

**Aus der Klinik und Polikliniken für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten
der Universität Würzburg**

Abteilung für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde

Direktor: Herr Professor Dr. -Ing. Roger Thull

**Mikrobiologische Untersuchungen zum Vergleich verschiedener
Materialien für Mittelohrimplantate**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Roman Elias

aus Würzburg

Würzburg, August 2006

Erstgutachter: Herr Prof. Dr.-Ing. R. Thull

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. med. K. Schwager

Dekan: Herr Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: Herr Prof. Dr.-Ing. R. Thull 28.03.2007
Herr Prof. Dr. med. K. Schwager 23.04.2007

Der Promovend ist Zahnarzt

**Meiner Frau und meinem
Sohn in Dankbarkeit gewidmet**

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELUNG	1
1.1	Anforderungen an Implantatmaterialien	2
1.1.2	Problematik der implantatassoziierten Infektion	3
1.2	Das Mittelohrimplantat	4
1.2.1	Geschichte der Mittelohrimplantatmaterialien	6
1.2.2	Anforderungen an das Knochenersatzmaterial im Mittelohr	7
1.2.3	Antibiotikatherapie bei Otitis media	8
1.3	Der Biofilm	9
1.3.1	Definition Biofilm	10
1.3.2	Entstehung des Biofilms	11
1.3.3	Einfluss von Biofilmen auf die Antibiotikaresistenz	14
1.4	Problemstellung und Ziele	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Verwendete Testkeime	17
2.1.1	Escherichia coli (Stamm HB 101- gram -)	17
2.1.2	Staphylokokkus epidermidis (Stamm RP62A- gram+)	17
2.1.3	Streptokokkus pneumoniae (ATCC 12213 gram -)	18
2.2	Prüfkörper	18
2.2.1	Goldplättchen	19
2.2.2	Silberplättchen	19
2.2.3	Stahlplättchen	19
2.2.4	Titanplättchen	19
2.2.5	Polystyrolplättchen	20
2.3	Kultivierung der Bakterien	20
2.3.1	Nährboden und -medium und Herstellung	20
2.3.2	Einfrieren der Keime zur Lagerung	21
2.3.3	Kultivierung der Versuchskeime	21
2.4	Vorversuche	21

2.4.1	Vorversuch zur möglichen Beeinflussung der Titandrähte auf die Testplättchen	22
2.4.2	Vorversuch zur Anwendung von Ultraschall und Vortex beim Ablösen der Testkeime und der Adhäsionsfähigkeit der Testkeime	22
2.4.3	Vorversuche zur Anfärbung der Testkeime	23
2.5	Bewachsen der Prüfkörper	24
2.5.1	Versuchsablauf zum Bewachsen der Plättchen	25
2.5.1.1	Aufbau der Halterung der Plättchen	25
2.5.1.2	Bewachsen der Plättchen	26
2.6	Auszählmethode (CFU) und Kontrolle der Plättchen im REM- Mikroskop	27
2.6.1.1	Waschen der besiedelten Testkörper	27
2.6.1.2	Ablösen der Bakterien vom Testkörper	28
2.6.1.3	Verdünnungsreihe	28
2.6.1.4	Impfen der Nährböden	29
2.6.1.5	Auswertung	29
2.6.2	Kontrolle der Plättchen im Rasterelektronenmikroskop (REM)	29
2.6.2.1	Fixieren und Entwässern der Keime	30
2.6.2.2	Kritisch-Punkt-Trocknen (CPD)	30
2.6.2.3	Präparationen der Testkörper für das REM	31
2.6.3	Auswertung unter dem REM	32
2.7	Bestimmung der bakteriellen Adhäsion auf den Testmaterialien mittels des Fluoreszenzphotometers	32
2.7.1	Anfärben der Keime	32
2.7.2	Einrichten des Fluoreszenzphotometers	33
2.7.3	Kontrolle der Testkörper unter dem Fluoreszenzmikroskop	34
3	ERGEBNISSE	34
3.1	Auswertung der Vorversuche	34
3.1.1	Auswirkung der Titanaufhängung auf das Wachstum der Bakterien	34
3.1.2	Ablösen der Testkeime	35
3.1.2.1	Ablösen der Keime durch alleiniges Abwaschen mit LB-Medium	35
3.1.2.2	Ablösen der Keime nur durch Ultraschall	36

3.1.2.3	Ablösen der Keime durch Ultraschall und Vortex – Mixer	38
3.1.2.4	Ablösen der Keime durch Ultraschallbad und Vortex - Mixer mit verlängerte n Behandlungszeiten	39
3.1.3	Anfärben bewachsener und unbewachsener Oberflächen mit SYBR® Green I	40
3.2	Ergebnisse des Wachstums von <i>Escherichia coli</i> auf den Versuchwerkstoffen	40
3.2.1	Auswertung des Wachstums von <i>Escherichia coli</i> auf verschiedenen Werkstoffen (indirekte Methode)	40
3.2.2	Auswertung der Adhäsion von <i>Escherichia coli</i> auf verschiedenen Werkstoffen mit dem Fluoreszenzphotometer (direkte Methode)	42
3.3	Ergebnisse des Wachstums <i>Streptokokkus pneumoniae</i> auf den Versuchwerkstoffen	43
3.3.1	Auswertung des Wachstums von <i>Streptokokkus pneumoniae</i> auf verschiedenen Werkstoffen	43
3.3.2	Auswertung der Adhäsion von <i>Streptokokkus pneumoniae</i> auf verschiedenen Werkstoffen mit dem Fluoreszenzphotometer (direkte Methode)	44
3.4	Ergebnisse des Wachstums von <i>Staphylokokkus epidermidis</i> auf den Versuchwerkstoffen	46
3.4.1	Auswertung des Wachstums von <i>Staphylokokkus epidermidis</i> auf verschiedenen Werkstoffen (indirekte Methode)	46
3.4.2	Auswertung der Adhäsion von <i>Staphylokokkus epidermidis</i> auf verschiedenen Werkstoffen mit dem Fluoreszenzphotometer (direkte Methode)	47
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	48
3.6	Tabellarische Übersicht der Auswertung unter dem Fluoreszenzphotometer	50
3.7	Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie	51
3.8	Kontrolle der Plättchen mittels des Fluoreszenzmikroskops	54

4	DISKUSSION	55
4.1	Methoden zur Auswertung der Keimbesiedlung	55
4.1.1	Ablösen und Auszählen der Kolonien (CFU)	55
4.1.2	Bestimmung der Keimzahl durch Fluoreszenzmessung	57
4.1.3	Vergleich der Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen	59
4.2	Versuchsaufbau zur Besiedlung der Prüfoberflächen	59
4.3	Auswahl der Testkeime	60
4.4	Auswahl der Prüfmaterialien	61
4.5	Bestimmungen der Adhärenz der Testkeime auf den Werkstoffen mittels Fluoreszenzphotometer	62
4.6	Bestimmung der Adhärenz der Testkeime auf den Werkstoffen mittels CFU	63
4.7	Schlussfolgerung und mögliche Denkansätze	64
5	ZUSAMMENFASSUNG	68
6	LITERATURVERZEICHNIS	70
7	ANHANG	83

1. Einleitung und Problemstellung

Schon seit der Antike werden alloplastische Materialien für das Wiederherstellen von knöchernen Defekten, als Ersatz bei Zahnverlust oder als Nahtmaterial verwendet. Man fand heraus, dass in allen altertümlichen Kulturen versucht wurde, verlorene Körperteile zu ersetzen oder zumindest eine funktionelle Wiederherstellung zu erreichen.

Zahlreiche Materialien fanden hier ihre Verwendung. So wurden z.B. Menschen- und Tierzähne, bearbeitete Tierknochen, Perlmutter, Obsidian, Metalle, vor allem aber Gold verwendet, um knöcherne Defekte so gut wie möglich auszugleichen. Von den Ägyptern ist beispielsweise bekannt, dass sie schon in vorchristlicher Zeit Gold als Nahtmaterial benutzten. Die Etrusker stellten, für damalige Verhältnisse, hochwertige Brücken aus Gold und Menschenzähnen her, welche durch Goldstifte und -drähte an den Nachbarzähnen verankert wurden. Im 18. Jahrhundert wurden in England traumatische Verletzungen des Schädels mit Metallstücken verschlossen [LÄSSIG und MÜLLER 1999].

Der Einsatz von körperfremdem Material hat im letzten Jahrhundert rasante Fortschritte erzielt. Eine restitutio ad integrum wird aber auch mit modernsten Materialien und Operationsmethoden bis heute nicht erreicht. Implantate verursachen nach wie vor Probleme bezüglich ihrer Biokompatibilität, der Funktion und dem Risiko einer nosokomialen Infektion.

Erst in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts konnten Fortschritte auf dem Gebiet der Biomaterialien erzielt werden. Auch verbesserte Operationstechniken und der Einsatz von Antibiotika erhöhten den Erfolg bei der Verwendung von alloplastischen Werkstoffen.

Für sehr belastungsfähige Implantate, wie sie in der Orthopädie zum Einsatz kommen, werden vorwiegend Komponenten aus metallischen Legierungen, Keramiken und Verbundwerkstoffen eingesetzt [SCHIERHOLZ et al. 2004].

In der Zahnmedizin werden seit längerem schon Titanimplantate, als Ersatz für verlorengegangene Zähne erfolgreich verwendet [BRÄNEMARK et al. 1977].

Bei einer Untersuchung von implantatassoziierten Infektionen bei orthopädischen Implantaten waren in 76 Prozent der Fälle Bakterien, die auf der Oberfläche der Implantate einen Biofilm gebildet hatten, für diese Infektion verantwortlich [GRISTINA und COSTERTON 1985].

Die bakterielle Adhäsion ist der erste und wichtigste Schritt bei der Biofilmbildung und der damit drohenden Implantatinfektion [SCHIERHOLZ und BEUTH 2001]. Deshalb sollte bei innovativen Implantaten die bakterielle Adhäsion so gering wie möglich sein.

Um die hohe Infektionsgefahr zu minimieren, ist es von großem Interesse, nicht nur die Eigenschaften von Bakterien zu kennen. Besonders die Kenntnis über die Effektivität, mit welcher sich diese Bakterien an verschiedensten Implantatmaterialien anlagern können, stellt eine Notwendigkeit im Gebiet der Forschung an innovativen Implantaten dar. Hierbei hilft die Ermittlung bakterienabweisender Materialien bei der Auswahl bzw. dem Ausschluss von später zu verwendenden Implantatoberflächen.

1.1 Anforderungen an Implantatmaterialien

Implantierte Materialien müssen für eine erfolgreiche Implantation bestimmte Eigenschaften aufweisen. Sie sollten kein toxisches oder allergieauslösendes Potential besitzen. Es sollten keine Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen des Körpers ausgelöst werden. Das Material eines Implantats muss bio-, form-, korrosionsstabil und sterilisierbar sein [WILLIAMS 1988].

1.1.2 Problematik der implantatassoziierten Infektion

In den USA verursachen nosokomiale Infektionen einen geschätzten jährlichen Schaden von 11 Mrd. US \$. Fast die Hälfte (45%) dieser Infektionen werden durch Implantate verursacht [JARVIS 1996, MARTONE et al. 1992, STAMM 1978].

Bakteriell verursachte Revisionen stellen somit auch heute noch eine häufige postoperative Komplikation dar, trotz verbesserter Operationstechniken und dem Einsatz von Antibiotika. Bakterien die während der Operation, durch eine Wunde oder hämatogene Ausbreitung auf die Implantatoberfläche gelangen, können durch Bildung eines widerstandsfähigen Biofilms über Monate im Implantatbereich persistieren, bevor eine Entzündung ausbricht. Die Therapie einer Fremdkörperinfektion ist wegen der häufigen Antibiotikaresistenz der Erreger im Biofilm sehr schwierig und zieht meist die Entfernung des Implantats nach sich [SCHIERHOLZ und BEUTH 2001]. Innerhalb dieses aus Ionen und extrazellulären Produkten bestehenden Films sind die Keime hervorragend geschützt. So ist eine um das 500 - 5000fach höhere Antibiotikakonzentration, im Vergleich zu planktonisch lebenden Bakterien, notwendig, um eine bakterizide Wirkung zu erzielen [COSTERTON et al. 1994, ENG et al. 1991, GILBERT et al. 1990, GRISTINA 1987, NICHOLS et al. 1989, NICKEL et al. 1985]. Der Biofilm stellt auch für die Immunabwehr des Wirtes eine Barriere dar [WARD et al. 1992]. Die Infektionen persistieren in der Regel solange bis das Implantat entfernt wird. Die Entfernung des Implantats ist bislang die Standardtherapie bei persistierenden, implantatassoziierten Infektionen. Hauptverursacher sind nicht obligat pathogene Mikroorganismen, die Haut und Schleimhäute besiedeln. Beispiele hierfür sind Enterobacteriaceae, Pseudomonaden und Aktinomyzeten bei Infektionen von Harnwegskathetern. Bei Herzklappen und orthopädischen Implantaten treten beispielsweise koagulasenegative Staphylokokken, wie zum Beispiel *Staphylokokkus epidermidis*, auf [SCHIERHOLZ et al. 2004, SCHIERHOLZ und BEUTH 2001]. Die Rolle von implantatassoziierten Infektionen in den verschiedensten Bereichen der Medizin wurden intensiv untersucht. Hierbei stellte sich heraus,

dass die Adhäsion der Mikroorganismen auf der Oberfläche der Implantate den Initialschritt in der Pathogenese derartiger Biofilmbildung darstellt [GRISTINA 1987].

Dabei stehen, laut Gristina 1987, die Keime im Wettstreit mit körpereigenen Zellen um die Besiedlung der Implantatoberfläche [GRISTINA 1987].

Maßnahmen zur Verringerung der initialen bakteriellen Adhäsion beinhalten veränderte Eigenschaften der Oberflächenstruktur, welche das Zellwachstum stimulieren, sowie antibakterielle Eigenschaften der Materialoberfläche (z.B. PMMA - Kügelchen, Antibiotikaadditive) [SCHIERHOLZ et al. 2004].

1.2 Das Mittelohrimplantat

Zur Wiederherstellung des Hörvermögens bei Schallleitungsschwerhörigkeit ist die Rekonstruktion der Gehörknöchelchenkette, neben dem Verschluss des Trommelfells, die am häufigsten angewandte Methode.

Dabei kommen verschiedene Materialien für die Rekonstruktion zum Einsatz. Möglich sind autologe Materialien, wie z.B. Kortikalisknochen und Knorpel beziehungsweise allogene Materialien, ebenfalls Kortikalisknochen und Knorpel, sowie Dentin und Gehörknöchelchen. Ersatzmaterialien die xenogen gewonnen werden, spielen in der Rekonstruktion des Mittelohrs bisher keine Rolle [GEYER 1999].

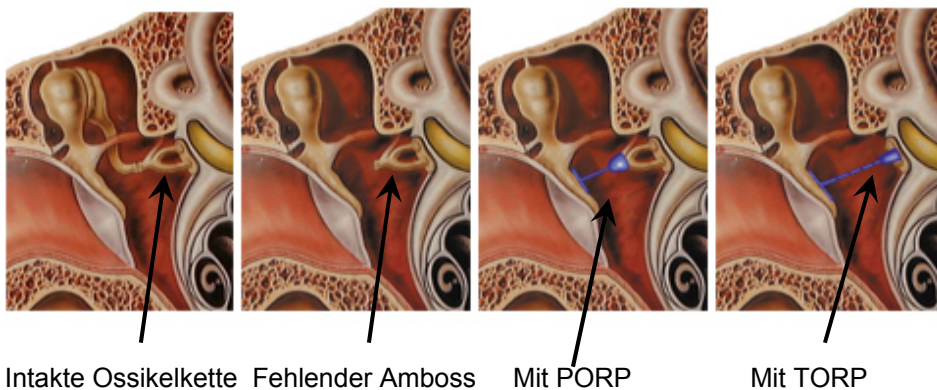
Mittelohrimplantate dienen in der Otochirurgie als Ersatz für die beschädigten oder funktionslosen Ossikel. Mit ihrer Hilfe wird die defekte mechanische Schallleitungskette zwischen Pauke und Stapesfußplatte wieder hergestellt.

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Typen von Mittelohrimplantaten. Zum einem gibt es das Totalimplantat oder TORP (Total Ossicular Replacement Prosthesis) genannt. TORP ist ein kompletter Ossikellersatz, die Stapesfußplatte ist dabei noch funktionsfähig. Zum anderen ist das Partialimplantat oder PORP (Partial Ossicular Replacement Prosthesis) zu nennen. PORP ist ein nur teilweiser Ossikellersatz. Hier ist sowohl der Stapes

noch vorhanden, als auch die Stapesfußplatte funktionsfähig. Beim PORP handelt es sich um eine Tympanoplastik vom Typ III nach der Klassifikation von Wullstein 1953 [WULLSTEIN 1953].

Abbildung 1 zeigt der Reihe nach den Querschnitt vom Mittelohr mit intakter Ossikelkette, fehlendem Amboss, mit PORP und mit TORP.

Abbildung 1:



Theoretisch gehören auch Stapesprothesen zur Kategorie Mittelohrimplantate, aufgrund der stark unterschiedlichen Form und operativen Vorgehensweise fasst man Stapesprothesen jedoch in einer eigenen Kategorie zusammen.

Neben den natürlichen Ersatzmaterialien gibt es zahlreiche alloplastische Werkstoffe, wie z.B. Metalle. Hier sind vor allem Titan und Gold aber auch Stahl und Platin zu nennen. Auch Kunststoffe wie Polyethylen und Polytetrafluorethylen kommen auf dem Gebiet der Ersatzmaterialien zum Einsatz. Ebenso werden diverse Keramiken, wie Oxidkeramiken, Calciumphosphatkeramiken und Glas-Keramiken, für die Implantation im Mittelohr eingesetzt. Das hybride Ionomerzement lässt sich in keiner der genannten Gruppen der Knochenersatzmaterialien zuordnen, zählt aber ebenso zu den derzeit verwendeten Ersatzmaterialien [GEYER 1999].

1.2.1 Geschichte der Mittelohrimplantatmaterialien

1953 wurde von Wullstein die Gehörknöchelchenkette mit Palavit - Columella rekonstruiert. Leider erfolgte bereits nach kurzer Zeit die Abstoßung der Rekonstruktion [WULLSTEIN 1953]. In den 60er Jahren wurden Polyethylen, Austin- Teflonhohlschaftprothesen sowie regenschirmähnliche Columellen als Knochenersatz im Mittelohr verwendet [BOJRAB 1992]. Palva et al. 1987 empfahlen metallische Implantate [PALVA et al. 1987]. Der Einsatz von alloplastischen Werkstoffen wie zum Beispiel Plastipore, Ceravital, Proplast im Mittelohr schien jedoch ungeeignet bei chronischer Otitis. Zahlreiche Autoren fanden starke Fremdkörperreaktionen und stellten die Verwendung von alloplastischen Materialien in Frage [FROOTKO 1984, HÜTTENBRINK 1994, KUIJPERS 1984, PORTMANN et al. 1984].

Erst mit der Einführung von Keramiken wie z.B. den Glaskeramiken, den Aluminium-Oxidkeramiken und den Calciumphosphatkeramiken, ließen sich günstige klinische und funktionelle Ergebnisse erzielen. Dichtes Hydroxylapatit schien sich am besten als Knochenersatzmaterial zu eignen, da es den kalzifizierten Gewebekristallen am ähnlichsten ist [DORNHOFFER 1998, GEYER 1992].

Ionomerzement, ein hybrides keramikähnliches Knochenersatzmaterial, wurde von Geyer und Helms 1997 untersucht [GEYER und HELMS 1997] und bewährte sich auch über einen langen Beobachtungszeitraum. Aus Gold gefertigte Mittelohrimplantate schienen denen aus Titan unterlegen zu sein. Schwager bestätigte tierexperimentell am Mittelohr von Kaninchen die gute Biokompatibilität von Titan als Implantatmaterial [SCHWAGER 1998, SCHWAGER und GEYER 1998]. Wegen einer nicht vollständig auszuschließenden Gefahr der Übertragung des AIDS - Virus (HIV) und Prionen (Jakob – Creutzfeld - Erkrankung) gerieten die allogenen (homologen) Transplantate in Misskredit. Die Verwendung von nutzbaren autologen (autogenen) Ossikeln als Mittelohrimplantat wurde hingegen niemals bezweifelt. [GLASSCOCK et al. 1991, HÜTTENBRINK1994].

1.2.2 Anforderungen an das Knochenersatzmaterial im Mittelohr

Bei Knochenersatzmaterialien, die im Mittelohr implantiert werden, ist eine bakterielle Kontamination des Implantats unvermeidlich, da es sich beim Mittelohr um ein sogenanntes halboffenes Implantatgebiet handelt. Die anatomische Besonderheit besteht hier in der Eustachischen Röhre. Sie ist die Verbindung des Mittelohrs zur Außenwelt [SCHWAGER 1998]. Somit besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko am Implantat. Es muss in jedem Fall mit Kolonisation und Infektionen des Mittelohrs durch Bakterien gerechnet werden [GEYER 2000, GLASSCOCK et al. 1991, SCHWAGER 2002].

Während die Einwanderung von Keimen bei anderen Implantaten, wie künstlichen Gelenken, drastische Folgen nach sich ziehen, meist gleichbedeutend mit einer Implantatabstoßung, ist die Einbringung von Implantaten im Mittelohr möglich. Allerdings ist es wünschenswert über die Wechselwirkung, zwischen dem Implantat und dem zu erwartenden Keimspektrum, ausreichende Informationen zu erlangen [GEYER 2001].

Auch wenn eine bakterielle Kontamination bei Mittelohrimplantaten keine sofortige Explantation erforderlich macht, dürfen die verwendeten Materialien zur Rekonstruktion nicht durch akute Infekte in Mitleidenschaft gezogen werden [GLASSCOCK et al. 1991, SCHWAGER 2002]. Das implantierte Material sollte daher der Adhäsion von Keimen nicht förderlich sein. Die Biostabilität und Formstabilität der Mittelohrimplantate müssen bei gelegentlicher bakterieller Infektion und Kontamination erhalten bleiben. Zudem sollten sich Mittelohrimplantate intraoperativ leicht bearbeiten lassen, um sie den jeweiligen anatomischen Gegebenheiten anzupassen. Erfüllt ein Werkstoff diese Bedingung nicht, müssen eine Vielzahl von Prothesen vorgehalten werden, wie z.B. Titanossikel [GEYER 1999]. Die Übertragung von Infektionskrankheiten (z.B. HIV, Prionen) muss ausgeschlossen werden. Dies gilt ins Besondere für allogene Materialien.

Autologe Materialien stehen laut Schwager 2001 häufig wegen der destruierenden Grunderkrankung nicht zur Verfügung. Dies betrifft die chronische Schleimhauteiterung, die Tympanosklerose und Paukenfibrose, vor

allem aber das Cholesteatom [SCHWAGER 2001]. Daher muss in vielen Fällen auf alloplastisches Material zurückgegriffen werden. Eine weitere Anforderung ist ein möglichst geringes Materialgewicht, da es die Schalltransmission speziell im hohen Frequenzbereich begünstigt. Mögliche kanzerogene, gewebsschädigende sowie allergene Eigenschaften des Implantatmaterials schließen eine Verwendung im menschlichen Körper aus. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass an geeignete Knochenersatzmaterialien neben dem Ausschluss von kanzerogenen, gewebsschädigenden oder allergenen Eigenschaften, die Bio – und Formstabilität, ein geringes Gewicht, die leichte intraoperative Bearbeitung und das optimale Verhalten des Implantats im bakteriell kontaminierten Gebiet berücksichtigt werden müssen [GEYER 1999].

1.2.3 Antibiotikatherapie bei Otitis media

Ein erhöhter Anspruch an das Mittelohrimplantat wird bei einer Infektion des Mittelohrs gestellt. Die Bekämpfung von Biofilmen bei Otitis media durch Antibiotika gestaltet sich äußerst schwierig. Zu der gesteigerten Antibiotikaresistenz von Keimen in Biofilmen, kommt eine geringe Diffusion von Antibiotika in die Mittelohrflüssigkeit hinzu [KRAUSE et al. 1982].

Nach einer Studie von Krause et al. 1982 wurden verschiedene Antibiotika auf ihre Konzentration in der Gewebsflüssigkeit des Mittelohrs im Vergleich zum Serum untersucht. Zu diesem Zweck wurde Kindern mit seröser Otitis media verschiedene Antibiotika verabreicht (u.a. Amoxicillin, Erythromycin). 15 bis 240 Minuten nach der oralen Gabe der Antibiotika, wurden die Konzentrationen in Serum und Mittelohr verglichen. Die Gewebsflüssigkeit im Mittelohr hatte bei jeder Probe eine signifikant niedrigere Konzentration an Antibiotika als das Serum. Erythromycin ließ sich überhaupt nicht im Mittelohr nachweisen [KRAUSE et al. 1982].

In vitro lässt sich eine Biofilmbildung durch Antibiotika verhindern. Kondoh und Hashibo 1998 konnten mit verschiedenen Makroliden die Ausbildung eines

Biofilms auf Teflon verhindern. Die Erfolge wurden aber bei hohen Konzentrationen von Makroliden erzielt [KONDOH und HASHIBO 1998]. Sollte eine ähnlich hohe Konzentration im Mittelohr erreicht werden, ließe sich wahrscheinlich eine wirkungsvolle präoperative Prophylaxe entwickeln, um eine Infektion nach einer Implantation zu verhindern.

Letztendlich ist die Entstehung eines Biofilms nur schwer zu vermeiden. Diese Tatsache unterstreicht noch einmal die Notwendigkeit Implantatmaterialien zu finden, welche durch ihre Beschaffenheit eine bakterielle Adhäsion minimieren.

1.3 Der Biofilm

Die Adhäsion an Oberflächen und die Bildung eines Biofilms ist eine Überlebensstrategie, die von praktisch allen Bakterien entwickelt wurde und über Millionen von Jahren verfeinert worden ist [DUNNE 2002]. Da Bakterien kein komplexes Nervensystem besitzen, welches ihnen ermöglicht ihren Umgebungsstandort festzulegen, müssen sie über andere grundlegende Überlebensstrategien verfügen. Im Gegensatz zu höheren Lebewesen, können Bakterien nur im beschränkten Maß auf ihre Umwelt reagieren. Daher haben Bakterien die Bildung von Biofilmen als besondere Strategie zum Überleben entwickelt. Diese Strategie realisieren sie sowohl in natürlichen, als auch in künstlichen Systemen [DUNNE 2002].

Die Bildung von Biofilmen dient der Verankerung der Mikroorganismen in einer vorteilhafteren Umwelt und ermöglicht bessere Überlebenschancen unter schlechten Umweltbedingungen, wie sie bei einem Mangel an lebenswichtigen Wachstumsbedingungen vorliegen. Der Biofilm schützt sie ebenfalls vor antibakteriellen Chemikalien und anderen Lebensformen. Natürliche Feinde wie Bakteriophagen, Pilze und phagozytische Amöben aber auch Antibiotika können den Biofilm kaum durchdringen [DONLAN und COSTERTON 2002]. Chronische Infektionen, ausgelöst durch ein mit einem Biofilm besiedeltes

Implantat, weisen eine sehr hohe Resistenz gegen Antibiotika und die Abwehr des Wirtes auf [SCHIERHOLZ et al. 2004].

Während die Entwicklung von Antibiotika und Impfstoffen den meisten bakteriellen Infektionen ihren lebensbedrohenden Charakter nehmen konnten, stellen Bakterien in Biofilmen ein weiterhin gefährliches Problem für die menschliche Gesundheit dar.

1.3.1 Definition Biofilm

„Eine strukturierte Gemeinschaft von Bakterienzellen, eingebunden in eine Polymer-Matrix und an eine inerte oder lebende Oberfläche angeheftet“ lautet die Definition von Costerton et al. 1999. Carpentier und Cerf 1993 beschreiben das Konzept vereinfacht als „Gemeinschaft von Mikroben, eingebettet in eine organische Polymer-Matrix“ [CARPENTIER und CERF 1993, COSTERTON et al.1999].

Stark vereinfacht lässt sich sagen, ein Biofilm benötigt drei Grundvoraussetzungen um zu existieren: Mikroorganismen, Glycocalyx und eine Oberfläche. Im Falle des Fehlens einer dieser Voraussetzungen kann ein Biofilm sich nicht entwickeln [DUNNE 2002].

Es gibt jedoch auch Charakteristika in einem Biofilm, die erst in jüngster Zeit näher erforscht werden. Costerton und Lapping-Scott 1995 stellten bei Bakterien in Biofilmen eine veränderte Genexpression fest, welche notwendige Proteine für die Adhäsion und die Biofilmformation steuern [COSTERTON und LAPPING-SCOTT 1995]. Bakterien sind imstande, die Zelldichte ihrer Population wahrzunehmen und über Signalmoleküle miteinander zu kommunizieren. Dieses Phänomen wird Quorum Sensing genannt und ermöglicht es den Bakterien, statt als Individuen als Gemeinschaft zu agieren [FUQUA et al. 1996; GRAY 1997]. *Pseudomonas aeruginosa* ist für die Bildung eines Biofilms nachweislich auf Quorum Sensing - Signale angewiesen [DAVIES et al. 1998, STICKLER et al. 1998]. Die oben genannte Definition

eines Biofilms trifft auch auf sogenannte „Nicht - Biofilm“ – Populationen zu. Zu diesen gehören zum Beispiel Kolonien auf Agarplatten, sie verhalten sich wie planktonische Bakterien die auf dem Substrat adhärirt sind [DONLAN und COSTERTON 2002].

Donlan und Costerton 2002 formulierten auf Grund dieser Eigenschaften eine abgewandelte Definition: „Ein Biofilm ist eine aus Mikroben entstandene sesshafte Gemeinschaft, die durch Zellen charakterisiert ist, die irreversibel an einem Substrat, einer Oberfläche angeheftet sind und in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen eingebettet sind, welche sie selbst produziert haben und das Vorliegen eines veränderten Phänotyps im Hinblick auf die Wachstumsrate und Gentranskription aufzeigen “ [DONLAN und COSTERTON 2002].

1.3.2 Entstehung des Biofilms

Die Entstehung eines Biofilms verläuft in mehreren Schritten. Die primäre Bindung einzelner Bakterien an die Oberfläche ist der erste Schritt. Darauf folgt die Phase der Proliferation und Akkumulation der Bakterien [AN et al. 2000, MARSHALL 1985, PEARCE et al. 1995]. Einige Autoren geben auch noch die Konditionierung der Oberfläche als zusätzlichen Schritt an [BOLAND et al. 2000, GRISTINA 1987]. Dies betrifft zum Beispiel Implantatwerkstoffe, die beispielsweise durch Anheftung von Blutfetten, Albumin und Kollagen ihre Eigenschaften gegenüber Bakterien verändern können [DUNNE 2002, FREYTAG 2004].

Die erste Phase, das sogenannte Andocken, ist reversibel. Der genaue Vorgang der bakteriellen Bindung ist sehr komplex und noch nicht ausreichend verstanden.

Klar ist aber, dass zuerst der Organismus in die kritische Reichweite der Oberfläche gelangen muss. Die endgültige Adhäsion an die Oberfläche hängt

dann von der Summe der abstoßenden und anziehenden Kräfte ab [DUNNE 2002].

Diese Kräfte beinhalten hydrophobe Interaktionen, van der Waals-Kräfte, sterische Beeinträchtigungen, hydrodynamische Kräfte, Dipol - Dipol - Kräfte, die atomare Struktur und die Oberflächenenergie [AN 2000, CARPENTIER UND CERF 1993]. Hierbei scheinen elektrostatische Wechselwirkungen die Abstoßung von Bakterien zu fördern, da die meisten inerten Oberflächen und Bakterien, bei physiologischem pH-Wert, negativ geladen sind [CARPENTIER und CERF 1993, JUCKER et al. 1996]. Weiter spielen nicht nur die genannten Kräfte eine Rolle. Bei Implantatoberflächen sind ebenfalls gebundene Proteine entscheidend für die Adhäsion von Keimen an der Oberfläche. Dunne und Burd 1993 konnten eine dosisabhängige Verminderung der Adhäsion von *Staphylokokkus epidermidis* an Kunststoffoberflächen durch Fibronectin nachweisen [DUNNE und BURD 1993]. Hermann et al. 1988 konnten eine Verstärkung der Adhäsion von Staphylokokken durch Plasmaproteine nachweisen [HERMANN et al. 1988].

Bakterien wie Staphylokokken haben die Fähigkeit ein breites Spektrum von extrazellulären Matrixproteinen, Gewebekomponenten und löslichen Faktoren an ihre Zellwand zu binden. Da die Oberflächen von Fremdkörpern nach der Implantation innerhalb weniger Minuten mit solchen Komponenten behaftet sind, bieten sie somit eine ideale Angriffsfläche für Staphylokokken und andere Bakterien [MULLER et al. 1991, PASCUAL et al. 1996]. Es gibt also zahlreiche Faktoren die in ihrer Gesamtheit die Adhäsion von Keimen auf einer Oberfläche beeinflussen.

In der zweiten Phase der Biofilmentstehung kommt es zur Proliferation und Akkumulation der Mikroorganismen. In einem mehrschichtigen Biofilm haben nur wenige Bakterien direkten Kontakt zur besiedelten Oberfläche, daher müssen intrazelluläre Kräfte wirken, um die Integrität des Biofilms aufrecht zu erhalten [SEUNG-HAK 2001]. Die Bakterien produzieren hierfür extrazelluläre Polysaccharide [MACK et al. 1994, MACK et al. 1996].

In dieser Phase wird der Biofilm, solange keine für die Keime negativen chemischen oder physikalischen Einflüsse auftreten, irreversibel [DUNNE

2002]. Haben sich die Bakterien irreversibel festgesetzt, kommt es zu Reifung des Biofilms. Die Dichte und die Komplexität des Biofilms nehmen zu. Außerdem entsteht die Glycokalyx aus extrazellulären Komponenten und organischen und anorganischen Stoffen, aus dem umgebenden Biosystem. Im Falle von Implantaten können auch Substanzen in die Glycokalyx eingebaut werden, welche aus der Immunantwort des Wirtes herrühren. Dies sind unter anderem Proteine, wie zum Beispiel Fibrinogen und Fibronectin [DUNNE 2002]. In einem voll ausgereiften Biofilm weisen die Bakterien ein verändertes Wachstumsmuster, einen veränderten Metabolismus und physiologische Kooperation auf. Alle diese Veränderungen in einem Biofilm ähneln einem primitiven eukaryontischen Gewebe [COSTERTON et al. 1995, COSTERTON und LAPPIN-SCOTT 1995].

In Abbildung 2 sind die verschiedenen Phasen der Biofilmbildung anhand von *Staphylokokkus epidermidis* dargestellt.

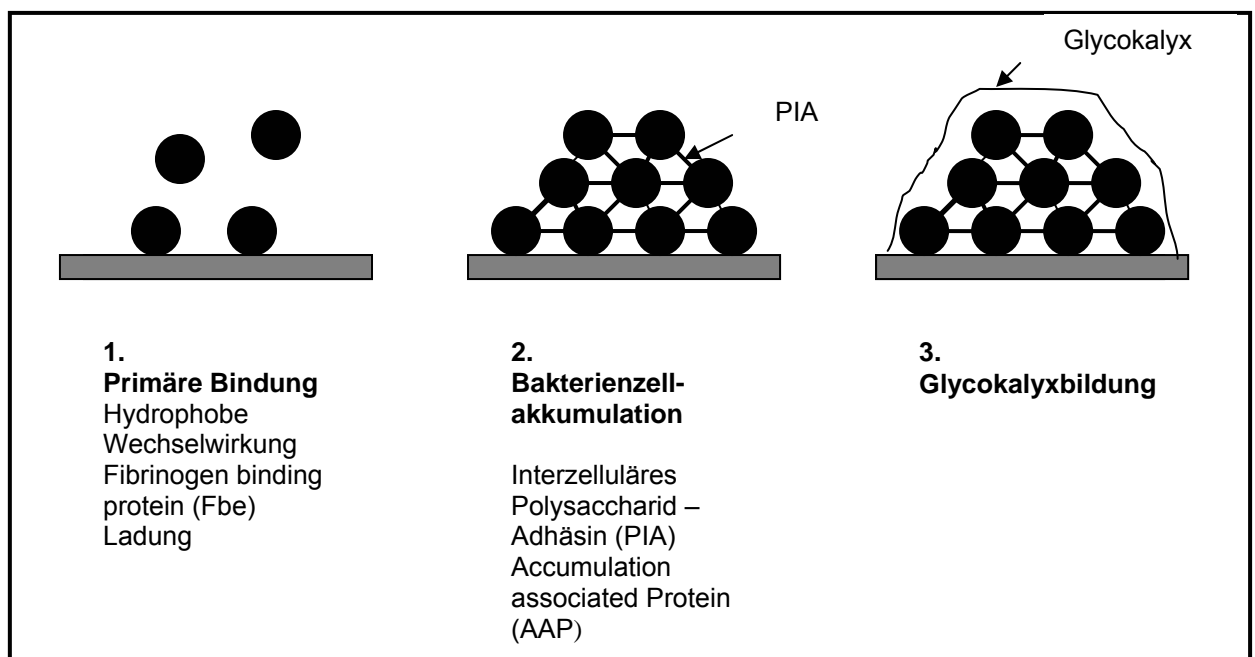


Abbildung 2 :

Phasen der Biofilmbildung von *Staphylokokkus epidermidis*. Die primäre Bindung wird von physikalischen Bedingungen der Oberfläche und angelagerten Gewebsproteinen bestimmt. In der zweiten Phase entstehen Bakterienzellakkumulationen. Diese entstehen unter anderem durch das Interzelluläre Polysaccharid – Adhäsion (PIA) [CRAMTON et al. 1999, HEILMANN et al. 1996]. Der dritte Schritt ist die Bildung der Glycokalyx, der aber nicht zwingend erfolgen muss [CHRISTENSEN et al. 1990].

1.3.3 Einfluss von Biofilmen auf die Antibiotikaresistenz

Bakterien in einem reifen Biofilm unterscheiden sich weitgehend von planktonischen Bakterien. Mikroorganismen in Biofilmen weisen eine weit höhere Resistenz gegenüber Antibiotika auf, als Bakterien in Lösung [CERF et al. 1999, SCHIERHOLZ et al. 1999]. Das trifft auch zu, wenn der Keim in - vitro gegen das verwendete Antibiotikum nicht resistent ist [DONLAN und COSTERTON 2002].

Es wird eine 500 - 5000fach höhere Dosis für eine antibakterizide Wirkung benötigt, um Bakterien in einem Biofilm abzutöten als für planktonische Bakterien des gleichen Stammes [COSTERTON et al. 1994, ENG et al. 1991, GILBERT et al. 1990, NICHOLS et al. 1989, NICKEL et al. 1985]. Man geht zurzeit von mehreren Mechanismen aus, die die gesteigerte Resistenz von Biofilmen gegen Antibiotika verantworten. Zuerst wäre die verminderte Diffusion durch den Biofilm von Antibiotika zu nennen.

Farber et al. 1990 fanden heraus, dass Zellextrakte von *Staphylokokkus epidermidis* die antibakterielle Fähigkeit von Glycopeptidantibiotika hemmen. Die Autoren nehmen an, dass der Polysaccharidschleim entweder die Glycopeptide inaktiviert oder, dass er die Zellwand umhüllt und so eine Permeabilitätsbarriere schafft [FARBER et al. 1990]. Suci et al. 1994 wiesen eine verzögerte Penetration von Ciproflaxin durch den Biofilm von *Pseudomonas aeruginosa* nach [SUCI et al. 1994].

Dunne et al. 1993 zeigten jedoch, dass das Durchdringen der bakteriellen Oberfläche von Antibiotika nur minimal von einem Biofilm verzögert wird [DUNNE et al. 1993].

Viele Antibiotika wirken auf sich teilende Zellen, ruhende Zellen werden nicht abgetötet [DUNNE 2002]. Durch eine beinahe ruhende Wachstumsrate von Bakterien in einem Biofilm und die damit verbundene geringe Aufnahme von Antibiotika in den Bakterienstoffwechsel, wird ein weiterer Mechanismus der Resistenz von Bakterien gegenüber Antibiotika vermutet [DONLAN und COSTERTON 2002]. Eng et al. 1991 zeigte, dass *Staphylokokkus aureus* im Falle einer reduzierten Nahrungsaufnahme gegen alle getesteten Antibiotika

resistent war [ENG et al. 1991]. Bei Steigerung der Nahrungszufuhr und damit Steigerung der Wachstumsrate waren die Antibiotika deutlich wirksamer. Die reduzierte Nahrungsaufnahme der langsamwachsenden Zellen veränderte auch die Zellmembran dieser Bakterien. Diese Veränderung der Zellmembran könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Antibiotikaresistenz haben [ANWAR et al. 1992].

Die dritte Theorie geht davon aus, dass die Mikroumgebung im bakteriellen Biofilm die Aktivität von Antibiotika gegenteilig beeinflusst. In den tiefen Schichten des Biofilms herrschen saure und anaerobe Bedingungen vor. Diese Bedingungen (pH, pCO₂, pO₂) zeigen eine negative Beeinflussung der Wirkung von Antibiotika [JORGENSEN et al. 1999].

1.4 Problemstellung und Ziele

Wie aus den vorangegangenen Abschnitten hervorgeht, gibt es eine große Anzahl verschiedenster Mittelohrimplantatmaterialien, deren Haltbarkeit zum einen durch die Besonderheit des Einsatzes in einem halboffenen System und zum anderen durch die Antibiotikaresistenz der Bakterien stark eingeschränkt wird. Speziell die Verhinderung der Biofilmbildung stellt eine große Herausforderung dar.

Hierfür wurde mittels verschiedener Testreihen die bakterielle Adhäsion an den Materialien Gold, Silber, Stahl, Titan und Polystyrol genau untersucht.

Als Testkeime wurden *Staphylokokkus epidermidis*, *Escherichia coli* und *Streptokokkus pneumoniae* ausgewählt.

Das spezielle Augenmerk lag auf der Fähigkeit der Bakterien an ein Material zu adhären. Dies ergibt sich aus der unvermeidlichen bakteriellen Kontamination von Mittelohrimplantaten.

Da das Andocken der Bakterien an das Implantatmaterial den Initialschritt für die Entwicklung eines Biofilms darstellt, ist es von besonderer Wichtigkeit

Oberflächenmaterialien zu finden, deren Beschaffenheit im besten Fall ein Andocken der Keime verhindert oder zumindest längstmöglich hinauszögert.

In dieser Arbeit wird die Adhäsion der genannten Keime an die Oberfläche der Testmaterialien untersucht.

Ziel der Versuche war es, das bakterielle Wachstum der Testkeime auf verschiedenen Werkstoffen zu untersuchen. Es wurden zwei Methoden ausgewählt, um den Grad der Besiedlung der Bakterien zu bestimmen. Zum einem wurde die Anzahl der Keime indirekt bestimmt, durch Ablösen der auf dem Testkörper anheftenden Keime und Animpfen der abgelösten Keime auf einen Nährboden. Die so entstandenen Bakterienkolonien wurden ausgezählt. So ließ sich ein Rückschluss auf die bakterielle Besiedlung des Testkörpers ziehen. Die andere Versuchsreihe ermittelte das bakterielle Wachstum auf den Prüfkörpern direkt. Hierzu wurden die anheftenden Versuchskeime angefärbt und ihre Anzahl quantitativ mittels Fluoreszenzphotometer bestimmt.

2. Material und Methode

2.1. Verwendete Testkeime

Die Laborstämme *Escherichia coli*, *Staphylokokkus epidermidis* und *Streptokokkus pneumoniae* wurden in den Versuchen verwendet.

Die Testkeime treten alle bei Infekten des Mittelohrs auf und wurden aus diesem Grund ausgewählt. *Staphylokokkus epidermidis* besitzt hervorragende adhäsive Fähigkeiten auf Oberflächen. Diese Fähigkeit machte *Staphylokokkus epidermidis* besonders interessant für die Untersuchung der bakteriellen Besiedlung auf verschiedenen Werkstoffen.

2.1.1 *Escherichia coli* (Stamm HB 101, gram -)

Die kokkoiden Stäbchen sind gramnegativ, fakultativ anaerob und treten als Dickdarmkommensale auf. *E. coli* stellt geringe Nährbodenansprüche und wächst in großen grauglänzenden Kolonien. *E. coli* ist der häufigste Erreger von Harnwegsinfektionen. Er ist jedoch auch bei Atemwegsinfektionen, Durchfallerkrankungen und invasiven Infektionen mit hämatogener Ausbreitung (Sepsis, Meningitis, Otitis media) zu finden.

2.1.2 *Staphylokokkus epidermidis* (Stamm RP62A, gram+)

Staphylokokkus epidermidis gehört zu der Gattung grampositiver, unbeweglicher, traubenförmig gelagerter Kugelbakterien der Familie *Micrococcaceae*.

Staphylokokkus epidermidis ist ein Plasmakoagulase - negativer Saprophyt der Haut und Schleimhaut. Er ist ein opportunistischer Erreger von Endokartiden, Wundinfektionen. Oftmals besiedelt dieser Keim in den Körper eingebrachte Kunststoffe wie Venenkatheter oder Ventrikeldrainagen [CHRISTENSEN et al. 1982].

Zusätzlich ist er ein Erreger bei Otitis media [FEIGIN et al. 1992].

2.1.3 *Streptokokkus pneumoniae* (ATCC 12213, gram -)

Die Art *Streptokokkus pneumoniae* (Pneumokokken) sind grampositive, rund-oval bis lanzettförmige Kokken mit einer Größe von 0,5-1,25 μ m, die meist paarweise gelagert sind. Das Medium der Wahl sind Blutagar-Platten. Auf diesen entwickeln sich in aerober Atmosphäre schleimige Kolonien, die durch die Lichtreflexion bedingt hell glänzend erscheinen. Oft bildet sich um die Kolonien ein vergrünender Hof (α -Hämolyse). Der Erreger ist bei Otitis media zu finden [FEIGIN et al. 1992].

Etwa 50% der gesunden Bevölkerung sind *Streptokokkus pneumoniae* - Keimträger.

2.2 Prüfkörper

Die ausgewählten Prüfkörper der zu untersuchenden Materialien bestanden aus Gold, Silber, Stahl, Titan und Polystyrol. Alle Plättchen waren mit einer randständigen Perforation versehen, welche der Aufhängung der Plättchen diente.

Sämtliche Plättchen wurden vor den Versuchen gereinigt. Dazu wurden die Plättchen in ein Becherglas mit 100 ml destilliertem Wasser gegeben und eine Minute von Hand geschwenkt. Im zweiten Schritt der Reinigung wurden die

Plättchen aus dem Becherglas mit dem destillierten Wasser genommen und in ein weiteres Becherglas mit 100 ml Isopropanol (80%) gelegt. Nach Abschütten des Isopropanols wurden die Plättchen zum Trocknen unter den Abzug gestellt. Nach der Trocknung wurden die Plättchen in Autoklavfolien zu je fünf Stück eingeschweißt und bei 121°C und 3 bar im Autoklaven sterilisiert.

2.2.1 Goldplättchen

Es wurden mit Gold beschichtete Stahlplättchen mit 14 mm Durchmesser und mit einem 0,8 mm breiten, randständigen Loch verwendet.

2.2.2 Silberplättchen

Es wurden mit Silber beschichtete Plättchen aus Stahl verwendet, die einen Durchmesser von 14 mm und einer 0.8 mm breiten randständigen Perforation aufwiesen.

2.2.3 Stahlplättchen (Fa. Ergste Wertig GmbH, Schwerte)

Hier wurden gesägte Stahlplättchen aus medizinischem Stahl mit 14 mm Durchmesser und einer 0,8 mm breiten randständiger Perforation verwendet.

2.2.4 Titanplättchen Grade 2 (Fa. Robert Zapp Werkstofftechnik GmbH, Ratingen)

Die Titanplättchen wiesen einen Durchmesser von 14 mm mit 0,8 mm breitem randständigem Loch auf.

2.2.5 Polystyrolplättchen (Fa. Nunc A/S, Dänemark)

Die Polystyrolplättchen hatten einen Durchmesser von 14,5 mm und ein 0,8 mm breites randständiges Loch.

2.3 Kultivierung der Bakterien

2.3.1 Nährboden und -medium und Herstellung

Es kamen zwei verschiedene Nährböden bzw.- medien zum Einsatz. Zur Herstellung von 800 ml LB - Medium wurden 800 ml reinstes Wasser, 8 g NaCl, 8 g Pepton Nr. 140 und 4 g Hefeextrakt verwendet. Die benötigten Zutaten wurden auf einer Laborwaage abgewogen und in eine mit 800 ml gefüllte 1000 ml Schottflasche gegeben. Das Nährmedium wurde nun bei 121°C im Autoklaven sterilisiert und bei 4°C für maximal 4 Wochen im Kühlraum gelagert. Zur Herstellung der LB - Agarplatten wurde der oben beschriebenen Zusammensetzung des Mediums noch 12 g Agar hinzugefügt und unter gleichen Bedingungen sterilisiert. Nach der Sterilisation wurde der LB - Agar unter der Sterilbank (Fa. Heraeus Instruments, Hanau) in sterile Petrischalen gegossen und ebenfalls bei 4°C im Kühlraum gelagert. Die LB - Agarplatten wurden nie länger als eine Woche aufbewahrt.

Bei der Herstellung des TSB -Mediums wurden 800 ml reinstes Wasser mit 20 g des Tryptic Soy Pulvers vermischt. Das TSB-Medium wurde daraufhin bei 121°C sterilisiert und bei 4°C kühl aufbewahrt.

2.3.2 Einfrieren der Keime zur Lagerung

Die Bakterien wurden bei -18°C gelagert. Zuerst wurden einzelne Kolonien der Keime von einer Kulturplatte mit einer ausglühten Sonde abgeschabt. Diese Kolonien wurden dann in ihren jeweiligen Nährmedien 24h bei 37°C bebrütet. Hiernach wurden 0,3 ml der angesetzten Kulturen mit 0,7 ml Medium und 5% Glycerin in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und maximal sechs Monate bei -18°C gelagert.

2.3.3 Kultivierung der Versuchskeime

Escherichia coli und *Staphylokokkus epidermidis* wurden in LB - Medium bebrütet und auf LB - Agarplatten geimpft. *Streptokokkus pneumoniae* wurde in TSB - Medium bebrütet und auf Schafsblutplatten ausgebracht.

Zum Anbrüten der Bakterien wurden 3 μl der gekühlten Bakterienlösung in ein Glasfläschchen mit 2 ml des jeweiligen Mediums gegeben und 24 h bei 37°C im Schüttler bebrütet.

2.4 Vorversuche

In den Vorversuchen wurde zum einen untersucht, ob die Verwendung der Titandrähte zur Aufhängung der Testplättchen bei den Metallen Gold, Silber und Stahl, sowie Polystyrol zu Wechselwirkungen im Bereich der Aufhängung an den Plättchen führten.

Zum anderen sollte geklärt werden, mit welcher Intensität das Ablösen der Testkeime mittels Ultraschallbad und Vortex - Mixer von der Oberfläche erfolgen sollte.

Ein weiterer Vorversuch beschäftigte sich mit der Realisierung des Anfärbens der Keime auf den Prüfkörpern.

2.4.1 Vorversuch zur möglichen Beeinflussung der Titandrähte auf die Testplättchen

Die Bakterien wurden wie nachfolgend unter 2.5.1.2 beschrieben auf den Oberflächen kultiviert und wie unter 2.6.1.1 ausgeführt, gewaschen. Die Bakterien waren also nicht abgelöst, sondern auf den Plättchen belassen worden.

Die Plättchen wurden nun im REM bis zur 5000fachen Vergrößerung untersucht, wobei das Hauptaugenmerk der Perforation am Rand des Plättchens galt. Insbesondere wurden die Plättchen der Metalle Gold, Silber und Stahl darauf geprüft ob eine Beeinflussung der Testergebnisse durch galvanische Ströme durch die verschiedenen Metalle der Testplättchen und der Titanaufhängung entstand.

Ebenfalls kontrolliert wurde, ob es zu einer mechanischen Verletzung der Oberflächen gekommen war. Diese Kontrolle diente der Überprüfung, ob es zwischen den Plättchen untereinander oder mit der Wand des Erlenmeyer - Kolbens zu Kollisionen gekommen war.

2.4.2 Vorversuch zur Anwendung von Ultraschall und Vortex beim Ablösen der Testkeime und der Adhäsionsfähigkeit der Testkeime

Ein weiterer Punkt der im Vorfeld geklärt werden musste, war die Anzahl und die Dauer der Zyklen zum Ablösen der Keime von der Oberfläche. Bei zu geringer Intensität des Ablösevorgangs wären zu viele Keime an der Oberfläche

haften geblieben, bei zu hoher Intensität wären zu viele Keime abgetötet worden.

Zur Untersuchung wurden die Oberflächen der Testmaterialien wie unten beschrieben bewachsen, nur in der Dauer und Anzahl der Zyklen zur Ablösung wurde variiert.

Als Testkeim wurde *Staphylokokkus epidermidis* gewählt, da er die besten adhäsiven Eigenschaften der Testkeime aufweist. Von den Prüfkörpern wurden Polystyrol, Gold, Silber, Stahl und Titan verwendet.

Die verschiedenen Zyklen sahen wie folgt aus:

1. Plättchen: Nur Abwaschen, kein Ablösen durch Ultraschall oder Vortex
2. Plättchen: Ablösen allein durch Ultraschall zehnmal 30 sec mit 30 sec Pause
3. Plättchen: Ablösen durch Ultraschall zehnmal 30 sec und viermal 15 sec im Vortex - Mixer mit 45 sec Pause
4. Plättchen: Ablösen durch Ultraschall 10x45 sec und 2x 60 sec im Vortex - Mixer mit 120 sec Pause.

Die Auswertung erfolgte anhand der ausgezählten Kolonien und zusätzlich durch die Kontrolle mittels REM.

2.4.3 Vorversuche zur Anfärbung der Testkeime

In diesem Versuch sollte geklärt werden, inwieweit sich die Bakterien anfärben lassen und ob eine Irritation der Testmaterialien durch den DNA-Farbstoff zu erwarten ist.

Die Versuchsreihe wurde in zwei Gruppen aufgeteilt. In der ersten Gruppe wurden je zwei Plättchen aller fünf Testmaterialien mit Keimen bewachsen und wie unten beschrieben, gewaschen. In der anderen Gruppe wurden ebenfalls zwei Testkörper von jedem Material verwendet, aber nicht mit Bakterien besiedelt.

Hiernach wurden beide Gruppen auf die gleiche Weise mit dem DNA-Farbstoff

(SYBR® Green I, Fa. Molecular Probes Inc., Richmond, OR, USA) angefärbt. Die Methode erfolgte analog zu 2.7.1. Die Auswertung erfolgte im Photometer und die Kontrolle mittels Fluoreszenzmikroskop.

2.5 Bewachsen der Prüfkörper

Es wurden zwei Methoden ausgewählt um eine orientierte Aussage über das Wachstum der Bakterienstämme auf der Oberfläche der verschiedenen Materialien treffen zu können.

Das Bewachsen der Plättchen war bei beiden Versuchsanordnungen gleich, jedoch wurden zwei verschiedene Methoden zur Auswertung des bakteriellen Wachstums auf den Materialien herangezogen.

Zum einem wurde eine indirekte Methode benutzt. Hierzu wurden die Bakterien von den Plättchen gelöst, auf Nährböden ausgebracht und inkubiert. Anhand der Anzahl der gewachsenen Kolonien wurde die Menge der adhärenierten Bakterien auf dem getesteten Material bestimmt. Die Bestimmung erfolgte visuell unter Auszählen von sogenannten colony forming units (CFU).

Bei der zweiten Methode wurde das bakterielle Wachstum direkt auf dem Prüfkörper untersucht. Zu diesem Zweck wurden die an der Oberfläche der Plättchen haftenden Bakterien mit einem DNA-Fluoreszenzfarbstoff (SYBR® Green I, Molecular Probes, Inc., Richmond, OR, USA) gefärbt. Die Auswertung erfolgte quantitativ in einem Fluoreszenzphotometer (Spectrafluor Plus, Fa. TECAN, CH- Maennendorf).

2.5.1 Versuchsablauf zum Bewachsen der Plättchen

2.5.1.1 Aufbau der Halterung der Plättchen

Bei dem Bewachsen der Plättchen lag die Schwierigkeit darin, ein gleichmäßiges Wachstum der Bakterien über die Fläche zu erhalten. Aus diesem Grund konnten die Plättchen nicht einfach in eine Nährlösung gelegt werden. Hierbei hätte nicht ausgeschlossen werden können, dass die Plättchen sich im rotierenden Brutschrank umgedreht oder überlagert hätten und es somit zu einem ungleichmäßigen Bewuchs gekommen wäre. Des Weiteren hätten Kollisionen unter den Plättchen bzw. mit der Gefäßwand zu nicht einschätzbaren Irritationen auf der Oberfläche der Testkörper geführt.

Aus diesen Gründen wurden die Plättchen fixiert in eine Nährlösung gehängt. Zu diesem Zweck wurde ein Titanverschluss für einen Erlenmeyer-Kolben (250 ml) angefertigt (Siehe Abbildung 3). In den Verschluss sind vier Gewinde gebohrt in denen jeweils ein starrer Titandraht befestigt ist, an dessen Ende sich ein Häkchen zur Aufhängung der Plättchen befindet. In den Gewinden befindet sich ein dünner Gummischlauch der über die Titandrähte gestülpt ist. Wenn die Schrauben angezogen werden, wird der Gummischlauch komprimiert und dadurch der Draht im Gewinde befestigt. Alle vier Drähte ragen 13 cm tief in den Kolben hinein.

Der Abstand zwischen den Haken ist so gewählt, dass die Plättchen frei umherschwingen können, ohne sich oder den Kolben zu berühren. Am Titanverschluss befindet sich weiterhin ein Dichtungsring aus Gummi. Diese Halterung wurde bei 121°C und 3 bar sterilisiert. Die Gummidichtungen konnten ohne Probleme bei 121°C sterilisiert werden.

Mit dieser Halterung konnten die Plättchen frei im Nährmedium hängen und auf diese Weise gleichmäßig von den Keimen bewachsen werden. Außerdem gewährleistete die Halterung, dass es zu keinen Berührungen zwischen den Testkörpern oder mit dem Kolben kam.

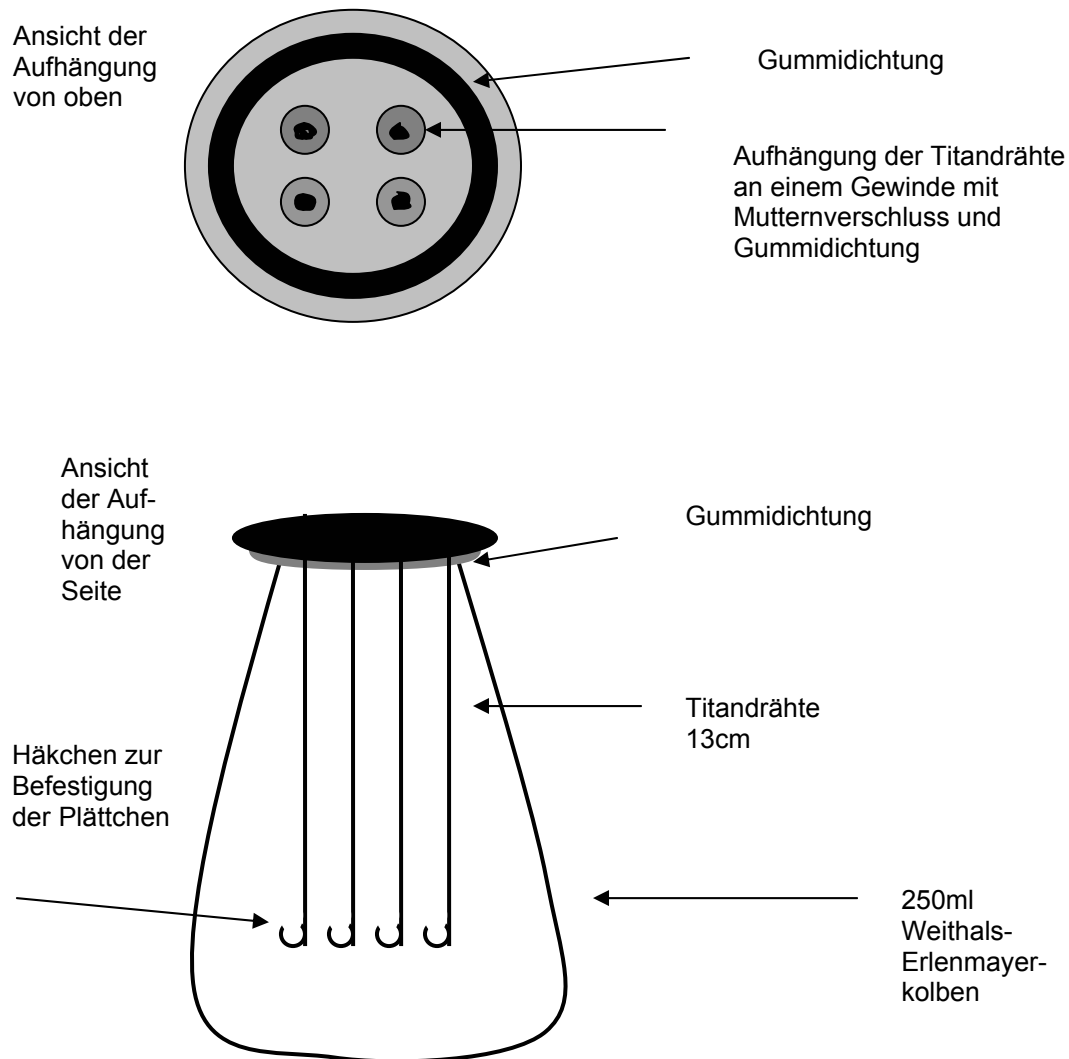


Abbildung 3: Konstruktion zur Befestigung und Besiedlung der Plättchen

2.5.1.2 Bewachsen der Plättchen

Zum Bewachsen der Plättchen wurden jeweils 300 µl einer wie unter 2.3.3 beschriebenen Bakterienkultur in fünf Weithals-Erlenmeyer - Kolben, die 150 ml des jeweiligen Mediums enthielten, unter der Sterilbank pipettiert.

Mittels einer sterilisierten Pinzette wurden vier Plättchen eines Materials in die Häkchen der Halterung gehängt. Dabei wurden die Plättchen nur an ihrem

randständigen Loch gefasst, um mechanische Schädigungen der Oberfläche zu vermeiden. Jeder Kolben enthielt vier Plättchen eines Materials.

Danach wurde der Kolben mit dem Titanverschluss verschlossen. Die Menge des Nährmediums war so gewählt, dass die Plättchen auch unter den kreisenden Bewegungen im Schüttler stets von Medium bedeckt waren. Die Kolben wurden 24h bei 37°C bebrütet.

2.6 Auszählmethode (CFU) und Kontrolle der Plättchen im REM

2.6.1.1 Waschen der besiedelten Testkörper

Durch das Waschen der Versuchsplättchen wurden nur die Bakterien abgelöst, welche nicht adhäsiv mit der Oberfläche verbunden waren. Im nächsten Schritt wurden die Plättchen vorsichtig von den Häkchen abgenommen. Dieser Schritt erfolgte unter dem sterilen Abzug und die Plättchen wurden nur an ihrem randständigen Loch mit einer sterilisierten Pinzette angefasst. Die Plättchen wurden nun einzeln in jeweils einen sterilisierten Kolben mit 2 ml gekühltem Medium gelegt und verschlossen. Die Kolben befanden sich in einem Eisbad, um die Vermehrung der Keime zu hemmen. Das gesamte Eisbad mit den Kolben wurde auf einen langsam schwingenden Schüttler gestellt und dort für 5 Minuten belassen. Die Kolben wurden nun wieder unter der Sterilbank geöffnet und das Medium mit einer Pipette abgesaugt. Danach wurden 2 ml frisches, gekühltes und sterilisiertes Medium in die Kolben gegeben und der Vorgang auf dem Schüttler wiederholt.

Nach dem Entfernen der nicht adhärenen Bakterien, wurden die Plättchen, wiederum mit einer sterilen Pinzette und unter dem sterilen Abzug, aus den Kolben herausgenommen und mit 1 ml Medium aus einer Pipette abgespült. Die so gereinigten Plättchen wurden nun einzeln in Plastikfläschchen, welche 1 ml Medium enthielten, gelegt und die Fläschchen verschlossen.

2.6.1.2 Ablösen der Bakterien vom Testkörper

Der nächste Schritt diente dem Ablösen der Bakterien von der Oberfläche der Testmaterialien. Zu diesem Zweck wurden die Plättchen einer Ultraschallbehandlung in einem Eisbad mit zehn Zyklen unterzogen. Jeder Zyklus begann mit 30 sec Ultraschallbehandlung mit anschließend 30 sec Pause. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Fläschchen in einen Vortex - Mixer nochmals in vier Zyklen behandelt. Ein Zyklus bestand hier aus 20 sec vortexen und 60 sec Pause im Eisbad. Die Dauer und Anzahl der einzelnen Zyklen im Ultraschallbad und Vortex – Mixer wurden in den Vorversuchen wie unter 2.4.2 beschrieben ermittelt.

2.6.1.3 Verdünnungsreihe

Die abgelösten Bakterien wurden nun einer Verdünnungsreihe unterzogen. Zu diesem Zweck wurden für jeden Testkörper drei Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 0,9 ml Medium vorbereitet.

In das erste Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden nun 0,1 ml des Mediums aus den Plastikfläschchen, in dem sich die abgelösten Bakterien befanden, pipettiert. Das Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde nun für 5 sec in den Vortex - Mixer gestellt. Aus diesem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden wieder 0,1 ml mit einer neuen Pipettenspitze herauspipettiert und in das zweite Eppendorf-Reaktionsgefäß dieser Reihe pipettiert. Die Verdünnung im dritten Eppendorf-Reaktionsgefäß erfolgte analog dem bisherigen Vorgehen und die herauspipettierten 0,1 ml wurden zum Abfall gegeben.

Auf diese Weise erhielt man eine Verdünnung der Bakterienlösung von 10^{-1} bis 10^{-3} . Dieser Vorgang wurde für jeden Testkörper wiederholt.

2.6.1.4 Impfen der Nährböden

Darauf folgend wurden aus jedem Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,1 ml herauspipettiert und auf eine Platte mit Nährboden angeimpft. Damit sich die Keime gleichmäßig über den Nährboden verteilen, wurden auf Platten sterile Kunststoffkügelchen gegeben, die bei langsamem Rotieren die Keime gleichmäßig verteilen. Nachdem die Kügelchen wieder entfernt waren, wurden die Platten für 48h bei 37,5°C im Brutschrank inkubiert.

2.6.1.5 Auswertung

Das Auszählen der Kolonien (CFU) erfolgte nach 48h visuell. Dabei erhielt man von jedem Plättchen das Ergebnis der Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-3} . Es lagen somit vier Verdünnungsreihen von jedem untersuchten Material vor und konnten ausgezählt werden.

2.6.2 Kontrolle der Plättchen im Rasterelektronenmikroskop (REM)

Am Ende jeder Versuchsreihe wurde kontrolliert, ob das Ablösen der Bakterien erfolgreich war. Die Kontrolle erfolgte im Rasterelektronenmikroskop. Für eine Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop muss das zu untersuchende Objekt eine Reihe von Bedingungen aufweisen. Das Objekt wird in einem Hochvakuum mit Elektronen beschossen. Hierbei darf das Untersuchungsobjekt nicht beschädigt oder verunreinigt sein. Es darf zu keiner Formveränderung des Objekts oder Ausgasen kommen. Die Elektronen müssen auf eine elektrisch leitende Oberfläche auftreffen und dürfen nicht durch störende Aufladungen abgelenkt werden.

Diese Voraussetzungen sind bei organischen Objekten wie Bakterien nicht gegeben. Bakterien enthalten Wasser und die Oberfläche ist für einen Beschuss mit Elektronen nicht geeignet. Daher müssen, vor der Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop, die Bakterien getrocknet und die Oberfläche mit Gold bedampft werden. Hierdurch wird eine dünne, elektrisch leitende Goldschicht erzeugt.

2.6.2.1 Fixieren und Entwässern der Keime

Zur Fixierung der Keime wurden die Testkörper in 20 ml Glasfläschchen mit 5 ml Glutaraldehyd PBS - Lösung (6,25 %) gelegt. Die Glasfläschchen wurden geschlossen und die Testkörper für 24h darin belassen. Nach der Fixierung erfolgte eine Waschung der Testkörper mit PBS - Lösung. Hierzu wurden unter einem Abzug die Testkörper in ein anderes 20 ml Glasfläschchen mit 5 ml PBS gegeben. Nach fünf Minuten wurde die Pufferlösung mit einer Pipette entfernt und erneut 5 ml frische Pufferlösung in Fläschchen gegeben. Dieser Vorgang wurde insgesamt fünfmal wiederholt. Die Entwässerung der Keime erfolgte mittels einer aufsteigenden Acetonreihe. Die Probekörper wurden jeweils für zehn Minuten in 30%, 50%, 70%, 90% und sechsmal in 100% Aceton entwässert.

2.6.2.2 Kritisch – Punkt – Trocknen (CPD)

Beim Übergang vom flüssigen in den gasförmigen Zustand können hohe Oberflächenspannungen auftreten. Um einen solchen Phasenübergang zu vermeiden, wurden die Proben oberhalb des kritischen Punkts getrocknet. Der kritische Punkt von Wasser kann nur unter hohen Druck- und Temperaturbedingungen (674,4° K / 217 bar) erreicht werden. Deshalb muss es durch ein Medium mit leicht erreichbarem kritischen Punkt ersetzt werden.

Das Wasser in den Bakterien wurde durch die Acetonreihe gegen Aceton ausgetauscht. Das Aceton wurde mit flüssigem CO₂ gemischt. Der kritische Punkt von CO₂ liegt bei 304,2°K / 72 bar. Hierdurch erreicht man eine formerhaltende Trocknung der Keime. Die Kritisch-Punkt-Trocknung erfolgte nach Herstellerangaben im Kritisch-Punkt-Trocknungsgerät (CPD 030, Bal-Tec AG, Liechtenstein).

2.6.2.3 Präparationen der Testkörper für das REM

Nach dem Trocknen der Plättchen wurden diese auf Trägern für das REM befestigt. Hierzu wurden die Plättchen an ihrer randständigen Perforation mittels einer sterilen Pinzette aus der Wellplatte entnommen und auf Trägern für das Rasterelektronenmikroskop mittels doppelseitiger Klebefolie befestigt.

Die Testmaterialien wurden nun einer Goldbedampfung unterzogen, dem sogenannten Sputtern. Ziel des Sputterns ist es eine leitfähige, feine Goldschicht auf den Bakterien zu erzeugen. Dieser Vorgang wird in einem Sputter (Fa. Emitech, K550, Ashford, GB) vorgenommen, der aus einem evakuierten, mit Argongas gefüllten hohlen Zylinder besteht. In diesem Zylinder befinden sich zwei gegenüberliegende Metallplatten, die durch Anlegen einer Hochspannung von circa 1500 Volt als Kathode und Anode dienen. Beim Anlegen der elektrischen Spannung entstehen im Zylinder positiv geladene Argon - Ionen. Die Argon - Ionen werden zur Kathode beschleunigt und schlagen beim Auftreffen Goldatome aus der Goldfolie. Die Atome verteilen sich diffus im Zylinder, werden von der Anode angezogen und schlagen sich auf dem Prüfkörper nieder.

2.6.3 Auswertung unter dem REM

Die Oberfläche wurde auf die Effektivität des Ablösens der Keime im REM untersucht. Des Weiteren wurde eine Kontrolle auf eventuelle mechanische Irritationen der Oberfläche oder Verunreinigungen vorgenommen.

Es gelang in keinem der Fälle eine Ablösung sämtlicher Keime, jedoch war die Anzahl der verbleibenden Bakterien vernachlässigbar gering. Die Vergrößerung wurde im Bereich von 100fach bis 5000fach gewählt.

2.7. Bestimmung der bakteriellen Adhäsion auf den Testmaterialien mittels des Fluoreszenzphotometers

2.7.1 Anfärben der Keime

Das Bewachsen der Testkörper erfolgte wie unter 2.5.1.2 beschrieben. Die Plättchen wurden wie unter 2.6.1.1 beschrieben gewaschen.

In dieser Versuchsreihe wurde auf Polystyrolplättchen verzichtet, da diese eine Eigenfluoreszenz besitzen und eine Auswertung mit dem Fluoreszenzphotometer nicht möglich ist.

Nach dem Bewachsen wurden die Plättchen mit PBS abgespült und in eine 24 - Well - Zellkulturplatte gelegt. Die Fixierung erfolgte 20 Minuten in 5 ml Glutaraldehyd -PBS - Lösung (6,25 %). Anschließend wurde die Glutaraldehyd - PBS - Lösung (6,25 %) mit einer Glaspipette entfernt und die Plättchen zweimal mit PBS abgewaschen.

Im nächsten Schritt wurden die Bakterien mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Der Sinn der langsam aufsteigenden Alkoholreihe war es, die Wasserkonzentration in den Bakterien langsam zu senken, um ein Platzen der Keime zu verhindern. Es wurden jeweils 0,5 ml Ethanol in den Konzentrationen 30%, 50%, 70%, 80% und 100% verwendet. Die Prüfkörper wurden 5 Minuten in der jeweiligen Ethanollösung belassen. Beginnend mit

30% wurde nach 5 Minuten die Lösung mit einer Pipette entfernt und durch die nächsthöhere Konzentration ersetzt. Dieser Vorgang wurde bis zu 100% Ethanol weitergeführt und dann nochmals fünfmal mit 100 % Ethanol wiederholt. Nach dem Trocknen wurden die Plättchen 20 Minuten unter die Sterilbank gestellt, damit der restliche Alkohol verdunsten konnte.

Nach der Trocknung wurden die Testkeime mit dem DNA - Farbstoff SYBR® Green I angefärbt. Zu diesem Zweck wurde der Farbstoff mit Trispuffer im Verhältnis 1:100000 verdünnt und 0,5 ml dieser Verdünnung zu jedem Plättchen gegeben. Dort wurde die Verdünnung für fünf Minuten belassen und dann entfernt. Zur Entfernung des restlichen Farbstoffes wurde den Plättchen 0,5 ml Trispuffer in die 24 – Well - Zellkulturplatte zugegeben und nach 15 sec mit einer Pipette entfernt. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt.

Hiernach erfolgte die Trocknung unter der Sterilbank für 20 Minuten. Die 24 - Well- Zellkulturplatte wurde während der Trocknung mit Aluminiumfolie abgedunkelt und das Licht unter der Sterilbank ausgeschaltet, um eine Ausbleichen der Proben zu verhindern.

2.7.2 Einrichten des Fluoreszenzphotometers

Zunächst musste das Fluoreszenzphotometer für die verwendete 24 - Well - Zellkulturplatte und den verwendeten Farbstoff kalibriert werden.

Die Maße der verwendeten 24 - Well - Zellkulturplatte, wurden aus dem Auswahlmenü der Software Magellan v.2.0 ausgewählt und die korrekte Position der Lichtblitze überprüft.

Die bei SYBR® Green I verwendete Wellenlänge des Filters für die Exzitation betrug 485 nm und für die Emission 535 nm. Die Messung der Fluoreszenz wurde mit jeweils fünfmal fünf Lichtblitzen für jedes Well vorgenommen.

Für jedes Well ergaben sich nach der Messung 25 Zahlenwerte, die zur Auswertung gemittelt wurden. Die so erhaltenen Zahlenwerte, ergaben einen quantitativen Hinweis auf die Anzahl der Bakterien auf einem Prüfkörper.

2.7.3 Kontrolle der Testkörper unter dem Fluoreszenzmikroskop

Die Testkörper wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop visuell auf mechanische Verletzungen der Oberfläche und Verunreinigungen kontrolliert. Gleichfalls wurde untersucht ob eine gleichmäßige Einfärbung der Bakterienkultur stattgefunden hat. Die Testmaterialien wurden einzeln auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem auf den Farbstoff abgestimmten Farbfilter BP450-490/BP515-565 unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiolab, Carl Zeiss GmbH, Jena) ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Auswertung der Vorversuche

3.1.1 Auswirkung der Titanaufhängung auf das Wachstum der Bakterien

Die Überprüfung erfolgte visuell mittels Rasterelektronenmikroskopie. Es konnte bei keinem der verwendeten Werkstoffe Besonderheiten im Bereich der Perforation festgestellt werden. Der Bewuchs der Keime war gleichmäßig über die Plättchen verteilt. Die Titanaufhängung verfälschte die Ergebnisse des Keimbewuchses auf den getesteten Metallen Gold, Stahl und Silber nicht. Mechanische Irritationen der Testoberfläche traten nur vereinzelt auf und waren nicht ausschlaggebend für das Ergebnis.

Abbildung 4

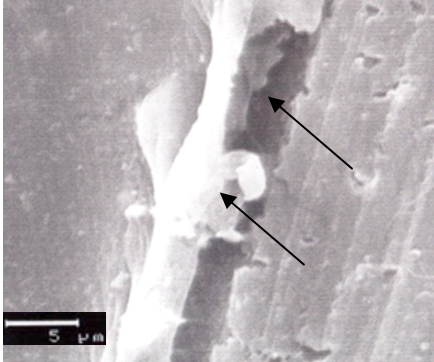


Abbildung 4: randständige Perforation (Pfeilspitzen). Die Titanaufhängung beschädigte die Prüfkörper nicht. Vergrößerung 3000fach.

3.1.2 Ablösen der Testkeime

3.1.2.1 Ablösen der Keime durch alleiniges Abwaschen mit LB-Medium

Die Ergebnisse waren sehr unterschiedlich, wobei sich jedoch insgesamt zeigte, dass das alleinige Abwaschen der Testkörper ein unzureichendes Ablösen der Keime von der Oberfläche aufwies. Dies wurde durch die Kontrolle im Rasterelektronenmikroskop bestätigt. Bei der Rasterelektronenmikroskopie konnte eine gleichmäßige, dichte Besiedlung der Bakterien auf der Oberfläche aller Testmaterialien festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde zur Ablösung der Keime diese Methode nicht eingesetzt.

Staphylokokkus epidermidis

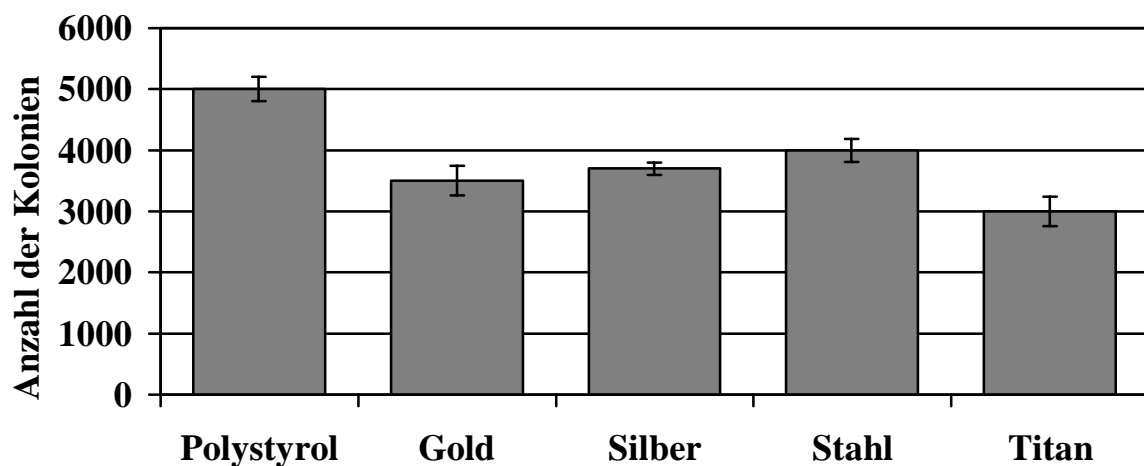


Abbildung 5: Darstellung der ermittelten Werte des Vorversuchs zur Ablösung der Keime durch alleiniges Waschen der Probekörper nach Auszählen der CFU.

3.1.2.2 Ablösen der Keime nur durch Ultraschall

Für diesen Versuch wurden die Keime allein durch ein Ultraschallbad abgelöst. Die von Bakterien bewachsenen Prüfkörper wurden zehnmal für 30 sec dem Ultraschallbad ausgesetzt. Zwischen jeder Behandlung im Ultraschallbad folgte eine Ruhephase von 30 sec.

Staphylokokkus epidermidis

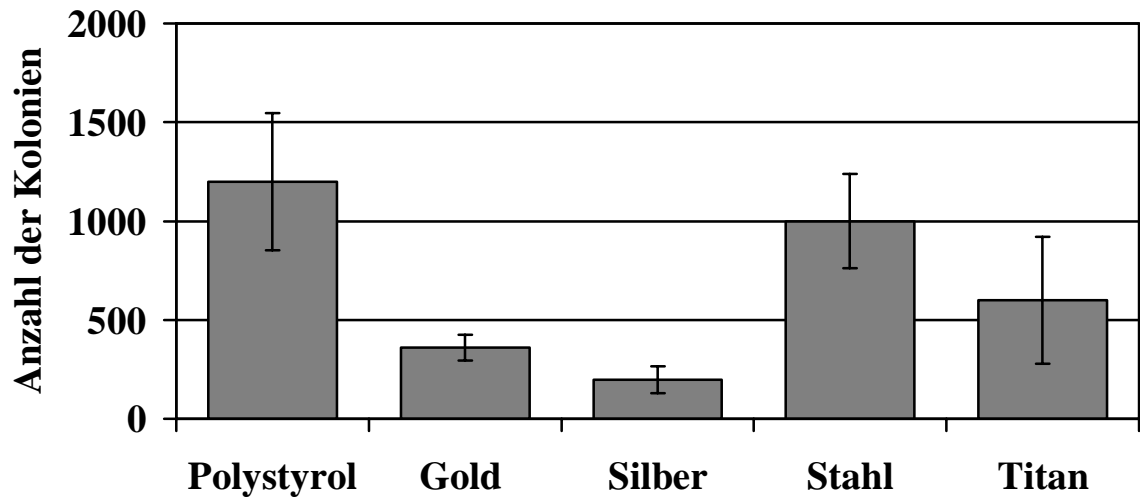


Abbildung 6: Darstellung der ermittelten Werte des Vorversuchs zur Ablösung der Keime nur durch das Ultraschallbad nach Auszählen der CFU.

Die Ergebnisse beim Auszählen der Kolonien schienen vernünftige Daten zu liefern. Bei der folgenden rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung wurden jedoch bei den metallischen Werkstoffen vereinzelt größere Kolonien auf der Oberfläche gefunden.



Abbildung 7

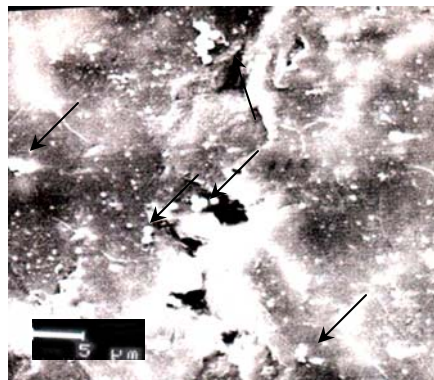


Abbildung 8

Abbildung 7 und Abbildung 8: große Kolonie (Pfeil) auf der Goldoberfläche links, rechts zahlreiche Bakterien (Pfeile) auf Polystyrol. Beide Abbildungen 3000-fache Vergrößerung.

Bei Polystyrol konnte sogar ein regelmäßiges Auftreten von Bakterienkolonien auf der gesamten Oberfläche festgestellt werden. Mit dieser Methode konnte keine vollständige Ablösung der Keime erzielt werden.

3.1.2.3 Ablösen der Keime durch Ultraschall und Vortex – Mixer

Das Ablösen erfolgte durch zehnmahlige Inkubation im Ultraschallbad für 30 sec mit jeweils 15 sec Pause und viermaliges Ablösen im Vortex - Mixer für 15 sec mit 45 sec Pause.

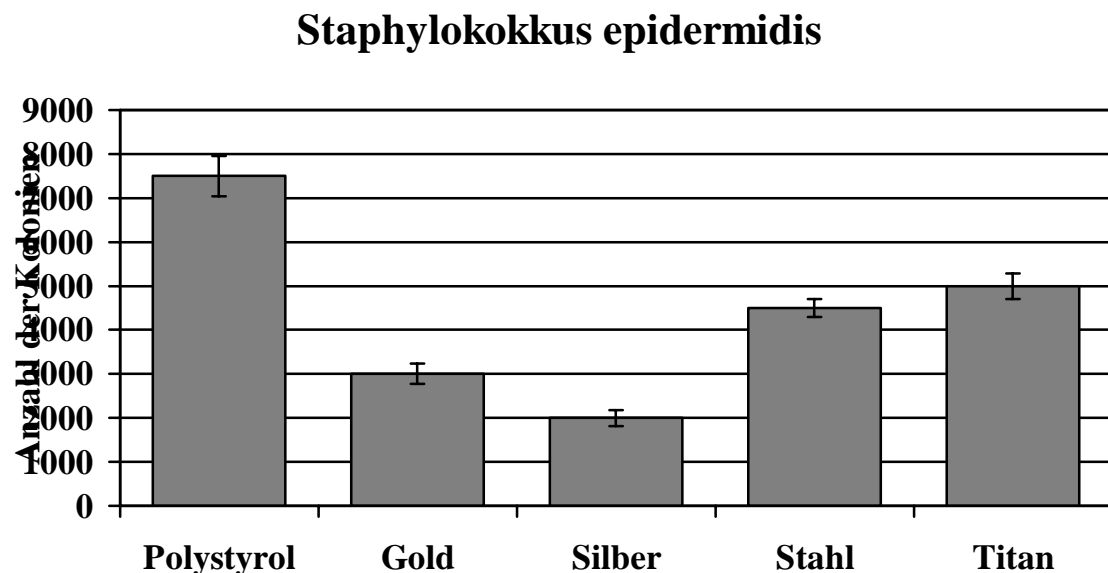


Abbildung 9: Darstellung der ermittelten Werte des Vorversuchs zur Ablösung der Keime durch Waschen und Ultraschall nach Auszählen der CFU.

Die Ergebnisse ergaben nachvollziehbare Werte bei allen verwendeten Materialien. Unter dem REM konnte keine größere Anzahl von Bakterien gefunden werden.

3.1.2.4 Ablösen der Keime durch Ultraschallbad und Vortex - Mixer mit verlängerten Behandlungszeiten

Diese Versuchsreihe erfolgte wie unter 3.1.2.3 beschrieben, es wurden jedoch die Behandlungszeiten verändert. Das Ablösen im Ultraschallbad wurde mit zehnmal 45 sec und jeweils 15 sec Pause durchgeführt. Im Vortex - Mixer wurden die Plättchen zweimal für 60 sec abgewaschen mit einer Ruhepause von 120 sec.

Staphylokokkus epidermidis

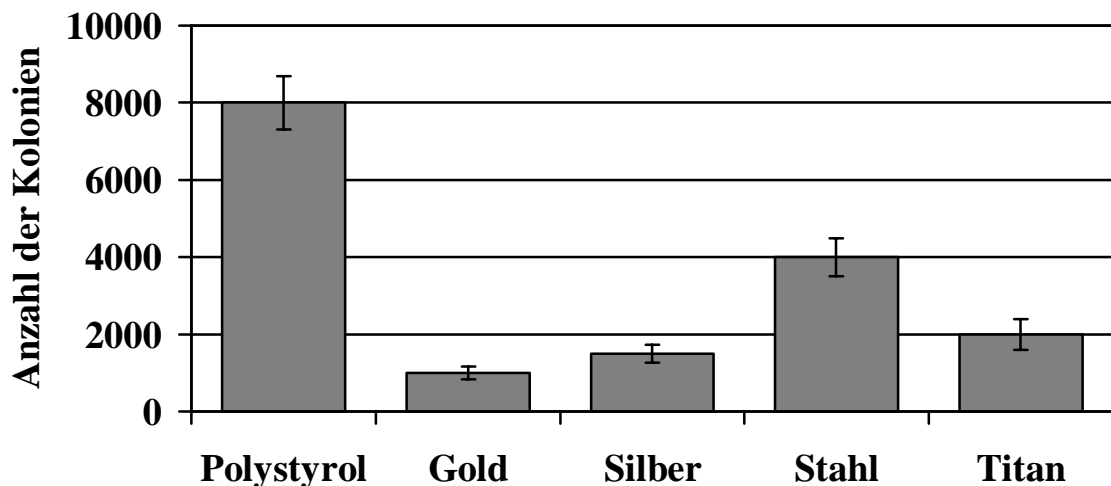


Abbildung 10: Darstellung der ermittelten Werte des Vorversuchs zur Ablösung der Keime durch längeres Waschen und Ultraschallbad nach Auszählen der CFU.

Die Kontrolle im REM ergab, dass nur vereinzelt Bakterien auf den Oberflächen der Plättchen zu finden waren. Gold, Silber und Titan wiesen von den anderen Vorversuchen abweichende Ergebnisse auf. Aufgrund der geringeren Anzahl der Kolonien bei diesen Materialien, musste von einem Absterben der Bakterien bei dieser Behandlung ausgegangen werden.

3.1.3 Anfärben bewachsener und unbewachsener Oberflächen mit SYBR® Green I

Die Metallwerkstoffe ohne bakterielle Besiedlung wiesen keine Fluoreszenz auf. Der Farbstoff interagiert nicht mit den Metallen Gold, Titan, Silber und Stahl. Metallwerkstoffe die von Keimen besiedelt und angefärbt wurden, zeigten jedoch eine ausgeprägte Fluoreszenz. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte ein deutlicher Bewuchs mit Bakterien erkannt werden. Bei Polystyrol zeigte sich sowohl bei besiedelten als auch bei unbesiedelten Testplättchen eine hohe Fluoreszenz. Bei der Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte keine Unterscheidung zwischen bewachsenen und unbewachsenen Plättchen getroffen werden. Die Testplättchen stellten sich als stark fluoreszierend dar, wobei die Fluoreszenz auf allen Bereichen der Oberfläche die gleiche Stärke aufwies.

Aufgrund dieser Tatsache muss davon ausgegangen werden, dass Polystyrol eine Eigenfluoreszenz besitzt und somit keine Aussage über die Anzahl der Bakterien auf der Polystyroloberfläche gemacht werden kann. Aus diesem Grund wurde auf Polystyrol in den Testreihen mit der Fluoreszenzmessmethode verzichtet.

3.2 Ergebnisse zum Wachstum von *Escherichia coli* auf den Versuchswerkstoffen

3.2.1 Auswertung zum Wachstum von *Escherichia coli* auf verschiedenen Werkstoffen (indirekte Methode)

Abbildung 11 zeigt die Anzahl der kolonienbildenden Einheiten von *Escherichia coli* auf den Nährböden.

Escherichia coli

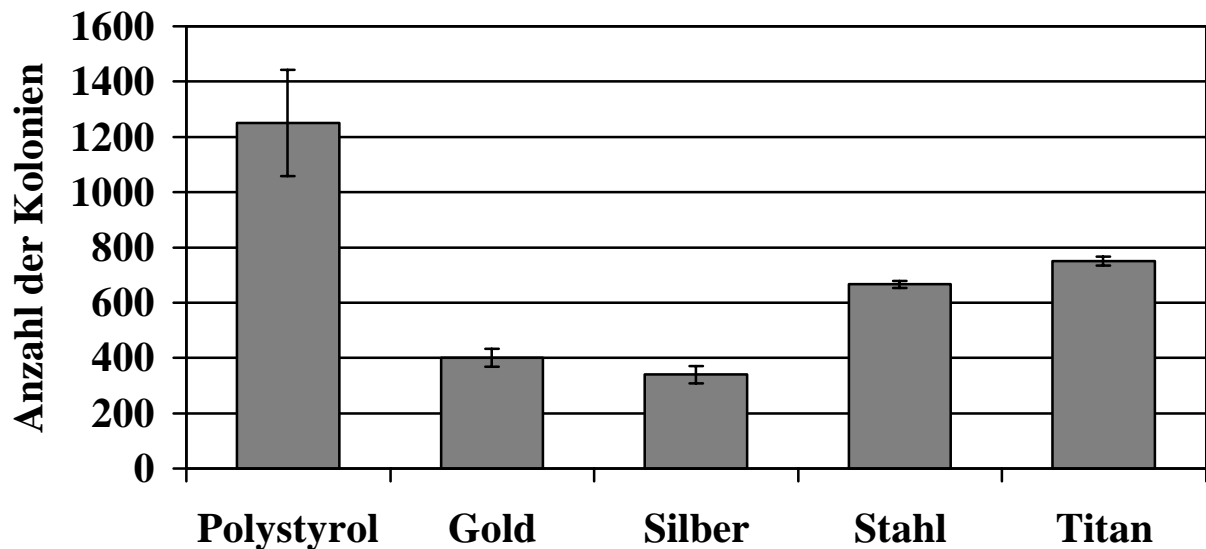


Abbildung 11: Bakterienbewuchs auf den diversen Testmaterialien. Polystyrol zeigt die stärkste Besiedlung durch *Escherichia coli*. Silber und Gold wurden am schwächsten besiedelt. Die Besiedlung von *Escherichia coli* auf Titan und Stahl war deutlich höher als auf Gold und Silber, jedoch geringer als auf Polystyrol. Ausgezählt wurden die CFU der Verdünnungsstufe 1:10.

Die Kolonien wurden durch Ablösen der Bakterien von den Probekörpern Gold, Polystyrol, Silber, Stahl und Titan gewonnen. Polystyrol wies die höchste Keimbesiedlung auf, die Silberplättchen die geringste Besiedelung. Ebenfalls eine geringe Anzahl von Kolonien konnte von der Goldoberfläche gewonnen werden. Das stärkste Wachstum, neben Polystyrol, zeigte *Escherichia coli* auf Stahl und Titan. Titan weist dabei hierbei eine höhere Anzahl abgelöster Kolonien auf als Stahl.

3.2.2 Auswertung der Adhäsion von *Escherichia coli* auf verschiedenen Werkstoffen mit dem Fluoreszenzphotometer (direkte Methode)

Die Werte wurden aus den Ergebnissen der Fluoreszenzmessung der vier Testplättchen jeden Materials ermittelt und zu einem Mittelwert zusammengefasst.

Abbildung 12 zeigt das Wachstum von *Escherichia coli* auf den Versuchsplättchen aus Gold, Silber, Stahl und Titan. Die Angaben entsprechen einem quantitativen Nachweis der bakteriellen Adhäsion auf den Plättchen. Die Werte entsprechen der gemessenen Fluoreszenzintensität auf den besiedelten Testmaterialien. Sie liefern keinen Nachweis über die tatsächliche Anzahl der adhätierenden Keime auf den Prüfkörpern. Die ermittelten Werte entsprechen in etwa den Ergebnissen der vorherigen Versuchsreihe.

Escherichia coli

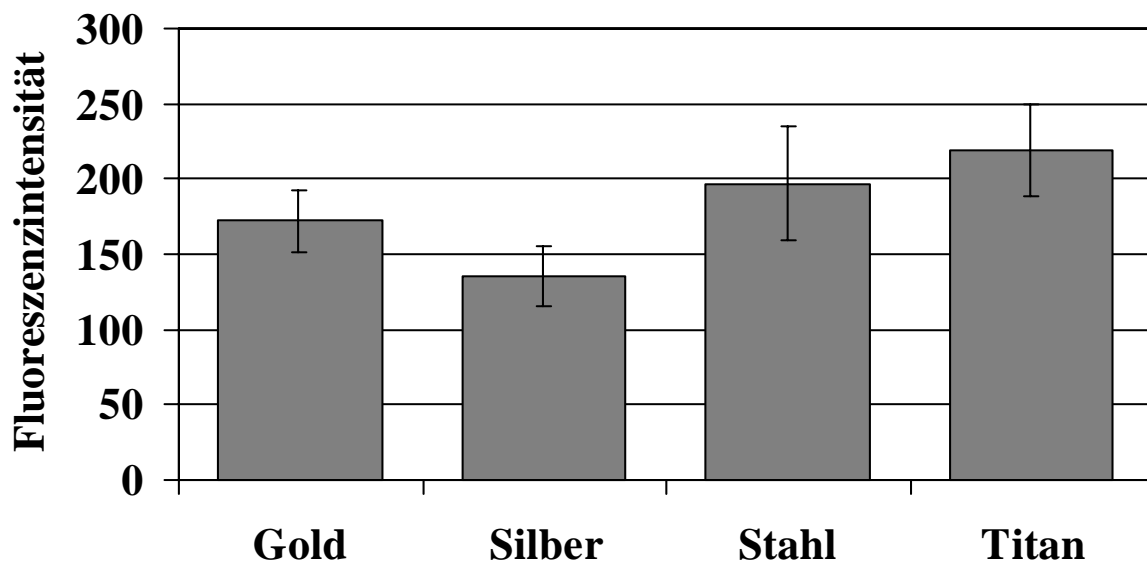


Abbildung 12: Wachstumsverhalten von *Escherichia coli* auf den Prüfkörpern. Auf Titan war die Adhäsion von *Escherichia coli* am stärksten, auf Silber am geringsten.

Auch hier weist *Escherichia coli* auf Titan das stärkste bakterielle Wachstum auf. Die Werte von Stahl sind in allen Auswertungen unwesentlich niedriger als

die von Titan. Gold und Silber hingegen weisen ein tendenziell geringeres Wachstum von *Escherichia coli* auf. Silber ist auch hier der Werkstoff mit der niedrigsten Wachstumsrate von *Escherichia coli*. Auf Polystyrol wurde aufgrund der Eigenfluoreszenz in dieser Versuchsreihe verzichtet.

Die Ergebnisse beider Versuchsreihen zeigen, dass auf dem bakterizid wirkenden Silber in beiden Auswertungen am wenigsten Bakterien wachsen konnte. Der Werkstoff Polystyrol wird zwar nur bei der indirekten Auswertung untersucht, es zeigt sich jedoch klar, dass sich *Escherichia coli* hervorragend auf der Oberfläche von Polystyrol anheftet. Gold weist im Vergleich zu Titan und Stahl nach Silber ebenfalls eine verringerte Adhäsion von *Escherichia coli* auf. Auf Stahl war die Adhäsion von *Escherichia coli* nur geringfügig schwächer als auf Titan. Dieses Ergebnis konnte in beiden Versuchsreihen festgestellt werden.

3.3 Ergebnisse zum Wachstum von *Streptokokkus pneumoniae* auf den Versuchswerkstoffen

3.3.1 Auswertung zum Wachstum von *Streptokokkus pneumoniae* auf verschiedenen Werkstoffen (indirekte Methode)

Abbildung 13 zeigt die Anzahl der abgelösten Keime von den verschiedenen Materialien Gold, Polystyrol, Silber, Stahl und Titan. Wie bei *Escherichia coli* wurde *Streptokokkus pneumoniae* von den Oberflächen der Testmaterialien gelöst und auf Petrischalen geimpft. Die gewachsenen kolonienbildenden Einheiten wurden ausgezählt.

Auch *Streptokokkus pneumoniae* zeigt auf Polystyrol ein massives Bakterienwachstum. Die Anzahl der abgelösten Bakterien war hier am höchsten. Auf den Silberplättchen wies *Streptokokkus pneumoniae* das geringste Wachstum auf. Bei den metallischen Werkstoffen war die Besiedlung durch *Streptokokkus pneumoniae* auf Titan am höchsten. Die Werte von Gold und Stahl lagen zwischen den Werten von Silber und Titan.

Streptokokkus pneumoniae

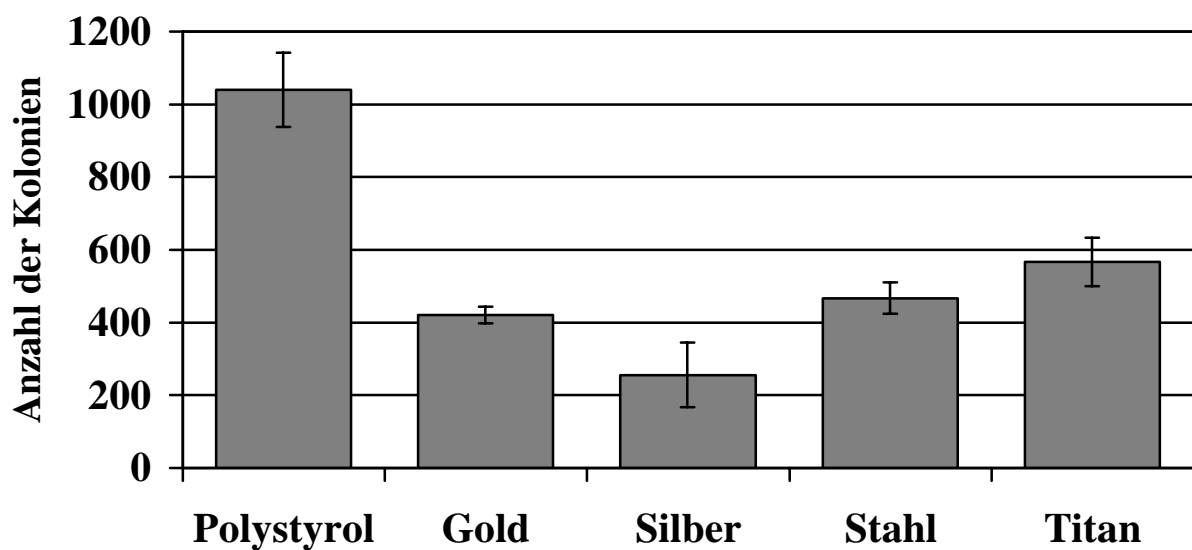


Abbildung 13: Anzahl der kolonienbildenden Einheiten von *Streptokokkus pneumoniae* nach dem Ablösen von Testoberflächen. Das stärkste Wachstum wies der Keim auf der Oberfläche von Polystyrol auf. Auf Silber zeigte sich die geringste Besiedlung von *Streptokokkus pneumoniae*. Ausgezählt wurden die CFU der Verdünnungsstufe 1:10.

3.3.2 Auswertung der Adhäsion von *Streptokokkus pneumoniae* auf verschiedenen Werkstoffen mit dem Fluoreszenzphotometer (direkte Methode)

Nach dem Anfärben von *Streptokokkus pneumoniae* auf den besiedelten Versuchsplättchen der einzelnen Materialien Gold, Silber, Stahl und Titan wurde die Fluoreszenzintensität ausgewertet.

Die Werte wurden auch bei *Streptokokkus pneumoniae* aus den Ergebnissen der Fluoreszenzmessung der vier Testplättchen jeden Materials ermittelt und zu einem Mittelwert zusammengefasst. Die Ergebnisse sind Abbildung 14 zu entnehmen. Die Reihenfolge im Grad der Besiedlung entspricht der vorherigen Versuchsreihe mit *Streptokokkus pneumoniae*. Auf Titan und Stahl weist *Streptokokkus pneumoniae* eine deutlich höhere Adhäsion auf, als auf Gold und Silber. Dieser Unterschied trat bei der vorherigen Versuchsreihe nicht so deutlich auf.

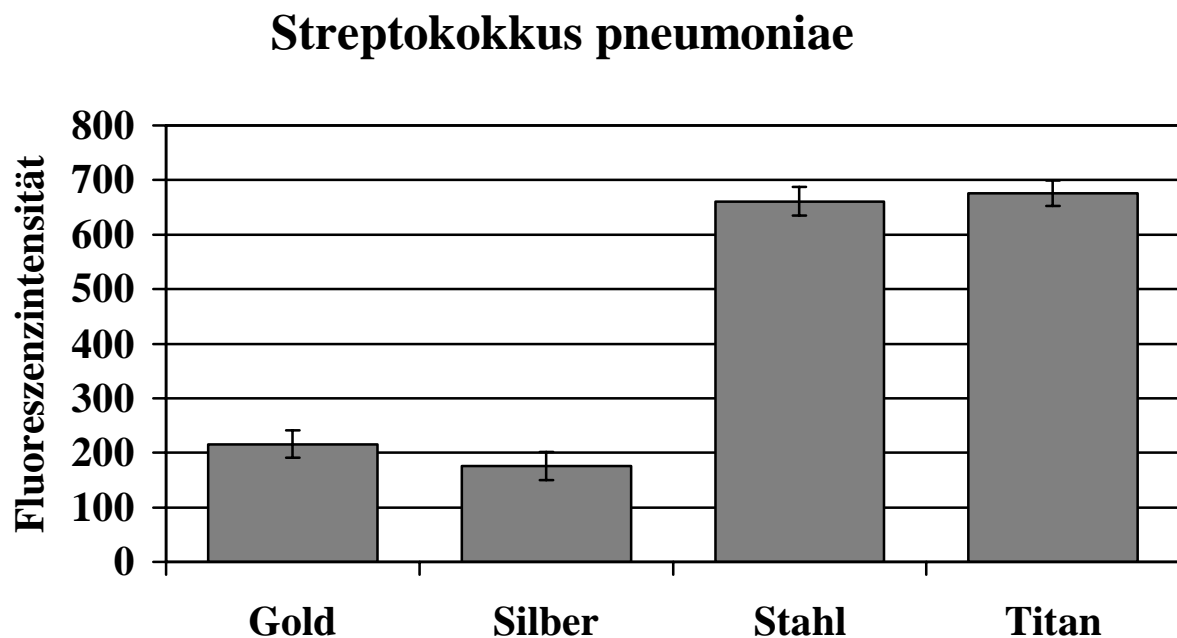


Abbildung 14: Wachstumsverhalten von *Streptokokkus pneumoniae* auf den Materialien Gold, Silber, Stahl, Titan. Die Titanoberflächen sind am stärksten besiedelt. Etwas schwächer besiedelt sind die Stahloberflächen. Die geringste Besiedlung zeigt *Streptokokkus pneumoniae* auf Silber und Gold.

Zwischen den Metallen Stahl und Titan, beziehungsweise Gold und Silber liegen keine signifikanten Unterschiede vor. Bei der Auswertung mittels des Photometers wiesen Gold und Silber deutlich geringere Werte auf als Stahl und Titan. Bei der Auswertung mittels Zählung der CFU war dieser Unterschied jedoch nicht so deutlich ausgeprägt. Auf Polystyrol zeigte *Streptokokkus*

pneumoniae das höchste Wachstum, auf Silber das niedrigste. Titan wurde in der Gruppe der Metalle am besten von *Streptokokkus pneumoniae* besiedelt.

3.4 Ergebnisse zum Wachstum von *Staphylokokkus epidermidis* auf den Versuchswerkstoffen

3.4.1 Auswertung zum Wachstum von *Staphylokokkus epidermidis* auf verschiedenen Werkstoffen (indirekte Methode)

Abbildung 15 zeigt die Anzahl der Kolonien nach dem Ablösen der Bakterien von Gold, Polystyrol, Silber, Stahl und Titan.

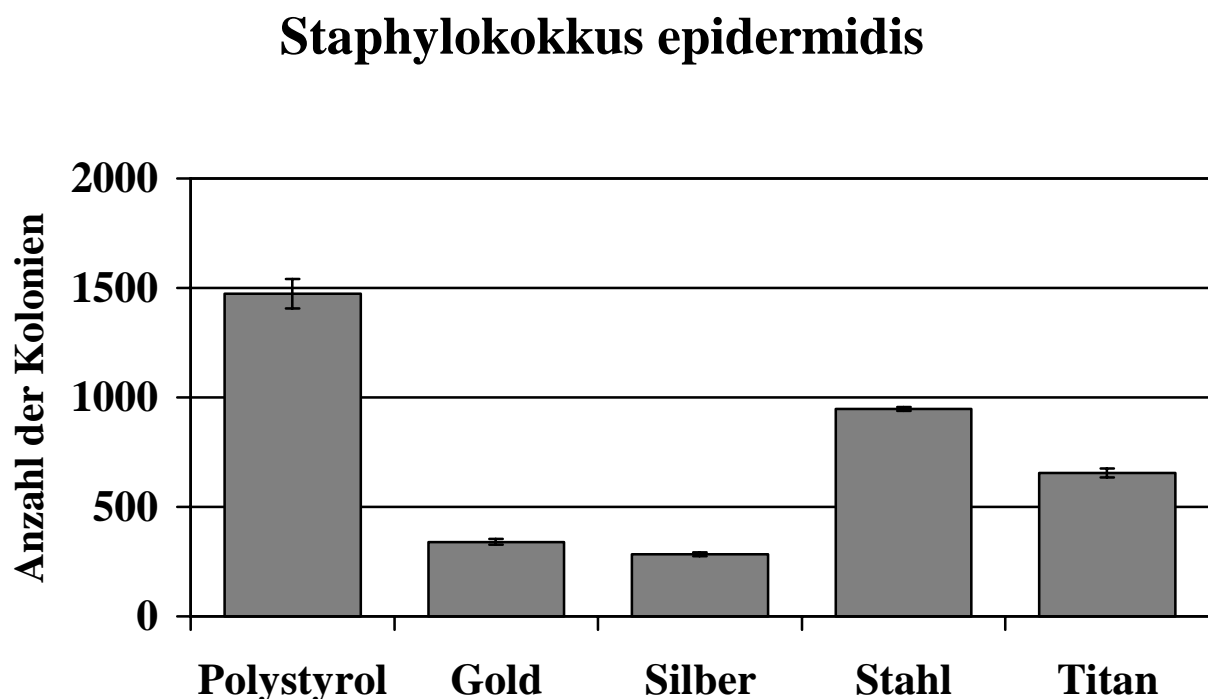


Abbildung 15: Anzahl der kolonienbildenden Einheiten von *Staphylokokkus epidermidis* nach dem Ablösen von Testoberflächen. Auf Polystyrol war das höchste Wachstum zu beobachten. Deutlich weniger ausgeprägt war das Wachstum auf Stahl. Titan wurde weniger stark besiedelt als Stahl. Auf Silber zeigte sich die geringste Besiedlung von *Staphylokokkus epidermidis*. Die ausgezählten Kolonien stammen aus den abgelösten Bakterien der ersten Verdünnungsstufe 1:10.

Auch hier sind auf Polystyrol mit Abstand am meisten Keime vorhanden. Ebenfalls wie bei den vorherigen Versuchsreihen weist Silber die geringste Anzahl von Kolonien auf, gefolgt von Gold. Von der Stahloberfläche wurde eine höhere Anzahl von Kolonien gewonnen, als von der Titanoberfläche. Die Anzahl der ausgezählten Kolonien ist bei Titan noch deutlich über der Anzahl der Kolonien bei Silber und Gold.

3.4.2 Auswertung der Adhäsion von *Staphylokokkus epidermidis* auf verschiedenen Werkstoffen mit dem Fluoreszenzphotometer

Die Werte von *Staphylokokkus epidermidis*, die mittels des Fluoreszenzphotometers gewonnen wurden, sind aus Abbildung 16 zu entnehmen.

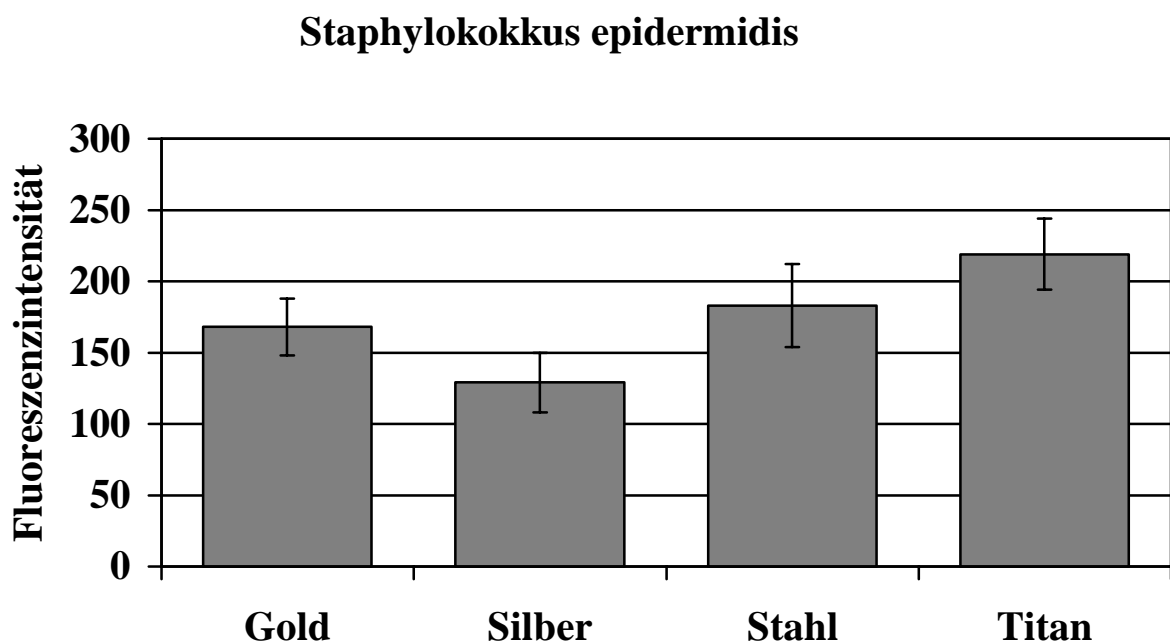


Abbildung 16: Wachstumsverhalten von *Staphylokokkus epidermidis* auf den Prüfkörpern Gold, Silber, Stahl, Titan. Die Titanoberflächen sind auch hier wie bei *Streptokokkus pneumoniae* und *Escherichia coli* am stärksten besiedelt. Weniger besiedelt sind die Stahloberflächen. Die geringste Keimzahl zeigt *Staphylokokkus epidermidis* auf Silber und Gold.

Die Ergebnisse setzen sich aus den einzelnen Messergebnissen des Fluoreszenzphotometers zusammen, wie in den vorherigen Versuchen beschrieben. Im Gegensatz zu dem Ergebnis der vorherigen Versuchsreihe mit *Staphylokokkus epidermidis*, konnte das erhöhte Wachstum auf Stahl im Vergleich zu Titan, nicht bestätigt werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Werkstoffen treten im Vergleich mit der indirekten Methode nicht so deutlich hervor. Die absoluten Werte sind aber den restlichen Versuchsreihen ähnlich. So zeigt Silber auch hier den niedrigsten Wert aller Materialien.

Beim Vergleich der Methoden zeigt sich zum einem das zu erwartende Ergebnis, dass *Staphylokokkus epidermidis* auf Silber, aufgrund der wachstumshemmenden Wirkung von Silber auf Bakterien, das geringste Wachstum aufweist. Sowohl bei der Anzahl der Kolonien als auch beim quantitativen Wert der direkten Messmethode. Gold ist wie auch bei den anderen Testkeimen stärker von Keimen besiedelt als Silber, liegt jedoch unter den Werten von Titan und Stahl. Es lässt sich die Feststellung machen, dass Stahl genauso wie Titan gut von *Staphylokokkus epidermidis* besiedelt wird. Da die Werte der Keimbesiedlung von Titan bei den Messergebnissen mit dem Fluoreszenzphotometer nicht weit über denen von Stahl liegen, scheint *Staphylokokkus epidermidis* sehr gut an Stahl zu adhären.

Die Ergebnisse der anderen Werkstoffe Gold, Silber und Polystyrol liegen, wie schon erwähnt, in der Reihenfolge der vorherigen Versuchsreihen. Polystyrol weist wieder das mit Abstand höchste Ergebnis im Vergleich zu den anderen Materialien auf.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In beiden Versuchreihen wiesen die Metalle Stahl und Titan die stärkste bakterielle Besiedlung durch alle Versuchskeime auf. Wobei Titan bei fast allen Versuchsreihen das ausgeprägteste Wachstum der Keime auf der Oberfläche aufwies. Einzig bei dem Versuch mittels Auszählen der CFU von

Staphylokokkus epidermidis war die Adhäsion auf Stahl höher. Silber wurde von allen Testkeimen am schwächsten besiedelt. Dieses Ergebnis war zu erwarten und wurde bei allen Versuchen festgestellt. Gold wurde ebenfalls von allen verwendeten Bakterienstämmen gering besiedelt, jedoch bei allen Versuchen stärker als Silber. *Streptokokkus pneumoniae* zeigte ein hohes Adhäsionsverhalten auf Silber bei den Ergebnissen mittels CFU im Vergleich zu den anderen Versuchen. Dieses Ergebnis konnte aber mit der Fluoreszenzmessung nicht bestätigt werden.

In Abbildung 17 und 18 sind die Ergebnisse normiert dargestellt. Da Titan die höchsten Werte hatte, wurden die Werte mit einhundert Prozent gleichgesetzt. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse, die anhand der CFU ermittelt wurden. Abbildung 18 die Ergebnisse aus der Fluoreszenzmessung.

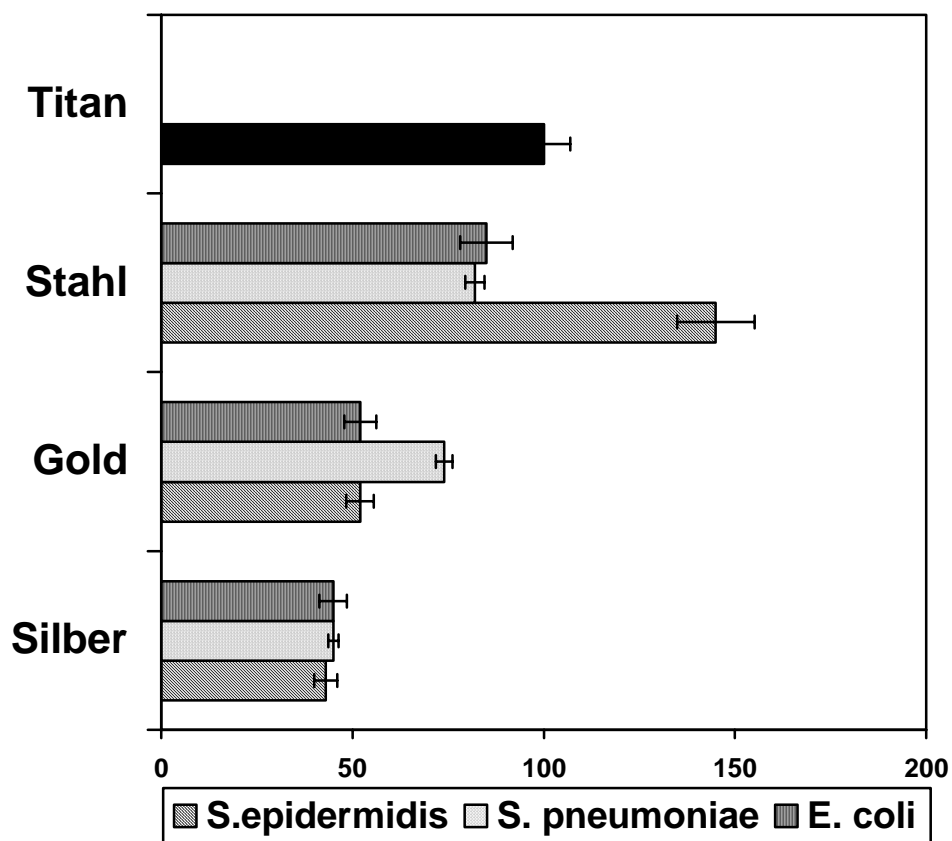


Abbildung 17: Prozentuale Darstellung des Adhäsionsverhaltens der Testkeime
Die Werte wurden über Auszählung der CFU bestimmt.

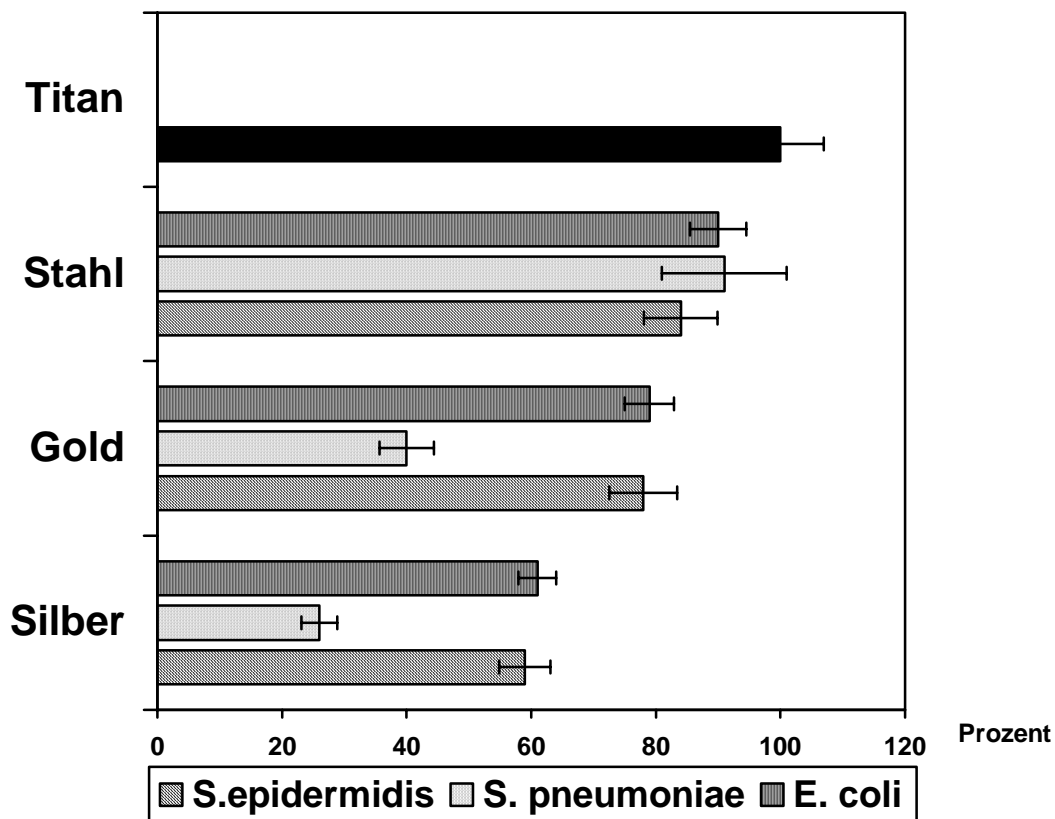


Abbildung 18: Prozentuale Darstellung des Adhäsionsverhaltens der Testkeime
Die Werte wurden mittels des Photometers bestimmt.

Zusammenfassend kann man eine sehr gute bakterielle Adhäsion auf Titan und auch auf Stahl feststellen. Gold wird weniger stark besiedelt. Polystyrol wurde, wie zu erwarten, massiv besiedelt und Silber am geringsten.

3.6 Tabellarische Übersicht der Auswertung unter dem Fluoreszenzphotometer

Die Tabelle liefert einen Überblick über die Messung der Fluoreszenzintensität der einzelnen Wells in der 24 - Well - Zellkulturplatte.

Material			Streptokokkus pneumoniae	Staphylokokkus epidermidis
Gold	Well A	179	221	180
	Well B	185	245	154
	Well C	165	203	162
	Well D	161	195	176
Silber	Well A	145	180	120
	Well B	136	170	136
	Well C	125	205	125
	Well D	135	149	135
Stahl	Well A	215	664	190
	Well B	220	671	178
	Well C	184	669	180
	Well D	169	640	184
Titan	Well A	230	690	-
	Well B	211	650	211
	Well C	247	681	247
	Well D	190	683	198

3.7 Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie

Nach dem Ablösen der Bakterien von den Plättchen wurden von jedem Werkstoff exemplarisch zwei Plättchen ausgewählt und unter dem Rasterelektronenmikroskop untersucht. Die Kontrolle unter dem REM erfolgte nur bei der Versuchsreihe mittels des Auszählen von Bakterienkolonien in der Petrischale. Die Untersuchung unter dem REM diente der Kontrolle der effektiven Ablösung der Keime. Des Weiteren wurde die Oberfläche der Materialien auf eventuelle mechanische Beschädigungen und Verschmutzungen untersucht. Die Auflösung erfolgte im Bereich 50fach bis zu 20000fach.

Bei den untersuchten Plättchen waren keine maßgeblichen Verschmutzungen oder Verletzungen der Oberfläche festzustellen. Auch das erfolgreiche Ablösen der Keime konnte bei jedem ausgewählten Plättchen nachgewiesen werden. Vereinzelt traten Verschmutzungen und Beschädigungen der Oberfläche auf. Bei keinem der untersuchten Werkstoffe wurde eine vollständige Entfernung

aller Keime erreicht. Auf jedem Plättchen wurden einzelne Bakterien oder kleine Kolonien wie auf Abbildung 19-20 zu sehen gefunden. Die Menge der verbliebenen Bakterien war aber für das Gesamtergebnis unerheblich.

Abbildung 19a

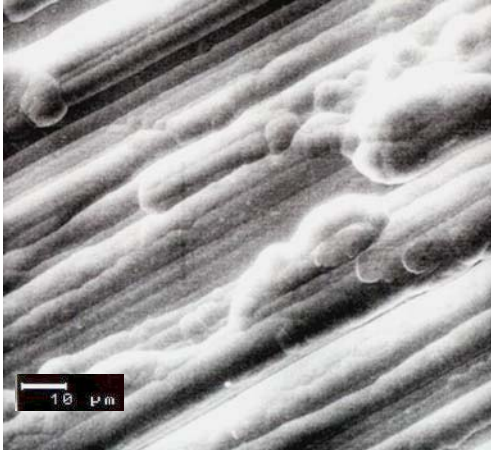


Abbildung 19b

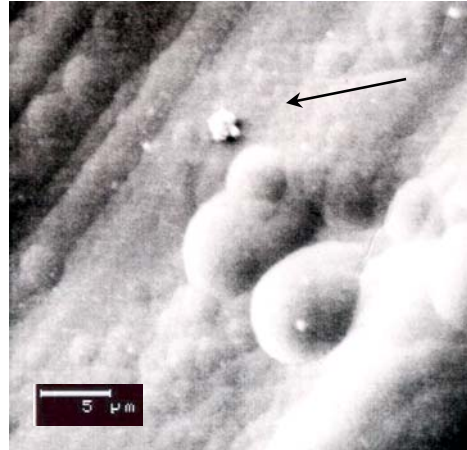


Abbildung 19c

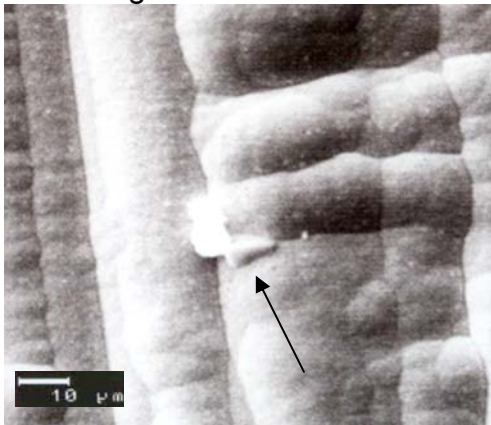


Abbildung 19 a - c: 19a saubere Goldoberfläche nach dem Ablösen der Keime. Vergrößerung 1000fach. 19b Kolonie (Pfeil) von *Streptokokkus pneumoniae* auf Gold. Vergrößerung 3000fach. 19c vereinzelt *Staphylokokkus epidermidis* auf Goldplättchen nach dem Ablösen zu finden. Vergrößerung 3000fach.

Zwischen den metallischen Werkstoffen konnte, bezüglich der Anzahl der nicht abgelösten Keime, kein Unterschied festgestellt werden. Die Anzahl der gefundenen Bakterien auf Polystyrol war jedoch deutlich höher als auf den anderen Werkstoffen. Während einige metallische Plättchen insbesondere Gold und Silber als fast keimfrei bezeichnet werden konnten, war auf Polystyrol immer eine, wenn auch geringe, Anzahl von Bakterien zu finden.

Abbildung 20a



Abbildung 20b

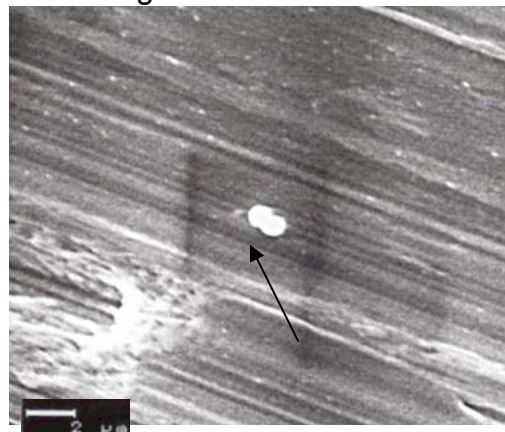


Abbildung 20 a und b: Noch vereinzelt *Escherichia coli* auf Stahlplättchen nach dem Ablösen (Pfeil) Vergrößerung 1000fach (b) und 20000fach (a).

Abbildung 21

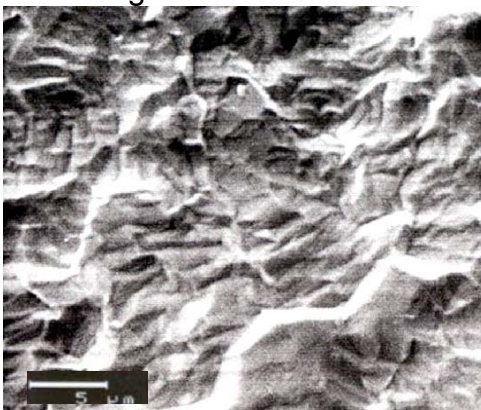


Abbildung 21: saubere Titanoberfläche nach dem Ablösen der Keime. Vergrößerung 1000fach.

Abbildung 22a

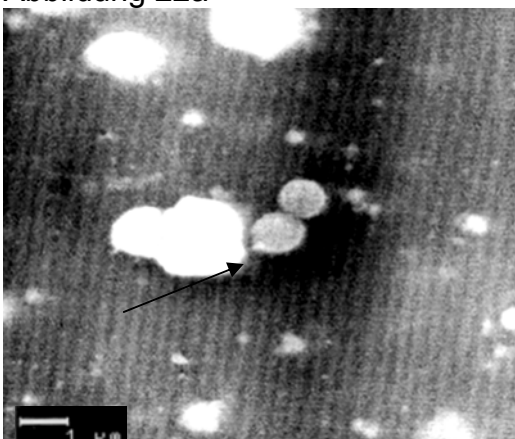


Abbildung 22b

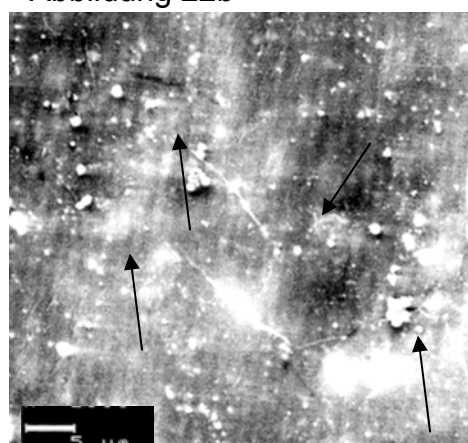


Abbildung 22 a und b: *Streptococcus pneumoniae* ist noch nach dem Ablösen der Keime auf der auf der Polystyroloberfläche zu finden (Pfeilspitzen). Vergrößerung 10000fach (a) und 2000fach (b)

Abbildung 23a

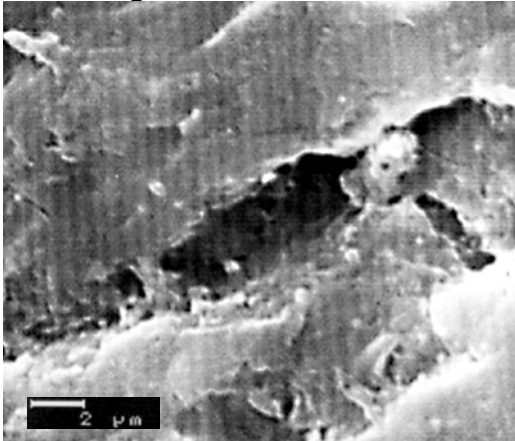


Abbildung 23b

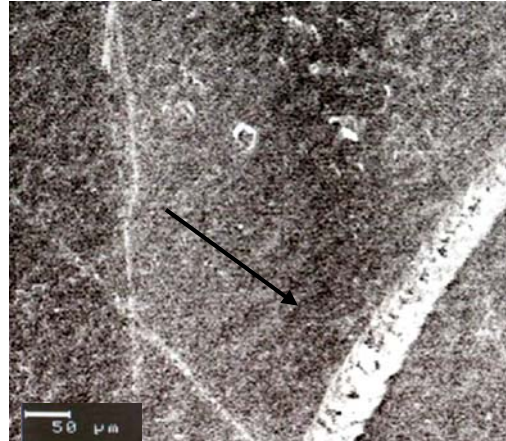


Abbildung 23 a und b: Auch von Unebenheiten der Oberfläche, hier Stahl, konnten die Keime entfernt werden. Abbildung 23b: mechanische Beschädigung (Pfeil) der Silberoberfläche. Keine unzureichende Keimablösung erkennbar. Vergrößerung 2000fach (a) und 5000fach (b).

3.8 Kontrolle der Plättchen mittels des Fluoreszenzmikroskops

Nach Messung der Fluoreszenz wurden alle Plättchen einer Analyse im Fluoreszenzmikroskop unterzogen. Das Augenmerk lag hierbei auf Verunreinigungen und Verletzungen der Plättchen. Verunreinigungen, die sich ebenfalls wie die Bakterien hätten anfärben können, oder Irritationen der Oberfläche, in denen sich der Farbstoff hätte akkumulieren können, hätten zu einer Verfälschung des Ergebnisses geführt.

Auf keinem der Plättchen waren im Fluoreszenzmikroskop ergebnisverfälschende Verunreinigungen oder Reste von nicht abgewaschenem Farbstoff nachzuweisen.

4. Diskussion

4.1 Methoden zur Auswertung der Keimbesiedlung

Die zwei verwendeten Versuchsmethoden zur Auswertung der Keimbesiedlung unterscheiden sich grundlegend. Das Auszählen der abgelösten Bakterien anhand der Kolonienbildung stellt nur eine indirekte Methode dar, um Rückschlüsse auf die tatsächliche Bakterienansiedlung auf den Oberflächen zu ziehen. Die Auswertung unter dem Fluorometer wertet quantitativ die tatsächliche Anzahl der Keime auf einer Oberfläche aus. Auch der Zeitaufwand und die Anzahl der Arbeitsschritte unterscheiden sich erheblich. So benötigt das Auszählen der Kolonien 48 Stunden und ein zusätzliches Ablösen der Keime. Die Messung mittels Anfärben der Bakterien dauert nur circa 26h und benötigt keinen weiteren Zeitaufwand zur Ablösung der Keime.

4.1.1 Ablösen und Auszählen der Kolonien (CFU)

Die Ermittlung der Keimzahl anhand von colony forming units (CFU) ist eine klassische Methodik und Standard in der Mikrobiologie. Diese Methode wurde bereits 1977 von Maki et al. angewendet und findet auch heute noch Gebrauch [MAKI et al. 1977]. Nachteil dieser Methode ist die hohe Anzahl der durchzuführenden Arbeitsschritte, da jeder Arbeitsschritt die mögliche Fehlermenge erhöht. Beim Auszählen der Kolonien lässt sich nicht präzise die absolute Menge der abgelösten Bakterien bestimmen. Aus diesem Grund wurde eine Verdünnungsreihe der Lösung, mit den abgelösten Keimen, bis zu einer 1000fachen Verdünnung durchgeführt. Die Gesamtzahl der Bakterienkolonien war somit gering und ein einfaches und damit nahezu fehlerfreies Auszählen möglich. Durch die geringe Anzahl der Kolonien auf dem

Nährboden waren diese klar voneinander abgegrenzt. Nur selten verschmolzen die Kolonien derart, dass keine klare Aussage über die ursprüngliche Anzahl gemacht werden konnte. Einzig bei Polystyrol war durch die hohe Anzahl der abgelösten Keime das Auszählen der Kolonien schwieriger.

Ein weiteres Problem dieser Methode ist das sichere Entfernen der Bakterien von den Oberflächen der Plättchen. Die komplette Entfernung aller adhätierenden Bakterien, ohne Keime abzutöten oder zu viele auf der Oberfläche zu belassen und gleichzeitig die Oberflächenstruktur der Prüfkörper nicht zu beschädigen, ist ein nur schwer zu erreichendes Ziel. Hinzu kam noch die Verwendung verschiedener Materialien und Bakterien. Vor allem Polystyrol als Nichtmetall verhält sich im Ultraschallbad und beim Vortexen anders als Metalle. Zu diesem Zweck wurden Vorversuche durchgeführt, um die effektivste Methode zum vollständigen Ablösen der Keime zu ermitteln.

Als Testkeim wurde *Staphylokokkus epidermidis* ausgewählt, da er die höchste Adhärenz aller verwendeten Keime an Kunststoffen und Metallen aufweist.

In den Vorversuchen wurden unterschiedlich stringente Ablösevorgänge ausgetestet und die Plättchen mittels Rasterelektronenmikroskopie kontrolliert. Alleiniges Waschen der Plättchen löste, wie erwartet, anheftende Bakterien nicht von den Oberflächen. Bei den restlichen Versuchen erwies sich die Kombination von 30 sec Inkubation im Ultraschallbad und 15 sec mit 15 beziehungsweise 45 sec Pause als ausgewogene Methode zur Ablösung der Keime. Die anderen Versuchsmethoden zeigten entweder ein unzureichendes Ablösen der Bakterien oder führten zum Absterben von Keimen. Eine Beschädigung der Oberfläche konnte nach elektronenmikroskopischer Analyse bei keinem Testmaterial festgestellt werden. Eine Beschädigung der Oberflächen durch Ultraschall hätte negative Auswirkungen, wenn das Wachstum der Kolonien auf dem Nährboden in den Petrischalen durch Bruchstücke der Materialien gestört werden würde. Zu diesem Aspekt wurden keine Versuche durchgeführt, da die Oberflächen unbeschädigt waren.

Eine Kontrolle mit anderen Bakterienstämmen fand nicht statt. Die Ergebnisse der eigentlichen Versuchsreihe wiesen jedoch keine Auffälligkeiten auf, die auf ein unzureichendes oder zu intensives Ablösen hingedeutet hätten.

Polystyrol wies nach dem Ablösevorgang von allen Materialien die höchste Anzahl von verbliebenen Bakterien auf, während die Metallplättchen als nahezu keimfrei bezeichnet werden können. Da Polystyrol nur als Referenz diente und die hervorragende Anheftung von Bakterien an diesen Werkstoff bekannt ist, wurde die im Vergleich zu den anderen Materialien unzureichende Ablösung toleriert. Polystyrol wies immer eine deutlich höhere Anzahl von abgelösten Keimen auf, als alle anderen Oberflächen.

Zusammenfassend erweist sich die Bestimmung der CFU als zuverlässige Methode, um die Anzahl abgelöster Keime zu ermitteln. Die Ergebnisse entsprechen nicht der absoluten Anzahl der Bakterien, die auf den Oberflächen der Testplättchen adhären, sondern nur Näherungswerten. Diese Ergebnisse genügen aber um tendenzielle Aussagen über die Stärke der Adhärenz der einzelnen Bakterienstämme auf den Versuchsoberflächen zu treffen. Es muss jedoch mit einer erhöhten Fehleranzahl gerechnet werden.

4.1.2 Bestimmung der Keimzahl durch Fluoreszenzmessung

Der DNA – Farbstoff SYBR® Green I diente bei dieser Methode zur Anfärbung der Bakterien – DNA. Die gemessene Fluoreszenzintensität erlaubte somit Rückschlüsse auf die Gesamtzahl der auf einer Oberfläche haftenden Bakterien. Da beim Farbstoff SYBR® Green I das Excitationsmaximum bei 497 nm und das Emissionsmaximum bei 520 nm liegt, konnte dies gut mit den für das Photometer vorliegenden Filtern von 485 nm und 535 nm kombiniert werden. Die Lichtempfindlichkeit von SYBR® Green I ist eine mögliche Fehlerquelle, die aber durch sorgsames Abschirmen der Prüfkörper minimal ist. Die Auswertung sollte dennoch sofort nach dem Anfärben stattfinden, da eine Lagerung, durch die Temperaturempfindlichkeit und die erwähnte Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes, das Ergebnis verfälschen könnte [NAMASIVAYAM et al. 2003].

Ein wichtiger Punkt, der vor der Versuchreihe geklärt werden musste war, inwiefern die Oberfläche der Prüfkörper auf den Farbstoff reagierte. Zu diesem Zweck wurden mit Keimen bewachsene und unbewachsene Testplättchen mit dem Farbstoff gefärbt. Als Testkeim diente *Staphylokokkus epidermidis*. Die Auswertung erfolgte unter der Fluorometer und Fluoreszenzmikroskop.

Die Metalloberflächen zeigten nach der Anfärbung keine Fluoreszenz. Bei der Fluoreszenzmikroskopie konnten auf den bewachsenen Plättchen die Bakterien klar von der Metalloberfläche unterschieden werden. Auf den unbewachsenen Plättchen kam es zu keiner Fluoreszenz.

Einzig Polystyrol erwies sich als ungeeignet. Die Oberflächen, der unbewachsenen und der bewachsenen Oberfläche lieferten gleich hohe Ergebnisse im Fluorometer. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte sich eine identisch homogene Fluoreszenz. Aufgrund der hohen Eigenfluoreszenz der Oberfläche schied Polystyrol als Referenzmaterial in der Versuchsreihe aus.

Die Auswertung mittels der Fluoreszenz ist weniger zeitaufwendig und benötigt weniger Arbeitsschritte als die Auszählung der Kolonien. Vor allem die geringere Anzahl von Arbeitsschritten ist vorteilhaft, da hierbei die Anzahl der potentiellen Fehlerquellen verringert wird. Das verwendete Fluoreszenzphotometer SPECTRAFluor Plus der Firma Tecan erwies sich als zuverlässig und präzise. Es lieferte auch bei wiederholten Messungen der gleichen Testmaterialien reproduzierbare Ergebnisse, deren Abweichungen in dem vom Hersteller angegebenen Rahmen lagen. Die Handhabung des Gerätes und der dazugehörigen Software XFFLUOR und Magellan ist einfach und verständlich. Es trat nur in einem einzigen Well ein unstimmliges Ergebnis auf, welches aber auch auf einen Fehler beim Anfärben zurückzuführen wäre. Die Messung der Fluoreszenz von mit SYBR® Green I gefärbten Bakterien lieferte gute und verlässliche Ergebnisse. Die Fluoreszenz entspricht hierbei nur einem quantitativen Wert, auf die absolute Zahl der Bakterien kann keinerlei Rückschluss gezogen werden.

4.1.3 Vergleich der Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen

Beide Methoden lieferten gute und verlässliche Ergebnisse. Die Bestimmung der CFU von Bakterien ist jedoch aufwendiger und zeitintensiver. Vor allem die längere Inkubationsdauer, das Gießen der Nährböden sowie der höhere Aufwand für die Kontrolle mittels Rasterelektronenmikroskopie erhöhen den Zeitaufwand. Die Anzahl potentieller Fehler ist durch das Ablösen der Keime deutlich höher. Vorteil der Methode ist ein geringer Aufwand an Material und technischen Geräten.

Das Anfärben der Keime ist unkompliziert und benötigt weniger Arbeitsschritte. Die Auswertung verlangt jedoch eine hohe technische Ausstattung. Im Vergleich ist der Versuchsablauf mittels des Anfärbens von Keimen als effektiver, exakter und sicherer anzusehen.

Ein Nachteil beider Methoden ist die unzureichende Kontrolle der eigentlichen Adhärenz der Keime an den Oberflächen. Die Plättchen werden zwar sorgsam abgewaschen um alle nur locker anliegenden Keime zu entfernen, jedoch lässt sich nicht sicherstellen, ob die verbleibenden Keime eine feste Bindung zur Oberfläche hergestellt haben. Es wäre theoretisch möglich, dass nur locker verbundene Bakterien sich an anderen Bakterien festsetzen oder nicht abgespült werden. Die Ergebnisse sollten aber idealerweise nur Aussagen über die Anzahl der Bakterien, die auf der Oberfläche adhäreren, liefern.

4.2 Versuchsaufbau zur Besiedlung der Prüfoberflächen

Die freie Aufhängung der Testplättchen wurde gewählt, um ein gleichmäßiges Bewachsen der Oberflächen zu gewährleisten. Ein einfaches Einlegen der Plättchen in eine 24 - Well - Zellkulturplatte wurde nicht verwendet. Bei dieser Besiedlungsmethode wird nur die nach oben zeigende Oberfläche besiedelt. Die Unterseite der Testkörper wäre ungleichmäßig und unter nicht kontrollierbaren Bedingungen von Bakterien besiedelt worden. Da bei dem

späteren Auszählen der Kolonien die Bakterien von beiden Seiten der Plättchen entfernt werden, wäre ein verfälschtes Ergebnis die Folge gewesen.

In einer Kultur in der die Plättchen frei flottieren, wären die Oberflächen unter nicht zu kontrollierenden Bedingungen besiedelt worden. Gegenseitige Kollisionen oder Kollisionen mit der Gefäßwand hätten zur Verfälschung der Ergebnisse führen können.

Aus diesen Gründen wurde die erwähnte freie Aufhängung in einem Weithals-Erlenmeyerkolben gewählt. Diese wurde so konstruiert, dass die vier Plättchen weder sich, noch die Glaswand des Erlenmeyerkolbens, bei Bewegungen berühren konnten. Die Aufhängung der Plättchen an ihrer randständigen Perforation mittels eines Titandrahtes wurde gesondert betrachtet. Es wurde untersucht ob eine Beeinflussung der Titandrahte auf die Besiedlung der Oberflächen vorlag. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Metalle Gold, Silber und Stahl gelegt, ob es zu einer Beeinträchtigung des Bakterienwachstums durch einen Ionenfluss zwischen den verschiedenen Metallen kam. Die Konstruktion erwies sich als geeignet. Es wurde keine Beeinflussung der Aufhängekonstruktion auf die Besiedlung der Oberfläche unter der dem REM erkannt.

Somit konnte die freie Aufhängung der Testmaterialien eine gleichmäßige Besiedlung durch die Keime gewährleisten.

4.3 Auswahl der Testkeime

Die Keime wurden zum einem nach ihren Vorkommen bei entzündlichen Prozessen im Mittelohr, als auch nach ihren Adhärenzverhalten ausgewählt. *Streptokokkus pneumoniae* tritt vor allem bei Infektionen der Atemwege auf und ist häufig im Mittelohr nachweisbar. *Escherichia coli* ist der Haupterreger von Harnwegsinfektionen, kommt aber ebenfalls bei Atemweginfektionen und bei Otitis media vor [FEIGIN et al. 1992]. *Staphylokokkus epidermidis* hingegen ist selten bei Mittelohrentzündungen anzutreffen [CHRISTENSEN et al. 1982].

Seine Eigenschaft, hervorragend an alloplastische Oberflächen zu adhären, machte ihn jedoch für diese Arbeit interessant.

4.4 Auswahl der Prüfmaterialien

Gold, Stahl und Titan sind Materialien die häufig als Implantate mit den verschiedensten Aufgaben zum Einsatz kommen.

Gold wurde bei der Rekonstruktion der Gehörknöchelchenkette eingesetzt. Die Ergebnisse waren in Funktion und Biokompatibilität sehr gut, aufgrund der schwierigen Bearbeitung wird jedoch Titan als Werkstoff bevorzugt. Eine bakterizide Wirkung von Gold konnte in vitro nachgewiesen werden [HEUMANN et al. 1982, SCHUBERT 1964]. Goldimplantate im Mittelohr wurden laut Helms 1998 durch Titanprothesen verdrängt [HELMMS 1998].

Titan wird häufig als Mittelohrimplantatmaterial verwendet und liefert ausgezeichnete klinische Resultate [GEYER 1999]. Titan ist sehr gut bioverträglich und korrosionsbeständig [ALBREKTSSON et al. 1983]. Titan bildet bei Kontakt mit Sauerstoff eine Oxidschicht aus, welche weitere Reaktionen mit der Umgebung verhindert [THERIN et al. 1991].

Silber und Polystyrol wurden als Referenzen verwendet. Die bakterizide beziehungsweise bakterio-statische Wirkung von Silber ist bekannt. Sie beruht auf der Konzentration von freien Ag^{2+} - Ionen. Diese stören in niedrigen Konzentrationen reversibel den transmembranen Energiemetabolismus, in hohen Konzentrationen irreversibel. Es werden mehrere Mechanismen für die bakterizide Wirkung von Ag^{2+} - Ionen angenommen. Zum einem können Ag^{2+} - Ionen mit Schwefelgruppen in der Zellwand komplexieren. Die Schwefelgruppen sind Bestandteile von Enzymen, welche für die transmembrane Energieerzeugung und den Elektrolyttransport verantwortlich sind [KLUEH et al. 2000]. Zum anderen blockieren Ag^{2+} - Ionen die Cytochromoxidase und die NADH – Succinat - Dehydrogenase in der Atmungskette. Ein weiterer Mechanismus ist die Bindung von Ag^{2+} - Ionen an

die Bakterien - DNA und eine dadurch bedingte Auflösung der Wasserstoffbindung zwischen Purin - und Pyrimidin - Basen [KLUEH et al. 2000]. Die antibakterielle Wirkung von Silber bewährt sich in der Medizin zum Beispiel in Amalgam [KAGA et al. 1991] oder Kathetern [LIEDBERG und LUNDBERG 1989]. Die Silberoberfläche diente daher als Positivkontrolle. Polystyrol bietet Bakterien sehr gute Bedingungen zum Adhären. Aus diesem Grund war Polystyrol die Negativkontrolle.

4.5 Bestimmungen der Adhärenz der Testkeime auf den Werkstoffen mittels Fluoreszenzphotometer

Alle getesteten Keime zeigten auf Titan die stärkste und auf Silber die schwächste Adhäsion. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen. Aufgrund der bakteriziden Wirkung von Silber ist das Ergebnis nachvollziehbar. Die ausgeprägte Adhäsion der Keime auf Titan lässt sich durch die hohe Oberflächenenergie von Titan erklären [BAIER et al. 1984]. Gold und Stahl nehmen eine Mittelstellung ein. Gold besitzt ebenfalls eine bakterizide Wirkung [HEUMANN et al. 1982, SCHUBERT 1964].

Bei Stahl zeigt sich eine etwas geringere Adhäsion der Bakterien auf der Oberfläche, als auf Titan. Medizinischer Stahl wirkt nicht bakterizid wie Silber und Gold, die Oberfläche wird jedoch von Bakterien nicht so gut angenommen wie Titan. Diese Reihenfolge des Grades der Besiedlung der Testmaterialien zeigt sich bei allen Versuchskeimen.

Streptokokkus pneumoniae weist deutlich höhere Werte für Stahl und Titan im Vergleich zu Silber und Gold auf, als die anderen Testkeime. *Streptokokkus pneumoniae* adhärert nahezu gleich gut an Stahl und Titan. Gold und Silber werden ebenfalls im gleichen Maße besiedelt. Der prozentuale Unterschied zwischen Gold und Silber auf der einen Seite und Titan und Stahl auf der anderen, ist bei keinem getesteten Keim ähnlich stark ausgeprägt wie bei *Streptokokkus pneumoniae*. *Streptokokkus pneumoniae* scheint also auf Titan

und Stahl hervorragend zu adhären. Auf Gold hingegen weist *Streptokokkus pneumoniae* ein sehr schwaches Adhäsionsverhalten auf.

Staphylokokkus epidermidis zeigte von allen Keimen die geringste Materialsensibilität. Die zu erwartende Reihenfolge mit den niedrigsten Ergebnissen für Silber und den höchsten für Titan ist auch bei *Staphylokokkus epidermidis* gegeben. Das niedrige Adhäsionsverhalte gegenüber Edelstahl konnte nicht direkt nachgewiesen werden, wie von König beschrieben [KÖNIG et al. 1999, KÖNIG et al. 2001]. Die geringen Unterschiede zwischen Gold, Silber und Stahl könnten jedoch als Hinweis darauf gedeutet werden, dass *Staphylokokkus epidermidis* auf Stahl und auch auf Titan schwächer adhärert als die anderen Versuchskeime.

Da die prozentualen Unterschiede bei *Staphylokokkus epidermidis* zwischen den Metallen geringer sind als bei *Escherichia coli* und *Streptokokkus pneumoniae*, könnte aber auch die umgekehrte Schlussfolgerung möglich sein. Die bakterizide Wirkung von Gold und Silber könnten auf *Staphylokokkus epidermidis* weniger Einfluss haben, verglichen mit den anderen Versuchskeimen.

Um die Testergebnisse untereinander vergleichen zu können, wurden diese normiert. Das Wachstum der Keime auf Titan wurde mit 100 Prozent gleichgesetzt, da Titan in allen Versuchsreihen den höchsten Wert geliefert hat.

4.6 Bestimmung der Adhärenz der Testkeime auf den Werkstoffen mittels CFU

Die Ergebnisse sind kritischer zu betrachten, als die im Fluorometer ermittelten Resultate. Die Gründe hierfür wurden unter dem Punkt 4.1.1 abgehandelt.

Das Verhältnis des Besiedlungsgrades der Implantatmaterialien konnte aber auch hier bestätigt werden. Bakterien adhären hervorragend auf Polystyrol, daher diente Polystyrol als Referenz. Bei allen Versuchsstämmen wurde eine massive Besiedlung der Oberflächen von Polystyrol festgestellt. *Escherichia coli*

und *Streptokokkus pneumoniae* wiesen das zu erwartende Adhäsionsverhalten auf. Von den metallischen Prüfkörpern wurde Titan am stärksten und Silber am geringsten besiedelt. Einzig bei *Staphylokokkus epidermidis* traten abweichende Ergebnisse auf. *Staphylokokkus epidermidis* adhärierte auf Stahl besser als auf Titan. Der Unterschied war schwach ausgeprägt und daher nicht aussagekräftig. Die Ergebnisse mittels Auszählen der CFU sind, wie schon erwähnt, etwas fehleranfälliger, als bei der Auswertung mittels Fluoreszenzphotometer anzusehen. Insbesondere besteht die Möglichkeit, dass die Keime nur unvollständig von der Oberfläche abgelöst werden.

4.7 Schlussfolgerung und mögliche Denkansätze

Die Verhinderung von implantatassoziierten Infektionen setzt ein striktes Einhalten der hygienischen Prinzipien voraus. Trotz Einhaltung dieser Hygienemaßnahmen, die eine sterile Umgebung, Sterilität der verwendeten Instrumente und Materialien und natürlich eine Sterilität der Implantate beinhalten, ist ein absolut keimfreies Vorgehen selbst unter strikt sterilen Operationsmethoden nicht möglich. So konnte zum Beispiel *Staphylokokkus aureus* auf 90% der gereinigten Wunden vor dem Wundverschluss nachgewiesen werden [OAKES und WOODS 1986, NELSON 1979].

Dies ist aber vor allem für voll integrierte Implantate eine Problematik, da diese in eine sterile Umgebung eingebracht werden. Beim Einsatz von Mittelohrimplantaten muss eine sterile Arbeitsweise natürlich ebenfalls als Grundvoraussetzung gegeben sein. Bakterien können jedoch wie schon erwähnt das halboffene System des Mittelohrs und damit auch die Implantatoberflächen jederzeit besiedeln [GEYER 2000, SCHWAGER 2002].

Implantatmaterialien die Anwendung im Mittelohr finden, sollten also eine antiadhäsive Oberfläche sowie im besten Fall antimikrobielle Eigenschaften aufweisen. Die Adhäsion der Keime stellt den Initialschritt der Biofilmbildung dar. Innerhalb dieses Biofilms sind die Bakterien durch extrazelluläre Substanz

vor der körpereigenen Abwehr und der angewandten Antibiotika - Therapie geschützt [DOUGHERTY 1988, GIRIDHAR et al. 1994]. Betrachtet man den Biofilm als Hauptfaktor für die Therapieresistenz von Protheseninfektionen, so muss man ihn zum Angriffspunkt einer Therapie machen. Eine zusätzliche Voraussetzung ist eine gute Gewebeverträglichkeit. Eine gute Gewebeverträglichkeit bedeutet eine zufriedenstellende Implantateinheilung und damit eine geringere Infektionsanfälligkeit für Implantate.

Durch das äußerst komplexe Geschehen und die Vielzahl der Adhäsionsmechanismen, gekennzeichnet durch diverse beteiligte Proteine, Glykoproteine, Fettsäuren, Lipopolysaccharide und spezifischen Rezeptoren, ist es außerordentlich schwierig eine antiadhäsive Oberfläche gegen die unterschiedlichen Bakterienarten zu finden [SCHIERHOLZ et al. 2004]. Durch die oben genannten Blutbestandteile wird die Oberfläche so modifiziert, dass die Adhäsion von Bakterien oftmals begünstigt wird. Albumin verringert die Adhäsion von Staphylokokken auf Titan und Chrom-Kobalt, während Fibrinogen und Fibronectin genauso wie Kollagen die Adhärenz steigert [FREYTAG 2004]. Eine weitere Möglichkeit die Infektion von Implantaten zu reduzieren oder sogar zu verhindern, ist eine antibakterielle Modifikation der Implantatoberflächen.

Es gibt zahlreiche Ansätze solche antimikrobielle Oberflächenmodifikationen zu erreichen. Der Einsatz von sogenannten „Slow - release - Systemen“ ist eine solche Möglichkeit. „Slow - release - Systeme“ zeichnen sich durch eine kontinuierliche Freisetzung von Antiseptika, Antibiotika oder Schwermetallionen aus lokalen Wirkstoffträgern oder den beschichteten Oberflächen der Implantate aus [SCHIERHOLZ et al. 2004]. Als Beschichtungen dienen zum Beispiel Silber, Rifampicin, Ammoniumsalze oder Chlorhexidin. Vorteil dieser Systeme ist eine lang anhaltende Wirkung dieser antibakteriellen Substanzen durch ein langsames Entweichen der Wirkstoffe. Die Konzentration auf der Oberfläche selber, der sogenannten Nernst - Schicht ist sehr hoch, wobei systemische Nebenwirkungen durch die lokale Anwendung vermieden werden [SCHIERHOLZ und BEUTH 2001; SCHIERHOLZ, BEUTH und PULVERER 1999].

Ein weiterer Ansatz ist die Erzeugung von schwachen elektrischen Strömen auf den Implantaten. Wellmann et al. 1996 konnten mit 1 mA Oberflächenstrom auf Oberflächen eine antibakterielle Wirkung selbst bei einer Biofilmbildung nachweisen.

Van der Borden et al. 2004 konnte im Tierversuch initial anheftende Staphylokokken auf perkutanen Implantaten aus medizinischem Stahl, mittels eines elektrischen Stromes von 60 μ A und 100 μ A ablösen [VAN DER BORDEN et al. 2004].

Auch die Verstärkung der antibakteriellen Wirkung von Antibiotika durch schwache Ströme $>100 \mu$ A wurde schon beobachtet [COSTERTON et al. 1994]. Die Entwicklung von antiadhärenten Beschichtungen ist ebenfalls ein Forschungsbereich um implantatassoziierte Infektionen zu verhindern. Barnes et al. 1999 konnten bei medizinischem Stahl eine geringere Adhäsion von *Staphylokokkus aureus* und *Listeria monocytogenes* nach Beschichtung von Oberflächen mit Milchproteinen beobachten [BARNES et al. 1999]. Singh et al. 2002 verwendete Lactoferrin als Beschichtung von Oberflächen. Es verhindert, dass Bakterien einen Biofilm auf Oberflächen bilden. [SINGH et al. 2002]. Bakterien die durch Beschichtungen an der Adhäsion gehindert werden sind einfacher durch Antibiotika oder die Immunabwehr zu bekämpfen, da ihnen die schützende Wirkung des Biofilms fehlt.

Eine weitere Möglichkeit ist die Störung der Kommunikation zwischen den Bakterien um eine Biofilmentstehung zu verhindern. Häufig handelt es sich bei diesen Signalmolekülen um halogenierte Furanone. Es ist schon gelungen ein Analogon, nämlich (5Z)-4-Bromo-5-(Brommethylen)-3-Butyl-2(5H)-Furanon, aus der Alge *Delisea pulchra* zu extrahieren, welches die Bildung von Biofilmen stoppt. Diese Ergebnisse stammen aus Versuchen mit *Escherichia coli* [REN et al. 2001], *Bacillus subtilis* [REN et al. 2002] und *Pseudomonas aeruginosa* [HENTZER et al. 2002].

Auch mit *Staphylokokkus epidermidis* wurden solche Versuche durchgeführt. Bei in vivo Versuchen an Schafen, denen mit Furanonen beschichtete und unbeschichtete Venenkatheder subkutan implantiert wurden, zeigten die mit

Furanon beschichteten Katheder weniger Bakterienwachstum [HUME et al. 2004].

Der Einsatz von Impfstoffen gegen Oberflächenproteine ist ebenfalls eine denkbare Art der Vorbeugung von Biofilmbildung. Diese wurde allerdings noch nicht bei implantierten Fremdkörpern erprobt. Es konnte aber schon die Wirksamkeit von Impfstoffen gegen Oberflächenadhäsine in Tierversuchen nachgewiesen werden [MAMO et al. 1994, NILSON et al. 1998, ROZALSKA und WADSTRÖM 1994].

Es gibt eine große Anzahl verschiedenster Ansätze um eine bakterielle Adhäsion auf Oberflächen zu verhindern oder eine antimikrobielle Wirkung zu erzielen. Ein vorrangiges Ziel sollte die genauere Erforschung der Biofilmbildung und die Eigenschaften von Bakterien in Biofilmen sein. Wenn diese Mechanismen besser verstanden werden, können ausgereifere Möglichkeiten zur Bekämpfung von Biofilmen entwickelt werden.

Das Adsorptionsverhalten körpereigener Proteine auf den Oberflächen wurde in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. So haben zum Beispiel Staphylokokken die Fähigkeit extrazelluläre Matrixproteine, Gewebekomponenten und lösliche Faktoren auf ihrer Oberfläche zu binden [ESPERSEN et al. 1990, HERRMANN et al. 1988, PASCUAL et al. 1996]. Alle medizinischen Implantate werden nach kurzer Zeit mit diesen Komponenten überzogen und bieten eine ideale Angriffsfläche für diese Bakterien. Diese Konditionierung der Oberfläche von körpereigenen Proteinen wie es Dunne 2002 ausdrückte, scheint aber immer mehr an Bedeutung zu gewinnen, um die Biofilmbildung auf Implantaten zu verhindern [THULL 2000, WAHLGREN und ARNEBRANT 1991].

Die Anwendung dieser genannten Maßnahmen zur Verhinderung von implantatassoziierten Infektionen bei Mittelohrimplantaten, bedarf neben den mikrobiologischen Aspekten noch der Untersuchung auf die Funktionalität. Ein Implantatmaterial, welches gute antibakterielle Eigenschaften aufweist, muss zusätzlich noch gute Schalleitungseigenschaften aufweisen, haltbar sein und sollte sich vom Operateur intraoperativ einfach anpassen lassen.

5. Zusammenfassung

An Mittelohrimplantate werden hohe Ansprüche im Bezug auf die Bio- und Formstabilität, intraoperative Handhabung und Schallleitungseigenschaften gestellt. Die Besonderheit bei Mittelohrimplantaten stellt jedoch die potentielle bakterielle Besiedlung des Implantationsgebiets dar. Das Mittelohr hat durch die Eustachische Röhre eine Verbindung mit den oberen Atemwegen. Dadurch kann es zum Beispiel durch eine aufsteigende Infektion der Atemwege zu einer bakteriellen Besiedlung der Mittelohrimplantate kommen.

Ziel dieser Arbeit war es die Besiedlung von Polystyrol, Gold, Silber, Stahl und Titan durch die Bakterienstämme *Escherichia coli*, *Staphylokokkus epidermidis*, *Streptokokkus pneumoniae* zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden jeweils vier Plättchen eines Testmaterials mit einer Bakterienmonokultur besiedelt. Es wurden zwei Methoden ausgewählt um die Besiedlung der Versuchskeime auf den Testmaterialien zu bestimmen.

Zum einem wurden die an den Plättchen adhärierenden Keime abgelöst und nach einer Verdünnungsreihe auf Nährböden ausgebracht. Nach der Bebrütung wurden die entstandenen Kolonien (CFU) ausgezählt. Bei der zweiten Methode wurden die adhärierenden Keime auf den Prüfkörpern belassen und mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff angefärbt. Mit einem Photometer wurde die Besiedlung der Bakterien auf den Materialien statistisch bestimmt. Polystyrol und Silber dienten als Referenzmaterialien. Bei der Auswertung mittels Photometer musste aufgrund der Eigenfluoreszenz auf die Verwendung von Polystyrol verzichtet werden.

Die Ergebnisse beider Methoden ergaben für alle Keime das höchste Adhäsionsverhalten auf Titan. Stahl wurde von den Versuchskeimen ebenfalls gut besiedelt. Auf der Goldoberfläche wurde die geringste Adhäsion der Keime festgestellt. Eine deutliche bakterizide oder bakterio-statische Wirkung von Stahl und Titan konnte bei keinem der verwendeten Bakterienstämme festgestellt werden. Gold hingegen konnte deutlich das Bakterienwachstum hemmen. Der genaue Wirkungsmechanismus des bakteriziden Einflusses von Gold ist sicherlich ein interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung von

Implantatmaterialien, insbesondere für Mittelohrimplantate, da hier wie oben erwähnt, eine bakterielle Kontamination jederzeit erfolgen kann.

6. Literaturverzeichnis

Albrektsson, T., P.-I. Brånemark, O. Hallen, J. Lindström (1983) Percutaneous implants of pure titanium. *Trans Ann Meet Soc Biomat*; 6: 1

An, Y. H., R. B. Dickinson, R. J. Doyle (2000) Mechanism of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. p. 61 – 76. In An und Friedmann, *Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications*, 1 st ed. Humana Press, Totowa, N. J.

Anwar, H., J. L. Strap, J. W. Costerton (1992) Establishment of aging biofilms: possible mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 36: 1347 – 1351

Baier, R. E., A. E. Meyer, J. R. Natiella, R. R. Natiella, J. M. Carter (1984) Surface properties determine bioadhesive outcomes: methods and results. *J Biomed Mater Res*; 18: 327 – 355

Barnes, L.-M., M. F. LO, M. R. Adams, A. H. L. Chamberlain (1999) Effect of Milk Proteins on Adhesion of Bacteria to Stainless Steel Surfaces; *Applied and Environmental Micro.*; 65: No 10, 4543 – 4548

Bojrab, D. I. (1992) Alternatives in biocompatible ossicular implants. In: *Insights in Otolaryngology*, vol 7. Mosby-Year Book, Mosby, St Louis, 1–7

Boland, T., R. A. Latour, F. J. Sutzenberger (2000) Molecular basis of bacterial adhesion, p. 29 – 41. In Y. H. An and R. J. Friedmann (ed.), *Handbook of bacterial adhesion: principles, methods, and applications*, 1 st ed. Humana Press, Totowa, N. J.

Van der Borden, A. J., H. van der Werf, H. C. van der Mei, H. J. Busscher (2004) Electric Current-Induced Detachment of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms from Surgical Stainless Steel, Applied and Environ. Micro.; 70: No 11: 6871 – 6874

Brånemark, P. I., B. Hansson, R. Adell, U. Breine (1977) Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10 years period.
Scand J Plast Reconstr Surg; 16: 1 – 13

Carpentier, B., O. Cerf (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. J. Appl. Bacteriol.; 75: 499 - 511

Cerf, H., M.E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck, A. Buret (1999) The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J. – Clin. Microbiol.; 37: 1771 – 1776

Christensen, G. D., L. P. Barker, T. P. Mawhinney, L. M. Baddour, W. A. Simpson (1990) Identification of an antigenic marker slime production for *Staphylococcus epidermidis*. Infect. Immunol.; 58: 2906 – 2911

Costerton, J. W., B. Ellis, K. Lam, F. Johnson, A. E. Khoury (1994)
Mechanism of Electrical Enhancement of Efficacy of Antibiotics in Killing Biofilm Bacteria. Antimicro. Agents and Chemoth.; 38: 2803 - 2809

Costerton, J. W., H. M. Lappin – Scott (1995) Introduction to microbial biofilms, p. 1 – 11. In H. M. Lappin – Scott and J. W. Costerton (ed.), Microbial biofilms, 1 st ed. Cambridge University Press, New York, N. Y.

Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, H. M. Lappin-Scott (1995) Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol.; 49: 711 – 745

Costerton, J. W., P. Stewart, E. Greenberg (1999) Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections.; Science 284: 1318 - 1322

Cramton, S. E., C. Gerke, N. F. Schnell, W. W. Nichols, F. Götz (1999) The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. Infect Immun.; 67: 5427-33.

Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, E. P. Greenberg (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science; 280: 295-298

Donlan, R. M., J. W. Costerton (2002) Biofilms: Survival mechanism of clinically relevant micro organism; 15: No 2:167 - 193

Dornhoffer, J. L. (1998) Hearing results with the Dornhoffer ossicular replacement prostheses, Laryngoskop; 108: 531 – 538

Dougherty, S. H. (1988) Pathobiology of Infection in prosthetic Devices.Reviews of Infectious Diseases; 10: 1102 - 1117

Dunne, W. M. (2002) Bacterial adhesion: Seen any good biofilm lately? Clini. Microbilo. Reviews; 15: No. 2: 155 - 166

Dunne, W. M., E. M. Burd (1993) Fibronectin and proteolytic fragments of fibronectin interfere with the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to plastic. J. Appl. Bacteriol.; 74: 411 – 416

Dunne, W. M., E. O. Manson, Jr., S. L. Kapla (1993) Diffusion of rifampicin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. Antimicrob. Agents Chemother.; 37: 2522 – 2526

Eng, R. H. , F. T. Padberg, S. M. Smith, E. N. Tan, C. E. Cherubin (1991)

Bactericidal effects of antibiotics on slowly growing and nongrowing bacteria.

Antimicrob. Agents Chemother.; 35: 1824 – 1828

Espersen, F., B. J. Wilkinson, B. Gahrn-Hansen, V. T. Rosdahl (1990)

Attachment of staphylococci to silicone catheters in vitro. APMIS; 98: 471 - 478

Farber, B. F., M. H. Kaplan, A. G. Clogston (1990) *Staphylococcus*

epidermidis extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide

antibiotics. J. Infect.; 161: 37 - 40

Feigin, R. D., M. W. Kline, S. R. Hyatt, K. L. Ford III (1992) Otitis media, S.

174 – 189 In: R. D. Feigin und J. D. Cherry (Hrsg.), Textbook of paediatric

infectious diseases, 3te Ausgabe, vol. 1; W. B. Saundersco., Philadelphia, Pa.

Freytag, A. (2004) Adhärenz humanpathogener Staphylokokken auf

orthopädischen

Implantatmaterialien, Dissertation, Universität Würzburg

Frootko, N. J. (1984) Causes of ossiculoplasty failure using porous

polyethylene (Plastipore) prostheses. In: Grote JJ (ed) Biomaterials in otology.

Nijhoff, Boston; 76:169 – 176

Fuqua, C., S. C. Winians, E. P. Greenberg (1996) Census and consensus in

bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional

regulators. Annu. Rev. Microbiol.; 50: 727-751

Geyer, G. (1992) Implantate in der Mittelohrchirurgie. Otorhinolaryngol; I: 185 –

221

Geyer, G. (1999) Materialien zur Rekonstruktion des Schalleitungsapparates.

HNO; 47: 77 – 91

Geyer, G. (2000) Die Wiederherstellung der Mittelohrfunktion. Biomaterialien 1: 54 - 60

Geyer, G. (2001) Bakterielle Besiedlung von Implantaten in der Nebenhöhlen - und Ohrregion. HNO; 49: 340 – 343

Geyer, G., J. Helms (1997) Ionomerzementprothesen in der rekonstruktiven Mittelohrchirurgie. HNO; 45: 442 – 447

Gilbert, P., M. R. W. Brown, J. P. Collier (1990) Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cells cycle, dormancy and stringent response. Antimicro. Agents Chem.; 34: 1865 - 1868

Giridhar, G., A.S., Kreger, Q.N., Myrvik, Gristina A. G. (1994) Inhibition of *Staphylococcus* adherence to biomaterials by extracellular slime of *S. epidermidis* RP12. Journal of Biomedical Materials Research; 28: 1289 – 1294

Glasscock, M. E., S.C. Levine, K. Mckennan (1991)

Materials used in tympanoplasty. In: Paparella MM, Shumrick DA, Gluckman JL, Meyerhoff WL (eds) Otolaryngology. Vol II: Otolology and neurootology. Saunders, Philadelphia, 1441 – 1447

Gray, K. M. (1997) Intercellular communication and group behaviour in bacteria. Trends Microbiol.; 5: 184 - 188

Gristina, A. G. (1987) Biomaterial-centered infection, microbial adhesion Versus tissue integration. Science; 237: 1588 - 1597

Gristina, A. G., J. W. Costerton (1985) Bacterial Adherence to biomaterials and tissue, Juorn. Of Bone and Joint Surgery; 67A, 2: 264 - 273

Heilman, C., O. Schweitzer, C. Gerke, N. Vanittanakom. D. Mack, F. Götz (1996)

Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm - forming *Staphylococcus epidermidis*. Mol. Microbiol.; 20: 1083 - 1091

Helms, J. (1998) Persönliche Mitteilung an Dr. Geyer, . Klinik für HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie, (Chefarzt: Priv.- Doz. Dr. G. Geyer), Städtisches Klinikum Solingen

Hentzer, M., K. Riedel, T.B. Rasmussen, A. Heydorn, J. B. Andersen, M.R. Parsek, S. A. Rice, L. Eberl, S. Molin, N. Hoiby, S. Kjelleberg, M. Givskov (2002) Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound, Microbiology; 148(Pt 1): 87 - 102

Herrmann, M., P.E. Baudaux, D. Pittet, R. Auckenthaler, P. D. Lew, F. Schumacher-Perdreau, G. Peters, F. A. Waldvogel (1988) Fibronectin, fibronectin, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. J. Infect. Dis.; 158: 693 – 701

Heumann, H., E. Steinbach, S. Seuffert (1982) Über die Anwendbarkeit von Paukenröhrchen aus Edelmetall. Laryng. Rhino. Otol.; 61: 17-19

Hume, E. B. H., J. Baveja , B. Muir, T.L. Schubert, N. Kumar, S. Kjelleberg, H.J. Griesser, H. Thissen, R. Read, L.A. Poole-Warren, K. Schindhelm, M.D.P Willcox (2004) The control of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and in vivo infection rates by covalently bound furanones. Biomaterials; 25: 5023 - 5030

Hüttenbrink, K. B. (1994) Die operative Behandlung der chronischen Otitis media. Teil III: Mittelohrrekonstruktion. HNO; 42: 701 – 718

Jarvis, W. R. (1996) The epidemiology of colonization. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*; 17(1): 47 - 52.

Jorgensen, J. H., J. D. Turnidge, J. A. Washington (1999) Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods, p. 1526 – 1543. *In* P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, D. C.

Jucker, B. A., H. Harms, A. J. B. Zehnder (1996) Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *J. Bacteriol.*; 178: 5472 – 5479

Kaga, M., N.S. Seale, I. Hannawa, J. L. Ferracane, D.E. Waite, T. Okabe (1991) Cytotoxicity of amalgams, alloys, and their elements and phases. *Dent Mater*; 7, 68 - 72

Klueh, U., S. Wagner, S. Kelly, A. Johnson, J. D. Bryers (2000) Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *Mater. Res. (Appl Biomater)*; 53: 621 - 631

König, D. P., F. Perdreau-Remington, J. Rutt, R. D. Hilgers, J. M. Schierholz (1999) Adherence to and accumulation of *S. epidermidis* on different biomaterials due to extracellular slime production. *In vitro* comparison of a slime - producing strain (Rp 62 A) and its isogenic slime negative mutant (M7). *Zentralbl Bakteriologie*; 289: 355 – 364

König, D. P., J.M. Schierholz, R. D. Hilgers, C. Bertram, F. Perdreau-Remington, J. Rutt (2001) *In vitro* adherence and accumulation of *Staphylococcus epidermidis* RP 62 A and *Staphylococcus epidermidis* M7 on four different bone cements. *Langenbecks Arch Surg*; 386: 328 – 332

Kondoh, K., M. Hashibo (1998) Inhibitory effect of macrolid antibiotics on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaibo; 101: 25 - 36

Krause, P. J., N. J. Owens, C. H. Nightingale, J. J. Klimek, W. E. Lehmann, R. Quintilliani (1982) Penetration of amoxicillin, cefaclor, erythromycin-sulfisoxazole and trimethoprim – sulfamethoxazole into the middle ear fluid of patients with chronic serous otitis media. J. Infect. Dis.; 145: 815 - 821

Kuijpers, W. (1984) Behaviour of bioimplants in the middle ear. An experimental study. In: Grote JJ (ed) Biomaterials in otology. Nijhoff, Boston; 18 – 28

Lässig, H. E., R. A. Müller (1999) Die Zahnheilkunde in Kunst und Kulturgeschichte
DuMont Buchverlag, Köln, 6 - 31

Liedberg, H., T. Lundberg (1989) Assessment of silver-coated urinary catheter toxicity by cell culture. Urol res; 17: 359 – 360

Mack, D., N. Siemssen, R. Laufs (1994) Identification of a cell cluster associated antigen specific for plastic adherent *Staphylococcus epidermidis* which is functional related to intercellular adhesion. Zentralbl. Bakteriol. Suppl.; 26: 411 – 413

Mack, D., W. Fischer, R. Krokotsch, K. Leopold (1996) The intercellular adhesion involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear (1 – 6)-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis. J. Bacteriol.; 178: 175 – 183

Maki, D. G., C. E. Weise, H. W. Sarafin (1977) A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *New Eng. J. Med.*; 296: 1305-1309

Mamo, W., P. Jonsson, J. I. Flock, M. Linberg, H. P. Muller, T. Wadström, L. Nelson (1994) Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis: immunological response of mice vaccinated with fibronectin-binding protein (FnBP-A) to challenge with *S. aureus*. *Vaccine*; 12: 988 - 992

Marshall, K. (1985) Mechanism of bacterial adhesion at solid-water interfaces S. 133 - 141. *In* Savage D. C. und Fletcher. Bacterial adhesion: mechanism and physiological significance. Plenum Press New York

Martone, W., W. R. Jarvis, D. H. Culver, R. W. Haley (1992) Incidence and nature of endemic and epidemic nosokomial infections. *Antimicrob. Agents Chem.*; 5: 77 – 592

Muller, E., S. Takeda, D. A. Goldmann, G. B. Pier (1991) Blood proteins do not promote adherence of coagulase-negative staphylococci to biomaterials. *Infect. Immun.*; 59: 3323 - 3326

Namasivayam, V., R. G. Larson, D. T. Burke, M. A. Burns (2003) Light – induced molecular cutting: localized reaction on a single DNA molecule. *Anal. Chem.*; 75: 4188 - 4194

Nelson, C. L. (1979) Environmental bacteriology in the unidirectional (horizontal) operating room. *Arch. Surg.*; 114: 778 - 782

Nickel, J. C. , I. Ruseka, J. B Wright., J. W. Costerton (1985) Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob. Agents Chem.*; 27: 619 - 624

Nichols, W. W., M. J. Evans, M. P. E. Slack, H. L. Walmsley (1989) The penetration of antibiotics into aggregates of mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol.; 135: 1291-1303

Nilsson, I. M., J. M. Patti, T. Bremell, M. Höök, A. Tarkowski (1998) Vaccination with a recombinant fragment of collagen adhesin provides protection against *Staphylococcus aureus*-mediated septic death. Journal of Clinical Investigation; 101: 2640 - 2649

Oakes, J. A., A. J. Wood (1986) Infections in surgery. N. Engl. J.; 315: 1129-1138

Palva, T., L.G. Johnsson, A. Kohonen (1987) Ceramic prostheses used as a columella. Clin Otolaryngol; 12: 33 – 38

Pascual, A., A. Fler, N. A. C. Westerdaal, J. Verhoef (1996) Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to Teflon catheters in vitro. Eur. J. Clin. Microbiol.; 5: 518 – 522

Pearce, D., M. J. Bazin, J. M. Lynch (1995) The rhizosphere as a biofilm S. 207 - 220; In Lappin-Scott und Costerton, Microbial biofilms, 1st ed. Cambridge University Press, New York

Portmann, M., J. P. Bebear, M. Bagot d'Arc, A. Diogo de Paiva (1984) Comparative study of different ossicular prostheses in tympanoplasty (Proplast, Plastipore, Ceravital). Analysis of clinical results, histopathological and hearing in the long term (250 cases). In: Grote JJ (ed) Biomaterials in otology. Nijhoff, Boston; 177 – 186

Ren, D, J. J. Sims, T. K. Wood (2001) Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. Environ. Microbiol.; 3(11): 731 - 736

Ren, D., J. J. Sims, T. K. Wood (2002) Inhibition of biofilm formation and swarming of *Bacillus subtilis* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone

Lett. Appl. Microbiol.; 34(4): 293 - 299

Rozalska, B., T. Wadström (1994) Role of antibodies against fibronectin-, collagen-binding proteins and alphatoxin in experimental *Staphylococcus aureus* peritonitis and septicaemia in neutropenic mice Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.; 281: 495 - 501

Schierholz, J. M., J. Beuth (2001) Implant infections: a haven for opportunistic bacteria, J. hospit. Infec.; 49: 87 - 93

Schierholz, J. M., J. Beuth, D. König, A. Nürnberger, G. Pulverer (1999) Antimicrobial substances and effects on sessile bacteria. Zentbl. Bakteriol.; 289: 165 – 177

Schierholz, J. M., J. Beuth, G. Pulverer (1999) Adherent bacteria and activity of antibiotics J. Antimicrob. Chem. ; 43: 158-160

Schierholz, J. M., C. Morscheck, N. Brenner, D. P. König, N. Yücel, M. Korenkov, E. Neugebauer, A. F. E. Rump, G. Waalenkamp, J. Beuth, G. Pulverer, S. Arens (2004) Besonderheiten der implantatassoziierten Infektion in der orthopädischen Chirurgie. Von der Pathophysiologie zu maßgeschneiderten Präventionsstrategien, Der Orthopäde; 33: 397-404

Schubert, K. (1964) Probleme der Stapeschirurgie. HNO; 12: 12-14

Schwager, K. (1998) Titan als Gehörknöchelchenersatzmaterial. In-vivo Untersuchungen im Mittelohr des Kaninchens und Untersuchungen zur Proteinadsorption am Implantatmaterial. Habilitationsschrift, Universität Würzburg

Schwager, K. (1998) Titanium as ossicular replacement materials: biocompatibility results after implantation in the rabbit. Eur Arch ORL; 255: 396 - 401

Schwager, K. (2002) Titan als Gehörknöchelchenersatzmaterial. Grundlagen und klinische Anwendung, Laryngo. Rhino. Otol. ; 81: 178 - 183

Schwager, K., G. Geyer (1998) Titanium and glass-ionomer cement as ossicular replacement materials: biocompatibility results after implantation in the rabbit. Eur Arch ORL; 60: 322 – 328

Seung-Hak, C. (2001) Epidemiologische und molekulare Untersuchungen zur Biofilmbildung in *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus aureus*. Diss. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Singh, P. K., M. R. Parsek, E. P. Greenberg, M. J. Welsh (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. Nature; 417: 552 - 555

Stamm, W.E. (1978) Infections related to medical devices. Ann Int. Med.; 89: 764-769

Stickler, D. J., R. J. Morris, N. S. Mclean, C. Fuqua (1998) Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. , Appl. Environ. Microbiol.; 64: 3486 - 3490

Suci, P. A., M. W. Mittelmann, F. P. Yu, G. G. Geesey (1994) Investigations of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Antimicro. Agents. Chem. ; 38: 2125- 2133

Thull, R. (2000) Biokompatibilitätsbestimmende Eigenschaften der Grenzflächen zwischen Werkstoff und Biosystem. Biomaterialien; 1: 6 - 11

Wahlgren, M., T. Arnebrant (1991) Protein adsorption to solid surfaces. Tibtech; 9: 201 – 208

Ward, K. H., M. E. Olson, K. Lam, J. W. Costerton (1992) Mechanism of persistent infection associated with peritoneal implants. J. Med. Microbiol.; 36: 406-413

Wellman, N., S. M. Fortun, B. R. McLeod (1996) Bacterial Biofilms and the Bioelectric Effect, Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 2012 - 2014

Williams, D. F. (1988) Consensus and definitions in biomaterials. In: de Putter D. , K. de Lange, K. de Groot (Hrsg.): Advances in biomaterials. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 6 - 11

Wullstein, H. (1953) Die Tympanoplastik als gehörverbessernde Operation bei Otitis media chronica und ihre Resultate. Proc Fifth. Internat Congress Oto-Rhino-Laryngol; S. 104

Wullstein, H. L., S. R. Wullstein, (1986) Tympanoplastik Osteoplastische Epitympanotomie. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York

7. Anhang

Verwendete Abkürzungen

AAP	Accumulation associated Protein
ATCC	American Tissue and Cell Collection
°C	Grad Celsius
CFU	Colony Formig Unit
CPD	Critical Point Drying
DNA	Desoxyribonucleic acid
Fbe	Fibrinogen binding protein
h	Stunde
LB	Luria Bertani Broth
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphat-gepufferte Natriumchlorid-Lösung
PIA	Polysaccharid –Adhäsın
PMMA	Polymethylmethacrylat
PORP	Partial Ossicular Replacement Prosthesis
REM	Rasterelektronenmikroskop
sec	Sekunde
TORP	Total Ossicular Replacement prosthesis
TSB	Tryptic Soy Broth

Materialliste:

Geräte:

Abzug	Gebäudeinstallation		
Autoklav	Cliniklav 25	Melag AG	Berlin
Autoklaventüten- Bietigheim-	Hygropac	Dürr AG	
Einschweißgerät			Bissingen
Cleanbench	LaminAir HB 2472	Heraeus Instruments	Hanau
Elektronische Waage	PT 600	Sartorius AG	Göttingen
Fluoreszenzmessgerät	SPECTRAFluor Plus	Tecan Group Ltd.	CH-
Maennedorf			
Fluoreszenz – Mikroskop	Axiolab	Carl Zeiss GmbH	Jena
Gläser	Bechergläser Erlmeyerkolben	Schott Glass GmbH	Mainz
Goldbedampfungsgerät	K 550	EM - Technologies Ltd.	GB-
Ashford			
Kritisch Punkt	CPD 030	Bal-Tec AG	
Lichtenstein			
Trocknungsgerät			
Locheisen	Durchmesser 14 mm	Karl Fischer GmbH	Pforzheim
Mikrobiologischer Brutschrank	Heraeus BB 6060	Heraeus Holding GmbH	Hanau
Motor – Pipette	Accu – Jet	Brand GmbH Co. KG	Wertheim
PH – Meter	inoLab pH Level 1	WTW GmbH	Wielheim
Pipetten	Research 1000 & Research 200	EppendorfAG	Hamburg
Rasterelektronenmikroskop	DSM 940	Carl Zeiss GmbH	Jena
Schüttler	Novotron	Infors AG	Bottmingen
Ultraschallgerät	Sonorex RK 102 H	Bandelin GmbH&Co. KG	Berlin
Vortex – Gerät	Vortex - Genie® 2	Carl – Roth GmbH	Karsruhe

Verbrausmaterialien:

Autoklaventüten	Hygrofol 7,5 x 30 cm	Dürr AG	Bietigheim Bissingen
Eppendorf – Reaktinsgefäße	1,5ml	Eppendorf AG	Hamburg
Kunststoff Petrischalen	10cm Durchmesser	Greiner – Bio One GmbH	Fricken - hausen
Leitlack für die Rasterelektronenmikroskopie	Leit – C	Plano GmbH	Wetzlar
Pipettenspitzen	blau 1000 gelb 200	Sarstedt GmbH	Hamburg
Tiefziehfolie	Erkodur 3 mm	Erkodent GmbH	Pfalzgra - fenweiler
Zellkulturplatten	24 – Well	Greiner – Bio One GmbH	Fricken - hausen

Chemiekalien:

Aqua destillata	Eigenproduktion	
D (+) – Glucose	Merck KG	Darmstadt
Formaldehyd (3,7)	Merck KG	Darmstadt
Hefextrakt	Life Technologies GmbH	Karlsruhe
NaOH	Merck KG	Darmstadt
NaCl	Merck KG	Darmstadt
NaOH	Merck KG	Darmstadt
Pepton aus Casein	Sigma – Aldrich GmbH	München
Pepton Nr. 140	Sigma – Aldrich GmbH	München
SYBR® Green I	Molecular Probes, Inc., bezogen von MoBiTec GmbH	Richmond OR,USA Göttingen

Zusammensetzung von Tryptone Soy Broth (TSB) Medium:

17,0 % (w/v)	Pepton aus Casein
3,0 % (w/v)	Pepton (Nr. 140) aus Sojamehl
2,5 % (w/v)	D(+)- Glucose
5,0 % (w/v)	NaCl
2,5 % (w/v)	K ₂ HPO ₄
ad 1000,0 ml	Aqua destillata
Kalibrieren des pH – Wertes auf 7,0 mit NaOH	
Autoklavieren: 20 min, 121°C	

Zusammensetzung von der phosphatgepufferten Saline (PBS) :

8,0 g	NaCl
0,2 g	KH ₂ PO ₄
1,44 g	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O
0,2 g	KCl
ad 1000,0 ml	Aqua destillata

Autoklavieren: 20 min, 121°C

Zusammensetzung von Tris – Puffer [2 – Amino – 2 – (hydroxymethyl) – propan – 1,3 - diol]:

1,21 g Tris .
ad 100,0 ml Aqua destillata

Kalibrieren des pH – Wertes auf 7,9 mit HCl

Herstellung der LB – Agarplatten (in sterile Petrischalen gegossen):

12,0 g/l Agar (w/v) in LB – Medium

Autoklavieren: 20 min, 121°C

Testplättchen:

Stahl DIN 17433	Firma Ergste Wertig GmbH	Schwerte
Polystyrol	Firma Nalege Nunc A/S Int.	Dänemark
Titan Grade 2	Firma Robert Zapp	
Warmgefertigt ASTM B348	Werkstofftechnik GmbH	Ratingen

Für die Gold- und Silberplättchen wurden Stahlplättchen (Fa. Ergste Wertig GmbH, Ratingen) in der Abteilung experimentelle Zahnmedizin der Poliklinik für Mund,- Kiefer-, Gesichtskrankheiten mit Gold bzw Silber beschichtet

Bakterienstämme:

Staphylokokkus epidermidis, Stamm RP 62 A, Biofilm bildend, grampositiv

Escherichia coli, Stamm HB 101, gramnegativ

Streptokokkus pneumoniae, ATCC

Staphylokokkus epidermidis und Escherichia coli wurden bei der „Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen – GmbH (DSMZ) – Braunschweig erworben.

Streptokokkus pneumoniae wurde aus dem Mikrobiologischen Institut der Universität Würzburg bezogen

Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Professor Dr.-Ing. Roger Thull für die Vergabe des Themas

Bei Frau Dr. Andrea Ewald und Gisela Menig bedanke ich mich ganz besonders für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit. Ihr stetiges Interesse, Ihre Geduld und Engagement haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Das wissenschaftliche Arbeiten im Labor wäre für mich sehr schwierig gewesen, wenn da nicht eine Menge netter und hilfsbereiter Mitarbeiter gewesen wären. Auf meine vielen Fragen bekam ich immer freundliche und kompetente Antworten.

Meiner Frau, Tina Elias und meinem Sohn, Leonhard Elias für ihre Unterstützung und Geduld.

Zum Schluss bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Roman Elias

Geburtstag: 09.08.1976

Geburtsort: Würzburg

Familienstand: verheiratet mit Tina Elias (geb. Klonz), 1 Sohn geb. 04.06.2005

Religion: evangelisch

Name und Beruf des Vaters: Dr. Norbert Elias, Zahnarzt

Name und Beruf der Mutter: Annemarie Elias, MTA

Ausbildung:

Schulischer Werdegang: 1983-87 Grundschule Rottendorf
1987-96 Riemenschneider-Gymnasium Würzburg
28.06.1996 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Universitärer Werdegang: Wintersemester 1997 Beginn des Studiums der Zahnmedizin in Würzburg
20.04.1999 naturwissenschaftliche Vorprüfung
11.04.2000 zahnärztliche Vorprüfung
12.11.2002 zahnärztliche Prüfung
09.12.2002 Approbation

Beruflicher Werdegang: 01.01.2003 Assistenzarzt in der Praxis Dr. Norbert Elias
Niedergelassener Zahnarzt in Rottendorf seit 1.02.2005

Würzburg, 13.08.2006

