

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Vorversuch zur Validierung der Ultraschallwirkung auf eine *S. sanguis*-Suspension

Es wurden 100 ml einer BHI-Lösung mit *S. sanguis* beimpft und für 24 h bei 37 °C bebrütet. Von der Keimsuspension wurden jeweils 5 ml in sieben Reagenzröhrchen pipettiert und anschließend in einem Wasserbad für unterschiedliche Zeiten mit Ultraschall behandelt (Tabelle 4 im Anhang). Nach der Ultraschallbehandlung wurde jedes Teströhrchen mit einem Vortexmischer geschüttelt und eine Verdünnung auf  $10^{-5}$  und  $10^{-6}$  hergestellt. Diese wurden mit einem Spiral Plater (s. Anhang) auf jeweils eine Columbia Blut-Agar-Platte (s. Anhang) ausplattiert. Zur besseren Vergleichsmöglichkeit wurde jede Verdünnung zweimal ausplattiert. Damit ergaben sich für eine Zeit immer vier verschiedene Werte. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C bebrütet und dann die entstandenen Kolonien ausgezählt. Da der Spiral Plater nur ein Volumen von 37,3  $\mu$ l ausplattiert, musste das Ergebnis der Auszählung nach folgender Formel auf das Volumen von 1 ml korrigiert werden:

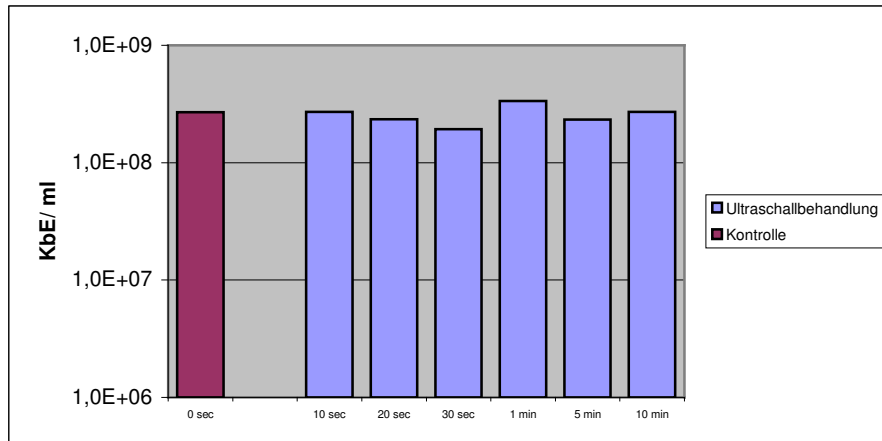
$$\text{KbE/ml} = \Sigma / 0,0373$$

KbE = kolonienbildende Einheit

$\Sigma$  = Summe der Kolonien auf einer Platte

Zur Kontrolle wurde ein Reagenzröhrchen nicht im Ultraschallbad behandelt. In diesem Röhrchen befanden sich im Mittel rund  $2,7 \times 10^8$  Keime. Die Abbildung 2 verdeutlicht, dass die mittleren Keimzahlen

für 10 s, 20 s, 5 min und 10 min in einem Bereich zwischen  $2,4$  und  $2,7 \times 10^8$  Keime streuen. Für die hohen Keimzahlen ist das ein recht konstantes Ergebnis.



**Abbildung 2:** Validierung zur Auswirkung von Ultraschall auf eine *S. sanguis*-Suspension

Lediglich die Werte für 30 s und 1 min fallen mit den Keimzahlen von knapp  $2,0 \times 10^8$  bzw.  $3,4 \times 10^8$  etwas aus dem Rahmen.

### 3.2 Vorversuch zur Validierung der Ultraschallwirkung auf die Hydroxylapatit-Plättchen

In sechs Reagenzröhrchen wurden jeweils 5 ml Aqua dest. pipettiert. Dann wurde jedem der Röhrchen je ein Hydroxylapatit-Plättchen zugefügt. Die Reagenzröhrchen wurden in ein Wasserbad gestellt und mit Ultraschall unterschiedlich lange behandelt (die Zeiten gleichen denen aus Tabelle 4, wobei die Kontrolle ohne Ultraschallbehandlung weggelassen wurde).

Die Auswertung ergab, dass sich bei einer Zeit von 10 min im Ultraschallbad das Wasser weiß getrübt hatte und sich nach einigen

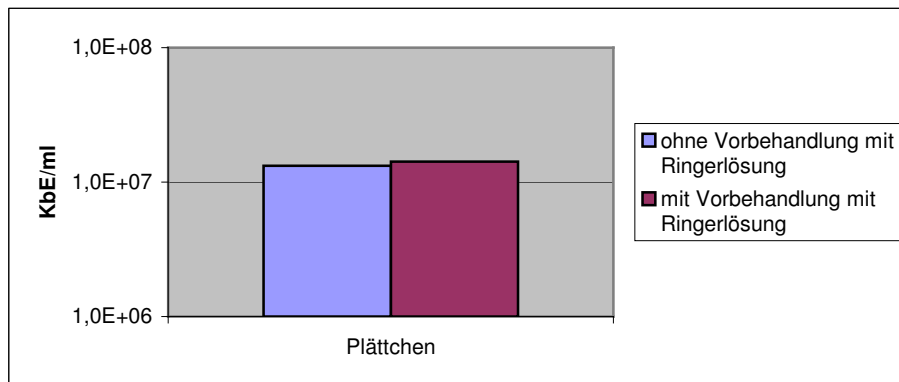
Minuten diese Trübung als weißer Niederschlag auf dem Boden des Reagenzröhrchens absetzte. Die anderen Reagenzröhrchen ließen keine Trübung bzw. keinen Niederschlag erkennen. Es dürfte sich bei dem weißen Niederschlag um Abnutzungserscheinungen der HA-Plättchen handeln.

### **3.3 Vorversuch zur Validierung der Vergleichbarkeit der Keimzahlen in den verschiedenen Biofilmen miteinander und der Auswirkung einer physiologischen Flüssigkeit auf die Keimzahlen**

Zur Herstellung der Biofilme wurde der gleiche Versuchsaufbau benutzt wie im Abschnitt **2. Material und Methode** beschrieben. Nachdem ein Biofilm auf den Plättchen gewachsen war, wurden acht Plättchen in je 1 ml Phosphatpuffer gegeben und die Biofilme durch 30 s Durchmischen auf dem Vortexmischer und 30 s Behandlung im Ultraschallbad abgelöst. Mit den anderen acht Plättchen wurde genauso verfahren, jedoch wurden sie vorher für 5 min in je 1 ml einer physiologischen Kochsalzlösung (Ringerlösung) gelegt. Von jeder Probe wurde eine Verdünnungsreihe im Phosphatpuffer auf  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  hergestellt und anschließend mit einem Spiral Plater auf eine Columbia Blut-Agar-Platte ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C für 48 h bebrütet und dann die vorhandenen Kolonien ausgezählt. Auch hier musste die Kolonienzahl nach der unter **3.1** angegebenen Formel auf die Kolonienanzahl pro ml umgerechnet werden, da der Spiral Plater nur ein Volumen von 37,3 µl ausplattiert.

Die folgende Auswertung bezieht sich auf die Werte der Verdünnungsreihe  $10^{-4}$ . Bei den einzelnen Ergebnissen fallen die

Werte der Proben 9 und 11 auf (Tabelle 5 im Anhang). Die vorliegenden Keimzahlen sind hier etwa doppelt so hoch wie bei den übrigen Proben. Die Werte wurden deshalb als Ausreißer definiert und bei der Mittelwertberechnung nicht berücksichtigt. Der Wert der Probe 8 liegt bei fast  $1,0 \times 10^7$  und wurde nicht als Ausreißer behandelt. Demnach ergibt sich für die Proben 1 bis 8, die zuvor nicht mit Ringerlösung behandelt wurden, ein Mittelwert von  $1,3 \times 10^7$  Keimen pro ml. Der Mittelwert der Proben 9 bis 16, die mit Ringerlösung behandelt wurden, liegt bei  $1,4 \times 10^7$ . Damit sind die beiden Mittelwerte fast identisch (Abbildung 3).



**Abbildung 3:** Vergleich der Mittelwerte zwischen den Plättchen mit und ohne Vorbehandlung durch Ringerlösung

Die Einzelwerte in und zwischen den beiden Gruppen liegen bis auf die Ausreißer 9 und 11 in einem eng abgrenzbaren Bereich.

### 3.4 Vorversuch zur Validierung der Wirkung von Mucin im Nährmedium

Zur Herstellung der Biofilme wurde der gleiche Versuchsaufbau benutzt wie im Abschnitt **2. Material und Methode** beschrieben. Das

Nährmedium war jedoch zusätzlich mit 2,5 g/l Schweinemagenmucin (Herkunft s. Anhang, Versuchsergebnisse s. Tabelle 6 im Anhang) supplementiert. Im Anschluss an die Biofilmherstellung wurde ein Versuch mit 0,1% Chlorhexidindigluconat und einer Einwirkzeit von 30 s und 3 min durchgeführt, analog zur Versuchsdurchführung in Abschnitt **2. Material und Methode**.

Zum Vergleich wurde der Versuch noch einmal mit den gleichen Parametern durchgeführt. Dabei enthielt das Nährmedium aber kein Mucin (Ergebnisse s. Anhang Tabellen 6 und 7).

Beim Vergleich der einzelnen Ergebnisse fällt auf, dass beim Versuch mit dem mucinhaltigen Nährmedium die Keimzahlen grundsätzlich um 1 log-Stufe niedriger angesiedelt waren als im Versuchsansatz ohne Mucin. Außerdem sind auf den Platten des Mucin enthaltenden Ansatzes oftmals gar keine Kolonien gewachsen. Das scheinen aber nur Ausreißer zu sein. Sonst wäre es nicht plausibel, dass auf den anderen Platten Keimzahlen im Bereich von  $10^5$  und  $10^6$  gewachsen sind.

### **3.5 Vorversuch zur Validierung der Effektivität des jeweiligen Neutralisationsmittels**

Zunächst wurde mit der in Abschnitt **2. Material und Methode** beschriebenen Versuchsanordnung *S. sanguis* als Bakteriensuspension über einen Zeitraum von 48 h kultiviert. 1 ml von jedem Antiseptikum wurde jeweils mit 1 ml BHI vermischt. Die Konzentration betrug bei Chlorhexidindigluconat 2%, bei PVP-Iod 7,5% und bei Octenidin 0,1%. Von jedem Antiseptikum wurden drei Ansätze vorbereitet. Nach Durchmischung wurde jeweils 1 ml in je 9 ml des

entsprechenden Neutralisationsmittels überpipettiert. Nach 30 min wurde jeweils 0,1 ml der Keimsuspension hinzugegeben und anschließend mit einem Spiral Plater auf eine Columbia Blut-Agar-Platte ausplattiert. Als Leerwerte wurden 10 ml von jedem der drei Neutralisationsmittel in je ein Reagenzröhrchen pipettiert. Dann wurde jeweils 0,1 ml der Keimsuspension zugefügt und mit einem Spiral Plater auf eine Columbia Blut-Agar-Platte ausplattiert.

Die Platten wurden bei 37 °C für 48 h bebrütet. Danach wurden die Kolonien auf den Platten miteinander verglichen. Alle Platten zeigten einen ähnlichen Bewuchs. Jedes Neutralisationsmittel ist somit für das entsprechende Antiseptikum wirksam.

### **3.6 Versuchsergebnisse der Antiseptikatestung**

Jedes Antiseptikum wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen für jeweils 5 min und 30 min Einwirkzeit getestet (Tabellen 8 – 13 im Anhang).

Bei den Biofilmen wurden für jede Zeit und jede Konzentration drei Prüfkörper verwendet. Da jeder Versuch im Doppelansatz durchgeführt wurde, standen am Ende immer sechs Messwerte zur Auswertung zur Verfügung. Als Vergleichs- bzw. Leerwerte dienten parallel zur Antiseptikatestung in jedem Versuchsansatz ermittelte Werte mit dem spezifischen Neutralisationsmittel. Für Chlorhexidindigluconat wurden pro Versuchsansatz drei Werte ermittelt. Es standen insgesamt also wie für das Antiseptikum selbst sechs Werte zur Verfügung. In den Versuchsansätzen mit PVP-Iod und Octenidin wurde für jedes spezifische Neutralisationsmittel jeweils ein Wert erhoben. Da mit den beiden zuletzt genannten

Antiseptika vier Versuche durchgeführt wurden, standen zum Schluss vier Werte für jedes der beiden Neutralisationsmittel zu Verfügung. Eine Überprüfung der Toxizität des jeweiligen Neutralisationsmittels fand in jedem Versuchsansatz statt. Dabei wurde in den Versuchsansätzen mit Chlorhexidindigluconat ein Probekörper nur mit Ringerlösung behandelt. In den Versuchsansätzen mit PVP-Iod und Octenidin waren es jeweils zwei Probekörper. Anhand der Keimzahlbestimmung (KbE/ml), die genauso durchgeführt wurde wie für die getesteten Antiseptika (Abschnitt **2. Material und Methode**), konnte die Auswirkung des Neutralisationsmittels auf die Biofilme ermittelt werden. In keinem Fall zeigten sich auffällig reduzierte Keimzahlen im Vergleich zu den mit Ringerlösung behandelten Probekörpern. Der Medianwert der mit den Neutralisationsmitteln behandelten Biofilmzellen betrug  $3,8 \times 10^6$  Zellen pro  $\text{mm}^2$ . Bei Behandlung mit Ringerlösung ergab sich ein Medianwert von  $4,6 \times 10^6$  pro  $\text{mm}^2$ . Diese Differenz ist nicht signifikant ( $p = 0,796$ ). Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Neutralisationsmittel keine toxische Wirkung auf die Biofilmzellen ausüben.

Für die planktonischen Zellen wurden pro Konzentration des Antiseptikums und pro Einwirkzeit zwei Werte erhoben. Da auch hier der Versuch im Doppelansatz durchgeführt wurde, ergaben sich insgesamt vier Werte. Die planktonische Testung wurde für die Konzentration von 7,5% PVP-Iod und 0,1% Octenidin jedoch nicht mehr durchgeführt, da schon bei der geringeren Konzentration von 1,5% PVP-Iod bzw. 0,05% Octenidin alle planktonischen Zellen vernichtet worden waren. Als Vergleichs- bzw. Leerwerte dienten parallel zur Antiseptikatestung in jedem Versuchsansatz ermittelte Werte mit dem spezifischen reinen Neutralisationsmittel. In jedem Versuch wurde immer ein Wert für das jeweils verwendete

Neutralisationsmittel erhoben, so dass insgesamt immer zwei Werte vorlagen. In den Versuchen 9 und 10 erfolgte dies nicht mehr. Wie bei den Biofilmen wurde auch für die planktonischen Zellen die Toxizität des jeweiligen Neutralisationsmittels getestet. Hierfür wurde als Vergleichswert eine Keimzahlbestimmung in Ringerlösung durchgeführt. In den Versuchsansätzen für Chlorhexidindigluconat wurde immer ein Wert erhoben. In den restlichen Ansätzen wurden zwei Proben hergestellt. Auch hier zeigten sich keine auffällig reduzierten Keimzahlen im Vergleich zu den mit Ringerlösung behandelten Probekörpern. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Neutralisationsmittel keine toxische Wirkung auf die planktonischen Zellen ausüben.

Um die Wirksamkeit der Antiseptika vergleichen zu können, wurden Reduktionsfaktoren errechnet. Dazu wurden aus den gemessenen Werten der mit den Antiseptika behandelten Biofilmen bzw. planktonischen Zellen die numerischen Mittelwerte und von diesen dann der dekadische Logarithmus gebildet. Mit den Werten der Neutralisationsmittel wurde gleichermaßen verfahren. Letztendlich wurde der logarithmierte Mittelwert der mit den Antiseptika behandelten Zellen von dem der Neutralisationsmittel subtrahiert.

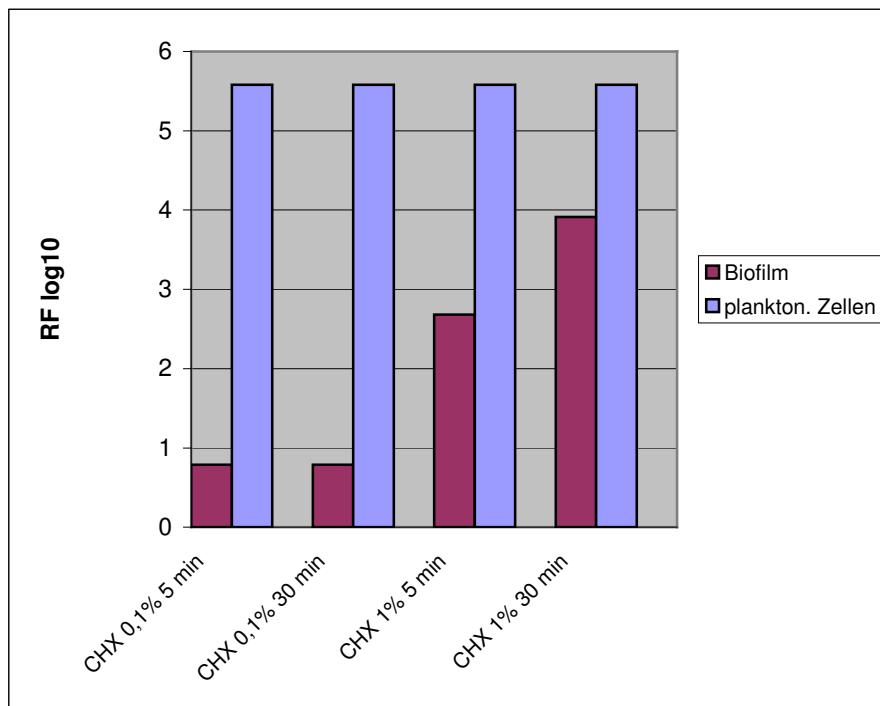
Da sich die Mittelwerte für die planktonischen Zellen aus jeweils beiden Versuchsansätzen zusammensetzen und bei beiden Einwirkzeiten von 5 min bzw. 30 min gleiche Ergebnisse vorliegen (vollständige Reduktion der Zellen), sind die Reduktionsfaktoren identisch.

Alle Messwerte gingen in die Berechnung ein, es sei denn, dass es sich offensichtlich um Fehleinschätzungen handelte.



Bei Chlorhexidindigluconat sind daher folgende Werte herausgefallen: In der Testreihe mit CHX 0,1% 5 min und in der mit CHX 1% 30 min (s.a. Tabelle 1) gab es bei den Biofilmzellen ein Messergebnis von „0“, d.h. es hätten demnach alle Zellen des Biofilms vernichtet worden sein müssen. Da aber auch bei höheren Konzentrationen von Chlorhexidindigluconat nicht immer alle Zellen abgetötet worden waren, sind die Werte nicht erklärbar.

Eine graphische Darstellung der Reduktionsfaktoren für das Antiseptikum Chlorhexidindigluconat zeigt Abbildung 4.

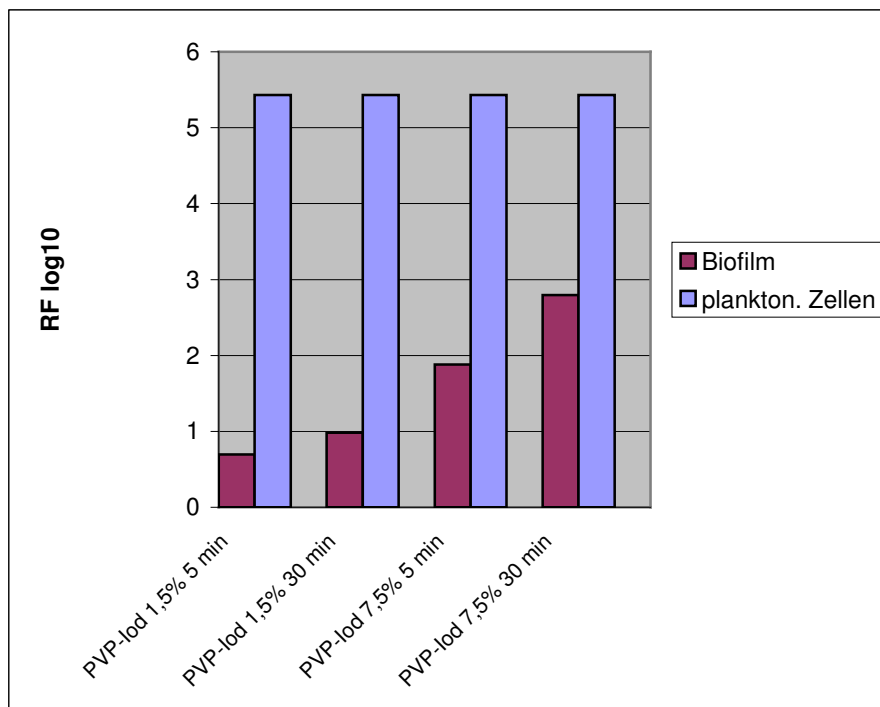


**Abbildung 4:** Darstellung der Wirkung von Chlorhexidindigluconat auf Biofilme und planktonische Zellen anhand der Reduktionsfaktoren

Für die 0,1%-ige Chlorhexidindigluconat-Lösung existieren fast identische Reduktionsfaktoren bei beiden Einwirkzeiten. Die Reduktion von weniger als 1 log-Stufe ist relativ gering. Eine mehr als doppelt so hohe Reduktion zeigt Chlorhexidindigluconat in 1%-iger Lösung. Hier spielt außerdem die Dauer der Einwirkung eine Rolle.

Das beste Ergebnis wurde bei 30 min erreicht. Es zeigt sich folglich eine deutliche Dosis-Zeit-Wirkungs-Beziehung: Mit steigender Konzentration des Antiseptikums steigt auch die Reduktion des Testorganismus. Eine verlängerte Einwirkzeit erhöht ebenfalls die Effizienz.

Signifikant schlechtere Ergebnisse als bei der Verwendung von Chlorhexidindigluconat lassen sich bei PVP-Iod finden (Abbildung 5).

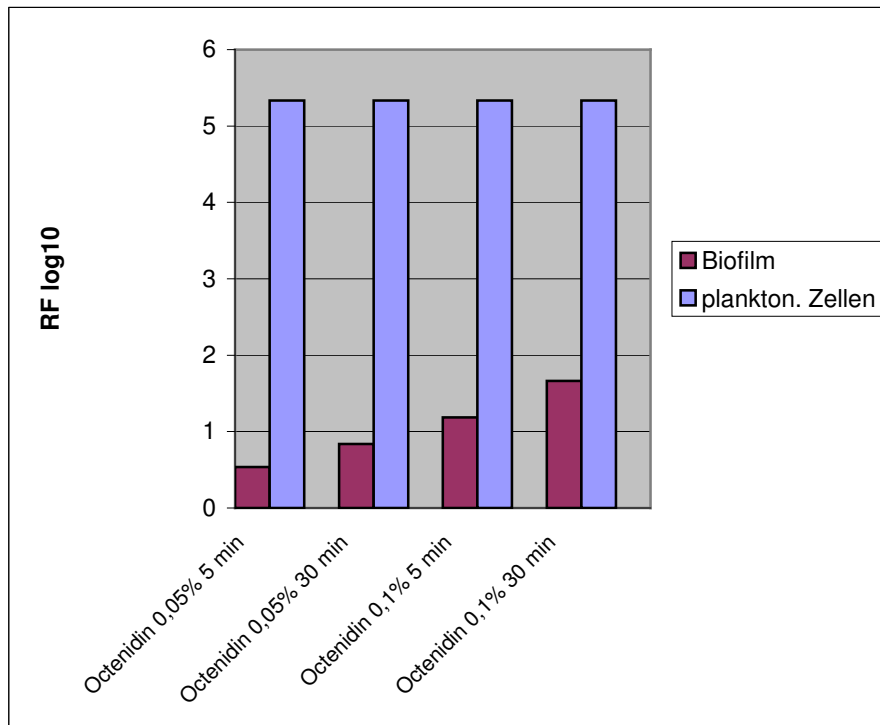


**Abbildung 5:** Darstellung der Wirksamkeit von PVP-Iod auf Biofilme und planktonische Zellen anhand der Reduktionsfaktoren

Die Reduktion von PVP-Iod 1,5% und 5 min Einwirkzeit lässt sich mit der von Chlorhexidindigluconat 0,1% bei 5 min und 30 min Einwirkzeit vergleichen. Bei der höchsten geprüften Konzentration und der längsten Einwirkzeit liegt die Reduktion von PVP-Iod aber fast genau 1 log-Stufe unter der von Chlorhexidindigluconat mit

vergleichbaren Parametern. Auch bei Verwendung von PVP-Iod lässt sich eine Dosis-Zeit-Wirkungs-Beziehung feststellen.

Mit Octenidin wurden die geringsten Reduktionsfaktoren ermittelt (Abbildung 6).



**Abbildung 6:** Darstellung der Wirksamkeit von Octenidin auf Biofilme und planktonische Zellen anhand der Reduktionsfaktoren

Bei einer Konzentration von 0,05% und der höchsten Einwirkzeit von 30 min wurden weniger als 90% der Biofilmzellen vernichtet. Die Konzentration von 0,1% führte zu einer Reduktion von nicht einmal 2 log-Stufen. Eine Dosis-Zeit-Wirkungs-Beziehung liegt hier aber ebenso vor wie bei den anderen beiden Antiseptika.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Chlorhexidindigluconat die beste Reduktionswirkung auf Biofilme hat, speziell in der höchsten angewendeten Konzentration von 1% und der höchsten

Einwirkzeit von 30 min. Die geringste Reduktion wurde durch Octenidin erreicht.

Alle Antiseptika konnten aber die planktonischen Zellen vollkommen eliminieren. Dabei sind sich die Reduktionsfaktoren sehr ähnlich. Bei einem Vergleich der antimikrobiellen Effizienz zwischen den Biofilm-Versuchen und den Versuchen mit planktonischen Zellen sind alle Unterschiede signifikant (s. Tabellen 1 – 3). Die Biofilmzellen werden auch bei Chlorhexidindigluconat in der Konzentration von 1% und der Einwirkzeit von 30 min signifikant weniger reduziert (3,91 log) als die planktonischen ( $\geq 5,58$  log).

Die Tabellen 1 bis 3 geben einen Überblick über die Effizienz der verwendeten Antiseptika gegen Biofilmzellen und planktonisch gelöste Bakterien. Es ist zu beachten, dass die Reduktion als arithmetisches Mittel mit der entsprechenden Standardabweichung dargestellt ist.

**Tabelle 1:** Antimikrobielle Effizienz von Chlorhexidin gegen *S. sanguis* als Biofilm und als planktonische Zellen

Konzentration	Wirkdauer	Reduktion der Bakterien in Biofilmformation		Reduktion der planktonischen Bakterien		Signifikanz <sup>+</sup>
		Anzahl der Werte	arithm. Mittel [lg] $\pm$ Standardabweichung	Anzahl der Werte	arithm. Mittel [lg]	
0,1%	5 min	5	0,97 ( $\pm 0,53$ )	4	$\geq 5,64$	$p < 0,05$
0,1%	30 min	6	1,14 ( $\pm 0,70$ )	n.e.*	n.e.*	n.e.*
1,0%	5 min	6	2,74 ( $\pm 0,28$ )	4	$\geq 5,51$	$p < 0,05$
1,0%	30 min	5	3,97 ( $\pm 0,25$ )	n.e.*	n.e.*	n.e.*

<sup>+</sup> Vergleich Biofilm/planktonisch

\* n.e. = nicht ermittelt

**Tabelle 2:** Antimikrobielle Effizienz von PVP-Iod gegen *S. sanguis* als Biofilm und als planktonische Zellen

Konzentration	Wirkdauer	Reduktion der Bakterien in Biofilmformation		Reduktion der planktonischen Bakterien		Signifikanz <sup>+</sup>
		Anzahl der Werte	arithm. Mittel [lg] ± Standardabweichung	Anzahl der Werte	arithm. Mittel [lg]	
1,5%	5 min	6	0,71 (± 0,33)	4	≥ 5,49	p < 0,05
1,5%	30 min	6	1,31 (± 0,73)	n.e.*	n.e.*	n.e.*
7,5%	5 min	6	2,22 (± 0,61)	4	≥ 5,36	p < 0,05
7,5%	30 min	6	2,85 (± 0,25)	n.e.*	n.e.*	n.e.*

<sup>+</sup> Vergleich Biofilm/planktonisch

\* n.e. = nicht ermittelt

**Tabelle 3:** Antimikrobielle Effizienz von Octenidin gegen *S. sanguis* als Biofilm und als planktonische Zellen

Konzentration	Wirkdauer	Reduktion der Bakterien in Biofilmformation		Reduktion der planktonischen Bakterien		Signifikanz <sup>+</sup>
		Anzahl der Werte	arithm. Mittel [lg] ± Standardabweichung	Anzahl der Werte	arithm. Mittel [lg]	
0,05%	5 min	6	0,55 (± 0,12)	4	≥ 5,39	p < 0,05
0,05%	30 min	6	0,87 (± 0,19)	n.e.*	n.e.*	n.e.*
0,1%	5 min	6	1,55 (± 0,72)	4	≥ 5,26	p < 0,05
0,1%	30 min	6	1,93 (± 0,50)	n.e.*	n.e.*	n.e.*

<sup>+</sup> Vergleich Biofilm/planktonisch

\* n.e. = nicht ermittelt