therapie und eine angemessene Intensivtherapie zur Unterstützung des Kreislaufs und der gestörten Organsysteme notwendig [4]. Bali et al. empfahlen, bei Verdacht auf einen septischen Verlauf umgehend Blutkulturen anzulegen, wobei die Entnahme des Blutes möglichst noch vor der ersten antibiotischen Therapie erfolgen sollte [4]. Wie die rechtzeitige Einleitung einer chirurgischen Therapie, so wird auch eine effektive antibiotische Therapie als wesentlicher Prognosefaktor angesehen [146]. Dabei soll eine zunächst kalkulierte antibiotische Therapie im Weiteren durch eine möglichst gezielte antibiotische Behandlung ersetzt werden [12]. Weise et al. haben in

ihrer Untersuchung zu septischen Verläufen bei odontogenen Infektionen vermehrt bakterielle Resistenzen gegen Clindamycin entdeckt [24], die auch von der Arbeitsgruppe von Heim et al. beobachtet wurden [122]. Sie empfahlen daher, bei Verdacht auf einen septischen Verlauf bereits primär eine Breitspektrum-Antibiotikatherapie mit Piperacillin und Tazobactam durchzuführen. Alternativ wurden hierzu auch Carbapeneme wie etwa Meropenem empfohlen [150]. Tabelle 4 fasst die wesentlichen Therapiekomponenten beim Vorliegen einer odontogen bedingten Sepsis zusammen.

Therapie bei ausgedehnter odontogener Infektion mit Sepsis

Möglichst frühzeitige Diagnose und unverzüglicher Therapiebeginn (Notfall)

Chirurgische Beseitigung der Infektionsquelle

Antibiotische Therapie (Breitspektrum [24,150])

Hämodynamische Therapie (Vasopressoren und Flüssigkeitszufuhr)

Ersatz von ausgefallenen Organfunktionen (z.B. Dialyse, Beatmung, etc.)

Modulation der Entzündungsreaktion

Sedierung und Analgesie

Adäquate Ernährung

Tabelle 4: Therapiebausteine bei ausgedehnten odontogenen Infektionen mit Ausbildung einer Sepsis (n. Bali et al [4])

6.5. Nekrotisierende Entzündungen

Die meisten odontogenen Infektion zeigen eine starke Tendenz zur Abszedierung. In seltenen Fällen können odontogene Infektionen jedoch statt einer Abszedierung auch das Bild einer Phlegmone oder sogar das Bild einer sich diffus ausbreitenden, nekrotisierenden Entzündung hervorrufen. Unter den nekrotisierenden Entzündungen sind vor allem die Krankheitsbilder der nekrotisierenden Fasziiitis und der nekrotisierende Mediastinitis bekannt, wobei die nekrotisierende Mediastinitis meist als schwerwiegende Komplikation der nekrotisierenden Fasciitis beschrieben wird [115]. Beide Erkrankungen stellen eine extrem lebensbedrohliche Erkrankung dar,

die neben der Entwicklung einer Sepsis mit einem erheblichen Gewebsuntergang einhergehen und ein sofortiges therapeutisches Handeln erfordern [149]. Gerade bei diesen schweren Entzündungen stellt sich die Frage nach dem Vorhandensein eines besonderen ursächlichen Organismus oder nach dem Vorhandensein von besonderen Virulenzfaktoren. Wird der nekrotisierende Verlauf der odontogenen Infektion durch ein besonderes Bakterium (z.B. *Streptococcus pyogenes*) ausgelöst und handelt es sich dabei um eine übertragbare Erkrankung, für die die Henle-Koch-Postulate gelten oder wird die Erkrankung durch eine typische odontogene Bakterienflora ausgelöst, die durch wirtsbedingte Faktoren begünstigt wird? Die folgende Publikation versucht darauf eine Antwort zu geben.

6.6. Publikation 5: Odontogenic Cervicofacial Necrotizing Fasciitis: Microbiological Characterization and Management of Four Clinical Cases.

Einleitung: Die nekrotisierende Faszitis des Kopfes und Halses ist eine seltene, sehr schwere Erkrankung, die in den meisten Fällen von odontogenen Infektionen ausgeht und häufig mit dem Tod des Patienten endet. Ein rascher chirurgischer Eingriff mit großzügigem chirurgischen Wunddebridement in Kombination mit einer möglichst erregerspezifischen Antibiotikatherapie kann das Überleben des Patienten ermöglichen. Es stellt sich die Frage, welche Erreger für den nekrotisierenden Verlauf von odontogenen Entzündungen ursächlich sind.

Methoden: Mittels experimenteller 16S-rRNA-Gen-Analyse mit Next Generation Sequencing und Bioinformatik wurde das Mikrobiom von Patienten, die mit einer odontogenen nekrotisierenden Infektion behandelt wurden, identifiziert und mit dem Ergebnis der Routinekultur verglichen.

Ergebnisse: Drei von vier Patienten überlebten die schwere Infektion, ein Patient starb an septischem Multiorganversagen. Die Bestimmung des Mikrobioms ergab Befunde, die mit normalen odontogenen Abszessen vergleichbar waren. Ein spezifischer

Erreger, der für den nekrotisierenden Verlauf ursächlich sein könnte, konnte nicht identifiziert werden.

Schlussfolgerung: Eine frühzeitige Diagnose und rasches chirurgisches Eingreifen sowie eine möglichst erregerspezifische Antibiotikatherapie, die auch das anaerobe Spektrum der odontogenen Infektionen abdeckt, sind die Behandlungen der Wahl. Die 16S-rRNA-Genanalyse wies deutlich mehr Bakterien nach als herkömmliche kulturbasierte Techniken. Molekulare Methoden sollten daher Teil der Routinediagnostik in der medizinischen Mikrobiologie werden.

Article

Odontogenic Cervicofacial Necrotizing Fasciitis: Microbiological Characterization and Management of Four Clinical Cases

Sebastian Böttger ^{1,*}, Silke Zechel-Gran ², Daniel Schmermund ¹, Philipp Streckbein ¹, Jan-Falco Wilbrand ¹, Michael Knitschke ¹, Jörn Pons-Kühnemann ³, Torsten Hain ^{2,4}, Markus Weigel ², Can Imirzalioglu ^{2,4}, Hans-Peter Howaldt ¹, Eugen Domann ^{4,5} and Sameh Attia ¹

- ¹ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Justus-Liebig-University Giessen, University Hospital Giessen, Klinikstrasse 33, 35392 Giessen, Germany; Dael.Schmermund@uniklinikum-giessen.de (D.S.); Philipp.Streckbein@uniklinikum-giessen.de (P.S.); Jan-Falco.Wilbrand@uniklinikum-giessen.de (J.-F.W.); Michael.Knitschke@uniklinikum-giessen.de (M.K.); HP.Howaldt@uniklinikum-giessen.de (H.-P.H.); sameh.attia@dentist.med.uni-giessen.de (S.A.)
 - ² Institute of Medical Microbiology, Justus-Liebig-University Giessen, 35392 Giessen, Germany; Silke.Zechel@mikrobio.med.uni-giessen.de (S.Z.-G.); Torsten.Hain@mikrobio.med.uni-giessen.de (T.H.); Markus.Weigel@mikrobio.med.uni-giessen.de (M.W.); Can.Imirzalioglu@mikrobio.med.uni-giessen.de (C.I.)
 - ³ Institute of Medical Informatics, Justus-Liebig-University Giessen, 35392 Giessen, Germany; Joern.Pons@informatik.med.uni-giessen.de
 - ⁴ German Center for Infection Research (DZIF), Justus-Liebig-University Giessen, 35392 Giessen, Germany; Eugen.Domann@mikrobio.med.uni-giessen.de
 - ⁵ Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, Schubertstrasse 81, 35392 Giessen, Germany
- * Correspondence: Sebastian.Boettger@uniklinikum-giessen.de; Tel.: +49-641-985-46271



Citation: Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Schmermund, D.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F.; Knitschke, M.; Pons-Kühnemann, J.; Hain, T.; Weigel, M.; Imirzalioglu, C.; et al. Odontogenic Cervicofacial Necrotizing Fasciitis: Microbiological Characterization and Management of Four Clinical Cases. *Pathogens* **2022**, *11*, 78. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010078>

Academic Editors:
Benedita Sampaio-Maia, Maria João Azevedo, Joana Campos and Lawrence S. Young

Received: 19 November 2021
Accepted: 7 January 2022
Published: 9 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Necrotizing fasciitis of the head and neck is a rare, very severe disease, which, in most cases, originates from odontogenic infections and frequently ends with the death of the patient. Rapid surgical intervention in combination with a preferably pathogen-specific antibiotic therapy can ensure patients' survival. The question arises concerning which pathogens are causative for the necrotizing course of odontogenic inflammations. Experimental 16S-rRNA gene analysis with next-generation sequencing and bioinformatics was used to identify the microbiome of patients treated with an odontogenic necrotizing infection and compared to the result of the routine culture. Three of four patients survived the severe infection, and one patient died due to septic multiorgan failure. Microbiome determination revealed findings comparable to typical odontogenic abscesses. A specific pathogen which could be causative for the necrotizing course could not be identified. Early diagnosis and rapid surgical intervention and a preferably pathogen-specific antibiotic therapy, also covering the anaerobic spectrum of odontogenic infections, are the treatments of choice. The 16S-rRNA gene analysis detected significantly more bacteria than conventional methods; therefore, molecular methods should become a part of routine diagnostics in medical microbiology.

Keywords: fasciitis; necrosis; abscess; cellulitis; microbiome; 16S-rRNA gene analysis

1. Introduction

Necrotizing fasciitis is a severe, life-threatening disease that can lead to a highly septic clinical presentation with extensive tissue necrosis in various areas of the body, and a poor outcome [1]. It is defined as a bacterial infection of the superficial fascial layer and the adjacent cutaneous tissues leading to fulminant, devastating and rapidly progressive necrosis of the affected tissues [2,3]. The disease is most common in the trunk, the extremities and the perineum [2,4], while it is rare in the head and neck region, accounting for only 1–10% of cases [5]. The majority of cases of cervicofacial necrotizing fasciitis are caused by an odontogenic focus [6–8]. Thus, similar to other odontogenic infections,

the diagnosis is usually based on clinical and radiological findings [7], but the disease can easily be misdiagnosed as a common odontogenic abscess, cellulitis or erysipelas in its early stages [9]; thus, the resulting danger for the patient might be underestimated. Only advanced stages show the almost pathognomonic picture of necrotizing fasciitis with small purple spots [2], dark hemorrhagic blisters, crepitus, complete anesthesia and dusky necrosis of the affected skin [9–11]. Concomitant septic symptoms such as hypotension, tachypnea and impaired consciousness usually already indicate a life-threatening condition [7]. Numerous authors, therefore, have pointed out the importance of rapid diagnosis and prompt intervention [2,7,10], since a delay in therapy usually leads to a significant decrease in the probability of survival [12]. The cornerstones of therapy of odontogenic necrotizing fasciitis are consequent surgical exposure of the affected fascia with radical removal of necrotic tissue and an empirical broad-spectrum antibiotic therapy, which subsequently can be adjusted by targeted antibiotic treatment according to an antibiogram [7,11]. To be able to select an appropriate antibiotic, the microbial nature of the infection is of interest. Using cultural analyses, many authors have observed that odontogenic cervicofacial necrotizing fasciitis, similar to odontogenic abscesses, is caused polymicrobially by aerobic and anaerobic bacteria of the oral cavity [13]. Usually, two to three combined aerobic and anaerobic bacteria are identifiable [8], leading to a typical microbiological report consisting of alpha-hemolytic streptococci and obligate anaerobes such as *Prevotella* spp. and *Bacteroides* spp. [6,8]. Sometimes, culture is not even able to detect any bacteria at all [7,8]. Using more recent molecular biological methods, it has been possible to detect a much larger number of bacteria in the root canals of non-vital teeth [14] and in odontogenic abscesses [15,16] than was previously possible using only cultural methods alone [17,18].

Therefore, the purpose of this study was to microbiologically characterize four cases of extensive odontogenic necrotizing fasciitis using advanced molecular techniques in addition to standardized cultural analysis. Furthermore, we aim to describe how this rare but life-threatening disease can be diagnosed early and treated appropriately.

2. Results

In the period from April 2009 to December 2020, four extensive odontogenic infections with a severe course of disease and extensive formation of skin necrosis were treated in the Clinic for Oral and Maxillofacial Surgery of the university hospital. Two women and two men were hospitalized, aged between 38 and 74 years. Patient No. 2 was transferred intubated and ventilated from a peripheral hospital to the university hospital, while all other patients were primarily admitted to the university hospital. Patient No. 3 was transported with a severely reduced general condition to the clinic by ambulance service, while the remaining two patients presented themselves at the university hospital.

2.1. Clinical Findings

For all patients, an odontogenic cause of the inflammation could already be determined by the medical history and the routine clinical examination. One patient developed the inflammation due to a tooth extraction, based on the inflamed dental alveolus. Two patients had a decayed molar with chronic apical periodontitis, and one patient had an apical periodontitis originating from crowned lower incisors as the causative dental focus. All odontogenic foci were well documented clinically and radiologically (Table 1).

On admission, all patients already showed a considerable impairment of their general condition with extensive swelling and erythema (Table 1) as well as severe pain and tenderness in the area of the neck and massive dysphagia. Further, all patients showed a significant increase in inflammatory parameters and the LRINEC score (Table 1).

Due to the severe course of the disease, a computed tomography scan with a contrast medium was performed for all patients during the early course. Here, all patients showed contrast medium enhancement in the area of inflammation as well as fluid and gas

inclusions along the fascial planes (Table 1). Tissue samples later confirmed the suspected diagnosis of necrotizing inflammation (Table 1).

Table 1. Clinical course and lab values on admission.

| | PAT. NO. 1 | PAT. NO. 2 | PAT. NO. 3 | PAT. NO. 4 |
|-----------------------|--|--|--|---|
| AGE/SEX | 71/F | 65/F | 74/M | 38/M |
| ORIGIN | Empty alveolus of extracted tooth 37 | Periodontitis apicalis of the lower incisors | Impacted decayed tooth 48 with apical periodontitis | Impacted decayed tooth 38, residual tooth root 36 |
| REGION | Left neck and thorax | Submental, bilateral neck, bilateral thorax, shoulders and axillae | Left neck and thorax | Left submandibular and submental region |
| ASSOCIATED DISEASE | None | None | None | Diabetes mellitus |
| CLINICAL SIGNS | Pain, touch sensitivity, swelling, induration, lockjaw, dysphagia, livid erythema | Black blisters, livid erythema, Somnolenz, Sopor, reduced general condition | Black blisters, anesthesia of the skin, livid erythema, reduced general condition | Pain, touch sensitivity, erythema, swelling, induration, lockjaw, dysphagia |
| LEUC | 19.1 | 40.6 | 16.1 | 10.9 |
| CRP | 245.1 | 368.61 | 294.61 | 472.53 |
| LRINEC SCORE | 8 | 13 | 6 | 7 |
| PATHOLOGY | florid granulating, partly purulent inflammation with tissue meltdown | phlegmonous purulent, hemorrhagic and necrotizing inflammation | Necrotizing, acute phlegmonous purulent inflammation | No tissue sample |
| RADIOLOGY | Air accumulations in subcutaneous and submandibular space | Diffuse swelling, extensive fluid and gas accumulation in the soft tissues of the neck | Diffuse air accumulations in the subcutaneous space | Post-incision, diffuse air accumulation in the subcutaneous space of cheek and neck |
| CULTURE | <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Alpha-hemolytic Streptococci</i> , <i>Candida albicans</i> | <i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> | <i>Actinomyces turicensis</i> , <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> | <i>Prevotella intermedia</i> |
| ANTIBIOTIC RESISTANCE | <i>P. intermedia</i> : <i>Penicillin</i> , <i>Ampicillin</i> | <i>S. anginosus</i> : <i>Gentamycin</i> | <i>A. turicensis</i> : <i>Levofloxacin</i> , <i>Ciprofloxacin</i> <i>S. epiderm.</i> : <i>Tetracyclin</i> | <i>P. intermedia</i> : <i>Vancomycin</i> |
| LENGHT OF STAY | 25 | 22 | 36 | 24 |
| ICU | 1 | 21 | 20 | 0 |
| SURG. INT. | 4 | 9 | 5 | 2 |
| SEC. SURG. | Skin graft | Tooth removal Skin graft | Tooth removal Skin graft Tracheostomy | Tooth removal |

Pat. No.: patient number; LEUC: leucocytes (giga/l); CRP: C-reactive protein (mg/l); ICU: length of stay in the intensive care unit; SURG. INT.: number of surgical interventions; SEC. SURG.: secondary surgical interventions; Pat. No. 2 died.

2.2. Surgical Treatment

On admission, the patients presented themselves with varying degrees of disease progression. Two patients (patient Nos. 1 and 4) were initially treated with the diagnosis of an odontogenic abscess. The remaining two patients (Nos. 2 and 3) presented a complete picture of necrotizing fasciitis. These two patients underwent immediate surgery as an

emergency, while the other two patients underwent surgical therapy as soon as possible, but not later than the first day after admission. In the case of the diagnosis “odontogenic abscess”, incisions and drains were performed using multiple Easy Flow drains. If necrotizing fasciitis was diagnosed, extensive deep incisions were performed, and fascial planes of the deep cervical fascia were exposed right down to the chest. In patient No. 2, multiple Easy Flow drains were also initially inserted, while in patient No. 3, all necrotically softened tissue was immediately removed radically. Furthermore, as recommended by numerous authors [7], a second-look procedure was performed on the first postoperative day. At this point, even in patient No. 2, the entire necrotic tissue was radically removed, exposing large parts of the pectoral musculature. Wound management was performed using Coldex[®] hydro foam (Monomed NV, Hamont-Achel, Belgium), and later, coverage was realized using meshed split-thickness skin grafts. In patient No. 3, wound management was performed using negative wound pressure therapy (vacuum pump: V.A.C. ULTA[®], 3M KCI, St. Paul, MN, USA), and later, wound coverage was also carried out using meshed split-thickness skin grafts.

The two cases initially diagnosed as an abscess showed their necrotizing potential only in the further course of the disease. Despite aggressive incision and drainage, patient No. 1 showed progressive necrotizing fasciitis after a few days, which required complete removal of the necroses and coverage with meshed split-thickness skin grafts in the further course. Patient No. 4 already showed massive redness of the skin and small black blisters over the punctum maximum of the inflammation at the time of the first surgical intervention. Despite aggressive incision and drainage with multiple Easy Flow drains, skin necroses several centimeters in size developed in the further course of the disease, which, however, remained locally confined to the neck. The necroses were locally resected, and the wounds were left to secondary wound healing.

2.3. Microbiological Findings and Ancillary Medical Treatment

Swabs were taken from all patients and sent to the microbiology laboratory for examination by culture. Table 1 and Table S1 show that all patients had a polymicrobial infection. With *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* and alpha-hemolytic streptococci, typical aerobic and anaerobic bacteria of the oral microbiome, which were frequently associated with odontogenic infections [15,16,19], were detected in three patients. By contrast, patient No. 3 showed a rather atypical bacterial composition for an odontogenic infection with *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Actinomyces turicensis* and *Staphylococcus epidermidis*. In addition to culture, PCR for prokaryote DNA was performed for the first patient, who had already been treated in 2009. In addition to the culture result, this allowed *Bacillus licheniformis* to be identified. The pus microbiome was determined for the three patients who were treated since 2016 using 16S-rRNA gene analysis. Figure 1 shows the microbiomes in the form of bar charts, and Table S1 shows the relative abundances of the reads of all bacterial genera. This indicates that, compared to other studies [17], many more bacteria could be detected than by culture alone. In these cases, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus* and *Veillonella* appeared as typical pathogens of odontogenic infections [15]. Patient No. 2 also showed an abundance of *Erysipelothrix* and *Slackia*, while Patient No. 3 showed an abundance of *Pyramidobacter*, *Moryella* and *Peptoniphilus*. The genera *Bacteroides* and *Actinomyces*, which were recovered in culture, were also detected with a relative frequency of 3.9% and 0.5%, respectively. In patient No. 4, *Coriobacterium* was also predominant. Overall, our patients showed only negligible antibiotic resistance (Table 1). Susceptibility testing showed no resistance against antibiotics commonly used for odontogenic infections (ampicillin/sulbactam, clindamycin, metronidazole) [20] and against broad-spectrum antibiotics. All patients underwent empirical antibiotic therapy until susceptibility tests were performed. The initial diagnosis of abscess in patient Nos. 1 and 4 was initially treated with ampicillin and sulbactam according to the German guidelines for odontogenic infections [20]. Due to the exceptional severity of the disease, patient No. 4 was treated with an additional administration of metronidazole. In the case of the

initial diagnosis of necrotizing fasciitis, clindamycin was administered in addition to a broad-spectrum antibiotic (patient No. 2: imipenem; patient No. 3: meropenem) to inhibit the protein biosynthesis of the bacteria [21] and thus to reduce the production of harmful enzymes. Furthermore, patient No. 2 was additionally treated with vancomycin due to a *Clostridium difficile*-associated colitis. In the susceptibility tests, all the substances used demonstrated a good efficacy against the bacteria, which were isolated by culture during the course.

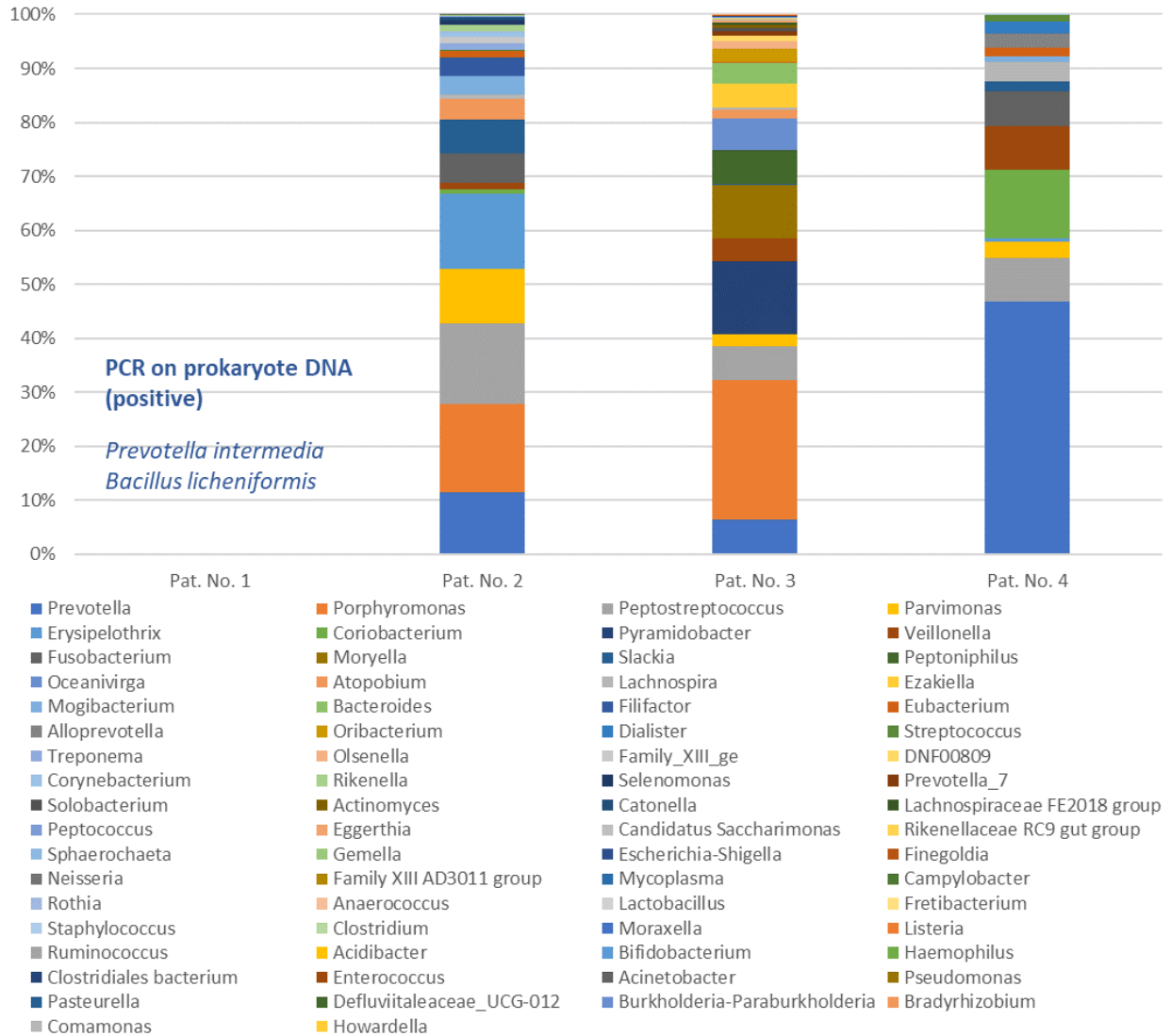


Figure 1. Microbiome of necrotizing fasciitis of three patients treated since 2016. PCR on prokaryote DNA identified *Prevotella intermedia* and *Bacillus licheniformis* in patient No. 1. The order of the bacterial genera in the legend corresponds to the mean of the relative abundances. Exact data are available in Table S1 of the Supplementary Materials.

2.4. Outcome

Three of four patients survived the necrotizing odontogenic infection, and one patient ultimately died due to septic multiorgan failure. The length of stay in the hospital ranged from 7 to 36 days which included intensive care of 1 to 21 days (Table 1). The surviving patients could be followed up for at least 15 months and showed scarring in the area of

the former inflammations during the course, but functional deficits were minimal (Table 1). Patient No. 2 showed a drastically reduced general condition with extended necrotizing fasciitis already on admission. In addition to renal failure, she developed bilateral diffuse pneumonia, enteric ischemia and fulminant liver failure, leading to her final death as a result of septic shock and multiorgan failure. Figures 2–5 show the entire clinical course of the four patients as well as representative CT images of the soft tissues and radiographs of the dental focus.

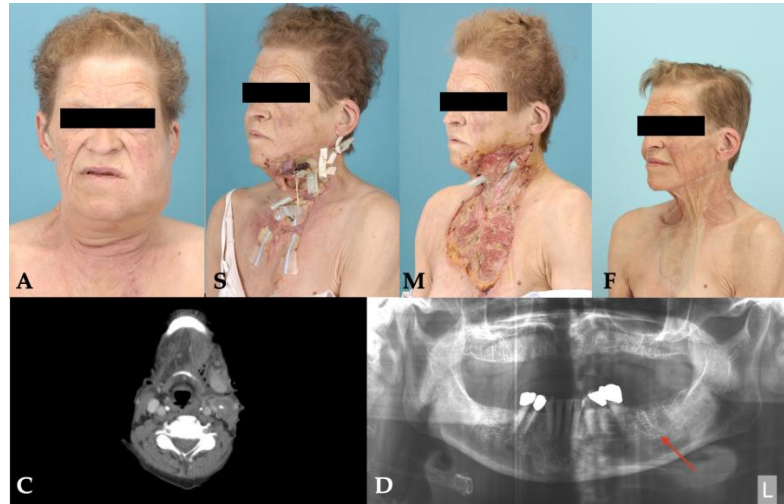


Figure 2. Clinical course and radiographs of patient No. 1: A: admission; S: surgery; M: maximal extent; F: final result; C: CT scan; D: dental focus (empty alveolus).

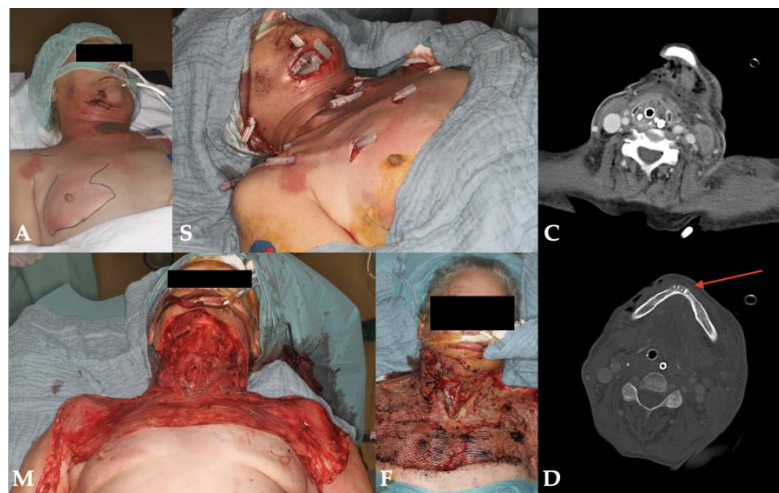


Figure 3. Clinical course and radiographs of patient No. 2: A: admission; S: surgery; M: maximal extent; F: final result; C: CT scan; D: dental focus (lower incisors).

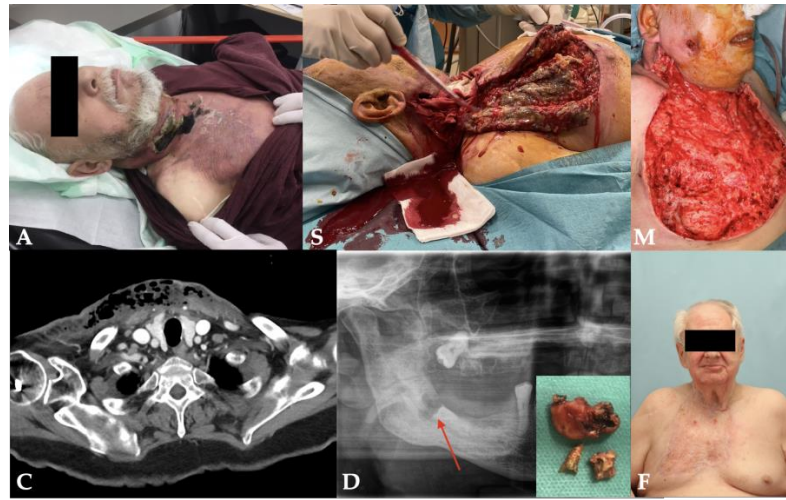


Figure 4. Clinical course and radiographs of patient No. 3: A: admission; S: surgery; M: maximal extent; F: final result; C: CT scan; D: dental focus (empty alveolus and decayed tooth 48).

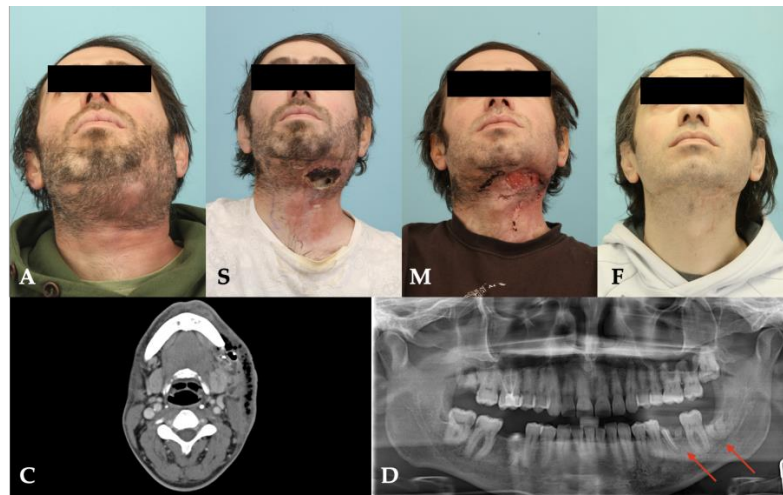


Figure 5. Clinical course and radiographs of patient No. 4: A: admission; S: surgery; M: maximal extent; F: final result; C: CT scan; D: dental focus (tooth remnants 36 and 38).

3. Discussion

3.1. Clinical Course of Necrotizing Fasciitis

Odontogenic infections are the most common infections in the head and neck region [22,23]. Most infections can be managed well on an outpatient basis, but patients with extensive abscesses require hospitalization [20,24]. The overall prognosis of these diseases is favorable if adequate surgical therapy and additional antibiotics are used [23]. Very rarely, instead of forming an abscess, odontogenic infections can lead to necrotizing fasciitis, which is described as a dreaded complication by many authors [2,7,10,22,23]. This results in acute life-threatening conditions, which can have severe consequences for the patient even in the case of survival [25]. In contrast to the common odontogenic abscess, the inflammation does not remain localized. The infection spreads through the tissue and extends to the level of the fasciae [12]. Destructive enzymes such as hyaluronidase and lipase allow the inflammation to spread rapidly at the level of the fasciae [12,26]. This results in septic thrombosis of the blood vessels of the skin crossing the fasciae, causing ischemia and necrosis of the skin [12,27]. Without appropriate therapy, the necrosis rapidly

expands, leading to a highly septic clinical presentation and finally to the death of the patient [28]. Although healthy patients without pre-existing disorders can also develop the disease, older patients with pre-existing conditions are usually affected [2]. Diabetes mellitus followed by alcohol abuse with impaired liver function are reported as the most frequent predisposing disorders [8]. In addition, atherosclerosis, obesity, malnutrition, metastatic neoplasms, chronic renal failure and polymyositis are also mentioned [2]. Initially, only blurred skin redness and swelling appear, with smooth, tense and sometimes shiny skin [2]. Patients usually report disproportionately severe pain, typically extending widely beyond the edge of the skin redness, which provides an excellent clue to the true extent of disease [10]. In the further course, indurations, fluctuations and clear blister formations can appear [10]. If the disease progresses further, the almost pathognomonic picture of necrotizing fasciitis with small purple spots [2], dark hemorrhagic blisters, complete anesthesia of the affected skin, crepitus and dusky skin necrosis appears [9–11]. If left untreated, necrosis progresses to frank gangrene [10], and most patients develop sepsis with high rates of mortality [7,10,11,28].

3.2. Management of Odontogenic Necrotizing Fasciitis

Numerous authors have pointed out that early diagnosis and early initiation of adequate therapy are crucial for the outcome of necrotizing fasciitis [2,7,10,13,28]. In most cases, a markedly deranged physiology with abnormal blood parameters is observed [10], which is mainly characterized by abnormal elevation of white blood cells and C-reactive protein, impaired blood coagulation and elevated renal parameters [10]. In this context, the LRINEC score was proposed as a risk indicator with a cutoff value of 6 [29], which was also reached or exceeded by our patients in all cases. Although the sensitivity and specificity of this score, based on simple laboratory parameters, are controversially discussed by some authors [10,30], the score may well be used to assess the severity of disease and thus to raise awareness regarding a possibly necrotizing course [10]. Thus, in our study, the patient that we could not cure had an LRINEC score of 13 on admission. A prompt CT diagnosis of the head and neck region and the thorax with a contrast medium can show the extent of the inflammation and usually allow a reliable differentiation from the common odontogenic abscess [31]. Surgical therapy should be performed as soon as possible, but immediately as emergency therapy in the presence of purplish spots, dark hemorrhagic blisters or definite skin necrosis. In contrast to an odontogenic abscess, necrotizing fasciitis shows significantly reduced tissue resistance, allowing the blunt finger to be advanced beneath the already affected skin without any resistance. Here, it is of utmost importance to expose the affected fascia and to completely remove already necrotized tissue. It is advisable to collect several samples (swabs and native tissue) for microbiological and histopathological examination. Since the detection of anaerobes is often challenging, the microbiologist should be informed in advance and care should be taken to ensure rapid and proper sample transport to the microbiological laboratory [16]. Sampling should ideally take place prior to the first application of antibiotic therapy. Wounds should be treated with negative wound pressure therapy to ensure continuous removal of bacterial enzymes and metabolites from the affected tissues. Postoperatively, patients should receive intensive medical care, and at least one second-look surgical intervention should be performed on the next day to safely remove any further developing necrosis [7]. In our experience, more extensive cases require several interventions until the development of new necrosis is arrested. With regard to the recently observed increase in antibiotic resistance in odontogenic abscesses [16,32], a broad-spectrum antibiotic therapy, for example, with piperamcillin/tazobacam or meropenem should initially be performed. In cases of a pre-existing colonization of the oral cavity with a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), additional administration of vancomycin may be considered. In this way, it can be assumed that the entire bacterial community of the infection is safely targeted. If the microbiological findings including an antibiogram are available after several hours, therapy can be adjusted specifically. As recommended by Tsitsilonis et al. [21], clindamycin may be used in addition to the broad-

spectrum antibiotic to inhibit bacterial protein biosynthesis in order to retard bacterial production of destructive enzymes. Tracheostomy may be necessary as part of intensive care therapy. However, it is advisable to perform this only if the approach to the trachea is clean and free of necrosis to prevent possible seeding of the bacteria into the mediastinum, which would lead to a very poor prognosis [8]. If no further necrosis becomes apparent after several surgical interventions over several days, therapy with meshed skin grafts can be performed similarly to burn patients. Minor defects confined to the neck can be left to free granulation.

3.3. Microbiology of Odontogenic Necrotizing Fasciitis

Odontogenic infections are regularly caused by the bacteria of the oral microbiome [15]. In contrast to inoculation of bacteria through the skin [33], these are endogenous infections. Numerous authors have pointed out that odontogenic infections are caused polymicrobially by aerobic and anaerobic bacteria. Aderhold et al. already pointed out in 1981, and Eckert et al. in 2000, the particular importance of the anaerobic species *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* and *Peptostreptococcus* [19,34]. Recent studies using molecular methods to determine the microbiome of odontogenic infections have confirmed these findings [14,16,17]. In addition to the previously mentioned bacteria, *Parvimonas* has also been associated with strong pathogenicity [18]. In their review about odontogenic infections, Lewis et al. described that culture-based analyses often only detect viridans-streptococci and staphylococci in odontogenic infections, and that the detection of anaerobic bacteria is only possible using strictly anaerobic and low-contamination techniques [35]. It is therefore not surprising that in a large review of 1235 cases of cervicofacial necrotizing fasciitis, mainly streptococci and staphylococci could be isolated, whereas the detection of anaerobes was markedly less successful [8]. In the routine cultural analyses performed in this study, two out of four cases (patient Nos. 1 and 2) showed the typical picture of an odontogenic infection [16,19,34], consisting of abscess-typical anaerobic species (*Prevotella intermedia* or *Fusobacterium nucleatum*) in combination with alpha-hemolytic streptococci. In patient No. 4, only *Prevotella intermedia* was detected by culture, which, however, can also be considered typical for an odontogenic infection [16,19]. Eckert et al. pointed out that culture is not always able to detect all species involved in an odontogenic infection [34], and the examination of the associated microbiome (Figure 1) of patient No. 4 showed that streptococci were also involved despite the lack of cultural evidence. Overall, three out of four patients showed culture findings that were appropriate and typical for both simple odontogenic infection and odontogenic necrotizing fasciitis [8,19]. In patient No. 3, however, *Actinomyces turicensis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* were detected in association with *Staphylococcus epidermidis*. While *Staphylococcus epidermidis* was probably a contamination from the skin [16], *Actinomyces turicensis* has been identified as a bacterium that occurs physiologically in the oral cavity [36], but in rare cases, it can cause severe and sometimes necrotizing inflammations [37,38]. *Bacteroides thetaiotaomicron* is a dominant member of the intestinal microbiota, which is known for its strong adaptability to external conditions and its ability to metabolize various complex polysaccharides [39]. Its ability to strongly increase virulence in polymicrobial infections is also well described [40]. To our knowledge, no case of cervicofacial necrotizing fasciitis with such a bacterial constellation has been described thus far. Therefore, this is the first description of necrotizing fasciitis caused by *Actinomyces turicensis* and *Bacteroides thetaiotaomicron*. However, the additionally prepared microbiome showed a composition of mainly *Porphyromonas*, *Pyramidobacter*, *Peptostreptococcus*, *Parvimonas*, *Veillonella* and *Moryella*, in which *Bacteroides* and *Actinomyces* appeared only in a smaller abundance. Thus, the typical appearance of a polymicrobial odontogenic infection was finally seen even in this case.

As previously published, the DNA-based determination of microbiomes reveals many more bacteria in odontogenic infections than would have been found in a cultural analysis alone [14,15,17]. This also seems to be the case in odontogenic necrotizing fasciitis, although, to our knowledge, no microbiome of a necrotizing fasciitis has been published yet. The

here determined microbiomes show many more bacteria than cultural analysis, and the polymicrobial character of the infection is further emphasized. It has also become evident that, similar to common odontogenic abscesses, it is probably not useful to search for a single culprit bacterium that would be responsible for the necrotizing course [16]. Presumably, a pathological community is always involved, which receives its virulence through the synergy of the abilities of the individual species [41]. In this context, it is remarkable that even bacteria not primarily expected in odontogenic infections, such as *Coriobacterium* and *Erysipelothrix*, can be part of this pathological community (Figure 1, patient Nos. 2 and 4). In the case of patient No. 1, the possibility of determining a microbiome was not yet available at that time, and the identification of DNA from *Bacillus licheniformis* seems likely to be a case of contamination. However, we assume that a comparable microbiome would also have been collected here. In summary, with regard to the ability of a pathological community to form necrotizing fasciitis, it is probably not the presence of a particular bacterium (e.g., streptococci or staphylococci) that is decisive, but rather the co-occurrence of specific virulence factors with regard to the metabolism of polysaccharides and oxygen and the ability to produce certain destructive enzymes [12,28]. In relation to the management of odontogenic necrotizing fasciitis, it should finally be noted that, similar to odontogenic abscesses, microbiological culture analysis may only detect a part of such a culprit bacterial community [16], which could have a negative impact on susceptibility testing. However, especially in cases that do not respond adequately to therapeutic measures, adequate bacterial detection may be crucial for patients' outcome. Therefore, culture-based routine microbiological diagnostics should be complemented by culture-independent molecular detection methods in the future.

4. Materials and Methods

Patients of this cross-sectional, retrospective study were observed in two other studies on odontogenic abscesses at the Department of Oral and Maxillofacial Surgery of the University Hospital of the Justus-Liebig-University Giessen between April 2009 and December 2020. The inclusion criterion for this special investigation was the development of extensive skin necrosis due to an odontogenic infection, which was associated with a significantly worse and extended course of disease in all cases. The patients or their authorized relatives gave their written consent to participate, and the entire project was authorized by the Ethics Committee of the Justus-Liebig-University Giessen (Vote 191/16 and Vote 222/14) [15,42]. Clinical therapy was performed independently of the ongoing studies and was carried out initially either with the diagnosis of extensive odontogenic abscess or necrotizing fasciitis, with the diagnosis of abscess corrected to necrotizing fasciitis in the course of disease. For the study, inflammatory parameters were obtained from the first blood sample after hospital admission, and the Laboratory Risk Indicator for Necrotizing Fasciitis (LRINEC) score was calculated as described by Wong et al. [29]. Histopathological examinations were performed following the hospital's standard with hematoxylin and eosin stain.

Microbiological specimens were collected for both cultural and molecular biology testing during the first surgical intervention from the surgical wounds. For molecular analysis, pure pus was collected in an Eppendorf tube, and swabs (wrapped fiber swabs with gel-based Amies medium) of the pus were taken for culture. The samples were taken in a standardized manner prior to the first administration of antibiotics. However, it could not be ruled out that the patients had already taken antibiotics prior to hospital admission due to the severity of the disease. Culture and antibiograms were performed according to the hospital's standard, as previously described [16]. Moreover, in addition to the clinical routine, PCR on prokaryote DNA was performed for the patient treated in 2009, and the microbiome of the pus was determined for the three patients treated since 2016 using 16S-rRNA amplicon sequencing and bioinformatics, as previously described [15,43]. For this purpose, specimens were first stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Subsequently, bacterial DNA was extracted from the initially frozen samples, and the variable area "V4" of the 16S-rRNA genes was amplified by PCR using primers in the conserved flanking areas with adapters.

The resulting amplicons of an approximate length of 350 to 370 bps were processed for next-generation sequencing using the Illumina MiSeq System, as described by the vendor (Illumina). After the sequencing of these amplicons, the bacteria-specific sequences were determined and ready for bioinformatic analysis.

Therefore, paired-end sequence reads were joined, and primer sequences were removed, as previously described [44]. Reads with ambiguous base calls or with homopolymers longer than eight nucleotides were removed, and duplicates were merged and aligned against the SILVA bases' bacterial reference alignment [45]. Applying the Mothur implementation of the uchime algorithm, chimeric reads were removed, taxonomy was assigned and non-bacterial reads were removed from the analysis. Operational taxonomic units (OTUs) were generated, and taxonomy was reassigned using Mothur. In preparation for the analysis, an OTU table in biom format was created.

The statistical analysis was carried out using Microsoft Excel.

5. Conclusions

1. Cervicofacial necrotizing fasciitis is rare compared to common odontogenic abscesses, but in most cases, it is also caused by an odontogenic focus.
2. Early diagnosis and immediate initiation of adequate therapy are crucial for the outcome of odontogenic cervicofacial necrotizing fasciitis.
3. Radical surgical therapy in combination with broad-spectrum antibiotic therapy represents the cornerstone of therapy. Negative wound pressure therapy supports wound purification and may facilitate subsequent coverage with skin grafts.
4. Similar to odontogenic abscesses, odontogenic necrotizing fasciitis represents an endogenous, polymicrobial infection in which anaerobic bacteria of the oral microbiome predominate. A single "culprit bacterium" that triggers the necrotizing course could not be identified even by using molecular pathogen diagnostics.
5. In odontogenic necrotizing fasciitis, molecular pathogen diagnostics were able to detect significantly more bacteria than cultural analysis alone. Molecular methods are predestined to become the gold standard in medical microbiology diagnostics, particularly for polymicrobial infections with a predominance of anaerobic bacteria.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens11010078/s1>, Table S1: Relative abundances of the bacterial genera in the microbiome of Necrotizing Fasciitis.

Author Contributions: Conceptualization, S.B., J.-F.W., H.-P.H., E.D. and S.A.; data curation, S.B. and M.K.; formal analysis, J.P.-K.; investigation, S.B., S.Z.-G., D.S., T.H., M.W. and E.D.; methodology, P.S. and E.D.; project administration, S.A.; supervision, H.-P.H. and S.A.; validation, S.B. and H.-P.H.; writing—original draft, S.B.; writing—review and editing, S.Z.-G., D.S., P.S., J.-F.W., M.K., J.P.-K., T.H., M.W., H.-P.H., C.I., E.D. and S.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded collaboratively by the Institute of Medical Microbiology and the Clinic for Oral and Maxillofacial Surgery of the Justus-Liebig-University Giessen. This study was supported by German Research Foundation DFG (KFO 309 Z01, SFB1021 Z02 and SFB-TR84 B/08) funding to T.H.

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of the Justus-Liebig-University Giessen (Vote 191/16).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The datasets generated and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: The authors thank Trinad Chakraborty (Institute of Medical Microbiology) for making sequencing machines available.

Conflicts of Interest: The authors declare no competing interests.

References

1. Stevens, D.L.; Bryant, A.E.; Goldstein, E.J. Necrotizing Soft Tissue Infections. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2021**, *35*, 135–155. [CrossRef]
2. Balcerak, R.J.; Sisto, J.M.; Bosack, R.C. Cervicofacial necrotizing fasciitis: Report of three cases and literature review. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **1988**, *46*, 450–459. [CrossRef]
3. Chou, P.Y.; Hsieh, Y.H.; Lin, C.H. Necrotizing fasciitis of the entire head and neck: Literature review and case report. *Biomed. J.* **2020**, *43*, 94–98. [CrossRef]
4. Wang, J.M.; Lim, H.K. Necrotizing fasciitis: Eight-year experience and literature review. *Braz. J. Infect. Dis.* **2014**, *18*, 137–143. [CrossRef]
5. Lin, C.; Yeh, F.L.; Lin, J.T.; Ma, H.; Hwang, C.H.; Shen, B.H.; Fang, R.H. Necrotizing fasciitis of the head and neck: An analysis of 47 cases. *Plast. Reconstr. Surg.* **2001**, *107*, 1684–1693. [CrossRef] [PubMed]
6. Mao, J.C.; Carron, M.A.; Fountain, K.R.; Stachler, R.J.; Yoo, G.H.; Mathog, R.H.; Coticchia, J.M. Craniocervical necrotizing fasciitis with and without thoracic extension: Management strategies and outcome. *Am. J. Otolaryngol.* **2009**, *30*, 17–23. [CrossRef]
7. Malik, V.; Gadepalli, C.; Agrawal, S.; Inkster, C.; Lobo, C. An algorithm for early diagnosis of cervicofacial necrotising fasciitis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **2010**, *267*, 1169–1177. [CrossRef] [PubMed]
8. Gunaratne, D.A.; Tseros, E.A.; Hasan, Z.; Kudpaje, A.S.; Suruliraj, A.; Smith, M.C.; Riffat, F.; Palme, C.E. Cervical necrotizing fasciitis: Systematic review and analysis of 1235 reported cases from the literature. *Head Neck* **2018**, *40*, 2094–2102. [CrossRef]
9. Whitesides, L.; Cotto-Cumba, C.; Myers, R.A. Cervical necrotizing fasciitis of odontogenic origin: A case report and review of 12 cases. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2000**, *58*, 144–151. [CrossRef]
10. Goh, T.; Goh, L.G.; Ang, C.H.; Wong, C.H. Early diagnosis of necrotizing fasciitis. *Br. J. Surg* **2014**, *101*, e119–e125. [CrossRef] [PubMed]
11. Wong, C.H.; Chang, H.C.; Pasupathy, S.; Khin, L.W.; Tan, J.L.; Low, C.O. Necrotizing fasciitis: Clinical presentation, microbiology, and determinants of mortality. *J. Bone Joint Surg. Am.* **2003**, *85*, 1454–1460. [CrossRef]
12. Wong, C.H.; Wang, Y.S. The diagnosis of necrotizing fasciitis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2005**, *18*, 101–106. [CrossRef]
13. Gore, M.R. Odontogenic necrotizing fasciitis: A systematic review of the literature. *BMC Ear Nose Throat Disord.* **2018**, *18*, 14. [CrossRef]
14. Brito, L.C.N.; Doolittle-Hall, J.; Lee, C.T.; Moss, K.; Bambirra, W., Jr.; Tavares, W.L.F.; Ribeiro Sobrinho, A.P.; Teles, F.R.F. The apical root canal system microbial communities determined by next-generation sequencing. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 10932. [CrossRef] [PubMed]
15. Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Schmermund, D.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F.; Knitschke, M.; Pons-Kühnemann, J.; Hain, T.; Weigel, M.; Howaldt, H.-P.; et al. Microbiome of Odontogenic Abscesses. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1307. [CrossRef]
16. Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Schmermund, D.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F.; Knitschke, M.; Pons-Kühnemann, J.; Hain, T.; Weigel, M.; Imirzalioglu, C.; et al. Clinical Relevance of the Microbiome in Odontogenic Abscesses. *Biology* **2021**, *10*, 916. [CrossRef]
17. Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clin. Microbiol. Rev.* **2013**, *26*, 255–273. [CrossRef]
18. Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N. The Oral Microbiota in Health and Disease: An Overview of Molecular Findings. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1537*, 127–138. [CrossRef]
19. Aderhold, L.; Knothe, H.; Frenkel, G. The bacteriology of dentogenous pyogenic infections. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **1981**, *52*, 583–587. [CrossRef]
20. Al-Nawas, B.; Karbach, J. S3-Leitlinie (Langversion): Odontogene Infektionen. In *Leitlinien Zahnmedizin*; Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften: Frankfurt, Germany, 2016; Available online: <http://www.awmf.org> (accessed on 10 March 2020).
21. Tsitsilonis, S.; Druschel, C.; Wichlas, F.; Haas, N.P.; Schwabe, P.; Bail, H.J.; Schaser, K.D. Necrotizing fasciitis: Is the bacterial spectrum changing? *Langenbecks Arch. Surg.* **2013**, *398*, 153–159. [CrossRef] [PubMed]
22. Bali, R.K.; Sharma, P.; Gaba, S.; Kaur, A.; Ghanghas, P. A review of complications of odontogenic infections. *Natl. J. Maxillofac. Surg.* **2015**, *6*, 136–143. [CrossRef]
23. Han, X.; An, J.; Zhang, Y.; Gong, X.; He, Y. Risk Factors for Life-Threatening Complications of Maxillofacial Space Infection. *J. Craniofac. Surg.* **2016**, *27*, 385–390. [CrossRef]
24. Al-Nawas, B.; Maeurer, M. Severe versus local odontogenic bacterial infections: Comparison of microbial isolates. *Eur. Surg. Res.* **2008**, *40*, 220–224. [CrossRef]
25. De Backer, T.; Bossuyt, M.; Schoenaers, J. Management of necrotizing fasciitis in the neck. *J. Craniofac. Surg.* **1996**, *24*, 366–371. [CrossRef]
26. Maisel, R.H.; Karlen, R. Cervical necrotizing fasciitis. *Laryngoscope* **1994**, *104*, 795–798. [CrossRef]
27. Stamenkovic, I.; Lew, P.D. Early recognition of potentially fatal necrotizing fasciitis. The use of frozen-section biopsy. *N. Engl. J. Med.* **1984**, *310*, 1689–1693. [CrossRef]
28. Young, M.H.; Aronoff, D.M.; Engleberg, N.C. Necrotizing fasciitis: Pathogenesis and treatment. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2005**, *3*, 279–294. [CrossRef] [PubMed]
29. Wong, C.H.; Khin, L.W.; Heng, K.S.; Tan, K.C.; Low, C.O. The LRINEC (Laboratory Risk Indicator for Necrotizing Fasciitis) score: A tool for distinguishing necrotizing fasciitis from other soft tissue infections. *Crit. Care Med.* **2004**, *32*, 1535–1541. [CrossRef] [PubMed]

30. Barie, P.S. The laboratory risk indicator for necrotizing fasciitis (LRINEC) score: Useful tool or paralysis by analysis? *Crit. Care Med.* **2004**, *32*, 1618–1619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Becker, M.; Zbären, P.; Hermans, R.; Becker, C.D.; Marchal, F.; Kurt, A.M.; Marré, S.; Rüfenacht, D.A.; Terrier, F. Necrotizing fasciitis of the head and neck: Role of CT in diagnosis and management. *Radiology* **1997**, *202*, 471–476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Heim, N.; Jürgensen, B.; Kramer, F.J.; Wiedemeyer, V. Mapping the microbiological diversity of odontogenic abscess: Are we using the right drugs? *Clin. Oral Investig.* **2021**, *25*, 187–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sablier, F.; Slaouti, T.; Drèze, P.A.; El Fouly, P.E.; Allemeersch, D.; van Melderden, L.; Smeesters, P.R. Nosocomial transmission of necrotizing fasciitis. *Lancet* **2010**, *375*, 1052. [[CrossRef](#)]
34. Eckert, A.W.; Hohne, C.; Schubert, J. [Pathogen spectrum and resistance status of exclusively anaerobic odontogenic infections]. *Mund Kiefer Gesichtschir.* **2000**, *4*, 153–158. [[CrossRef](#)]
35. Lewis, M.A.; MacFarlane, T.W.; McGowan, D.A. A microbiological and clinical review of the acute dentoalveolar abscess. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **1990**, *28*, 359–366. [[CrossRef](#)]
36. Kansara, T.; Majmundar, M.; Doshi, R.; Ghosh, K.; Saeed, M. A Case of Life-threatening *Actinomyces turicensis* Bacteremia. *Cureus* **2020**, *12*, e6761. [[CrossRef](#)]
37. Vassa, N.; Mubarik, A.; Patel, D.; Muddassir, S. *Actinomyces turicensis*: An unusual cause of cervicofacial actinomycosis presenting as Ludwig's angina in an immunocompromised host—Case report and literature review. *IDCases* **2019**, *18*, e00636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Kocsis, B.; Tiszlavicz, Z.; Jakab, G.; Brassay, R.; Orbán, M.; Sárkány, Á.; Szabó, D. Case report of *Actinomyces turicensis* meningitis as a complication of purulent mastoiditis. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Comstock, L.E.; Coyne, M.J. *Bacteroides thetaiotaomicron*: A dynamic, niche-adapted human symbiont. *Bioessays* **2003**, *25*, 926–929. [[CrossRef](#)]
40. Brook, I. Pathogenicity of the *Bacteroides fragilis* group. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1989**, *19*, 360–376.
41. Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N. Community as the unit of pathogenicity: An emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2009**, *107*, 870–878. [[CrossRef](#)]
42. Böttger, S.; Lautenbacher, K.; Domann, E.; Howaldt, H.P.; Attia, S.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.F. Indication for an additional post-operative antibiotic treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses. *J. Craniomaxillofac. Surg.* **2020**, *48*, 229–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Streckbein, P.; Knitschke, M.; Hain, T.; Weigel, M.; Wilbrand, J.F.; Domann, E.; Howaldt, H.P.; Attia, S. A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics. *Pathogens* **2020**, *9*, 798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Regier, Y.; Komma, K.; Weigel, M.; Kraiczky, P.; Laisi, A.; Pulliainen, A.T.; Hain, T.; Kempf, V.A.J. Combination of microbiome analysis and serodiagnostics to assess the risk of pathogen transmission by ticks to humans and animals in central Germany. *Parasit. Vectors* **2019**, *12*, 11. [[CrossRef](#)]
45. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic. Acids Res.* **2013**, *41*, D590–D596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



pathogens

an Open Access Journal by MDPI



CERTIFICATE OF PUBLICATION



Certificate of publication for the article titled:

Odontogenic Cervicofacial Necrotizing Fasciitis: Microbiological Characterization and Management of Four Clinical Cases

Authored by:

Sebastian Böttger; Silke Zechel-Gran; Daniel Schmermund; Philipp Streckbein; Jan-Falco Wilbrand; Michael Knitschke;
Jörn Pons-Kühnemann; Torsten Hain; Markus Weigel; Can Imirzalioglu; Hans-Peter Howaldt; Eugen Domann;
Sameh Attia

Published in:

Pathogens 2022, Volume 11, Issue 1, 78



Academic Open Access Publishing
since 1996

Basel, January 2022

7. Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der 16S-rRNA-Gen-Analyse, des Next-Generation-Sequencing und der Bioinformatik gewonnen Erkenntnisse sollten Auswirkungen auf die Diagnostik und die Therapie odontogener Infektionen haben. Mit Hilfe der publizierten Erkenntnisse wird klar, dass vor allem die mikrobiologische Diagnostik bei odontogenen Infektionen vermutlich deutlich verbessert werden kann. Sekundär könnte dadurch möglicherweise auch ein positiver Effekt auf die Therapie dieser Infektionen erreicht werden. Auf der Basis der Erkenntnisse aus den einzelnen Publikationen soll an dieser Stelle nun versucht werden, die am Anfang formulierten Fragen zu beantworten. Es sollen ferner Vorschläge für den Umgang mit odontogenen Infektionen in der täglichen Klinik formuliert werden.

7.1. Abgrenzung zwischen typischer und atypischer odontogener Infektion

Schon in der Einleitung wurde beschrieben, dass der Begriff einer odontogenen Infektion nicht eindeutig definiert ist. Genauso wenig sind auch die Bezeichnungen einer typischen und einer atypischen odontogenen Infektion klar definiert. Dennoch werden diese Begriffe bei verschiedenen Publikationen immer wieder verwendet, um das Erscheinungsbild und den Verlauf der Erkrankung zu beschreiben [1,37,46]. Der Begriff typische odontogene Infektion beschreibt dabei den Regelfall einer odontogenen Infektion, der durch sehr häufiges Auftreten, charakteristische Symptome und Befunde sowie durch einem unkomplizierten Verlauf gekennzeichnet ist [12]. Die Therapie besteht im Wesentlichen aus chirurgischen und zahnärztlichen Maßnahmen wie Trepanation, Inzision oder Zahn-Extraktion, die bei Ausbreitungstendenz oder Vorliegen von Risikofaktoren wie Diabetes mellitus oder Immunsuppression mit einer konsequenten adjuvanten antibiotischen Therapie begleitet werden kann [12,113]. Die Prognose ist gut und die endogene Infektion heilt in der Regel innerhalb von ein bis zwei Wochen aus, wenn der odontogene Focus der Infektion entfernt oder adäquat zahnärztlich therapiert wird [12,113].

Atypische odontogene Infektionen fallen hingegen dadurch auf, dass normale Maßnahmen wie Trepantion, Inzision und Zahn-Extraktion nicht zur Ausheilung der Erkrankung führen. In vielen Fällen kann eine sorgfältige Anamnese Erkenntnisse zur Ursache für den atypischen Verlauf der Entzündung zu Tage fördern. Besteht eine bislang unbekanntes Systemerkrankung? Wurde eine Bestrahlung im Kiefer- und Gesichtsbereich durchgeführt? Besteht eine maligne Grunderkrankung aufgrund derer Bisphosphonate, Denosumab, Bevacizumab oder Sunitinib verabreicht wurden? Oder besteht eine rheumatische oder autoimmunologische Grunderkrankung aufgrund derer Immunsuppressiva oder Glucocorticosteroide eingenommen werden? In den meisten Fällen wird die Anamnese vermutlich zur Klärung der Situation beitragen können, in einigen Fällen wird aber auch die sorgfältige Anamnese die Ursache des atypischen Verlaufes nicht klären können [88]. Dann sollte zunächst kontrolliert werden, ob nicht noch ein weiterer, bislang unentdeckter odontogener Focus als Ursache in Frage kommt. Sofern das aber nicht der Fall ist, müssen besondere Anforderungen an die Diagnostik gestellt werden. Diese bestehen zum einen in der Anfertigung einer 3D-Schnittbild-Diagnostik zusätzlich zur konventionellen Bildgebung und zum anderen in der Gewinnung von Gewebeproben für mikrobiologische und histopathologische Untersuchungen. In der 3D-Schnittbilddiagnostik mittels einer Computertomographie oder eines dentalen Volumentomogramms sollte das Vorhandensein von Knochensequestern und pathologischen Frakturen ausgeschlossen werden. Zudem können die 3D-Untersuchungen dabei helfen, bislang unentdeckte dentale Foci zu identifizieren. In der histopathologischen Untersuchung kann unter anderem das Vorhandensein von *Actinomyces*, von Pilzen und von säurefesten Stäbchen ausgeschlossen oder bestätigt werden. Zudem besteht die Möglichkeit, molekulare Nachweismethoden zur Bakterienidentifikation wie etwa auf Mykobakterien einzusetzen. Mit Hilfe von mikrobiologischen Untersuchungen kann in Anlehnung an die Henle-Koch-Postulate versucht werden, pathogene Keime zu identifizieren. Hierzu sollten aber zwingend Abstrich-Systeme verwendet werden, die einerseits ein Überleben der empfindlichen

anaeroben Bakterien aus der Mundhöhle ermöglichen und die andererseits auch die Möglichkeit von weiteren molekularen Untersuchungen bieten [151]. Vor allem durch erregerspezifische PCR-Techniken und die Anwendung der 16S-rRNA-Gen-Analyse können hierbei auch ganz ohne kulturelle Analyse Ergebnisse erzielt werden. In diesem Zusammenhang hat sich die zusätzliche Untersuchung von Nativgewebe zur mikrobiologischen Untersuchung bewährt [152], da hierbei auch Keime aus der Tiefe des Gewebes nachgewiesen werden können und die Gefahr einer Kontamination durch gut kultivierbare Haut- oder Speichelkeime reduziert wird. Der Mikrobiologe sollte vorab darüber informiert werden, dass es sich bei dem Probenmaterial nicht um einen gewöhnlichen banalen Abszess handelt, sondern um einen diagnostisch und therapeutisch schwierigen Fall und dass das Ergebnis der Untersuchung möglicherweise entscheidenden Einfluss auf die Therapie haben könnte. Aus den voran gegangenen Kapiteln geht hervor, dass mikrobiologische Untersuchungen bei odontogenen Infektionen Limitationen haben, die im Weiteren noch eingehender diskutiert werden sollen. Dennoch ermöglicht die mikrobiologische Untersuchung meist die Identifikation von klassischen pyogenen Bakterien wie zum Beispiel von *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* oder *Pseudomonas aeruginosa*, die dann möglicherweise ein vollkommen anderes Resistenzprofil gegenüber Antibiotika zeigen, als dies bei typischen odontogenen Infektionen zu erwarten wäre [12]. Die Untersuchungen sind daher wichtig, um zwischen endogenen Infektionen aus dem oralen Mikrobiom und exogenen Infektionen mit klassischen Krankheitserregern unterscheiden zu können. Leider ist jedoch zu vermuten, dass viele mikrobiologische Untersuchungen, wie von Bertrand et al. beschrieben, nur eine Kontamination durch Streptokokken aus der Mundhöhle [56] oder Staphylokokken von der Haut nachweisen [151], so dass häufig eine Situation entstehen kann, in der zwar ein „schuldiger Keim“ mit zugehörigem Antibiogramm bestimmt wird, dieser aber eventuell gar nicht ursächlich für die eigentliche Erkrankung ist. Alle Untersuchungsergebnisse sollten daher in der Zusammenschau und mit Vorsicht interpretiert werden. Es hat sich in diesem Zusammenhang sehr bewährt, dies

interdisziplinär in einem Infektionsboard durchzuführen. Nur auf diese Weise ist es möglich, das oft komplexe Fachwissen aus der Infektiologie, der Mikrobiologie, der Pharmakologie, der Radiologie und der Chirurgie gemeinsam zu erörtern und zur Anwendung zu bringen. Die folgende Graphik stellt einen Vorschlag für das Vorgehen bei atypisch verlaufenden odontogenen Infektionen dar (Abbildung 3).

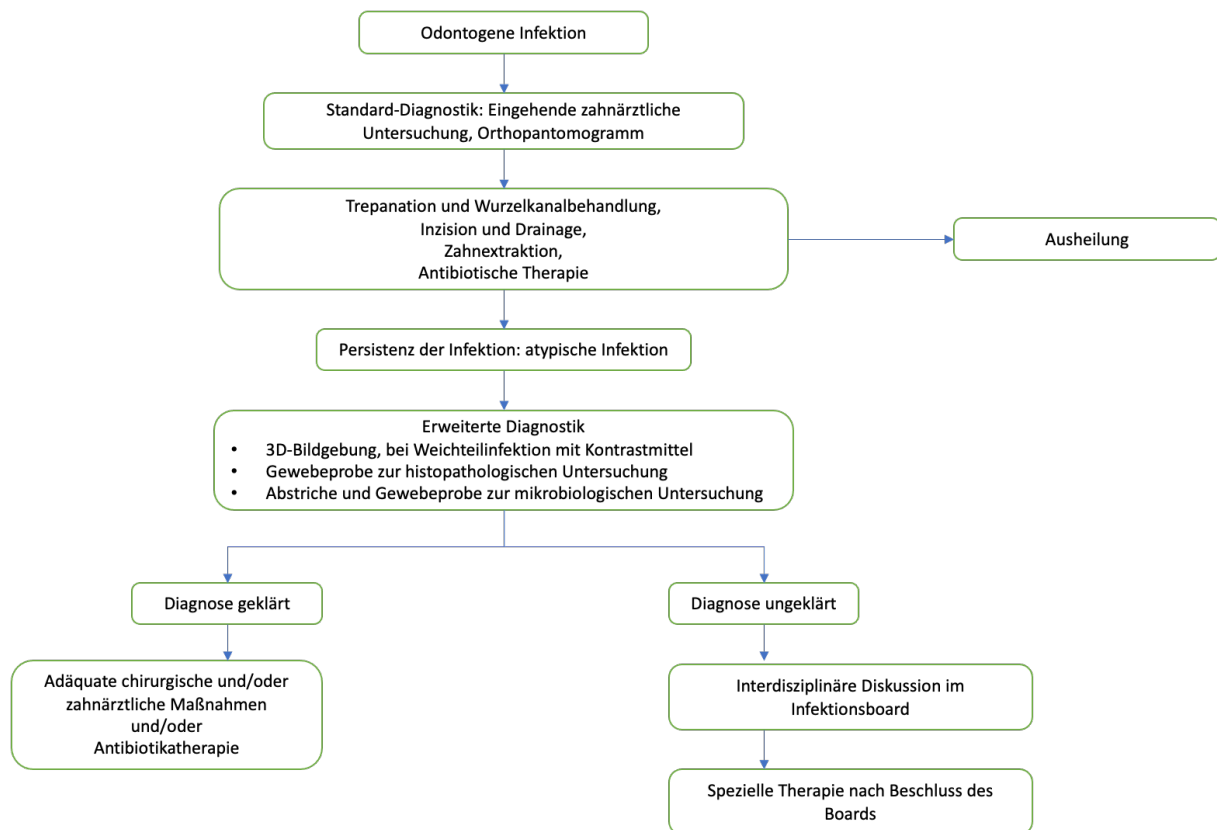


Abbildung 3: Flussdiagramm zur Differenzierung zwischen typischer und atypischer odontogener Infektion.

7.2. Limitationen der mikrobiologischen Diagnostik

Odontogene Infektionen kommen in der täglichen klinischen Praxis sehr häufig vor [12]. Vor allem in den Kliniken werden bei Inzisionen von odontogenen Abszessen häufig Abstriche entnommen und zur mikrobiologischen Untersuchung eingesandt [12]. Diese mikrobiologische Untersuchung wird wie zuvor beschrieben in aller Regel zunächst mit den bewährten Verfahren einer aeroben und einer anaeroben Kultur durchgeführt. Am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Giessen wird diese im Falle von odontogenen Infektionen mittels Columbia-Blutagar,

Chocolate-Blutagar, McConkey-Agar, Sabouard-Glucose-Agar, Schaedler/Schaedler-KV-Agar (Biplatte), und Thioglykollat-Medium durchgeführt. Die Medien werden bei 37 °C bebrütet und nach 24 und 48 Stunden abgelesen [151]. Die bakterielle Identifikation der kultivierten Bakterien wird dann mit dem MALDI-TOF-System durchgeführt und die antimikrobielle Resistenztestung erfolgt automatisiert (Vitek 2, Biomérieux, Nürtingen, Deutschland) oder mittels Agardiffusionstest und E-Test-Streifen gemäß den EUCAST-Standards [151]. Wie zuvor bereits beschrieben, beschreibt diese standardisierte Vorgehensweise in Anlehnung an die Henle-Koch-Postulate eine Suche nach mindestens einem oder mehreren krankheitsauslösenden „schuldigen Bakterien“, für die entsprechend ein Antibiogramm ermittelt werden soll. Man kann daher durchaus die Frage stellen, ob diese Postulate auch für die endogene Infektion eines odontogenen Entzündungsgeschehens gelten. Demnach gilt ein Erreger dann als ursächlich für eine Erkrankung, wenn der Erreger zeitgleich mit der Erkrankung auftritt, außerhalb des Körpers kultiviert werden kann und die Inokulation des Erregers im Tierversuch wiederum die Krankheit auslöst [66]. Siquera und Roças beschrieben in ihrer Arbeit, dass odontogene Infektionen in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle durch eine überwiegend anaerobe pathologische bakterielle Gemeinschaft ausgelöst werden [153], was durch zahlreiche Autoren bestätigt werden konnte [18,82,110]. Dabei kann die bakterielle Zusammensetzung bei vollkommen identischem Krankheitsbild aber ganz unterschiedlich ausfallen [112]. Auch wenn die hier untersuchten Mikrobiome odontogener Abszesse zeigen, dass bestimmte Pathogene, wie zum Beispiel die Bakterien der Gattung *Prevotella*, gehäuft und relativ konstant vorkommen, so ist jedoch kein Pathogen durchgehend in allen Abszessen vorhanden oder zur Ausbildung eines odontogenen Abszesses zwingend notwendig [112,151]. Das erste Postulat ist damit also nur bedingt erfüllt. Ferner kann bei Weitem nicht angenommen werden, dass alle Bakterien aus odontogenen Abszessen auch außerhalb des Körpers kultiviert werden können [87]. Der im Rahmen dieser Arbeit angefertigte Vergleich zwischen Abszess-Mikrobiom und parallel angefertigter Kultur zeigt eindeutig, dass von den tatsächlich im Abszess

vorhandenen Bakterien mit der in der Klinik gebräuchlichen kulturellen Analyse nur ein Bruchteil der tatsächlich vorhandenen Bakterien nachgewiesen wird [151]. Zudem kann bezweifelt werden, dass die kulturell nachgewiesenen Bakterien auch tatsächlich immer die sind, die für die Ausbildung des Abszesses verantwortlich sind [16]. In zahlreichen mikrobiologischen Untersuchungen zu odontogenen Abszessen werden zum Beispiel immer wieder alpha-hämolysierende Streptokokken nachgewiesen und für die Ausbildung der Abszesse verantwortlich gemacht [16]. Tatsächlich spielt aber die Gattung *Streptococcus* in den Mikrobiomen meist nur eine untergeordnete Rolle, so dass viel mehr, wie von Eckert et al. und vielen anderen Autoren beschrieben, empfindliche obligat anaerobe Gattungen wie *Peptostreptococcus*, *Parvimonas*, *Prevotella*, *Porphyromonas* und *Fusobacterium* als „schuldige Keime“ in Erwägung gezogen werden müssen [16,18,82]. Diese sind jedoch aufgrund ihrer Empfindlichkeit nur schwer kultivierbar und werden möglicherweise von den schnell wachsenden Streptokokken in der Kultur verdrängt [16]. Schon Lewis et al. haben mit Ihrer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 1990, lange vor der Epoche des Next-Generation-Sequencing, darauf hingewiesen, dass das Ergebnis der Kultur bei odontogenen Infektionen wesentlich von der Qualität der Probengewinnung abhängig ist. Sie konnten zeigen, dass bei prospektiven Studien mit einer kontaminationsarmen Aspiration von Eiter, einem raschen Proben transport und einer streng anaeroben Arbeitsweise eine deutliche Prädominanz von Anaerobiern nachgewiesen werden konnte, während bei retrospektiven Untersuchungen mit Abstrichen vorwiegend Viridans-Streptokokken und Staphylokokken nachgewiesen wurden [16]. Der hier durchgeführte Vergleich zwischen dem Abszess-Mikrobiom und der kulturbasierten klinischen Analyse unterstreicht diese Annahme eindrucksvoll [151]. Siquera und Roças haben in ihrer Arbeit aus dem Jahr 2013 beschrieben, dass die Vielzahl der in odontogenen Abszessen vorhandenen Bakterien für die kulturelle Analyse ein Problem darstellt [18]. Viele Bakterien sind zum Beispiel auf spezielle Nährmedien oder auf das Vorhandensein und die Stoffwechselprodukte von anderen Spezies angewiesen [18]. Andere wiederum werden durch ihre leichter kultivierbaren

Konkurrenten verdrängt [18]. Auf der Basis von Untersuchungen mit molekularen Methoden schätzten sie daher, dass etwa 40 bis 70% der oralen Bakterien zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgreich kultiviert und phänotypisch charakterisiert wurden [18]. Ein gutes Beispiel für einen schwer kultivierbaren Keim stellt *Filifactor alocis* dar [154,155]. Dieser Keim wurde erst 1999 mit Hilfe der 16S-rRNA-Analyse in eine eigene Gattung eingeordnet [156] und sein pathologisches Potential vor allem in Hinblick auf parodontale Erkrankungen wurde erst in den letzten 10 Jahren vollständig erkannt und beschrieben [154,155]. Im Mikrobiom der odontogenen Abszesse konnte die Gattung *Filifactor* immerhin mit der zehngrößten relativen Häufigkeit identifiziert werden [112], während sie in kulturbasierten Analysen bislang gar keine Rolle spielte [16,82]. Siquera und andere Autoren wiesen daher stets auf die mögliche Bedeutung der bislang noch vollkommen unkultivierten oralen Bakterien in Hinblick auf die Ausbildung odontogener Entzündungen hin [87,89,155] und hoben die Bedeutung der Bakterienidentifikation auf der Basis von molekularen Methoden deutlich hervor [18]. Aus den beschriebenen Gegebenheiten wird deutlich, dass eine vollständige Identifikation der an einer odontogenen Entzündung beteiligten Bakterien mit den gegenwärtigen kulturbasierten Methoden eher eine Illusion darstellt und das Postulat der Anzucht der „schuldigen Krankheitserreger“ außerhalb des Körpers daher keinesfalls erfüllt ist [18]. Interessant ist ferner, dass die Inokulation von Kulturen aus odontogenen Abszessen in Tierversuchen nur dann eine Infektion auslösen konnte, wenn darin schwarz pigmentierte gramnegative Anaerobier (zum Beispiel *Prevotella melaninogenica*) enthalten waren [16]. Wenn diese Bakterien jedoch isoliert inokuliert wurden, dann konnte keine tierexperimentelle Infektion ausgelöst werden [16]. Dies deutet wiederum darauf hin, dass beim odontogenen Abszess nicht ein einzelnes „schuldiges“ Bakterium, sondern die Gesamtheit der darin enthaltenen Bakterien mit Ihren Fähigkeiten als pathogen betrachtet werden müssen [18]. Siquera und Roças beschreiben dies in Ihrer Übersichtsarbeit als „The Community-as-Pathogen Concept“ [18]. Demnach kann die Virulenz eines bestimmten Bakteriums in der Reinkultur völlig anders sein als in einer großen bakteriellen Gemeinschaft, wo sich bestimmte

Pathogenitätsfaktoren synergistisch aufaddieren können [18]. Ein für sich allein nicht virulenter Keim kann somit mit seinen Fähigkeiten einen wesentlichen Baustein in der Virulenz der gesamten bakteriellen Gemeinschaft liefern [18]. Wenn aber nur die gesamte bakterielle Gemeinschaft in der Lage ist, eine Infektion auszulösen, dann ist auch das dritte Postulat, nach dem die Inokulation eines Erregers im Tierversuch eine Infektion auslösen muss, nur bedingt erfüllt. Für die an die Henle- und Koch-Postulate angelehnte kulturbasierte Analyse der klinischen Routine bedeutet dies, dass die aus ihr resultierenden Ergebnisse stets mit Vorsicht interpretiert werden müssen. So ist es zum Beispiel durchaus denkbar, dass bei einer intraoralen Abszess-Inzision der Abstrich des Eiters das gleiche Kulturergebnis liefert, wie ein Abstrich der Mundschleimhaut auf der gesunden Gegenseite. Die starke Prädominanz der Streptokokken wird mit großer Wahrscheinlichkeit in beiden Kulturen zur Identifikation von alpha-haemolysierenden Streptokokken zusammen mit einigen weiteren Bakterien der Mundhöhle führen, ohne jedoch, dass dadurch wirklich ein „schuldiger“ Keim identifiziert wird. Um die bakterielle Zusammensetzung odontogener Infektionen wirklich ergründen zu können, müssen wie von Siquera und Roças vorgeschlagen molekulare Untersuchungsmethoden eingesetzt werden, da dies durch eine primär kulturbasierte Analyse nicht vollständig bewerkstelligt werden kann. Zum Einsatz kommen könnten an dieser Stelle erregerspezifische PCR-Techniken [19] oder die im Rahmen dieser Arbeit verwendete 16S-rRNA-Gen-Analyse. Vor dem Hintergrund der im Normalfall gut behandelbaren odontogenen Infektionen würde sich dann aber die Frage stellen, ob die bislang verwendete kulturbasierte Analyse dann überhaupt noch zur Anwendung gebracht werden sollte.

7.3. Sinnvolle Anwendung der mikrobiologischen Diagnostik

Farmahan et al. beschreiben in ihrer Untersuchung aus dem Jahr 2014, dass es üblich ist, zumindest bei im Krankenhaus behandelten Patienten mit ausgedehnten odontogenen Infektionen Abstriche des Eiters zur Bakterienidentifikation und zur Erstellung eines Antibiotogramms zu entnehmen [31]. Zu der gleichen Einschätzung

kommen auch Fowell et al., die die Probengewinnung für die mikrobiologische Kultur und Resistenztestung bei Abszess-Inzisionen als gängige chirurgische Praxis beschreiben [30]. Die deutsche Leitlinie zur Behandlung odontogener Infektionen sieht eine Erregerbestimmung ausdrücklich nur für odontogene Infektionen mit einer Ausbreitungstendenz vor, wobei die Erregerdiagnostik intraoperativ angestrebt werden kann, um bei Bedarf auf eine gezielte Antibiotikatherapie wechseln zu können [12]. Eine Erregerbestimmung bei odontogenen Infektionen ohne Ausbreitungstendenz wird hingegen nicht empfohlen, da hier, sofern keine Risikofaktoren vorliegen, zusätzlich zur chirurgischen Therapie auch keine antibiotische Therapie empfohlen wird [12]. Eine aktuelle Übersichtsarbeit über kalkulierte Antibiotikatherapien im Kopf-Hals-Bereich beschreibt, dass für unkomplizierte odontogene Infektionen in der zahnärztlichen Praxis ein Erregernachweis nicht sinnvoll zu fordern ist [150]. Bei schweren odontogenen Infektionen mit Ausbreitungstendenz und dem Risiko von lokalen und systemischen Komplikationen, die intravenös antibiotisch therapiert werden müssen, sei der Erregernachweis jedoch unverzichtbar, da die Therapie im Falle einer Ausbreitung oder Komplikation dann gezielt angepasst werden könne [150]. Fowell et al. führten zu diesem Thema eine retrospektive Untersuchung an 79 stationär behandelten Patienten mit odontogenen Abszessen durch, die in Allgemeinanästhesie behandelt wurden [30]. Bei 62 Patienten wurde hierbei eine kulturbasierte mikrobiologische Untersuchung veranlasst, die in 86,2% der Fälle ein Ergebnis erbrachte [30]. Wie in vielen Studien zuvor wurden am häufigsten Viridans-Streptokokken nachgewiesen, wobei der erste Bericht im Mittel erst nach 3,25 Tagen übermittelt wurde, während aber fast 90% der Patienten bereits bis zum zweiten postoperativen Tag entlassen wurden [30]. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass die mikrobiologische Untersuchung damit keinen therapeutischen Wert habe und verzichtbar sei [30]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Farmahan et al. [31]. In dieser retrospektiven Studie an 90 Patienten wurden 72 Proben einer kulturbasierten mikrobiologischen Analyse zugeführt, wobei eine Keimbestimmung in 85% der Fälle gelang. Auch hier wurden

überwiegend Viridans-Streptokokken nachgewiesen. Wie in der Studie von Fowell et al. wurde der mikrobiologische Bericht im Durchschnitt nach drei Tagen zur Verfügung gestellt, während die mittlere Verweildauer im Krankenhaus aber nur bei zwei Tagen lag [31]. Da knapp 95% der Patienten bereits vor dem Vorliegen des Ergebnisses aus dem Krankenhaus entlassen werden konnten, folgerten die Autoren, dass die mikrobiologische Kultur bei odontogenen Infektionen von geringem therapeutischem Wert sei und man bei unkomplizierten Verläufen mit nur einer betroffenen Loge ganz auf die mikrobiologische Untersuchung verzichten könne [31]. Zusammenfassend lässt sich damit feststellen, dass bei einer ambulanten Behandlung von odontogenen Abszessen keine mikrobiologische Untersuchung gefordert wird, während die Empfehlungen bei stationär therapierten Patienten von verzichtbar über möglich bis hin zu obligat reichen. Wenn man die oben beschriebenen Limitationen der mikrobiologischen Analyse bei odontogenen Infektionen mit in Betracht zieht, erscheint sie tatsächlich auch bei den stationären Fällen eher verzichtbar zu sein. Wie von Stephanopoulos beschrieben können bei odontogenen Infektionen typischerweise obligat anaerobe gram-positiven Kokken (*Peptostreptococcus*, *Parvimonas*), obligat anaerobe gram-negativen Stäbchen (*Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*) und fakultativ anaerobe Streptokokken in verschiedenen Zusammensetzungen nachgewiesen werden [110], ohne dass dabei jedoch eine umfassende und vollständige Bakterienbestimmung auch nur angenommen werden kann [151]. Die Arbeiten „Microbiome of Odontogenic Abscesses“ und „Clinical Relevance of the Microbiome in Odontogenic Abscesses“ zeigen sehr gut, dass die Anzahl der tatsächlich vorhandenen Bakterien in den meisten Fällen viel größer ist, als man auf der Basis der kulturellen Analyse allein annehmen würde und dass die bei odontogenen Infektionen so häufig nachgewiesenen Staphylokokken sehr wahrscheinlich eher Kontaminationen von der Haut der Inzisionsstelle als ursächliche Krankheitserreger sind [151]. Auch für die etwa 10% bis 15% der Fälle, in denen die Kultur gar kein Bakterienwachstum zeigte, deuteten die molekularen Untersuchungen darauf hin, dass diese Abszesse keineswegs als steril angesehen werden können [151].

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass die kulturbasierte Bakterienidentifikation bei odontogenen Infektionen in vielen Fällen nicht nur zu langsam, sondern auch unvollständig und kontaminationsbedingt fehlerhaft ist.

In Hinblick auf ihren wichtigsten Zweck, der Resistenztestung gegenüber Antibiotika, kann dies Folgen haben, die man bei der Interpretation von mikrobiologischen Befunden stets berücksichtigen sollte. So muss zum Beispiel der Nachweis einer Resistenz einer bakteriellen Spezies gegenüber einem Antibiotikum noch lange nicht bedeuten, dass auch zwingend die gesamte bakterielle Gemeinschaft der Infektion eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum besitzen muss. Wenn die resistente Bakterienspezies auf das Vorhandensein von anderen, kulturell zwar nicht nachgewiesenen Bakterien angewiesen ist und diese aber empfindlich sind, so kann das Antibiotikum trotz der nachgewiesenen Resistenz in vollem Umfang wirksam sein, wenn die symbiontische Gemeinschaft durch das Absterben der empfindlichen Mitglieder zusammenbricht. Umgekehrt bedeutet eine Bakterienidentifikation ohne den Nachweis von Resistenzen noch lange nicht, dass sich keine resistenten Bakterien in der zugrunde liegenden bakteriellen Gemeinschaft einer odontogenen Infektion befinden. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass vor allem gramnegative Anaerobier wie zum Beispiel die Gattung *Prevotella* häufig Betalaktamasen ausbilden [17,122]. Wenn man die Zahlen aus der Arbeit „Clinical Relevance of the Microbiome in Odontogenic Abscesses“ betrachtet, sieht man, dass die Gattung *Prevotella* hier in knapp 80% der Fälle Resistenzen gegen Penicillin und in knapp 50% der Fälle gegenüber Clindamycin zeigte [151]. Nachgewiesen wurde die Gattung aber nur in etwa jeder fünften kulturellen Analyse während sie in den Mikrobiomen fast immer in großer Häufigkeit vorhanden war [151]. Man kann also durchaus kalkulieren, dass der kulturelle Nachweis von *Prevotella* möglicherweise in vier von fünf Fällen scheitert. Mit dem fehlenden Nachweis der Gattung kann aber auch die möglicherweise vorhandene Antibiotikaresistenz nicht nachgewiesen werden, so dass die Resistenzproblematik letztlich noch viel größer sein könnte als aktuelle Untersuchungen belegen [17].

Man könnte nun die Frage stellen, warum die Behandlung einer typischen odontogenen Infektion am Ende doch in vielen Fällen so unproblematisch verläuft. Vermutlich gibt es darauf zwei Antworten. Zum einen wird es wie oben beschrieben vermutlich ausreichend sein, wenn genügend viele Mitglieder der bakteriellen Gemeinschaft in der odontogenen Infektion noch empfindlich gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum sind und die symbiontische Gemeinschaft unter der Therapie zusammenbricht und zum anderen hat die Arbeit „Indication for an additional postoperative treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses“ ja eindeutig aufgezeigt, dass selbst bei hospitalisierten Patienten bei adäquater chirurgischer Therapie in vielen Fällen auf eine antibiotische Therapie komplett verzichtet werden kann. Wozu wird aber die mikrobiologische Untersuchung bei odontogenen Infektionen dann überhaupt noch benötigt? Eine gängige Antwort darauf ist die, dass man bei schweren Verläufen die empirische Therapie anhand eines Antibioogrammes nach einigen Tagen gezielt anpassen kann [150], aber auch diese Antwort kann durchaus kritisch hinterfragt werden. Schwere Verläufe sind, wie die Arbeit „Odontogenic cervicofacial necrotizing fasciitis: microbiological characterization and management of four clinical cases“ beschrieben, mit einer korrekten Einschätzung des Risikoprofils (Diabetes mellitus, Immunsuppression, Adipositas, Bisphosphonate, QSOFA-Score, LRINEC-Score) und einer zeitnahen bildgebenden Diagnostik in vielen Fällen frühzeitig zu erkennen, so dass die antibiotische Therapie hier schon zu Beginn der Therapie und vor der Bereitstellung des mikrobiologischen Ergebnisses eskaliert werden kann [24]. Eine spätere Anpassung unter Kenntnis der Resistenz einiger weniger Keime der zugrunde liegenden odontogenen Infektion ist dann möglicherweise gar nicht mehr notwendig. Dennoch sollte die über Jahrzehnte eingesetzte und bewährte Technik der kulturellen Analyse nicht einfach verlassen werden. Bei jeder odontogenen Infektion besteht nämlich das Risiko, dass die Infektion möglicherweise gar keinen odontogenen Ursprung hat, oder einer atypischen odontogenen Infektion entspricht, bei der sich wie in der Arbeit „A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth

Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics“ beschrieben, ein völlig anderes und unerwartetes Keimspektrum als ursächlich ergeben kann. Auch wenn wie oben beschrieben nicht alle möglichen Bakterien mittels einer kulturellen Analyse nachgewiesen werden können, so ist doch unbestritten, dass klassische Krankheitserreger wie zum Beispiel *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* und andere hervorragend mittels der bewährten kulturbasierten Technik nachgewiesen werden können. Insbesondere bei atypischen odontogenen Infektionen können diese Bakterien eine große Rolle spielen und diese Bakterien können dann tatsächlich den Einsatz von völlig anderen Antibiotika erfordern, als sie für eine typische odontogene Infektion sonst empfohlen werden. So kann zum Beispiel in einer offenen Wunde eines bestrahlten Kiefers durchaus ein multiresistenter *Staphylococcus aureus* angetroffen werden oder in den putriden Zahnfleischtaschen eines mit starken Immunsuppressiva behandelten Rheumatikers *Burkholderia cepacia* zu finden sein, wie eigene Erfahrungen mit Fällen von atypischen odontogenen Infektionen zeigen. Der Nachweis des typischen Bildes von alpha-hämolyisierenden Streptokokken in Kombination mit dem Bild einer typischen Rachenflora hilft daher auch ohne die vollständige Identifikation jeder einzelnen Spezies, den odontogenen Ursprung der Infektion abzusichern und die Erkrankung klinisch entsprechend einordnen zu können. Eine darüber hinaus angefertigte Resistenztestung kann im Einzelfall hilfreich sein, sollte aber aus den oben beschriebenen Gründen mit entsprechender Vorsicht interpretiert werden.

Unter dem Gesichtspunkt der Verhältnismäßigkeit der Mittel sollte die einfache kulturbasierte Analyse ohne den Anspruch auf eine vollständige Identifikation aller vorhandenen Bakterien abschließend wie die Bestimmung von Entzündungsparametern und die pathologische Untersuchung von entnommenem Gewebe auch weiterhin zum guten Standard einer stationären Therapie dazu gehören. Sie sollte allerdings für besondere Fragestellungen die Möglichkeit des Einsatzes von zusätzlichen Techniken bereithalten um bei schweren oder atypischen Verläufen

tatsächlich die genaue Zusammensetzung der bakteriellen Gemeinschaft der odontogenen Infektion bestimmen zu können.

7.4. Optimierung der mikrobiologischen Diagnostik

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass odontogene Infektionen durch Erregergemische aus überwiegend anaeroben Bakterien verursacht werden [12,16,110]. Zumindest bei einer typischen odontogenen Infektion kann man daher davon ausgehen, dass die auslösenden Erreger in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle bekannt sind. Vielmehr als die genaue Bestimmung der bakteriellen Zusammensetzung sind für den Kliniker aber die Virulenzfaktoren des Erregergemisches von Bedeutung. Wie oben bereits beschrieben, gibt es zum Beispiel Hinweise, dass gerade Antibiotikaresistenzen zu einem höheren Risiko für einen schweren Verlauf einer odontogenen Infektion führen können [23,122]. In besonderen Fällen, also zum Beispiel bei einem sehr schweren Verlauf oder bei einer absolut atypisch verlaufenden Infektion kann es daher sinnvoll sein, die Bemühungen im Rahmen der mikrobiologischen Diagnostik zu maximieren, um möglichst viele Erkenntnisse über die krankheitserregenden Pathogene zu gewinnen. Diese Bemühung beginnen bereits auf der chirurgischen Seite mit der Gewinnung von mikrobiologischen Proben. In der Arbeit „Clinical Relevance of the Microbiome in Odontogenic Abscesses“ wurden hierzu folgende Vorschläge für die Probengewinnung bei Abszessen unterbreitet [151]:

1. Die Haut (oder Schleimhaut) an der Inzisionsstelle sollte sehr sorgfältig desinfiziert werden: Auf diese Weise kann eine Kontamination durch Staphylokokken von der Haut verhindert werden [157]. Wie von Lewis et al. beschrieben kann die Probenentnahme alternativ auch mittels steriler Punktion erfolgen [16].
2. Anstatt den fließenden Eiter nach der Inzision an der Haut- oder Schleimhautoberfläche abzustreichen, sollte der Abstrich in der Tiefe der

Abszesshöhle genommen werden. Der Eiter selbst stellt ein lebensfeindliches Medium dar und die Wahrscheinlichkeit, lebensfähige Organismen nachzuweisen steigt, wenn statt der Eiterflüssigkeit das native Gewebe in der Tiefe der Abszesshöhle abgestrichen wird, während die Gefahr einer Kontamination von der Hautoberfläche gleichzeitig verringert wird [151].

3. Es sollten statt der herkömmlichen gelbasierten Medien mit Fasertupfern moderne flüssigkeitsbasierte Transportmedien mit geflockten Tupfern verwendet werden (z.B. Copan eSwab®) [152]. Diese Medien ermöglichen einen effektiven Materialabtrag und ausreichendes Überleben auch der anaeroben Bakterien und sie eröffnen zudem die Möglichkeit, aus dem flüssigen Medium der Probe molekularbiologische Bestimmungen wie zum Beispiel eine 16S-rRNA-Gen-Analyse durchzuführen [158].
4. Der Probentransport in das mikrobiologische Labor sollte so rasch wie möglich durchgeführt werden. Hierfür wird eine Transportzeit von weniger als zwei Stunden bei Raumtemperatur als optimal angesehen [152]. Bei längeren Transportzeiten wird eine Kühlung auf 2-4 °C empfohlen [158].

Zusätzlich besteht die Möglichkeit bei chirurgischen Eingriffen Nativgewebe zu entnehmen, was insbesondere bei Verdacht auf Infektionen des knöchernen Gewebes als sinnvoll und der Entnahme eines Abstriches überlegen erscheint [152]. Bewährt hat sich auch die Entnahme von Blutkulturen vor und unmittelbar nach einer chirurgischen Intervention, da die Erreger im Rahmen der chirurgischen oder zahnärztlichen Maßnahmen häufig hämatogen ausgetragen werden und dann möglicherweise in der Blutkultur nachgewiesen werden können. Zudem sollten Blutkulturen bei einem septischen Krankheitsbild immer mit in die Diagnostik miteinbezogen werden.

Auf der Seite des Mikrobiologen bedingen die oben ausführlich erläuterten Limitationen der Diagnostik, dass letztlich kein Verfahren allein dazu in der Lage ist, alle an die mikrobiologische Diagnostik gestellten Fragen zu beantworten. Mit der

kulturellen Analyse in Verbindung mit der MALDI-TOF-Methode allein können bei weitem nicht alle pathogenen Keime einer odontogenen Infektion nachgewiesen werden. Erregerspezifische PCR-Verfahren und die 16S-rRNA-Gen-Analyse können zwar kulturunabhängig Bakterien der Infektion identifizieren, sie ermöglichen jedoch keine direkte Aussage über das Resistenzprofil in einer odontogenen Infektion. Wie von Miller et al. beschrieben ist es daher für den Kliniker wichtig, dem mikrobiologischen Labor möglichst viele Informationen über das Krankheitsbild und den Entnahmeort von Probenmaterial zukommen zu lassen, damit der Mikrobiologe aus der Vielzahl der möglichen Untersuchungsmethoden die geeigneten Verfahren zur Anwendung bringen kann [152]. Im Falle einer hochakuten odontogenen Infektion sollte das erste Ergebnis der mikrobiologischen Analyse dann nicht primär die Bestimmung einzelner Keime mit eigenem Resistenzprofil, sondern vielmehr eine möglichst rasche Empfehlung eines passenden Antibiotikums gegen die Gesamtheit der zugrunde liegenden bakteriellen Gemeinschaft sein. Da die begleitende antibiotische Therapie bei akuten odontogenen Infektionen meistens einem bestimmten Standard folgt, wäre für den Kliniker auch schon die bloße Information hilfreich, dass die möglicherweise bereits kalkuliert zur Anwendung gebrachten Antibiotika, wie etwa Ampicillin mit Sulbactam oder Clindamycin [12], zielführend sind oder nicht. Wie von Schuetz beschrieben, könnte hier möglicherweise die Anwendung der einfach zu handhabbaren MIC-Gradientendiffusionsmethode mittels antibiotika-spezifischer E-Teststreifen eine mögliche Verbesserung der mikrobiologischen Diagnostik für den Kliniker bringen, da hier schon spätestens nach 48 Stunden Inkubation eine Aussage über mögliche Resistenzen getroffen werden kann [159] (Abbildung 4). Das primäre Ergebnis würde dann nur in der Auskunft bestehen, dass die bakterielle Gemeinschaft gegenüber den verwendeten Antibiotika sensibel ist oder nicht, und die klinische Konsequenz wäre eine Fortführung der bisherigen antibiotischen Therapie oder aber eine Eskalation auf Reserveantibiotika.

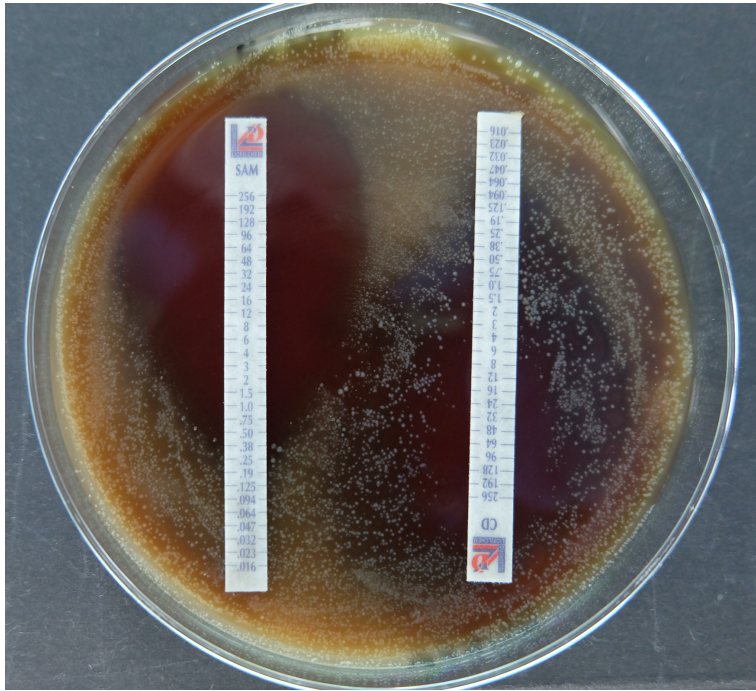


Abbildung 4: Bild einer gemischten Kultur mit E-Test-Streifen. Die Hemmhöfe bei höheren Konzentrationen zeigen, dass beide Antibiotika (SAM: Ampicillin mit Sulbactam; CD: Clindamycin) wirksam sind.

Bei atypischen Infektionen und bei ausgedehnteren Infektionen ist es ansonsten angezeigt, das Maximum dessen, was die kulturbasierte Analyse an Information über die zugrunde liegenden Pathogene liefern kann, auch zu ermitteln. Die Arbeit „Odontogenic Cervicofacial Necrotizing Fasciitis: Microbiological Characterization and Management of Four Clinical Cases“ zeigt wie andere Untersuchungen auch, dass die Verweildauer im Krankenhaus bei ausgedehnteren odontogenen Infektionen mehr als 20 Tage betragen kann [160]. In derartigen Fällen können dann selbstverständlich auch Informationen, die erst nach mehreren Tagen zur Verfügung gestellt werden, von großer therapeutischer Konsequenz sein [150]. Bei chronisch verlaufenden atypischen Infektionen, bei denen die Ursache der nicht abheilenden Entzündung oft unklar ist, empfiehlt es sich wie oben beschrieben den Patientenfall im Rahmen eines Infektionsboards interdisziplinär zu besprechen und vorab Vereinbarungen über zu entnehmendes Probenmaterial zu treffen. Insbesondere bei knöchernen Proben stellt die von Bertrand et al. beschriebene Kontaminationsgefahr der Proben durch die physiologische Mundflora eine große Gefahr dar [56], so dass derartige Proben nur nach sorgfältigster Desinfektion der Schleimhäute oder von extraoral aus entnommen

werden sollten. Auch sollte, wie oben bereits beschrieben, in einer solchen Situation eine Nativgewebsprobe den Abstrichen des Gewebes vorgezogen werden [152]. Insbesondere bei Verdacht auf eine Osteomyelitis wird statt der Abstrich-Entnahme die Gewinnung von möglichst großen Knochenstücken und Knochenspänen oder die Aspiration von nekrotisch zerfallenem Knochen empfohlen [152].

Unabhängig von der kulturbasierten Analyse sollten aber zukünftig die kulturunabhängigen molekularbiologischen Verfahren in größerem Ausmaß eingesetzt werden. Dies gilt insbesondere dann, wenn die kulturelle Analyse die Ursache einer odontogenen Infektion nicht klären kann. Die hier vorgestellten Arbeiten zur molekularbiologischen Bakterienidentifikation mit Hilfe der 16S-rRNA-Gen-Analyse zeigen sehr deutlich, dass eine vollständig kulturunabhängige Analyse zusätzlich zur Kultur nicht nur ein sehr viel umfassenderes Bild der bakteriellen Zusammensetzung liefern kann, sondern wie im Falle der Arbeit „A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics“ die Klärung der Ursache überhaupt erst ermöglichen kann.

Dementsprechend wird die 16S-rRNA-Gen-Analyse bereits auch in anderen medizinischen Disziplinen dann zur Anwendung gebracht, wenn die Kultur die Ursache einer entzündlichen Erkrankung allein nicht klären kann [161]. Fida et al. berichteten, dass in Ihrer Untersuchung in etwa 10% der kultur-negativen Infektionen mit Hilfe der 16S-rRNA-Gen-Analyse noch ein potentielles Pathogen identifiziert werden konnte [161]. Sie schlussfolgerten daher, dass die 16S-rRNA-Gen-Analyse durchaus eine Rolle bei der diagnostischen Evaluation von Patienten spielen kann und zwar insbesondere bei kardiovaskulären Infektionen [161]. Rampini et al. zeigten in ihrer Untersuchung an 394 mikrobiologischen Proben eine Konkordanz von über 90% zwischen der bakteriellen Routine-Kultur und der 16S-rRNA-Gene-Analyse bei gemischten Proben [162]. In 24 Fällen konnte in dieser Arbeit die molekulare Analyse noch einen Keimnachweis trotz eines kultur-negativen Ergebnisses erbringen und die Autoren wiesen diesbezüglich darauf hin, dass in den meisten dieser Fälle eine

antibiotische Vorbehandlung stattgefunden hatte [162]. Sie empfahlen daher die Anwendung der 16S-rRNA-Gen-Analyse insbesondere dann, wenn ein klinischer Verdacht auf schwer kultivierbare Erreger besteht, bereits Antibiotika verabreicht wurden und kein artenspezifischer molekularer Test zur Verfügung steht [162]. Gerade aber diese Konstellation besteht vermutlich bei fast allen ausgedehnten und atypischen odontogenen Infektionen. Die meisten Bakterien einer odontogenen Infektion sind als Anaerobier schwer oder gar nicht kultivierbar [18,87,159,163,164] und gerade bei diesen Infektionen hat oft schon eine antibiotische Vorbehandlung stattgefunden bevor die Patienten in einer Klinik behandelt werden. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die 16S-rRNA-Gen-Analyse gerade bei den odontogenen Infektionen ein so viel umfangreiches Bild der bakteriellen Zusammensetzung liefert als die gut etablierte Kultur [151,164]. Artenspezifische molekulare Tests wurden bei odontogenen Infektionen ebenfalls erfolgreich eingesetzt [19]. Sie haben aber als geschlossene Verfahren den Nachteil, dass man eben nur solche Erreger identifizieren kann, die bereits bekannt sind und in der Infektion vermutet werden [18]. Derartige Verfahren werden heute vor allem kommerziell zur Bakterienidentifikation in der Parodontologie eingesetzt [15,165]. Dazu werden sterile Papierspitzen mit der Flüssigkeit aus parodontalen Taschen getränkt und anschließend im Labor auf erregerspezifische Nukleinsäuren getestet [165]. Der molekulare Nachweis von sogenannten Marker-Keimen zeigt dann ein erhöhtes Risiko bezüglich eines progredienten Attachment-Verlustes des Zahnhalteapparates an und es werden therapeutische Entscheidungen von den Testergebnissen abgeleitet [165,166]. Die Marker-Keime sind im Wesentlichen in den häufig zitierten mikrobiologischen Komplexen nach Socransky enthalten [111], die ebenfalls auf der Basis von geschlossenen molekularen Verfahren definiert wurden [111]. Die Arbeit „Microbiome of Odontogenic Abscesses“ zeigt, dass vermutlich viele dieser Bakterien auch bei odontogenen Infektionen, die vom Apex ausgehen, eine große Rolle spielen [112]. So konnten fast 90% des medianen Mikrobioms direkt oder indirekt über die Bakteriengattung mit dem roten oder dem orangenen Komplex assoziiert werden [112].

Es ist also zu vermuten, dass die für parodontale Taschen entwickelten molekularen Testsysteme auch bei odontogenen Abszessen viele Marker-Keime nachweisen würden, wenn sie hier zur Anwendung gebracht würden. Es wäre sogar durchaus denkbar, dass die molekularen Tests aufgrund der oben beschriebenen Limitationen deutlich mehr Bakterien nachweisen als die in den Kliniken etablierte kulturelle Analyse. Die alleinige Kenntnis der vorhandenen Keime würde jedoch bei vom Apex ausgehenden odontogenen Infektionen wenig hilfreich sein, da hier bislang keine bakteriellen Gemeinschaften - ähnlich den parodontalen Marker-Keimen - definiert wurden, die mit einem höheren Risiko der Erkrankung einhergehen würden. Hierzu müssten erst weitere umfangreiche Studien mit offenen Verfahren wie zum Beispiel der 16S-rRNA-Gen-Analyse durchgeführt werden, um auf einer möglichst großen Datenbasis dann die Erkennung von tatsächlichen bakteriellen Risikokonstellationen zu ermöglichen. Auf diese Weise könnten dann molekulare Tests für akute apikale Entzündungen entwickelt werden, die anhand der identifizierten Keime ein erhöhtes Risiko für einen schweren Krankheitsverlauf anzeigen könnten. Eine direkte Schlussfolgerung bezüglich einer Resistenz gegenüber Antibiotika würde damit aber auch noch nicht möglich sein. Hierzu müssten die molekularen Tests statt auf die Erkennung von erregerspezifischen DNA-Sequenzen auf die Erkennung von Resistenzgenen ausgerichtet werden, so wie es bereits für einige Spezies beschrieben wurde [167-169]. Das Vorhandensein dieser Resistenzgene in odontogenen Infektionen müsste wiederum mit dem klinischen Verlauf und den Ergebnissen der kulturellen Analysen korreliert werden. Ebenso könnten die molekularen Tests auf das Vorhandensein von Genen für andere Virulenzfaktoren wie etwa Proteinasen, Sekretionssysteme und Toxine ausgerichtet werden. Zhang et al. beschreiben in ihrer Untersuchung über die Genomanalyse von *Prevotella intermedia* und *Prevotella nigrescens* mittels Next-Generation-Sequencing, dass die Genome der in odontogenen Infektionen so häufig vorhandenen Bakterien hoch dynamisch sind und dass die Spezies zahlreiche Virulenzfaktoren durch horizontalen Gentransfer aufnehmen können [170]. Isolate von parodontal erkrankten Zähnen zeigten dabei

deutlich mehr Virulenzfaktoren als Isolate von Zähnen mit gesundem Zahnhaltapparat [170]. Dies deutet an, dass die genetische Bestimmung von Virulenzfaktoren zukünftig möglicherweise eine wichtigere Rolle spielen könnte, als die Identifikation der Bakterien selbst. Willis und Gabaldón geben in ihrer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2020 eine gute Übersicht über die aktuellen Entwicklungen auf diesem Gebiet [97]. Während die 16S-rRNA-Gene-Analyse im Rahmen der Bestimmung von Mikrobiomen hauptsächlich der Identifikation von Bakterien dient, wird bei der Metagenom-Analyse das gesamte Genom analysiert [97]. Hierzu wird die vorhandene DNA zunächst fragmentiert, dann massiv parallel sequenziert und mit Hilfe der Bioinformatik wieder zusammengesetzt und ausgewertet [97]. Auf diese Weise wird nicht nur die Frage nach den vorhandenen Bakterien sondern auch die Frage nach den biochemischen Möglichkeiten der Bakterien umfassend untersucht [97]. Durch eine Metatranskriptom-Analyse, bei der exklusiv Messenger-RNA sequenziert wird, kann nachgewiesen werden, welche Gene tatsächlich aktuell zur Proteinbiosynthese verwendet werden [97]. Derartig aufwändige Untersuchungen eignen sich zwar aktuell noch nicht für einen Einsatz in der klinischen Routine, die hierbei entstehenden Erkenntnisse könnten aber in die Entwicklung von molekularen Tests einfließen, die sich dann wiederum wie von Rampini empfohlen in der Routinediagnostik anwenden ließen [162].

7.5. Fazit

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die kulturbasierte Analyse bei odontogenen Infektionen nicht etwa ausgemustert, sondern durch die Möglichkeiten moderner molekularer Diagnostik ergänzt werden sollte. Bei atypischen Infektionen sollte auch heute schon eine möglichst parallel verlaufende molekulare Diagnostik zusätzlich zur Kultur erfolgen, da hier in der Regel ausreichend Zeit für eine intensive Labordiagnostik zur Verfügung steht und die Ergebnisse durchaus therapeutische Konsequenzen, wie zum Beispiel die richtige Auswahl eines Antibiotikums, haben können. Bei akuten Infektionen bleibt für umfangreiche Genomanalysen vermutlich

in den meisten Fällen nicht genügend Zeit für eine intensive Laborarbeit und zumindest bei unkomplizierten typischen Verläufen wird der Aufwand dafür auch gar nicht vertretbar sein. Schnelle Aussagen sollten hier eher klassisch mittels der kulturellen Analyse ermöglicht werden, wobei der Focus der Analyse eher auf der Empfehlung eines passenden Antibiotikums als auf der Bestimmung von einzelnen Bakterien liegen sollte. Die Identifikation von einzelnen Bakterien ist aber auch weiterhin sinnvoll, da neben dem typischen odontogenen Erregerspektrum differentialdiagnostisch durchaus auch andere nicht odontogene Erreger wie zum Beispiel *Streptococcus pyogenes* oder *Staphylococcus aureus* ausgedehnte Infektionen im Kopf-Hals-Bereich auslösen können. Diese Keime sind durch die klassische kulturbasierte Analyse sicher nachweisbar und werden antibiotisch unter Umständen anderes therapiert als eine odontogene Infektion.

Die hier durchgeführten Untersuchungen geben einen tiefen Einblick in die Vielfalt der bei odontogenen Infektionen beteiligten Bakterien. Obwohl sie bereits zu ersten Veränderungen in der mikrobiologischen Diagnostik beigetragen haben, bleibt die Therapie auch weiterhin nahezu unverändert. Typische odontogene Infektionen können durch chirurgische und zahnärztliche Maßnahmen zur Ausheilung gebracht werden. Selbst bei ausgedehnten Logenabszessen bleibt die chirurgische Behandlung der Eckstein der Therapie. Die über 2000 Jahre alte Weisheit von Galen, dass man einen Abszess am besten durch Inzision und Drainage behandelt, gilt auch weiterhin uneingeschränkt. Dennoch sollten die im Rahmen dieser Arbeit begonnen Forschungsaktivitäten auch bei typischen odontogenen Infektionen weiter fortgeführt werden um für die Zukunft tatsächlich schnelle und effektive molekulare Tests in Hinblick auf Resistenzgene und Virulenzfaktoren entwickeln zu können, die man zusätzlich zur Kultur einsetzen könnte.

Im Dialog und in Kooperation von Klinik und Mikrobiologie können Handlungsabläufe und diagnostische Verfahren weiterentwickelt werden. Der optimierte Einsatz von molekularen Verfahren in Ergänzung zur etablierten Kultur kann dann gezielt diagnostische Lücken schließen und eine effektive Therapie auch in

durchaus schwierigen und teilweise lebensbedrohlichen Krankheitsfällen ermöglichen.

8. Zusammenfassung

Odontogene Infektionen sind sehr häufig und führen im Gesundheitssystem zu beträchtlichen Kosten. Sie lassen sich nach therapeutischen Gesichtspunkten in die sehr häufigen typischen odontogenen Infektionen und die seltenen atypischen Infektionen einteilen. Typische odontogene Infektionen können durch geeignete chirurgische und zahnärztliche Maßnahmen zur Ausheilung gebracht werden, wobei in ausgedehnten Fällen eine adjuvante Verabreichung von Antibiotika angezeigt sein kann. Atypische odontogene Infektionen sind vor allem dadurch gekennzeichnet, dass sie durch die üblichen chirurgischen und zahnärztlichen Maßnahmen auch unter Anwendung von Antibiotika nicht wie gewöhnlich zur Ausheilung gebracht werden können. Solche Infektionen stellen sowohl diagnostisch als auch therapeutisch eine große Herausforderung dar. Ursächlich für odontogene Infektionen sind Bakterien aus der Mundhöhle, so dass es sich um endogene Infektionen aus dem oralen Mikrobiom handelt. Zahlreiche Autoren haben beschrieben, dass die Infektionen durch Erregergemische aus vorwiegend anaeroben und fakultativ anaeroben Bakterien verursacht werden, die häufig nur schwer und unvollständig mit einer kulturbasierten Untersuchung nachgewiesen werden können. Die im Rahmen dieser Habilitationsschrift vorgestellten Arbeiten führen zu einigen Schlussfolgerungen, die zukünftig zu möglichen Veränderungen in der Diagnostik und der Therapie odontogener Infektionen führen könnten:

1. Indication for an additional postoperative treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses [113]:

In einer retrospektiven Studie an 258 Patienten wurde nachgewiesen, dass selbst ausgedehnte typische odontogene Infektionen gut durch eine chirurgische Inzision und Drainage behandelbar sind und in vielen Fällen auch ohne postoperative Verabreichung von Antibiotika gut beherrscht werden können. Die unkritische, automatisierte Verabreichung von Antibiotika, so wie

sie von manchen Autoren empfohlen wird, sollte hingegen kritisch hinterfragt werden.

2. A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics [88]:

Bei therapieresistenten atypischen odontogenen Infektionen kann eine erweiterte mikrobiologische Diagnostik mittels der 16S-rRNA-Gen-Analyse Keime nachweisen, die mit herkömmlichen kulturbasierten Methoden nicht nachweisbar sind. Im konkreten Fall konnte eine Infektion mit den Umweltkeimen *Delftia* und *Alcanivorax* nachgewiesen werden, die vermutlich aus einer kontaminierten dentalen Einheit stammen. Als Konsequenz ist zu fordern, dass Osteotomien von Zähnen zwingend mit sterilem Kühlwasser und nicht mit dem Leitungswasser aus einer zahnärztlichen Einheit durchgeführt werden.

3. Microbiome of Odontogenic Abscesses [112]:

Die im Rahmen dieser prospektiven Arbeit an 50 Patienten mit ausgedehnten odontogenen Infektionen durchgeführten Untersuchungen mit der 16S-rRNA-Gen-Analyse zeigen, dass in odontogenen Abszessen, wie zuvor auch für das orale Mikrobiom beschrieben, viel mehr Bakterien nachweisbar sind, als man auf der Basis der kulturellen Analyse allein erwarten würde. Während in der Kultur meist zwei bis drei Bakterienspezies nachgewiesen werden, sind im Mikrobiom eines odontogenen Abszesses im Durchschnitt etwa 30 Bakteriengattungen in verschieden großer relativer Häufigkeit nachweisbar. Darunter befinden sich bekannte Gattungen wie *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Parvimonas* und *Streptococcus* aber auch bislang weniger mit odontogenen Abszessen assoziierte Gattungen wie *Veillonella*, *Mogibacterium*, *Filifactor*, *Alloprevotella* und *Slackia*.

4. Clinical Relevance of the Microbiome in Odontogenic Abscesses [151]:

In dieser prospektiven Untersuchung an 48 Patienten mit ausgedehnten odontogenen Infektionen wurde ein direkter Vergleich zwischen der kulturbasierten Analyse aus der klinischen Routine mit den korrespondierenden Mikrobiomen durchgeführt. Die Untersuchung zeigt, dass die Kultur bei odontogenen Infektionen offensichtlich nicht geeignet ist, die Vielfalt der tatsächlich im Abszess vorhandenen Bakterien darzustellen. Statt der zahlreichen empfindlichen anaeroben Organismen werden wie in vielen älteren Studien zuvor vor allem die leicht kultivierbaren Gattungen *Streptococcus* und *Staphylococcus* nachgewiesen, obwohl diese bei simultaner Betrachtung der zugehörigen Mikrobiome oft nur eine untergeordnete oder keine Rolle im odontogenen Abszess spielen. Dies sollte den klinisch Behandelnden bei der Interpretation von kulturbasierten mikrobiologischen Befunden bewusst sein.

5. Odontogenic Cervicofacial Necrotizing Fasciitis: Microbiological Characterization and Management of Four Clinical Cases [160]:

In dieser retrospektiven Untersuchung wurden vier Behandlungsfälle des seltenen, aber überaus lebensbedrohlichen Krankheitsbildes einer nekrotisierenden zervicofazialen Faszitis beschrieben und mikrobiologisch mittels Kultur und molekularer Methoden charakterisiert. Wie der odontogene Abszess, so stellt auch die odontogene nekrotisierende Faszitis eine polymikrobielle, endogene Infektion dar, die vorwiegend durch anaerobe Bakterien aus dem oralen Mikrobiom verursacht wird. Ein einzelnes „schuldiges“ Bakterium, welches für den nekrotisierenden Verlauf der Infektion verantwortlich gemacht werden könnte, konnte auch mit Hilfe der 16S-rRNA-Gen-Analyse nicht identifiziert werden. Damit kann vermutet

werden, dass eher das Vorhandensein von bestimmten Virulenzfaktoren als das Vorhandensein einer bestimmten bakteriellen Spezies für den nekrotisierenden Verlauf der Erkrankung ausschlaggebend ist. Therapeutisch ist die frühzeitige, sehr radikale chirurgische Entfernung des gesamten nekrotischen Gewebes entscheidend für den Therapieerfolg und das Überleben der Patienten.

Obwohl odontogene Infektionen klinisch in den aller meisten Fällen gut beherrschbar sind, deuten die Ergebnisse der aufgezählten Untersuchungen an, dass die klinische Routinediagnostik gerade bei ausgedehnten und atypischen Krankheitsverläufen deutlich verbessert werden könnte. Der Einsatz der 16S-rRNA-Gen-Analyse in Verbindung mit Next-Generation-Sequencing und Bioinformatik ermöglicht eine Erregerdiagnostik, die vollkommen unabhängig von der kulturbasierten Analyse durchgeführt werden kann. Die Methode kann auch dann noch Ergebnisse liefern, wenn in der Kultur kein Bakterienwachstum mehr nachweisbar ist. Daher sollte diese molekularbiologische Diagnostik die bewährte kulturelle Analyse baldmöglichst auch in der klinischen Routine ergänzen. Ihr zielgerichteter Einsatz sollte wie auch in anderen klinischen Fächern in enger Abstimmung zwischen Mikrobiologie und Klinik erfolgen.

Die Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit können zukünftig einen Beitrag zur Entwicklung von schnellen und kulturunabhängigen molekularen Tests leisten, die vor allem bei schweren Erkrankungsfällen eine frühe Beurteilung der Situation in Hinblick auf eine besondere Virulenz oder eine Antibiotikaresistenz ermöglichen. Aus therapeutischer Sicht wird bei der überwiegenden Mehrzahl der odontogenen Infektionen aber auch zukünftig die über 2000 Jahre alte Weisheit von Galen gelten: „Ubi pus ibi evacua – Wo Eiter ist, dort entleere ihn!“

9. Summary

Odontogenic infections are very common and lead to considerable costs in the healthcare system. According to therapeutic aspects, they can be divided into very frequent typical odontogenic infections and rare atypical infections. Typical odontogenic infections can be cured by appropriate surgical and dental measures, although adjuvant administration of antibiotics may be indicated in extensive cases. Atypical odontogenic infections are rare and characterized primarily by the fact that they cannot be brought to healing by the usual surgical and dental measures, even with the use of antibiotics. Such infections are a great challenge both diagnostically and therapeutically. Odontogenic infections are caused by bacteria from the oral cavity. Thus, they are categorized as endogenous infections from the oral microbiome. Numerous authors have described that these infections are caused polymicrobially by predominantly anaerobic and facultative anaerobic bacteria, which are often difficult to detect by culture-based examination. The studies presented in this postdoctoral thesis led to some conclusions that may change diagnostics and therapy in odontogenic infections in the future:

- 1. Indication for an additional postoperative treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses [113]:**

In a retrospective study involving 258 patients, it was demonstrated that even extensive typical odontogenic infections can be well treated by surgical incision and drainage and in many cases can be well controlled without postoperative administration of antibiotics. However, an uncritical and automated administration of antibiotics, as recommended by some authors, should be critically questioned.

- 2. A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics [88]:**

In therapy-resistant atypical odontogenic infections, advanced microbiological diagnostics using 16S-rRNA-gene-analysis can detect pathogens that are not detectable using conventional culture-based methods. In this specific case, an infection with the environmental bacteria *Delftia* and *Alcanivorax* was detected, which presumably originated from a contaminated dental unit. As a consequence, it should be demanded that osteotomies of teeth are mandatorily performed with sterile cooling water and not with the tap water from a dental unit.

3. Microbiome of Odontogenic Abscesses [112]:

The results of this prospective study on 50 patients with extensive odontogenic infections using 16S-rRNA-gene-analysis show that, as previously described for the oral microbiome, many more bacteria are detectable in odontogenic abscesses than would be expected on the basis of cultural analysis alone. While two to three bacterial species are usually detected in culture, an average of about 30 bacterial genera are detectable in the microbiome of an odontogenic abscess in varying relative abundance. These include well-known genera such as *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Parvimonas*, and *Streptococcus*, but also genera previously less associated with odontogenic abscesses such as *Veillonella*, *Mogibacterium*, *Filifactor*, *Alloprevotella*, and *Slackia*.

4. Clinical Relevance of the Microbiome in Odontogenic Abscesses [151]:

In this prospective study on 48 patients with extensive odontogenic infections, a direct comparison was made between culture-based analysis from routine clinical practice with the corresponding microbiomes. The study shows that in case of atypical infections, the occurrence of bacteria must even be expected that have so far not been associated with odontogenic infections at all. The direct comparison between the culture-based analysis of clinical routine and the corresponding microbiomes shows that culture is not suitable for representing

the diversity of bacteria actually present in odontogenic infections. Similar to many older studies instead of the sensitive anaerobic organisms, mainly the easily culturable genera *Streptococcus* and *Staphylococcus* are detected, although these often play only a minor or no role in the odontogenic abscess considering the corresponding microbiomes simultaneously.

5. Odontogenic Cervicofacial Necrotizing Fasciitis: Microbiological Characterization and Management of Four Clinical Cases [160]:

In this retrospective study, four cases of rare but highly life-threatening cervicofacial necrotizing fasciitis were described and characterized microbiologically by culture and molecular methods. Similar to odontogenic abscesses, odontogenic necrotizing fasciitis represents a polymicrobial endogenous infection caused by predominantly anaerobic bacteria from the oral microbiome. A single "culprit" bacterium that could be considered responsible for the necrotizing course of the infection could not be identified, also using 16S-rRNA-gene-analysis. Thus, it can be assumed that the presence of specific virulence factors rather than the presence of a specific bacterial species is crucial for the necrotizing course of the disease. Therapeutically, early and very radical surgical removal of all necrotic tissue is critical for therapeutic success and patients' survival.

Although odontogenic infections are clinically well manageable in most cases, the results of this work suggest that routine diagnostics could be significantly improved, especially for extensive and atypical courses of infection. The use of 16S-rRNA-gene analysis in combination with next-generation sequencing and bioinformatics enables pathogen diagnostics that can be performed completely independently of culture-based analysis and still provides results even if no bacterial growth occurs in the culture. Therefore, this molecular biological method of diagnosis should complement the established cultural analysis in clinical routine as soon as possible. Its targeted use

should be carried out in close coordination between surgery and microbiology, similar to other clinical disciplines.

In the future, the findings of the present work may contribute to the development of rapid and culture-independent molecular tests that allow early assessment of the situation with regard to particular virulence or antibiotic resistance, especially in severe cases of disease. From a therapeutic point of view, however, the over 2000-year-old wisdom of Galen will continue to be valid for the vast majority of odontogenic infections: "Ubi pus ibi evacua - where there is pus, there evacuate it!"

10. Literatur

1. Døving, M.; Handal, T.; Galteland, P. Bacterial odontogenic infections. *Tidsskr Nor Laegeforen* **2020**, *140*, doi:10.4045/tidsskr.19.0778.
2. Cachovan, G.; Phark, J.H.; Schön, G.; Pohlenz, P.; Platzer, U. Odontogenic infections: an 8-year epidemiologic analysis in a dental emergency outpatient care unit. *Acta Odontol Scand* **2013**, *71*, 518-524, doi:10.3109/00016357.2012.696694.
3. Seppänen, L.; Lauhio, A.; Lindqvist, C.; Suuronen, R.; Rautemaa, R. Analysis of systemic and local odontogenic infection complications requiring hospital care. *J Infect* **2008**, *57*, 116-122, doi:10.1016/j.jinf.2008.06.002.
4. Bali, R.K.; Sharma, P.; Gaba, S.; Kaur, A.; Ghanghas, P. A review of complications of odontogenic infections. *Natl J Maxillofac Surg* **2015**, *6*, 136-143, doi:10.4103/0975-5950.183867.
5. Seppänen, L.; Rautemaa, R.; Lindqvist, C.; Lauhio, A. Changing clinical features of odontogenic maxillofacial infections. *Clin Oral Investig* **2010**, *14*, 459-465, doi:10.1007/s00784-009-0281-5.
6. Kim, M.K.; Nalliah, R.P.; Lee, M.K.; Allareddy, V. Factors associated with length of stay and hospital charges for patients hospitalized with mouth cellulitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* **2012**, *113*, 21-28, doi:10.1016/j.tripleo.2011.01.012.
7. Opitz, D.; Camerer, C.; Camerer, D.M.; Raguse, J.D.; Menneking, H.; Hoffmeister, B.; Adolphs, N. Incidence and management of severe odontogenic infections-a retrospective analysis from 2004 to 2011. *J Craniomaxillofac Surg* **2015**, *43*, 285-289, doi:10.1016/j.jcms.2014.12.002.
8. Statistisches Bundesamt. Einrichtungen, Betten und Patienten-bewegung 2017. Available online: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/krankenhaeuser-fa.html> (accessed on 06/10/2021).
9. Statistisches Bundesamt. Pressemitteilung Nr. 347 vom 14. September 2018. Available online: https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2018/09/PD18_347_124_11.html (accessed on 06/10/2021).
10. DRG-Research-Group. Webgrouper. Available online: https://www.drg-research-group.de/index.php?option=com_webgrouper&Itemid=112&view=webgrouper (accessed on 06/10/2021).
11. Eisler, L.; Wearda, K.; Romatoski, K.; Odland, R.M. Morbidity and cost of odontogenic infections. *Otolaryngol Head Neck Surg* **2013**, *149*, 84-88, doi:10.1177/0194599813485210.
12. Al-Nawas, B.; Karbach, J. S3-Leitlinie (Langversion): Odontogene Infektionen. *Leitlinien Zahnmedizin* **2016** Available online: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/007-006.html> (accessed on 06/10/2021).

13. Kassenärztliche Bundesvereinigung. *Jahrbuch 2020*; Available online: <https://www.kzbv.de/kzbv-jahrbuch-2020-2.media.d31ec54df2c2e2592d7d45681edcfc0f.pdf>.
14. Al Asaadi, Z.; Srinivasan, B.; Melchers, L.J.; Brennan, P.A. Streptococcus constellatus causing bony destruction secondary to odontogenic infection: three rare cases. *Br J Oral Maxillofac Surg* **2019**, *57*, 594-596, doi:10.1016/j.bjoms.2019.05.004.
15. Leonhardt, A.; Carlén, A.; Bengtsson, L.; Dahlén, G. Detection of periodontal markers in chronic periodontitis. *Open Dent J* **2011**, *5*, 110-115, doi:10.2174/1874210601105010110.
16. Lewis, M.A.; MacFarlane, T.W.; McGowan, D.A. A microbiological and clinical review of the acute dentoalveolar abscess. *Br J Oral Maxillofac Surg* **1990**, *28*, 359-366, doi:10.1016/0266-4356(90)90032-g.
17. Heim, N.; Jürgensen, B.; Kramer, F.J.; Wiedemeyer, V. Mapping the microbiological diversity of odontogenic abscess: are we using the right drugs? *Clin Oral Investig* **2021**, *25*, 187-193, doi:10.1007/s00784-020-03350-0.
18. Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clin Microbiol Rev.* **2013**, *26*, 255-273. doi: 210.1128/CMR.00082-00012.
19. Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N.; Souto, R.; Uzeda, M.; Colombo, A.P. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **2001**, *92*, 451-457. doi: 410.1067/moe.2001.118620.
20. de Brito, L.C.N.; Doolittle-Hall, J.; Lee, C.T.; Moss, K.; Bambirra Júnior, W.; Tavares, W.L.F.; Ribeiro Sobrinho, A.P.; Teles, F.R.F. The apical root canal system microbial communities determined by next-generation sequencing. *Sci Rep* **2020**, *10*, 10932, doi:10.1038/s41598-020-67828-3.
21. Larsen, T.; Fiehn, N.E. Dental biofilm infections - an update. *Apmis* **2017**, *125*, 376-384, doi:10.1111/apm.12688.
22. Parahitiyawa, N.B.; Jin, L.J.; Leung, W.K.; Yam, W.C.; Samaranayake, L.P. Microbiology of odontogenic bacteremia: beyond endocarditis. *Clin Microbiol Rev* **2009**, *22*, 46-64, Table of Contents, doi:10.1128/cmr.00028-08.
23. Al-Nawas, B.; Maeurer, M. Severe versus local odontogenic bacterial infections: comparison of microbial isolates. *Eur Surg Res* **2008**, *40*, 220-224, doi:10.1159/000110864.
24. Weise, H.; Naros, A.; Weise, C.; Reinert, S.; Hoefert, S. Severe odontogenic infections with septic progress - a constant and increasing challenge: a retrospective analysis. *BMC Oral Health* **2019**, *19*, 173, doi:10.1186/s12903-019-0866-6.
25. Han, X.; An, J.; Zhang, Y.; Gong, X.; He, Y. Risk Factors for Life-Threatening Complications of Maxillofacial Space Infection. *J Craniofac Surg* **2016**, *27*, 385-390, doi:10.1097/scs.0000000000002416.
26. Schwenger, N.; Ehrenfeld, M. *Zahnärztliche Chirurgie*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 2019.

27. Connors, W.J.; Rabie, H.H.; Figueiredo, R.L.; Holton, D.L.; Parkins, M.D. Acute dental infections managed in an outpatient parenteral antibiotic program setting: prospective analysis and public health implications. *BMC Infect Dis* **2017**, *17*, 202, doi:10.1186/s12879-017-2303-2.
28. Wiese, K.G.; Merten, H.A.; Wiltfang, J.; Luhr, H.G. [Clinical studies on the pathophysiology of odontogenic abscesses]. *Mund Kiefer Gesichtschir* **1999**, *3*, 242-246, doi:10.1007/s100060050143.
29. Mucke, T.; Dujka, N.; Ermer, M.A.; Wolff, K.D.; Kesting, M.; Mitchell, D.A.; Ritschl, L.; Deppe, H. The value of early intraoral incisions in patients with perimandibular odontogenic maxillofacial abscesses. *J Craniomaxillofac Surg* **2015**, *43*, 220-223, doi:10.1016/j.jcms.2014.11.009.
30. Fowell, C.; Igbokwe, B.; MacBean, A. The clinical relevance of microbiology specimens in orofacial abscesses of dental origin. *Ann R Coll Surg Engl* **2012**, *94*, 490-492, doi:10.1308/003588412x13373405385539.
31. Farmahan, S.; Tuopar, D.; Ameerally, P.J. The clinical relevance of microbiology specimens in head and neck space infections of odontogenic origin. *Br J Oral Maxillofac Surg* **2014**, *52*, 629-631, doi:10.1016/j.bjoms.2014.02.027.
32. Warnke, P.H.; Becker, S.T.; Springer, I.N.; Haerle, F.; Ullmann, U.; Russo, P.A.; Wiltfang, J.; Fickenscher, H.; Schubert, S. Penicillin compared with other advanced broad spectrum antibiotics regarding antibacterial activity against oral pathogens isolated from odontogenic abscesses. *J Craniomaxillofac Surg* **2008**, *36*, 462-467, doi:10.1016/j.jcms.2008.07.001.
33. Eckert, A.W.; Maurer, P.; Wilhelms, D.; Schubert, J. [Soft tissue infections in oral, maxillofacial, and plastic surgery. Bacterial spectra and antibiotics]. *Mund Kiefer Gesichtschir* **2005**, *9*, 389-395, doi:10.1007/s10006-005-0645-1.
34. Bonnefond, S.; Catroux, M.; Melenotte, C.; Karkowski, L.; Rolland, L.; Trouillier, S.; Raffray, L. Clinical features of actinomycosis: A retrospective, multicenter study of 28 cases of miscellaneous presentations. *Medicine (Baltimore)*. **2016**, *95*, . doi:10.1097/MD.0000000000003923.
35. Abbaszadeh, H.; Sheibani, M.S. Actinomycotic Osteomyelitis of Mandible. *J Craniofac Surg*. **2016**, *27*, e452-454. doi: 10.1097/SCS.00000000000002793.
36. Castro, A.L.; Vieira, E.M.; Arêde, L.T.; Jardim Junior, E.G. Infection of keratocystic odontogenic tumour by pseudomonas aeruginosa. *Braz J Otorhinolaryngol* **2009**, *75*, 157, doi:10.1016/s1808-8694(15)30848-x.
37. Mohammed-Ali, R.I.; McGurk, M. Atypical fulminating dental nfections. *Dent Update* **2008**, *35*, 420-424, doi:10.12968/denu.2008.35.6.420.
38. Thavagnanam, S.; McLoughlin, L.M.; Hill, C.; Jackson, P.T. Atypical Mycobacterial infections in children: the case for early diagnosis. *Ulster Med J*. **2006**, *75*, 192-194.
39. Bennhoff, D.F. Actinomycosis: diagnostic and therapeutic considerations and a review of 32 cases. *Laryngoscope*. **1984**, *94*, 1198-1217.
40. Moturi, K.; Kaila, V. Cervicofacial Actinomycosis and its Management. *Ann Maxillofac Surg* **2018**, *8*, 361-364, doi:10.4103/ams.ams_176_18.

41. Kang, J.S.; Choi, H.J.; Tak, M.S. Actinomycosis and Sialolithiasis in Submandibular Gland. *Arch Craniofac Surg* **2015**, *16*, 39-42, doi:10.7181/acfs.2015.16.1.39.
42. Lerner, P.I. The lumpy jaw. Cervicofacial actinomycosis. *Infect Dis Clin North Am* **1988**, *2*, 203-220.
43. Wong, V.K.; Turmezei, T.D.; Weston, V.C. Actinomycosis. *BMJ*. **2011**, *343*:d6099., 10.1136/bmj.d6099.
44. Vandeplas, C.; Politis, C.; Van Eldere, J.; Hauben, E. Cervicofacial actinomycosis following third molar removal: case-series and review. *Oral Maxillofac Surg* **2021**, *25*, 119-125, doi:10.1007/s10006-020-00896-x.
45. Pradhan, S.; Datta, N.R.; Prasad, K.N.; Ayyagari, S.; Pandey, R. Actinomycosis mimicking carcinoma of the maxillary sinus. *Indian J Cancer* **1993**, *30*, 1-4.
46. Belmont, M.J.; Behar, P.M.; Wax, M.K. Atypical presentations of actinomycosis. *Head Neck* **1999**, *21*, 264-268, doi:10.1002/(sici)1097-0347(199905)21:3<264::aid-hed12>3.0.co;2-y.
47. Valour, F.; Sénéchal, A.; Dupieux, C.; Karsenty, J.; Lustig, S.; Breton, P.; Gleizal, A.; Boussel, L.; Laurent, F.; Braun, E.; et al. Actinomycosis: etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infect Drug Resist.* **2014**, *7*:183-97., 10.2147/IDR.S39601.
48. Vorasubin, N.; Wu, A.W.; Day, C.; Suh, J.D. Invasive sinonasal actinomycosis: case report and literature review. *Laryngoscope* **2013**, *123*, 334-338, doi:10.1002/lary.23477.
49. Yadav, S.P.; Chanda, R.; Gathwala, G.; Yadav, R.K. Actinomycosis of tonsil masquerading as tumour in a 12-year old child. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* **2002**, *63*, 73-75, doi:10.1016/s0165-5876(01)00647-4.
50. Moghimi, M.; Salentijn, E.; Debets-Ossenkop, Y.; Karagozoglu, K.H.; Forouzanfar, T. Treatment of cervicofacial actinomycosis: a report of 19 cases and review of literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **2013**, *18*, e627-632, doi:10.4317/medoral.19124.
51. Sudhakar, S.S.; Ross, J.J. Short-term treatment of actinomycosis: two cases and a review. *Clin Infect Dis* **2004**, *38*, 444-447, doi:10.1086/381099.
52. Bernier, S.; Clermont, S.; Maranda, G.; Turcotte, J.Y. Osteomyelitis of the jaws. *J Can Dent Assoc* **1995**, *61*, 441-442, 445-448.
53. Montonen, M.; Lindqvist, C. Diagnosis and treatment of diffuse sclerosing osteomyelitis of the jaws. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* **2003**, *15*, 69-78, doi:10.1016/s1042-3699(02)00073-0.
54. Baltensperger, M.M.; Eyrich, G.K. *Osteomyelitis of the Jaws*; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 2009.
55. Modabber, A.; Schick, D.; Möhlhenrich, S.C.; Mottaghy, F.M.; Verburg, F.A.; Hölzle, F.; Gerressen, M. Evaluation of SPECT/CT in the assessment of inflammatory jaw pathologies. *Eur J Radiol* **2020**, *125*, 108917, doi:10.1016/j.ejrad.2020.108917.
56. Bertrand, K.; Lamy, B.; De Boutray, M.; Yachouh, J.; Galmiche, S.; Leprêtre, P.; de Champfleury, N.M.; Reynes, J.; Le Moing, V.; Morquin, D. Osteomyelitis of

- the jaw: time to rethink the bone sampling strategy? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2018**, *37*, 1071-1080, doi:10.1007/s10096-018-3219-5.
57. Kato, H.; Uchibori, M.; Nakanishi, Y.; Kaneko, A. A Case of Osteomyelitis of the Mandibular Condyle Secondary to Bisphosphonate-related Osteonecrosis of the Jaw. *Tokai J Exp Clin Med* **2020**, *45*, 126-130.
 58. Eyrich, G.K.; Baltensperger, M.M.; Bruder, E.; Graetz, K.W. Primary chronic osteomyelitis in childhood and adolescence: a retrospective analysis of 11 cases and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* **2003**, *61*, 561-573, doi:10.1053/joms.2003.50110.
 59. Mehra, H.; Gupta, S.; Gupta, H.; Sinha, V.; Singh, J. Chronic suppurative osteomyelitis of mandible: a case report. *Craniofacial Trauma Reconstr* **2013**, *6*, 197-200, doi:10.1055/s-0033-1343781.
 60. Hudson, J.W. Osteomyelitis of the jaws: a 50-year perspective. *J Oral Maxillofac Surg* **1993**, *51*, 1294-1301, doi:10.1016/s0278-2391(10)80131-4.
 61. Zimmerli, W.; Flückiger, U. [Classification and microbiology of osteomyelitis]. *Orthopade* **2004**, *33*, 267-272, doi:10.1007/s00132-003-0604-1.
 62. Kishimoto, H.; Noguchi, K.; Takaoka, K. Novel insight into the management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ). *Jpn Dent Sci Rev* **2019**, *55*, 95-102, doi:10.1016/j.jdsr.2018.09.002.
 63. Powell, C.; Chang, C.; Gershwin, M.E. Current concepts on the pathogenesis and natural history of steroid-induced osteonecrosis. *Clin Rev Allergy Immunol* **2011**, *41*, 102-113, doi:10.1007/s12016-010-8217-z.
 64. Horie, N.; Kawano, R.; Kaneko, T.; Shimoyama, T. Methotrexate-related lymphoproliferative disorder arising in the gingiva of a patient with rheumatoid arthritis. *Aust Dent J* **2015**, *60*, 408-411, doi:10.1111/adj.12235.
 65. Fliefel, R.; Tröltzsch, M.; Kühnisch, J.; Ehrenfeld, M.; Otto, S. Treatment strategies and outcomes of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) with characterization of patients: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* **2015**, *44*, 568-585, doi:10.1016/j.ijom.2015.01.026.
 66. De Ceulaer, J.; Tacconelli, E.; Vandecasteele, S.J. Actinomyces osteomyelitis in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): the missing link? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **2014**, *33*, 1873-1880, doi:10.1007/s10096-014-2160-5.
 67. Marx, R.E.; Sawatari, Y.; Fortin, M.; Broumand, V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg* **2005**, *63*, 1567-1575, doi:10.1016/j.joms.2005.07.010.
 68. Suárez-López Del Amo, F.; Monje, A.; Padiá-Molina, M.; Tang, Z.; Wang, H.L. Biologic Agents for Periodontal Regeneration and Implant Site Development. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*, 957518, doi:10.1155/2015/957518.
 69. Freiburger, J.J.; Padilla-Burgos, R.; Chhoeu, A.H.; Kraft, K.H.; Boneta, O.; Moon, R.E.; Piantadosi, C.A. Hyperbaric oxygen treatment and bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a case series. *J Oral Maxillofac Surg* **2007**, *65*, 1321-1327, doi:10.1016/j.joms.2007.03.019.

70. Grisar, K.; Schol, M.; Schoenaers, J.; Dormaar, T.; Coropciuc, R.; Vander Poorten, V.; Politis, C. Osteoradionecrosis and medication-related osteonecrosis of the jaw: similarities and differences. *Int J Oral Maxillofac Surg* **2016**, *45*, 1592-1599, doi:10.1016/j.ijom.2016.06.016.
71. Marx, R.E. Osteoradionecrosis: a new concept of its pathophysiology. *J Oral Maxillofac Surg* **1983**, *41*, 283-288, doi:10.1016/0278-2391(83)90294-x.
72. Meyer, I. Infectious diseases of the jaws. *J Oral Surg* **1970**, *28*, 17-26.
73. Rice, N.; Polyzois, I.; Ekanayake, K.; Omer, O.; Stassen, L.F. The management of osteoradionecrosis of the jaws--a review. *Surgeon* **2015**, *13*, 101-109, doi:10.1016/j.surge.2014.07.003.
74. Delanian, S.; Lefaix, J.L. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol* **2004**, *73*, 119-131, doi:10.1016/j.radonc.2004.08.021.
75. Bast, F.; Groß, A.; Hecht, L.; Schrom, T. Etiology and treatment of osteonecrosis of the mandible. *Contemp Oncol (Pozn)* **2013**, *17*, 281-285, doi:10.5114/wo.2013.35275.
76. Akashi, M.; Wanifuchi, S.; Iwata, E.; Takeda, D.; Kusumoto, J.; Furudoi, S.; Komori, T. Differences between osteoradionecrosis and medication-related osteonecrosis of the jaw. *Oral Maxillofac Surg* **2018**, *22*, 59-63, doi:10.1007/s10006-017-0667-5.
77. Hansen, T.; Wagner, W.; Kirkpatrick, C.J.; Kunkel, M. Infected osteoradionecrosis of the mandible: follow-up study suggests deterioration in outcome for patients with Actinomyces-positive bone biopsies. *Int J Oral Maxillofac Surg* **2006**, *35*, 1001-1004, doi:10.1016/j.ijom.2006.08.006.
78. Davis, D.D.; Hanley, M.E.; Cooper, J.S. Osteoradionecrosis. In *StatPearls*; StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL), 2021.
79. Gaêta-Araujo, H.; Vanderhaeghen, O.; Vasconcelos, K.F.; Coucke, W.; Coropciuc, R.; Politis, C.; Jacobs, R. Osteomyelitis, osteoradionecrosis, or medication-related osteonecrosis of the jaws? Can CBCT enhance radiographic diagnosis? *Oral Dis* **2021**, *27*, 312-319, doi:10.1111/odi.13534.
80. Hansen, T.; Kunkel, M.; Kirkpatrick, C.J.; Weber, A. Actinomyces in infected osteoradionecrosis--underestimated? *Hum Pathol* **2006**, *37*, 61-67, doi:10.1016/j.humpath.2005.09.018.
81. Delanian, S.; Chatel, C.; Porcher, R.; Depondt, J.; Lefaix, J.L. Complete restoration of refractory mandibular osteoradionecrosis by prolonged treatment with a pentoxifylline-tocopherol-clodronate combination (PENTOCLO): a phase II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2011**, *80*, 832-839, doi:10.1016/j.ijrobp.2010.03.029.
82. Eckert, A.W.; Hohne, C.; Schubert, J. [Pathogen spectrum and resistance status of exclusively anaerobic odontogenic infections]. *Mund Kiefer Gesichtschir* **2000**, *4*, 153-158, doi:10.1007/s100060050188.
83. Keller, P.M.; Hombach, M.; Bloemberg, G.V. 16S-rRNA-Gen-basierte Identifikation bakterieller Infektionen. *Biospektrum* **2010**, *07.10*, 755-758.

84. Heimdahl, A.; von Konow, L.; Satoh, T.; Nord, C.E. Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings. *J Clin Microbiol.* **1985**, *22*, 299-302. doi: 210.1128/JCM.1122.1122.1299-1302.1985.
85. Celakovsky, P.; Kalfert, D.; Smatanova, K.; Tucek, L.; Cermakova, E.; Mejzlik, J.; Kotulek, M.; Vrbacky, A.; Matousek, P.; Stanikova, L.; et al. Bacteriology of deep neck infections: analysis of 634 patients. *Aust Dent J* **2015**, *60*, 212-215, doi:10.1111/adj.12325.
86. Socransky, S.S.; Gibbons, R.J.; Dale, A.C.; Bortnick, L.; Rosenthal, E.; Macdonald, J.B. The microbiota of the gingival crevice area of man. I. Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Arch Oral Biol.* **1963**, *8*:275-80., 10.1016/0003-9969(1063)90019-90010.
87. Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N. As-yet-uncultivated oral bacteria: breadth and association with oral and extra-oral diseases. *J Oral Microbiol.* **2013**, *5*, 10.3402/jom.v3405i3400.21077. Print 22013.
88. Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Streckbein, P.; Knitschke, M.; Hain, T.; Weigel, M.; Wilbrand, J.F.; Domann, E.; Howaldt, H.P.; Attia, S. A New Type of Chronic Wound Infection after Wisdom Tooth Extraction: A Diagnostic Approach with 16S-rRNA Gene Analysis, Next-Generation Sequencing, and Bioinformatics. *Pathogens.* **2020**, *9*, 798. doi: 710.3390/pathogens9100798.
89. Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N. The Oral Microbiota in Health and Disease: An Overview of Molecular Findings. *Methods Mol Biol* **2017**, *1537*:127-138., 10.1007/1978-1001-4939-6685-1001_1007.
90. Dewhirst, F.E.; Chen, T.; Izard, J.; Paster, B.J.; Tanner, A.C.; Yu, W.H.; Lakshmanan, A.; Wade, W.G. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* **2010**, *192*, 5002-5017. doi: 5010.1128/JB.00542-00510. Epub 02010 Jul 00523.
91. Krishnan, K.; Chen, T.; Paster, B.J. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis.* **2017**, *23*, 276-286. doi: 210.1111/odi.12509. Epub 12016 Jul 12504.
92. Gomaa, E.Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2020**, *113*, 2019-2040, doi:10.1007/s10482-020-01474-7.
93. Santos, A.L.; Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N.; Jesus, E.C.; Rosado, A.S.; Tiedje, J.M. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PLoS One* **2011**, *6*, e28088. doi: 28010.21371/journal.pone.0028088. Epub 0022011 Nov 0028021.
94. Clarridge, J.E., 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **2004**, *17*, 840-862, table of contents, doi:10.1128/cmr.17.4.840-862.2004.
95. Woese, C.R. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* **1987**, *51*, 221-271, doi:10.1128/mr.51.2.221-271.1987.
96. Woo, P.C.; Lau, S.K.; Teng, J.L.; Tse, H.; Yuen, K.Y. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel

- bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* **2008**, *14*, 908-934, doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x.
97. Willis, J.R.; Gabaldón, T. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms*. **2020**, *8*, 308. doi: 310.3390/microorganisms8020308.
 98. Heather, J.M.; Chain, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* **2016**, *107*, 1-8, doi:10.1016/j.ygeno.2015.11.003.
 99. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977**, *74*, 5463-5467, doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
 100. Gauthier, J.; Vincent, A.T.; Charette, S.J.; Derome, N. A brief history of bioinformatics. *Brief Bioinform* **2019**, *20*, 1981-1996, doi:10.1093/bib/bby063.
 101. Stein, L.D. The case for cloud computing in genome informatics. *Genome Biol* **2010**, *11*, 207, doi:10.1186/gb-2010-11-5-207.
 102. Quast, C.; Pruesse, E.; Yilmaz, P.; Gerken, J.; Schweer, T.; Yarza, P.; Peplies, J.; Glöckner, F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, D590-596. doi: 10.1093/nar/gks1219. Epub 2012 Nov 1028.
 103. Chen, T.; Yu, W.H.; Izard, J.; Baranova, O.V.; Lakshmanan, A.; Dewhirst, F.E. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)*. **2010**, *2010:baq013*, 10.1093/database/baq1013.
 104. Nibali, L.; Sousa, V.; Davrandi, M.; Spratt, D.; Alyahya, Q.; Dopico, J.; Donos, N. Differences in the periodontal microbiome of successfully treated and persistent aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol.* **2020**, *47*, 980-990. doi: 910.1111/jcpe.13330. Epub 12020 Jun 13326.
 105. Drews, G. The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century. *FEMS Microbiol Rev* **2000**, *24*, 225-249, doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00540.x.
 106. Cambau, E.; Drancourt, M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. *Clin Microbiol Infect* **2014**, *20*, 196-201, doi:10.1111/1469-0691.12555.
 107. Sims, W. The clinical bacteriology of purulent oral infections. *Br J Oral Surg* **1974**, *12*, 1-12, doi:10.1016/0007-117x(74)90055-9.
 108. Falagas, M.E.; Siakavellas, E. Bacteroides, Prevotella, and Porphyromonas species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents*. **2000**, *15*, 1-9.
 109. van Steenberg, T.J.; van Winkelhoff, A.J.; de Graaff, J. Classification and typing methods of black-pigmented gram-negative anaerobes. *FEMS Immunol Med Microbiol* **1993**, *6*, 83-88, doi:10.1111/j.1574-695X.1993.tb00307.x.
 110. Stefanopoulos, P.K.; Kolokotronis, A.E. The clinical significance of anaerobic bacteria in acute orofacial odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2004**, *98*, 398-408, doi:10.1016/j.tripleo.2004.01.016.

111. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Cugini, M.A.; Smith, C.; Kent, R.L., Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* **1998**, *25*, 134-144. doi: 110.1111/j.1600-1051x.1998.tb02419.x.
112. Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Schmermund, D.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F.; Knitschke, M.; Pons-Kühnemann, J.; Hain, T.; Weigel, M.; Howaldt, H.-P.; et al. Microbiome of Odontogenic Abscesses. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1307.
113. Böttger, S.; Lautenbacher, K.; Domann, E.; Howaldt, H.P.; Attia, S.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.F. Indication for an additional postoperative antibiotic treatment after surgical incision of serious odontogenic abscesses. *J Craniomaxillofac Surg.* **2020**, *48*, 229-234. doi: 210.1016/j.jcms.2020.1001.1009. Epub 2020 Jan 1031.
114. Alotaibi, N.; Cloutier, L.; Khaldoun, E.; Bois, E.; Chirat, M.; Salvan, D. Criteria for admission of odontogenic infections at high risk of deep neck space infection. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* **2015**, *132*, 261-264, doi:10.1016/j.anorl.2015.08.007.
115. Gunaratne, D.A.; Tseros, E.A.; Hasan, Z.; Kudpaje, A.S.; Suruliraj, A.; Smith, M.C.; Riffat, F.; Palme, C.E. Cervical necrotizing fasciitis: Systematic review and analysis of 1235 reported cases from the literature. *Head Neck* **2018**, *40*, 2094-2102, doi:10.1002/hed.25184.
116. Kakoschke, T.K.; Ehrenfeld, M.; Mast, G. [Severe bacterial soft tissue infections in the head and neck region : Overview of the causes, pathogenesis, diagnostics, treatment and possible sequelae]. *Chirurg* **2020**, *91*, 283-292, doi:10.1007/s00104-020-01121-x.
117. Wong, T.Y. A nationwide survey of deaths from oral and maxillofacial infections: the Taiwanese experience. *J Oral Maxillofac Surg* **1999**, *57*, 1297-1299; discussion 1300, doi:10.1016/s0278-2391(99)90863-7.
118. Uluibau, I.C.; Jaunay, T.; Goss, A.N. Severe odontogenic infections. *Aust Dent J* **2005**, *50*, S74-81, doi:10.1111/j.1834-7819.2005.tb00390.x.
119. Moghimi, M.; Baart, J.A.; Karagozoglu, K.H.; Forouzanfar, T. Spread of odontogenic infections: a retrospective analysis and review of the literature. *Quintessence Int* **2013**, *44*, 351-361, doi:10.3290/j.qi.a29150.
120. Haug, R.H.; Hoffman, M.J.; Indresano, A.T. An epidemiologic and anatomic survey of odontogenic infections. *J Oral Maxillofac Surg* **1991**, *49*, 976-980, doi:10.1016/0278-2391(91)90063-r.
121. Pham Dang, N.; Delbet-Dupas, C.; Mulliez, A.; Devoize, L.; Dallel, R.; Barthélémy, I. Five Predictors Affecting the Prognosis of Patients with Severe Odontogenic Infections. *Int J Environ Res Public Health* **2020**, *17*, doi:10.3390/ijerph17238917.
122. Heim, N.; Faron, A.; Wiedemeyer, V.; Reich, R.; Martini, M. Microbiology and antibiotic sensitivity of head and neck space infections of odontogenic origin. Differences in inpatient and outpatient management. *J Craniomaxillofac Surg* **2017**, *45*, 1731-1735, doi:10.1016/j.jcms.2017.07.013.
123. Holt, S.C.; Ebersole, J.L. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic

- consortium in periodontitis. *Periodontol* **2005**, 38:72-122., 10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x.
124. Mysak, J.; Podzimek, S.; Sommerova, P.; Lyuya-Mi, Y.; Bartova, J.; Janatova, T.; Prochazkova, J.; Duszkova, J. Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview. *J Immunol Res* **2014**, 2014:476068., 10.1155/2014/476068. Epub 472014 Mar 476025.
 125. Bodet, C.; Chandad, F.; Grenier, D. [Pathogenic potential of Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola and Tannerella forsythia, the red bacterial complex associated with periodontitis]. *Pathol Biol (Paris)*. **2007**, 55, 154-162. doi: 110.1016/j.patbio.2006.1007.1045. Epub 2006 Oct 1017.
 126. Han, Y.W. Fusobacterium nucleatum: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol*. **2015**, 23:141-7., 10.1016/j.mib.2014.1011.1013. Epub 2015 Jan 1018.
 127. Kamat, R.D.; Dhupar, V.; Akkara, F.; Shetye, O. A comparative analysis of odontogenic maxillofacial infections in diabetic and nondiabetic patients: an institutional study. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* **2015**, 41, 176-180, doi:10.5125/jkaoms.2015.41.4.176.
 128. Zheng, L.; Yang, C.; Zhang, W.; Cai, X.; Kim, E.; Jiang, B.; Wang, B.; Pu, Y.; Wang, J.; Zhang, Z.; et al. Is there association between severe multispace infections of the oral maxillofacial region and diabetes mellitus? *J Oral Maxillofac Surg* **2012**, 70, 1565-1572, doi:10.1016/j.joms.2011.07.010.
 129. Bakathir, A.A.; Moos, K.F.; Ayoub, A.F.; Bagg, J. Factors Contributing to the Spread of Odontogenic Infections: A prospective pilot study. *Sultan Qaboos Univ Med J* **2009**, 9, 296-304.
 130. Vieira, F.; Allen, S.M.; Stocks, R.M.; Thompson, J.W. Deep neck infection. *Otolaryngol Clin North Am* **2008**, 41, 459-483, vii, doi:10.1016/j.otc.2008.01.002.
 131. Hostetter, M.K. Handicaps to host defense. Effects of hyperglycemia on C3 and Candida albicans. *Diabetes* **1990**, 39, 271-275, doi:10.2337/diab.39.3.271.
 132. Huang, T.T.; Tseng, F.Y.; Liu, T.C.; Hsu, C.J.; Chen, Y.S. Deep neck infection in diabetic patients: comparison of clinical picture and outcomes with nondiabetic patients. *Otolaryngol Head Neck Surg* **2005**, 132, 943-947, doi:10.1016/j.otohns.2005.01.035.
 133. Palmason, S.; Marty, F.M.; Treister, N.S. How do we manage oral infections in allogeneic stem cell transplantation and other severely immunocompromised patients? *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* **2011**, 23, 579-599, vii, doi:10.1016/j.coms.2011.07.012.
 134. Fating, N.S.; Saikrishna, D.; Vijay Kumar, G.S.; Shetty, S.K.; Raghavendra Rao, M. Detection of Bacterial Flora in Orofacial Space Infections and Their Antibiotic Sensitivity Profile. *J Maxillofac Oral Surg* **2014**, 13, 525-532, doi:10.1007/s12663-013-0575-7.
 135. Flynn, T.R.; Shanti, R.M.; Hayes, C. Severe odontogenic infections, part 2: prospective outcomes study. *J Oral Maxillofac Surg* **2006**, 64, 1104-1113, doi:10.1016/j.joms.2006.03.031.

136. Flynn, T.R.; Shanti, R.M.; Levi, M.H.; Adamo, A.K.; Kraut, R.A.; Trieger, N. Severe odontogenic infections, part 1: prospective report. *J Oral Maxillofac Surg* **2006**, *64*, 1093-1103, doi:10.1016/j.joms.2006.03.015.
137. Flynn, T.R. The swollen face. Severe odontogenic infections. *Emerg Med Clin North Am* **2000**, *18*, 481-519.
138. Cavallone, L.F.; Vannucci, A. Review article: Extubation of the difficult airway and extubation failure. *Anesth Analg* **2013**, *116*, 368-383, doi:10.1213/ANE.0b013e31827ab572.
139. Ovassapian, A.; Tuncbilek, M.; Weitzel, E.K.; Joshi, C.W. Airway management in adult patients with deep neck infections: a case series and review of the literature. *Anesth Analg* **2005**, *100*, 585-589, doi:10.1213/01.Ane.0000141526.32741.Cf.
140. Carenfelt, C. Pathogenesis of sinus empyema. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **1979**, *88*, 16-20, doi:10.1177/000348947908800104.
141. Stübinger, S.; Leiggenger, C.; Sader, R.; Kunz, C. Intraorbital abscess: a rare complication after maxillary molar extraction. *J Am Dent Assoc* **2005**, *136*, 921-925, doi:10.14219/jada.archive.2005.0293.
142. Lechien, J.R.; Filleul, O.; Costa de Araujo, P.; Hsieh, J.W.; Chantrain, G.; Saussez, S. Chronic maxillary rhinosinusitis of dental origin: a systematic review of 674 patient cases. *Int J Otolaryngol* **2014**, *2014*, 465173, doi:10.1155/2014/465173.
143. Lee, K.C.; Lee, S.J. Clinical features and treatments of odontogenic sinusitis. *Yonsei Med J* **2010**, *51*, 932-937, doi:10.3349/ymj.2010.51.6.932.
144. Crovetto-Martínez, R.; Martín-Arregui, F.J.; Zabala-López-de-Maturana, A.; Tudela-Cabello, K.; Crovetto-de la Torre, M.A. Frequency of the odontogenic maxillary sinusitis extended to the anterior ethmoid sinus and response to surgical treatment. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* **2014**, *19*, e409-413, doi:10.4317/medoral.19629.
145. Bullock, J.D.; Fleishman, J.A. The spread of odontogenic infections to the orbit: diagnosis and management. *J Oral Maxillofac Surg* **1985**, *43*, 749-755, doi:10.1016/0278-2391(85)90328-3.
146. Font, M.D.; Thyagarajan, B.; Khanna, A.K. Sepsis and Septic Shock - Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. *Med Clin North Am* **2020**, *104*, 573-585, doi:10.1016/j.mcna.2020.02.011.
147. Kim, J.K.; Lee, J.H. Clinical utility of procalcitonin in severe odontogenic maxillofacial infection. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* **2021**, *43*, 3, doi:10.1186/s40902-020-00288-x.
148. Blot, S.; Vandewoude, K. Early detection of systemic infections. *Acta Clin Belg* **2004**, *59*, 20-23, doi:10.1179/acb.2004.003.
149. Malik, V.; Gadepalli, C.; Agrawal, S.; Inkster, C.; Lobo, C. An algorithm for early diagnosis of cervicofacial necrotising fasciitis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **2010**, *267*, 1169-1177, doi:10.1007/s00405-010-1248-5.
150. Olzowy, B.; Al-Nawas, B.; Havel, M.; Karbach, J.; Müller, R. Calculated parenteral initial treatment of bacterial infections: Infections in the ear, nose,

- throat and mouth and jaw area. *GMS Infect Dis* **2020**, *8*, Doc14, doi:10.3205/id000058.
151. Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Schmermund, D.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.-F.; Knitschke, M.; Pons-Kühnemann, J.; Hain, T.; Weigel, M.; Imirzalioglu, C.; et al. Clinical Relevance of the Microbiome in Odontogenic Abscesses. *Biology* **2021**, *10*, 916.
 152. Miller, J.M.; Binnicker, M.J.; Campbell, S.; Carroll, K.C.; Chapin, K.C.; Gilligan, P.H.; Gonzalez, M.D.; Jerris, R.C.; Kehl, S.C.; Patel, R.; et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis* **2018**, *67*, e1-e94, doi:10.1093/cid/ciy381.
 153. Siqueira, J.F., Jr.; Rôças, I.N. Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **2009**, *107*, 870-878. doi: 810.1016/j.tripleo.2009.1001.1044.
 154. Aruni, W.; Chioma, O.; Fletcher, H.M. Filifactor alocis: The Newly Discovered Kid on the Block with Special Talents. *J Dent Res.* **2014**, *93*, 725-732. doi: 710.1177/0022034514538283. Epub 0022034514532014 Jun 0022034514538284.
 155. Aruni, A.W.; Mishra, A.; Dou, Y.; Chioma, O.; Hamilton, B.N.; Fletcher, H.M. Filifactor alocis--a new emerging periodontal pathogen. *Microbes Infect.* **2015**, *17*, 517-530. doi: 510.1016/j.micinf.2015.1003.1011. Epub 2015 Apr 1012.
 156. Jalava, J.; Eerola, E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium alocis* and *Fusobacterium sulci* based on 16S rRNA gene sequences: proposal of *Filifactor alocis* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. and *Eubacterium sulci* (Cato, Moore and Moore) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* **1999**, *49 Pt 4*, 1375-1379, doi:10.1099/00207713-49-4-1375.
 157. Dargère, S.; Cormier, H.; Verdon, R. Contaminants in blood cultures: importance, implications, interpretation and prevention. *Clin Microbiol Infect* **2018**, *24*, 964-969, doi:10.1016/j.cmi.2018.03.030.
 158. Van Horn, K.G.; Audette, C.D.; Sebeck, D.; Tucker, K.A. Comparison of the Copan ESwab system with two Amies agar swab transport systems for maintenance of microorganism viability. *J Clin Microbiol* **2008**, *46*, 1655-1658, doi:10.1128/jcm.02047-07.
 159. Schuetz, A.N. Antimicrobial resistance and susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* **2014**, *59*, 698-705, doi:10.1093/cid/ciu395.
 160. Böttger, S.; Zechel-Gran, S.; Schmermund, D.; Streckbein, P.; Wilbrand, J.F.; Knitschke, M.; Pons-Kühnemann, J.; Hain, T.; Weigel, M.; Imirzalioglu, C.; et al. Odontogenic Cervicofacial Necrotizing Fasciitis: Microbiological Characterization and Management of Four Clinical Cases. *Pathogens* **2022**, *11*, doi:10.3390/pathogens11010078.
 161. Fida, M.; Khalil, S.; Abu Saleh, O.; Challener, D.W.; Sohail, M.R.; Yang, J.N.; Pritt, B.S.; Schuetz, A.N.; Patel, R. Diagnostic Value of 16S Ribosomal RNA

- Gene Polymerase Chain Reaction/Sanger Sequencing in Clinical Practice. *Clin Infect Dis* **2021**, 73, 961-968, doi:10.1093/cid/ciab167.
162. Rampini, S.K.; Bloemberg, G.V.; Keller, P.M.; Büchler, A.C.; Dollenmaier, G.; Speck, R.F.; Böttger, E.C. Broad-range 16S rRNA gene polymerase chain reaction for diagnosis of culture-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* **2011**, 53, 1245-1251, doi:10.1093/cid/cir692.
163. Nagy, E.; Schuetz, A. Is there a need for the antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria? *Anaerobe* **2015**, 31, 2-3, doi:10.1016/j.anaerobe.2014.11.002.
164. Altaie, A.M.; Saddik, B.; Alsaegh, M.A.; Soliman, S.S.M.; Hamoudi, R.; Samaranayake, L.P. Prevalence of unculturable bacteria in the periapical abscess: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **2021**, 16, e0255485, doi:10.1371/journal.pone.0255485.
165. Untch, M.; Schlagenhauf, U. Inter- and intra-test agreement of three commercially available molecular diagnostic tests for the identification of periodontal pathogens. *Clin Oral Investig* **2015**, 19, 2045-2052, doi:10.1007/s00784-015-1418-3.
166. Ezzo, P.J.; Cutler, C.W. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000* **2003**, 32, 24-35, doi:10.1046/j.0906-6713.2003.03203.x.
167. Eitel, Z.; Sóki, J.; Urbán, E.; Nagy, E. The prevalence of antibiotic resistance genes in *Bacteroides fragilis* group strains isolated in different European countries. *Anaerobe* **2013**, 21, 43-49, doi:10.1016/j.anaerobe.2013.03.001.
168. Rôças, I.N.; Siqueira, J.F., Jr. Antibiotic resistance genes in anaerobic bacteria isolated from primary dental root canal infections. *Anaerobe* **2012**, 18, 576-580, doi:10.1016/j.anaerobe.2012.10.001.
169. Rôças, I.N.; Siqueira, J.F., Jr. Detection of antibiotic resistance genes in samples from acute and chronic endodontic infections and after treatment. *Arch Oral Biol* **2013**, 58, 1123-1128, doi:10.1016/j.archoralbio.2013.03.010.
170. Zhang, Y.; Ping, Y.; Zhou, R.; Wang, J.; Zhang, G. High throughput sequencing-based analysis of microbial diversity in dental unit waterlines supports the importance of providing safe water for clinical use. *J Infect Public Health*. **2018**, 11, 357-363. doi: 10.1016/j.jiph.2017.1009.1017. Epub 2017 Oct 1015.

11. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Zeichen der Ausbreitungstendenz bei odontogenen Infektionen gemäß der aktuellen Leitlinie der AWMF [12]. | 15 |
| Tabelle 2: Atypische odontogene Infektionen..... | 25 |
| Tabelle 3: Severity-Score bei schweren Odontogenen Infektionen nach Flynn et al. [135]. | 111 |
| Tabelle 4: Therapiebausteine bei ausgedehnten odontogenen Infektionen mit Ausbildung einer Sepsis (n. Bali et al [4]) | 118 |

12. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| Abbildung 1: Ausbreitungsmöglichkeiten einer odontogenen Infektion nach Schwenger und Ehrenfeld [26]. | 14 |
| Abbildung 2: Pathophysiologie der medikamenten-assoziierten Kiefernekrosen nach Kishimoto et al. [62]. | 34 |
| Abbildung 3: Flussdiagramm zur Differenzierung zwischen typischer und atypischer odontogener Infektion. | 138 |
| Abbildung 4: Bild einer gemischten Kultur mit E-Test-Streifen. Die Hemmhöfe bei höheren Konzentrationen zeigen, dass beide Antibiotika (SAM: Ampicillin mit Sulbactam; CD: Clindamycin) wirksam sind. | 151 |

13. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Habilitationsschrift selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Habilitationsschrift angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Habilitationsschrift erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

14. Danksagung

Ich möchte ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Dr. H.-P. Howaldt dafür bedanken, dass er mir nicht nur den medizinisch-wissenschaftlichen Rahmen für diese Arbeit geboten hat, sondern mich auch unermüdlich motiviert und mit seinem wertvollen Rat bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt hat. Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus Herrn Prof. Dr. E. Domann und Frau Zechel-Gran, ohne die die molekularbiologischen Untersuchungen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären. Mein Dank gilt ferner Herrn Priv. Doz. Dr. T. Hain, Herrn Priv. Doz. Dr. C. Imirzalioglu, Herrn Prof. Dr. Dr. P. Streckbein und Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. Jan-Falco Wilbrand, die mir sowohl von chirurgischer als auch von mikrobiologischer Seite mit Ihren Ideen und ihrem Rat zur Seite standen. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. S. Attia, der mich insbesondere bei der Publikation der Manuskripte unterstützt hat. Bedanken möchte ich mich ferner auch Herrn Dr. J. Pons-Kühnemann, der mich sachkundig und mit viel Geduld bei der Anfertigung der zahlreichen Statistiken beraten hat. Mein Dank gilt ferner allen meinen Kolleginnen und Kollegen, die auch nachts und an Wochenenden dazu bereit waren, mich bei der Sammlung der Proben zu unterstützen. Mein abschließender Dank gilt meiner Familie, die mich vor allem zeitlich unterstützt hat und meine wechselnden Launen beim Schreiben und Publizieren tapfer ertragen hat.