

Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
Abteilung Kieferorthopädie Universitätsklinikum Ulm  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. F. G. Sander

# **Antimikrobielle Wirkung von Nanosilber in Dentalkunststoffen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin der  
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

**Christiane Voigt**  
**Freiberg**  
**2005**

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. G. Sander

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Sitzmann

Tag der Promotion: 20. Oktober 2005

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>1 Einleitung</b>	1
<b>2 Material und Methodik</b>	5
<b>2.1 Herstellung und Evaluation der Prüfkörper</b>	5
2.1.1 Herstellung der silberhaltigen Pulverkomponente	5
2.1.2 Herstellung der Prüfkörper	6
<b>2.2 Diagnostische Methoden</b>	10
2.2.1 Rasterelektronenmikroskopie	10
2.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen	12
2.2.2.1 Ablaufdiagramm eines Probenquartetts	12
2.2.2.2 Staphylococcus aureus	14
2.2.2.3 Haemophilus influenzae	17
2.2.2.4 Streptococcus mitis	20
2.2.2.5 Candida albicans	22
2.2.3 Mikroskopische Darstellung mittels Fluoreszenzfarbstoff	24
<b>2.3 Statistik</b>	27
<b>3 Ergebnisse</b>	28
<b>3.1 Tabellarische Übersicht der Gesamtversuche</b>	29
<b>3.2 Ergebnisse des Prüfkörpers Kieferorthopädisches Gerät</b>	30
3.2.1 Energiedispersive Röntgenanalyse EDAX	30
3.2.2 In vivo Untersuchung eines Prototypen einer kieferorthopädischen Apparatur mit silberhaltigen Kunststoffkörper	32
<b>3.3 Ergebnisse der zylinderförmigen Prüfkörper</b>	36
3.3.1 Übersicht der Versuchsreihen	36
3.3.2 Untersuchungen mit FORESTACRYL®	37
3.3.2.1 Staphylococcus aureus ATCC 29213	37
3.3.2.2 Haemophilus influenzae ATCC 49247	41
3.3.3 Untersuchungen mit Palapress®	43
3.3.3.1 Streptococcus mitis ATCC 49456	43

3.3.3.2	Candida albicans ATCC 10231	45
<b>3.4</b>	<b>Ergebnisse der objektträgerförmigen Prüfkörper</b>	<b>47</b>
3.4.1	Streptococcus mitis Anlagerung an Palapress® Proben	48
3.4.2	Staphylococcus aureus an FORESTACRYL® Proben	51
<b>3.5</b>	<b>Gesamtaussage</b>	<b>53</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Antimikrobielle Stoffe</b>	<b>55</b>
4.1.1	Infektionsprohylaxe	55
4.1.2	Einsatz von Antibiotika neben humaner Therapieanwendung	56
<b>4.2</b>	<b>Schutzmechanismen der Mikroorganismen gegen Antibiotika</b>	<b>57</b>
<b>4.3</b>	<b>Bioverträglichkeit und Antimikrobielle Eigenschaften von Materialien in der Zahnheilkunde</b>	<b>58</b>
4.3.1	Biokompatibilität und Biofunktionalität	59
4.3.2	Metallallergien	59
4.3.3	Metalle (Legierungen)	60
4.3.3.1	Titan	60
4.3.3.2	Gold	61
4.3.3.3	Silber	62
4.3.3.4	Quecksilber	64
4.3.4	Nichtmetalle	65
<b>4.4</b>	<b>Methodenkritik</b>	<b>65</b>
4.4.1	Herstellung der Prüfkörper	65
4.4.2	Diagnostische Methoden	66
4.4.3	Besprechung der Ergebnisse	70
4.4.4	Schlussfolgerungen	71
<b>4.5</b>	<b>Klinische Relevanz</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	<b>82</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Ag	argentum (Silber)
Agar	Agarplatte(n)
AgGw%	Silbergehalt in Gewichtsprozent
Aqua dest.	Aqua destillum
ATCC	American Type Culture Collection
BSE	Backscattered Elektronen (Rückstreuelektronen)
°C	Grad Celsius
ca.	zakra
C. a.	Candida albicans
CDH	coronary heart disease (Koronare Herzerkrankungen)
C K( $\alpha$ )	K- Schale des Elements Kohlenstoff
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cr- Co- Mo- Leg.	Chrom- Cobalt- Molybdän- Legierung
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDAX	Elemental Dispersion Analysis using X- rays
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
g	Gramm
gg.	gegen
h	Stunde / Stunden
H. i.	Haemophilus influenzae
KBE	Koloniebildende Einheiten
KBE/ml	Koloniebildende Einheiten pro Milliliter
Keimkonz.	Keimkonzentration
Konzfaktor	Konzentrationsfaktor
M	molar
MDPB	12-Methacryloyloxydodecylpyridiniumbromid
mg/l	Milligramm pro Liter
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mm	Millimeter
MW	Mittelwert
NaCl- Lösung	Natriumchloridlösung
NAD	Nikotinamid- Adenin- Dinukleotid
NADP	Nikotinamid- Adenin- Dinukleotid- Phosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
nm	Nanometer
ppm	parts per million
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
S. a.	Staphylococcus aureus
S. aureus	Staphylococcus aureus
S. m.	Streptococcus mitis
SSG	Streptococcus sanguis Gruppe
Staph. aureus	Staphylococcus aureus
Staph. epidermidis	Staphylococcus epidermidis
Strep.	Streptococcus
Strep. mitis	Streptococcus mitis
Strep. oralis	Streptococcus oralis
Strep. salivarius	Streptococcus salivarius
Strep. sanguis	Streptococcus sanguis
U/min	Umdrehungen pro Minute
u. U.	unter Umständen
VR	Versuchsreihe
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

### Silber: Wirkmechanismus, Resistenz und Kommerz

Silber an sich ist ein inertes Edelmetall, sein Ion jedoch ein äußerst reaktives Teilchen. So benötigen auch in Stoffe eingebaute Silberbestandteile immer Feuchtigkeit, um überhaupt in das wirksame Silberkation zu generieren. Die Wirkungen von Silberionen auf biochemischer Ebene sind noch nicht vollständig geklärt. Silber lagert sich intrazellulär an denaturierte bakterielle DNA und RNA an und hemmt dadurch die Replikation, daneben entfaltet es eine inhibitorische Wirkung auf die bakterielle Zellatmung. Bei *Candida albicans* wird durch Silberionen ein Zellwandenzym, nämlich die Phosphomannose-Isomerase gehemmt. Das führt zu Zelldeformierungen im Zytoskelett und Fehler in der kontinuierlichen Zellwandstruktur (24). Bei Untersuchungen mit Silbernitrat an *E. coli* und *S. aureus* wurde ein Ablösen der Zellmembran von der Zellwand beobachtet (12).

Ob Silber an sich Keimresistenzen entwickelt oder nicht, scheint noch nicht geklärt zu sein. Zum einen gibt es zustimmende Meinungen. Durch den Nachweis von Resistenzgenen bei *E. coli* an bakteriellen Plasmiden (Probenentnahmen an silberbeschichteten Kathetern) mittels molekulargenetischer Methoden (36). Zum anderen auch verneinende Haltungen. Es wurde festgestellt, dass es keine Kreuzresistenzen mit Antibiotika und auch keine Induktion von antimikrobiellen Resistenzen durch Silberionen gibt (15).

Viele Studien zur Wirksamkeit der neuen Silberprodukte sind gesponsert durch deren Hersteller und tendieren dazu, einen Benefiz zu unterstützen (24).

### Silber in der Zahnheilkunde

Um eine annähernde Größenvorstellung von der Keimbelastung in der menschlichen Mundhöhle zu bekommen, soll der Wert von ca.  $10^8$  KBE Mikroorganismen / ml Speichel bei einem gesunden Erwachsenen dienen.

Ein bakterielles Problem besteht in der Zahnheilkunde z.B. in der Pathogenese einer Parodontitis. Dahingehend wurde in vitro die Wirkung von Silberzeolit gegen orale Bakterien unter anaeroben Bedingungen untersucht. Die Ergebnisse der Autoren deuten an, dass Silberzeolit in Dentalmaterialien seine antibakterielle Aktivität unter anaeroben Bedingungen, wie sie in der Tiefe einer parodontalen Tasche vorkommen, entfalten kann (20). Auch wurde bereits die Zugabe von Silber zu phosphatbasierenden Gläsern in vitro untersucht. Erfolgreiche Experimente mit *Strep. sanguis* und verschiedenen

Silberkonzentrationen konnten eine kontrollierte Ionenabgabe aus den Gläsern nachweisen (27). Weitere in vitro Arbeiten mit Silbernitrat in menschlichem Serum konnten eine hohe antibakterielle Aktivität gegen die häufig vorkommenden Parodontalkeime wie Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia und Actinobacillus actinomycetemcomitans beweisen. Die Möglichkeit dieses Material als potentielles Agens zur Behandlung der Parodontitis einzusetzen, wird betont (37).

Auch im Bereich der Endodontie, aufbereitete Wurzelkanäle mit antibakteriellen Substanzen abzufüllen, wurden bereits Untersuchungen in vitro durchgeführt. Bei einem entwickelten Dentinbonding- Wurzelkanalsealer bestehend aus einem Glasionomermaterial und einem silberhaltigen Zeolit konnte in Untersuchungen der hypothesierte Vorteil des Silbers nicht demonstriert werden (30).

Silber wurde auch als Beimischung in bioaktiven Gläsern untersucht. Eingebaut in das mechanische Gewebegerüst soll es seine antibakteriellen Eigenschaften in diesem dentalen oder orthopädischen Transplantatmaterial entfalten. Bei dem diesbezüglich in vitro untersuchten Silberoxid an den Bakterien Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa und Staphylococcus aureus konnte eine Wachstumshemmung beobachtet werden (1).

Die meisten dieser Untersuchungen blieben auf in vitro Untersuchungen beschränkt, dringend notwendige klinischen Untersuchungen erscheinen schwierig durchzuführen. In Bezug auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, hat jeder Patient seine individuelle Mundhöhle die mit all ihren individuellen Besonderheiten einmalig ist. Das spricht für ein sehr großes Patientengut, um überhaupt auch nur annähernd vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

### **Silberanreicherung im menschlichen Organismus**

Wenn mit Silber versetzte Materialien in den menschlichen Organismus eingebracht werden, wird die Frage nach der Anreicherung im Körper gestellt. Die WHO lässt bis zu 0,1 mg/l Silberionen zur Desinfektion von Trinkwasser zu. Im Rahmen eines Tierversuches an Mäusen wurde diesen Tieren für eine und zwei Wochen Trinkwasser mit einer dreifach niedrigeren Konzentration (0,03 mg/l) angeboten. Die Silberakkumulation in folgenden Geweben mit absteigender Konzentration wurde ermittelt: musculus soleus, cerebellum, spleen, duodenum und Myokardmuskel. Den Autoren erscheint eine Reevaluation der gegenwärtigen Befürwortung des Gebrauchs von Silbersalzen für Trinkwasserdesinfektion notwendig (31).

### **Menschliche Rachenflora (Keimcharakteristika)**

In der Mundhöhle findet sich eine Vielzahl unterschiedlicher Mikroorganismen, die zur lokalen Infektion im Bereich der Mundhöhle, aber auch zu Infektionen anderer Organe im Sinne einer Focuserkrankung (z.B. Endokarditis) führen können. Bei dentogenen Infektionen finden sich überwiegend aerobe und anaerobe Keimgemische, die zum Teil aus mehr als 10 verschiedenen Erregerarten zusammengesetzt sind. Dabei erreichen die Anaerobier eine bis zu  $10^5$  größere Keimzahl als die Aerobier. Sie übertreffen diese auch hinsichtlich der Artenvielfalt beträchtlich.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden folgende vier Mikroorganismen untersucht.

#### **1. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* findet man physiologischerweise auf der Haut und Schleimhaut. Infektionen durch diesen Keim treten gehäuft bei immuninkompetenten Wirtsorganismen auf. Typischerweise verbleiben die Erreger am Ort der Invasion und sind in der Lage durch Fibrinbildung um den Infektionsherd sich der Körperabwehr zu entziehen.

*S. aureus* besiedelt neben belebte auch unbelebte Oberflächen, wie beispielsweise Kunststoffmaterialien.

#### **2. *Haemophilus influenzae***

Neben den unbekapselten Arten stellen die weit aus häufiger vorkommenden bekapselten Stämme die größere humanpathogene Gefahr dar. Charakteristisch für dieses Bakterium ist der Bedarf an X- und Y- Faktoren für seine Vermehrung. Der X- Faktor ist das in Erythrozyten vorkommende Hämin und der Y- Faktor bezeichnet NAD bzw. NADP.

#### **3. *Streptococcus mitis***

Er gilt neben *Strep. salivarius* als einer der ersten Besiedler der Mundhöhle innerhalb der ersten Stunden nach der Geburt. Später, nach Durchbruch der Zähne zählt *Strep. mitis* neben *Strep. sanguis* und *Strep. oralis* und wenigen *Actinomyces* zu den Pionierkeimen bei der Besiedlung der gereinigten Zahnoberfläche. Dieses so genannte Schmelzoberhäutchen bildet sich nicht nur auf gereinigten Zähnen, sondern formiert sich auch auf Prothesen bzw. kieferorthopädischen Geräten da es der Grundlage der Zahnbeläge und später der kalzifizierten Form dem Zahnstein entspricht. *Strep. mitis* kann infolge einer Bakteriämie auch in Blutkulturen nachgewiesen werden, wenn z.B. infolge einer Zahnextraktion keine antibiotische Abschirmung erfolgte. Dies ist bei den meisten Menschen auch nicht indiziert, jedoch sind vorgeschädigte Herzklappen ein Beispiel für eine vor chirurgischer Intervention notwendige Endokarditisprophylaxe.

Der Zusammenhang zwischen Erregern der Streptococcus sanguis Gruppe (SSG) und der Koronaren Herzerkrankung (CHD) wurde bewiesen, indem ein positiver Zusammenhang zwischen der Zunahme von Bakterien der SSG in Speichel und subgingivaler Plaque mit ernsthaften Koronaratheromatosen unter Berücksichtigung der klassischen Risikofaktoren für CHD gefunden wurde (9). Die direkte Bindung von Bakterien an Thrombozyten ist eine große Voraussetzung in der Pathogenese der infektiösen Endokarditis. Durch molekulargenetische Untersuchungen an Strep. mitis wurde herausgefunden, dass mindestens zwei Genloki für die Bindungsfähigkeit beitragen (2). Um postoperative Endocarditien nach Herzklappenersatz zu verhindern, wurden die Auswirkungen von silberbeschichteten Herzklappenprothesen an 38 Patienten untersucht. Dabei wurde zum einen festgestellt, dass beim Einsatz der beschichteten Ersatzklappen keine klappenbezogenen Erkrankungen aufgetreten waren. Zum anderen, wurde eine konstante Abnahme der Silberserumkonzentration in der postoperativen Phase beobachtet, nachdem unmittelbar nach dem chirurgischen Eingriff ein Peak verzeichnet wurde. Der Durchschnitt lag bei 4 ppm. Level unter 10 ppm werden für normal gehalten (3).

#### ***4. Candida albicans***

Candida albicans gehört zu den Hefepilzen und ist häufig in der physiologischen Haut- und Schleimhautflora zu finden. Infektionen durch diesen fakultativ pathogenen Pilz können durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden. Hierzu zählen der Diabetes, ein geschwächtes Immunsystem oder auch Antibiotika- Behandlungen bei denen es zu einer Verschiebung der mikrobiellen Flora kommen kann.

Untersuchungen ergaben, dass kein statistischer Zusammenhang zwischen dem Tragen von Zahnersatz und der Entwicklung einer oralen Candidiasis festgestellt werden konnte (14). Es sollten vielmehr die Risikofaktoren ermittelt werden, um präventive Maßnahmen zur Anwendung zu bringen. Meist ist dieses Krankheitsbild assoziiert mit Streptococcen, weshalb auch dieser Keim in die Testreihen des silberversetzten Palapress® eingebaut wurde.

#### **Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer geeigneten Methode, die propagierte antibakterielle Wirkung von Nanosilber in den Dentalkunststoffen FORESTACRYL® und Palapress® nachzuweisen.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Herstellung und Evaluation der Prüfkörper

#### 2.1.1 Herstellung der silberhaltigen Pulverkomponente

**Tab. 1.** Zusammensetzung der verwendeten Dentalkunststoffe

Dentalkunststoff	Pulverkomponenten	Flüssigkeitskomponenten	Hersteller
FOREST-ACRYL®	Polymethylmethacrylat, Polyacrylmethacrylat, Katalysator	Methylmethacrylat, Vernetzer, Katalysator	FORESTADENT® GmbH, Pforzheim
Palapress®	Methylmethacrylat - Copolymer	Methylmethacrylat, Dimethacrylat, Katalysator	Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau

Für die Testreihen wurden zwei verschiedene Dentalkunststoffe verwendet. Zum einen das in der Prothetik häufig verwendete Kaltpolymer Palapress® und zum anderen das vielfach in der Kieferorthopädie eingesetzte Autopolymerisat FORESTACRYL®. Beide Hersteller geben freie Dosiermöglichkeiten für die Flüssigkeits- und Pulverkomponente an.

Zur Bestimmung des Polymergewichts wurden die empfohlenen Mengenvorgaben von Pulver und Flüssigkeit entsprechend der Verarbeitungsanleitung vermischt und anschließend in einem halb mit Wasser gefüllten Drucktopf bei 2.5 bar und 55 °C Wassertemperatur 15 min auspolymerisiert. Bei dem Werkstoff FORESTACRYL® wurden 10 g Pulver mit 3.4 g Flüssigkeit als ideales Verarbeitungsverhältnis erarbeitet, das Polymergewicht dieser Probe ergab 14 g. Beim dem giessbaren Dentalkunststoff Palapress® war für 10 g Pulver eine größere Flüssigkeitsmenge notwendig, nämlich 6 g. Das Polymergewicht betrug 16 g.

Da das Pulver bei diesen Verarbeitungsarten vorgelegt wird, wurden die Silberpartikel in diese Komponente eingebracht. Das in einer Partikelgröße von 5 – 50 nm vorliegende Silber der Fa. Bio-Gate GmbH, Nürnberg wurde vom Fraunhofer Institut München bezogen.

Der Mischvorgang erfolgte in einer Dose mit 100 g Pulver und der errechneten Silbermenge zu der zusätzlich als Mischhilfe Kunstharzpyramiden beigegeben wurden. Die Dose wurde in den Halter eines Rotors gespannt und bei 25 U/min 20 Stunden lang in

Bewegung gehalten. Danach konnte makroskopisch homogene Pulversubstanz entnommen werden.

**Tab. 2.** Silbermenge in 100g Pulver

Dentalkunststoff	Silbergewichtsprozent bezogen auf das Polymer	Silbermenge in 100g Pulverkomponente
FORESTACRYL®	0,4 %	0,56 g
	0,6 %	0,84 g
	1,0 %	1,40 g
Palapress®	0,4 %	0,64 g
	0,6 %	0,96 g
	1,0 %	1,60 g

Die werkstoffkundlichen Veränderungen, wie Biege- und Druckfestigkeit sowie Biokompatibilität, die durch die Zugabe des Silberpulvers verursacht wurden, bedürfen vor einer kommerziellen Anwendung noch weiterer Untersuchungen.

### 2.1.2 Herstellung der Prüfkörper

#### Elektronenmikroskopische Untersuchungen an einem kieferorthopädischen Gerät

Zu Beginn der einzelnen Teilabschnitte werden die verwendeten Materialien tabellarisch aufgezählt. Bei den darauf folgenden Beschreibungen werden lediglich die zusätzlich benötigten Materialien aufgelistet.

**Tab. 3.** Verwendete Materialien

Material	Bezeichnung / Bestellnummer	Hersteller / Vertrieb
Drucktopf	Dentaurum	Dentaurum
Alginat	Palgat	pluradent
Gips	Hartgips grün 34520	Schuler Dental / pluradent
Draht	212 – 3070 / 3080	Forestadent
Plattenwachs	Modellierwachs Standard	GEBDI Dental- Products GmbH
Fräse	Kunststofffräse	Fa. Komet
Schmirgelpapier	Körnung 120 / 43212	pluradent
Bismehl	mittlere Körnung / 48212	Hinrichs / pluradent
Metallpolitur	Sidol	Henkel
Leinenschwabbel	49396	Polirapid / pluradent

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde wie nachfolgend beschrieben ein kieferorthopädisches Gerät hergestellt.

Es wurde ein Alginateabdruck vom Oberkiefer einer Versuchsperson genommen und mit Gips ausgegossen. Für das so entstandene Gipsmodell wurde jeweils zwischen den Zähnen 14 und 15 sowie 24 und 25 eine Dreiecksklammer gebogen und für die Zähne 16 und 26 eine Adamsklammer angefertigt. Damit entfaltete dieser Untersuchungskörper keine kieferorthopädische Wirkung. Diese Elemente hatten lediglich eine Haltefunktion und wurden mit Wachs am Modell fixiert. Dieses wurde gewässert, um eine Isolierung gegen den kieferorthopädischen Kunststoff zu erzielen.

Da bei diesem Versuch die Wirkung von 1 AgGw% Kunststoff gegenüber silberfreiem Kunststoff elektronenmikroskopisch untersucht werden sollte, wurde für den I. Quadranten bis zur Raphe median das 1 AgGw% Pulver und für den II. Quadranten das silberfreie Pulver verwendet.

Die Pulver wurden nun portionsweise auf das Gipsmodell gestreut und mit der Monomerflüssigkeit benetzt. Durch dieses abwechselnde Auftragen beider Komponenten wurde modellierend die Rohform des Untersuchungsgeräts erzielt. Polymerisiert wurde der Kunststoffkörper 15 Minuten lang bei 2.5 bar in einem halb Wasser gefüllten Drucktopf (Wassertemperatur 55 C).

Danach konnte das Werkstück vom Gipsmodell abgehoben und mit einer Fräse bearbeitet werden. Die orale Seite des Untersuchungskörpers wurde mit Schmirgelpapier geglättet und anschließend mit Bimsmehl vorpoliert. Der Hochglanz wurde mit Sidol und Leinenschwabbel erreicht.

#### **Zylinderförmige Prüfkörper für mikrobiologische Untersuchungen**

**Tab. 4.** Zusätzliche Materialien

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung / Bestellnummer</b>	<b>Hersteller / Vertrieb</b>
Stiftprobenteller	Stiftprobenteller ø 12,5 mm, Stift ø 3,0 mm	Plano GmbH, Wetzlar
Vaseline	Weißes Vaseline Lichtenstein	Lichtenstein Pharmazeutica
Becher	Resimixbecher / 45332	Scheu- Dental / pluradent

Da die Wirkung des Silbers in den Werkstoffoberflächen der Materialproben erwartet wird, sollte das Verhältnis Oberfläche zu Volumen groß sein. Die Prüfkörper sollten jedoch relativ klein sein, d.h. in die Spitze eines Eppendorftubes bzw. liegend in die Spitze eines Glasröhrchens passen. Als geeignete Probengröße ergab sich damit ein zylinderförmiges Werkstück mit der Länge von 6 mm und einem Durchmesser von 3 mm. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, mussten die Werkstückproben nahezu identisch sein, was bei einer manuellen Herstellung nur in begrenztem Umfang möglich ist.

Hier wurde als Mustervorlage der Haltestift eines Objektträgertellers von einem Elektronenmikroskop verwendet. Er ist 8 mm lang und verläuft auf den letzten 1,5 mm konisch, der Durchmesser beträgt 3 mm. Mittels Vaseline wurde der Aluminiumzapfen gegen Plattenwachs isoliert, welches erwärmt in flüssigem Zustand vorlag. Durch eintauchen in diesen so genannten Wachstopf konnte sich eine zunächst dünne Wachsschicht um den Zapfen legen. Damit diese Patrize eine ausreichend stabile Konstruktion bildete, wurde ein erwärmter mehrfach gefalteter Plattenwachsstreifen darum gelegt. Nach Abkühlung in einem Wasserbad konnte die Wachspatrize von dem Aluminiumzapfen des Elektronenmikroskopobjektträgers entfernt werden. Jede Wachsform konnte nur einmal verwendet werden und wurde entweder mit FORESTACRYL® oder Palapress® befüllt.

Bei FORESTACRYL® wurde die Wachshohlform abwechselnd mit dem Silber enthaltenden Pulvermaterial und der Monomerflüssigkeit beschickt. Nach 15 minütigem polymerisieren in dem halb Wassergefüllten (55 °C) Drucktopf bei 2.5 bar konnte die Wachsmanschette problemlos entfernt bzw. abgebrüht werden. Der Rohling wurde mit einer Fräse auf 6 mm gekürzt.

Das Palapress® wurde so verarbeitet: Das Silber enthaltende Pulver wurde in einem Resimixbecher mit der Monomerflüssigkeit blasenfrei vermengt und in noch flüssigen Zustand in die Wachshohlform gegossen. Die Auspolymerisierung und Fertigstellung der Probenkörper erfolgte wie oben beschrieben.

### **Objektträgerförmige Prüfkörper für farbliche Darstellungen**

**Tab. 5.** Zusätzliche Materialien

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung / Bestellnummer</b>	<b>Hersteller / Vertrieb</b>
Isolierung Gips gg. Palapress®	FENIX SUPER	ESPE GmbH
Isolierung Gips gg. Gips	Isofix 2000 / 1005979	Renfert / demedis

Die Mustervorlage wurde für diese Probenkörper aus zwei zusammengeklebten herkömmlichen Glasobjektträgern konstruiert. Dieses Muster wurde flach in noch weichen Gips blasenfrei gelegt. Bis zur Modellhöhe wurde der überschüssige abbindende Gips mit einem Gipsmesser glatt entfernt. Nach vollständigem Abbinden des Gipses konnte an der seitlichen Gipsumrandung dieses Modells Retentionen in Form von Vertiefungen eingefräst werden. Durch Isolieren dieser Gipsschale konnte ein wieder trennbares Gipsdiant hergestellt werden. Dieses war durch die vorher eingefrästen Retentionsnischen eindeutig fixierbar. Somit war eine trennbare Gipshohlform geschaffen, deren Hohlraum genau zwei übereinander gelegten Glasobjektträgern entsprach. Diese Verdopplung der Stärke wurde nur vorgenommen, da eine einfache Höhe für diese Kunststoffe zu instabil war. Ein Verbiegen dieser Proben hätte Probleme beim Mikroskopieren mit sich gebracht. Dieses Modell konnte mehrfach zur Herstellung der Kunststoffproben genutzt werden.

Bei der Herstellung der objektträgerförmigen Palapress®-Proben wurde die Gipshohlform nach zehnmütiger Wässerung mit der Kunststoff- Gips- Isolierung benetzt und getrocknet. In zwei separaten Resimixbechern wurden anschließend zum einen das silberfreie und zum anderen das eingewichtsprozent Nanosilber enthaltene Pulver mit der entsprechenden Menge an Flüssigkeit gießfähig angemischt. Behutsam wurden diese Portionen blasenfrei so in die schalenförmige Gipshälfte gegossen, dass zu gleichen Teilen die entstehende Kunststoffprobe aus silberfreiem und silberhaltigem Kunststoff bestand. Nach aufdrücken der fixierbaren zweiten Gipshälfte wurde diese mit einem Gummi verschnürt. Im Drucktopf unter bereits oben genannten Bedingungen wurde die Kunststoffprobe polymerisiert.

Für die FORESTACRYL®-Proben musste die Gipshohlform nicht isoliert werden, das alleinige wässern reichte aus. Auch hier wurden die beiden Pulverarten (silberfrei, 1AgGw%) so in die schalenförmige Gipsform gestreut, dass die entstehende Kunststoffprobe aus zwei gleichen Anteilen dieser Materialien entstand. Die Monomerflüssigkeit dazu wurde alternierend zum Streuvorgang auf die Pulverareale getropft. Zum Schluss wurde der Deckel der Gipsform arretiert und mit einem Spanngummi befestigt. Die Polymerisation erfolgte im Drucktopf.

Beide Arten von Kunststoffprobenkörper wurden aus der trennbaren Gipsform entnommen und die geringgradigen seitlichen Überschüsse mit einer Kunststofffräse entfernt. Eine der planen Oberflächen wurde minimal mit Schmirgelpapier angeraut.

## 2.2 Diagnostische Methoden

### 2.2.1 Rasterelektronenmikroskopie

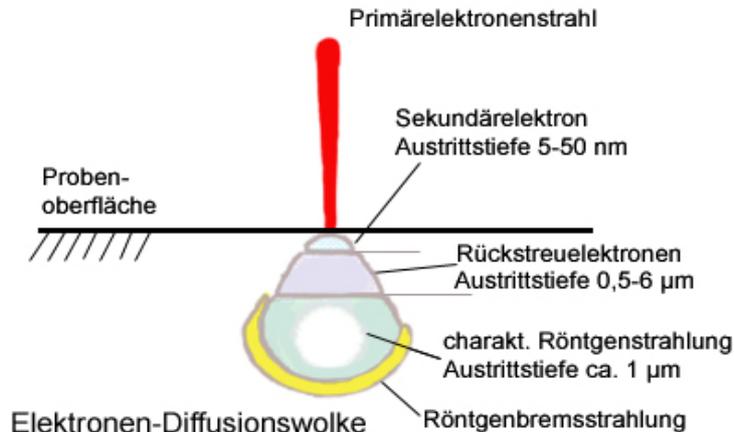
#### Elementaranalyse (EDAX)

##### *Besputterung des kieferorthopädischen Gerätes*

Da der Kunststoff des Probenkörpers nicht leitend ist, muss er für das REM mit einer Schicht Kohlenstoff überzogen werden, um Aufladungen bei der Akquirierung zu vermeiden und den Abtransport von Ladungen zu gewährleisten.

Dazu benutzt man ein Sputtergerät. In den Halter der Kathode wird ein ca. 4 cm langer Kohlefaden achtförmig befestigt. Das kieferorthopädische Gerät wurde in die Kammer gestellt in der ein Vakuum von -3 bis -4 mbar erzeugt wurde. Durch die angelegte Spannung verglühte der Kohlefaden. Der Kohlenstoff wurde durch die zusätzliche Wirkung von Magneten gleichmäßig auf die Oberfläche des Untersuchungskörpers verteilt. Nach Belüftung der Kammer wurde die Probe wieder entnommen.

##### *Prinzip der Elementaranalyse*



**Abb. 1.** Prinzip der Röntgenmikroanalyse, schematische Darstellung nach Fraunhofer- Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Stuttgart

<http://www.igb.fhg.de/WWW/Service/OA/Analytik-Anlagen/dt/REM-EDX.html#a2>

Die folgende Beschreibung des Prinzips der Elementaranalyse ist eng an die Darstellung vom Fraunhofer- Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik IGB, Stuttgart angelehnt.

Ein Primärelektronenstrahl wird mit Hilfe einer Elektronenkathode erzeugt und zur Anode hin beschleunigt. Er wird durch elektromagnetische Linsen auf die Oberfläche der zu untersuchende Probe möglichst fein fokussiert. Durch diesen Primärelektronenstrahl

werden drei unterschiedliche Wechselwirkungen mit der Probe erreicht. Diese sind von der angelegten Beschleunigungsspannung und der Materialzusammensetzung der Probe abhängig. Alle drei Wechselwirkungen Sekundärelektronen, Rückstreuelektronen und Röntgenstrahlung können mit entsprechenden Detektoren registriert werden. Die Energie der Röntgenstrahlung ist von der Ordnungszahl des emittierenden Atoms abhängig und damit für das betreffende Element charakteristisch.

### ***Durchführung der Elementaranalyse***

Nach Besputterung des kieferorthopädischen Geräts wurde es ins REM eingeschleust. Dieser Vorgang wurde zweimal für je eine Hälfte (0 AgGw%, 1,0 AgGw%) durchgeführt. Untersucht wurde die gaumenwärts liegende Probenkörperunterseite.

Die Kammer wurde evakuiert, um eine Streuung von Elektronen an Gasmolekülen zu vermeiden. Diese wäre so stark, dass die Elektronen kaum mehr als wenige Millimeter Wegstrecke zurücklegen könnten. Die angelegte Hochspannung bewirkt ein sehr hohes elektrisches Feld. So kann der Elektronenstrahl den Probenoberflächenelektronen Energie zuführen und ihnen die Austrittsarbeit ermöglichen. Über das Programm EDAX wurden die Spektren akquiriert.

Die Akquirierung erfolgte bis zum Erreichen von 100 Zählsekunden auf einer Probenoberfläche von ca. 4,5 mm<sup>2</sup> und bis zu einer Tiefe von 1 µm. Die Bestimmung der vorhandenen Elemente erfolgte im Programm EDAX. Damit wurde der Anteil der entsprechenden Elemente in Atom- und Gewichtsprozent bestimmt. Auf der silberhaltigen Seite des Untersuchungskörpers wurde zusätzlich an derselben Stelle das oberflächlich liegende Silber durch einen BSE- Detektor sichtbar gemacht. Dieser kann Rückstreuelektronen entsprechend ihres Ursprungmetalls in unterschiedlichen Graustufen darstellen.

### ***Keimbesiedlung nach 20 Stunden Tragedauer eines kieferorthopädischen Geräts***

#### ***Charakteristika des Probanden***

Bei dem Probanden handelte es sich um eine 30jährige Frau mit guter Mundhygiene. Allgemeinanamnestisch konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden, der zahnmedizinische Befund ergab ein konservierend und prothetisch suffizient versorgtes Gebiss. Die Zähne 16, 17, 26, 27 waren mit Goldinlays restaurativ versorgt.

### ***Versuchsaufbau***

Zunächst wurde der lose aufsitzende Kohlenstoff von Versuch der Elementaranalyse mit einem Dampfstrahler und Ultraschallgerät restlos entfernt.

Das kieferorthopädische Gerät verweilte nahezu ununterbrochen zirka 20 Stunden im Mund der Probandin, lediglich zur Nahrungsaufnahme wurde sie herausgenommen. Hier sollte der oralen Mikroflora der Testperson ausreichend Zeit eingeräumt werden mit dem Testkörper in Kontakt zu stehen. Um möglichst identische Bedingungen für die bakterielle Besiedlung beider Kunststoffarten (silberfrei, 1AgGw%) zu bieten, wurde das kieferorthopädische Gerät im I. Quadranten aus silberhaltigem und im II. Quadranten aus silberfreiem FORESTACRYL® hergestellt.

Die nach dieser Zeit den Kunststoffkörper besiedelten Keime wurden durch eine Fixierlösung (2,5 % Glutaraldehyd, 0,1 M Phosphatpuffer, 1 % Saccharose, pH 7,3) konserviert. Die Trocknung erfolgte durch eine aufsteigende Alkoholreihe, da der Probenkörper aufgrund seiner Größe nicht in das Gerät für eine Kritisch- Punkt-Trocknung passte. Dieses Verfahren hätte den Vorteil gehabt, dass Zellwandanhängsel wie Zilien und Geißeln nicht abgerissen werden.

Die Entwässerung der zu untersuchenden Probe ist wichtig, da beim REM unter Vakuum gearbeitet wird.

### ***Besputterung des kieferorthopädischen Gerätes***

Der besseren Detailerkennbarkeit wegen und des besseren Ableiten von Ladungen wurde das Testgerät nun mit einer Gold- Palladium- Legierung beschichtet. Dazu wurde die Kammer wieder evakuiert und mit Argongas geflutet. Die gewünschte Schichtstärke von 20 nm wurde über die Sputterdauer eingestellt. Der so vorbereitete Probenkörper wurde ins REM eingeschleust. Untersucht wurde nur die gaumenwärts liegende Körperunterseite, da gerade in dieser ökologischen Nische unmittelbar zur Mundschleimhaut die Selbstreinigung durch Speichel und Zunge verhindert ist.

## **2.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen**

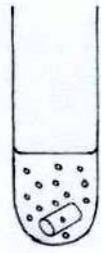
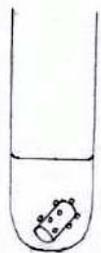
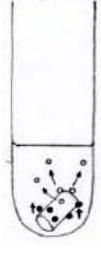
### **2.2.2.1 Ablaufdiagramm eines Probenquartetts**

Bei der Vermehrung von Bakterien in Flüssigkultur gibt es mehrere Möglichkeiten diese zu quantifizieren. Die Nutzung der Zählkammer oder Trübungsmessung sind relativ einfache und schnell durchführbare Methoden. Bei den nachfolgenden Versuchen, sollte

die Frage geklärt werden, wie viele vermehrungsfähige Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Medium vorhanden sind. Das wurde durch definierte Probenentnahmen und Ausimpfung dieser auf einen festen Nährboden beantwortet. Dabei wurde unterstellt, dass jede nach 18 – 24 h Bebrütungsdauer entstandene Kolonie einem vorher vermehrungsfähigen Organismus entsprach.

Bei den mikrobiologischen Untersuchungsreihen wurde immer mit vier Proben (jeweils eine der silberfreien, der 0,4 AgGw%igen, der 0,6 AgGw%igen und der 1,0 AgGw%igen) gleichzeitig, zwar in eigenen Behältnissen jedoch in einer selben Versuchsreihe experimentiert. Einen groben Überblick soll das folgende Ablaufdiagramm einer Versuchsreihe vermitteln. Dabei wurden die Besonderheiten bei den einzeln untersuchten Mikroorganismen vorerst vernachlässigt; an späterer Stelle dazu mehr.

**Tab. 6.** Allgemeine Darstellung der Durchführung einer Versuchsreihe

<b>A</b>	Die Probenkörper (0, 0,4, 0,6, 1,0 AgGw%) werden 2 h in einer Keimlösung von $10^8$ KBE / ml bei 36° C inkubiert. Jede Probe in einem separaten Gefäß.	
<b>B</b>	Es folgte ein Waschvorgang, der bei den unterschiedlichen Keimarten herausgearbeitet werden musste. Ziel war es, Keime am Werkstück haften zu lassen, während die überschüssige Ansatzlösung <b>A</b> entfernt werden sollte.	
<b>C</b>	Das so kontaminierte Probenstück wurde in eine verdünnte Nährlösung gelegt und bis zu 20 h bei 36 C inkubiert. Innerhalb dieses Zeitfensters wurden 6 mal Flüssigproben dem Medium entnommen und auf Agarplatten ausgestrichen.	

<b>D</b>	<p>Nach einer Bebrütungsdauer von ca. 18 h bei 36 °C wurden die Agarplatten ausgezählt. Diese Koloniebildenden Einheiten wurden anschließend in die Konzentrationseinheit KBE / ml umgerechnet.</p>	
----------	---	--

### 2.2.2.2 Staphylococcus aureus

#### Vorversuche

**Tab. 7.** Zusätzliche Materialien

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
NaCl	sterile, isotonischer Natriumchlorid- Lösung 0,9 %	Fa. Delta Select GmbH, Pfullingen
CASO Bouillon	CASO Bouillon	Merck KGaA, Darmstadt
Rüttler	VORTEX – GENIE 2	Scientific Industries BOHEMIA
Photometer	GT 9301	GENE – TRAK SYSTEMS

Zunächst wurde die optische Dichte ermittelt, die bei dem Staphylococcus aureus Stamm ATCC 29213 einer Keimkonzentration von  $10^8$  KBE / ml entspricht. Da von einer Keimdichte von  $10^8$  KBE / ml in der Mundhöhle ausgegangen wurde. Durch regelmäßige Kontrollansätze konnte der optische Wert von 0,09 als reproduzierbar angesehen werden. Das heißt, die Ansatzlösung **A** wurde für jede Versuchsreihe mit einer am Vortag angelegten Reinkultur von Staphylococcus aureus in steriler, isotonischer Natriumchlorid – Lösung 0,9 % hergestellt.

Die anfängliche Keimfreiheit der Probenwerkstücke wurde durch 10 minütiges einlegen in 70 % igen Alkohol standardisiert. Das Sterilisieren der Kunststoffkörper bei 115 °C 40 Minuten lang, war wegen der geringe Hitzestabilität nicht möglich.

Als Behältnis für die Versuchsdurchführung mit Staphylococcus aureus wurden 1,5 ml fassende Eppendorftubes für geeignet befunden, da diese dicht verschlossen werden konnten, zumal das Bakterium keinen Anspruch an die umgebende Atmosphäre stellte.

Die Optimierung des Waschvorgangs **B** erforderte ein systematisches Vorgehen, da weder die Größe der Haftfähigkeit noch die Größe der Haftstabilität der Keime am Probenkunststoff bekannt war. Dreifach Spülungen mit steriler NaCl- Lösung unter

Rüttlereinsatz ergaben völlig unzureichende Ergebnisse. Da sich die Wirkung des Silbers lediglich an der Oberfläche des Werkstücks entfalten kann, war es Ziel dieses Waschens, die Keime zu entfernen, welche sich nicht direkt am Probenkörper befanden.

Hypothetisch sollten die am Werkstück haftenden Keime nun mit den unterschiedlich angebotenen Silberkonzentrationen eine Reaktion zeigen. Es sollten die noch vermehrungsfähigen Keime im Idealfall eine Tochterzelle in die Lösung C abgeben, wobei deren Teilung wiederum durch den Einsatz einer verdünnten Nährlösung C eingeschränkt bleiben sollte.

Durch die Methode der Lösungsentnahme aus dem Medium und anschließendem beimpfen von Agarplatten konnten nun die noch vermehrungsfähigen Tochterzellen bestimmt werden. Das heißt man geht davon aus, je weniger koloniebildende Einheiten ausgezählt werden konnten, desto größer war die antibakterielle Wirkung des Silbers.

Gearbeitet wurde für die Staphylococcus aureus Versuche mit einer 9 % igen CASO Bouillon in 0,1 Molar pH 7,4 Phosphatpuffer - Lösung.

**Tab. 8.** Zusammensetzung und Zubereitung von CASO Bouillon und Phosphatpuffer

	Zusammensetzung	Zubereitung	pH
CASO Bouillon	in g/l : Pepton aus Casein 17,0 Pepton aus Sojamehl 3,0 D (+) – Glucose 2,5 Natriumchlorid 5,0 di – Kaliumhydrogenphosphat 2,5	30 g in 1 Liter demineralisierten Wasser lösen und autoklavieren (15 min , 121 °C)	7,3 ± 0.2 bei 25°C
Phosphatpuffer	0,1 Molar Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (basisch) 0,1 Molar NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (sauer)	Die basische Komponente wird vorgelegt und mit der sauren auf den gewünschten pH – Wert titriert	7,4

Die so beschriebene Methode wurde einmal mit je 2 Proben 0 AgGw% und 1,0 AgGw% bzw. einmal mit je 2 Proben 0,4 AgGw% und 0,6 AgGw% durchgeführt. Ein Vergleich der Ergebnisse war bei einer KBE – Schwankung von 2 Logarithmenstufen nicht möglich. Deshalb wurden für die Hauptversuche nur 1 Probe, aber von jeder Silberkonzentration (0 AgGw%, 0,4 AgGw%, 0,6 AgGw%, 1,0 AgGw%) für einen Versuchsdurchgang verwendet.

### Hauptversuche

**Tab. 9.** Zusätzliche Materialien

<b>Material</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Ultraschall	BANDELIN SONOREX RK 100 H	BANDELIN electronic
CASO Blutagar	CASO Blutagar	heipha Dr. Müller GmbH, Heidelberg
Eppendorftubes	Safe – Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG Hamburg
Plattierungsspatel	Plattierungsspatel	Fa. SARSTEDT Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht

Es wurden vier folgend beschriebene Testreihen (VR I – IV) durchgeführt.

Alle vier Probenstücke wurden in ein 70%igen Alkohol enthaltendes Reagensglas gegeben und verblieben dort 10 Minuten. Der Alkohol wurde abgegossen und anschließend dreimal mit jeweils 4 ml steriler NaCl - Lösung unter Rüttlereinsatz gespült. Die zylinderförmigen Werkstoffproben unterschieden sich sichtbar in ihrer grauen Farbabstufung, weshalb die Zuordnung nun in einzelne Eppendorftubes, beschriftet mit der jeweiligen Silberkonzentration, kein Problem darstellte. Mit einer sterilen Pinzette wurden die Probenkörper in 100 µl 10<sup>8</sup> KBE Staphylococcus aureus ATCC 29213 / ml enthaltene Keimlösung gebracht. In dieser Ansatzlösung **A** verblieben sie 2 Stunden bei 36 °C, damit sich die Bakterien anlagern konnten.

Der Waschvorgang **B** begann zunächst mit dem Absaugen der Ansatzlösung **A**. Alle 4 Eppendorftubes wurden mit den enthaltenen Proben dreimal mit jeweils 1 ml steriler NaCl- Lösung und unter Nutzung des Rüttlers 5 Sekunden gewaschen. Wieder mit 1 ml NaCl- Lösung aufgefüllt, wurden die 4 Tubes zusammen in einem Ständer für 10 Sekunden in ein Ultraschallbad gestellt. Die durch den Schall in Lösung gegangenen Keime wurden durch nochmaliges dreifaches Spülen mit 1 ml NaCl und jeweils 5 Sekunden Rüttlereinsatz entfernt.

Anschließend wurden die Proben vorsichtig mit einer sterilen Pinzette in ein neues Eppendorftube überführt. In weiteren 1 ml NaCl- Lösung kam wieder für 10 Sekunden das Ultraschallbad zum Einsatz. Der Waschvorgang **B** wurde durch erneutes dreifaches Spülen mit 1 ml NaCl und 5 Sekunden Rüttlerbetrieb beendet.

Die Werkstoffproben wurden in ein neues Tubes mit 450 µl 9 % iger CASO Bouillon in Phosphatpuffer- Lösung eingesetzt; bei Versuchsreihe IV in 510 µl.

Mit einer Pipette wurden langsam um die Probe herum 100 µl Lösung C aufgenommen und auf CASO Blutagar mit einem Plattierungsspatel ausgestrichen. Die nach 18–24 h gezählten KBE entsprechen der „Null“ Stunden.

Nach 2 h und 4 h wurden, wieder mit der Pipettenspitze kreisend um das Probenstück, aus den Tubes jeweils 100 µl entnommen. Davon wurden 90 µl direkt auf CASO Blutagar ausgespatelt und 10 µl wurden in 90 µl sterilen NaCl- Lösung pipettiert. Von dieser 10fachen Verdünnung wurden 90 µl ausgespatelt. Nach 6 h wurde lediglich bei VR IV wie bei 2 h verfahren. Bei allen andern Versuchsreihen wurden zu diesem Zeitpunkt, sowie bei 8 h und 20 h lediglich 10 µl entnommen. Auf Agar ausgestrichen wurden bei 6 h und 8 h die 10 fache und 100 fache Verdünnung nach obigem Prinzip. Durch das reduzierte Nährstoffangebot reichte es nach 20 h die 100 fache und 1000 fache Verdünnungsstufe auszuspateln.

Nach einer Bebrütungsdauer von ca. 20 Stunden bei 36 °C wurden die CASO Blutagarplatten ausgezählt (D). Diese koloniebildenden Einheiten wurden anschließend in den Konzentrationswert KBE / ml umgerechnet.

### 2.2.2.3 Haemophilus influenzae

#### Vorversuche

Tab. 10. Zusätzliche Materialien

Material	Bezeichnung	Hersteller
H- Medium	H – Bouillon 11ml	Fa. MERLIN Diagnostika GmbH
Glasröhrchen	mehrfach verwendbare, sterilisierbare Glasröhrchen	
H. i. Wachstumssupplement	Haemophilus Test Medium Supplement, Code SR 158 E	Fa. OXOID

Für alle nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurde der Haemophilus influenzae Stamm ATCC 49247 verwendet. Der adäquate Wert der optischen Dichte im Photometer zur Keimkonzentration von  $10^8$  KBE / ml wurde durch systematische Erhöhung der Keimkonzentration in der Testlösung ermittelt. Durch mehrfache Kontrollansätze konnte der Wert von 0,13 bestätigt werden.

Für den weitaus anspruchsvolleren Keim Haemophilus influenzae musste die Ansatzlösung A zubereitet werden. Dazu wurde zunächst ein gefriergetrocknetes Wachstums- Supplement nach Anleitung mit sterilem destilliertem Wasser versetzt und in

120 µl Portionen eingefroren. Zu dem in Röhrchen befindlichen H- Medium (11 ml) wurden 100 µl gelöstes Wachstums- Supplement beigefügt. Die so vorbereitete bräunliche Nährstofflösung wurde mit einer einen Tag vorher angelegten Reinkultur von H. i. entsprechend einer Konzentration von  $10^8$  KBE / ml kontaminiert. Diese Ansatzlösung **A** wurde für jede Versuchsreihe separat angesetzt.

**Tab. 11.** Zusammensetzung und Zubereitung von Haemophilus influenzae Wachstums- supplement und Phosphatpuffer

	Zusammensetzung	Zubereitung
Haemophilus Test Medium Supplement	Hämatin 7,5 mg Nicotinamid- adenin- dinucleotid 7,5 mg	zu diesem Pulver aseptisch 2 ml steriles Aqua dest. Zusetzen. Das Supplement durch vorsichtiges Schwenken lösen. Die Menge ist für 500 ml H-Medium ausreichend
Phosphatpuffer	0,1 Molar $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (basisch) 0,1 Molar $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (sauer)	Die basische Komponente wird vorgelegt und mit der sauren auf einen pH- Wert von 7,0 titriert.

Um eine anfängliche Keimfreiheit der Werkstoffproben vorauszusetzen, wurden sie 10 Minuten in 70 % Alkohol gelegt.

Für die Versuchsreihen mit H. i. wurden Glasröhrchen mit nicht dicht verschließbaren Aluminiumkappen als Behältnis gewählt, um die im Brutschrank herrschende 5 %  $\text{CO}_2$  Atmosphäre zur Wachstumsunterstützung zu nutzen.

Die Optimierung des Waschvorgangs **B** erforderte wieder ein systematisches Vorgehen, da weder die Größe Haftfähigkeit noch Haftstabilität der Keime am Probenkunststoff bekannt war. Der genaue Ablauf ist unter Hauptversuche beschrieben.

Die Aufgabe der Lösung **C** wurde zufrieden stellend gelöst, wenn sie zu gleichen Teilen aus der oben genannten Nährstofflösung und 0,1 M Phosphatpuffer mit einem pH von 7,0 bestand.

### Hauptversuche

Es wurden drei folgend beschriebene Testreihen durchgeführt.

Alle vier zylinderförmigen Probenstücke (0 AgGw%, 0,4 AgGw%, 0,6 AgGw%, 1,0 AgGw%) wurden für 10 Minuten in 70 %igen Alkohol gelegt. Die Flüssigkeit wurde abgossen und anschließend dreimal mit jeweils 4 ml steriler NaCl- Lösung unter Vortexeinsatz gespült. Mit einer sterilen Pinzette wurden die Probenkörper in 400 µl  $10^8$  KBE Haemophilus influenzae ATCC 49247 / ml enthaltene Keimlösung gebracht. In dieser Ansatzlösung **A** verblieben sie 2 Stunden bei 36°C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre.

Der Waschvorgang **B** begann zunächst mit dem Absaugen der Ansatzlösung. Alle 4 Glasröhrchen wurden mit deren enthaltenen Proben fünfmal mit jeweils 1 ml steriler NaCl- Lösung und unter vortexen (5 Sekunden) gewaschen. Mit 2 ml NaCl- Lösung aufgefüllt, wurden die Glasröhrchen zusammen in einem Ständer für 10 Sekunden in ein Ultraschallbad gestellt. Die durch den Schall in Lösung gegangenen Keime wurden durch nochmaliges 5 faches Spülen mit 1 ml NaCl- Lösung und jeweils 5 Sekunden Rüttlereinsatz entfernt. Anschließend wurden die Proben vorsichtig mit einer sterilen Pinzette in ein neues Glasröhrchen mit 800 µl reduziertem Nährmedium **C** (50 % H-Medium und 50 % 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0) eingesetzt. Mit einer Pipette wurden langsam um die Proben herum 100 µl Lösung **C** aufgenommen und auf Kochblutagar mit einem Plattierungsspatel ausgestrichen. Die darauf nach 18 – 24 Stunden gezählten KBE entsprechen der „Null“ Stunden.

Alle vier Behältnisse wurden 20 h bei 36 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre in einen Brutschrank gestellt. Nach 2 h und 4 h wurden aus den Glasröhrchen jeweils 100 µl entnommen. Davon wurden 90 µl direkt auf Schokoladenagar ausgespatelt und 10 µl in steriles NaCl- Lösung pipettiert. Von dieser 10 fachen Verdünnung wurden 90 µl ausgespatelt. Nach 6 h, 8 h und 20 h wurden lediglich 10 µl entnommen. Auf Agar ausgestrichen wurden bei 6 h die 10 fache und 100 fache Verdünnung, bei 8 h die 100 fache und  $10^3$  fache Verdünnung und bei 20 Stunden die  $10^6$  und  $10^7$  fache Verdünnung.

Nach einer Bebrütungsdauer der Platten von 18 – 24 Stunden bei 36 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre wurden die Koloniebildenden Einheiten gezählt (**D**). Diese KBE wurden anschließend in KBE / ml umgerechnet.

#### 2.2.2.4 Streptococcus mitis

##### Vorversuche

**Tab. 12.** Zusätzliche Materialien

Medium	Hersteller
Brucella Broth	Fa. bioWORLD
Brain Heart Infusion	Fa. OXOID
Columbia Blutagarplatten	heipha Dr. Müller GmbH, Heidelberg
CASO Bouillon	Fa. Merck

Für alle nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurde der Streptococcus mitis Stamm ATCC 49456 verwendet.

Bei der Suche nach einem geeigneten Nährmedium für Strep. mitis wurden ihm drei verschieden Wachstumsmedien angeboten. Zum einen Brucella Broth, konzipiert für die Kultur von Brucellen, zum anderen eine Brain Heart Infusion, z.B. geeignet zur Kultivierung von Streptococcen oder Pneumococcen und als drittes die CASO Bouillon. Es wurden je zwei Röhren mit diesen Nährmedien befüllt, wobei in eines davon eine Menge an Streptococcus mitis mit einer optischen Dichte von 0,02 gegeben wurde. Nach einer 24 stündigen Bebrütungsdauer bei 36°C und 5prozentiger CO<sub>2</sub> Spannung wurden erneut die optischen Unterschiede beider Röhren pro Nährmedium bestimmt. Bei allen drei Bouillon konnte ein Wachstum festgestellt werden. In CASO wurde eine Pelletbildung beobachtet. In der Brain Heart Lösung war das Kokkenwachstum am größten. Bei Brucella Broth war ein deutliches Wachstum zu verzeichnen, nicht so stark jedoch wie in der letztgenannter Lösung. Deshalb wurde auch dieses Nährmedium favorisiert, da ein nicht optimales Nährmedium bevorzugt werden sollte.

Die Keimkonzentration von 10<sup>8</sup> KBE / ml für die Ansatzlösung A wurde durch einfaches Probieren ermittelt, der Wert der optischen Dichte im Photometer war 0,45. Durch mehrfache Kontrollansätze konnte dieser bestätigt werden. Die dafür notwendige Menge an Kokken wurde von Columbia Blutagarplatten entnommen, die mit einer Reinkultur des ATCC Stammes 49456 bewachsen waren.

Wie bei den anderen Untersuchungsreihen wurde die anfängliche Keimfreiheit der Palapress®Proben durch 10minütiges Einlegen in 70%igen Alkohol erreicht. Für die Versuchsreihen mit S. m. wurden Glasröhren mit nicht dicht verschließenden Aluminiumkappen als Behältnis gewählt, um die im Brutschrank herrschende 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre zur Wachstumsunterstützung zu nutzen.

Die Optimierung des Waschvorgangs **B** erforderte wieder ein systematisches Vorgehen. Vier verschiedene Waschabläufe wurden untersucht. Diese reichten von fünfmaligem Spülen unter Rüttlereinsatz bis zu intensiver zweimalig 10 Sekunden dauernden Ultraschall Benutzung. Der ideal ermittelte Spülablauf wird unter Hauptversuche beschrieben.

Für Lösung **C** wurden 30 % Brucella Broth und 70 % 0,1 M Phosphatpuffer mit einem pH von 7,0 zusammengestellt.

### Hauptversuche

Es wurden drei folgend beschriebene Testreihen durchgeführt.

Alle vier zylinderförmigen Probenstücke(0 AgGw%, 0,4 AgGw%, 0,6 AgGw%, 1,0 AgGw%)

wurden für 10 Minuten in 70 %igen Alkohol gelegt. Die Flüssigkeit wurde abgegossen und anschließend dreimal mit jeweils 4 ml steriler Brucella Lösung unter vortexen das Desinfizienz abgespült. Mit einer sterilen Pinzette wurden die Probenkörper in 600 µl 10<sup>8</sup> KBE Streptococcus mitis ATCC 49456 / ml enthaltende Keimlösung gebracht. In dieser Ansatzlösung **A** verblieben sie 2 Stunden bei 36°C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre.

Der Waschvorgang **B** begann zunächst mit dem Absaugen der Ansatzlösung. Alle 4 Glasröhrchen wurden mit deren enthaltenen Proben fünfmal mit jeweils 1 ml steriler Brucella Bouillon und unter vortexen (5 Sekunden) gewaschen. Mit 2 ml Brucella Lösung aufgefüllt, wurden die Glasröhrchen zusammen in einem Ständer für 5 Sekunden in ein Ultraschallbad gestellt. Die durch den Schall in Lösung gegangenen Keime wurden durch nochmaliges 5faches Spülen mit 1 ml Brucellamedium und jeweils 5 Sekunden Rüttlereinsatz entfernt. Anschließend wurden die Proben vorsichtig mit einer sterilen Pinzette in ein neues Glasröhrchen mit 800 µl reduziertem Nährmedium **C** (30 % Brucella Broth und 70 % 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0) eingesetzt.

Streptococcus mitis ist ein austrocknungsempfindlicher Keim und das Umsetzen des Bakteriums in ein neues steriles Glas nach dem Waschen musste außerordentlich zügig erfolgen.

Mit einer Pipette wurden langsam um die Proben herum 100 µl Lösung **C** aufgenommen und auf Columbia- Blutagar mit einem Plattierungsspatel ausgestrichen. Die darauf nach 18 – 24 Stunden gezählten KBE entsprachen dem „Null“- Stunden- Wert.

Alle vier Behältnisse wurden 20 h bei 36 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre in einen Brutschrank gestellt. Nach 2 h, 4 h und 6 h wurden aus den Glasröhrchen jeweils 100 µl

entnommen. Davon wurden 90 µl direkt auf Columbiaagar ausgespatelt und 10 µl in sterile Brucella Lösung pipettiert. Von dieser 10 fachen Verdünnung wurden 90 µl ausgespatelt. Nach 8 h und 20 h wurden lediglich 10 µl entnommen. Auf Agar ausgestrichen wurden bei 8 h die 10 fache und 100 fache Verdünnung und bei 20 Stunden die 10<sup>3</sup> und 10<sup>4</sup> fache Verdünnung.

Nach einer Bebrütungsdauer der Platten von 18 – 24 Stunden bei 36 °C und 5 % CO<sub>2</sub> Spannung wurden die Koloniebildenden Einheiten gezählt (**D**). Diese KBE wurden anschließend in den vergleichbaren Konzentrationsfaktor KBE / ml umgerechnet.

### 2.2.2.5 *Candida albicans*

#### Vorversuche

*Candida albicans* wurde als vierter Mikroorganismus mikrobiologisch untersucht. Die Versuchsreihen entsprechen prinzipiell den bereits in den letzten Abschnitten dargestellten Abläufen. Durch die speziellen Charakteristika dieses Hefepilzes wurde eine Modifikation des Versuchsaufbaues notwendig. Da *Candida albicans* ein im Vergleich zu den bisher untersuchten Spezies ein deutlich langsames Wachstum zeigt, wurden die Zeiten der Probenentnahme verändert. Zu der Ausgangssituation wurden nach 10, 12, 14, 16 und 20 Stunden die *Candida albicans* Konzentrationen in den biologischen Systemen festgehalten. Diese pipettierten Lösungen wurden auf Sabouraud Glucose Agar ausgespatelt und nach zweitägigem Bebrüten bei 30°C ausgezählt

**Tab. 13.** Zusätzliche Materialien

Medium	Hersteller
Sabourand- Bouillon	Fa. OXOID
Schale 94/16 L.M.G.M.N. Steril	Fa. greiner bio-one
Sabourand Glucose Agar	Fa. OXOID

Für alle nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurde der *Candida albicans* Stamm ATCC 10231 verwendet.

Der für die Kultivierung notwendige Sabourand Glucose Agar wurde nach Herstellerangaben in Aqua dest. zubereitet, sterilisiert und als 20 ml Portionen in Petrischalen verteilt. Als Nährmedium wurde Sabouraud- Bouillon verwendet.

Die Keimkonzentration von 10<sup>8</sup> KBE / ml für die Ansatzlösung **A** wurde durch einfaches Probieren ermittelt, der Wert der optischen Dichte im Photometer war 1,5. Durch

mehrfache Kontrollansätze konnte dieser bestätigt werden. Die dafür notwendige Menge an Hefepilzen wurde von Sabourand Glucose Agar entnommen, der mit einer Reinkultur des ATCC Stammes 10231 bewachsen war.

Wie bei den anderen Untersuchungsreihen wurde die anfängliche Keimfreiheit der Palapress®-Proben durch 10minütiges Einlegen in 70%igen Alkohol erreicht. Für die Versuchsreihen mit C. a. wurden die sich bereits bewährten Glasröhrchen mit nicht dicht verschließenden Aluminiumkappen als Behältnis genutzt.

Die Optimierung des Waschvorgangs **B** erforderte ein systematisches Vorgehen. Vier verschiedene Waschabläufe wurden untersucht. Wie bei den anderen untersuchten Keimarten reichten die untersuchten Waschabläufe von fünfmaligem Spülen unter Rüttlereinsatz bis zu intensiver zweimalig 10 Sekunden dauernden Ultraschall Benützung. Der ideal ermittelte Spülablauf wird unter Hauptversuche beschrieben.

Für Lösung **C** wurden 50 % Sabouraud Bouillon und 50 % 0,1 M Phosphatpuffer mit einem pH von 7,0 angesetzt.

### Hauptversuche

Es wurden drei folgend beschriebene Testreihen durchgeführt.

Alle vier zylinderförmigen Probenstücke (0 AgGw%, 0,4 AgGw%, 0,6 AgGw%, 1,0 AgGw%) aus Palapress® wurden für 10 Minuten in 70 %igen Alkohol gelegt. Die Flüssigkeit wurde abgegossen und anschließend dreimal mit jeweils 4 ml steriler Sabouraud Lösung unter vortexen das Desinfizienz abgespült. Mit einer sterilen Pinzette wurden die Probenkörper in 600 µl  $10^8$  KBE *Candida albicans* ATCC 10231 / ml enthaltende Keimlösung gebracht. In dieser Ansatzlösung **A** verblieben sie 2 Stunden bei 30°C.

Der Waschvorgang **B** begann zunächst mit dem Absaugen der Ansatzlösung. Alle 4 Glasröhrchen wurden mit deren enthaltenen Proben fünfmal mit jeweils 1 ml steriler Sabouraud Bouillon und unter vortexen (5 Sekunden) gewaschen. Anschließend wurden die Proben vorsichtig mit einer sterilen Pinzette in ein neues Glasröhrchen mit 800 µl reduziertem Nährmedium **C** (50 % Sabouraud Lösung und 50 % 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0) eingesetzt. Mit einer Pipette wurden langsam um die Proben herum 100 µl Lösung **C** aufgenommen und auf Sabouraud- Glukose- Agar mit einem Plattierungsspatel ausgestrichen. Die darauf nach 36 Stunden gezählten KBE entsprachen dem „Null“-Stunden- Wert.

Alle vier Behältnisse wurden 20 h bei 30 °C in einen Brutschrank gestellt. Da *Candida albicans* im Vergleich zu den bisher untersuchten Spezies ein deutlich langsames Wachstum zeigt, wurden die Zeiten der Probenentnahme verändert. Zu der Ausgangssituation wurden nach 10, 12, 14, 16 und 20 Stunden die Konzentrationen in den biologischen Systemen festgehalten.

Nach 10 h, 12 h und 14 h wurden aus den Glasröhrchen jeweils 100 µl entnommen. Davon wurden 90 µl direkt auf Sabouraud- Glukose- Agar ausgespatelt und 10 µl in sterile Sabouraud Lösung pipettiert. Von dieser 10 fachen Verdünnung wurden 90 µl ausgespatelt. Nach 16 h und 20 h wurden lediglich 10 µl entnommen. Auf Agar ausgestrichen wurden bei 16 h die 10 fache und 100 fache Verdünnung und bei 20 Stunden die 10<sup>2</sup> und 10<sup>3</sup> fache Verdünnung. Nach einer Bebrütungsdauer der Platten von etwa 36 Stunden bei 30 °C wurden die Koloniebildenden Einheiten gezählt (**D**). Diese KBE wurden anschließend in den vergleichbaren Konzentrationsfaktor KBE / ml umgerechnet.

Es wurde eine Testreihe über 48 Stunden durchgeführt.

Die Durchführung des Langzeitversuches erfolgte analog zu den oben beschriebenen Testreihen. Nur die Proben wurden anstatt nach 0, 10, 12, 14,16, 20 Stunden nach 0, 6, 24, 30, 48 Stunden entnommen. Nach dieser längeren Kontaktzeit von *Candida albicans* mit den Palapress® Proben konnte kein Unterschied zwischen der silberfreien und den Silber beinhaltenden Proben festgestellt werden.

### 2.2.3 Mikroskopische Darstellungen mittels Fluoreszenzfarbstoff

**Tab.14.** Zusätzliche Materialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller / Vertrieb</b>
Fluoreszenzfarbstoff LIVE/DEAD®	Molecular Probes / Mo Bi Tec, Göttingen
physiologische Kochsalzlösung	Apotheke des Universitätsklinikum Ulm
Deckgläser 18 x 18	MARIENFELD Laboratory Glasware
Konfokalmikroskop	Leica Konfokalmikroskop TCS SP

#### LIVE/ DEAD®

Der Fluoreszenzfarbstoff lautet mit der genauen Bezeichnung L-7007 LIVE/DEAD® BacLight™. Dieser Farbstoff besteht aus einer Mischung der grün fluoreszierenden STYO®

9 Komponente und des rot fluoreszierenden propidium iodide Anteils. Diese beiden Farben unterscheiden sich in deren Spektralbereich und in ihrer Fähigkeit in gesunde Bakterienzellen zu penetrieren. STYO® 9 alleine würde generell alle Bakterien der Population markieren, solche mit intakten Membranen und welche mit zerstörten Membranen. Propidium iodide dagegen penetriert nur in Bakterien mit defekten Membranen. In diesem Set sind zwei Lösungen (Komponente A und B) enthalten, die aus unterschiedlichen Mischungsverhältnissen beider Farbstoffe bestehen.

Wie in der Anleitung vorgeschlagen, wurden beide Komponenten in einem Verhältnis 1 : 1 vorgelegt und nach einer 1 : 500 Verdünnung in 50 µl Portionen bei -20°C eingefroren. Die Emissionsmaxima für STYO® 9 liegt bei 480/500 nm und 490/635 nm für propidium iodide. Durch diese Mixtur können Bakterien mit intakten Zellmembranen grün fluoreszierend und die mit zerstörten Membranen rot fluoreszierend dargestellt werden. Jedoch gibt es auch unter bestimmten Voraussetzungen die Möglichkeit, dass Bakterien mit primär leicht lädierten Membranen in der Lage sind, diese Defekte zu reparieren und sich im Nachhinein zu reproduzieren. Ungeachtet der Defektgröße einer Membran wird solch ein Bakterium als „tot“ markiert. Ein weitere auf dem biologischem System basierende Fehlergröße sind Bakterien, die trotz intakter Membran unfähig sind, sich in Nährmedium zu reproduzieren. Solche werden mit dieser Methode grün markiert.

### **Konfokalmikroskop**

Unter diesem Begriff verbirgt sich ein Laser-Scanning-Mikroskop. Es ist ein Lichtmikroskop, das eine bessere Auflösung und meistens eine bessere Schärfentiefe als ein Linsensystem hat.

Aus dem Empfängersignal wird dann zeilenweise im Computer ein (Schnitt-)Bild zusammengesetzt. Das aus dem Brennfleck zurückkommende Licht kann vom Objekt reflektiertes oder dort erzeugtes Fluoreszenzlicht sein. Ein Lichtdetektor misst die Intensität für jeden Punkt. Hier gibt es eine messbare Intensität nur, wenn der Punkt in der Brennebene liegt, deshalb "konfokal" oder "monofokal".

Zwei Dinge sollten in diesem Versuchsabschnitt geklärt werden.

Aus den Versuchsreihen von **3.3.3.1** ergab sich die Fragestellung, ob sich die hier untersuchten Streptococccen mitis an das Material mit einem Gewichtsprozent Silber überhaupt erst anlagern oder ob durch Besonderheiten (vermutlich das beigefügte Silber), die Keimadhäsion verhindert ist.

Die mit der mikrobiologischen Methode festgestellte antibakterielle Wirkung gegen *Strep. mitis* und *Staph. aureus* (3.3.2.1) sollte mit einer weiteren Methode möglichst sichtbar gemacht werden. Dazu wurde der oben beschriebene Fluoreszenzfarbstoff mit einem Laser- Scanning- Mikroskop benutzt.

### **Versuchsdurchführung**

#### ***Nullprobe***

Um auszuschließen, dass die mit Silber versetzten Objektträger selbst fluoreszierende Signale nach Benetzung mit LIVE/DEAD® produzieren, wurde eine Nullprobe durchgeführt. Es konnten keine Signale ausgehend vom Objektträger ausgemacht werden.

#### ***Streptococcus mitis Anlagerung an eine Palapress®Probe***

In Anlehnung an den Versuchsaufbau der mikrobiologischen Untersuchungen wurde das objektträgerförmige Probenwerkstück nach 10minütiger Desinfektion mit Alkohol in eine Ansatzlösung A gelegt. Diese bestand aus 15ml Brucella Bouillon mit einer *Strep. mitis* Konzentration von  $10^8$  KBE / ml. Die Probe verbrachte darin liegend zwei Stunden bei 36°C und 5prozentiger CO<sub>2</sub> Spannung.

Unmittelbar nach Entnahme aus dieser Lösung wurde der Probenkörper mit steriler physiologischer Natriumchloridlösung abgespült und es wurden beide Probenhälften (silberfreie und 1AgGw%) mit jeweils 12 µl Farbstoff benetzt. Dies fand in einem abgedunkelten Raum statt, um der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes zu genügen. Nach blasenfreiem Auflegen eines Deckglases wurden beide Seiten mit dem Laser- Scanning- Mikroskop betrachtet und Aufnahmen gemacht.

#### ***Staphylococcus aureus Anlagerung an eine FORESTACRYL®Probe***

Um einen annähernden Vergleich bilden zu können, wurde die objektträgerförmige FORESTACRYL® Probe für zwei Stunden wie bei den mikrobiologischen Untersuchungen in eine  $10^8$  konzentrierten *Staphylococcus aureus* Ansatzlösung bei 36°C gelegt, danach abgespült und für zwei Stunden in eine reduzierte Nährlösung wiederum bei 36°C belassen. Nach diesen zwei Stunden wurde das anhaftende Nährmedium mit steriler 0,9prozentiger Kochsalzlösung abgespült und der Probenkörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff benetzt und Aufnahmen gemacht.

### **2.3 Statistik**

Bei allen nachfolgend beschriebenen Ergebnissen dieser drei verschiedenen Versuchsreihen war es nicht möglich, eine Statistik zu erheben. Die Untersuchungen mit dem kieferorthopädischen Gerät und die Untersuchungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff waren aufgrund ihrer Einmaligkeit lediglich richtunggebend. Die bei den mikrobiologischen Untersuchungsreihen gewonnenen Daten unterlagen sehr großen Schwankungen. Als Hauptursache wird die Tatsache verantwortlich gemacht, dass die anfängliche Keimbelastung der Testkörper trotz gleicher Versuchsdurchführung zu unterschiedlich war.

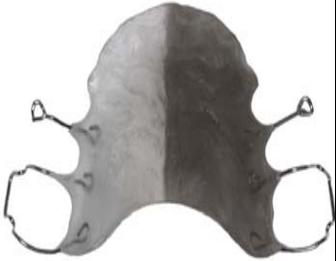
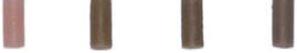
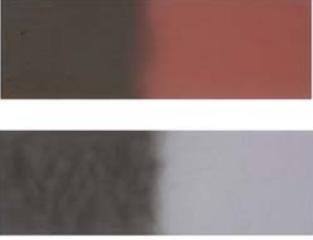
### 3 Ergebnisse

Insgesamt wurden mehrere Untersuchungsverfahren etabliert, die sich je nach der angewandten Methodik in drei Bereiche unterteilen lassen. Einen Überblick über die verschiedenen Prüfkörper mit ihren dazu gehörigen Prüfverfahren stellt Tabelle 15 dar.

Die abgebildeten Untersuchungskörper stellen ein kieferorthopädisches Gerät sowie zylinderförmige und objekträgerförmige Kunststoffproben dar. Die mikrobielle Besiedlung des kieferorthopädischen Gerätes wurde mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Mit den zylinderförmigen Proben wurden in vitro Untersuchungen mit den Keimarten *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *Candida albicans* und *Haemophilus influenzae* durchgeführt. An den objekträgerförmigen Werkstoffproben, die je zur Hälfte aus Material ohne und mit 1prozentigem Nanosilber bestanden, wurden Untersuchungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff LIVE/DEAD® mit Hilfe eines Konfokalmikroskop (Laser-Scanning-Mikroskop) durchgeführt. Bei diesem Verfahren konnten die am Material haftenden toten Bakterien (mit zerstörter Membran) durch rote Lichtsignale und die lebenden Bakterien mittels grünen Signalen sichtbar gemacht werden. Die Größenordnung der Zugabe des Nanosilbers in das Monomerpulver der zwei verwendeten Dentalkunststoffe FORESTACRYL® und Palapress® wurde willkürlich zwischen 0 und 1 Gewichtsprozent gewählt. FORESTACRYL® kommt hauptsächlich in der Kieferorthopädie und Palapress® in der Prothetik zur Anwendung. Beide Materialien sind Methacrylate, prinzipiell hätte man sich auf eine Kunststoffmarke beschränken können.

### 3.1 Tabellarische Übersicht der Gesamtversuche

**Tab. 15.** Übersicht der Versuche

Prüfkörper		<p>Silbergewichtsprozent    0    0,4    0,6    1,0</p> <p>FORESTACRYL®    </p> <p>Palapress®    </p>						
Diagnostische Methoden	REM	Mikrobiologische Untersuchungen				Fluoreszenzfarbstoff LIVE/DEAD®		
Dental-kunststoff	FORESTACRYL®	Palapress®		FORESTACRYL®		Palapress®	FORESTACRYL®	
Silberge-wichtspro-zent der Prüfkörper	I. Quadrant 1 AgGw% II. Quadrant 0 AgGw%	0 AgGw%, 0,4 AgGw%, 0,6 AgGw%, 1,0 AgGw%		0 AgGw%, 0,4 AgGw%, 0,6 AgGw%, 1,0 AgGw%		je eine Hälfte mit 0 AgGw% und 1,0 AgGw%	je eine Hälfte mit 0 AgGw% und 1,0 AgGw%	
Keimarten	Mundflora	Candida albicans	Streptococcus mitis	Haemophilus influenzae	Staphylococcus aureus	Streptococcus mitis	Staphylococcus aureus	
Anzahl der Versuchs-reihen	1	3	3	3	4	1	1	

REM = Rasterelektronenmikroskop

AgGw% = Silbergehalt in Gewichtsprozent

### 3.2 Ergebnisse des Prüfkörpers kieferorthopädisches Gerät

Der erste Untersuchungsblock sollte klären, ob mittels elektronenmikroskopischer Verfahren ein optisch wahrnehmbarer Unterschied der mikrobiellen Besiedlung auf dem Silber enthaltenden Teil des kieferorthopädischen Gerätes gegenüber einem silberfreien festgestellt werden kann. Dazu sollte im Vorhinein geklärt werden, ob Nanosilberpartikel an der Oberfläche noch nachweisbar sind, nachdem sie in die Kunststoffmatrix einpolymerisiert worden sind. Denn nur unmittelbar an der Werkstückoberfläche kann eine antibakterielle Wirkung erwartet werden.

#### 3.2.1 Energiedispersive Röntgenanalyse EDAX

Die Akquirierung erfolgte bis zum Erreichen von 100 Zählsekunden (lsec) auf einer Probenoberfläche von ca. 4,5 mm<sup>2</sup> und bis zu einer Tiefe von 1 µm. Mit dem EDAX Programm konnten die Daten des Rasterelektronenmikroskopes ausgewertet und die entsprechenden Spektren der vorhandenen Elemente dargestellt werden. Damit konnte der Anteil der entsprechenden Elemente in Atom- und Gewichtsprozent bestimmt werden.

Auf der silberhaltigen Seite stellt sich zusätzlich zu den Kohlenstoff- und Sauerstoffpeaks das Element Silber dar. Es wurde eine Anregungsspannung von 20 kV verwendet. Die damit erzeugten Röntgenimpulse des Elements Silber entstanden durch zurückfallen angeregter Elektronen vom M- auf das L-Energieniveau, dies kennzeichnet das Programm mit La. Der Wasserstoff als auch Edelgase sind nicht bestimmbar. Die prozentualen Angaben zur Gehaltsbestimmung sind nicht auswertbar, da der Probenkörper für diese Untersuchung mit Kohlenstoff besputtert werden musste.

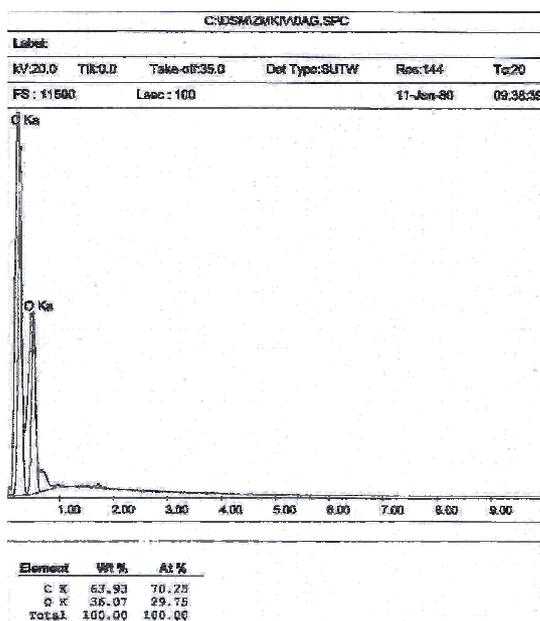


Abb.2 EDAX Analyse der silberfreien Seite

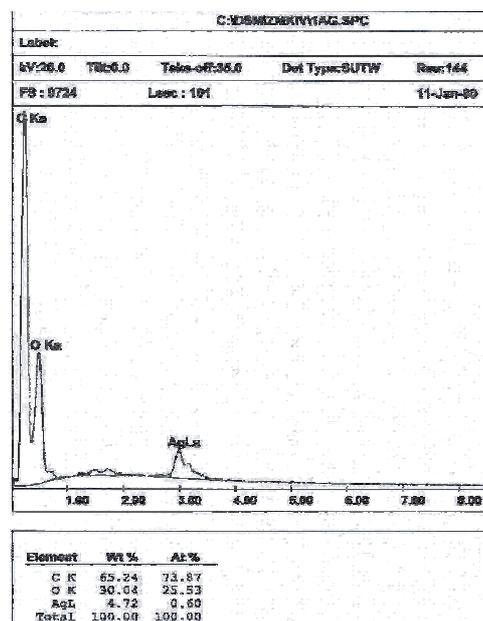
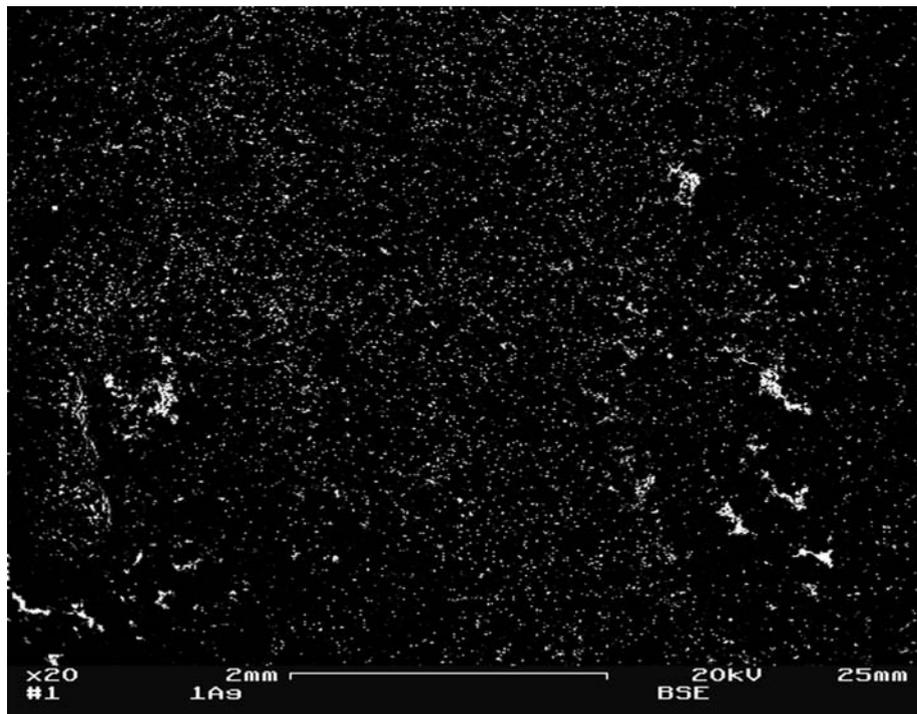


Abb. 3 EDAX Analyse der silberhaltigen Seite

C K( $\alpha$ ) = K( $\alpha$ )- Linie des Elements Kohlenstoff  
O K( $\alpha$ ) = K( $\alpha$ ) Linie des Elements Sauerstoff  
Ag L( $\alpha$ ) = L( $\alpha$ ) Linie des Elements Silber  
Wt % = wight in Prozent (Gewichtsprozent)  
At % = atomic wight in Prozent (Atomgewichtsprozent)

Auf der silberhaltigen Probenhälfte wurde zusätzlich an derselben Stelle das oberflächlich liegende Silber durch einen BSE- Detektor sichtbar gemacht. Dieser kann Rückstreuelektronen entsprechend ihres Ursprungmetalls in unterschiedlichen Graustufen darstellen.

Mit Hilfe des BSE- Detektors konnte das oberflächlich liegende Silber als weiße Areale sichtbar gemacht werden. Dieser Detektor stellt je nach Art des leitenden Elements dieses in verschiedenen Helligkeiten dar. Nachdem kein weiterer metallischer Stoff im Kunststoffmaterial vorhanden war, muss es sich um Silber handeln. Die Verteilung erscheint nicht durchgängig homogen, jedoch sind keine größeren Areale als annähernd  $0,2 \text{ mm}^2$  ohne Silber. Inwieweit bei industriellen technisierten Herstellungsverfahren dies verbessert werden kann, bleibt offen.



**Abb. 4.** Aufnahme mit dem BSE- Detektor

Ag = argentum (Silber) BSE = Backscattered Elektronen (Rückstreuelektronen)

Es konnte gezeigt werden, dass zugegebene Nanosilberpartikel im Polymerpulver nach Polymerisierung auch an der Oberfläche des entstandenen Werkstückes nachweisbar sind.

### **3.2.2 In vivo Untersuchung eines Prototypen einer kieferorthopädischen Apparatur mit silberhaltigen Kunststoffkörper**

Das kieferorthopädische Gerät verweilte nahezu ununterbrochen 20 Stunden im Mund am Oberkiefer des Probanden, lediglich zur Nahrungsaufnahme und Mundhygienemaßnahmen wurde sie herausgenommen.

Bei dem mit Silber präparierten Anteil des Probenkörper wurde metallischer Geschmack in Regio 26 beklagt. Die Ursache könnte physikochemisch erklärt werden. Im I. Quadranten (1 AgGw%) waren die Zähne 26 und 27 mit Goldinlays restaurativ versorgt, zusätzlich lag an 26 die Adamsklammer aus einer Cr- Co- Mo- Leg. an, sowie in unmittelbarer Nähe das Silber im Kunststoffkörper. Über das Medium Speichel ergab dies ein galvanisches Element. Silber kann mit Schwefel aus Nahrungsproteinen zu Silbersulfid reagieren, was einen unangenehmen metallischen Geschmack zur Folge haben könnte.

Es wurde bestimmt, nur die gaumenwärts liegende Probenseite zu untersuchen, da die zur Zunge weisende Seite einer gewissen Selbstreinigung unterliegt. Zwischen Gaumenschleimhaut und kieferorthopädischem Gerät besteht eine ökologische Nische, die hervorragende Bedingungen für das Wachstum von Mikroorganismen bietet.

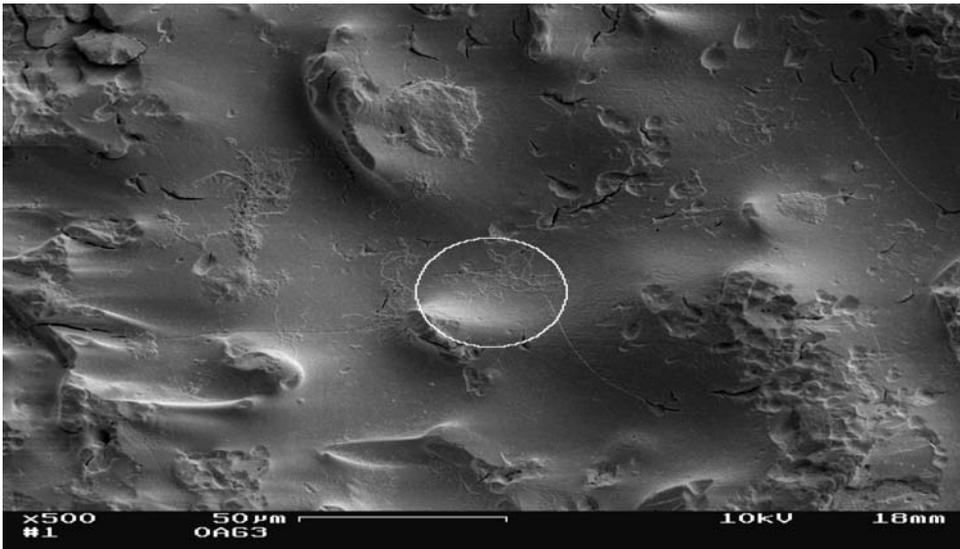
Es wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen von beiden Probenkörperhälften gemacht. Geklärt werden sollte, ob ein Unterschied in der Keimbeseidlung feststellbar ist. Der bakterielle Bewuchs auf der silberhaltigen Seite ist in seiner Dichte und Dimension geringer ausgeprägt.

Diese Beobachtung konnte beim Betrachten einer Vielzahl von Bildern am Rasterelektronenmikroskop gewonnen werden. Auf beiden Anteilen des Prüfkörpers werden die gefundenen Arten von Keimen als identisch vermutet, da eine Keimbestimmung aufgrund der notwendigen Fixierung im Nachhinein nicht mehr möglich war. Es scheint plausibel, dass es sich bei den dargestellten Bakterien im Wesentlichen um die physiologische Mundhöhlenflora handelt. Neben stäbchenförmige Arten sind auch Kokken erkennbar, letztere als Einzelkokken, Diplokokken oder auch haufenförmig angeordnet. Andere oberflächlich lose aufsitzende Strukturen können als denaturierte Speichelproteine gedeutet werden.

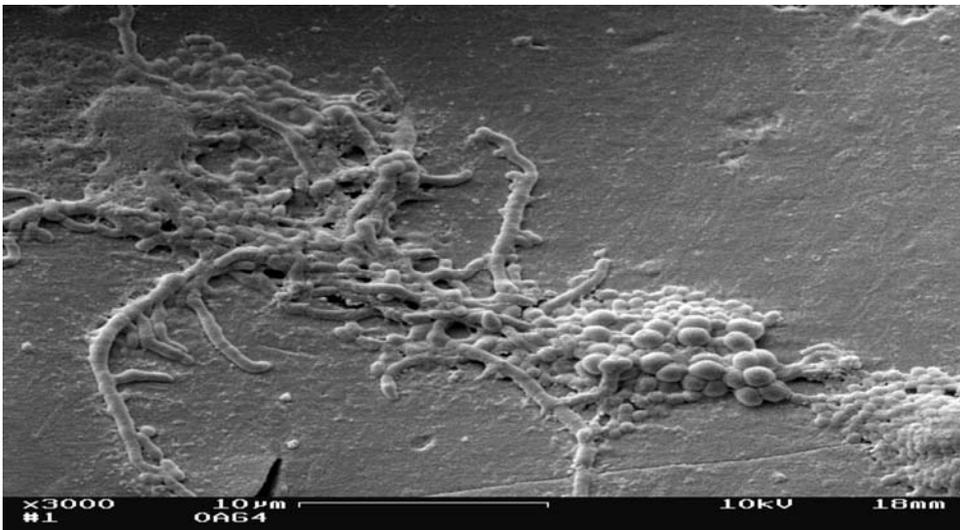
Aus dem gesamten Bildmaterial sollen exemplarisch von jeder Seite drei charakteristische Aufnahmen gezeigt werden. Der besseren Vergleichbarkeit erscheinen die Bilder einer jeden Hälfte auf getrennten Seiten. Die Abbildungen 5 und 8 zeigen Aufnahmen bei einer 500fachen Vergrößerung. Diese Übersichten stellen die Bewuchsdichte dar. Während bei

der silberfreien Probenkörperunterseite deutliche Besiedlungsinselformen erkennbar sind, sind die Keime auf der silberhaltigen Kunststoffseite eher einzeln aufzufinden. Die Detailaufnahmen Abb. 6 und 9 sowie 7 und 10 zeigen im Vergleich beider Seiten die Bewuchsgröße einzelner Bakterienanhäufungen. Es ist nicht möglich, eine Aussage über die quantitative Keimdifferenz zu treffen.

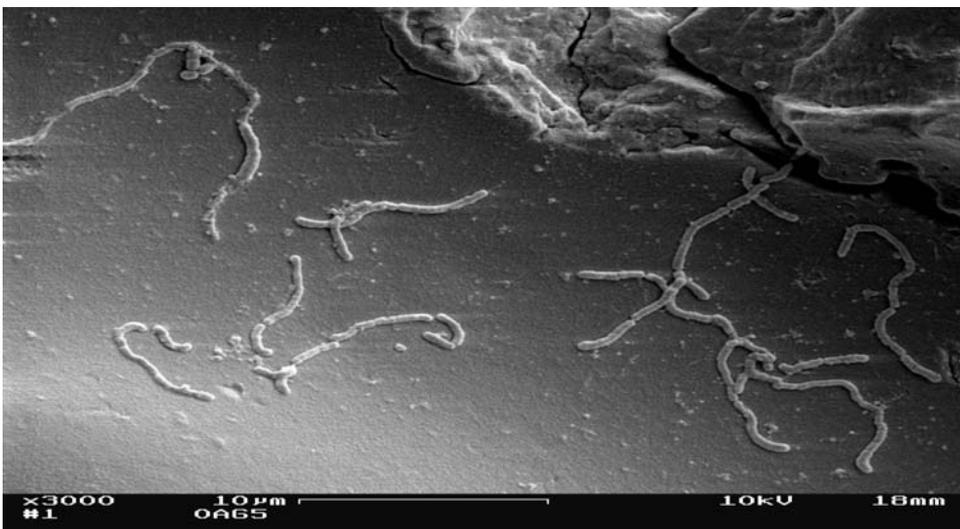
Bei den beschriebenen Beobachtungen muss darauf hingewiesen werden, dass es sich um subjektive Eindrücke handelt. Der kieferorthopädische Prüfkörper wurde orientierend in vivo bei einem Probanden ausgetestet, so dass hier individuelle Besonderheiten berücksichtigt werden müssen. Seite 34 präsentiert die Aufnahmen der silberfreien Hälften des kieferorthopädischen Gerätes (Abb. 5, 6, 7) und Seite 35 die des silberhaltigen Anteils (Abb. 8, 9, 10)



**Abb. 5.** Übersicht der Keimbesiedlung auf der Nicht-silberhaltigen Seite



**Abb. 6.** Detailaufnahme aus Abb.5 links oben, gedreht



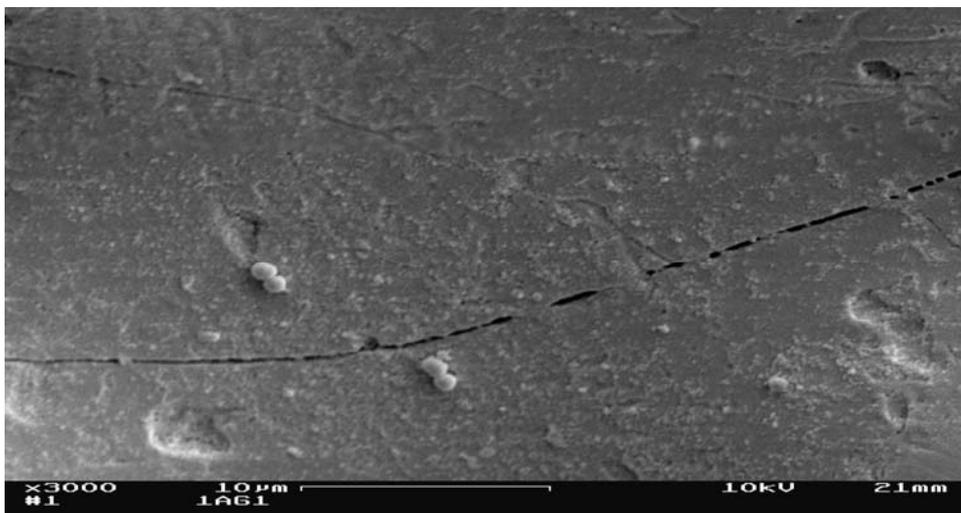
**Abb. 7.** Detailaufnahme aus einem anderen Bereich



**Abb. 8.** Übersicht über die Keimbesiedlung auf der silberhaltigen Seite



**Abb. 9.** Detailaufnahme aus dem markierten Bereich der Abb. 8



**Abb. 10.** Detailaufnahme aus einem anderen Bereich

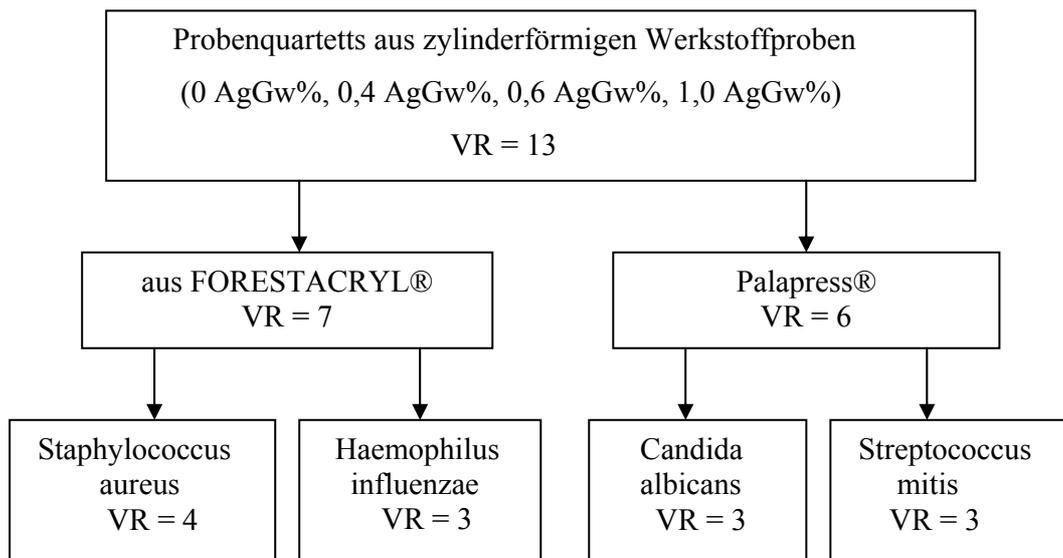
Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das anwesende Silber auf die Keimkolonisation am Kunststoffkörper eine hemmende Wirkung hat.

### 3.3 Ergebnisse der zylinderförmigen Prüfkörper

Nachfolgend soll der zweite Untersuchungsblock mit seinen Ergebnissen dargestellt werden. Für diese mikrobiologischen Experimente wurden vier repräsentative Keime der Mundflora ausgewählt. An ihnen sollte versucht werden, eine antibakterielle Wirkung des Nanosilbers im Dentalkunststoff nachzuweisen.

#### 3.3.1 Übersicht der Versuchsreihen

Nachfolgend soll eine Übersicht über die durchgeführten mikrobiologischen Versuchsreihen dargestellt werden.



AgGw% = Silbergewichtsprozent    VR = Versuchsreihen

Mit den Mikroorganismen *Haemophilus influenzae* (ATCC 49247), *Candida albicans* (ATCC 10231) und *Streptococcus mitis* (ATCC 49456) wurden jeweils drei Untersuchungsreihen durchgeführt, mit *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) vier.

### 3.3.2 Untersuchungen mit FORESTACRYL®

#### 3.3.2.1 Staphylococcus aureus ATCC 29213

Es sei an dieser Stelle gestattet, nochmals begleitend zu den Teilergebnissen das Prinzip einer Versuchsreihe darzustellen. Jede der vier zylinderförmigen Kunststoffproben wurde in ein eigenes separates Glasröhrchen gegeben. Diese wurden anschließend für 2h bei 36°C mit einer Staphylococcus aureus Suspension von  $10^8$  KBE/ml bebrütet. Diese  $10^8$  KBE/ml entsprachen dem reproduzierbaren photooptischen Wert von 0,09. Nach mehreren Waschschritten und Umsetzen der Proben in Gefäße mit reduziertem NahrungsmEDIUM sollte erreicht werden, dass Bakterien nur an der Probenoberfläche anhafteten. Wenn eine antibakterielle Wirkung eintritt, durch die in Lösung an der WerkstücksOberfläche entstehenden Silberionen, dann sollte sich dies in der Zahl der entstehenden Tochterzellen widerspiegeln. Diese wurde durch Probenentnahmen aus dem Medium nach 0, 2, 4, 6, 8 und 20 Stunden festgehalten. Die pipettierten Proben wurden auf CASO- Blutagar 24 Stunden bebrütet und anschließend ausgezählt.

**Tab. 16.** KBE Staphylococcus aureus (ATCC 29213) auf zylinderförmiger Kunststoffprobe

Nährmedium	AgGw%	0h	2h	4h	6h	8h	20h	VR	
450 µl	0	2	0	45	16	82	555	I	
		0	2	93	2	109	87	II	
		1	2	62	1	33	23	III	
	0,4	0	0	5	7	6	332	I	
		0	2	0	10	8	51	II	
		0	4	3	0	6	2	III	
	0,6	0	0	0	0	1	164	I	
		0	1	5	0	19	11	II	
		0	1	2	0	2	1	III	
	1,0	1	1	2	0	0	86	I	
		1	0	1	0	11	109	II	
		1	2	1	0	1	0	III	
		µl auf Agar	100	90	90	90	90	90	
		Konzfaktor	1	1	1	10	10	1000	
510 µl	0	0	0	16	73	31	1	IV	
	0,4	0	2	12	123	51	26	IV	
	0,6	1	0	4	6	0	1	IV	
	1,0	0	0	0	4	1	0	IV	
		µl auf Agar	100	90	90	90	90	90	
		Konzfaktor	1	1	1	1	10	1000	

KBE = Koloniebildende Einheiten  
 AgGw% = Silbergewichtsprozent  
 h = Stunden  
 VR = Versuchsreihe

µl auf Agar = ausgespatelte Lösung in µl auf Agarplatte  
 Konzfaktor = Konzentrationsfaktor  
 ATCC = American Type Culture Collection

VR nummeriert die durchgeführten vier Versuchsreihen. Es wurden zwei verschiedene Mengen Nährmedium eingesetzt, um sicherzustellen, dass das Probenwerkstück zu jeder Zeit mit ausreichendem Medium bedeckt ist. Der Grund bestand darin, dass im Verlauf der 20 stündigen Bebrütung ein Anteil der Lösung im Brutschrank trotz Abdeckung verdunstete. Diese Abweichung von den Versuchsreihen I – III brachte jedoch mit sich, dass zu den frühen Messzeiten die zählbaren koloniebildenden Einheiten vermehrt mit Null notiert werden musste, d. h. es sank die Wahrscheinlichkeit abgegebene Tochterzellen aufzunehmen. Dies entspricht zwar lediglich einer Verdünnung im Messsystem, jedoch bleibt bei Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die Null bestehen.

Nach Umrechnung mit folgenden Formeln in KBE / ml wurden die Daten der vier Versuchsreihen vergleichbar. Die Ergebnisse der vierten Versuchsreihe müssen zusätzlich mit dem Verdünnungsfaktor 1,133 multipliziert werden, um die unterschiedlichen Ausgangsgesamtlösungen auszugleichen.

**Tab. 17.** Umrechnungsformeln in KBE Staphylococcus aureus (ATCC 29213) / ml

Versuchsreihennummer	Umrechnungsformel
I, II, III	$\frac{\text{gezählte KBE} \times \text{Konzentrationsfaktor} \times 1000 \mu\text{l}}{\text{ausgespatelte } \mu\text{l}}$
IV	$\frac{\text{gezählte KBE} \times \text{Konzentrationsfaktor} \times 1000 \mu\text{l} \times \mathbf{1,133}}{\text{ausgespatelte } \mu\text{l}}$

KBE = Koloniebildende Einheiten

Die nachfolgende Tabelle enthält alle Bakterienkonzentrationen zu den gemessenen Zeiten. Die Werte wurden nach der Werkstücksart sortiert, beginnend mit der silberfreien Probe.

**Tab. 18.** Konzentrationswerte in KBE Staphylococcus aureus (ATCC 29213) / ml

AgGw%	0 h	MW	2 h	MW	4 h	MW	6 h	MW	8 h	MW	20 h	MW	VR
0	20	8	0	11	500	606	1.778	758	9.111	7.198	6.166.667	1.850.371	I
	0		22		1.033		222		12.111		966.667		II
	10		22		689		111		3.667		255.556		III
	0		0		202		919		3.904		12.593		IV
0,4	0	0	0	23	56	60	778	860	667	2.161	3.688.889	1.151.296	I
	0		22		0		1.111		889		566.667		II
	0		44		33		0		667		22.222		III
	0		25		151		1.549		6.422		327.407		IV
0,6	0	3	0	6	0	32	0	19	111	611	1.822.222	492.037	I
	0		11		56		0		2.111		122.222		II
	0		11		22		0		222		11.111		III
	11		0		50		76		0		12.593		IV
1,0	10	8	11	8	22	11	0	13	0	365	955.556	541.667	I
	10		0		11		0		1.222		1.211.111		III
	10		22		11		0		111		0		II
	0		0		0		50		126		0		IV

KBE/ml = Koloniebildende Einheiten pro Milliliter    ATCC = American Type Culture Collection  
 AgGw% = Silbergewichtsprozent    MW = Mittelwert  
 VR = Versuchsreihe    h = Stunden

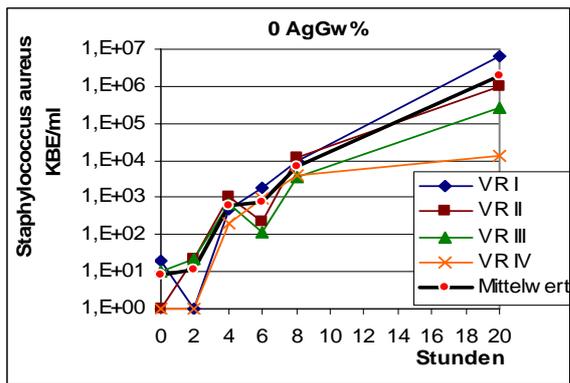
Jede Probe in ihrem separaten Glas bildete für sich ein eigenes biologisches Kompartement. Die Zahl der zu Beginn der Messreihe anhaftenden Bakterien wurde nicht bestimmt.

Es ist unerheblich, ob Median- oder Mittelwerte angegeben werden, die Standardabweichung übersteigt beide Größen und somit ist keiner der beiden Werte statistisch auswertbar. Lediglich der besseren Übersichtlichkeit wurde dennoch der Mittelwert (MW) angegeben.

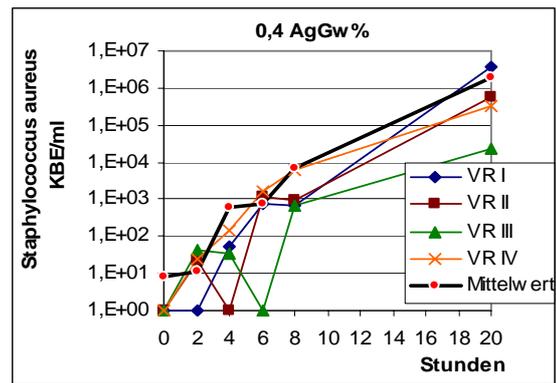
Identische Versuchswerte schwanken um einen Faktor von bis zu  $10^6$  (z.B.: 1 AgGw%, 20 h: VR I zu VR III).

Getrennt für die einzelnen Silberkonzentrationen ergaben sich folgende graphische Darstellungen. Um die semilogarithmischen Graphiken zu konstruieren, mussten alle „Null“ Werte von Tab. 18 mit dem Wert 1 ersetzt werden.

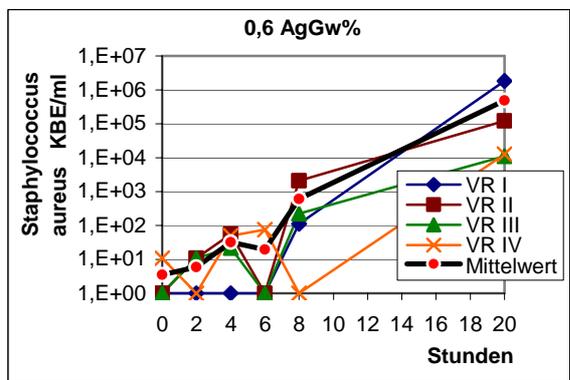
Der Mittelwert wurde in die graphische Darstellung eingebaut damit der Trend der Kurven erkannt werden kann.



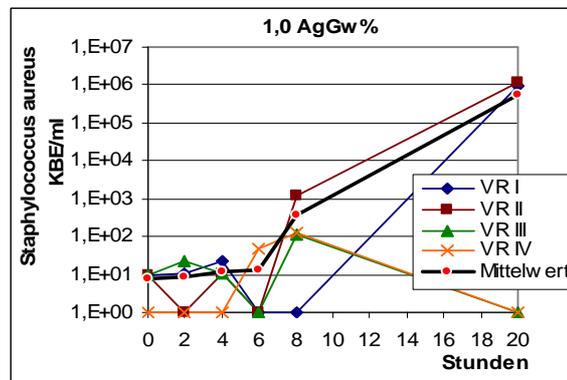
**Abb. 11.** Keimkonzentrationen an 0 AgGw% - Proben



**Abb. 12.** Keimkonzentration an 0,4 AgGw% - Proben



**Abb. 13.** Keimkonzentration an 0,6 AgGw% - Proben

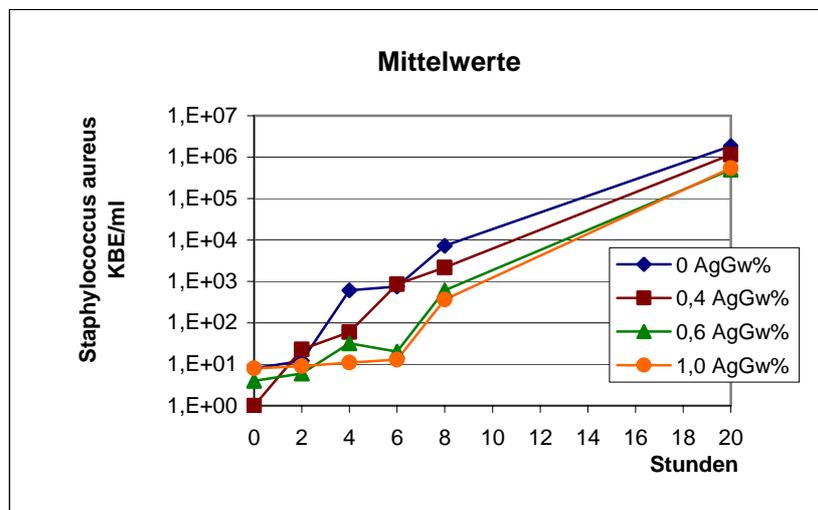


**Abb. 14.** Keimkonzentration an 1,0 AgGw% - Proben

AgGw% = Silbergewichtsprozent  
VR = Versuchsreihe

KBE/ml = Koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Werden von den vier Werkstoffarten (0, 0,4, 0,6 und 1,0 AgGw%) deren zugehörigen Mittelwertgraphen in ein separates Diagramm eingetragen, ergibt sich nachfolgendes Bild.



**Abb. 15.** Mittelwertkeimkonzentration der einzelnen Silberkonzentrationen

AgGw% = Silbergewichtsprozent

KBE/ml = Koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Der 0- Stunden- Wert sollte idealer Weise bei 1 zu liegen kommen, da es erwünscht war, zu Beginn der Untersuchungsreihe gar keine Keime in der Lösung zu haben. Hier schwanken die Werte zwischen 1 und 8 und stellen sich in dieser Grafikform als deutliche Abweichung dar. Diese Keimzahl gewinnt jedoch insofern an Bedeutung, als dass diese Keime sich in der Lösung auch vermehren und die Werte der später folgenden Probenentnahmen erhöhen.

Der 2- Stunden- Wert spiegelt die Latenzphase einer Flüssigkultur wieder. Die am Objekt angelagerten *Staphylococcus aureus* adaptieren sich an die nährstoffbeschränkte Kultur.

Nach 4, 6 und 8 Stunden konnten folgende Beobachtungen gemacht werden. Trotz der erheblichen Keimzahlschwankungen beim Vergleich der einzelnen Versuchsreihen (VR I – IV) konnte eine Reduktion der vermehrungsfähigen Bakterien bei Silberanwesenheit dargestellt werden. Allgemein betrachtet, je höher die Silberkonzentration (0,4 AgGw%, 0,6 AgGw%, 1,0 AgGw%), desto geringer die Zahl der teilungsfähigen Organismen am Probenwerkstück. Die Größenordnung der Keimreduktion beläuft sich maximal, im Vergleich zwischen 0 AgGw% und 1,0 AgGw%, um ca. zwei 10er Potenzen im klinisch relevanten Tragezeitraum von kieferorthopädischen Geräten bei drei bis sieben Stunden.

Wie erwartet, konnte nach 20 Stunden Kulturbeobachtung kaum mehr Differenzen in der Keimzahl festgestellt werden. Die über diese Zeit in die Lösung abgegeben Tochterzellen reproduzierten sich im angebotenen reduzierten Nährstoffmedium selbstlimitierend. Die ermittelten Keimmengen entsprechen der zum 20 h Zeitpunkt maximal noch möglich lebensfähigen Zellen.

Einpolymerisiertes Nanosilber in FORESTACRYL® zeigte mit steigender Konzentration des Silberanteils eine zunehmende antimikrobielle Wirkung gegen einen Teststamm *Staphylococcus aureus*. Zwischen dem 0,6 prozentigen und dem 1,0 prozentigen Silberanteil im Probenwerkstücke ließen sich keine Unterschiede in der antibakteriellen Wirkung feststellen.

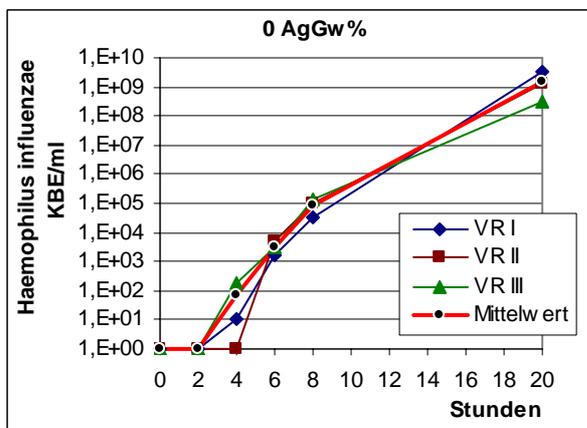
### **3.3.2.2 Haemophilus influenzae ATCC 49247**

Die Ansatzlösung von  $10^8$  KBE/ml entsprach einer photooptischen Dichte von 0,13.

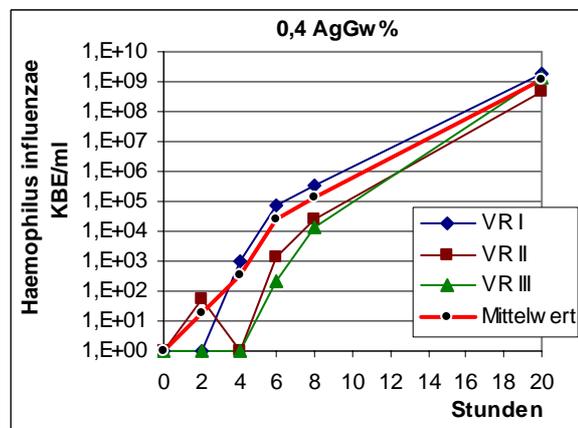
Bei der Untersuchung von *Haemophilus influenzae* ergaben sich folgende Besonderheiten. Die ausgezählten Koloniebildenden Einheiten (KBE) von *Haemophilus influenzae* aller drei Versuchsreihen sind in Tabelle 21 im Anhang einsehbar sowie die Ergebnisse nach

Umrechnung in KBE / ml (Tabelle 22). Dazu wurde die unter **3.3.2.1 Tab. 17** bereits erwähnte Formel verwendet.

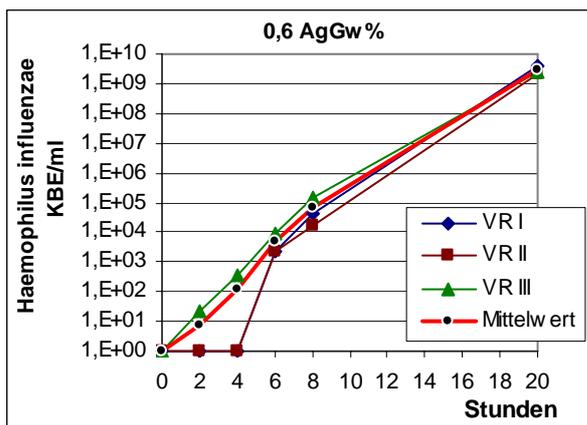
Im Vergleich zu den Versuchswerten von *Staphylococcus aureus* schwanken hier identische Versuchswerte um maximal einen Faktor von  $10^2$  (0,6 AgGw%, 4 h: VR II zu VR III). Auch bei diesen Werten war es nicht sinnvoll den Mittelwert statistisch auszuwerten, da die Standardabweichung diesen übersteigt. Für die grafische Darstellung wurde er der besseren Übersichtlichkeit dennoch herangezogen. Getrennt für die einzelnen Silberkonzentrationen ergaben sich folgende Darstellungen. Aufgrund der halblogarithmischen Darstellung mussten die in Tabelle 22 enthaltenen „Null“ Werte mit dem Wert 1 ersetzt werden.



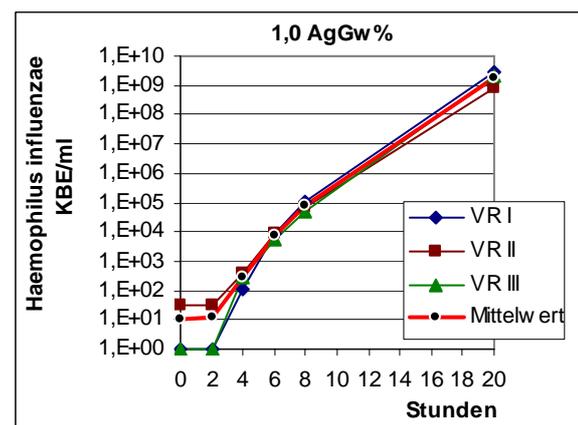
**Abb. 16.** Keimkonzentrationen an 0 AgGw% - Proben



**Abb. 17.** Keimkonzentration an 0,4 AgGw% - Proben



**Abb. 18.** Keimkonzentration an 0,6 AgGw% - Probe

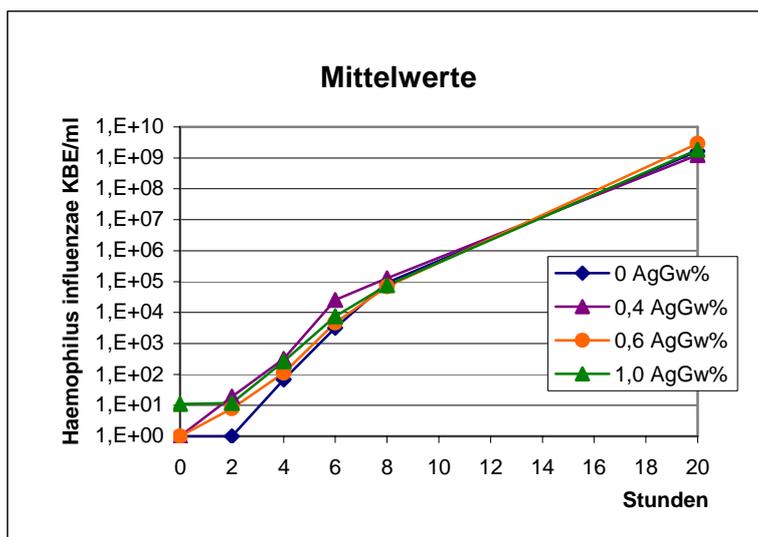


**Abb. 19.** Keimkonzentration an 1,0 AgGw% - Probe

AgGw% = Silbergewichtsprozent  
VR = Versuchsreihe

KBE/ml = Koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Fasst man nun deren Mittelwertlinien in einer Darstellung zusammen, ergibt sich folgendes Bild.



**Abb. 20.** Mittelwertkeimkonzentrationen der einzelnen Silberkonzentrationen

AgGw% = Silbergewichtsprozent

KBE/ml = Koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Der 0- Stunden- Wert lag zwischen 0 – 10 KBE / ml.

Nach 2 Stunden ist bei allen Silberkonzentrationen tendenziell eine langsame Keimvermehrung erkennbar. Alle 4 Graphen verlaufen annähernd auf derselben Keimkonzentrationshöhe. Die Ergebnisse der 20 h Kultur stellen die maximal möglich lebensfähigen *Haemophilus influenzae* zu diesem Zeitpunkt dar.

In dem für die kieferorthopädische Tragezeit interessanten Zeitfenster von 4, 6 und 8 h ist keine Wachstumshemmung von *Haemophilus influenzae* durch das zugefügte Nanosilber feststellbar.

### 3.3.3 Untersuchungen mit Palapress®

Mit der Bakterienart *Streptococcus mitis* und dem Hefepilz *Candida albicans* wurden die gleichen mikrobiologischen Experimente durchgeführt, jedoch bestanden die Werkstückproben aus dem Prothesenkunststoff Palapress®.

#### 3.3.3.1 *Streptococcus mitis* ATCC 49456

Die Ansatzlösung von  $10^8$  KBE/ml entsprach einer reproduzierbaren optischen Dichte der Lösung von 0,45.

Die gezählten Koloniebildenden Einheiten sind in Tabelle 23 des Anhangs aufgelistet, Tabelle 24 (Anhang) zeigt die umgerechneten KBE *Streptococcus mitis* pro Milliliter auf.

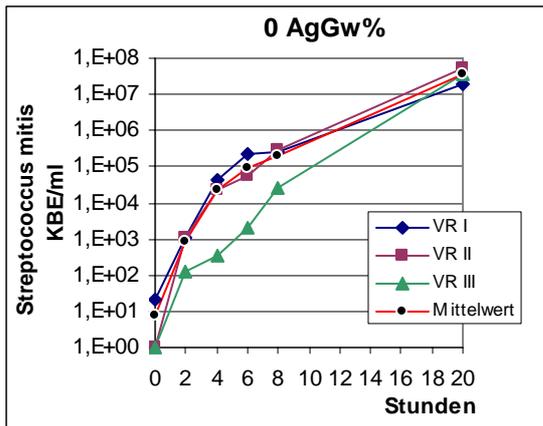


Abb. 21. Keimkonz. an 0 AgGw% - Probe

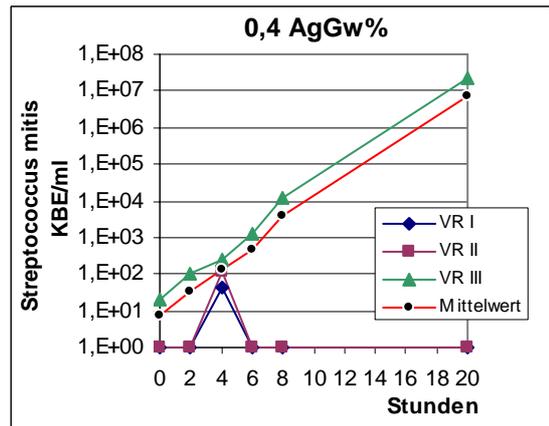


Abb. 22. Keimkonz. an 0,4 AgGw% - Probe

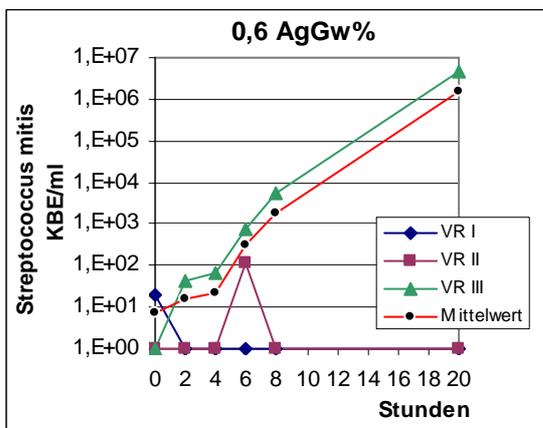


Abb. 23. Keimkonz. an 0,6 AgGw% - Probe

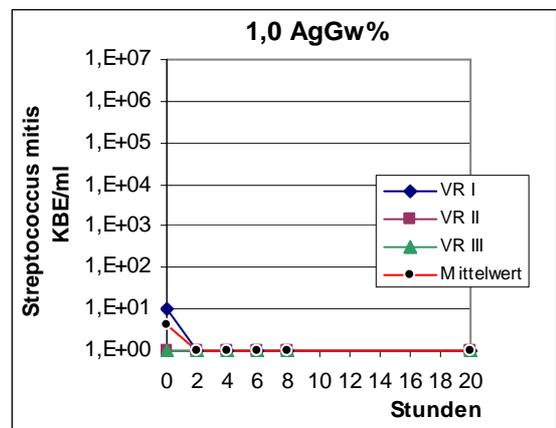


Abb. 24. Keimkonz. an 1,0 AgGw% - Probe

AgGw% = Silbergewichtsprozent  
VR = Versuchsreihe

KBE/ml = Koloniebildende Einheiten pro Milliliter  
Keimkonz. = Keimkonzentration

Fasst man nun deren Mittelwertlinien in einer Darstellung zusammen, ergibt sich folgendes Bild.

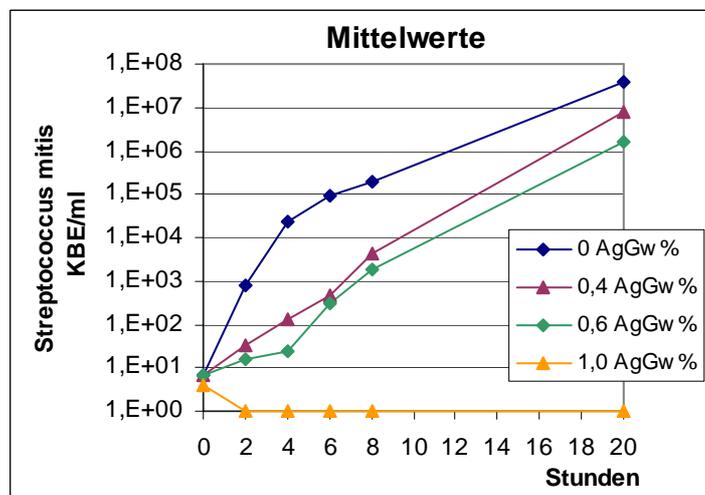


Abb. 25. Mittelwertkeimkonz. der einzelnen Silberkonzentrationen

AgGw% = Silbergewichtsprozent

KBE/ml = Koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Bei diesem Bakterium zeigte sich bei dieser Versuchsmethode die größte antibakterielle Wirkung. Der 0- Stunden- Wert lag im Mittel bei 7 KBE/ml und stellt somit gleiche Ausgangsbedingungen dar. Mit zunehmendem Silbergehalt nimmt die Steigung der Graphen ab. Die Ergebnisse der Probenentnahme nach vier Stunden zeigen eine Keimreduktion um gut zwei Logstufen, vergleicht man die silberfreien Proben mit den 0,4 Gewichtsprozent silberenthaltenden Palapress® Proben. Im Vergleich zu den 1,0 Gewichtsprozent silberversetzten Proben kann eine Streptococcus mitis Reduktion um den Faktor 10 000 abgelesen werden. In drei unabhängigen Versuchsreihen wurden nach zwei Stunden keine Keime im reduzierten Nährmedium bei den Proben mit der hier untersuchten höchsten Silberkonzentration gefunden.

Dieses Ergebnis wurde kritisch hinterfragt. In wie weit lagern sich überhaupt Keime an dieses modifizierte Probenmaterial an? Es bestünde die Möglichkeit, dass die Oberflächenbeschaffenheit mit zunehmenden Silbergehalt sich verändert. Diese Tatsache könnte eine Rolle spielen, dass sich gar keine Streptococci mitis an diese Materialproben anlagern. Aufgrund dieser Überlegungen wurde ein zusätzlicher experimenteller Ansatz aufgestellt. Die neu aufgeworfene Frage wurde im Abschnitt Fluoreszenzfarbstoff geklärt. Lagern sich diese Bakterien anfänglich wie ideell vorgestellt an, so werden die Ergebnisse wie folgt interpretiert. Die Werte nach sechs, acht und 20 Stunden sind die Folge der zu Beginn wirkenden antibakteriellen Wirkung auf die angelagerten Streptococci in Abhängigkeit der Silberkonzentration in dem Kunststoffmaterial. Die mit Nanosilber versetzten Palapress® Proben entfalten bereits ab einem Gehalt von 0,4 Gewichtsprozent eine deutliche antibakterielle Wirkung gegenüber der untersuchten Streptococci Art.

Bei den hier untersuchten Mikroorganismen zeigte sich bei dem Streptococcus mitis Stamm ATCC 49456 der stärkste antibakterielle Effekt.

### **3.3.3.2 Candida albicans ATCC 10231**

Die optische Dichte für eine Keimkonzentration von  $10^8$  KBE/ml wurde bei 1,5 experimentell ermittelt.

Da Candida albicans ein im Vergleich zu den bisher untersuchten Spezies ein deutlich langsames Wachstum zeigt, wurden die Zeiten der Probenentnahme verändert. Zu der Ausgangssituation wurden nach 10, 12, 14, 16 und 20 Stunden die Candida albicans Konzentrationen in den biologischen Systemen festgehalten. Die erhaltenen Rohdaten sind in der Tabelle 25 (Anhang) aufgelistet. Tabelle 26 (Anhang) stellt die von den

einzelnen Versuchsreihen vergleichbaren Daten dar, diese wurden in den nachfolgenden graphischen Darstellungen untergebracht.

Wie auch bei den vorangegangenen Untersuchungen es nicht möglich den Mittelwert statistisch auszuwerten. Für die grafische Darstellung wurde er der besseren Übersichtlichkeit dennoch herangezogen. Getrennt für die einzelnen Silberkonzentrationen ergaben sich folgende Darstellungen. Aufgrund der halblogarithmischen Darstellung mussten die in Tabelle 26 enthaltenen „Null“- Werte mit dem Wert 1 ersetzt werden.

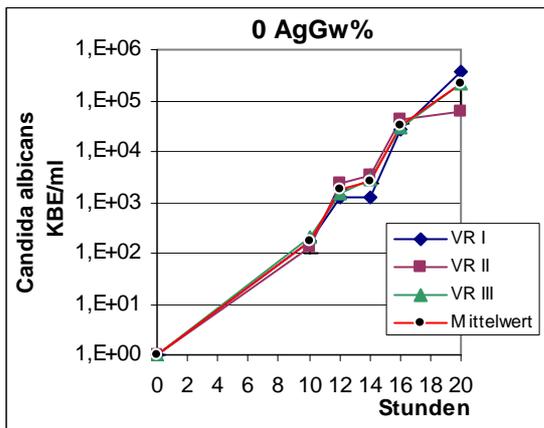


Abb. 26. Keimkonz. an 0 AgGw% - Probe

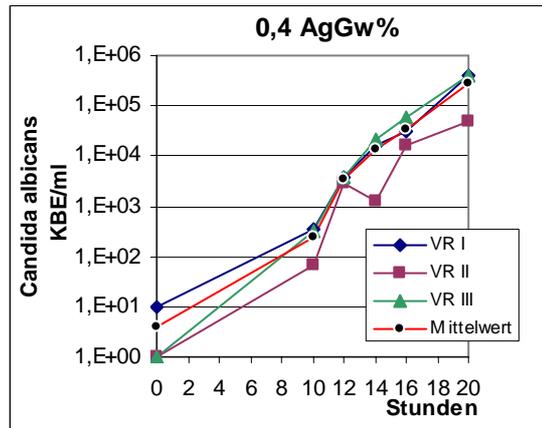


Abb. 27. Keimkonz. an 0,4 AgGw% - Probe

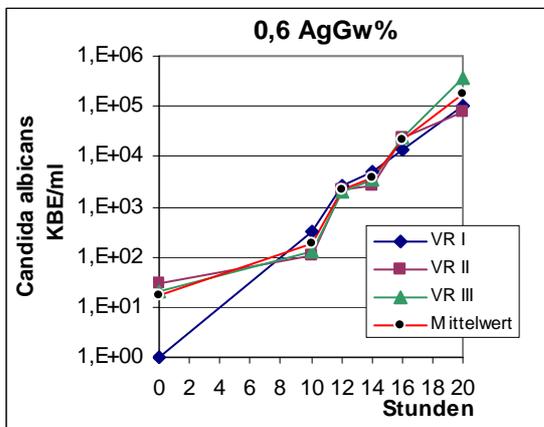


Abb. 28. Keimkonz. an 0,6 AgGw% - Probe

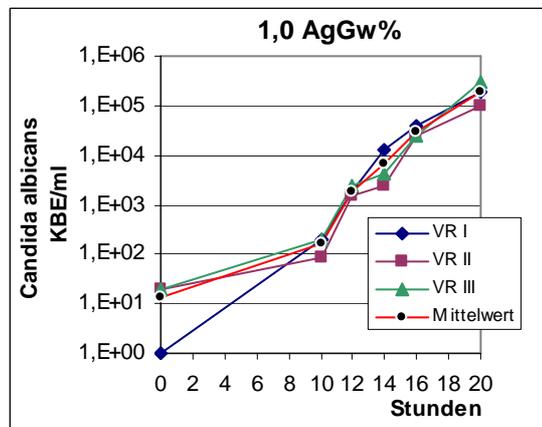
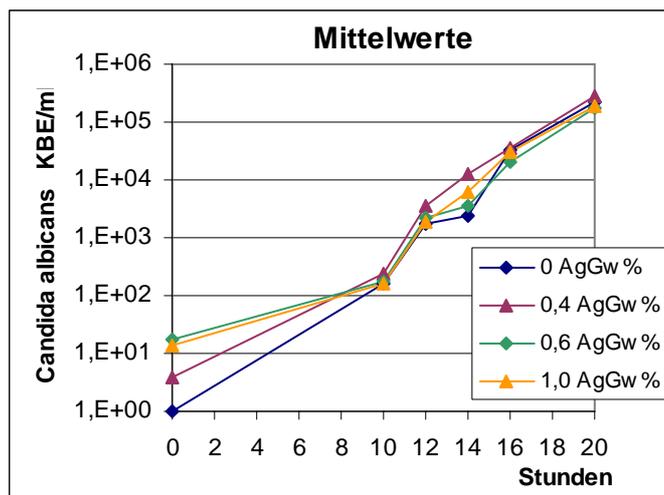


Abb. 29. Keimkonz. an 1,0 AgGw% - Probe

AgGw% = Silbergewichtsprozent  
VR = Versuchsreihe

KBE/ml = Koloniebildende Einheiten pro Milliliter  
Keimkonz. = Keimkonzentration

Fasst man nun deren Mittelwertlinien in einer Darstellung zusammen, ergibt sich folgendes Bild.



**Abb. 30.** Mittelwertkeimkonz. der einzelnen Silberkonzentrationen

AgGw% = Silbergewichtsprozent

KBE/ml = Koloniebildende Einheiten pro Milliliter

Die Ausgangssituation stellt sich nicht ideal mit gleicher Keimkonzentration dar. Für das klinisch interessante Zeitfenster von 0 bis 10 Stunden, könnte eine geringe fungizide Wirkung behauptet werden. Wird der Graphenanstieg in dem genannten Zeitraum von der 0 und der 1,0 Silbergewichtsprozent enthaltenden Palapress® Proben verglichen, kann ein geringfügig flacherer Anstieg der *Candida albicans* Konzentration bei dem Nanosilber versetzten Probenwerkstück beobachtet werden. Nach diesem Zeitraum ist allerdings keine wachstumshemmende Wirkung mit der hier angewandten Methode nachweisbar. Die Graphen der vier Silberkonzentrationen stellen sich nach dem 10 Stundenwert mit annähernd demselben Anstieg dar.

Mit dieser Methode konnte kein Nachweis einer fungiziden Wirkung des Nanosilbers in den Palapress® Proben erbracht werden, da die gemessenen wachstumshemmenden Wirkungen innerhalb der ersten zehn Stunden in einem Bereich von nur 100 Mikroorganismen liegen.

### 3.4 Ergebnisse der objekträgerförmigen Prüfkörper

Nachfolgend soll der dritte Untersuchungsblock mit seinen Ergebnissen dargestellt werden. Methodisch wurde sich eines speziellen Fluoreszenzfarbstoffes LIVE/DEAD® bedient, der in der Lage war, Bakterien mit zerstörter Membran rot und Bakterien mit intakter Außenhülle grün fluoreszierend darzustellen. Wobei alle Membranen mit dem grünen Farbstoff STYO 9 dye markiert wurden. Das heißt zusammengefasst, stellt sich ein

Bakterium neben einem grünen zusätzlich mit einem roten Signal dar, ist es tot oder zumindest nicht mehr vermehrungsfähig. Als Instrument diente ein Konfokalmikroskop.

Zwei Dinge sollten in diesem Versuchsabschnitt geklärt werden.

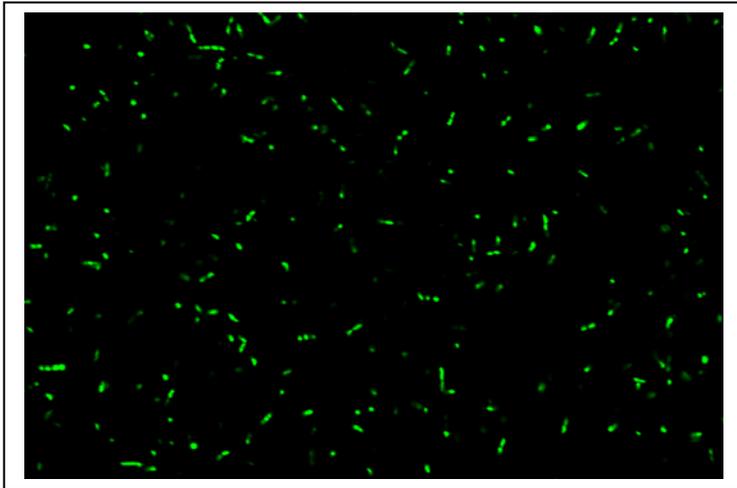
Aus den Versuchsreihen von **3.3.3.1** ergab sich die Fragestellung, ob sich die hier untersuchten Kokken an das Material mit einem Gewichtsprozent Silber überhaupt erst anlagern oder ob durch Besonderheiten (vermutlich das beigefügte Silber), die Keimadhäsion verhindert ist.

Neben der antibakteriellen Wirkung an *Streptococcus mitis* wurden solche Effekte, wenn auch in einem geringeren Ausmaß an *Staphylococcus aureus* gefunden (**3.3.2.1**). Die mit der mikrobiologischer Methode festgestellte Wirkung sollte mit einer anderen Methode untermauert werden.

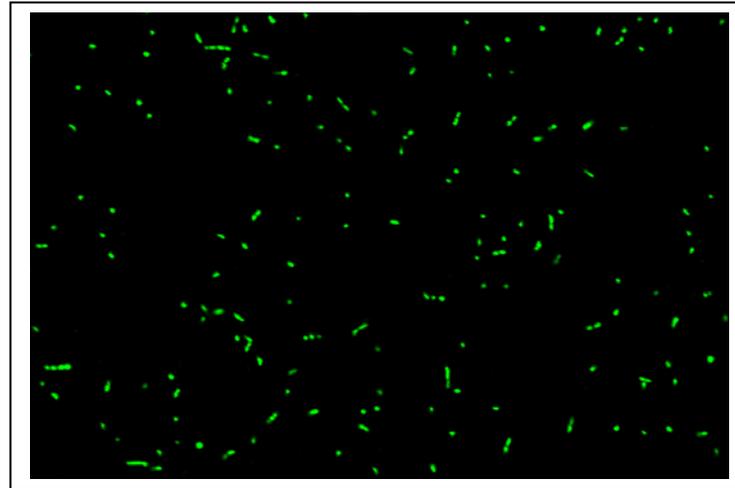
#### **3.4.1 Streptococcus mitis Anlagerung an eine Palapress®Probe**

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde auch das objekträgerförmige Probenwerkstück für zwei Stunden bei 36°C und unter einer 5 prozentigen CO<sub>2</sub> Spannung in eine 10<sup>8</sup> KBE *Streptococcus mitis* / ml Lösung gelegt. Unmittelbar nach Entnahme aus dieser Ansatzlösung wurde der Probenkörper abgespült und mit dem Farbstoff benetzt. Die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse müssen dem Zeitpunkt Null der mikrobiologischen Untersuchungen gegenübergestellt werden.

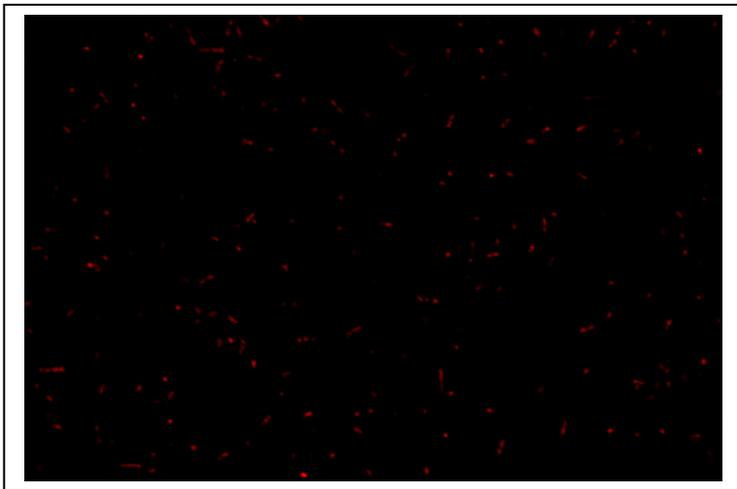
Nachfolgende Aufnahmen wurden festgehalten. Gezeigt werden zum einen die direkten Aufnahmen (**A**) und zum anderen die modifizierten Aufnahmen (**B**). Letztere entstand durch Veränderungen des Kontrastes und subjektiver Entfernung aller undeutlichen Farbsignale einschließlich solcher Objekte, die nicht eindeutig als Kokken identifiziert wurden. Seite 49 zeigt hierbei die Aufnahmen der silberfreie Probenseite und Seite 50 die Aufnahmen von der Palapress® - Hälfte mit den inkorporierten Nanosilberpartikeln in einer Größenordnung von einem Gewichtsprozent.



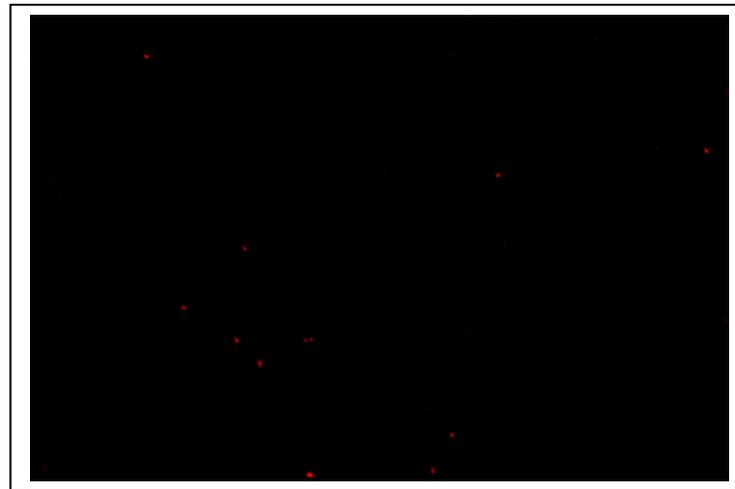
**Abb. 31.** A - 0 AgGw% - alle Zellen



**Abb. 32.** B - 0 AgGw% - alle Zellen

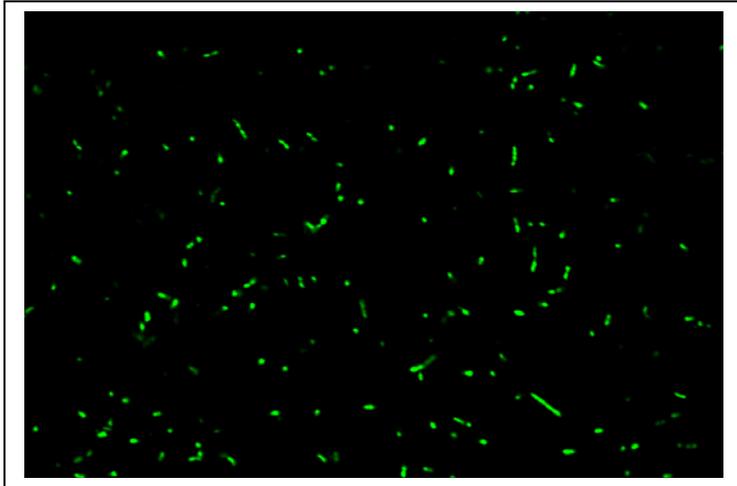


**Abb. 33.** A - 0 AgGw% - tote Zellen

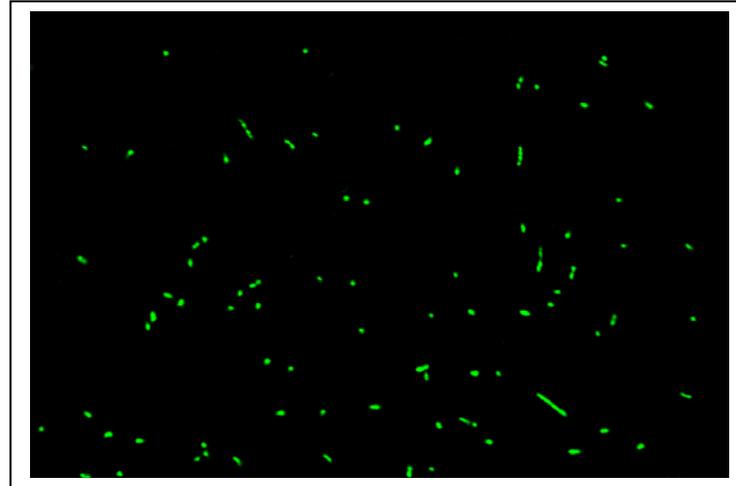


**Abb. 34.** B - 0 AgGw% - tote Zellen

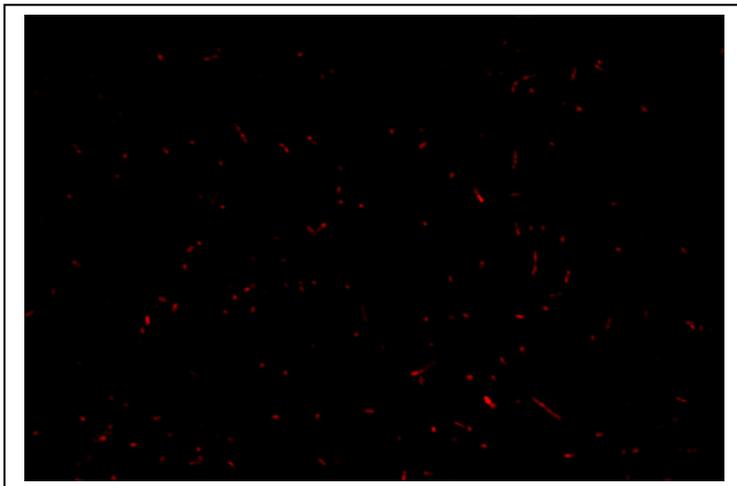
A = unbearbeitete Aufnahme    B = bearbeitete Aufnahme    AgGw% = Silbergewichtsprozent



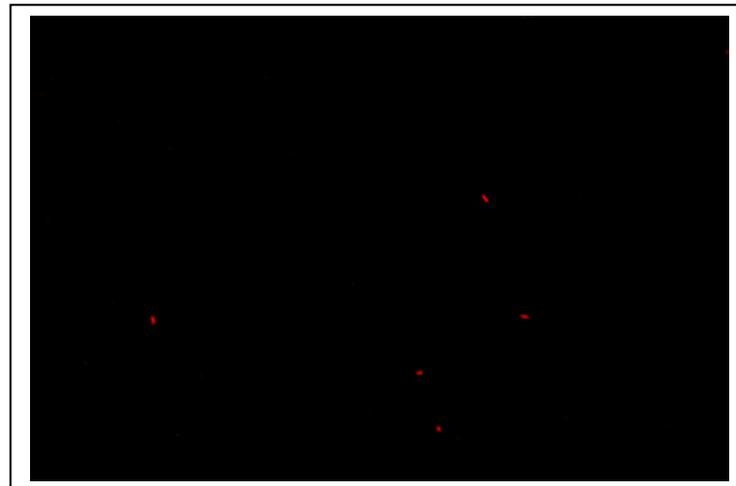
**Abb. 35.** A - 1 AgGw% - alle Zellen



**Abb. 36.** B - 1 AgGw% - alle Zellen



**Abb. 37.** A - 1 AgGw% - tote Zellen



**Abb. 38.** B - 1 AgGw% - tote Zellen

A = unbearbeitete Aufnahme    B = bearbeitete Aufnahme    AgGw% = Silbergewichtsprozent

Die Abbildungen 31–34 zeigen Ausschnitte von der silberfreien Hälfte der objektträgerförmigen Probe und die Abbildungen 35–38 stellen den gewonnenen Eindruck auf der silberhaltigen Hälfte dar.

Tabelle 19 fasst die in diesen Ausschnitt gezählten *Streptococcus mitis* zusammen.

**Tab. 19.** Anzahl der Fluoreszenzsignale der Bilder **B**

	<b>STYO 9 dye</b> (grün)	<b>Propidium iodide</b> (rot)	<b>Verhältnis</b>
<b>0</b> <b>AgGw%</b>	312	15	21 : 1
<b>1</b> <b>AgGw%</b>	209	18	12 : 1

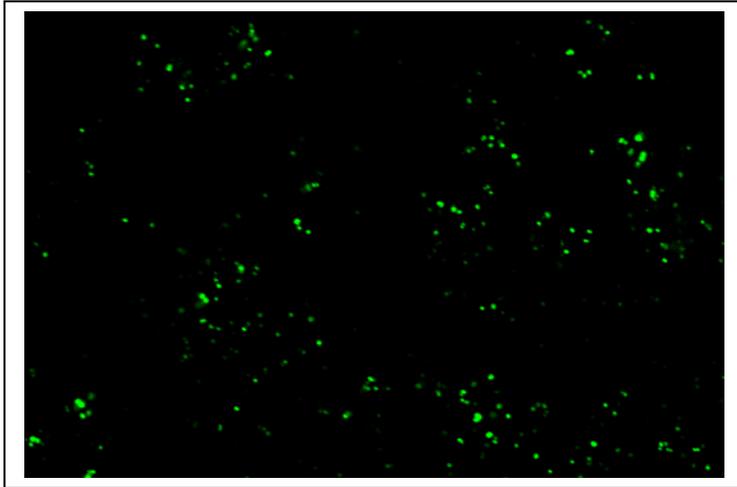
AgGw% = Silbergewichtsprozent

Die vorgestellte Untersuchung zeigt, dass sich an die silberenthaltende Probenhälfte während der Anlagerungszeit weniger Keime anhaften als an die Nichtsilberseite. In diesem Fall handelt es sich um 33% weniger *Streptococcus mitis*. Außerdem wurde festgestellt, dass im Verhältnis bereits mehr zellwandgeschädigte Bakterien bei der silberenthaltenden Probe festzustellen waren.

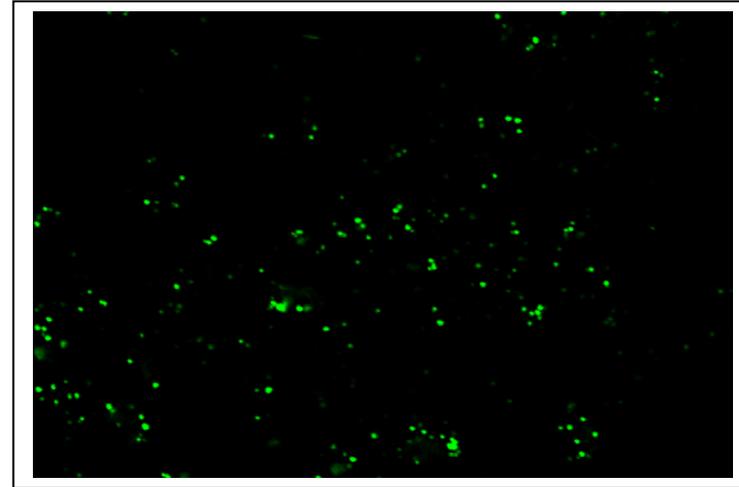
Die Fragestellung, ob sich *Streptococcus mitis* an das silberhaltige Material anlagert, kann mit „ja“ beantwortet werden.

### **3.4.2 Staphylococcus aureus an FORESTACRYL®Proben**

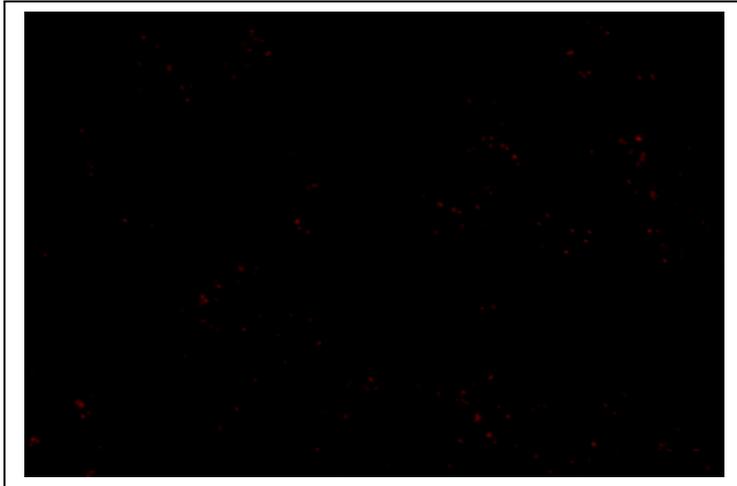
Um einen annähernden Vergleich bilden zu können, wurde die objektträgerförmige FORESTACRYL® Probe für zwei Stunden wie bei allen bisher beschriebenen Untersuchungen in eine  $10^8$  konzentrierten *Staphylococcus aureus* Ansatzlösung bei 36°C gelegt, danach abgespült und für zwei Stunden in eine reduzierte Nährlösung wiederum bei 36°C belassen. Nach diesen zwei Stunden wurde das anhaftende Nährmedium abgespült und der Probenkörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff benetzt. Die nachfolgenden Bilder wurden der Übersichtlichkeit wegen nur im Original abgebildet, das heißt, selbe Mikroskopeinstellungen für alle dargestellten Ausschnitte.



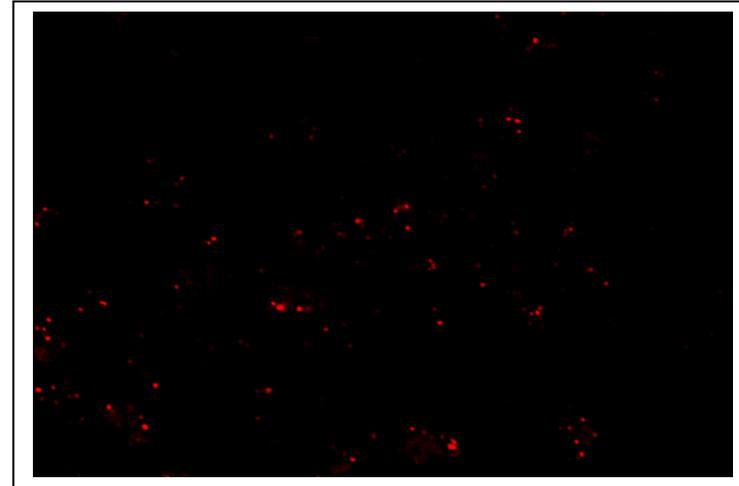
**Abb. 39.** STYO9 – Staph. aureus – 0 AgGw% - 2 h



**Abb. 40.** STYO 9 – Staph. aureus – 1 AgGw% - 2 h



**Abb. 41.** Propidium iodide – Staph. aureus – 0 AgGw% - 2 h  
AgGw% = Silbergewichtsprozent



**Abb.42.** Propidium iodide – Staph aureus – 1 AgGw% - 2 h

Bei der Auswertung der hier dargestellten Konfokalmikroskopaufnahmen sollte beachtet werden, dass diese Experimente orientierenden Charakter haben sollten, die eine tendenzielle qualitative Aussage ermöglichen. Dennoch sind zwei Dinge festzustellen. Zum einen, dass auf der Silberseite weniger zellwandintakte Staphylococci in Form von grünen Lichtsignalen zu erkennen sind, als auf der Nichtsilberseite. Das heißt, das inkorporierte Nanosilber scheint auch eine hemmende Wirkung auf das Anlagerungsverhalten zu zeigen. Und zum anderen kann festgehalten werden, dass die Propidium iodide Signale (rot) auf der Seite mit dem Silbergehalt von einem Gewichtsprozent extrem schwach sind und in meiner subjektiven Festlegung des Schwellenwerts überwiegend als nicht markant eingeordnet wurden. Im Gegenzug kann auf der Nichtsilberseite eine deutlich größere Anzahl an eindeutig roten Lichtsignalen ausgemacht werden. Es kann vermutet werden, dass nach zwei Stunden Kontaktzeit an dem mit einem Gewichtsprozent versetztem Silberkunststoff eine antibakterielle Wirkung auf den *Staphylococcus aureus* zu verzeichnen ist.

Damit wurde die aus den mikrobiologischen Untersuchungen hervorgehende Aussage, dass das Nanosilber auf den <i>Staphylococcus aureus</i> Stamm ACTT 29213 wachstumshemmend wirkt, bestätigt.
--

### **3.5 Gesamtaussage**

Alle Teilergebnisse zusammenfassend stellt Tabelle 20 dar.

**Tab. 20.** Ergebnisübersicht

<p>Prüfkörper</p>		<p>Silbergewichtsprozent    0    0,4    0,6    1,0</p> <p>FORESTACRYL®    </p> <p>Palapress®    </p>			
<p>Diagnostische Methode</p>	<p>Rasterelektronenmikroskop</p>	<p>Mikrobiologische Untersuchungen</p>		<p>Fluoreszenzfarbstoff LIVE/DEAD®</p>	
<p>Dental-kunststoff</p>	<p>FORESTACRYL®</p>	<p>Palapress®</p>	<p>FORESTACRYL®</p>	<p>Palapress®</p>	<p>FORESTACRYL®</p>
<p>Ergebnisse</p>	<p>Zwei Dinge konnten mit dieser Methode erfasst werden. Zum einen wurden Nanosilberpartikel an der Kunststoffoberfläche nachgewiesen und zum anderen konnte eine Wachstumshemmung der Mikroflora auf der Silberkunststoffseite festgestellt werden.</p>	<p>Bereits ab einem Gehalt von 0,4 Gewichtsprozent Nanosilber entfalten die Proben eine deutliche antibakterielle Wirkung gegenüber Streptococcus mitis. Bei Candida albicans konnte kein Nachweis einer fungiziden Wirkung erzielt werden.</p>	<p>Mit steigender Konzentration des Silberanteils war eine zunehmende antibakterielle Wirkung gegen Staphylococcus aureus feststellbar. Haemophilus influenzae wurde hingegen nicht in seinem Wachstum beeinträchtigt.</p>	<p>Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass neben der antibakteriellen Wirkung bei Silberanwesenheit Streptococcus mitis zusätzlich in seiner Oberflächenkolonisation gehemmt wird</p>	<p>Die aus den mikrobiologischen Untersuchungen hervorgegangene Aussage, dass das Nanosilber auf den Staphylococcus aureus wachstumshemmend wirkt, wurde bestätigt.</p>

## **4 Diskussion**

### **4.1 Antimikrobielle Stoffe**

#### **4.1.1 Infektionsprohylaxe**

Infektionsprohylaxe beschreibt weit reichende Vorgänge. Bei gesunden Individuen beschränken sie sich auf allgemein übliche Hygienemaßnahmen. Bei medizinischen Untersuchungen sind vorgeschriebene weiterführende prophylaktische Maßnahmen zu ergreifen, den Gesundheitsstatus zu erhalten. Je schwächer die Immunabwehr eines Organismus ist, desto invasivere Schritte müssen unternommen werden.

#### **Hygienemaßnahmen**

Unter Hygiene werden im engeren Sinne Maßnahmen verstanden, die Infektionskrankheiten vorbeugen, insbesondere die Reinigung und Desinfektion. Zu den wichtigsten Auslösern von Infektionskrankheiten zählen Bakterien, Viren, Pilze, Protozoen und Prionen. Dabei ist die Gefahr eines Krankheitsausbruches wesentlich von der Virulenz der Erreger abhängig.

Die einfachste Hygienemaßnahme ist das Waschen des Körpers, im Wesentlichen der Hände mit Seife. Auch die Mundhygiene mit Zahnpflege / Prothesenpflege zählt zu diesen elementaren Hygienemaßnahmen. Für steriles Arbeiten werden mindestens Schutzhandschuhe und Mundschutz verlangt. Bei der Desinfektion soll totes oder lebendes Material in einen Zustand versetzt werden, dass es nicht mehr infizieren kann. Man unterscheidet dabei noch zwischen Oberflächendesinfektion und Händedesinfektion, letztere wird noch in Hygienische und Chirurgische unterschieden. Auch die Quarantäne bietet eine Möglichkeit zur Infektionsprohylaxe, indem über einen bestimmten Zeitraum eine Isolierung durchgeführt wird.

#### **Antibiotikaprophylaxe**

Antibiotika können als therapeutische oder prophylaktische Medikamentengabe eingesetzt werden. Die prophylaktische Verabreichung von Antibiotika in der Zahnheilkunde soll verhindern, dass die durch zahnärztliche Maßnahmen verursacht Bakteriämie an anderen Organen Infektionen hervorruft. Zu diesen zahnmedizinischen Eingriffen zählen Zahnextraktion, Peridontaleingriffe (Kürettage), Zahnimplantation, Wurzelbehandlungen, Zahnsteinentfernungen und die intraligamentäre Injektion von Lokalanästhetikum (18).

Ein geeignetes Antibiotikum muss bereits vor der durchzuführenden Intervention eingenommen werden, damit eine ausreichende Konzentration während des Eingriffs vorliegt. Zum Einsatz können Penicilline, Cephalosporine oder Clindamycin kommen, dabei ist in den meisten Fällen eine so genannte Kurzzeitprophylaxe (1 Tag) ausreichend (40). Solche antibiotische Abdeckung bedarf strenger Indikation. Grundsätzlich betrifft es Erkrankungen, die mit einer eingeschränkten Infektionsabwehr einhergehen. Dazu zählen Herzerkrankungen mit Endokarditisrisiko, Diabetes mellitus, Hämophilie, Hämatologische Erkrankungen (z.B. Leukämie), Radiatio im Kiefer-, Gesichts- oder Halsbereich, Dialysepatienten und auch Nierentransplantierte (17).

### Antiseptika

Antiseptika kommen bei der Infektionsprophylaxe als Desinfektionsmittel zum Einsatz. Diese haben die Aufgabe, verschiedene Krankheitserreger mit ausreichender Sicherheit rasch abzutöten, ohne den Patienten selbst zu schädigen. Sie sollten gut Gewebeverträglich, möglichst geringe systemische Toxizität und ein geringes allergisierendes Potential aufweisen. Zu den Desinfektionsmitteln zählen Alkohole, meist als 70 – 80 %iger Ethanol oder n – Propanol, Detergentien als Seifen und Tenside, die oberflächenaktive Stoffe enthalten sowie Halogene. Chlor findet in der Trinkwasseraufbereitung und Jod als Kaliumjodid in Form von Wunddesinfektion seine Anwendung.

#### **4.1.2 Einsatz von Antibiotika neben humaner Therapieanwendung**

Antibiotika wird bei weitem nicht nur zur Behandlung humaner Infektionserkrankungen eingesetzt. Der Einsatz im Tierfutter ist und bleibt für mich eine rein ökonomische Frage. Als so genannte „Leistungsförderer“ sollen sie bei der wirtschaftlich geführten Tierhaltung (minimaler Aufwand – maximaler Gewinn) möglichst Infektionskrankheiten verhindern. Die zu Nahrungszwecken gehaltenen Tiere sind aufgrund bei einer fraglichen artgerechten Haltung besonders anfällig. 80 Prozent aller in der EU hergestellten Antibiotika werden an Tiere verfüttert. Ein Verbot von Antibiotika im Tierfutter existiert bisher nur in Finnland, Schweden und Dänemark. In der restlichen EU sind bisher lediglich sechs von zehn verwendeten Futterantibiotika verboten worden (38). Durch alternative Maßnahmen wie z.B. Hygiene, Impfprogramme oder Züchtung resistenter Rassen könnte der Antibiotikaeinsatz auf die Therapie der Tiere beschränkt werden.

Auch Natamycin, gekennzeichnet als E 235, ist als Konservierungsstoff für die Oberflächenbehandlung von bestimmten Käsesorten zugelassen. Es handelt sich um ein vom Schimmelpilz *Streptomyces natalensis* gebildetes Antimykotikum das den Verderb verhindert. Daneben ist Natamycin eine wirksame Substanz in zugelassenen Humanarzneimitteln. Es wird z.B. gegen Hefepilzerkrankungen der Haut eingesetzt. Bei zu häufiger Einnahme dieses Wirkstoffes kann es im menschlichen Organismus zur Bildung von resistenten Krankheitserregern führen (4).

## **4.2. Schutzmechanismen der Mikroorganismen gegen Antibiotika**

### **Biofilmbildung**

Bakterien sind in der Lage sich zusammenzuschließen, daraus ziehen sie unterschiedlichen Nutzen. Solche Bakterienverbände nennt man Biofilme. Diese Eigenschaft wird zum Beispiel in Kläranlagen zur Reinigung der Abwässer genutzt. Biofilme können aber auch negative Auswirkungen auf den Menschen haben. Eine Art Biofilm aus verschiedensten Bakterienarten ist die Zahnplaque. Der als Ursache für die initialen Entkalkung des Zahnschmelzes in der Kariogenese und für die anfängliche Ursache der Gingivitis steht. Bakterielle Biofilme bilden sich bevorzugt an vermeintlich glatten Oberflächen. *Staphylokokkus epidermidis*, der zur physiologischen Hautflora gehört, ist ebenfalls in der Lage Biofilme zu bilden. Dabei bevorzugt dieser Mikroorganismus glatte Kunststoffoberflächen wie sie bei Infusionsschläuchen, Kathetern, künstlichen Gelenken, oder Herzklappen zu finden sind. Diese Biofilmbildung kann dann zu Infektionen führen, die nur schwer oder gar nicht mit Antibiotika zu behandeln sind.

Die beteiligten Bakterien produzieren meist eine muköse Substanz aus Proteinen und Zuckermolekülen, die sie ausscheiden. Zunächst wachsen sie zu einer einzelligen Schicht heran, später zu einem mehrzelligen Biofilm. In ihm sind die Mikroorganismen geschützt gegen die körpereigene Immunabwehr. Der Körper reagiert schließlich auf den Biofilm mit einer Entzündung. Auch Antibiotika können die Bakterien in ihrem schützenden Film schwer oder gar nicht erreichen. Meist muss dann die Infektionsquelle entfernt werden. Ein Infusionsschlauch ist noch relativ unproblematisch, er wird samt Biofilm entfernt. Bei einer befallenen Herzklappe oder einem künstlichen Gelenk bleibt nur der Austausch durch eine erneute Operation (34).

### **Resistenzbildung**

Antibiotika ist nicht nur ein wirksames Mittel in der Behandlung von bakteriellen Infektionskrankheiten, es begünstigt auch die Entstehung resistenter Keime. Je großzügiger Antibiotika eingesetzt werden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit von Resistenzbildungen. Resistenzen haben Bakterien nicht erst in diesem Jahrhundert entwickelt. Sie besitzen außerordentliche Fähigkeiten sich unter besonderem Selektionsdruck anpassen. Das ist ein ganz normaler biologischer Vorgang. Bakterien können unter extremsten Umweltbedingungen existieren. Sie haben sich im Lauf der Evolution fast jede Nische des Planeten Erde erobert in dem sie Mechanismen gegen hohe und niedrige Temperaturen, ein Leben mit und ohne Sauerstoff etc. entwickelt haben (10). Resistenzen können sich auf zwei verschiedenen Wegen entwickeln. Durch eine einfache Mutation oder durch einen Austausch von Genstrukturen, die so genannte Konjugation. Die unterschiedlichen Wirkstoffgruppen von Antibiotika erzeugen nicht bei allen Bakterien mit gleicher Wahrscheinlichkeit Resistenzen. Zum Beispiel ist *Streptococcus pyogenes*, als Erreger zahlreicher infektiöser Erkrankungen (Tonsillitis, Sinusitis, Scharlach usw.) nach wie vor sehr gut mit Penicillin eliminierbar. Während eine große Zahl von *Staphylococcus aureus* und *Staph. epidermidis* Stämme inzwischen  $\beta$ -Laktamasebildner sind und somit penicillinresistent geworden sind.

### **4.3 Bioverträglichkeit und Antimikrobielle Eigenschaften von Materialien in der Zahnheilkunde**

Antimikrobielle Eigenschaften sind dann gewünscht, wenn Mikroorganismen pathogene Vorgänge auslösen. Diese Eigenschaften müssen meist an Trägermaterial gekoppelt werden. Sind systemische Verabreichungen notwendig, kann der behandelnde Arzt je nach Indikation auf orale oder intravenöse Gabe zurückgreifen. Auch lokal kann der Einsatz von Antibiotika notwendig werden. Je nach Einsatzgebiet wäre der antibiotisch wirksame Stoff in einer Lösung oder in einem Feststoff inkorporiert. Diese Agenzien wurden ausgehend vom Penicillin immer weiter entwickelt bzw. neue Wirkstoffgruppen entdeckt. Sie sind größtenteils unter dem Begriff Antibiotika, Antimykotika bekannt. Eine weitaus früher bekannte Wirkstoffgruppe stellen Metallionen dar.

In der konservierenden Zahnheilkunde stellt sich immer wieder das Problem der Umsetzung der Sekundärkariesprävention. Auftretende Entzündungen der Pulpa unter Restaurationen durch im Randbereich eingedrungene Bakterien sowie Sekundärkaries an

unzureichend dichten Füllungsrandern. Antibakteriell wirkende adhäsive Füllungsmaterialien sind daher ein weiterer Zielgedanke.

#### **4.3.1 Biokompatibilität und Biofunktionalität**

Unter Biokompatibilität versteht man die Eignung eines Materials in einem biologischen System keine pathologischen Vorgänge auszulösen. Eine Grundvoraussetzung der Biokompatibilität ist die Korrosionsfestigkeit. Da alle Metalle mehr oder weniger stark löslich sind, können sie durch Abrasion oder Korrosion aus dem Zahnersatz im Mund herausgelöst werden. Nichtedelmetalllegierungen sind wesentlich stärker löslich als Legierungen von Edelmetallen. Zur Abschätzung der möglichen Toxizität vergleicht man die abgegebene Menge der Legierungsbestandteile mit der Menge, die mit der Nahrung täglich aufgenommen wird. Die Konzentration der freigesetzten Ionen muss aus toxikologischer Sicht vernachlässigbar sein.

Unter Biofunktionalität versteht man die Eignung eines Werkstoffes hinsichtlich des an ihn gestellten werkstoffkundlichen Anspruchs. Solche Anforderungen sind nach Einsatzgebiet unterschiedlich. Neben der mechanische Festigkeit, geringen Dichte und Wärmeleitfähigkeit ist auch die Röntgentransparenz für diagnostische Gründe von Vorteil.

#### **4.3.2 Metallallergien**

Zugenommen haben in den letzten Jahren außerdem die allergischen Reaktionen auf Legierungen. Meist handelt es sich hierbei um Kontaktallergien. Die Metallatome allein sind zu klein, um als Antigene zu fungieren. Jedoch können sie durch eine Bindung an ein körpereigenes Protein zu voll funktionierenden Antigenen werden. Werden sie von antigenpräsentierenden Zellen spezifischen T- Lymphozyten dargeboten, kommt es zu deren Aktivierung sprich Sensibilisierung. Bei erneutem Antigenkontakt kommt es zur örtlichen Zellinfiltration mit den dazu gehörigen klinischen Symptomen, u. a. wie Ekzembildung, Schwellung oder Juckreiz. Nickelallergien sind z. B. sehr verbreitet und werden hauptsächlich durch Modeschmuck ausgelöst. Chrom ist als Chromat in der Farb- und Lederindustrie verbreitet und führt vor allem bei Berufstätigen im Friseurhandwerk oder Malergewerbe zu Typ IV Reaktionen.

### **4.3.3 Metalle (Legierungen)**

Im Folgenden soll eine kleine Auswahl der wichtigsten in der Medizin und Zahnmedizin verwendeten Metalle bzw. Legierungsbestandteile hinsichtlich ihrer Biokompatibilität, Biofunktionalität und Anwendungsbereiche besprochen werden.

In einer in vitro Studie zeigten die zahnärztlichen Materialien Titan, Gold, Amalgam und Keramik unterschiedlichen Einfluss auf Zellwachstum. Am geringsten war die Zellirritation bei Titan, eng gefolgt von Keramik und Gold. Bei Amalgam wurde eine deutliche Senkung der Wachstumsrate verzeichnet (32).

#### **4.3.3.1 Titan**

Titan wird wegen seiner hohen Festigkeit, geringem Gewicht und hoher Korrosionsbeständigkeit als idealer Werkstoff vor allem in der chirurgischen Medizin geschätzt. Durch seine sehr hohe Affinität zu Sauerstoff bildet es sofort eine dichte und beständige Oxidschicht, die für die hervorragende Biokompatibilität verantwortlich ist. Lediglich auf Fluorid- Gel- Applikationen sollte bei Patienten mit zahnärztlichen Restaurationen aus Titan verzichtet werden, da sie zu Aufrauungen der Oberfläche und damit Korrosion führen (25).

Das Hauptziel bei der Implantation von künstlichen Zahnwurzeln ist die Osseointegration. Trotz heute vorhandener verschiedensten Implantationstechniken und Implantationssystemen liegt der Forschungsschwerpunkt nach wie vor im werkstoffkundlichen Bereich, es geht vor allem um die Oberflächenkonditionierung der Implantate. So wurde die Osseointegration bei Titan- Plasma- Beschichtungen gegenüber mit Hydroxylapatit beschichteten Titanoberflächen bereits untersucht. Die letztgenannte Oberflächenmodifikation erreicht eine noch größere Osteoblastendifferenzierung und Induzierung von osteogenen Markern (22).

Eine der interessantesten Legierungen, ist die durch ihre Eigenschaften hervortretende Nickel-Titan-Legierung, welche aus 55 % Nickel und 45 % Titanium besteht. Im Vergleich zu den V2A Stahldrähten, die neben einem geringen Anteil von Kohlenstoff etwa 18 % Chrom und nur 10 % Nickel enthalten, ist das Korrosionspotential von Nickel-Titan erheblich geringer. Titan und Nickel- Titan- Legierungen, in Form von in der Kieferorthopädie angewandte Drähte, wurden bereits hinsichtlich ihrer Biokompatibilität und Biofunktionalität untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass bei beiden Materialien neben besonderer Korrosionsbeständigkeit keine bedeutsamen Unterschiede auf elektrochemischer und biologischer Ebene nachweisbar sind (11).

Nach physikalischer Definition ist Nickel-Titan nicht elastisch, sondern pseudoelastisch. Es weist eine extrem große Flexibilität auf und damit üben diese Drähte in Form als Federn oder Bögen nur sehr kleine Kräfte aus. Die Entdeckung des „programmierbaren“ Formgedächtnisses bei hoher Temperatur war für die Anwendung in der Kieferorthopädie ein großer Gewinn. Weitere Anwendungen wurden in der Literatur beschrieben, dazu sollen beispielhaft genannt werden:

In einer Dissertation, die die Anwendung von funktionell wirkenden Nickel-Titan-Nägeln in Röhrenknochen abhandelt, wurde neben einer guten Biokompatibilität die Funktion dieser Formgedächtnisnägel untersucht. Sie sollen Formdefekte und Brüche von Knochen korrigieren (23). In einer tierexperimentellen Studie wurde die Anwendung eines neuen dreidimensional wirkenden Skoliose- Korrekturgerätes untersucht. Neben einer guten Biokompatibilität (keine Beweise einer Fremdkörperantwort) wurde die formende Wirkung auf die Wirbelsäule herausgestellt (39).

#### **4.3.3.2 Gold**

Gold übt seit seinem ersten Fund eine faszinierende Wirkung auf den Menschen aus. Durch seinen gelblich schimmernden Glanz, seine Schwere und relativ leichte Bearbeitbarkeit wurden die ersten Funde für rituelle Zwecke verwendet. In einem Artikel über Schädelreparationen im Neolithikum wurde auch über goldene Cranioplastiken berichtet (5).

Aus den anfänglichen Grabungen entwickelte sich der Bergbau und mit zunehmender Verfügbarkeit weitete sich die Verwendung von Gold aus. Bereits in der Antike wurde Gold zum Zahlungsmittel. Neben dem Bedarf bei der Schmuckherstellung und in der Elektroindustrie, wird Gold heute auch als Lebensmittelfarbstoff unter der Nummer E 175 verwendet. Metallisches Gold gilt als ungiftig. In Form von Salz als Natriumaurothiomalat wird es, intramuskulär injiziert, zur Behandlung der chronischen Polyarthritits eingesetzt.

Auch in der frühen Zahnheilkunde wurde Gold eingesetzt. Durch die Möglichkeit der Kaltverformung sind Goldhammerfüllungen mit einer der ersten moderneren Anwendungen. Erste Schritte mit dem Wunsch Zähne zu bewegen, unternahmen Kieferorthopäden mit Golddrähten. Nach Entwicklung der Gusstechnik wird heute Gold überwiegend in hochgoldhaltigen Dentallegierungen zu Goldinlays oder (Teil-)Kronen verarbeitet. Durch seine Korrosionsbeständigkeit und zahnschmelzähnlichem Wärmeausdehnungskoeffizient erreicht dieser Zahnersatz bei Beherrschung der zahnärztlichen und zahntechnischen Technik eine sehr hohe Lebensdauer.

### 4.3.3.3 Silber

Silber hat als weiteres Edelmetall ähnliche Eigenschaften wie Gold. Schon vor Jahrhunderten wurde es zu Schmuck verarbeitet, wurden Kirchenggeräte und Tafelgedecke daraus gefertigt. Heute findet es neben diesen Bereichen Anwendung in der Elektronik und Optik aufgrund seiner guten elektrischen und Wärmeleitfähigkeit sowie optische Reflektionsfähigkeit. Die meisten Spiegel sind silberbedampfte Glasscheiben. Silber wurde bereits in der Antike in Trinkwasserbehälter in Form von Münzen gelegt, da man festgestellt hatte, dass das Wasser länger genießbar blieb.

Eine der ersten bekannten neuzeitlichen medizinischen Anwendungen von Silber in Form von 1%igem Silbernitrat wurde von Credé praktiziert und beschrieben (7). Er wandte dieses Präparat als Augentropfen prophylaktisch bei Neugeborenen an. Zu seiner Zeit war die Wahrscheinlichkeit von infizierten Schwangeren mit Erregern von Geschlechtskrankheiten sehr hoch. Er hatte mit diesem Mittel Erfolg, schwerste Augeninfektionen, die mit nachfolgender Erblindung verbunden waren, zu verhindern.

Silber an sich ist ein inertes Edelmetallatom, sein Ion jedoch ein äußerst reaktives Teilchen. Um zu diesem wirksamen Kation zu generieren, benötigt es mindestens Wasser. Der Wirkmechanismus als biochemischer Vorgang ist nach wie vor nicht ausreichend untersucht. Beschrieben wird die intrazelluläre Bindung von Silberionen an denaturierte bakterielle DNA und RNA, nachdem es durch strukturelle Veränderungen an der bakteriellen Zellwand eindringen konnte. Das führt zu Replikationsstörungen. Auch auf die bakteriellen Mitochondrien bewirken die Silberionen degenerative Veränderungen (24).

Im Vergleich zu Antibiotika weist Silber eine geringere antimikrobielle Wirkung auf. Es kann jedoch in bestimmten medizinischen Bereichen eine sinnvolle Infektionsprophylaxe darstellen.

Es wurde schon mehrfach in vitro als auch in vivo die antimikrobielle Wirkung von silberbeschichteten zentralen Venenkatheter als auch Blasenkateter beschrieben. Vereinfacht lässt sich sagen, dass in ein primär steriles Kompartiment (Gefäßsystem) ein Fremdkörper eingeführt wird, der mit der unsterilen Umgebung (auch Haut) verbunden wird. Infektionen über diese „Leitschiene“ sind prinzipiell unvermeidbar. Jedoch können über präzise lückenlose Hygienemaßnahmen überwiegend Infektionen verhindert werden. Die Idee, hier mit einer antimikrobiellen Beschichtung zu arbeiten liegt nahe. Bei der unter 4.4 beschriebenen Problematik des forcierten Selektionsdruckes in Krankenhäusern, scheint die Suche nach Alternativen zu Antibiotika obligat.

Mit einem silberlegierten Hydrogel beschichtete Blasenkatheeter zeigen antiinfektive Oberflächenaktivität und das damit verbundene Risiko für katheterassoziierte Urotraktinfektionen bei Kurzzeitkatheterisierung kann signifikant reduziert werden (26). Der Silberbeschichtete Oligon Vantex Katheter (zentraler Venenkatheter) reduziert das Auftreten von Katheterkolonisation und damit könnte das Risiko für Katheter assoziierte Sepsis vermindert sein (6).

Die Hornhaut des Auges ist nicht nur das stärkste brechende Medium im menschlichen Sehapparat, sie hat neben der Durchsichtigkeit und Regelmäßigkeit für das Sehen größte Bedeutung. Für ihren Schutz sind Augenbraue, Augenlider und Tränenflüssigkeit verantwortlich. In der Tränenflüssigkeit sind neben Wasser, Eiweißen, Salzen und Fett auch Zellen der Immunabwehr vertreten, z.B. Immunglobulin A. Wird ein Teil der Hornhaut beispielsweise mit einer Kontaktlinse bedeckt, ist in diesem Bereich neben der Ernährung auch der antimikrobielle Schutz verringert. Der Stoffaustausch zwischen Tränenflüssigkeit und Cornea per Diffusion wird behindert. Dahin gehend wurden Silber enthaltende Kontaktlinsen *in vitro* auf eine antibakterielle Wirkung untersucht. Gegen *Pseudomonas aeruginosa*, ein vorherrschender Keim bei mikrobiellen Keratitiden unter Weichlinsenträgern, wurde eine erheblich höhere antimikrobielle Wirkung festgestellt als gegen *Staphylococcus aureus*. Die Autoren betonen, andere notwendige desinfizierende Maßnahmen an den Linsen außerhalb der Augen werden hierbei keinesfalls ersetzt. Sie hegen weniger Befürchtungen hinsichtlich einer toxischen Wirkung sondern eher einer Gefahr der Sensibilisierung (29).

Klinisch erprobte Wundaufgaben mit integriertem Silber stellen ein weiteres Einsatzgebiet für Silberionen dar. Insbesondere die flächigen Wunden, wie Brandwunden können mit antibakteriell präparierten Wundverbänden antiseptisch abheilen. Eine bereits früher für flächige Wunden eingesetzte Silberverbindung war Silbersulfadiazin. Bereits bei dieser wurde ein weit reichender antibakterieller Wirkungskreis beschrieben (16). Beispielfhaft sollen zwei moderne Auflagen genannt werden, deren Wirkung sich auf der Entfaltung freier Silberionen begründet. Untersucht wurde die *in vivo* Wirkung von Acticoat® gegenüber einer Gazeabdeckung mit kontinuierlicher Antibiotikabenetzung an meshed skin grafts. Bei beiden Verbandsformen wurde keine Infektion beim Wundverschluss festgestellt. Zusätzlich wurde beobachtet, dass bei der silberenthaltenden Auflage die Reepithelisationsrate signifikant höher war (8). Bei *in vitro* Untersuchungen mit Actisorb Silver 220® konnte neben einer bakteriziden Wirkung eine hohe endotoxinbindende Fähigkeit festgestellt werden (28).

Silberversetzte Textilien können auch in der Dermatologie bei der Behandlung des atopischen Ekzems von Nutzen sein. Bei der Neurodermitis spielt die Hautkolonisation mit *Staphylococcus aureus* eine pathophysiologische Rolle. Patienten mit diesem Krankheitsbild wurden an der einen Ellenbogenflexur mit einem silberbeschichteten Textilverband und die andere Flexur mit Standardcotton für sieben Tage behandelt. Dabei wurde festgestellt, dass mit einer hohen Signifikanz die *Staphylococcus aureus* Kolonisation bei dem Arm mit dem silberenthaltenden Verband bereits nach zwei Tagen abnahm. Mit der Bakterienreduktion korrelierte eine stark verbesserte Heilung des atopischen Ekzems (13).

Die Phantasie lässt bei der Anwendbarkeit von Silber im kommerziellen Bereich nichts aus. So wirbt beispielsweise die Firma ODLO für eine silberversetzte antibakterielle „Frischefaser“ für Sportwäsche, die der Geruchsbildung beim Schwitzen Abhilfe schaffen soll. Hundertprozentige Hemmung des Bakterienwachstums wird versprochen und der Hinweis auf „den nicht zu unterschätzende gesundheitlichen Aspekt“ durch den gewonnenen Verzicht auf chemische Zusätze wirbt für ein allergieminimierendes Risiko. Die Firma Villeroy & Boch bietet eine Sanitärkeramik mit in die Oberfläche eingebundenen Silberionen an, natürlich mit dem Hinweis des antibakteriellen Effekts. Zumindest weist hier ÖKO-TEST daraufhin, dass sich auf Keramiken von Waschbecken einschließlich der Armaturen, nach dem Benutzen trockengerieben, keine Bakterien vermehren können.

#### **4.3.3.4 Quecksilber**

Amalgam bezeichnet eine Legierung mit Quecksilber. Als Silberamalgam wird es als Füllmaterial in der Zahnheilkunde schon sehr lange verwendet.

Heute kommen überwiegend Gamma-2-freie Silberamalgame zur Anwendung. Das Alloy enthält zwischen 40-70 % Silber, 12-25 % Kupfer sowie Zinn. Dieses Feilungspulver wird durch Zugabe von Quecksilber zu einer plastischen Masse, die bei Zimmertemperatur erhärtet. Der Vorteil von Amalgam liegt in seiner relativ einfachen Verarbeitung, in seiner Haltbarkeit und seiner Wirtschaftlichkeit.

Die Biokompatibilität von Füllungsamalgam ist wegen der Korrosionsanfälligkeit durch Herauslösen von Quecksilbersalzen umstritten. Es werden vor allem Reaktionen bei Allergikern und systemische Schäden durch elektrochemische Effekte vermutet. Beides konnte jedoch bisher nicht toxikologisch bewiesen werden. Beschriebene lichenoide Reaktionen durch Kontakt zu Amalgamfüllungen führten nach Ersatz der

Amalgamfüllungen bei 30% der Patienten zu einer Heilung und bei 60% eine Besserung der klinischen Symptome (21). Quecksilber enthaltendes Amalgam ist ein wichtiger Risikofaktor für Patienten mit Autoimmunerkrankungen. Nach dem Austausch der Amalgamfüllungen mit keramischen Materialien wurden die größten Verbesserungen der klinischen Symptomatik bei an Multipler Sklerose erkrankten Patienten beschrieben (33).

#### **4.3.4 Nichtmetalle**

Es sollen beispielhaft folgende in der Zahnmedizin entweder aufgrund ihrer Biokompatibilität oder ihrer antibakteriellen Wirksamkeit verwendete Nichtmetalle genannt werden.

Keramik in Form als Verblendmaterial bei Kronen und Brücken, als Inlays, als Brackets oder auch früher als Implantate benutzt, hat auch inzwischen wegen seiner „weißen Ästhetik“ einen hohen Stellenwert bei den zahnmedizinischen Materialien.

In der Endodontie werden antimikrobiell wirksame Wurzelkanaleinlagen verwendet. Dazu gehören beispielsweise Ledermix® und Kalziumhydroxid. Die in der Parodontologie parallel zum Scaling der Wurzeloberflächen eingesetzten Antibiotika, sollen speziell die Bakterien erreichen, die in den Taschen und umgebenen Epithelgewebe siedeln.

Auch in der konservierenden Zahnheilkunde werden Materialien mit antibakteriellen Eigenschaften gewünscht. Neuere Untersuchungen zielen insbesondere auf antibakteriell wirkende Adhäsive ab. Imazato et al. stellte 2004 einen antibakteriell wirkenden Primer vor, dessen Hauptwirkstoff MDPB (12-Methacryloyloxydodecylpyridiniumbromid) eine positiv geladene Pyridiniumgruppe aufweist und damit die negativ geladene Zellmembran von Bakterien zerstören kann. Mit der Polymerisierung der Bondingschicht wird die antibakterielle Aktivität des Monomers gestoppt.

### **4.4 Methodenkritik**

#### **4.4.1 Herstellung der Prüfkörper**

Zwei wesentliche Fehlerquellen bei der Herstellung der Prüfkörper konnten zwar erkannt, jedoch nicht eliminiert werden.

Zum einen wurde das pulverisierte Nanosilber in das Polymerpulver des entsprechenden Kunststoffes mit Hilfe einer über 24 Stunden rotierenden Glastrommel eingebracht. Makroskopisch ergab sich danach eine homogene Verteilung der Silberpartikel, was sich in einem einheitlichen Grauton des Kunststoffpulvers darstellte. Jedoch konnte beim

Anmischen der Kunststoffkomponenten beobachtet werden, dass sich die Silberpartikel teilweise akkumulierten und letztlich keine homogene Silberverteilung bei den auspolymerisierten Kunststoffproben erreicht wurde.

Zum anderen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Herstellungstechnik der Kunststoffproben mikroskopische Unterschiede entstanden. Bereits das Vorhandensein einer raueren Oberfläche einer Probe kann die Adhäsion von Bakterien wesentlich beeinflussen.

#### **4.4.2 Diagnostische Methoden**

##### **REM**

Die Elementaranalyse wurde nur repräsentativ an einer Stelle des kieferorthopädischen Gerätes durchgeführt. Es ist mit Sicherheit davon auszugehen, dass an anderen Stellen die Materialzusammensetzung in unbestimmten Breiten schwankt.

Die Ergebnisse des einmaligen Versuches mit der aus halb silberenthaltendem und gewöhnlichem Kunststoff bestehenden kieferorthopädischen Gerätes bei 20 Stunden Tragedauer müssen mit einer gewissen Zurückhaltung beurteilt werden. Die gemachten Beobachtungen waren von mehreren Faktoren abhängig. Mundhygiene, Zahnstatus, mikrobiologische Mundhöhlenbesiedlung und allgemeiner Gesundheitszustand sollen nur andeutungsweise die Vielfalt der beeinflussenden Faktoren umschreiben. Es konnte aber gezeigt werden, dass mit dieser Methode ein Ausbau der Untersuchungen möglich ist.

Mit einer geeigneten Anzahl an Probanden, mit möglichst ähnlichen Ausgangsbedingungen wie Zahnstatus, mikrobielle Mundhöhlenbesiedlung und Speichelfließrate könnten mit dieser Methode weitergehende Untersuchungen geplant werden. Zu den zu erhebenden Daten sollten neben den REM Aufnahmen auch die Bestimmung der Keimspezies zählen. In die Überlegungen könnte auch einbezogen werden, ob über einen bestimmten Zeitraum ein Silber enthaltendes kieferorthopädisches Geräts und über ein gleich langes Zeitfenster ein herkömmliches kieferorthopädisches Gerät getragen werden sollte. In meinem Versuch war das Testgerät je zur Hälfte aus beiden Materialien. Eingbracht werden könnte auch eine unterschiedliche Aufbewahrungsart der kieferorthopädischen Geräte während der Nichttragezeit, in Wasser oder Trocken.

## Mikrobiologische Untersuchungen

### *Allgemeines*

Zwei wesentliche Schwierigkeiten ergaben sich bei der mikrobiologischen Methodenfindung. Der Versuchsaufbau stützt sich wesentlich auf die Idee, dass die Keime sich an das Werkstück anlagern. Wie bereits erwähnt findet die Interaktion der Silberionen mit den Versuchsmikroben an der Oberfläche statt. Es ist bisher unbekannt gewesen inwieweit sich die einzeln untersuchten Arten an diese Kunststoffe überhaupt anlagen, sprich ihre Haftfähigkeit. Die Oberfläche der Werkstoffe konnte von dem eingebrachten Silber so verändert sein, dass allein dadurch eine Hemmung der Keimadhäsion bestand.

Die zweite Schwierigkeit bildete die gleichzeitig herauszufindende Haftstärke. Ziel war es zu Versuchsbeginn, in einer keimfreien Lösung ein mit adhärenen Keimen besetztes Werkstück. Bei jeder einzelnen Art von Mikroorganismen konnte dieses Teilziel nur durch systematisches erarbeiten der Waschschrte erreicht werden. Die Fähigkeit der Keime unterschiedlich starke „Bindungen“ mit dem Werkstück einzugehen, ergab deshalb verschiedene Spülvorgänge.

Nach Methodenfindung war die Durchführung der Versuchsreihen an sich recht unkompliziert.

### *Spezielles*

Bei der Flüssigkeitsprobenentnahme zu den entsprechenden Zeiten wurde die Pipettenspitze kreisend um das Objekt geführt. Es sollte nun die Konzentration der abgegebenen Tochterzellen gemessen werden. Dieser Durchführungsteil ist hohen zufälligen Schwankungen unterworfen. Die Probenentnahme bringt folgende Fehler mit. Absaugen von wenig adhärenen Zellen am Werkstück, die Problematik der Haftstärke wurde bereits im voran gehenden Abschnitt erwähnt. Des Weiteren ist theoretisch davon ausgegangen worden, dass die gebildeten Tochterzellen sich gleichmäßig im Medium befanden. Dies kann jedoch nicht bewiesen werden. Da hypothetisch von einer antimikrobiellen Silberwirkung ausgegangen worden ist, wurde in einem sehr kleinvolumigen Medium gearbeitet, um eine größtmögliche Chance zu haben, eventuell abgegebene Tochterzellen aufzulesen.

Die Probenentnahmen erfolgen üblicherweise in zwei Stundenabschnitten. Inwieweit das biologische System durch die Abkühlung dabei beeinflusst wurde, bleibt ungeklärt. Je nach Keimart konnte sich diese unumgängliche Störung negativ auswirken.

Beim Waschen ergab sich die Situation, dass das Probenwerkstück, wenn auch kurz, an der Luft unter der Absaugeinrichtung im Reagenzglas lag. Keime wie *Streptococcus mitis* reagieren sehr empfindlich auf Austrocknung. Auch hier bleibt ungeklärt, wie hoch die Störgröße einzuordnen ist.

Jede Probe in ihrem separaten Glas bildete für sich ein eigenes biologisches System. Das heißt, in einer Versuchsreihe wurden vier eigene Kompartements verglichen.

Die Zahl der zu Beginn der Messreihe anhaftenden Bakterien wurde nicht bestimmt. Zum einen war dies eine nicht messbare Größe und konnte auch nicht beeinflusst werden. Mit dieser Ausgangssituation stellt sich berechtigt die Frage, ob diese Methode überhaupt Anspruch auf Reproduzierbarkeit erhebt. Mit einer enormen Anzahl von Versuchsreihen, würden sicherlich durch die Häufung von selben Anlagerungssituationen statistisch auswertbare Ergebnisreihen entstehen.

In dieser Arbeit sollte die tendenzielle Wirkung von inkorporierten Nanosilber in Dentalkunststoff auf *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus mitis* und *Candida albicans* erkannt werden. Die Ergebnisse werden diesbezüglich nur richtungweisend sein.

### ***Problematik beim Nachweis der Tochterzellen***

Die einzelnen Graphen in den Ergebnisdarstellungen veranschaulichen gut die Problematik der starken Keimzahlschwankungen durch die unterschiedlichen Ausgangssituationen. Zwischenwerte von Versuchsreihen, die mit Null in die Auswertung gelangt sind, stellen sich als unlogischen Abfall der Graphen inmitten einer eigentlich logarithmischen Wachstumskurve dar. Beim Pipettieren der 10 µl Lösungen aus den Systemen zu den entsprechenden Zeiten muss dem Zufall zugeordnet werden, wie viele der tatsächlich in Lösung befindlichen Tochterzellen aufgenommen werden. Werden alle aufgesogen, ist das Teilergebnis absolut korrekt. Gleichzeitig stellte sich hierzu die Frage, wie lange war *Staphylococcus aureus* oder ein entsprechend anderer geprüfter Organismus in der Lage am Werkstück haftend, Tochterzellen zu produzieren. Die wahrscheinlich weitaus häufigere Situation wird jedoch wie folgt ausgesehen haben. Bei den einzelnen Probenentnahmen wurden vermutlich meistens weniger Tochterzellen aufgenommen, als real vorhanden. Je geringer die Chance, dass sich Tochterzellen bilden konnten, wie das bei der 1prozentigen Silberprobe der Fall war, umso häufiger der Messwert Null. Die nicht erfassten Tochterzellen konnten sich nun für weitere zwei Stunden in der Nährlösung vermehren. Es wurde versucht das Ausmaß dieses Fehlers einzudämmen,

indem die Probenwerkstücke während der 20 Stunden in einem reduzierten Nährmedium lagen.

Bei den Untersuchungen mit *Staphylococcus aureus* beläuft sich die Größenordnung der Keimreduktion im Vergleich zwischen der 0 AgGw% und 1,0 AgGw% Proben um ca. zwei 10er Potenzen im klinisch relevanten Tragezeitraum von kieferorthopädischen Geräten bei drei bis sieben Stunden. Diese Angabe muss als quantitative Aussage sehr kritisch gesehen werden. Die tatsächliche Wirkung kann u. U. auch um einiges darüber liegen, was aber mit dieser Methode und bei vier durchgeführten Versuchsreihen nicht erfasst werden kann.

Bei Betrachtung der gesamten Ergebnisse sind jedoch weitaus größeren Keimzahlschwankungen innerhalb von Versuchsreihen festzustellen und somit sollte der lediglich graphisch deutlicher hervortretenden Keimzahlschwankung zu Beginn der Versuchsreihen nicht zu große Bedeutung beigemessen werden.

### **Fluoreszenzfarbstoff**

#### ***Auswahl des Fluoreszenzfarbstoffes***

Die Firma Molecular Probes bietet u. a. für verschiedenste Aufgabenstellungen Fluoreszenzfarbstoffe an. Meine Fragestellung zielte auf die Darstellung von noch vermehrungsfähigen (membranintakten) und nicht mehr vermehrungsfähigen (membranbeschädigten) Bakterien ab. Dazu wurde das LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits L-7007 gewählt.

#### ***Mischungsverhältnis der beiden Farbstoffkomponenten***

Den Empfehlungen des Herstellers wurde folge geleistet, d.h. die Komponente A wurde mit der Komponente B im Verhältnis 1: 1 gemischt und angewandt. Es wird davon ausgegangen, dass die Ergebnisse mit Standard Platten Zählungen korrelieren.

#### ***Nachteile des Farbstoffs***

Es wurde in den Untersuchungen festgestellt, dass grundsätzlich alle Organismen beide Farbsignale tragen, jedoch mit unterschiedlicher Intensität. Bei zu langer Einwirkzeit des Farbstoffs bestand die Gefahr, dass die Keime durch den Farbstoff selbst, getötet wurden, da dieser toxisch ist.

### ***Keimauswahl***

Aus den Ergebnissen der mikrobiologischen Versuchsreihen der zylinderförmigen Proben wurden die Keime gewählt, die eine Reaktion mit dem dargebotenen Nanosilber zeigten. Die Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus mitis* wurden gewählt, um die bereits festgestellten Wachstumshemmungen zu bestätigen.

### ***Probenform***

Um die angelagerten Keime am Werkstoff beobachten zu können, mussten die Werkstoffproben objektträgerförmige Gestalt aufweisen. Nur mit einer ausreichend befestigte Probe am Mikroskopiertisch konnte gearbeitet werden. Die Dicke ergab sich als Kompromisslösung zwischen Halterfassung und ausreichender Stabilität der Kunststoffproben. Ein Verbiegen hätte Unschärfen zur Folge gehabt.

### ***Mikroskopauswahl***

Benötigt wurde mindestens ein Auflichtmikroskop mit Filtern, die den Emissionsmaxima der beiden Fluoreszenzfarbstoffe entsprachen. Für STYO 9 entsprach dies 480/500 nm und für propidium iodide 490/635 nm. Zusätzlich sollte eine Kamera einschließlich eines Speichermediums zur Dokumentation vorhanden sein. Hier wurde ein Konfokalmikroskop angewandt, da ein solches ohne weiteren Aufwand betriebsbereit war. Der Nachteil dieser Apparatur für meine Zwecke war, dass dieses Lasermikroskop Schichtaufnahmen in einer Z- Achse aufnimmt. Damit sind auf den einzelnen Schichtbildern auch angeschnittene Bakterien sichtbar. Dies beeinträchtigte jedoch die Darstellungsabsichten nicht wesentlich.

#### **4.4.3 Besprechung der Ergebnisse**

Die beobachtete starke antibakterielle Wirkung von Nanosilber auf *Streptococcus mitis* könnte in der Mundhöhle auch einen Einfluss auf *Candida albicans* haben. In dieser Arbeit konnte in den separaten Versuchen keine fungizide Wirkung festgestellt werden. Jedoch tritt *Candida albicans* meist mit Streptococcen assoziiert in der Mundhöhle auf.

In der Literatur wird jedoch beschrieben, dass bei *Candida albicans* ein Zellwandenzym durch Silberionen gehemmt wird und damit die Hefe durch eine defekte Zellwandstruktur lebensunfähig wird (24). Es besteht daher die Möglichkeit, dass die hier gewählte mikrobiologische Methode bei der Untersuchung auf antimikrobielle Wirksamkeit von Nanosilber nicht für alle Keime gleich geeignet ist.

#### **4.4.4 Schlussfolgerungen**

Die deutliche graue Einfärbung des Dentalwerkstoffes durch das Nanosilber könnte hinsichtlich der Ästhetik, die im oralen Bereich eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt, ein Problem darstellen.

Bei der Anwendung von prothetischem Kunststoff mit Silber, muss davon ausgegangen werden, dass es zu unangenehmen Geschmacksirritationen kommt. Silber wird in Kontakt mit schwefelhaltigem Eiweiß zu Silbersulfid und kann eventuell unangenehme Geschmacksirritationen hervorrufen.

Die Silberwirkung findet nur an der Oberfläche der verwendeten Materialien statt, das umliegende Milieu wird nicht beeinflusst. Klarer formuliert bei einer Keimdichte von  $10^9$  KBE/ml Speichel wird eine Reduktion um eine Logarithmstufe sicherlich keine Infektion verhindert. Was mit dem Silber in den parodontalen Taschen passiert, ob resorbiert oder durch das Sulkusfluid zurück in die Mundhöhle gespült und anschließend verschluckt wird, bleibt unklar.

#### **4.5 Klinische Relevanz**

Die in dieser Untersuchung gesammelten Daten, deuten auf eine eingeschränkte klinische Anwendbarkeit hin. In einer gesunden Mundhöhle finden wir zwar primär ein stark keimbelastetes Milieu vor, können aber aufgrund der natürlichen Schutzmechanismen von keiner Gefahr für den Organismus sprechen. Deshalb kann die Anwendung von Nanosilber in Kunststoff für kieferorthopädische Geräte und Prothesenkunststoff in dieser Hinsicht lediglich von hygienischer Bedeutung sein. Eine „saubere“ zahntechnische Konstruktion ist bei gesteigertem hygienischem Bedarf durchaus gerechtfertigt. Die Idee wird deshalb wahrscheinlich eher in der Lagerung der zahnmedizinischen Hilfsmittel während der Nichttragezeit liegen. Die kieferorthopädischen Geräte und Prothesen weisen Nischen auf, die konstruktionsbedingt nicht zu ändern sind. Die Eintrittsstellen der Drahtkonstruktionen stellen z.B. eine solche Problemzone bei kieferorthopädischen Regulierungen dar. Hier sammelt sich bereits nach kurzer Zeit ein bakterieller Belag an, der sofern der manuellen Reinigung entzogen zu regelrechten Biofilmen auswachsen können. Alternativ bleiben jedoch auch noch die so genannten chemischen Reinigungsmittel, die in Form von Tabletten als Prothesenreiniger auf dem Markt sind. Ob hierbei die Zugabe von Nanosilber in FORESTACRYL® für kieferorthopädische Geräte oder Palapress® für Prothesen eine echte Alternative darstellt, müsste im

Vergleich noch untersucht werden. So könnte das Nanosilber an oben beschriebenen Stellen zumindest die Biofilmbildung verlangsamen. Was im Ansatz durch die Untersuchungen mit dem Elektronenmikroskop in dieser Arbeit tendenziell befürwortet werden kann.

Das anfänglich gedachte Einsatzgebiet dieser teilweisen hygienischen kieferorthopädischen Geräte und Prothesen war für klinische Problemstellungen im Bereich der Prothetik bei der mikrobiell verursachten Prothesenstomatopathie und im Bereich der Kieferorthopädie bei Kindern mit reduzierter humoraler und zellulärer Immunität gedacht. In diesem Zusammenhang könnten z. B. Patienten mit dem Down-Syndrom (Karies, Kieferfehlbildungen, motorische Störungen...Zähne putzen) hinsichtlich Schleimhautproblematiken untersucht werden. Sie benötigen im Allgemeinen sehr oft eine Regulierung ihrer Zahnfehlstellungen. Durch die allgemeine Hypotonie ihrer Muskeln, treten eben durch den ständig offen gehaltenen Mund Zahn- und Kieferanomalien erhöht auf. Nicht selten kommt noch eine Makroglossie hinzu. An unserer Klinik konnte jedoch kein ausreichend großes Kollektiv ausgemacht werden. Hier könnten eventuell durch eine längerfristig angelegte Untersuchung Daten gesammelt werden oder aber an entsprechenden Betreuungszentren Patienten rekrutiert werden.

Das gleiche gilt für die relativ selten anzutreffende mikrobiell verursachte Prothesenstomatitis. Patienten mit diesem speziellen Krankheitsbild müssten über mehrere Kliniken eruiert werden. Der Pilz *Candida albicans* ist der mikrobiologisch ausschlaggebende Faktor in der Entstehung dieser Erkrankung.

## 5. Zusammenfassung

Es ist schon sehr lange bekannt, dass Silber eine antimikrobielle Wirkung hat. In den letzten Jahren wurde diese Eigenschaft im Zusammenhang mit einer möglichen Prävention von Infektionserkrankungen vermehrt untersucht.

Das derzeitige Einsatzgebiet silberhaltiger Materialien reicht von Silberbeschichteten Kathetern bis hin zu Silberionen enthaltenden Wundauflagen.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit verschiedenen Untersuchungsmethoden, an zwei silberversetzten Dentalkunststoffen die propagierte antimikrobielle Wirkung untersucht werden.

Dazu wurden drei unterschiedliche experimentelle Untersuchungen durchgeführt.

1. Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie wurde der bakterielle Bewuchs eines kieferorthopädischen Gerätes nach 20 Stunden Tragedauer analysiert.
2. Mittels mikrobiologischer Methoden wurde die Wirkung von verschiedenen Silberkonzentrationen in den Dentalkunststoffen FORESTACRYL® und Palapress® untersucht. Dabei wurden folgenden Mikroorganismen, die häufig als Besiedler der Mundhöhle anzutreffen sind, verwendet:
  - *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae* bei FORESTACRYL®
  - *Candida albicans* und *Streptococcus mitis* bei Palapress®
3. Mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes wurde untersucht, inwieweit Silber die Anheftung vitaler Bakterien an Oberflächen beeinflusst.

Die Auswertungen der Experimente lassen folgende Aussagen zu.

Unter Beachtung der individuellen Besonderheiten des einzigen Probanden und der Einmaligkeit dieser Versuchsdurchführung, weisen die Ergebnisse bei der Analyse des kieferorthopädischen Gerätes darauf hin, dass das Silber auf die Keimkolonisation am Kunststoffkörper eine hemmende Wirkung hat.

FORESTACRYL® zeigte mit steigender Silberkonzentration in den mikrobiologischen Studien eine zunehmende antibakterielle Wirkung gegen *Staphylococcus aureus*. *Haemophilus influenzae* wurde hingegen nicht in seinem Wachstum beeinträchtigt.

Bei Palapress® entfalteten die Proben ab einem Gehalt von 0,4 Gewichtsprozent Nanosilber eine deutliche antibakterielle Wirkung gegenüber *Streptococcus mitis*. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Mikroorganismen wurde hier der stärkste antibakterielle Effekt verzeichnet. Dagegen konnte bei *Candida albicans* keine hemmende Wirkung festgestellt werden.

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes konnte die aus den mikrobiologischen Untersuchungen abgeleitete Aussage, nämlich dass das Nanosilber in FORESTACRYL® auf den *Staphylococcus aureus* wachstumshemmend wirkt, bestätigt werden.

Weiterhin konnte mit dieser Methode gezeigt werden, dass sich *Streptococcus mitis* trotz der deutlichen antibakteriellen Wirkung zunächst an das Material anlagert und dann in seiner Vermehrung gehemmt wird.

Für Patienten mit dem Down-Syndrom könnten unsere Ergebnisse in Zukunft hilfreich sein. Bei ihnen liegen neben einer hohen Infektanfälligkeit unter anderem orofaciale Fehlfunktionen, wie Zungenvorverlagerung, Mundatmung, Zahnstellungs- und Bißlageabweichungen vor. In den Rahmen eines interdisziplinären Behandlungskonzeptes von Kinderarzt, Sprachtherapeut und Krankengymnast ist auch der Kieferorthopäde eingebunden. Mit einer Gaumenplatte nach Castillo- Morales (Gaumenplatte mit rundem Knopf o. ä. als Fremdkörperreiz für die Zunge) soll die schlaffe Zunge nach hinten oben orientiert werden.

An unserer Klinik konnte jedoch kein ausreichend großes Kollektiv rekrutiert werden. Hier könnten eventuell durch eine längerfristig angelegte Untersuchung Daten gesammelt werden.

An einer Prothesenstomatopathie erkrankte Prothesenträger weisen sehr häufig auch ein reduziertes Immunsystem auf. Der Pilz *Candida albicans* ist der mikrobiologisch ausschlaggebende Faktor in der Entstehung dieser Erkrankung. Mit den Methoden der vorliegenden Arbeit konnte jedoch die in der Literatur (24) beschriebene Wirkung von Silber bei *Candida albicans* nicht nachgewiesen werden.

## 7 Anhang

### Haemophilus influenzae

#### gezählte KBE Haemophilus influenzae

**Tab. 21.** Gezählte KBE Haemophilus influenzae

Reduziertes Medium	AgGw%	0h	2h	4h	6h	8h	20h	VR	
800µl	0	0	0	1	15	28	29	I	
		0	0	0	42	92	12	II	
		0	0	17	30	126	3	III	
	0,4	0	0	86	680	312	16	I	
		0	5	0	12	21	4	II	
		0	0	0	2	12	13	III	
	0,6	0	0	0	19	37	35	I	
		0	0	0	22	15	19	II	
		0	2	30	85	135	24	III	
	1,0	0	0	10	77	98	24	I	
		3	3	35	77	62	7	II	
		0	0	26	51	46	19	III	
	µl auf Agar		100	90	90	90	90	90	
	Konzfaktor		1	1	1	10	100	10 <sup>7</sup>	

KBE = Koloniebildende Einheiten  
AgGw% = Silbergewichtsprozent

h = Stunden (0-20)  
VR = Versuchsreihe

Agar = Agarplatte  
Konzfaktor = Konzentrationsfaktor

#### Umrechnung in KBE Haemophilus influenzae / ml

**Tab. 22.** Umrechnung in Haemophilus influenzae KBE / ml

AgGw%	0 h	MW	2 h	MW	4 h	MW	6 h	MW	8 h	MW	20 h	MW	VR
0	0		0		11		1.667		31.111		3.222.222.222		I
	0	0	0	0	0	67	4.667	3.222	102.222	91.111	1.333.333.333	1.629.629.629	II
	0		0		189		3.333		140.000		333.333.333		III
0,4	0		0		956		75.556		346.667		1.777.777.777		I
	0	0	56	19	0	319	1.333	25.704	23.333	127.778	444.444.444	1.222.222.222	II
	0		0		0		222		13.333		1.444.444.444		III
0,6	0		0		0		2.111		41.111		3.888.888.888		I
	0	0	0	7	0	111	2.444	4.666	16.667	69.259	2.111.111.111	2.888.888.888	II
	0		22		333		9.444		150.000		2.666.666.666		III
1,0	0		0		111		8.556		108.889		2.666.666.666		I
	30	10	33	11	389	263	8.556	7.593	68.889	76.296	777.777.777	1.851.851.851	II
	0		0		289		5.667		51.111		2.111.111.111		III

KBE = Koloniebildende Einheiten  
AgGw% = Silbergewichtsprozent

h = Stunden (0-20)  
VR = Versuchsreihe

MW = Mittelwert

**Streptococcus mitis**

**gezählte KBE Streptococcus mitis**

**Tab. 23** Gezählte KBE Streptococcus mitis

Reduziertes Medium	AgGw%	0h	2h	4h	6h	8h	20h	VR	
800 µl	0	2	103	4000	2000	236	1680	I	
		0	98	2000	526	273	5000	II	
		0	12	32	18	23	3470	III	
	0,4	0	0	4	0	0	0	0	I
		0	0	10	0	0	0	0	II
		2	9	21	12	11	2040	III	
	0,6	2	0	0	0	0	0	0	I
		0	0	0	1	0	0	0	II
		0	4	6	7	5	428	III	
	1,0	1	0	0	0	0	0	0	I
		0	0	0	0	0	0	0	II
		0	0	0	0	0	0	0	III
	µl auf Agar		100	90	90	90	90	90	
	Konzfaktor		1	1	1	10	100	1000	

KBE = Koloniebildende Einheiten  
AgGw% = Silbergewichtsprozent

h = Stunden (0-20)  
VR = Versuchsreihe

Agar = Agarplatte  
Konzfaktor = Konzentrationsfaktor

**Umrechnung in KBE Streptococcus mitis /ml**

**Tab. 24** Streptococcus mitis KBE/ml

AgGw%	0 h	MW	2 h	MW	4 h	MW	6 h	MW	8 h	MW	20 h	MW	VR
0	20		1.144		44.444		222.222		262.222		18.666.667		I
	0	7	1.089	789	22.222	22.341	58.444	94.222	303.333	197.037	55.555.555	37.592.593	II
	0		133		356		2.000		25.556		38.555.556		III
0,4	0		0		44		0		0		0		I
	0	7	0	33	111	129	0	444	0	4.074	0	7.555.556	II
	20		100		233		1.333		12.222		22.666.667		III
0,6	20		0		0		0		0		0		I
	0	7	0	15	0	22	111	296	0	1.852	0	1.585.185	II
	0		44		67		778		5.556		4.755.556		III
1,0	10		0		0		0		0		0		I
	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	II
	0		0		0		0		0		0		III

KBE = Koloniebildende Einheiten  
AgGw% = Silbergewichtsprozent

h = Stunden (0-20)  
VR = Versuchsreihe

MW = Mittelwert

***Candida albicans***

**gezählte KBE *Candida albicans***

**Tab. 25** Gezählte KBE *Candida albicans*

Reduziertes Medium	AgGw%	0h	10h	12h	14h	16h	20h	VR	
800 µl	0	0	15	114	11	24	335	I	
		0	12	211	31	38	53	II	
		0	18	141	25	27	198	III	
	0,4	1	32	342	153	28	345	I	
		0	6	263	11	15	46	II	
		0	29	333	189	52	359	III	
	0,6	0	28	225	46	12	89	I	
		3	10	189	23	22	71	II	
		2	11	174	31	22	323	III	
	1,0	0	18	172	114	35	168	I	
		2	8	135	21	22	85	II	
		2	17	209	38	23	267	III	
	µl auf Agar		100	90	90	90	90	90	
	Konzfaktor		1	1	1	10	100	100	

KBE = Koloniebildende Einheiten  
AgGw% = Silbergewichtsprozent

h = Stunden (0-20)  
VR = Versuchsreihe

Agar = Agarplatte  
Konzfaktor = Konzentrationsfaktor

**Umrechnung in KBE *Candida albicans* /ml**

**Tab. 26** *Candida albicans* KBE/ml

AgGw%	0 h	MW	10h	MW	12h	MW	14h	MW	16h	MW	20 h	MW	VR
0	0	0	167	167	1.267	1.726	1.222	2.481	26.667	32.963	372.222	217.037	I
	0		133		2.344		3.444		42.222		58.889		II
	0		200		1.567		2.778		30.000		220.000		III
0,4	10	3	356	248	3.800	3.474	17.000	13.074	31.111	35.185	383.333	277.778	I
	0		67		2.922		1.222		16.667		51.111		II
	0		322		3.700		21.000		57.778		398.889		III
0,6	0	17	311	181	2.500	2.178	5.111	3.704	13.333	20.740	98.889	178.889	I
	30		111		2.100		2.556		24.444		78.889		II
	20		122		1.933		3.444		24.444		358.889		III
1,0	0	13	200	159	1.911	1.911	12.667	6.407	38.889	29.630	186.667	192.593	I
	20		89		1.500		2.333		24.444		94.444		II
	20		189		2.322		4.222		25.556		296.667		III

KBE = Koloniebildende Einheiten  
AgGw% = Silbergewichtsprozent

h = Stunden (0-20)  
VR = Versuchsreihe

MW = Mittelwert

## 6. Literaturverzeichnis

1. Bellantone, M., Williams, H. D., Hensch, L. L.: Broad-spectrum bactericidal activity of Ag<sub>2</sub>O-doped bioactive glass. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46, 1940-1945 (2002)
2. Bensing, B. A., Rubens, C. E., Sullam, P. M.: Genetic loci of *Streptococcus mitis* that mediate binding to human platelets. *Infection and Immunity* 69, 1373-1380 (2001)
3. Brutel de la Riviere, A., Dossche, K. M., Birnbaum, D. E., Hacker, R.: First clinical experience with a mechanical valve with silver coating. *Journal of heart valve disease* 9, 123-130 (2000)
4. Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Natamycin als Lebensmittelzusatzstoff, Stellungnahme vom 9. Sep. 2003
5. Carod-Artal, F.J., Vázquez-Cabrera, C.B.: Paleopatología neurológica en las culturas precolombinas de la costa y el altiplano andino (II). *Historia de las trepanaciones craneales. Revista de Neurología* 38, 886-894 (2004)
6. Corral, L., Nolla-Salas, M., Ibañez-Nolla, J., León, M.A., Díaz, R.M., Cruz, Martín M., Iglesia, R., Catalan, R.: A prospective, randomized study in critically ill patients using the Oligon Vantex catheter. *Journal of Hospital Infection* 55, 212-219 (2003)
7. Credé, C. S. F.: Die Verhütung der Augenentzündung der Neugeborenen. *Archiv für Gynaekologie* 17, 50-53 (1881)
8. Demling, R. H., Leslie DeSanti, M. D.: The rate of re-epithelialization across meshed skin grafts is increased with exposure to silver. *Burns* 28, 264-266 (2002)
9. Deng, S., Chen, H., Zhang, W.: The relativity between *Streptococcus sanguis* group and coronary heart disease. *Chinese journal of stomatology* 37, 222-224 (2002)
10. Dreifert, M.: Eine Waffe wird stumpf. *Westdeutscher Rundfunk* <http://www.quarks.de/antibiotika/06.htm> (1999)
11. El Medawar, L., Rocher, P., Hornez, J. C., Traisnel, M., Breme J., Hildebrand, H. F.: Electrochemical and cytocompatibility assessment of NITINOL memory shape alloy for orthodontic use. *Biomolecular Engineering* 19, 153-160 (2002)
12. Feng, Q. L., Wu, J., Chen, G. Q., Cui, F. Z., Kim, T. N., Kim, J. O.: A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical Materials Research* 52, 662-668 (2000)

13. Gauger, A., Mempel, M., Schekatz, A., Schäfer, T., Ring, J., Abeck, D.: Silver-coated textiles reduce *Staphylococcus aureus* colonization in patients with atopic eczema. *Dermatology* 207, 15-21 (2003)
14. Grimoud, A. M., Marty, N., Bocquet, H., Andrieu, S., Lodter, J. P., Chabanon, G.: Colonization of the oral cavity by *Candida* species: risk factors in long-term geriatric care. *Journal of Oral science* 45, 51-55 (2003)
15. Guggenbichler, J. P., Böswald, M., Lugauer, S., Krall, T.: A new technology of microdispersed silver in polyurethane induces antimicrobial activity in central venous catheters. *Infection* 27, 16-23 (1999)
16. Hamilton-Miller, J. M., Shah, S., Smith, C.: Silver sulphadiazine: a comprehensive in vitro reassessment. *Chemotherapy* 39, 405-409 (1993)
17. Haßfeld, S.: Antibiotikatherapie im zahnärztlichen Bereich. <http://www.med.uni-heidelberg.de/mzk/mzk-mkg/Aktuelles/Antibiotika/antibiotika.html> (2000)
18. Hof, H., Weigel, R., Schmiedek, P.: Antibiotikaprophylaxe des odontogenen Hirnabszess. *Zahnärztliche Mitteilungen* 2/2001, Seite 32
19. Imazato, S., Kaneko, T., Takahashi, Y., Noiri, Y., Ebisu, S.: In vivo antibacterial effects of dentin primer incorporating MDPB. *Operative Dentistry* 29, 369-375 (2004)
20. Kawahara, K., Tsuruda, K., Morishita, M., Uchida, M.: Antibacterial effect of silver-zeolite on oral bacterial under anaerobic conditions. *Dental Materials* 16, 452-455 (2000)
21. Kästel, I., Dunsche, A., Terheyden, H., Springer, I., Härle, F.: Klinik der oralen lichenoiden Reaktion auf Amalgam. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 58, 660-666 (2003)
22. Knabe, C., Howlett, C. R., Klar, F., Zreiqat, H.: The effect of different titanium and hydroxapatite-coated dental implant surfaces on phenotypic expression of human bone-derived cells. *Journal of Biomedical Materials Research* 71, 98-107 (2004).
23. Kujala, S.: Biocompatibility and biomechanical aspects of Nitinol shape memory metal implants. *Medizinische Dissertation, Universität Oulu* (2003)  
<http://herkules oulu.fi/isbn9514271246/html/index.html>
24. Lansdown, A. B. G.: Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *Journal of Wound Care* 11, 125-130 (2002)
25. Lenz, E.: Titan als prophetischer Werkstoff. *ZMK Magazin für Zahnheilkunde, Management und Kultur* 6, 350-360 (1999)

26. Maki, D.G., Tambyah, P.A.: Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerging Infectious Diseases* 7, 342-347 (2001)
27. Mulligan, A. M., Wilson, M., Knowles, J. C.: Effect of increasing silver content in phosphate-based glasses on biofilms of *Streptococcus sanguis*. *Journal of Biomedical Materials Research* 67A, 401-412 (2003)
28. Müller, G., Winkler, Y., Kramer, A.: Antibacterial activity and endotoxin-binding capacity of Actisorb Silver 220. *Journal of Hospital Infection* 53, 211-214 (2003)
29. Nissen, S., Furkert, F. H.: Antimikrobielle Wirksamkeit einer Silberbeschichtung von Hydrogellinsen. *Der Ophthalmologe* 9, 640-643 (2000)
30. Padachey, N., Patel, V., Santerre, P., Cvitkovitch, D., Lawrence, H. P., Friedman, S.: Resistance of a novel root canal sealer to bacterial ingress in vitro. *Journal of Endodontics* 26, 656-659 (2000)
31. Pelkonen, K. H., Heinonen-Tanski, H., Hänninen, O. O.: Accumulation of silver from drinking water into cerebellum and musculus soleus in mice. *Toxicology* 186, 151-157 (2003)
32. Pistorius, A., Willershausen, B.: Biocompatibility of dental materials in two human cell lines. *Journal of Biomedical Materials Research* 7, 81-88 (2002)
33. Prochazkova, J., Sterzl, I., Kucerova, H., Bartova, J., Stejskal, V.D.: The beneficial effect of amalgam replacement on health in patients with autoimmunity. *Neuroendocrinology* 25, 211-218 (2004)
34. Raabe, H.: Der Krankenhausinfekt. Westdeutscher Rundfunk <http://www.quarks.de/antibiotika/05.htm> (1999)
35. Rosenberg, M.: Die Entdeckung des Penicillins. Westdeutscher Rundfunk (1999)
36. Silver, S.: Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews* 27, 341-353 (2003)
37. Spacciapoli, P., Buxton, D., Rothstein, D., Friden, P.: Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. *Journal of Periodontal Research* 36, 108-113 (2001)
38. Super- Schweine durch Doping, Antibiotika im Tierfutter. geoscience online (keine Autorangabe vorhanden) [http://www.g-o.de/index.php?cmd=focus\\_detail2&f\\_id=4&rang=14](http://www.g-o.de/index.php?cmd=focus_detail2&f_id=4&rang=14) (2000)

39. Wever, D. J., Elstrodt, J. A., Veldhuizen, A. G., v. Horn, J. R.: Scoliosis correction with shape-memory metal: results of an experimental study. *European Spine Journal* 11, 100-106 (2002)
40. Wissenschaftliche Stellungnahme der Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde: Einsatz von Antibiotika in der zahnärztlichen Praxis. (Hrsg) *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 57 (2002)

## **8. Danksagung**

Bei Herrn Prof. Dr. Sander möchte mich für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. v. Baum (Abt. Mikrobiologie und Hygiene) für ihre unerschöpflich scheinenden Ideen und guten Ratschläge für diese Arbeit bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Angelika Möricke (Abt. Mikrobiologie und Hygiene) für ihr stets offenes Ohr für Fragen im Laborbereich bedanken.

Herrn Schmied (Abt. Elektronenmikroskopie) danke ich für seine Geduld, mir bei der Erstellung der Aufnahmen am Elektronenmikroskop behilflich zu sein.

Bei Frau Prof. Schneider (Experimentelle Anästhesie) möchte ich mich für die unkomplizierte Hilfe beim zur Verfügung stellen des Konfokalmikroskopes bedanken.

Herrn Eberhard Reithmeier danke ich für seine Hilfe beim Bedienen des Konfokalmikroskopes.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Ehemann Thomas Voigt für seine Unterstützung in allen Computerbelangen bedanken.