Aus dem Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität zu Köln

Interdisziplinäre Poliklinik für Orale Chirurgie und Implantologie

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. med. dent. J.E. Zöller

Vergleichende In-vitro-Studie zur bakteriziden und fungiziden Wirkung von verschiedenen Dekontaminationsmitteln

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der

zahnärztlichen Doktorwürde

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Sandra Stolz

aus Halle a. d. Saale

promoviert am

16. November 2011

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Ziel der Arbeit 4

2 Literaturübersicht 7

2.1 Bakterien 7

2.1.1 Escherichia coli 13

2.1.2 Staphylococcus aureus 16

2.2 Pilze 18

2.2.1 Candida albicans 20

2.3 Desinfektion 22

2.3.1 Wirkmechanismus von Desinfektion 24

2.3.2 Anforderungen an Desinfektionsmittel 24

2.3.3 Desinfektionsmittel 25

2.3.4 Desinfektions-und Sterilisationsmethoden 26

2.4 Ozon 28

2.4.1 Molekül und Entstehung 28

2.4.2 Ozon als Oxidationsmittel 30

2.4.3 Ozonwirkung auf Mikroorganismen 31

2.4.4 Ozongerät „Prozone“ 32

2.5 Chlorhexidin 35

2.5.1 Das Molekül 35

2.5.2 Wirkung und Einsatzgebiet von Chlorhexidin 36

2.6 antimikrobielle Photodynamische Therapie 38

2.6.1 Anwendung und Wirkmechanismus 38

3 Material und Methoden 41
3.1 Ziel der Versuchsdurchführungen 41
3.2 Aufbau der Versuchsreihen 41
3.2.1 Qualitative Bestimmung 41
3.2.2 Quantitative Bestimmung 44
3.2.2.1 unterschiedliche Ozonbegasungszeiten 46
3.2.2.2 unterschiedliche Desinfektionsmethoden und –mittel 47

4 Ergebnisse 48
4.1 Qualitative Ergebnisse 48
4.1.1 Wirksamkeit von Desinfektionsmethoden und Materialien 48
4.1.1.1 Ozon 48
4.1.1.2 Chlorhexidin 49
4.1.1.3 antimikrobielle Photodynamische Therapie 49
4.2 Quantitative Ergebnisse 51
4.2.1 Wirksamkeit von unterschiedlichen Ozonbegasungszeiten 51
4.2.1.1 Escherichia coli 51
4.2.1.2 Staphylococcus aureus 53
4.2.1.3 Candida albicans 56
4.2.2 Wirksamkeit von Desinfektionsmethoden und Materialien 58
4.2.2.1 Escherichia coli 58
4.2.2.2 Staphylococcus aureus 61
4.2.2.3 Candida albicans 63
4.2.3 Vergleich der unterschiedlichen Ozonbegasungszeiten 66
4.2.4 Vergleich mit 1%igem Chlorhexidin 68
4.2.5 antimikrobielle Photodynamische Therapie im Vergleich 70

5 Diskussion 72
5.1 Kritische Betrachtung der qualitativen Versuche 72
5.2 Kritische Betrachtung der quantitativen Versuche 73
5.3 Materialien und Methoden mit Blick auf verschiedene Erkrankungen 76
5.3.1 Parodontitis 76
5.3.2 Periimplantitis 79
5.3.3 Chirurgische Eingriffe 81
5.3.4 Karies 82
5.3.5 Endodontie 83
5.3.6 Mundschleimhauterkrankungen 84

6 Schlussfolgerung 85

7 Zusammenfassung 87

8 Literaturverzeichnis 88

9 Lebenslauf 104

1 Einleitung und Ziel der Arbeit

Orale Gesundheit bedeutet ein Gleichgewicht des bakteriellen Mundmilieus. Dieses physiologische Gleichgewicht ist wichtig für gesunde Zähne, einen gesunden Zahnhalteapparat und gesunde Mundschleimhaut. Auf Grund der ästhetischen Ansprüche in der heutigen Zeit nimmt die Insertion von Implantaten und die damit verbundenen chirurgischen Eingriffe immer mehr zu. Folglich sind invasive Eingriffe in das bestehende Mikromilieu unvermeidbar, diese können auch zu einem Ungleichgewicht zu Gunsten der pathogenen Mikroorganismen führen. Fast alle oralen Infektionen sind auf eine Verschiebung des physiologisch bakteriellen Gleichgewichts hin zu einem pathogen mikrobiologischen Milieu zurückzuführen. Dabei wirken die pathogenen Mikroorganismen zu meist toxisch auf die Epithelzellen und die orale Schleimhaut. Das Immunsystem ist bei einem pathologischen Ungleichgewicht nicht immer in der Lage, die oralen Infektionen ohne äußere Einflussnahme zu beherrschen [55], [68], [112].

Um bakterielle Infektionen und die damit verbundenen Erkrankungen zu behandeln und eventuellen Folgeerscheinungen und Schwierigkeiten vorzubeugen, gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten. Zumeist werden Antibiotikatherapien angewendet, die lediglich systemisch wirken und häufig ohne Antibiogramm verordnet werden. Die Zahl der Antibiotikaresistenzen steigt [123] und die lokale Wirkung ist nur gering. Bei lokaler Antibiotikatherapie ist auf Grund der geringen Dosierung wenig Erfolg zu verzeichnen und allergische Reizungen werden immer häufiger. Die Wirkung von Antibiotika gegen Bakterien, die organisiert innerhalb eines Biofilms zusammen leben, wie es fast immer auf oralen Oberflächen der Fall ist, ist nachweislich geringer als bisher angenommen [19], [81], [84], [87].

Alternativen zur Behandlung bakterieller Infektionen sind die unterschiedlichsten Desinfektionsmaßnahmen. Auf diesem Gebiet gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten, die zur Verfügung stehen, und die Industrie entwickelt weiter zahlreiche neue Methoden, Materialien und Präparate. Das bekannteste und bisher bewährteste orale Desinfektionsmittel in der Zahnmedizin ist Chlorhexidindigluconat, kurz CHX genannt.

Es gibt Chlorhexidin in den unterschiedlichsten Konzentrationen und Konsistenzen. Es ist nachweislich bakterizid, viruzid und fungizid und wird erfolgreich als Antiseptikum in der Parodontologie, Endodontologie und Chirurgie eingesetzt [7], [28], [34], [121].

Andere chemisch wirksame Desinfektionsmittel wie Wasserstoffperoxid, Alkohol, Jod und Chlorid werden auch weiterhin in der Zahnmedizin eingesetzt. Neuere Desinfektionsmethoden und –mittel, wie zum Beispiel die Ozonbehandlung oder die photodynamische Therapie finden immer mehr Anwendung in der oralen Desinfektion. Unterschiedlichste Firmen konzentrieren sich auf die Weiterentwicklung dieser alternativen Methoden und Präparate.

Ozon wurde bereits im ersten Weltkrieg zur Wundheilung eingesetzt und wurde schon Anfang des letzten Jahrhunderts in zahlreichen Publikationen als wirksames Desinfektionsmittel beschrieben. Es findet heute vermehrt Anwendung in der Dermatologie zur Behandlung von chronischen, eitrigen Wunden und Ulceri [79], sowie bei der Eigenblutbehandlung. In den letzten Jahrzehnten hält Ozon wieder vermehrt Einzug in die Zahnmedizin und wird dort zur Oberflächendesinfektion von kariösen Läsionen und entzündlichen Schleimhautveränderungen verwendet und bietet in endodontischen, parodontologischen und chirurgischen Behandlungen neue Möglichkeiten [3], [62], [66].

Mit der photodynamischen Therapie wird in der Onkologie, Augenheilkunde und Dermatologie gearbeitet. Da dieses Verfahren gering invasiv angewendet werden kann und wenige bis gar keine Nebenwirkungen hat, bietet es zahlreiche Einsatzmöglichkeiten. Dieses Therapieverfahren wird auch in jüngerer Zeit immer mehr in der Zahnmedizin, vor allem in der Chirurgie, erfolgreich eingesetzt. Es ist eine Alternative zur Antibiotikatherapie und hat nachweislich positiven Einfluss auf die Wundheilung [16], [31], [92].

Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Effektivität der Ozonbehandlung gegen drei verschiedene pathogene Mikroorganismen, die stellvertretend für eine Vielzahl oraler pathogener Keime stehen, zu prüfen. Die Wirkung des Ozons gegen die drei ausgewählten pathogenen Mikroorganismen wird mit dem bereits bekannten und in der Zahnmedizin bewerten 1%igem Chlorhexidindigluconat verglichen. Da die antimikrobielle Photodynamische Therapie immer mehr Anwendung in den unterschiedlichen zahnmedizinischen Bereichen findet, wird auch diese desinfizierende Wirkung in die Vergleiche mit einbezogen.

2 Literaturübersicht

2.1 Bakterien

Der Begriff Bakterium stammt vom griechischen Wort bacterion – „Stäbchen“ und wird in der Medizin für mikroskopisch kleine, zumeist einzellige Organismen verwendet. Bakterien gehören zu den Prokaryoten, da sie keinen echten Zellkern besitzen. Die DNA von Prokaryoten liegt im sogenannten Nucleoid, einem Kernäquivalent, zusammengefaltet im Cytoplasma. Bei den Eukaryoten liegt die DNA in einem durch Doppelmembranen abgetrennten Zellkern [51].

Bereits 1675 beobachtete Antonio van Leeuwenhoek, mit seinem eigens gebauten Mikroskop, Protozoen und Bakterien im Wasser und Speichel. 1683 entdeckte er in seinem eigenen Zahnbelag Bakterien und anschließend auch bei Kontrollpersonen. Insgesamt beschrieb er drei beobachtete Formen: Bazillen, Spirillen und Kokken [25], [26], [50], [100].

Bazillen, lateinisch bacillus – „Stäbchen“, sind stäbchenförmige, grampositive und meistens bewegliche Bakterien, von denen einige auch pathogen sind. Sie bilden Endosporen und haben ein fakultativ anaerobes Wachstum. Spirillen sind große starre wendelförmige Bakterien, die gramnegativ und mikroaerophil sind. Kokken, sogenannte Kugelbakterien sind nach dem griechischen Wort kokkus – „Kern“/ „Beere“ benannt, da sie meistens eine runde Form haben. Es gibt verschiedene Arten von Kokken, bekannte Vertreter sind die Streptokokken – „Kettenkokken“ und Staphylokokken – „Haufenkokken“. Die unterschiedlichen Kokkenarten entstehen auf Grund der verschiedenen unzureichenden Trennungen nach der Zellteilung. Streptokokken sind grampositive aerotolerante Anaerobier, die in Kettenform vorliegen. Vertreter dieser Bakterienart sind zum Beispiel Streptococcus mutans und Streptococcus pneumoniae [51]. Staphylokokken sind nicht sporenbildende grampositive unbewegliche Bakterien, die wie Weintraubenreben angeordnet sind (Abb. 8 und 10). Die meisten Staphylokokken haben eine stabile Zellmembran auf Grund der verzweigten Fettsäureketten in ihren Membranlipiden (Abb. 7) und werden

nach koagulasepositiven–pathogen und koagulasenegativen–apathogenen Bakterien eingeteilt. Der Staphylococcus aureus ist das Bakterium mit der höchsten pathogenen Potenz und ist ein bedeutsamer Krankheitserreger für den Menschen [54].

Trotz einer Vielzahl von bereits bekannten Bakterien ist vermutlich die Mehrzahl der existenten Bakterien noch nicht entdeckt oder näher beschrieben nach dem Stand von 2006. Alle bekannten Bakterien besitzen eine Cytoplasmamembran, Cytoplasma, Nucleoid und Ribosomen. Die Bakterien–DNA, das sogenannte Bakterienchromosom, liegt stark zusammengefaltet als Nukleoid frei im Cytoplasma vor. Kleinere DNA Stränge, die ebenfalls in der Zelle vorkommen können, nennt man Plasmide. Diese können wie das Bakterienchromosom vervielfältig werden und geben bei Zellteilungen ihre Informationen weiter. Nicht alle Bakterien besitzen eine Zellmembran. Die Zellmembran von gramnegativen Bakterien ist dünn und besitzt außerhalb der Zellwand eine Biomembran, die sogenannte äußere Membran. Die Zellmembran der grampositiven Bakterien ist dick auf Grund ihrer verzweigten Fettsäureketten in den Membranlipiden. Bakterien können unterschiedliche Oberflächengestaltungen haben, wie zum Beispiel Geißel oder Pili, die zur Fortbewegung dienen oder sie sind von einer Glykokalix umgeben, die unterschiedlichster Zusammensetzung sein kann. Einige Bakterien enthalten unterschiedlich viele Plasmide und andere wiederum, je nach äußeren Umständen, verschiedene Gasvesikel (Abb. 7) [74].

Die Lebensweisen und Stoffwechselvorgänge sind genau so vielfältig, wie es unzählige Bakterien gibt. Man unterscheidet Aerobier, die sauerstoffliebend sind, von obligaten Anaerobier, die beim Kontakt mit Sauerstoff gehemmt oder sogar abgetötet werden. Zwischen diesen Einteilungen stehen fakultative Anaerobier, die nur eine bestimmte Menge Sauerstoff vertragen, bzw. tolerieren. Die meisten Bakterien sind chemotroph, das bedeutet, sie gewinnen ihrer Energie aus der chemischen Verstoffwechselung von Stoffen. Die meisten chemotrophen Bakterien sind gleichzeitig wiederum heterotroph, sie beziehen ihre Hauptenergie aus der Synthese organischer Verbindungen und nur zu einem geringeren Anteil aus dem Sonnenlicht. Die asexuelle Vermehrung der Bakterien gelingt durch Zellteilung, somit entstehen auf Grund der identischen Genome sogenannte Klone (Abb. 1) [51].

Abb. 1: Kolonien bildende Einheiten der Escherichia coli auf Blutagarplatte

Für den Menschen ist die bakterielle Flora nützlich und schützt ihn vor Umwelteinflüssen. Schätzungsweise befinden sich im Mund des Menschen 10^{10} Bakterien, die das Immunsystem unterstützen, indem sie Krankheitserreger abwehren. Auf der Körperoberfläche befinden sich etwa 100mal mehr Bakterien, die sich in unterschiedlichen Bereichen unterschiedlich viel ansammeln. So sind in feucht warmen Nischen deutlich mehr Bakterien vorhanden, als auf der trockenen Hautoberfläche. Doch die meisten Bakterien befinden sich im Darm und da vor allem im Dickdarm. Die für den Menschen nützlichen Bakterien leben mit ihm in einer Symbiose, dem sogenannten Mutualismus. Viele Bakterien besiedeln die menschlichen Oberflächen ohne negativen Einfluss auf den Menschen, sie nutzen lediglich den Wirt für ihr eigenes Überleben [74]. Nehmen solche Populationen überhand oder siedeln sich sogar pathogene Bakterien an, führt dies zu Krankheiten [54]. Bis heute wird, zumeist wirksam, Antibiotika gegen bakterielle Infektionen eingesetzt. Die unterschiedlichsten Antibiotika wirken auf verschiedene Weise auf die Vielzahl der Bakterien. Grob unterteilt man die Wirkweise der Antibiotika in bakteriostatische Wirkung, die Bakterien werden an der Vermehrung gehindert, aber nicht abgetötet. Die bakterizide Wirkung tötet die Bakterien und die bakteriolytische Wirkung zielt auf die Auflösung der Zellmembran ab, wodurch es schlussendlich auch zum Bakteriensterben kommt. Durch Mutationen bei den Bakterien kommt es zu immer mehr Resistenzbildungen gegen Antibiotika. Darum sind die Desinfektion und Sterilisation zur Vermeidung von bakteriellen Infektionen unabdingbar [11], [93].

Die unterschiedlichsten Bakterien leben meistens innerhalb eines Biofilms zusammen. Biofilme bezeichnet man auch als die Urform des Lebens und da sich Biofilme über Milliarden von Jahren bewährt haben, sind sie weit verbreitet [55]. Im Alltag erkennt man den Biofilm als sogenannte „Schleimschicht“, am Zahn wird der Biofilm umgangssprachlich als Plaque bezeichnet. Auf einer wasserbenetzten festen Oberfläche wie zum Beispiel dem Zahn, der Zahnwurzel oder Implantaten bildet sich eine organische Schicht. Diese dient der Anhaftung von Mikroorganismen. Das bezeichnet man als Induktionsphase. Während der Akkumulationsphase lagern sich immer mehr Bakterien an der Oberfläche an. Zunächst bildet sich ein flächiger Biofilm, der dann auf Grund von Zellteilung und weiteren Anlagerungen in der Breite, also dreidimensional wächst (Abb. 2). Auf Grund eines interzellulären Kommunikations-systems funktioniert das Miteinander der unterschiedlichsten Mikroorganismen in einem gemeinsam organisierten Biofilm [27].

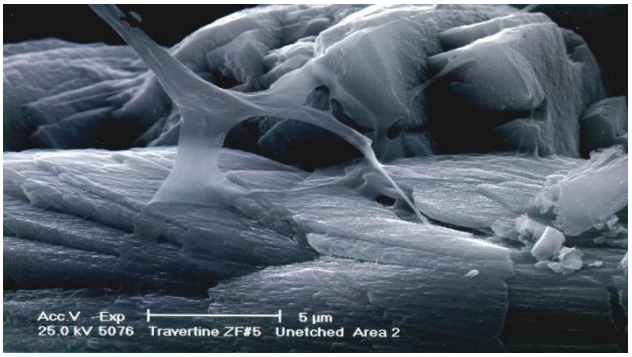

Abb. 2: Biofilm [36]

Die Existenzphase beschreibt das Gleichgewicht von Auf- und Abbau der Mikroorganismen in diesem System. Der Biofilm weist ein gewisses Breitenwachstum auf mit verschiedenen Schichten, die unterschiedlichste Lebensbedingungen bieten. Die verschiedenen Bakterien organisieren sich ihren Eigenschaften nach in den unterschiedlichen Schichten [135]. So sind Anaerobier nahe der sauerstoffarmen festen Oberfläche vermehrt vorhanden und Aerobier siedeln sich an der sauerstoffreichen Außenfläche des Biofilms an. Der organisierte Biofilm bietet den Bakterien Schutz vor äußeren Einflüssen, so können zum Beispiel Bakterizide nicht durch den kompletten Biofilm diffundieren. UV- und Röntgenstrahlung gelangen nicht

bis zur festen Oberfläche und die Toleranz der Bakterien gegenüber Substratmangel oder sinkendem pH-Wert wird größer. Kommt es dennoch zu größerem Bakteriensterben, können sogenannte „Persister“ auf Grund der für sie ausreichenden Lebensbedingungen überleben und sich zu einem späteren Zeitpunkt weiter vermehren [81], [82], [83], [84].

Abb. 3: Escherichia coli auf Blutagarplatte

Man muss in der Medizin apathogene und pathogene Biofilme voneinander unterscheiden. Die Darm-, Mund- und Hautflora sind wichtig für das Immunsystem des Manschens. Kommt es bei diesen apathogenen Biofilmen zu Störungen oder zum Ungleichgewicht, fehlt der natürliche Schutz und es können Krankheiten auftreten. Der Wirt und die Bakterien des Biofilms leben in einer Symbiose zusammen, dem sogenannten Mutualismus. Die Bakterien helfen in den frühen Kinderjahren bei der Entwicklung des Immunsystems, die Darmflora unterstützt die Verdauung und die Mundflora hält krankheitserregende Bakterien fern [74]. Die interspezifische Wechselwirkung zwischen verschiedenen Bakterien und dem Menschen nennt man auch Kommensale, lediglich die Bakterien profitieren bei dieser Verbindung zum Menschen ohne nachhaltige Schädigungen oder Einschränkungen des Wirts. Kommt es aus den unterschiedlichsten Gründen zu einem Populationsungleichgewicht auf Seiten der Bakterien, führt diese Art der Probiose zu Krankheiten [54]. Bei mehr als 60% der Infektionskrankheiten schützen sich die beteiligten Bakterien vor dem Immunsystem und den Bakteriziden, in dem sie sich in Biofilmen organisieren [53], [112]. Man hat herausgefunden, dass Bakterien, die in einem organisierten Biofilm leben, oft einen reduzierten Stoffwechsel haben. Sie können sich ganz in einen Ruhezustand versetzen, in dem sie durch „Nichtstun“ in schweren Zeiten überleben,

dem VBNC – „viable but not culturable“ [23]. Auf Bakterien, die einen reduzierten Stoffwechsel betreiben oder sogar ganz im Ruhestadium verweilen, wirken die bekannten Bakterizide oder Antibiotika nicht oder nur eingeschränkt [38], [112], [117]. Somit können pathogene Bakterien überleben und chronische, persistierende, bakterielle Infektionen treten auf. Wundinfektionen [68], Endokarditis, Parodontitis, Zahnkaries und Mittelohrentzündungen bei Kindern werden mit bakteriellen Biofilmen in Verbindung gebracht [4], [39], [87]. Bei fremdkörper-assoziierten Infektionen, wie es bei Zahnimplantaten vorkommen kann, fällt auf, dass Bakterien, wie der Staphylococcus aureus und Escherichia coli, eine besonders hohe Affinität zu Oberflächen von Biomaterialien haben. Die Kontamination von Zahnimplantaten mit organisierten Biofilmen in der Mundhöhle ist nicht zu vermeiden. Auf Grund der bereits oben beschriebenen eingeschränkten Wirkung von Antibiotika und bakteriziden Desinfektionsmitteln auf organisierte Biofilme [118], bleibt bei chronischen Entzündungen oft nur noch die Entfernung der Implantate. Damit es nicht zur chronischen Entzündung kommt, setzt man auf vorbeugende Maßnahmen, die die pathogene Biofilmbildung verhindern sollen. Zuerst führt man die mechanische Zerstörung des Biofilms durch [41] und reduziert die Zufuhr der organischen Nährstoffe, um den Bakterien die Lebensgrundlagen zu entziehen. Die verbleibenden Bakterien können sich anschließend nicht so schnell in neuen Biofilmen organisieren und verlieren somit auch einen gewissen Schutz. Da sich diese Bakterien im aktiven Zustand befinden, also Stoffwechsel betreiben, können Antibiotika und bakterizide Desinfektionsmittel gegen sie wirken [56], [117]. Die mechanisch gereinigten Oberflächen können anschließend mit antiseptischen Mitteln wie Wasserstoffperoxid, Ozon, Chlorhexidin oder antibiotischen Mitteln bestrichen oder begast werden, um die verbliebenen Bakterien noch weiter zu reduzieren [62], [66], [99], [105]. Die Oberflächenkontamination wird immer wieder erfolgen und ist unvermeidbar. Daher sind die regelmäßige mechanische Reinigung und die antiseptische Desinfektion unerlässlich. Die Bakterienbesiedlung soll so stets reduziert und die Biofilmbildung auf ein apathogenes Minimum begrenzt werden, um bakteriellen Infektionen vorzubeugen [27], [41], [48].

Für die praktischen Versuchsdurchführungen, wie Chlorhexidin und die antimikrobielle Photodynamische Therapie (aPDT) im Vergleich zu Ozon auf Mikroorganismen wirken, wurden zwei Vertreter der Bakterien, der Escherichia coli und der Staphylococcus aureus verwendet. Als Vertreter der Pilze wurde Candida albicans ausgewählt. Diese Bakterien und dieser Pilz lassen sich schnell und einfach kultivieren und sind bereits sehr gut untersucht.

2.1.1 Escherichia coli

Escherichia coli, abgekürzt E. coli, gehört zu den Enterobakterien und wurde 1919 nach seinem Entdecker Theodor Escherich benannt. Es ist ein säurebildendes, gramnegatives, Oxidase – negatives, begeißeltes Bakterium, welches im menschlichen Darm vorkommt (Abb. 4 und 5) [51]. Es gehört zu den Bakterien, die am besten untersucht sind. Das Bakterium ernährt sich hauptsächlich von Zucker und ist auf Grund seiner fakultativ anaeroben Eigenschaft in der Lage durch Atmung und durch gemischte Säuregärung Energie zu gewinnen. Ist nicht genügend Sauerstoff für die Energiegewinnung durch Atmung vorhanden, kann das Bakterium Zucker unter anoxischer Bedingung zur Energiegewinnung verarbeiten. Im Darm führt der Escherichia coli zur vermehrten Produktion von sekretorischem Immunglobulin A, welches als Antigen wichtig für das Immunsystem ist. Des Weiteren produziert das Bakterium das fettlösliche Vitamin K, das zum einen für die Fettlöslichkeit im Darm zuständig und zum anderen ein wichtiger Bestandteil der Blutgerinnungskaskade ist [54], [74]. Auf Grund der vielen gleichmäßig auf der Oberfläche verteilten Flagellen ist der Escherichia coli in der Lage, sich aktiv zu bewegen [51].

Abb. 4: Escherichia coli mit Flagellen (Kaulitzki)

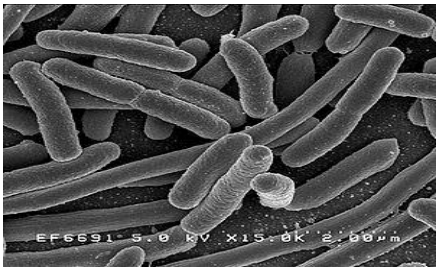

Abb. 5: Escherichia coli im Elektronenmikroskop [36]

Die zahlreichen Rezeptormoleküle auf der Bakterienoberfläche ermöglichen aktive Bewegung hin zu Nahrungsquellen und weg von hohen Säurekonzentrationen, die dem Bakterium schaden könnten. Die Eigenschaft gramnegativ beschreibt die Möglichkeit, durch die Gramfärbung die unterschiedlichen Bakterien anhand ihrer chemischen und physikalischen Zellwandbeschaffenheit schnell zu unterscheiden. Die Zellwand der gramnegativen Bakterien besteht aus einer dünnen einschichtigen Mureinhülle. Für den Escherichia coli bedeutet dies lediglich, dass die Zellwand erst bei der weiterführenden Fuchsin Färbung rosa eingefärbt werden kann (Abb. 6) [51], [74].

Abb. 6: Escherichia coli gramnegativ [36]

Das Bakterium Escherichia coli ist Oxidase–negativ, es fehlt ihm das Enzym Cytochrom c Oxidase in der Atmungskette und dient lediglich der näheren Klassifizierung [51]. Der Escherichia coli ist fakultativ pathogen, das bedeutet im menschlichen Darm ist eine bestimmte Anzahl dieser Bakterien nützlich und damit ein sehr wichtiger Bestandteil der natürlichen Darmflora. Jedoch an anderen Stellen des Körpers führt der Escherichia coli zu bakteriellen Entzündungen. So zum Beispiel kann er Blasenentzündungen oder Bauchfellentzündungen verursachen. Bei einer infektiösen Übertragung während der Geburt führt das Bakterium zur Hirnhautentzündung des Neugeborenen [54]. In der Biotechnologie werden gentechnisch veränderte Escherichia coli zur industriellen Herstellung von Insulinpräparaten genutzt. Auf diese Weise hergestellte Arzneimittel haben kein allergenes Potential, da Escherichia coli ein im menschlichen Darm natürlich vorkommendes Bakterium ist [74], [80].

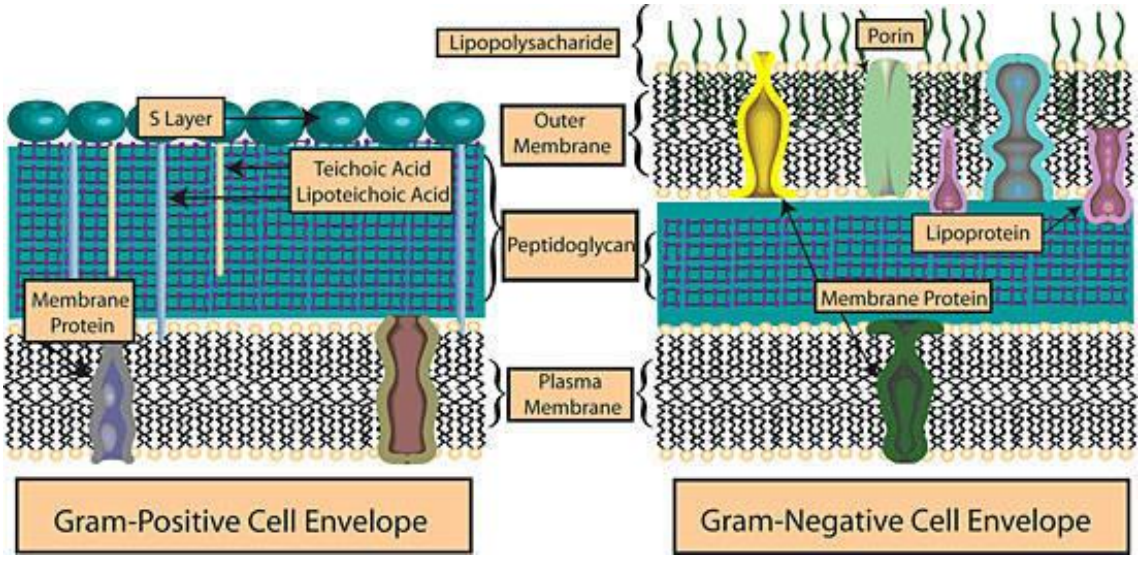

Abb. 7: schematische Darstellung grampositiver und -negativer Bakterienmembranen [36]

2.1.2 Staphylococcus aureus

Der Staphylococcus aureus ist ein unbewegliches, koagulasepositives, kugelförmiges Bakterium, welches sich auf Grund unzureichender Trennungen nach den Zellteilungen zu rebenähnlichen Gebilden formt, den sogenannten Haufenkokken (Abb.8).

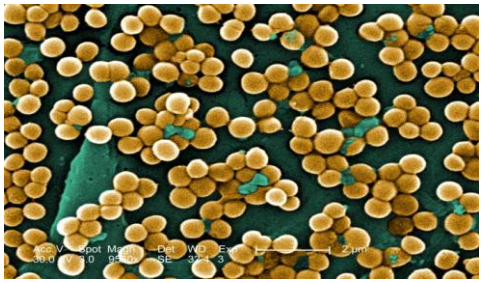

Abb. 8: Staphylococcus aureus [36]

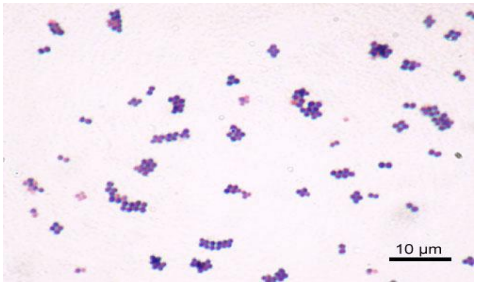

Abb. 9: grampositive Färbung [36]

Die Zellwand dieses Bakteriums färbt sich durch die Gramfärbung lilablau und zählt somit zu den grampositiven Bakterien (Abb. 9). Die Zellwand grampositiver Bakterien ist deutlich dicker als die der gramnegativen Bakterien. Eine dickere mehrschichtige Mureinhülle, Peptidoglycane, umgibt grampositive Bakterien und in den Peptidoglycanen kovalent verankert sind bis zu 40% Teichonsäuren, die der Zellwand zusätzliche Stabilität geben (Abb. 7). Gramnegative Bakterien sind lediglich von einer einschichtigen Mureinschicht umgeben (Abb. 7) [51]. Die schnelle mikrobiologische Unterscheidung durch die Gramfärbung ermöglicht bei bakteriellen Infektionen innerhalb von Minuten eine gezieltere antibiotische Behandlung, da Antibiotika auf grampositive Bakterien anders wirken als auf gramnegative. Als asymptomatischer Kolonisationskeim kommt der Staphylococcus aureus fast überall in der Natur und auf der Haut des Menschen vor. Bei bis zu 30% der Menschen befindet sich dieses Bakterium in den oberen Atemwegen, ohne krankheitserregend zu sein. Ist das Immunsystem geschwächt oder haben sich Lebensbedingungen geändert, kann das Bakterium sich auf Grund günstiger Einflüsse ausbreitet und Infektionskrankheiten auslösen. Der Staphylococcus aureus zählt zu den pathogensten Mikroorganismen für den Menschen. Dieses Bakterium kann verantwortlich sein für Hautinfektionen oder für lebensbedrohliche Infektionen, wie Lungenentzündung, Endokarditis oder Sepsis [74].

Die hohe Pathogenität des Staphylococcus aureus ist zum einen, auf seine Polysaccharidkapsel mit dem darin enthaltenen Protein A zurückzuführen. Dieses Protein A schützt das Bakterium beim Eintritt in den Körper vor dem Immunsystem. Es bindet sich an der Fc Stelle der körpereigenen Antikörper und ist somit für die Makrophagen als Fremdkörper nicht erkennbar. Es wird von den Makrophagen nicht aufgenommen und phagozitiert. Ein anderer Pathogenitätsfaktor ist die Koagulaseproduktion des Staphylococcus aureus. Es ist in der Lage mit Hilfe des eigenen Clumping-Faktors A eine wirtseigene Proteinschutzschicht um sich zu bilden. Das bedeutet die bakterielle Koagulase ist ein Aktivator des Prothrombins, welches Thrombin aktiviert und somit Fibrinogen zu Fibrin werden lässt. Der Clumping-Faktor A ist ein bakterielles Protein an der Oberfläche des Staphylococcus aureus, das zusätzlich noch Fibrinogenmoleküle an sich binden kann und aktiviert. Es kommt zur Verklumpung des Blutplasmas um das Bakterium herum. Damit ist das Bakterium gänzlich „unsichtbar“ für das menschliche Immunsystem und kann sich in Ruhe vermehren. Erst wenn sich das Bakterium zahlreich vermehrt hat, löst es selber die Fibrinschutzschicht auf. Es beginnt mit der Lyse des interzellulären Bindegewebes und der Parenchymzellen und dringt somit aktiv in den Wirtsorganismus vor. Auf Grund der Zellauflösung entstehen oberflächliche pyogene Infektionen, wie Furunkel und Karbunkel. Die tiefer liegende Infektionen, wie Osteomyelitis, Pneumonie, Endokarditis, Abszesse, Empyeme und Sepsis haben eine hohe Letalitätsrate [36], [74]. Der Staphylococcus aureus ist ein Krankenhauskeim. MRSA, Methicillin-resistenter-Staphylococcus-aureus, ist ein Sammelbegriff für die Staphylococcus aureus Stämme, die Resistenzen gegen gängige Antibiotika gebildet haben. So wirken zum Beispiel alle Beta-Lactam-Antibiotika, zu denen die Penicilline gehören, nicht mehr gegen diese Bakterienstämme. Auch Chinolone, Tetracycline, Erythromycin und Sulfonamine sind zumeist wirkungslos gegen MRSA. Mittlerweile gibt es sogar gegen Vancomycin und andere Glykopeptid-Antibiotika Resistenzbildungen, die unter dem Sammelbegriff VRSA zusammengefasst werden. Auch nicht resistente Staphylococcus aureus Stämme sind manchmal schwer mit Antibiotika zu bekämpfen, da sie sich während einer Antibiotikatherapie in den Wirtszellen verstecken und ihren Stoffwechsel solange herunterfahren, bis die Antibiotikatherapie beendet ist, um dann ihren Stoffwechsel wieder aufzunehmen [54].

Abb. 10: Staphylococcus aureus in 50.000facher Vergrößerung [36]

2.2 Pilze

Die Pilze, lateinischer Begriff fungi, gehören weder zu den Tieren noch zu den Pflanzen, sie bilden ein eigenständiges Reich der Eukaryonten. Pilze wurden lange Zeit dem Pflanzenreich zugeordnet, bis man feststellte, dass sie ihre benötigte Energie nicht aus dem Sonnenlicht durch Photosynthese bezogen. Es fehlt ihnen dafür das nötige Chlorophyll. Sie sind heterothroph wie Tiere, das heißt, sie ernähren sich von organischen Verbindungen und gewinnen den für sie wichtigen Kohlenstoff aus der Synthese dieser Nährstoffe. Die Ähnlichkeit zu den Tieren zeigt sich auch in der Art, wie Pilze Kohlenhydrate speichern, es wird Glykogen gebildet. Pflanzen hingegen speichern Kohlenhydrate in Form von Stärke. Auf zellulärer Ebene ähneln sich Pilze und Pflanzen nur im Vorhandensein von Zellwänden. Tierische Zellen besitzen keine Zellwände um die Plasmamembran. Die Zellwände der meisten Pilze werden aus Chitin gebildet, was wiederum nur im Tierreich vorkommt. Sie zählen zu den eukaryotischen Lebewesen, deren Zellen einen echten Zellkern, Nukleus, enthalten. Des Weiteren besitzen die Zellen der Pilze ein Zytoskelett, welches außerordentlich flexibel ist und nicht nur der Stabilität, sondern auch der Signalübertragung dient. Die in den Zellen enthaltenen Mitochondrien stellen als sogenannte „Energiekraftwerke der Zellen“ das energiereiche Adenosintriphosphat, kurz ATP, zur Verfügung. Einzellige Pilze, wie die Hefe, vermehren sich zu meist asexuell durch Sprossung, Zellteilung oder Sporenbildung. Mehrzellige Pilze, wie die Mycelpilze, besiedeln lebendes oder abgestorbenes Gewebe, verbreiten sich im Erdboden, im Holz oder auf anderen festen Materialien. Sie bilden ein großes dicht verzweigtes Netz aus mikroskopisch kleinen Fäden, die Hyphen genannt werden. Das Gesamtgeflecht, das mehrere Quadratkilometer groß und sehr alt werden kann, nennt man Mycel. Die Form der

Hyphen kann sehr unterschiedlich und spezialisiert sein. Zum Beispiel stülpen sich die Hyphen pflanzenparasitärer Pilze in die pflanzlichen Zellen und leben von den entzogenen pflanzlichen Nährstoffen. Fleischfressende, carnivore Pilze können aus ihren Hyphen Schlingfallen bilden, in denen die Beute gefangen wird. Der pilzspezifische Fruchtkörper, der makroskopisch sichtbar ist, besteht aus verzweigten Hyphen und stellt nur einen kleinen Teil des Gesamtgebildes dar. Die Fruchtkörper dienen hauptsächlich der Sporenbildung und ihrer Verbreitung zum Wachstum des Pilzes. Den Pilzen kommt eine große ökologische Bedeutung zu. Sie verwerten als Destruenten totes organisches Material, dienen der Pflanzenentwicklung oder zerstören diese, als Mykorrhiza oder Parasitismus [20]. Neben den Bakterien sind Pilze die wichtigsten Vertreter beim Abbau organischer Materialien und der Verwertung zu Humus. Die mutualistische Symbiose von Pflanzen und Pilzen bezeichnet man als Mykorrhiza. Die Hyphen der Pilze umschlingen die pflanzlichen Wurzeln und helfen ihnen bei der Aufnahme von Nährstoffen aus dem Boden. Der Pilz erhält im Gegenzug die für ihn notwendigen Kohlenhydrate aus der Photosynthese der Pflanzen. Zwischen 80% bis 90% der Pflanzen leben in einer solchen Symbiose mit Pilzen zusammen, besonders verbreitet in nährstoffarmen Gebieten. So wie es nützliche Symbionten gibt, gibt es auch Parasiten bei den Pilzen, die durch ihre Anwesenheit die Pflanzen zerstören [51].

Etwa 180 der bekannten Pilzarten sind für den Menschen krankheitserregend. Deutlich größer ist der Nutzen, den der Mensch aus Pilzen ziehen kann. So können Speisepilze verzehrt werden und andere Arten dienen der Biofermentierung von Alkohol, Zitronensäure und Vitamin C. In der Medizin nutzt man seit Beginn des 20.Jahrhunderts die Möglichkeit, aus Pilzen das Antibiotikum Penicillin gewinnen zu können [74].

Die Infektionskrankheiten, die durch Pilze als Parasiten verursacht werden, bezeichnet man als Mykosen, die man in oberflächliche Hautmykosen und systemische Mykosen unterteilt. Bei intaktem Immunsystem können Dermatophyten, Fadenpilze, oberflächliche Dermatomykosen verursachen. Der Fadenpilz ernährt sich vom Keratin der obersten Hautschicht und ist von Mensch zu Mensch übertragbar. Ein gesundes Immunsystem kann diese Infektionskrankheit erfolgreich bekämpfen. Zusätzlich

empfehlenswert sind unterstützende Therapien mit antimykotischen Cremes. Schleimhautmykosen treten meistens nur bei einem geschwächten Immunsystem oder immunsuppremierten Menschen auf. Lediglich vaginale Mykosen können auch bei einem gesunden Immunsystem auf Grund von Stress und Hormonschwankungen oder pH-Wert Änderungen, auftreten. Schleimhautmykosen werden fast ausschließlich von der Gattung Candida, vor allem von Candida albicans ausgelöst, da dieser Sprosspilz vermehrt auf den menschlichen Schleimhäuten des Verdauungstraktes vorkommt [54]. Menschen mit Immunschwächekrankheiten, nach Transplantationen und Chemotherapien sind häufiger gefährdet, zusätzlich an systemischen Mykosen zu erkranken. Diese sogenannte opportunistische Pilzinfektion gelangt über die Lunge in den Blutkreislauf und befällt dann die inneren Organe. Die Letalität ist sehr hoch und hauptverantwortlich dafür ist der Pilz der Gattung Candida [74]. Bei oberflächlichen Hautmykosen verwendet man zur lokalen Behandlung Antimykotika in Form von Salben und Cremes. Bei Schleimhautmykosen kommen je nach Lokalisation Salben, Tabletten, Säfte oder Zäpfchen zum Einsatz, die möglichst nur lokal und nicht systemisch wirken sollen. Nur bei schwer therapierbaren, tief liegenden Mykosen setzt man zusätzlich zur lokalen auch die systemische Behandlung an [54].

2.2.1 Candida albicans

Candida albicans ist ein Hefepilz der Candidagattung. Dieser Pilz ist ein fakultativ pathogener Erreger. Eine Kandidose entsteht meistens nur, wenn eine verminderte oder geschwächte Immunität, zum Beispiel durch Diabetes mellitus, Organtransplantationen oder AIDS, vorliegt. Der Pilz vermehrt sich dann stark und eine Form der Mykose kann sich manifestieren [54]. Bei einem intakten Immunsystem leben Candida albicans, als Saprobionten im Gleichgewicht mit der Immunabwehr und anderen Mirkroorganismen auf den menschlichen Schleimhäuten. Saprobionten sind heterogene Organismen. Sie leben von sich zersetzenden organischen Stoffen und schließen damit den Stoffkreislauf in einem Ökosystem. Bei Mykosen handelt es sich meistens um sogenannte endogene Infektionen, da sich die Erreger bereits im Körper befinden und dort stark vermehren. Grund für die Entstehung von Mykosen ist die ökologische Verschiebung hin zu optimaleren Bedingungen für die Mikroorganismen.

Anders bei der exogenen Infektion, die durch von außen neu erworbene Erreger entsteht. Kandidosen lassen sich gut mit Antimykotika therapieren, die entweder die Pilzzellwand oder Pilzzellmembransynthese stören [74]. Die Züchtung von Candida auf einfachen Nährböden erfolgt innerhalb von 24 bis 48 Stunden in einem Brutschrank von etwa 37°C. Die Nährböden sind mit antibakteriellen Stoffen versetzt, wie zum Beispiel Gentamycin in Sabouraodplatten, damit sich parallel keine Bakterien bilden können (Abb. 11) [20].

Candida ist ein Pilz, der unterschiedliche Wachstumsformen ausbilden kann, man bezeichnet dies als Polymorphismus. Die rundlichen ovalen Pilzzellen bilden Fadenformen oder echte Hyphen aus. Diese wiederum dienen der invasiven Besiedlungsform und manifestieren Infektionen. Die durch Sprossung entstehenden sogenannten Blastokonidien und die Bildung von sehr widerstandsfähigen Chlamydosporen, Dauersporen, sind wichtige Unterscheidungsmerkmale zu anderen Hefepilzen [54].

Candida albicans besitzt doppelte Chromosomensätze, in diesem Fall sind es 2 mal 8 Chromosomen, auf denen alle genetischen Erbinformationen gespeichert sind. Diese diploiden Organismen durchlaufen Formen sexueller Fortpflanzungsmechanismen, die zum Austausch unterschiedlicher Erbinformationen führen und somit eine Art von Evolution, Weiterentwicklung und Anpassung ermöglichen [20].

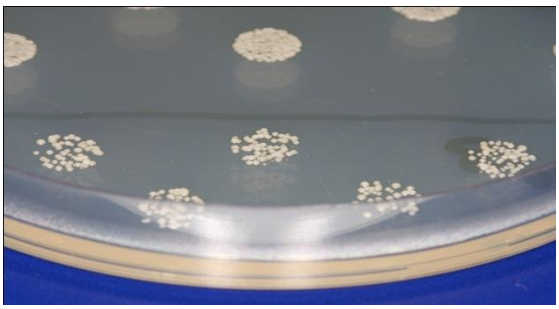

Abb. 11: Candida albicans Kolonien auf Sabouraudplatte

2.3 Desinfektion

Desinfektion bedeutet laut dem deutschen Arzneimittelbuch, dass lebendes oder totes Material in solch einen Zustand versetzt wird, in dem es nicht mehr fähig ist, etwas zu infizieren [77].

Der Unterschied zwischen Desinfektion und Sterilisation besteht in der geforderten Keimzahlreduktion, die mindestens erreicht werden muss. Das bedeutet, bei der Desinfektion müssen die anfänglichen keimbildenden Einheiten (KbE) mindestens um den Faktor 10^5 reduziert werden und bei der Sterilisation ist eine Keimzahlreduktion von 10^6 gefordert [24], [61]. Die Sterilisation von Haut- und Schleimhautoberflächen ist nicht möglich, deshalb können diese Oberflächen lediglich desinfiziert werden und sind somit nur keimreduziert und nie keimfrei, aseptisch. Desinfektion ist eine antiseptische Maßnahme zur Verminderung von infektiösen Keimen und zielt damit ab auf eine Minimierung von Infektionsrisiken [24]. In der Medizin werden Wunden desinfiziert, um die Keimbesiedelung zu reduzieren und somit eine regelrechte, antiseptische Wundheilung zu erzielen. Bereits 1847/ 48 erkannte Dr. Ignaz Philipp Semmelweis einen Zusammenhang zwischen dem Kindbettfieber und übertragenen Bakterien, woraufhin er die Desinfektion der Instrumente und Hände mit Chlorkalk anordnete. Die Mortalitätsrate sank von etwa 15% auf 1,3%, wie [11], [69]. Im Jahre 1867 führte der schottische Chirurg Dr. Joseph Baron Lister, auf Grundlage der Erkenntnisse von Dr. Semmelweis, die Desinfektion von Operationsoberflächen mit dem desinfizierenden Karbol ein. Er verband die Operationswunden mit in Karbolsäure getränkten Verbänden, dem sogenannten Listerschen Verband. Die vorhanden Bakterien wurden abgetötet und neue Bakterien konnten nicht an die Wunde gelangen, somit kam es nachhaltig zur signifikanten Reduktion von Operationsmortalität [93]. Robert Koch wies mikroskopisch bakterieninduzierte Infektionskrankheiten in Abstrichen infizierter Patienten nach und konnte diese auch in-vitro kultivieren. Auf ihn gehen zahlreiche bakteriologische Untersuchungsmethoden zurück.

Zur Desinfektion von Haut- und Schleimhautoberflächen werden verschiedene Mittel genutzt, die unterschiedliche Wirkungen und Zusammensetzungen aufweisen. Die Mindestanforderungen an Desinfektionsmittel sind die bakterizide oder bakterio-

statische, die viruzide oder virustatische und fungizide oder fungiostatische Wirksamkeit. Das 3%ige Wasserstoffperoxid sowie Jod werden als Desinfektionsmittel auf Haut und Schleimhaut effektiv angewendet, da beide Desinfektionsmittel Bakterien, Pilze und Viren durch Zellwandschädigung abtöten. Beide Desinfektionsmittel wirken auch verzögert auf Sporen. Alkohole und Phenole wirken gegen Bakterien und Pilze. Die Wirkung gegen Viren ist nur teilweise vorhanden und gegen Sporen sind beide wirkungslos. Chlorhexidin wirkt bakteriostatisch, fungiostatisch und virustatisch, das bedeutet lediglich eine Hemmung des Wachstums der Mikroorganismen [21].

Unsachgemäße Anwendung von Desinfektionsmitteln, das heißt regelmäßige Anwendung im Haushalt oder zu geringe Konzentrationen und Einwirkungszeiten können zu Resistenzbildungen führen. Auffällig ist, dass oft diese Resistenzen bei stabilen Bakterien auftreten, die auch eine erhöhte Antibiotikaresistenz aufweisen [123]. Die regelmäßige häusliche Desinfektion der Hände führt zur Störung der schützenden Hautflora und die Anfälligkeit für Dermatosen ist gravierend erhöht [47]. Die Reinigung mittels Seife oder ähnlichen Tensiden bewirkt die Entfernung des oberflächlichen Schmutzes, aber keine Oberflächendesinfektion. Die Anwendung von Tensiden vor der Desinfektion der Haut verursacht zumeist eine tiefere Wirkung der Desinfektionsmittel, welche die natürliche Hautflora irritiert. Die medizinischen Haut- und Handdesinfektionen haben laut Herstelleraussagen keine nachhaltig negativen Auswirkungen auf die Hautflora. Man sollte dennoch auf die zu häufige und ausgiebige Handwäsche mit Seifen vor jeder Handdesinfektion verzichten, um die natürliche Hautflora zu schützen [24], [77]. Die Handdesinfektion mittels Chlorhexidinpräparaten nach einer gründlichen Handwäsche erzielte eine signifikante Keimreduktion an der Hautoberfläche [94].

2.3.1 Wirkmechanismus von Desinfektion

Desinfektionsmittel wirken unterschiedlich auf Mikroorganismen. Einige Mikroorganismen werden abgetötet und andere lediglich im Wachstum gehemmt.

Man unterscheidet drei verschiedene Wirkmechanismen:

- Chemische Stoffe und energiereiche Gamma- oder UV-Strahlung führen zur Schädigung der Nukleinsäuren und damit auch zur Veränderung der DNA-Struktur.
- Durch Hitze und chemische Materialien können Proteine in ihrer Raumstruktur zerstört oder verändert werden, die sogenannte Denaturierung, die zwangsweise zur Apoptose von Mikroorganismen führt.
- Chemisch wirksame Agenzien, wie zum Beispiel Alkohole, können Lipide aus Membranen lösen und damit die Membranen von Mikroorganismen zerstören oder so verändern, dass der Stoffwechsel der Mikroorganismen beeinflusst wird [24], [61].

Die unterschiedlichen Wirkungen der Desinfektionsmittel auf die Mikroorganismen entscheiden über die Effizienz einer Desinfektion. So können Präparate zum Beispiel bakteriostatisch, virustatisch und fungistatisch sein, also lediglich das Wachstum und die Vermehrung von Bakterien, Viren und Pilzen beeinflussen. Oder ein Desinfektionsmittel ist bakteriozid, viruzid und fungizid, dann werden alle angegebenen Mikroorganismen auf unterschiedliche Weise abgetötet [21], [36].

2.3.2 Anforderungen an Desinfektionsmittel

Geeignete Desinfektionsmittel müssen strengen Vorschriften entsprechen und vorgeschriebene Eigenschaften besitzen, um als Desinfektionsmittel Anwendung zu finden.

- Desinfektionsmittel müssen pathogene Mikroorganismen um den vorgeschriebenen Faktor 10^5 reduzieren [61].

- Desinfektionsmittel müssen biokompatibel sein und dürfen auf und in menschlichem Gewebe keinen Schaden anrichten.
- Desinfektionsmittel dürfen auf Grund von Resorptionen in den Organismus keine schwerwiegenden Nebenwirkungen haben.
- Desinfektionsmittel müssen biologisch abbaubar sein und dürfen keine nachhaltigen Umweltschäden verursachen [24], [61].

Die jeweiligen Herstellerangaben sind zu beachten und einzuhalten, da die Firmen in experimentellen Versuchen die optimalsten Einwirkzeiten und die richtige Anwendung des Desinfektionsmittels ermittelt haben. Die optimalste Einwirkzeit ist definiert als die Zeit, die 99,999% der anfänglich vorhandenen pathogenen Mikroorganismen inaktiviert [21], [61]. Zu beachten ist die unterschiedliche Wirksamkeit auf verschiedene pathogene Mikroorganismen. Ein Bakterium in der Teilungsphase ist schneller inaktivierbar auf Grund seiner geringeren Resistenz als ein Bakterium im Sporenstadium. Desinfektionsmittel wirken auf oberflächliche Bakterien oder Bakterien in wässrigen Lösungen schneller, als auf Bakterien in proteinhaltigen Lösungen. Bakterien mit stabileren Membranen haben höhere Resistenzen gegen die Wirksamkeit von Desinfektionsmittel, als Bakterien mit dünnen Einwandmembranen [54].

2.3.3 Desinfektionsmittel

Alkohole wirken bakterizid, tuberkulozid, fungizid und viruzid auf behüllte Viren. In der Praxis finden Wasser–Alkohol–Gemische mit etwa 70% Alkohol Anwendung. Der Wasseranteil quillt die Membranen der Mikroorganismen auf und in Folge dessen ist das Desinfektionsmittel Alkohol wirksamer. Alkoholische Desinfektionsmittel ohne Wasseranteil haben lediglich eine wachstumshemmende Wirkung [74].

Chlorhexidin hat eine bakteriostatische, fungistatische und virustatische Wirkung. Diese Substanz wird bereits zahlreich vor allem in Mundspüllösungen speziell zur Schleimhautdesinfektion eingesetzt. Als Spray oder als Spüllösung wird es auch zur Hautdesinfektion verwendet [33], [94].

Halogene, wie Jod und Chlor, wirken bakterizid, tuberkulozid, teilweise sporozid, fungizid. Viruzid wirken sie auf behüllte sowie unbehüllte Viren, je nach verwendeter Substanz. Chlor in Form von Hypochloriten wird zur Wasser- und Instrumentendesinfektion und zur Desinfektion bei Wurzelkanalbehandlungen, zum Beispiel als Natriumhypochlorid, verwendet. Jod findet Anwendung bei der Haut- und Schleimhautdesinfektion, so zum Beispiel Betaisodona® [77].

Oxidationsmittel wie Ozon oder Wasserstoffperoxid wirken bakterizid, tuberkulozid, teilweise sporozid, fungizid und je nach verwendeter Substanz auf behüllte oder unbehüllte Viren auch viruzid. Ozon wird häufig zur Wasserdesinfektion verwendet. Es findet immer mehr Anwendung im medizinischen und zahnmedizinischen Bereich bei extra- und intraoraler Wunddesinfektion oder zum Beispiel zur Desinfektion von kariösen Läsionen [65], Wurzelkanälen [62], [66], Extraktionsalveolen [92] und parodontalen Taschen [18].

2.3.4 Desinfektions- und Sterilisationsmethoden

Es gibt eine Vielzahl von Desinfektionsmethoden für unterschiedliche Anwendungsbereiche. So zum Beispiel die chemischen Methoden zur oberflächlichen Hautdesinfektion vor Injektionen, wobei die Wischdesinfektion der einfachen Sprühdesinfektion vorzuziehen ist [110].

Bei der chemischen Desinfektion sind vorgegebene Grundregeln zu befolgen, so müssen zum Beispiel chirurgische Instrumente vor dem Reinigen stets desinfiziert werden. Es muss die richtige Dosierung, Temperatur und Einwirkzeit beachtet werden, um die Wirksamkeit des Desinfektionsmittels zu maximieren [61].

Die physikalischen Methoden zur Desinfektion sind nicht geeignet, um sie am oder im menschlichen Körper anzuwenden. So können Mikroorganismen durch Hitze, wie sie bei Dampf, Heißluft und beim Kochen vorliegt, abgetötet oder durch Feuer verbrannt oder abgeflammt werden [61].

Beim Sterilisationsverfahren unterscheidet man Dampfsterilisation von Heißluftsterilisation und die Sterilisation mittels eines Gases oder energiereicher Strahlen. Bei der Sterilisation ist die geforderte Keimzahlreduktion 10^6 vom Ausgangswert. Bei 1.000.000 behandelter Einheiten darf lauf Definition nur noch ein vermehrungsfähiger Mikroorganismus übrig bleiben [21], [61].

Die Dampfsterilisation erfolgt in einem Autoklaven unter gesättigtem Dampfdruck bis zu einer Temperatur von 134°C. Diese Art der Sterilisation ist nur für Materialien und Instrumente anwendbar, die Temperaturen bis zu 134°C vertragen.

Die Heißluftsterilisation erfolgt in Heißluftsterilisatoren. Die Temperatur liegt hier bei trockenen 180°C und dient der Sterilisation von wasserfreien, trockenen Materialien, die für diese hohen Temperaturen geeignet sind.

Die Gassterilisation und Strahlensterilisation kommen zum Einsatz bei Materialien, die nicht hitzebeständig sind und dennoch steril, also aseptisch sein müssen, wie beispielsweise Einmalkanülen, Nahtmaterial, Einmalskalpelle oder Katheter [36].

2.4 Ozon

2.4.1 Molekül und Entstehung

Ozon ist ein Molekül bestehend aus drei Sauerstoffatomen. Es handelt sich um eine allotrope Form des Disauerstoffs O2. Man bezeichnet Ozon auch als Trisauerstoff oder „aktiven Sauerstoff“, da es auf Grund seines energiereichen, oxidativen Zustands sehr reaktionsfreudig ist (Abb.12 und 13). Das Wort Ozon stammt vom griechischen Wort ozein und heißt übersetzt riechen, es hat einen unangenehmen stechenden bis chlorähnlichen Geruch. Ozon hat unter Normalbedingungen, das heißt bei Zimmertemperatur und normalem Luftdruck, einen instabilen gasförmigen Aggregatzustand und ist farblos bis bläulich [114], [133].

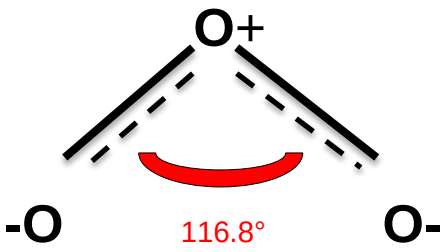

Abb. 12: Strukturformel von Ozon

$$3\ O_2 \longrightarrow 2\ O_3 \qquad \triangle H = +\ 286\ \text{kJ}$$

Abb. 13: Grundgleichung zur Bildung von 2 Ozonmolekülen aus 3 Disauerstoff-molekülen mit Angabe des Energieumsatzes, dies ist eine endotherme Reaktion

1839 wurde zum ersten Mal Ozon als eigenständiger Stoff beschrieben vom Chemieprofessor Christian Schönbein, der es als Nebenprodukt bei der Elektrolyse von Wasser an der Platinelektrode als stechenden Geruch wahrnahm [95]. Soret vermutete 1863 schon, dass es sich bei Ozon um ein Trisauerstoff handelt und bereits 1857 baute Werner von Siemens die erste Apparatur zur künstlichen Erzeugung von Ozon [36].

In der Atmosphäre kann Ozon auf drei verschiedene natürliche Weisen gebildet werden. Als photochemische Dissoziation wird die Ozonbildung unter Einfluss von UV-Strahlung bezeichnet. Dabei spaltet UV-C-Strahlung Dioxygen in einzelne Sauerstoffatome, sogenannte freie Radikale. Diese wiederum verbinden sich mit Disauerstoffmolekülen zu Trisauerstoffmolekülen. So entsteht in der Stratosphäre die Ozonschicht, welche die Erdoberfläche und deren Lebewesen vor schädlicher ultravioletter Strahlung, besonders den UV-B-Strahlen, schützt [114].

Auf der Erdoberfläche entsteht Ozon auch wieder unter Einfluss der ultravioletten Strahlung, und zwar wird hierbei ein Sauerstoffatom vom Stickstoffdioxid abgespalten und dieses bildet mit einem Disauerstoff die allotrope Form Ozon (Abb. 14) [36].

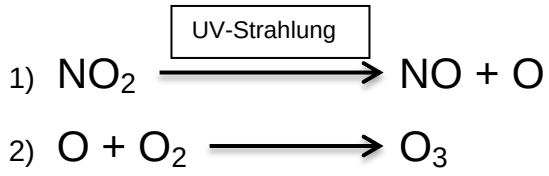

Abb. 14: Reaktionsgleichung der Ozonentstehung auf der Erdoberfläche

Die dritte Möglichkeit wie Ozon entstehen kann basiert auf den elektrischen Entladungen bei Gewitter. Die dabei frei werdende Energie spaltet, wie bei der oben beschriebenen photochemischen Dissoziation, ein Disauerstoff in zwei freie Radikale. Diese verbinden sich dann mit einem weiteren Disauerstoff zum Trisauerstoff unter Energieverbrauch, einer sogenannten endothermen Reaktion [114].

Die höchste Ozonkonzentration liegt in der Stratosphäre, in etwa 15 bis 50 km Höhe, der Ozonschicht vor. Durch den sogenannten Ozon-Sauerstoff-Zyklus entsteht ein chemisches Gleichgewicht, bei dem der Ozongehalt annähernd konstant bleibt. In der Atemluft ist Ozon schon in sehr geringen Konzentrationen, etwa 0,01ppm, reizend und gesundheitsschädlich [46]. Die Ozonkonzentration ist vor allem im Sommer in ländlichen Gegenden sehr hoch. In den Städten wird Ozon auf Grund des vermehrt vorkommenden Stickoxids, NO wieder zu Dioxygen umgewandelt, daher ist die sommerliche Ozonkonzentration in den Städten geringer. Diese Abbaureaktion

(Abb. 15) von Ozon durch NO wurde erstmals von Paul Josef Crutzen 1970 beschrieben [30].

Abb. 15: Abbaureaktion von Ozon mit Stickoxid zu Sauerstoff und Stickstoffdioxid

2.4.2 Ozon als Oxidationsmittel

Ozon ist neben Fluor das zweitstärkste Oxidationsmittel. Oxidationsmittel bedeutet, dass es ein Elektron in einer sogenannten Redoxreaktion an einen anderen Stoff abgibt, also selbst reduziert und den anderen Stoff oxidiert. Es ist so reaktionsfreudig, dass alle Metalle, ausgenommen Edelmetalle, sofort oxidieren. Auf Grund seiner hohen Reaktivität ist es ein zelltoxisches Gas, welches bakterizid, viruzid und fungizid wirkt, aber auch auf gesunde Zellen des Menschens toxische Wirkung hat [114]. Daher kann dieses starke Oxidationsmittel beim Menschen, wenn es in hohen Konzentrationen in der Luft vorkommt, zu Atemwegsreizungen und in extremen Fällen sogar zu Atemwegserkrankungen führen. Deshalb hat die EU Richtwerte für den Ozongehalt der Luft festgelegt. So besteht bei einer Ozonkonzentration von bis zu 110µg/m³ keine Gefahr für den Menschen. Ab einem Gehalt von 110µg/m^3 bis 180µg/m³ können Konzentrationsbeeinträchtigungen bei geschwächten und alten Menschen auftreten. Ab einem Wert von etwa 200µg/m³ können bereits Schleimhaut-, Tränen- und Hustenreizungen sowie Schläfenkopfschmerzen und Lungenfunktionsstörungen auftreten. Die festgelegte Arbeitsplatzmaximaldosis liegt bei 200µg/m³ oder 0,1ppm (parts per million). Ab einem Wert über 360µg/m³ besteht akute Lebensgefahr. Die angegebenen Werte beziehen sich alle auf einen Ein–Stunden–Mittelwert. Ebenfalls lebensgefährlich sind geringere Ozonkonzentrationen, die über einen längere Zeitraum mit der Atemluft unbemerkt aufgenommen werden [46], [70]. Ozon hat neben seiner oxidativen und bleichenden Wirkung auch eine desinfizierende, die man sich in der Wasseraufbereitung, Automobilbranche und in der Medizin zu Nutze macht. Die medizinische Wirkung gegen Bakterien, Viren und Pilze führt zur Entzündungshemmung, fördert die Durchblutung und regt den Stoffwechsel an. Bereits

1870 hat der Berliner Arzt Dr. C. Lederer Ozon zur Inhalation verwendet, damals war die toxische Wirkung des Ozons noch nicht so klar wie heute. Im ersten Weltkrieg hat man Kriegsverletzungen mit Ozon begast. Durch die oberflächendesinfizierende Wirkung von Ozon wurde die Wundheilung positiv beeinflusst. A. Wolff publizierte bereits 1915 die Wirkung von Ozon gegen Phlegmone, Abszesse und eitrige Knochenbrüche. Der Chirurg Erwin Payr veröffentlichte 1935 eine umfassende Publikation zum Thema „Ozonbehandlung in der Chirurgie“ mit verschiedenen Applikationsmöglichkeiten, die auch heute noch Anwendung finden. Heutzutage wird Ozon vielfältig in der Allgemeinmedizin eingesetzt, so zum Beispiel zur Eigenblutbehandlung, zur Darmtherapie, Wundheilung von Ulceri und eitrigen Hauterkrankungen [13]. In der Zahnmedizin findet Ozon Anwendung speziell zur Kavitätendesinfektion nach Kariesexkavation, zur Taschendesinfektion nach Parodontitisbehandlungen, Wurzelkanaldesinfektionen, sowie Begasung von Extraktionsalveolen [3], [95].

Unumstritten bleibt die toxische Wirkung des Gases Ozon, besonders bei der Inhalation desselben, doch ist die medizinische Positivwirkung des Gases auffällig.

2.4.3 Ozonwirkung auf Mikroorganismen

Auf Grund des instabilen und reaktionsfreudigen Ozons kommt es an der Bakterienmembran zu Oxidationsreaktionen, bei denen die Glykoproteine, Glykolipide und essentiellen Aminosäuren angegriffen, verändert oder zerstört werden. Diese Beeinflussungen führen zu Störungen der Zellmembranpermeabilität, die wiederum Stoffwechselstörungen zur Folge haben und schlussendlich die Zelllyse verursachen [133]. Bünning und Hempel zeigten 1996 die zelltoxische Wirkung von ozoniertem Wasser gegen Escherichia coli mit Zellwandschädigung und dem Stillstand des Metabolismus. Bei Viren sind die Angriffspunkte des Ozons die Proteine des Capsids, welche Bestandteile der viralen Hülle sind. Durch die Proteinveränderungen und die damit verbundene Capsidveränderung fehlt dem Virus die Möglichkeit, sich an Zelloberflächen anzuheften und an der Wirtszelle zu agieren. 1981 stellte die Studiengruppe von Roy eine irreversible Schädigung der viralen DNA durch den

Einfluss von Ozon fest [109]. Für unterschiedliche Bakterien und Viren sind auch unterschiedliche Ozonkonzentrationen und deren unterschiedliche Einwirkzeit zu beachten. Einzeln vorkommende Bakterien in planktonischen Lösungen reagieren anders auf die Ozonbegasung als Kolonien und Bakterien im Sporenzustand oder Bakterien in Biofilmen auf festen Oberflächen [76]. Wie in den Ozonversuchen der Uni Salzburg 2009 gezeigt, ist die Länge der Einwirkzeit des Ozons essentiell für die Wirkung gegen Bakterien. Wobei zu unterscheiden ist zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien [32].

2.4.4 Ozongerät „Prozone“

Das in den Versuchen verwendete Gerät zur Ozonbehandlung hat die Firma W&H entwickelt und für die Versuchsdurchführungen zur Verfügung gestellt (Abb. 16 und 17).

Abb. 16: Ozongenerator „Prozone“ [131]

Abb. 17: „Prozone“

Der übersichtliche Aufbau des Gerätes ist in Abbildung 18 schematisch aufgezeigt. Die Außenluft wird mittels einer Pumpe angesaugt. Innerhalb des Gerätes befindet sich ein Filter, der dazu dient, die eingesaugte Luft zu reinigen und zu trocknen. Im Generator werden aus drei Sauerstoffmolekülen unter Energiezufuhr zwei Ozonmoleküle, die auf Grund ihrer hohen oxidativen Wirkung gut gegen Bakterien und Viren eingesetzt werden können. Ozonmoleküle, die in der Anwendung nicht reduziert werden, zerfallen automatisch wieder zu Sauerstoffmolekülen, da sie den hoch energetischen Zustand mit drei Sauerstoffatomen nicht dauerhaft halten können (Abb. 18) [131].

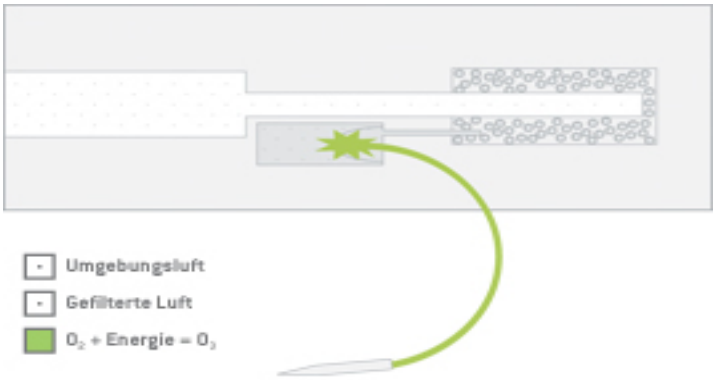

Abb. 18: schematischer Aufbau des Ozongenerators „Prozone“ [131]

Für eine sichere und effektive Ozonbehandlung gibt der Hersteller Anwendungszeiten am Ozongenerator vor, die in Abhängigkeit der gewünschten Behandlungsmethode und des Behandlungsbereichs gewählt werden können. So empfiehlt der Hersteller eine 6sekündige Ozonbegasung von Kavitäten nach Kariesexkavation und vor dem Legen der Kompositfüllung. 12 Sekunden werden zur chirurgischen Desinfektion, 18 Sekunden zur parodontalen Desinfektion empfohlen und bei endodontischen Behandlungen zur Desinfektion der Wurzelkanäle wird eine exakte Begasungszeit von 24 Sekunden vorgegeben [131].

2.5 Chlorhexidin

2.5.1 Das Molekül

Ende der 40er Jahre des 20.Jahrhunderts wurde auf der Suche nach antiviralen Mitteln Chlorhexidindigluconat von Davis entdeckt und beschrieben. Es kam erstmals als Malariaprophylaktikum zum Einsatz und wurde auch bei Verbrennungen angewendet. 1970 beschrieben Löe und Schiott die effektive Plaque- und Gingivitisreduktion auf Grund des Chlorhexidindigluconateinsatzes [85], [113].

Chlorhexidin (CHX) wird sehr häufig in der Zahnmedizin angewendet und liegt in wässriger Lösung zweifach positiv geladen vor. Das spiegelsymmetrische Molekül enthält zwei Benzolringe (Abb. 19) [36].

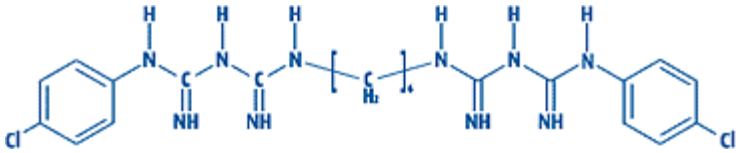

Abb. 19: Strukturformel Chlorhexidin (Chlorhexamed Produktinfo)

Da dieses Molekül zweifach positiv geladen ist, kann es sich sehr gut am negativen Pellikel, dem Zahnhäutchen, elektrostatisch anhaften. Es hat dadurch eine hohe Substantivität und wirkt auf Grund seines Reservoirs nach dem „slow release“ Prinzip sehr lange an der Zahnoberfläche und der Schleimhaut, ohne von dieser aufgenommen und vom Körper metabolisiert zu werden [106]. Chlorhexidin wird fast zu 100% wieder ausgeschieden und führt somit nur in sehr seltenen Fällen zu Allergien und Nebenwirkungen.

Die lokalen Nebenwirkungen, die durch Langzeittherapien oder Überdosierungen verursacht werden können, sind reversibel. Die bräunlichen Zahnverfärbungen kommen auf Grund des kationischen Charakters des spiegelsymmetrischen Moleküls zustande.

Abb. 20: reversible Zungenverfärbungen durch CHX Anwendung (DocCheck Pictures)

Farbpartikel aus Speisen und Genussmitteln werden vom Chlorhexidindigluconat an der Zahn- und Zungenoberfläche (Abb. 20) sowie der Mundschleimhaut gebunden und führen somit zu reversiblen Verfärbungen der Zähne und zu Geschmacksirritationen auf der Zunge. Diese Verfärbungen können durch professionelle Zahn- und Zungenreinigung wieder entfernt werden [59].

2.5.2 Wirkung und Einsatzgebiet von Chlorhexidin

Chlorhexidindigluconat hat eine keimreduzierende antibakterielle Wirkung, da es sich in der Zellmembran von Bakterien einlagern kann und dort zu Ausfällungen von Membranproteinen und cytoplasmatischer Proteine führt, was wiederum den Zelltod bedeutet. Es ist das Antiseptikum der ersten Wahl in der Zahnmedizin und steht in unterschiedlichen Darreichungsformen und Dosierungen zur Verfügung [59]. Spüllösungen haben eine Chlorhexidinkonzentration von 0,06% bis 0,2%, Gele von 1% bis 2% und Lacke bis 40%. Je nach Konzentration und Applikationsform ist die Dauer der Substantivität und damit die „slow release“ des Wirkstoffes [121], [122]. Neuere

Formen der CHX-Applikation liegen in Form von Chips vor, zum Beispiel der Perio Chip®, der in persistierend aktiven Parodontaltaschen eingelegt wird und konstant seinen Wirkstoff vor Ort abgibt [98]. Bei einem pH-Wert zwischen 7 und 9 liegt das Wirkoptimum des Antiseptikums [34]. Dieses Chemotherapeutikum hat seine höchste Wirksamkeit gegen grampositive Kokken, wie den Streptococcus mutans [42], [43]. Weniger effektiv ist Chlorhexidindigluconat gegen grampositive und gramnegative Stäbchen und behüllte Viren. Gegen säurefeste Stäbchen, unbehüllte Viren und Sporen ist es unwirksam. Chlorhexidindigluconat wird in der Zahnmedizin vielfältig eingesetzt. Häufig und erfolgreich findet es Anwendung prä- und postoperativ bei chirurgischen Eingriffen [97], bei bakteriell bedingter Gingivitis und Parodontitis [125]. Als „full mouth desinfection“ wird es bei Parodontaltherapien, bei nekrotisierend ulzerierender Gingivitis oder Parodontitis eingesetzt [15], [59]. Ebenfalls erfolgreich ist es bei der Kariesprävention [5], bei Halitosis und Xerostomie [28], [132]. Als Hautdesinfektion, auf Wundpflastern und in Wundsalben hat Chlorhexidin auch außerhalb der Zahnmedizin seine Wirksamkeit bewiesen [33]. Zur Eliminierung von MRSA im Nasenvorhof ist Chlorhexidin in Verbindung mit Mupirocin, einem Antibiotikum, sehr wirksam [14], [127].

Chlorhexidindigluconat kann als sogenannte „chemische Zahnbürste“ zur chemischen Plaquekontrolle vorübergehend eingesetzt werden. Vor allem bei Patienten, die auf Grund von motorischer oder gesundheitlicher Einschränkung keine mechanische Zahnreinigung durchführen können. Zu beachten ist dabei, dass nur bei ausreichend hoher Konzentration und Applikationsdauer eine effektive „Anti-Plaque-Wirkung“ erzielt wird. Bei niedriger Konzentration und Einwirkzeit minimiert sich die Wirkung einer Plaquereduktion und das Chlorhexidindigluconat wirkt dann lediglich bakteriostatisch, niedrig dosierte Chlorhexidinkuren dienen ergänzend zur täglichen mechanischen Zahnreinigung und wirken kariespräventiv [41], [43], [44]. Wichtig zu beachten ist die mögliche Inaktivierung des Chlorhexidinwirkstoffes durch zum Beispiel Natriumlaurylsulfat und Triclosan, da beides Bestandteile in Zahnpasten sind können sie die Wirksamkeit von Chlorhexidindigluconat aufheben. Ein Zeitraum von etwa 30 bis 60 Minuten sollte zwischen der Anwendung von Zahnpasten mit diesen Inhaltstoffen und chlorhexidinhaltigen Spüllösungen eingehalten werden, um eine optimale Wirksamkeit beider Produkte zu erzielen [59].

2.6 antimikrobielle Photodynamische Therapie

2.6.1 Anwendung und Wirkmechanismus

Die Firma HELBO® hat mit ihrem Softlaser eine Möglichkeit der Oberflächen-desinfektion entwickelt, die auf pathogene Mikroorganismen hemmend, aber auf den eigenen Zellstoffwechsel stimulierend wirkt. Somit wird die Wundheilung zum einen positiv beeinflusst durch die Bakterienhemmung und zum anderen durch die erhöhte Durchblutung und Stoffwechselaktivität der körpereigenen Zellen [92], [103]. Diese Therapie verspricht schmerzstillende Wirkung [124].

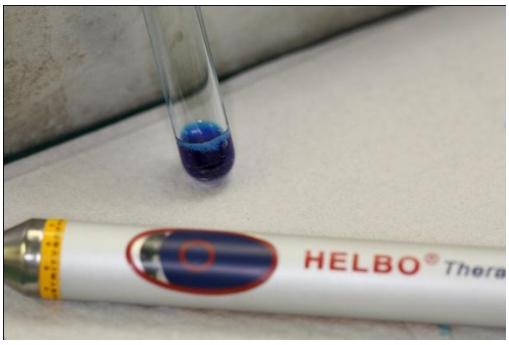

Abb. 21: HELBO® TheraLite Laser und HELBO® Blue Photosensitizer

Die antimikrobielle Photodynamische Therapie, kurz aPDT, basiert auf chemischen und physikalischen Hintergründen in Kombination mit photobiologischen Effekten. Der Photosensitizer hat einen pH Wert von 3,5 und enthält Phenothiazin-5-ium, 3,7-bis (dimethylamino)-, chlorid zur Einfärbung und Sensibilisierung der pathogenen Mikroorganismen. Dieser Farbstoff, besser bekannt unter dem Begriff Basic Blue 17 (Abb. 22), haftet auf Grund von Oberflächenladungen an den Membranen der Bakterien [58].

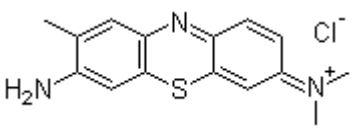

Abb. 22: Basic blue 17 – Photosensitizer [58]

Die infizierte Oberfläche sollte vor der Applikation des Photosensitizers möglichst speichel- und blutfrei sein, um Verdünnungen zu vermeiden. Die gesamte zu desinfizierende Oberfläche muss für etwa 60 Sekunden mit dem Photosensitizer dünn bestrichen werden. Anschließend wird gründlich mit Wasser gespült, um die Überschüsse zu entfernen. Im zweiten Schritt erfolgt die Bestrahlung der benetzten Oberfläche mittels des Lasers (Abb. 23). Die Wellenlänge des Laserlichts liegt zwischen 380nm und 700nm [58]. Durch die physikalisch-optischen Eigenschaften eines Low-Level Lasers werden die Moleküle des Photosensitizers angeregt. Diese angeregten Moleküle führen zur Bildung von Singulett Sauerstoff aus dem stabilen, energiearmen Triplett Sauerstoff. Der kurzlebige reaktive Singulett Sauerstoff wiederum, verursacht durch seine oxidative Wirkung die Zerstörung von bakteriellen Membranlipiden und Membranenzymen [37], [134]. Ist ein Sauerstoffmolekül im Grundzustand, also im Zustand der geringsten Energie, wird es als Triplett Sauerstoff bezeichnet. Singulett Sauerstoff entsteht photochemisch aus Triplett Sauerstoff oder chemisch aus anderen Sauerstoffverbindungen und kann in zwei unterschiedlich angeregten Zuständen vorliegen. Der Singulett Zustand des Sauerstoffs ist sehr kurzlebig, energiereich und reaktiv [78].

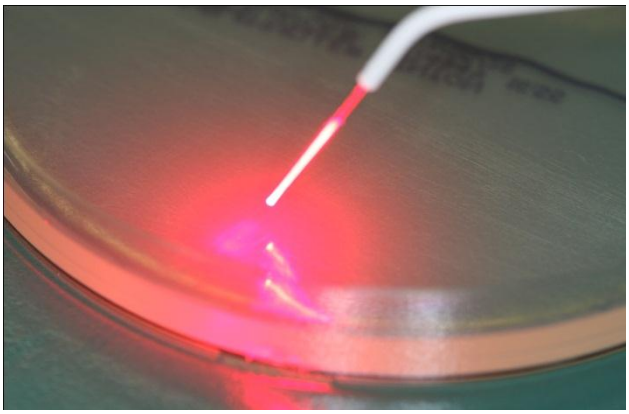

Abb. 23: Bestrahlung einer beimpften Sabouraudplatte mittels Low-Level Laser nach Einwirkzeit des Photosensitizers

Die oxidative Wirkung des Singulett Sauerstoffs, das durch die photochemische Reaktion, induziert durch den Low-Level Laser, entsteht, hat auch Positiveffekt auf die Phosphorylierung der Synthese von ADP zu ATP in den zelleigenen Mitochondrien. So kommt es zur Erhöhung der Zellenergie, die wiederum der Wundheilungsförderung und Schmerzlinderung dient [64], [92], [103], [124].

3 Material und Methode

3.1 Ziel der Versuchsdurchführungen

Ziel der Versuche war der qualitative und quantitative Nachweis der Wirksamkeit von Ozon gegen Escherichia coli, Staphylococcus aureus und Candida albicans im Vergleich zu 1%igem Chlorhexidin und der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie.

3.2 Aufbau der Versuchsreihen

3.2.1 Qualitative Bestimmung der Wirksamkeit von Desinfektionsmethoden und Materialien

Nach dem simplen „Ja–Nein–Prinzip“ erfolgte zunächst der qualitative Nachweis der Wirksamkeit von 1%igem Chlorhexidin, der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie und der Begasung mit Ozon. Es wurden für die jeweiligen Versuche ein Vertreter der gramnegativen Bakterien, der Escherichia coli, ein Vertreter der grampositiven Bakterien, der Staphylococcus aureus und ein Pilz, Candida albicans, ausgewählt. Von allen drei Versuchsgruppen wurden sogenannte Mac Farland Lösungen hergestellt. Eine Mac Farland Lösung besteht aus einer bestimmten Anzahl in Natriumchlorid schwimmender Bakterien, beziehungsweise Pilze. Deren ungefähre Anzahl wurde durch einen Trübungswert ermittelt, basierend auf Erfahrungswerten. Eine kleine Menge der Bakterien- und Pilzkultur wurde mittels eines Wattestäbchens, in diesem Versuch, in 1ml Natriumchlorid gelöst. Nach dem Durchmischen wurde die Trübung gemessen. Bei den Bakterien beträgt der Trübungswert der Mac Farland Lösung etwa 0,5, dies entspricht nach Erfahrungswerten etwa $1,5 \times 10^8$ KbE/ml, also etwa $1,5 \times 10^8$ Bakterien pro Milliliter. Bei den Pilzen liegt der Trübungswert bei etwa 2, da Pilze größer sind als Bakterien. Für die qualitativen Versuche wurden Bakterienkulturen aus den jeweiligen Mac Farland Lösungen mit Hilfe eines Wattestäbchens auf Müller-Hintonplatten flächig aufgetragen. Candia albicans wurden

nach dem gleichen Verfahren auf Sabouraudplatten appliziert (Abb. 24). Pilze wachsen auf diesem Nährboden besser und auf Grund des darin enthaltenen Gentamycins können sich gleichzeitig keine Bakterien kultivieren. Je eine bestrichene Platte wurde mit einem Tropfen einer 1%igen Chlorhexidinlösung beträufelt (Abb. 25). Je eine Platte wurde zum einen mit Methylenblau beträufelt und anschließend für eine Minute mit einem Laser bestrahlt. Eine andere Stelle wurde nur mit dem Laser bestrahlt und auf eine dritte Stelle wurde nur ein Tropfen Methylenblau auf getropft. Somit sollte die Wirksamkeit der Lasertechnik noch genauer verifizieren werden (Abb. 26 und 27). Die jeweils dritten Platten wurden an einer Stelle für 24 Sekunden und an einer anderen Stelle für 48 Sekunden mit Ozon begast (Abb. 28). Damit das Gas konzentriert an einer Stelle auf den Platten wirken konnte, wurden sterile Kunststoffringe auf die Platten gesetzt. Innerhalb dieser Grenzen konnte das Gas an den Oberflächen wirken, ohne sich in der Umgebung zu schnell zu verflüchtigen (Abb. 29). Alle Platten wurden für etwa 24 Stunden in den Brutschrank bei ca. 36°C gestellt (Abb. 35), damit die Kulturen wachsen bzw. die unterschiedlichen Desinfektionsmaßnahmen wirken konnten. Einen Tag später erfolgte die Analyse der bebrüteten Platten.

Abb. 24: flächige Applikation der Mac Farland Lösung auf die Nährbodenplatte

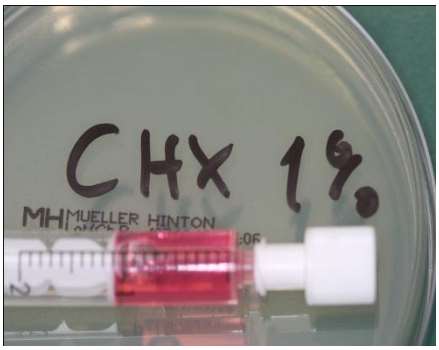

Abb. 25: verwendetes 1%iges Chlorhexidin (CHX)

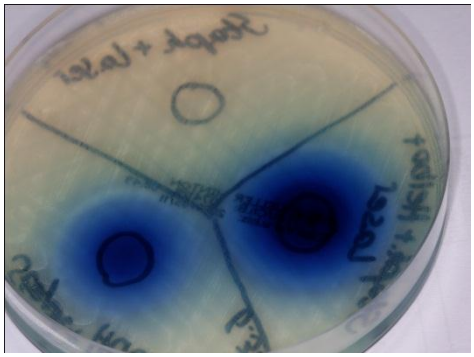

Abb. 26: Aufteilung für aPDT - nur Laser, nur Methylenblau, Methylenblau und Laser

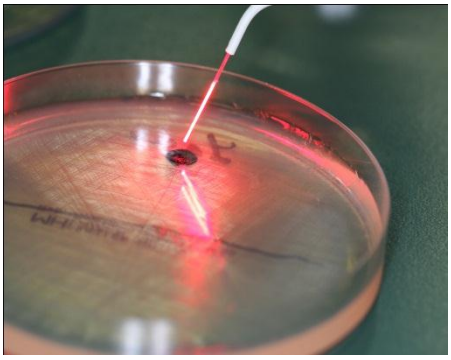

Abb. 27: Laseranwendung bei der aPDT

Abb. 28: Ozongerät

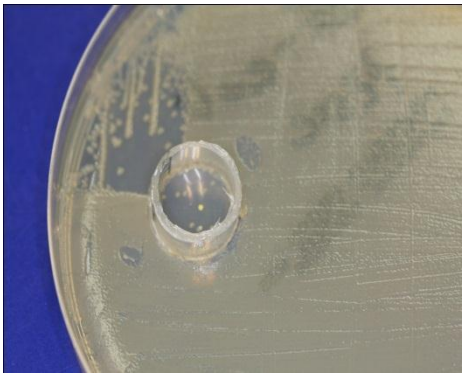

Abb. 29: Ozon begaste Fläche mit sterilem Kunststoffring

3.2.2 Quantitative Bestimmung der Wirksamkeit von Desinfektionsmethoden und Materialien

Für quantitative Nachweise der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln und -methoden mussten sogenannte Verdünnungsreihen hergestellt werden, um Vergleiche ziehen zu können. Zuerst wurden von den subkultivierten Bakterien Escherichia coli und Staphylococcus aureus sowie von der subkultivierten Candida albicans je eine Mac Farland Lösung hergestellt. Die Trübung der Mac Farland Lösung für Bakterien betrug wieder etwa 0,5 und bei Candida albicans etwa 2. Von jeder Mac Farland Lösung wurde jeweils 1ml mit den unterschiedlichen Desinfektionsmaßnahmen behandelt. Die behandelten Lösungen wurden wie die Kontrollgruppen in Verdünnungsreihen verdünnt. Für die Kontrollgruppen wurden von jeder unbehandelten Mac Farland Lösung je 500µl in jeweils ein erstes Reagenzglas mit 4,5ml Natriumchlorid pipettiert und gut durchgeschüttelt. Aus jeder ersten Verdünnung von 10^7 wurden wiederum 500µl in jeweils ein zweites Reagenzglas mit 4,5ml Natriumchlorid pipettiert (10^6) und wieder gut geschüttelt. Dieses Verfahren wurde wiederholt bis zur sechsten Verdünnung (Abb. 30, 31 und 32). Jede Verdünnungsreihe wurde von der Ausgangskonzentration, 10^8 in der Mac Farland Lösung, bis auf 10^2 verdünnt (Abb. 30 und 31). Das bedeutet, dass im jeweils sechsten Reagenzglas rein theoretisch die anfängliche Bakterienkonzentration um eine Million verdünnt wurde. Ausnahme bildet bei der Anzahl der Verdünnungen der Pilz. Auf Grund seiner Größe reichten vier Verdünnungsstufen aus, da in der fünften und sechsten Verdünnung keine Pilzkulturen mehr zuzählen gewesen wären, bezogen auf Erfahrungswerte. Aus jeder Verdünnung wurden je fünf Tropfen à 10µl pro Verdünnung auf Blutagarplatten bzw. Candida albicans auf Sabouraudplatten geträufelt. Später konnten die enthaltenen Bakterien und Pilze ausgezählt und zur Kontrolle auf eine anfängliche Ausgangsanzahl in der Mac Farland Lösung hochgerechnet werden. Die Blutagar- bzw. Sabouraudplatten kamen für circa 24 Stunden bei ungefähr 36°C in den Brutschrank (Abb. 33, 34 und 35). Einen Tag später erfolgte dann die Auszählung der gewachsenen Bakterien- und Pilzkolonien (Abb. 1, 11, 36 und 37). Pro Verdünnung wurde aus den insgesamt fünf Tropfen ein Mittelwert errechnet. Jeder Versuch wurde fünf Mal durchgeführt.

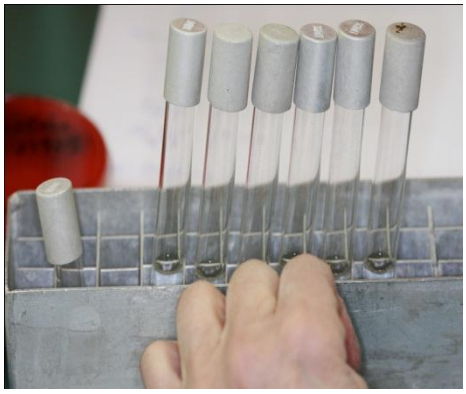

Abb. 30: Verdünnungsreihe

Abb. 31: Herstellung Verdünnungs-reihe

Abb. 32: Mischvorgang

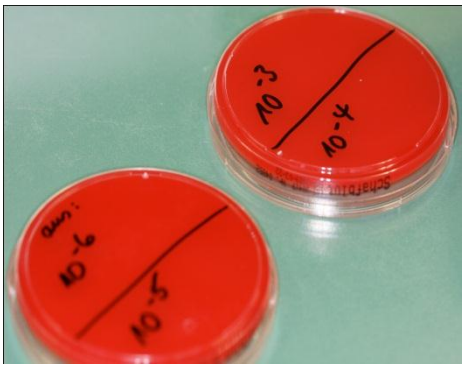

Abb. 33: Verdünnungsreihen auf Blutagarplatten

Abb. 34: 5 Tropfen à 10µl pro Verdünnung

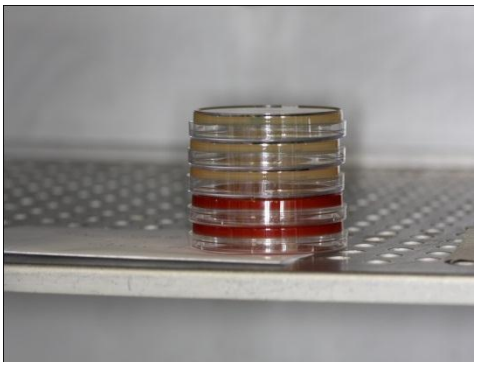

Abb. 35: Brutschrank mit etwa 36°C

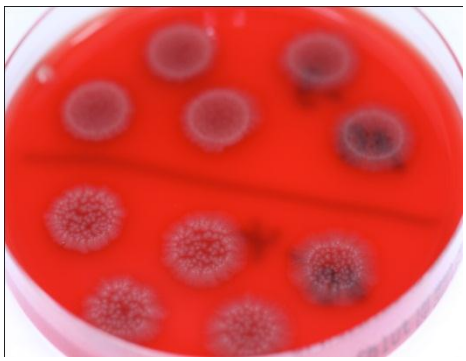

Abb. 36: KbE der 3.Verdünnung oben und 4. Verdünnung unten nach 24 Stunden

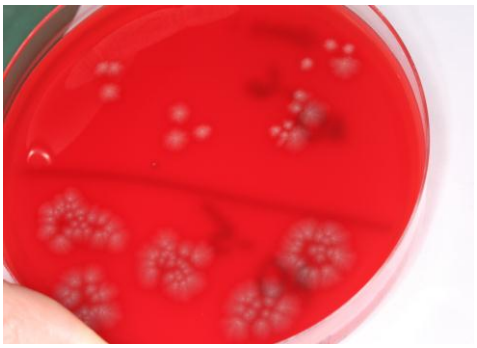

Abb. 37: KbE der 5. Verdünnung unten und 6. Verdünnung oben nach 24 Stunden

3.2.2.1 Quantitative Bestimmung der Wirksamkeit von unterschiedlichen Ozonbegasungszeiten auf Escherichia coli, Staphylococcus aureus und Candida albicans

Für diese Versuche wurden von den subkultivierten Stämmen wieder jeweils eine Mac Farland Lösung hergestellt. Die Kontrollgruppen wurden wie bekannt verdünnt und auf Blutagarplatten ausgetropft. Jeweils 1ml der Mac Farland Lösungen wurde für 42 Sekunden, auf Grund der Gerätevorgabe mussten 2 mal 24 Sekunden gewählt werden, mit Ozon begast und anschließend gut geschüttelt und wie bekannt um den Faktor 10^6 verdünnt. Jeweils ein weiterer Milliliter wurde für 72 Sekunden mit Ozon begast und anschließend zur Auswertung verdünnt. Alle Verdünnungen wurden auf Blutagar- und Sabouraudplatten ausgetropft und verblieben bis zur Auszählung für etwa 24 Stunden im Brutkasten.

3.2.2.2 Quantitative Bestimmung der Wirksamkeit von unterschiedlichen Desinfektionsmethoden und –mitteln auf Escherichia coli, Staphylococcus aureus und Candida albicans

Bei diesen Versuchsreihen wurden die Wirkungen von 1%igem Chlorhexidin, von der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie und von Ozon auf die unterschiedlichen Kulturen getestet. Dafür wurde je eine standardisierte Mac Farland Lösung vom Escherichia coli, Staphylococcus aureus und von Candida albicans hergestellt. Von jeder unbehandelten Mac Farland Lösung wurde je eine Verdünnungsreihe als Kontrollgruppe hergestellt. Anschließend wurde 1ml jeder Mac Farland Lösung mit jeweils 1ml der 1%igen Chlorhexidinkonzentration für 60 Sekunden gut vermischt. Diese Lösungen wurden wiederum in der bekannten Form um 10^6 verdünnt und auf den entsprechenden Platten ausgetropft. Ein weiterer Milliliter jeder Mac Farland Lösung wurde mit je einem Tropfen Methylenblau versetzt, 60 Sekunden gut geschüttelt und anschließend für jeweils eine Minute mit einem Laser bestrahlt. Auch hier erfolgte anschließend die Verdünnung bis auf 10^2 und die Verteilungung von jeweils fünf Tropfen à 10µl pro Verdünnung auf die verschiedenen Platten. Alle Versuche wurden nach dem gleichen Prinzip fünf Mal durchgeführt. Anschließend kamen alle Platten bei circa 36°C in den Brutschrank. Nach 24 Stunden konnten die gewachsenen Bakterien- und Pilzkulturen ausgezählt und der jeweilige Mittelwert pro Verdünnung errechnet werden. Erst mit diesen Werten sind Aussagen über die jeweiligen desinfizierenden Wirkungen und Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Desinfektionsmitteln und –methoden möglich.

4 Ergebnisse

4.1 Qualitative Ergebnisse

4.1.1 Wirksamkeit von Desinfektionsmethoden und Materialien

4.1.1.1 Ozon

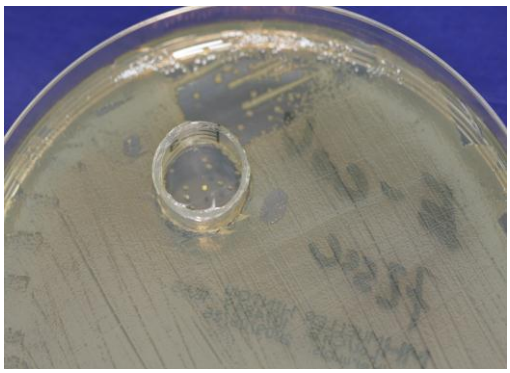

Abb. 38: E. coli auf Müller-Hinton-platte 72 sec mit Ozon begast

Abb. 39: Staph. aureus auf Müller-Hintonplatte 72 sec mit Ozon begast

Es ist eine Bakterienreduktion im Bereich des Kunststoffrings bei einer Begasungszeit von 72 Sekunden in beiden Fällen sichtbar. Auf der Platte mit dem Escherichia coli ist eine stärkere Keimreduktion innerhalb des Kunststoffrings erkennbar, als bei dem grampositiven Staphylococcus aureus (Abb. 38 und 39).

4.1.1.2 Chlorhexidin

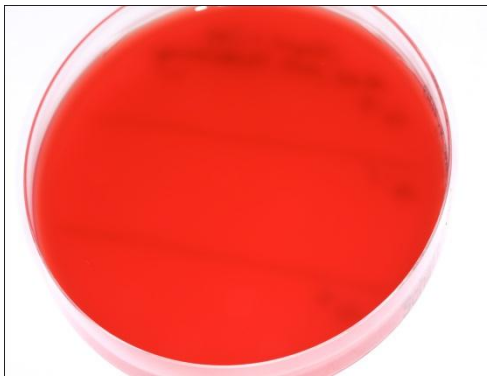

Abb. 40: E. coli mit 1%igem CHX auf Blutagarplatte

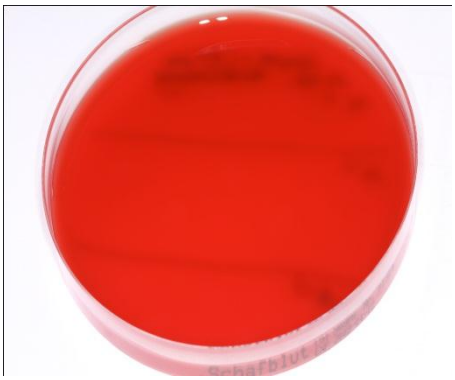

Abb. 41: Staph. aureus mit 1%igem CHX auf Blutagarplatte

Auf beiden Platten (Abb. 40 und 41) sind keine Kolonien gewachsen. Die 1minütige Einwirkzeit mit 1%igem Chlorhexidin hat die vorhandenen Bakterien in der Mac Farland Lösung abgetötet, so dass sich keine Bakterien auf den Blutagarplatten kultivieren konnten. Auch bei Candida albicans haben sich keine Pilzkulturen entwickelt nach der Behandlung mit 1%igem Chlorhexidin.

4.1.1.3 antimikrobielle Photodynamische Therapie

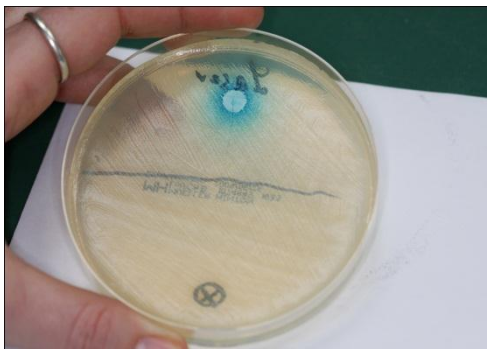

Abb. 42: E. coli aPDT mit und ohne Photosensitizer

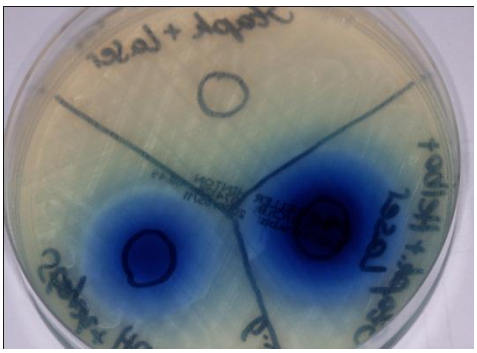

Abb. 43: Staph. aureus aPDT

Auf der ersten Platte (Abb. 42) erkennt man die Keimzahlreduktion im Bereich des blauen Kreises. In diesem Bakterienbereich wirkte erst für eine Minute ein Tropfen Methylenblau und anschließend wurde dieser Bereich nochmals für eine Minute mit dem Low-Level Laser bestrahlt. Im unteren Bereich (Abb. 42) wirkte nur der Laser für eine Minute, dort sind keine Keime reduziert. Rechts auf der Platte (Abb. 43) wurde beim Staphylococcus aureus zusätzlich ein Bereich nur mit Methylenblau behandelt. Auch auf dieser Platte findet in dem Bereich, in dem nur der Laser alleine wirkte, keine Keimzahlreduktion statt. Im Bereich des Methylenblaus mit und ohne Laser ist eine Keimzahlreduktion erkennbar. Im Bereich, der mit der Kombination Methylenblau und Laser behandelt wurde, ist eine größere Bakterienreduktion zu verzeichnen.

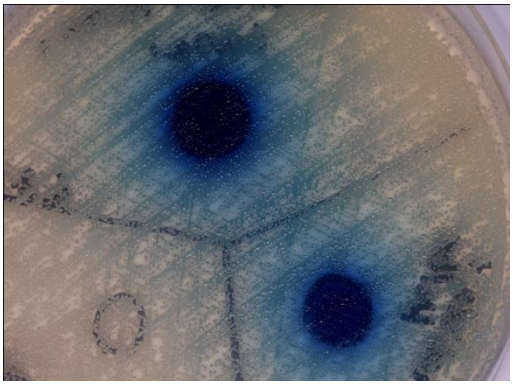

Abb. 44: Candida albicans, Wirksamkeit von aPDT auf Sabouraudplatte

Ob mit Methylenblau und Laser oder nur Methylenblau bzw. nur Laser es fand keine Beeinflussung des Candidawachstums statt (Abb. 44).

4.2 Quantitative Ergebnisse

4.2.1 Wirksamkeit von unterschiedlichen Ozonbegasungszeiten auf Escherichia coli, Staphylococcus aureus und Candida albicans

4.2.1.1 Escherichia coli

Bei einer Ozonbegasungszeit von 2 mal 24 Sekunden ist beim Escherichia coli eine eindeutige Keimzahlreduktion um den Faktor 10^3 auf den Ausgangswert der Kontrollgruppe zu erkennen. Der Ausgangswert der sechsten Verdünnung der Kontrollgruppe beträgt im Mittelwert $5{,}36 \times 10^8$ KbE/ml. In den Verdünnungen vier bis sechs der mit Ozon behandelten Mac Farland Lösung ist eine annähernde Keimfreiheit zu erkennen. Ab der dritten Verdünnung können Bakterienkolonien wieder gezählt werden. Die Bakterienanzahl der dritten Verdünnung beträgt etwa $1{,}16 \times 10^5$ KbE/ml und in der zweiten Verdünnung etwa $5{,}48 \times 10^4$ KbE/ml im Mittelwert. Bei einer verlängerten Begasungszeit von 3 mal 24 Sekunden erhöhte sich die Keimzahlreduktion nur minimal um etwa eine 10 Potenz (Tab. 1 und Abb. 45, 46 und 47).

Tabelle 1:

Escherichia coli und unterschiedliche Ozonbegasungszeiten

	48 sec		72 sec		Kontrolle		
Verdünnungen	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Einheit
6.	0	0	0	0	5,36	0,265	10^8 KbE/ ml
5.	0	0	0	0	n.z.	n.z.	10^7 KbE/ ml
4.	0,08	0,160	0	0	n.z.	n.z.	10^6 KbE/ ml
3.	1,16	0,612	0,24	0,320	n.z.	n.z.	10^5 KbE/ ml
2.	5,48	0,652	4,88	0,601	n.z.	n.z.	10^4 KbE/ ml
1.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^3 KbE/ ml

(0 = keine Bakterienkolonien; n. z. = nicht mehr zählbare Bakterienkolonien)

48 Sekunden Ozon auf Escherichia coli

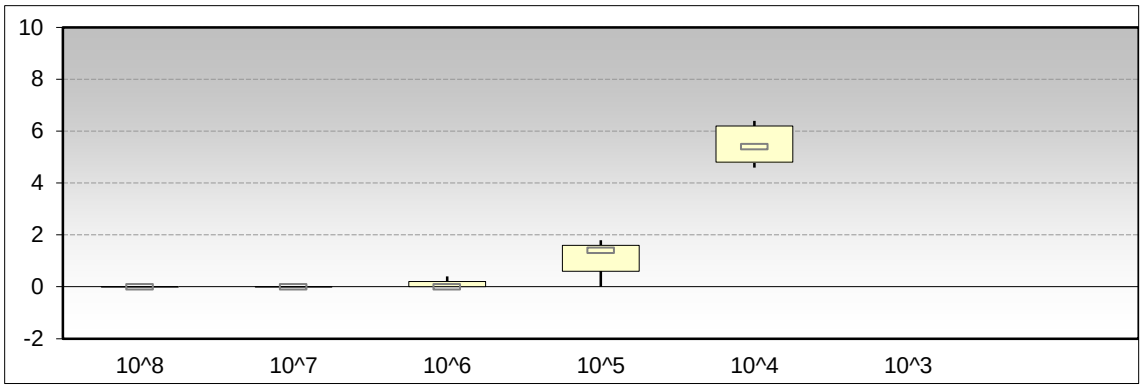

Abb. 45: In der 6. bis 4. Verdünnung (10^8 bis 10^6) ist eine eindeutige Keimzahlreduktion um den Faktor 10^3 zu erkennen. In der 1. Verdünnung (10^3) ist die Bakterienzahl nicht mehr zählbar (n. z.).

72 Sekunden Ozon auf Escherichia coli

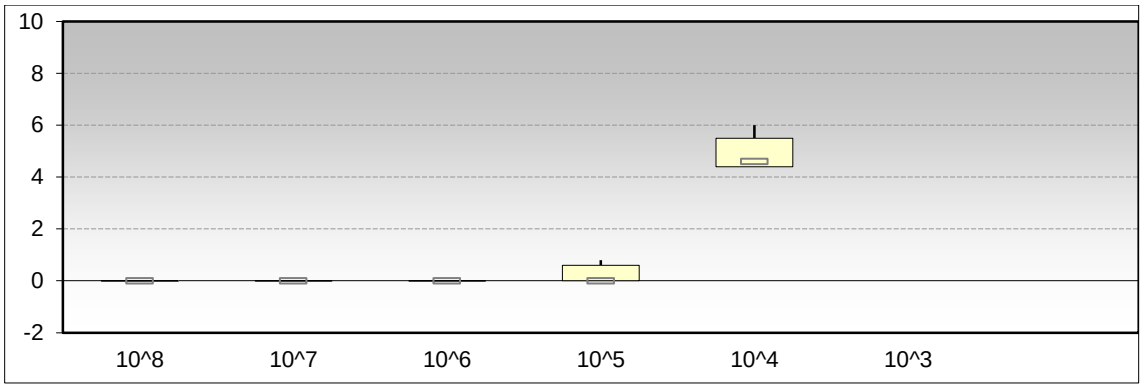

Abb. 46: Die Bakterienreduktion um den Faktor 10^3 ist bis zur 4. Verdünnung (10^6) signifikant. In der 1. Verdünnung (10^3) ist die Bakterienzahl nicht mehr zählbar (n. z.).

Escherichia coli Kontrolle

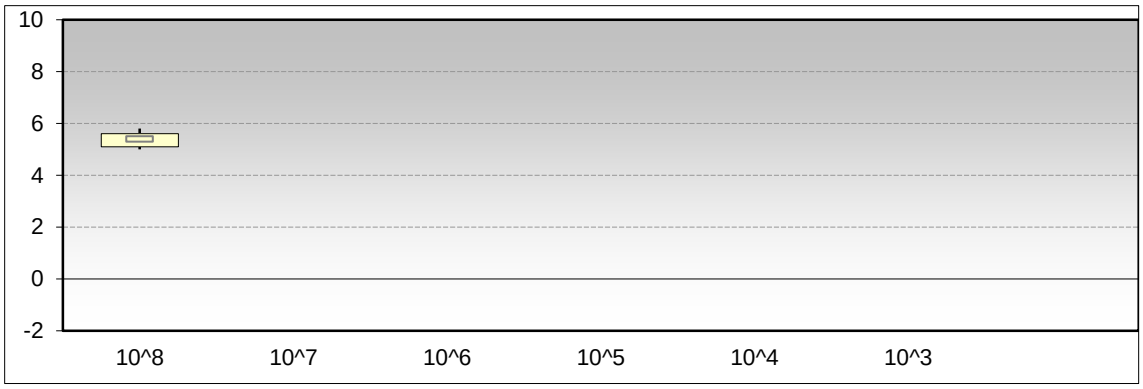

Abb. 47: Erst bei einer Verdünnung um 10^6 ist die enthaltende Bakterienanzahl zählbar. In der 5. bis 1. Verdünnung (10^7 bis 10^3) ist die Bakterienanzahl nicht mehr zählbar (n. z.).

4.2.1.2 Staphylococcus aureus

Beim Staphylococcus aureus fand bei gleicher Begasungszeit von 48 Sekunden lediglich eine Keimzahlreduktion um den Faktor 10^2 statt. Der Ausgangswert der sechsten Verdünnung der Kontrollgruppe beträgt mittelwertig $2{,}52 \times 10^8$ KbE/ml. Bei der behandelten Lösung ist in der vierten Verdünnung wieder eine Bakterienanzahl von etwa $1{,}84 \times 10^6$ KbE/ml zählbar und in der dritten Verdünnung sind es $16{,}28 \times 10^5$ KbE/ml. Bei einer verlängerten Ozonbegasungszeit von insgesamt 72 Sekunden reduzierte sich die Keimzahl insgesamt um den Faktor 1000. Erst in der dritten Verdünnung sind wieder Bakterienkolonien von etwa $0{,}52 \times 10^5$ KbE/ml zählbar (Tab. 2 und Abb. 48, 49 und 50).

Tabelle 2:

Staphylococcus aureus und unterschiedliche Begasungszeiten

	48 sec		72 sec		Kontrolle		
Verdünnungen	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Einheit
6.	0	0	0	0	2,52	0,601	10^8 KbE/ ml
5.	0,4	0,08	0	0	15,28	1,366	10^7 KbE/ ml
4.	1,84	0,344	0	0	n.z.	n.z.	10^6 KbE/ ml
3.	16,28	1,197	0,52	0,299	n.z.	n.z.	10^5 KbE/ ml
2.	n.z.	n.z.	3,56	0,662	n.z.	n.z.	10^4 KbE/ ml
1.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^3 KbE/ ml

(0 = keine Bakterienkolonien; n. z. = nicht mehr zählbare Bakterienkolonien)

Staphylococcus aureus und 48 Sekunden Ozon

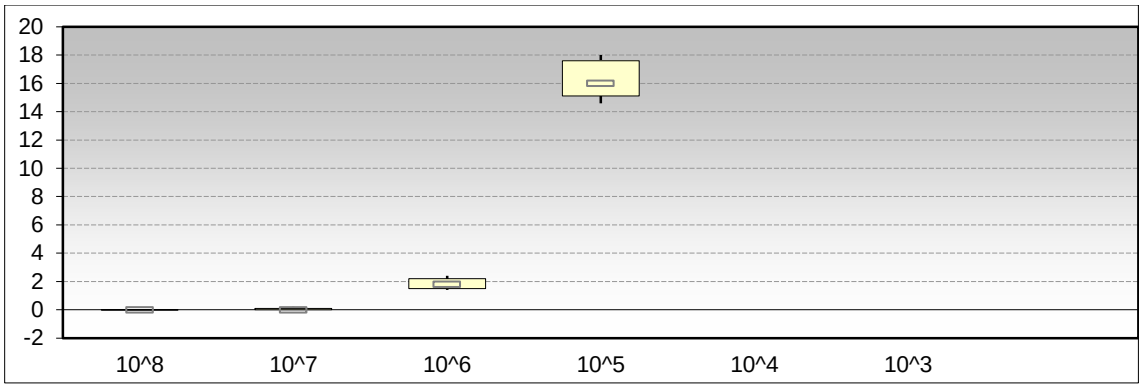

Abb. 48: In der 6. und 5. Verdünnung (10^8 und 10^7) wurde eine Keimzahlreduktion um den Faktor 10^2 erzielt. Ab der 2. Verdünnung (10^4) ist die Bakterienanzahl nicht mehr zu zählen (n. z.).

Staphylococcus aureus und 72 Sekunden Ozon

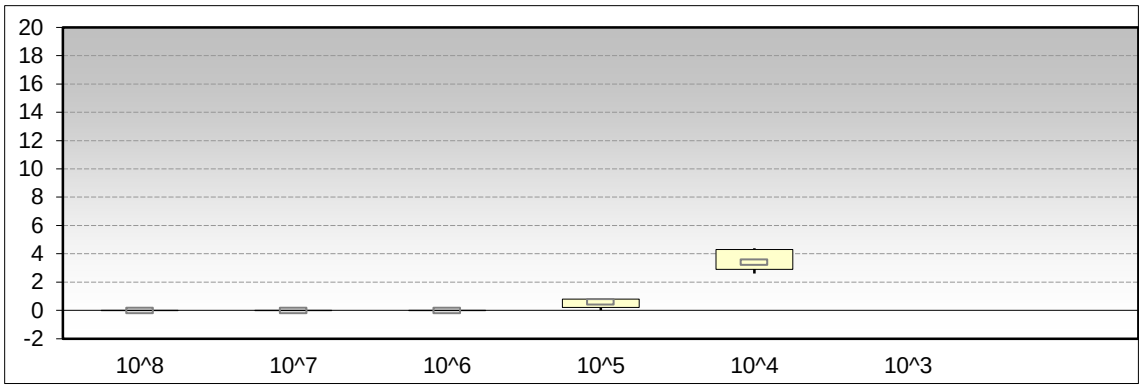

Abb. 49: In der 6. bis 4. Verdünnung (10^8 bis 10^6) ist eine eindeutige Keimzahlreduktion um den Faktor 10^3 erkennbar. In der 1. Verdünnung (10^8) ist die Bakterienanzahl nicht mehr zählbar (n. z).

Kontrolle Staphylococcus aureus

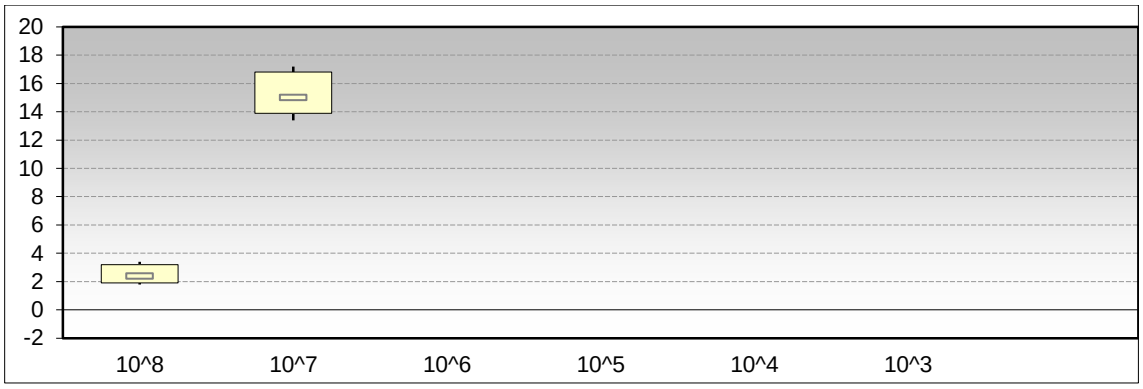

Abb. 50: In der 6. und 5. Verdünnung (10^8 und 10^7) waren die Bakterienkulturen soweit verdünnt, dass sie zählbar waren. Ab der 4. Verdünnung (10^6) waren die kolonienbildenden Einheiten (KbE) nicht mehr zählbar (n. z.).

4.2.1.3 Candida albicans

Bei der 48- und 72sekündigen Ozonbegasung der Candida albicans kam es zu keiner merklichen Keimzahlreduktion. Die Anzahl der Mikroorganismen waren gleich der Kontrollgruppe. Insgesamt wurden bei der Candida nur vier Verdünnungen durchgeführt, da Pilze auf Grund ihrer Größe bereits in der vierten Verdünnung zählbar sind (Tab. 3 und Abb. 51, 52 und 53).

Tabelle 3:

Candida albicans und unterschiedliche Ozonbegasungszeiten

	48 sec		72 sec		Kontrolle		
Verdünnungen	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Einheit
4.	8,12	0,722	8,88	0,755	8,28	1,07	10^6 KbE/ ml
3.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^5 KbE/ ml
2.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^4 KbE/ ml
1.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^3 KbE/ ml

(0 = keine Bakterienkolonien; n. z. = nicht mehr zählbare Bakterienkolonien)

Candida albicans und 48 Sekunden Ozon Begasung

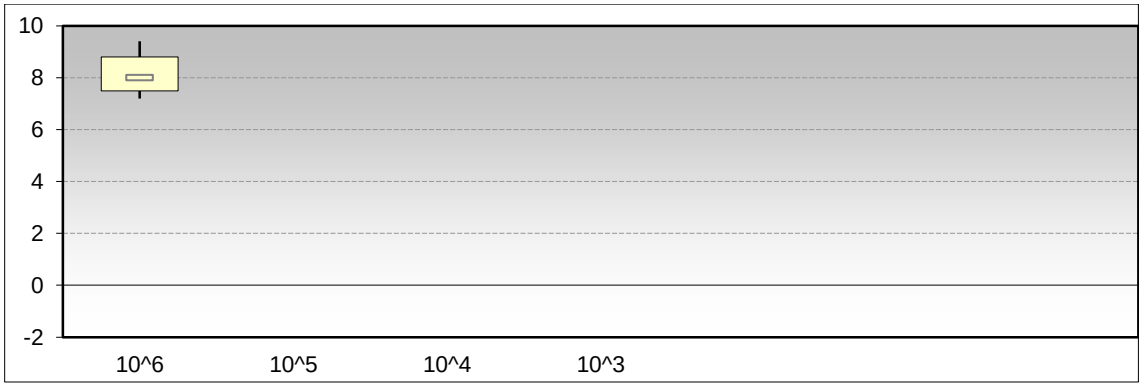

Abb. 51: Bei der Ozonbegasung der Candida ist im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Keimzahlreduktion erkennbar.

Candida albicans und 72 Sekunden Ozon Begasung

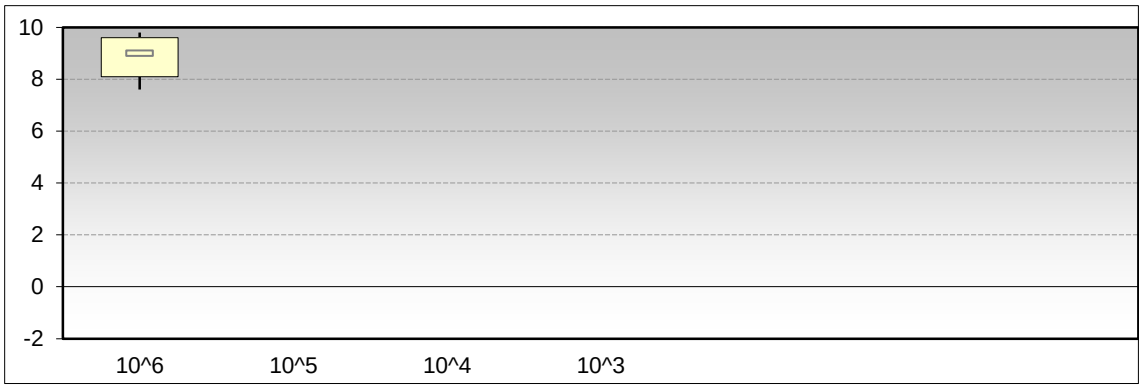

Abb. 52: Bei einer verlängerten Begasungszeit wurden keine Reduktionen verzeichnet.

Candida albicans Kontrolle

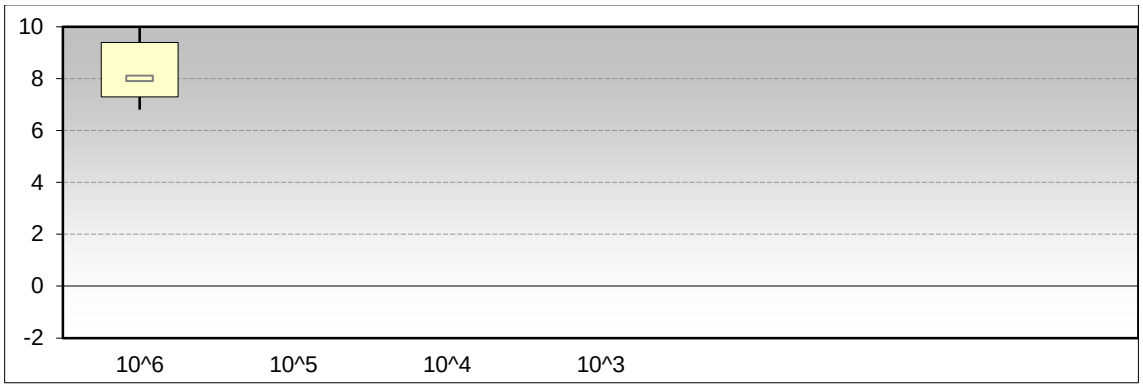

Abb. 53: vergleichende Kontrollgruppe

4.2.2 Wirksamkeit von 1%igem Chlorhexidin und der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie im Vergleich zu unterschiedlichen Ozonbegasungszeiten auf Escherichia coli, Staphylococcus aureus und Candida albicans

Im ersten Versuch wurden die Bakterien und der Pilz für 2 und 3 mal 24 Sekunden mit Ozon begast (auf Grund der Gerätevorgabe nicht individuell einstellbar). Im zweiten Versuch wurden noch zusätzlich die 1minütige Wirkung von 1%igem Chlorhexidin und einer antimikrobiellen Photodynamischen Therapie getestet.

4.2.2.1 Escherichia coli

Tabelle 4:

Escherichia coli Vergleich der unterschiedlichen Desinfektionsmaßnahmen

	48 sec		72 sec		1%Chlorhexamed		aPDT		Kontrolle		
Verdünnungen	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Einheit
6.	0	0	0	0	0	0	1,88	0,483	5,36	0,265	10^8 KbE/ ml
5.	0	0	0	0	0	0	13	0,8	n.z.	n.z.	10^7 KbE/ ml
4.	0,08	0,160	0	0	0	0	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^6 KbE/ ml
3.	1,16	0,612	0,24	0,320	0	0	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^5 KbE/ ml
2.	5,48	0,652	4,88	0,601	0	0	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^4 KbE/ ml
1.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	0	0	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^3 KbE/ ml

(0 = keine Bakterienkolonien; n. z. = nicht mehr zählbare Kolonien)

48 Sekunden Ozon

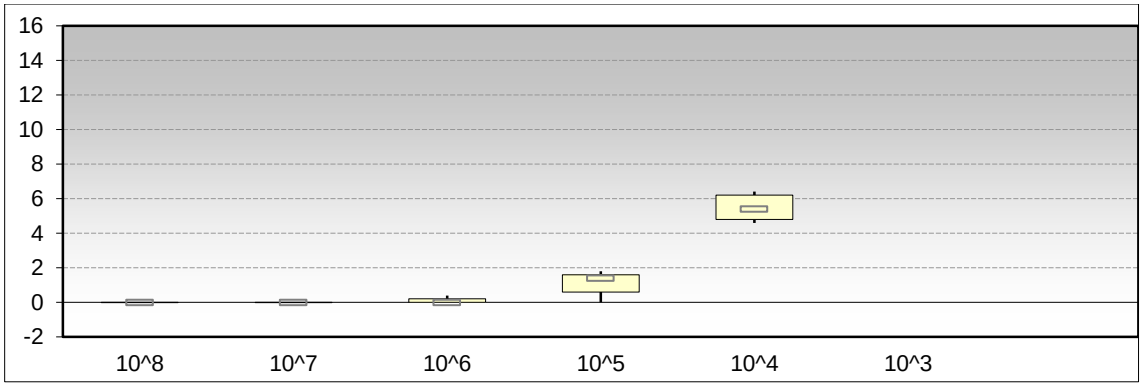

Abb. 45: Keimzahlreduktion um etwa Faktor 10^3

72 Sekunden Ozon

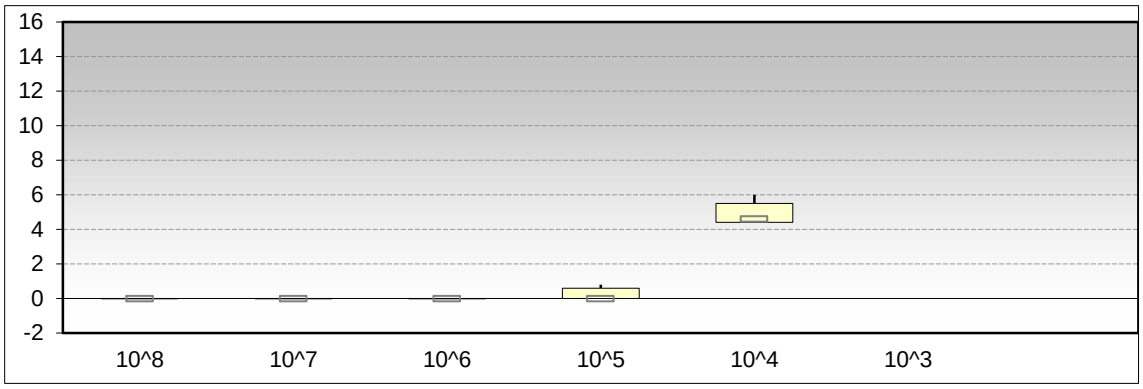

Abb. 46: Keimzahlreduktion um Faktor 10^3 bis 10^4

1% Chlorhexidin

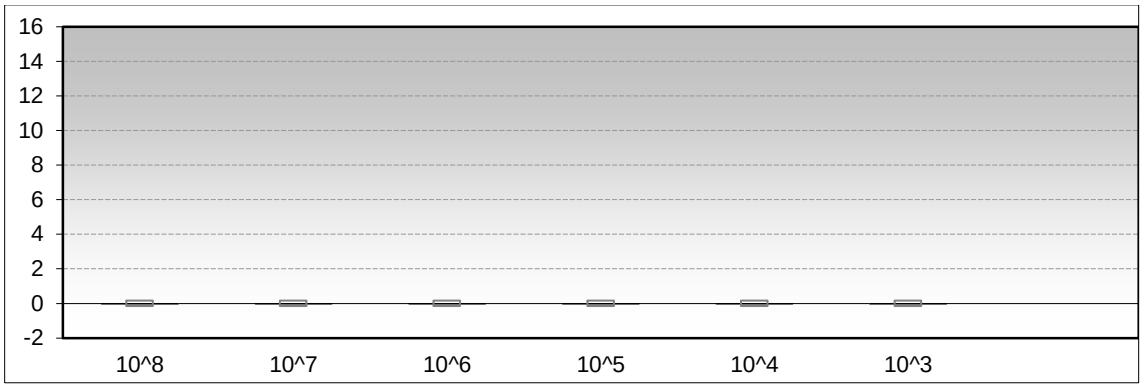

Abb. 54: Bei einer 1minütigen Anwendung von 1%igem Chlorhexidin ist eine eindeutige Keimelemination erkennbar.

antimikrobielle Photodynamische Therapie

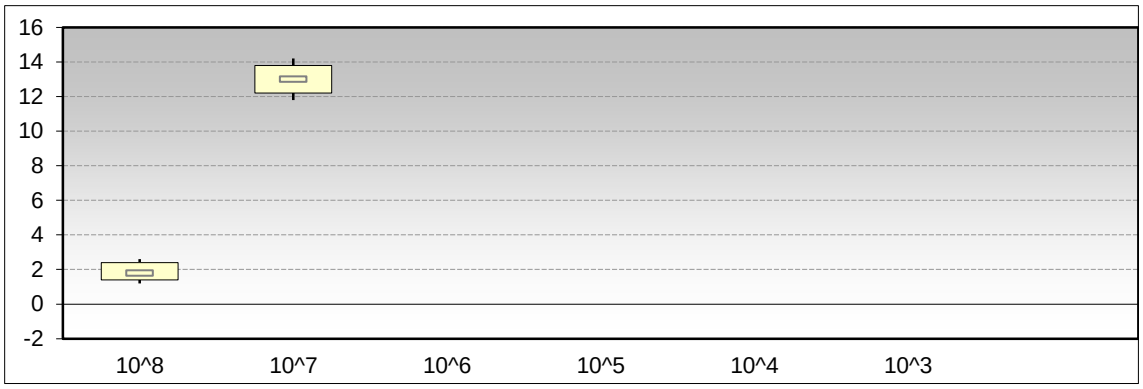

Abb. 55: Die Anwendung der aPDT hatte keine signifikante Keimzahlreduktion erzielt.

Escherichia coli Kontrolle

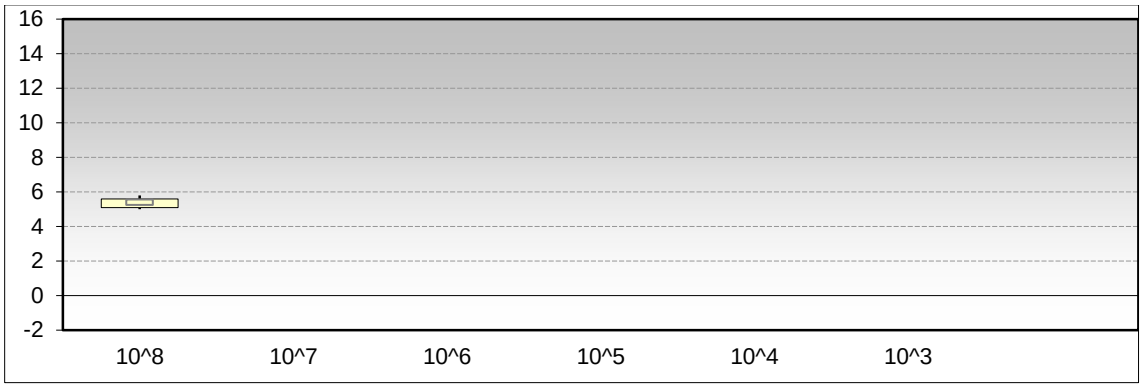

Abb. 47: Vergleichskontrolle

In der tabellarischen (Tab. 4) sowie in den grafischen (Abb. 45, 46, 47, 54 und 55) Darstellungen wird die hohe Effektivität des 1%igem Chlorhexidins auf Escherichia coli deutlich. Das Ozon hatte lediglich eine reduzierende Wirkung und die antimikrobielle Therapie erzielte keinen messbaren Erfolg beim Escherichia coli.

4.2.2.2 Staphylococcus aureus

Tabelle 5:

Staphylococcus aureus Vergleich der unterschiedliche Desinfektionsmaßnahmen

	48 sec		72 sec		1% Chlorhexamed		aPDT		Kontrolle		
Verdünnungen	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Einheit
6.	0	0	0	0	0	0	1,72	0,574	2,52	0,601	10^8 KbE/ ml
5.	0,4	0,08	0	0	0	0	13,2	1,035	15,28	1,366	10^7 KbE/ ml
4.	1,84	0,344	0	0	0	0	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^6 KbE/ ml
3.	16,28	1,197	0,52	0,299	0	0	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^5 KbE/ ml
2.	n.z.	n.z.	3,56	0,662	0	0	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^4 KbE/ ml
1.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	0	0	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^3 KbE/ ml

(0 = keine Bakterienkolonien; n. z. = nicht mehr zählbare Kolonien)

48 Sekunden Ozon

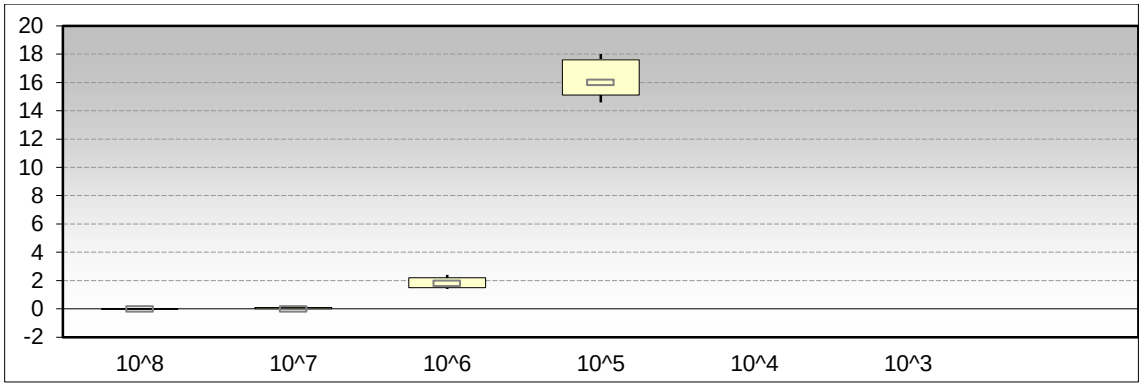

Abb. 48: Keimzahlreduktion um den Faktor 10^2

72 Sekunden Ozon

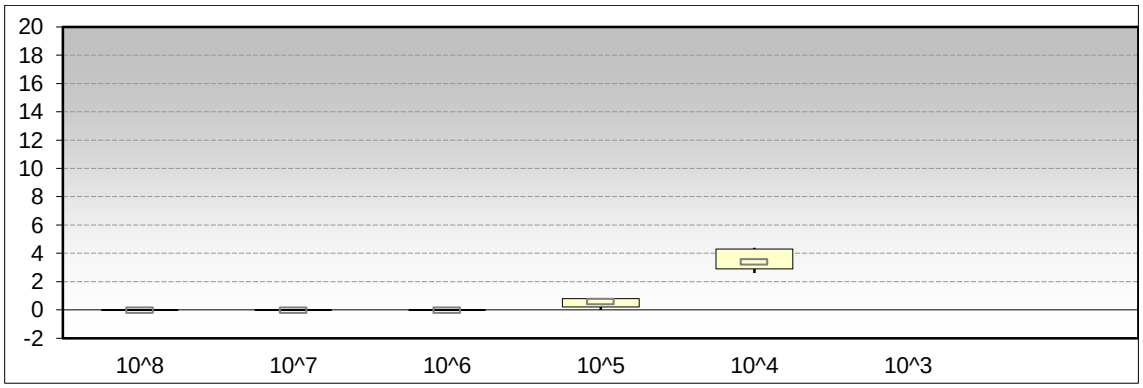

Abb. 49: Keimzahlreduktion um den Faktor 10^3

1% Chlorhexidin

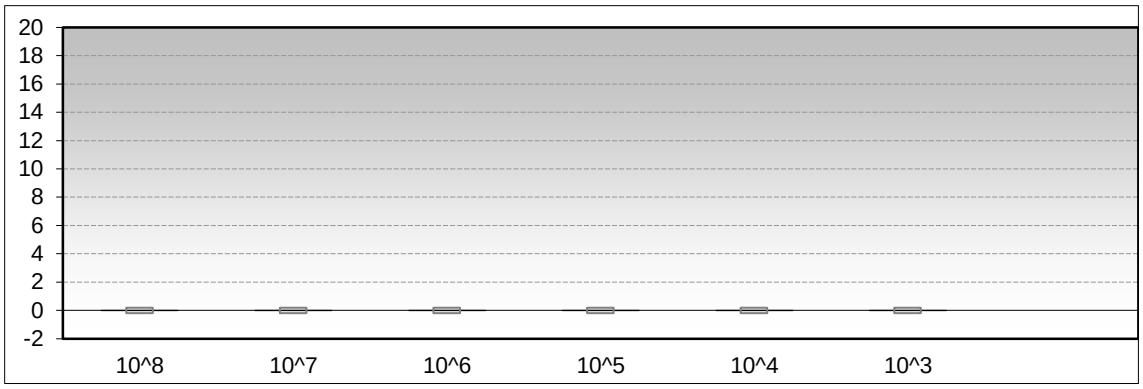

Abb. 56: Bei einer 1minütigen Anwendung von 1%igem Chlorhexidin ist eine eindeutige Keimelemination erkennbar.

antimikrobielle Photodynamische Therapie

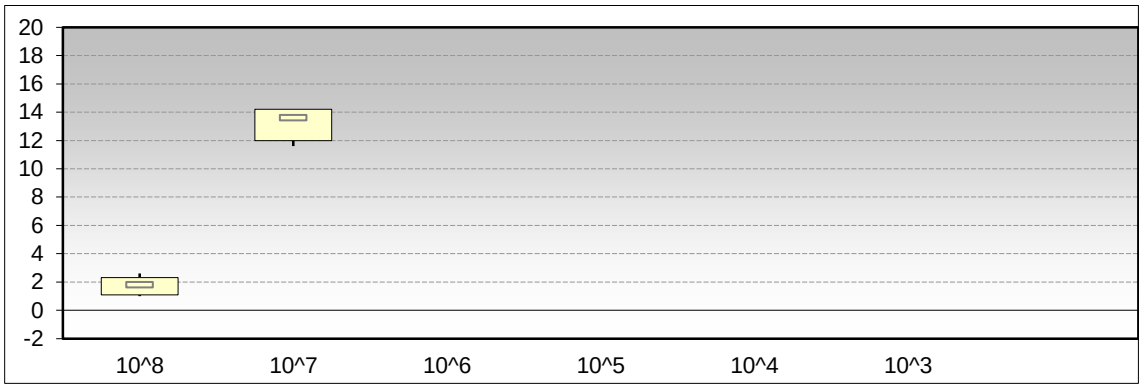

Abb. 57: Die Anwendung der aPDT hatte keine signifikante Keimzahlreduktion erzielt.

Staphylococcus aureus Kontrolle

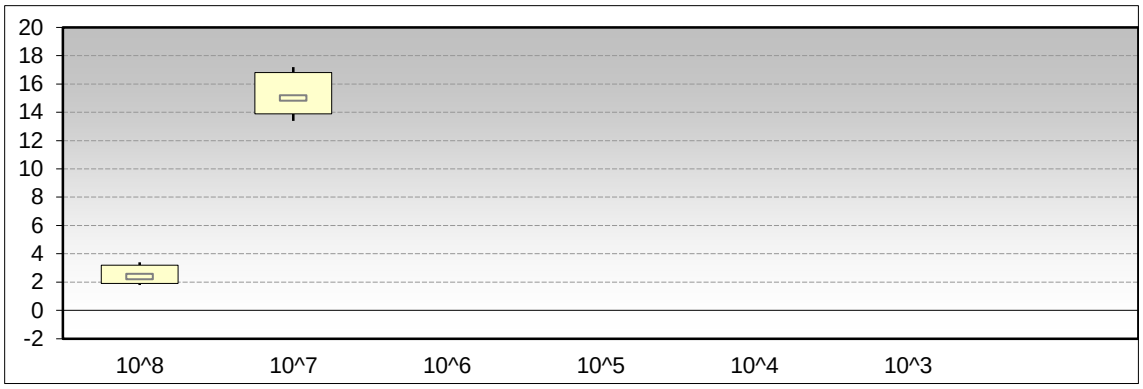

Abb.: 50 Vergleichskontrolle

Die tabellarische (Tab. 5) sowie die grafischen Darstellungen (Abb. 48, 49, 50, 56 und 57) verdeutlichen die hohe Effektivität des 1%igem Chlorhexidins auf Staphylococcus aureus. Auch beim Staphylococcus aureus hat Ozon lediglich eine reduzierende Wirkung. Die antimikrobielle Therapie erzielte keinen messbaren Erfolg beim Staphylococcus aureus.

4.2.2.3 Candida albicans

Tabelle 6:

Candida albicans Vergleich der unterschiedlichen Desinfektionsmaßnahmen

	48 sec		72 sec		1% Chlorhexamed		aPDT		Kontrolle		
Verdünnungen	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Einheit
4.	8,12	0,722	8,88	0,755	0	0	9,16	0,975	8,28	1,07	10^6 KbE/ ml
3.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	0	0	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^5 KbE/ ml
2.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	0	0	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^4 KbE/ ml
1.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	0	0	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^3 KbE/ ml

(0 = keine Kolonienbildung; n. z. = nicht mehr zählbare Kolonienbildung)

48 Sekunden Ozon

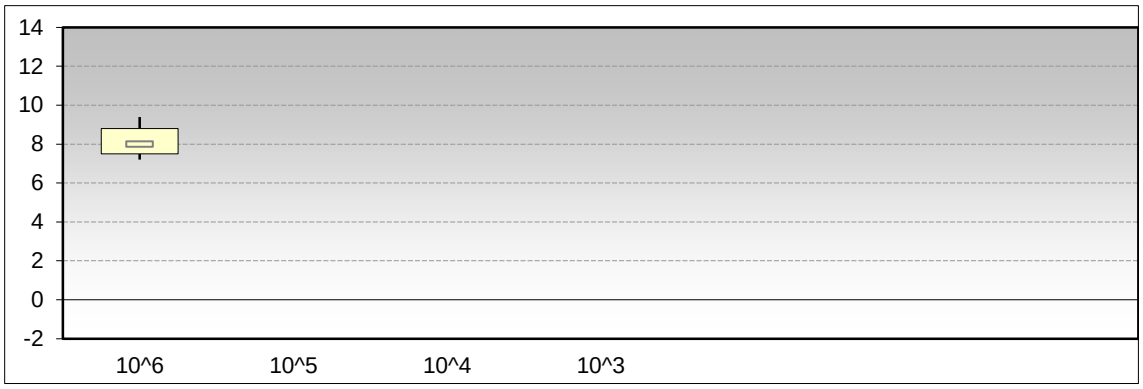

Abb. 51: Bei der Ozonbegasung der Candida ist keine Keimzahlreduktion erkennbar.

72 Sekunden Ozon

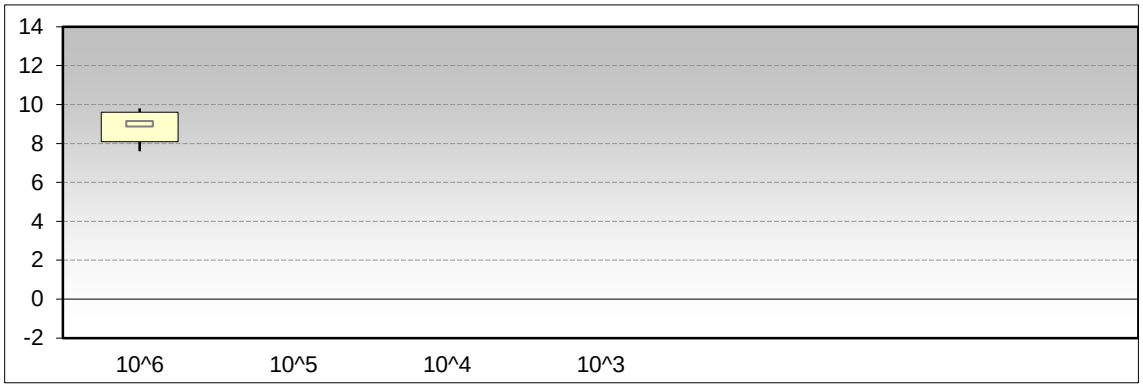

Abb. 52: Bei einer verlängerten Begasungszeit sind keine Reduktionen zu verzeichnen.

1% Chlorhexidin

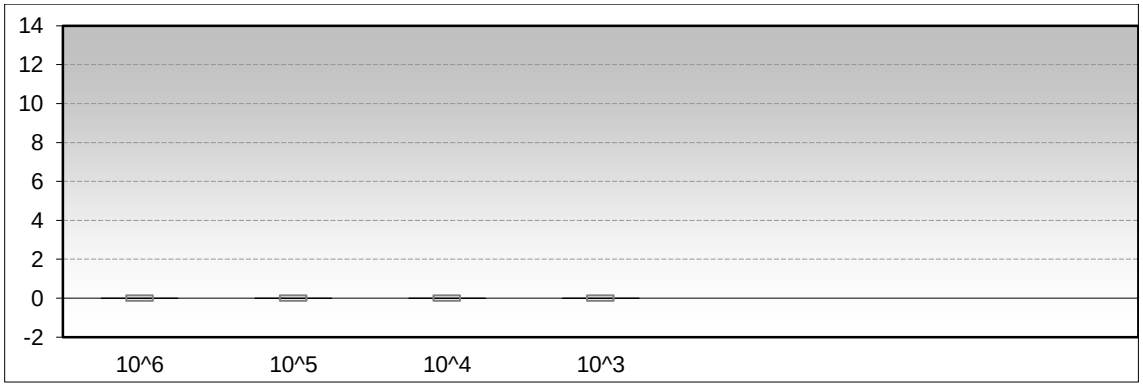

Abb.: 58 vollständige Keimzahleleminierung

antimikrobielle Photodynamische Therapie

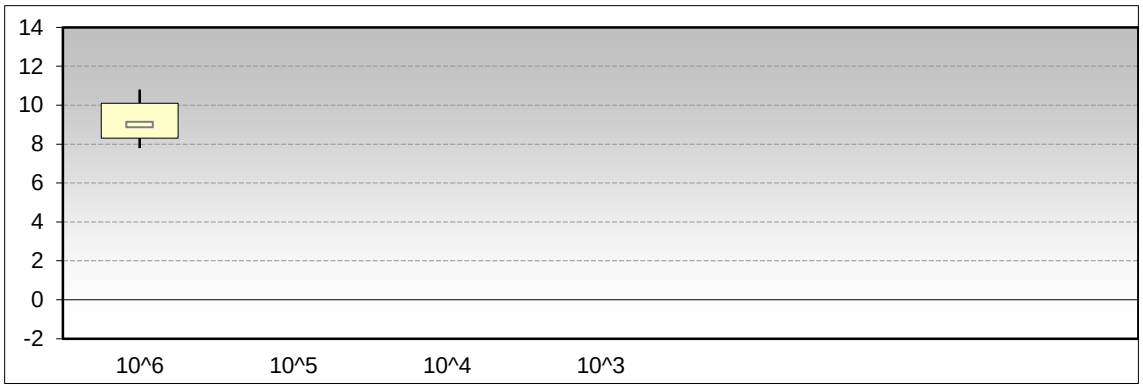

Abb.: 59 keine Keimzahlreduktion mittels antimikrobieller Photodynamischer Therapie erzielt

Candida albicans Kontrolle

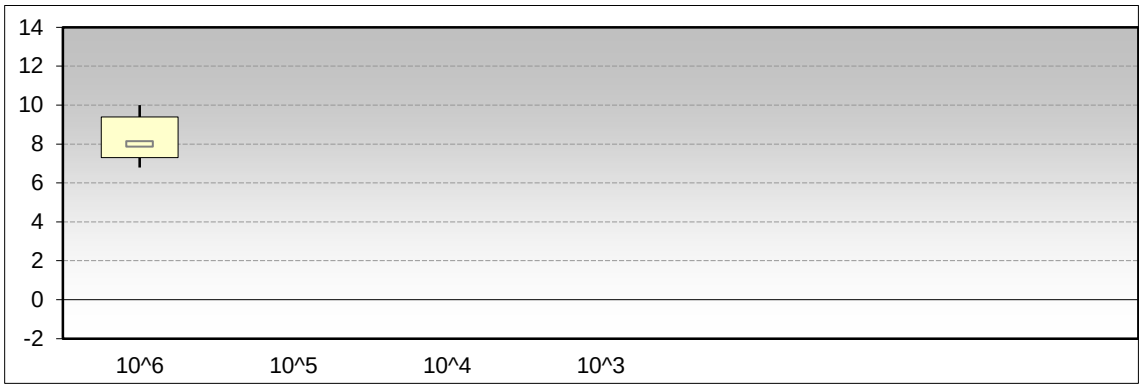

Abb. 53: vergleichende Kontrollgruppe

Das einzige Desinfektionsmittel im Fall der Candida albicans, welches eine 100%ige Wirkung hatte, war das 1%ige Chlorhexidin. Weder bei der Ozonbegasung noch bei der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie sind Keimzahlreduktionen messbar.

4.2.3 Vergleich 48 und 72 Sekunden Ozonbegasung auf Escherichia coli, Staphylococcus aureus und Candida albicans

Im direkten Vergleich der unterschiedlichen Einwirkzeiten von Ozon auf Escherichia coli und Staphylococcus aureus ist erkennbar, dass beim gramnegativen Bakterium keine signifikantere Keimzahlreduktion mit verlängerter Ozon Einwirkzeit einhergeht. Beim Staphylococcus aureus ist eine erhöhte Keimzahlreduktion im direkten Vergleich der unterschiedlichen Begasungszeit von 48 zu 72 Sekunden zu verzeichnen, was auf die stabilere Bakterienmembran zurückzuführen sein könnte, da erst durch die längere Begasungszeit die Ozonkonzentration an den grampositiven Bakterienmembranen so hoch ist, dass durch Schädigung der Zellmembranen es nachweislich zur Keimzahlreduktion kommt. Beim Pilzvertreter ist keine messbare Beeinflussung durch eine Ozonbegasung zu verzeichnen.

Tabelle 7:

Vergleich der unterschiedlichen Ozonbegasungszeiten

	48 sec E.coli		72 sec E.coli		Kontrolle E.coli		48 sec Staph.		72 sec Staph.		Kontrolle Staph.		
Verdünnungen	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Einheit
6.	0	0	0	0	5,36	0,265	0	0	0	0	2,52	0,601	10^8 KbE/ ml
5.	0	0	0	0	n.z.	n.z.	0,4	0,08	0	0	15,28	1,366	10^7 KbE/ ml
4.	0,08	0,160	0	0	n.z.	n.z.	1,84	0,344	0	0	n.z.	n.z.	10^6 KbE/ ml
3.	1,16	0,612	0,24	0,320	n.z.	n.z.	16,28	1,197	0,52	0,299	n.z.	n.z.	10^5 KbE/ ml
2.	5,48	0,652	4,88	0,601	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	3,56	0,662	n.z.	n.z.	10^4 KbE/ ml
1.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^3 KbE/ ml

	48 sec Candida		72 sec Candida		Kontrolle Candida		
Verdünnungen	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Einheit
4.	8,12	0,722	8,88	0,755	8,28	1,07	10^6 KbE/ ml
3.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^5 KbE/ ml
2.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^4 KbE/ ml
1.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^3 KbE/ ml

(0 = keine Kolonienbildung; n. z. = nicht mehr zählbare Kolonienbildung)

Escherichia coli

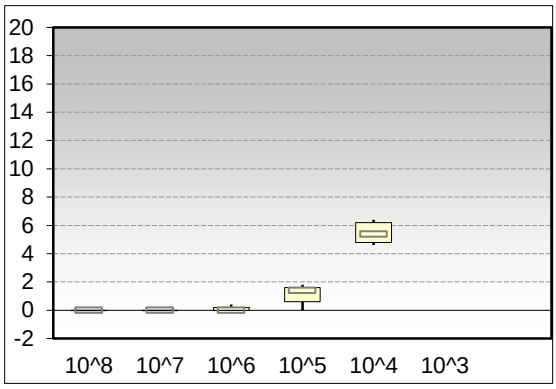

Abb. 45: 48 Sekunden

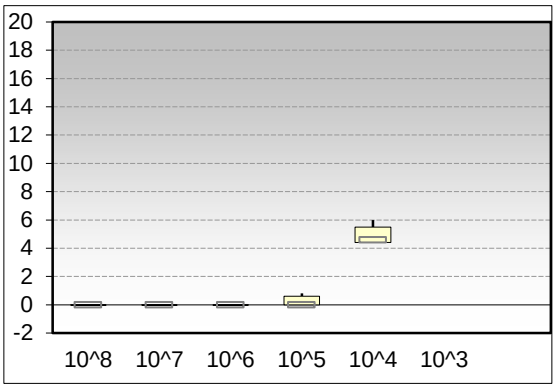

Abb. 46: 72 Sekunden

Staphylococcus aureus

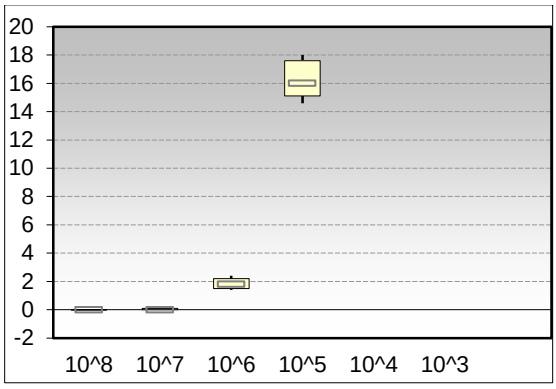

Abb. 48: 48 Sekunden

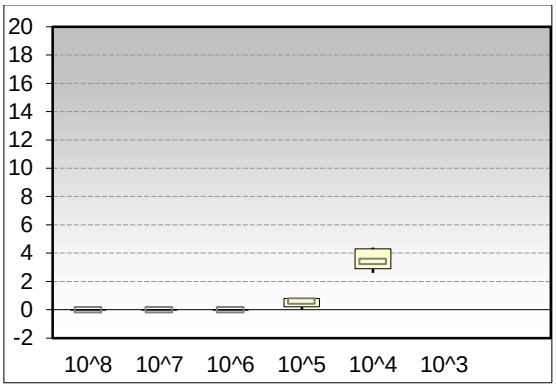

Abb. 49: 72 Sekunden

Candida albicans

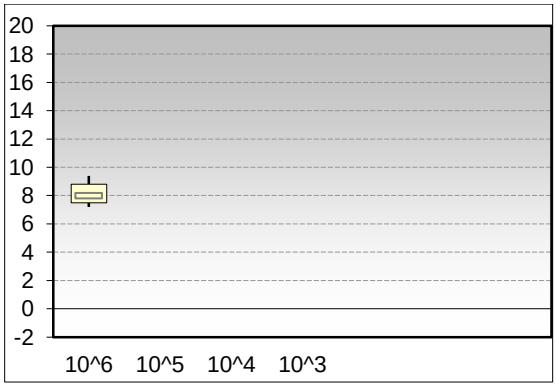

Abb. 51: 48 Sekunden

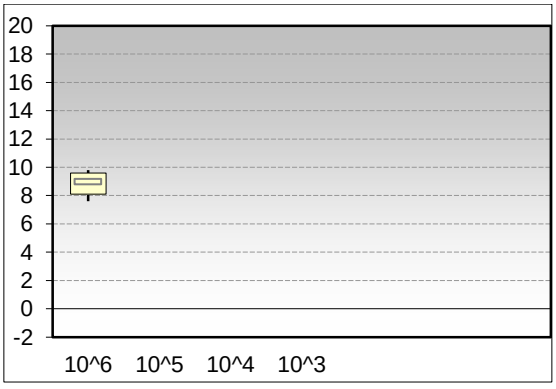

Abb. 52: 72 Sekunden

4.2.4 Vergleich der Mikroorganismen mit 1% Chlorhexidin

In den Grafiken wird deutlich gezeigt, dass die drei getesteten Mikroorganismen vollständig reduziert wurden durch die 1 minütige Einwirkzeit von 1%igem Chlorhexidin. In der Tabelle 8 sind die Kontrollwerte als Referenz gegenüber gestellt.

Tabelle 8:

Vergleich des 1%igem Chlorhexidins

	1% CHX E.coli		Kontrolle E.coli		1% CHX Staph.		Kontrolle Staph.		1% CHX Candida		Kontrolle Candida		
Verdünnungen	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Einheit
6.	0	0	5,36	0,265	0	0	2,52	0,601					10^8 KbE/ ml
5.	0	0	n.z.	n.z.	0	0	15,28	1,366					10^7 KbE/ ml
4.	0	0	n.z.	n.z.	0	0	n.z.	n.z.	0	0	8,28	1,07	10^6 KbE/ ml
3.	0	0	n.z.	n.z.	0	0	n.z.	n.z.	0	0	n.z.	n.z.	10^5 KbE/ ml
2.	0	0	n.z.	n.z.	0	0	n.z.	n.z.	0	0	n.z.	n.z.	10^4 KbE/ ml
1.	0	0	n.z.	n.z.	0	0	n.z.	n.z.	0	0	n.z.	n.z.	10^3 KbE/ ml

(0 = keine Kolonienbildung; n. z. = nicht mehr zählbare Kolonienbildung)

Escherichia coli

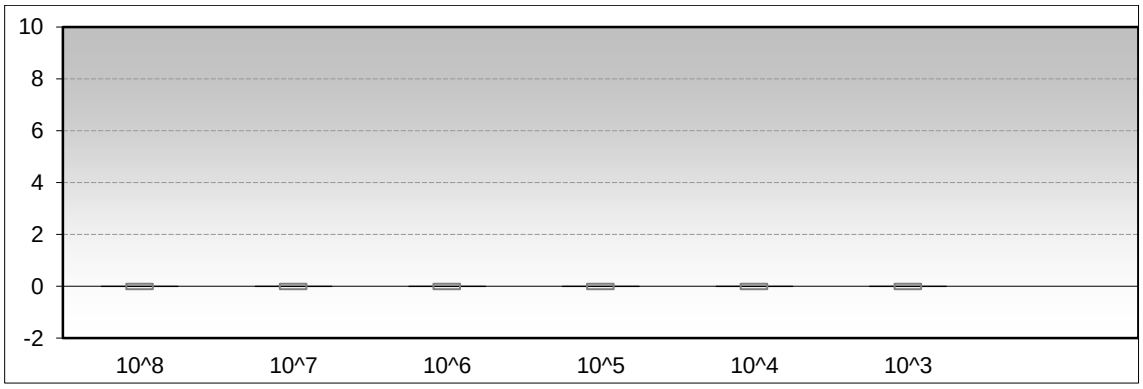

Abb. 54: 1 minütige Einwirkzeit 1%iger Chlorhexidinlösung

Staphylococcus aureus

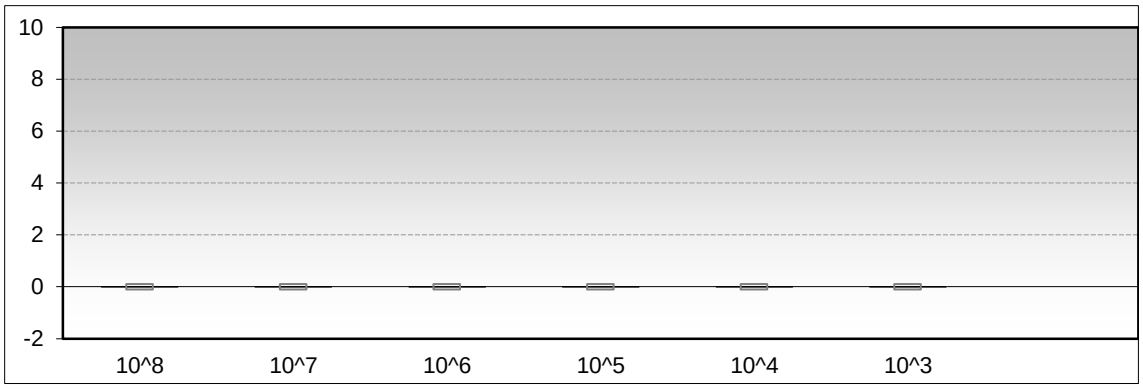

Abb. 56: 1 minütige Einwirkzeit 1%iger Chlorhexidinlösung

Candida albicans

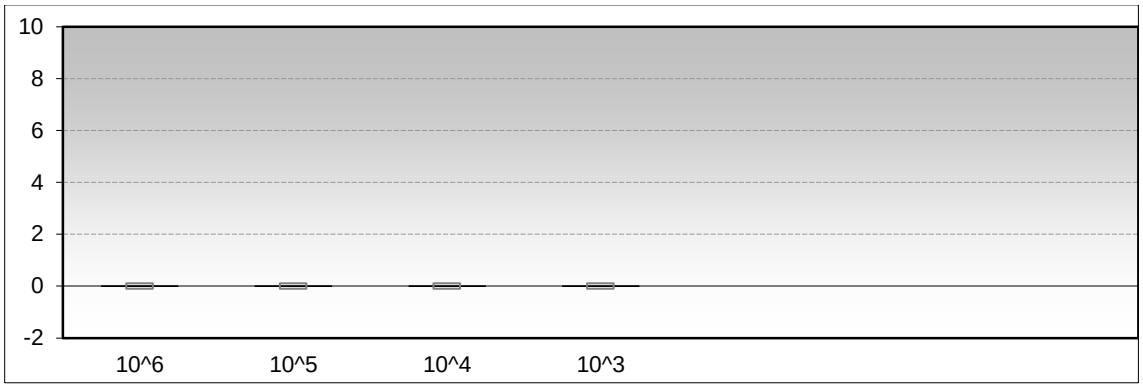

Abb. 58: 1 minütige Einwirkzeit 1%iger Chlorhexidinlösung

4.2.5 antimikrobielle Photodynamische Therapie im Vergleich

Die Anwendung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie erzielte bei keinem ausgewählten Mikroorganismus eine reduzierende Wirkung.

Tabelle 9:

Vergleich der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie

	aPDT E.coli		Kontrolle E.coli		aPDT Staph.		Kontrolle Staph.		aPDT Candida		Kontrolle Candida		
Verdünnungen	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	Einheit
6.	1,88	0,483	5,36	0,265	1,72	0,574	2,52	0,601					10^8 KbE/ ml
5.	13	0,8	n.z.	n.z.	13,2	1,035	15,28	1,366					10^7 KbE/ ml
4.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	9,16	0,975	8,28	1,07	10^6 KbE/ ml
3.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^5 KbE/ ml
2.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^4 KbE/ ml
1.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	n.z.	10^3 KbE/ ml

(0 = keine Kolonienbildung; n. z. = nicht mehr zählbare Kolonienbildung)

Escherichia coli

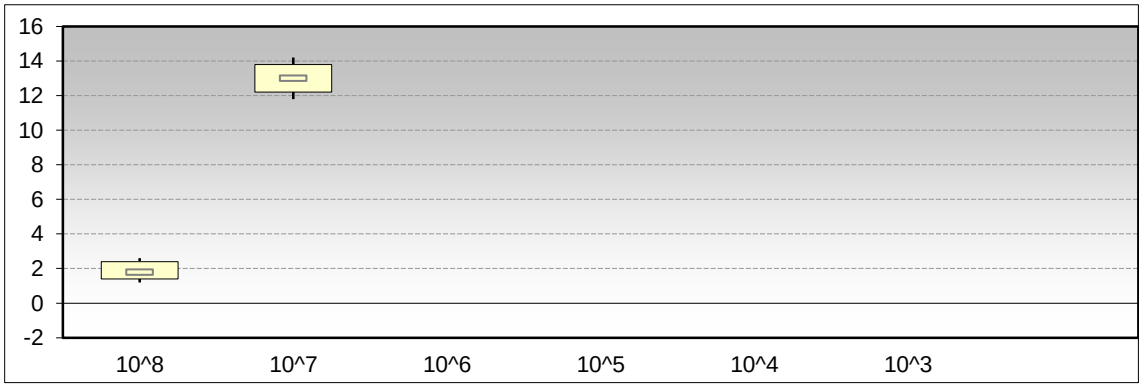

Abb. 55: aPDT ohne messbare Wirkung im Vergleich zur Escherichia coli Kontrollgruppe (Abb. 47).

Staphylococcus aureus

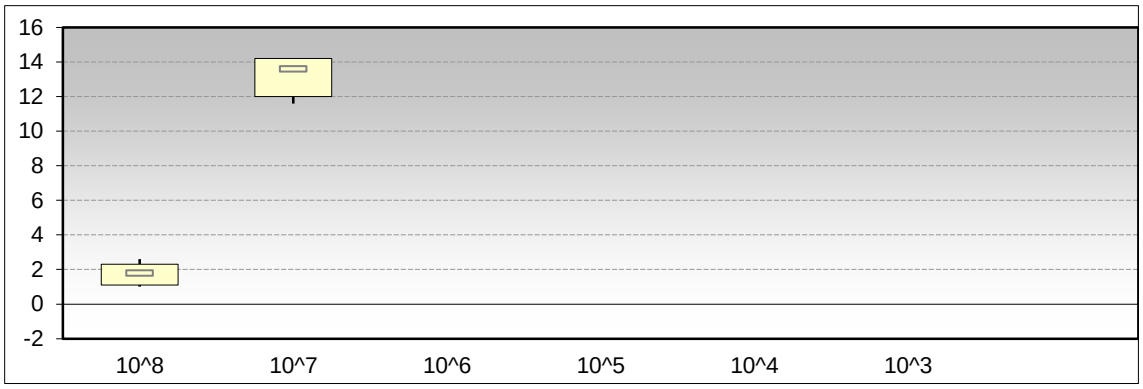

Abb. 57: aPDT ohne zählbare Wirkung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 50).

Candida albicans

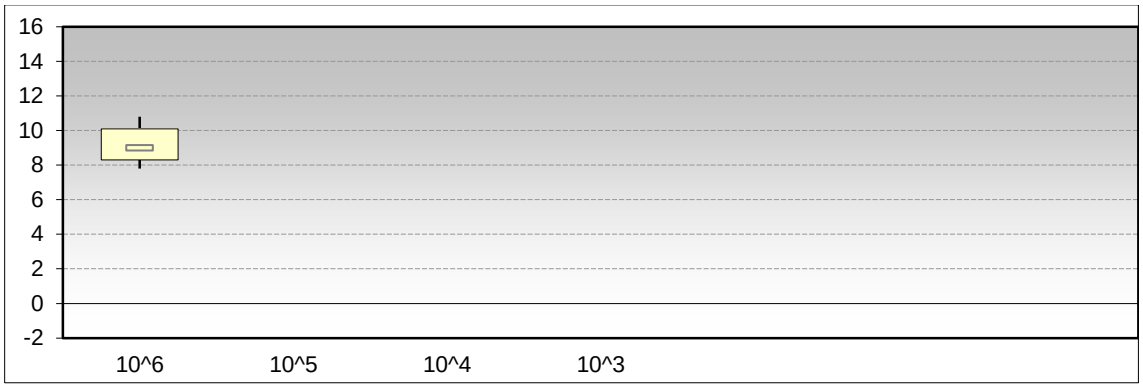

Abb. 59: aPDT keine reduzierende Wirkung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 53).

5 Diskussion

5.1 Kritische Betrachtung der qualitativen Versuche

Die qualitativen Versuche ließen lediglich erkennen, ob eine Desinfektionswirkung erzielt wurde. Die Blutagarplatten, Müller-Hinton-Platten und die Sabouraudplatten dienten in diesen Versuchen als Nährmedium und sind vergleichbar mit festen Oberflächen auf denen sich Biofilme etablieren können. Die Wirksamkeit der unterschiedlichen Desinfektionsmaßnahmen und –mittel gegen Biofilme ist in diesen Fällen vergleichbar mit intraoralen Oberflächen und den darauf befindlichen Biofilmen. Da diese qualitativen Versuche jedoch nichts über die Quantität der Wirksamkeit von Desinfektionsmethoden aussagen, sind weitere Versuche mit sogenannten Verdünnungsreihen durchgeführt worden.

Bei der Begasung von Mikroorganismen mit Ozon aus einem Ozongenerator wurde eine sterile Eingrenzung verwendet, um das flüchtige Gas konzentriert einwirken zu lassen. In diesem Bereich ist auch hier eine qualitative Aussage über die Wirksamkeit zu treffen, doch fehlt die quantitative Aussage über die Effektivität (Abb. 38 und 39).

Die Wirkung von Chlorhexidin gegen alle Mikroorganismen ist in den Versuchen eindeutig sichtbar. Die quantitative Wirkung beträgt in allen Fällen 100%ige Keimzahlreduktion bezogen auf die Ausgangswerte (Abb. 40 und 41).

Bei der Desinfektion der Candida albicans beimpften Sabouraudplatten mittels antimikrobieller Photodynamischer Therapie ist aufgefallen, dass es keine Reduktion der Mikroorganismen gab (Abb. 44). Es ist ein flächiges Wachstum über den gesamten Nährboden erkennbar. Dies könnte mit dem sauren pH-Wert des Photosensitizers zusammen hängen. Die qualitative Wirksamkeit der antimikrobiellen Photo-dynamischen Therapie gegen die beiden ausgewählten Bakterienarten ist auf den Müller-Hinton-Platten eindeutig erkennbar. Nach der photodynamische Behandlung, bei der lediglich der Laser zum Einsatz kam, fand trotzdem ein Bakterienwachstum statt. In dem gekennzeichneten Bereich, der nur mit dem Photosensitizer bestrichen

wurde, kann man eine bakterienfreie Zone erkennen. In dem Bereich, der zusätzlich zum Photosensitizer mit Laserlicht bestrahlt wurde (Abb. 42 und 43) ist ebenfalls eine Bakterienreduktion erkennbar. Der Unterschied zwischen den mit Photosensitizer behandelten Bereichen ist nicht visualisierbar. Man kann hier von einer Beeinflussung der Mikroorganismen durch die saure Wirkung des Methylenblaus ausgehen, da auch ohne Laserlicht eine Bakterienreduktion stattfand (Abb. 42 und 43). Schlussfolgernd ist die antimikrobielle Photodynamische Therapie nur mit der Applikation des Photosensitizers zielführend. Das Laserlicht alleine hat keinerlei Einfluss auf das Verhalten der Bakterien.

5.2 Kritische Betrachtung der quantitativen Versuche

In den weiterführenden Versuchen wurden sogenannte Verdünnungsreihen der Bakterien und des Pilzes hergestellt, mit denen man die Wirksamkeit unterschiedlicher Präparate und Verfahren quantifizieren und Vergleiche ziehen konnte. Der größte Unterschied der qualitativen und quantitativen Versuche ist die Form, in der die Mikroorganismen vorkommen und behandelt wurden. Auf den verschiedenen Platten wurden die Bakterien und der Pilz flächig appliziert und konnten gegebenenfalls auf den Nährböden wachsen und sich organisieren, wie es auf organischen Oberflächen in Form eines Biofilms möglich ist. In den Verdünnungsreihen lagen die Bakterien frei vor, wie es in planktonischen Lösungen der Fall ist. Die Bakterien schwammen dort zumeist frei in wässrigen Natriumchloridlösungen. Die Desinfektionsmaßnahmen haben folglich eine andere Wirkung auf die Mikroorganismen. In vergleichbaren Studien ging es um die unterschiedliche Wirksamkeit von Antibiotika auf Bakterien und deren Bakterienaktivität zum einen in organisierten Biofilmen und zum anderen in planktonischen Lösungen [56], [117]. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass es unterschiedliche Wirksamkeiten gab, doch das für die Effektivität ausschlaggebende Kriterium war das Vorhandensein von sogenannten „persister cells“.

Im Versuch 3.2.2.1 wurde die Ozonwirkung in Abhängigkeit unterschiedlicher Begasungszeiten auf Bakterien und Candida albicans getestet. Die verlängerte Begasungszeit hatte eindeutig positiven Effekt auf die grampositiven Bakterien, das

heißt die Keimzahlreduktion war größer, je länger Ozon einwirkte (Abb. 48 und 49). Bei den gramnegativen Bakterien war schon bei geringer Begasungszeit ein positives Ergebnis erzielt worden. Die Bakterienreduktion hatte sich nicht signifikant erhöht mit verlängerter Begasungszeit (Abb. 45 und 46). In einer Studie der Salzburger Universität wurde bereits gezeigt, mit der Verlängerung der Begasungszeit nimmt die Bakterienreduktion exponentiell zu. Sie führten mit dem gleichen Ozongenerator ähnliche Versuche im April 2009 mit Bakterien in Flüssigkulturen und auf Agarplatten durch. Ihre Versuche zeigten ebenfalls, dass die vom Gerät fest vorgegebenen 6, 12, 18 und 24 Sekunden Ozonbegasungszeit zu gering sind, um effektiv Einfluss auf die Bakterien zu nehmen. Ihre Empfehlung ist eine 5- bis 7-fache Erhöhung der Begasungszeit mit Ozon, abhängig von der Bakterienart und ob die Bakterien in Biofilmen oder in Flüssigkulturen vorliegen [32].

Auf Candida albicans war kein Positiveffekt bei der Ozonbegasung zu verzeichnen (Tab. 3 und Abb. 51, 52 und 53). Diese Erkenntnis könnte mit der stabilen Zellwand, die aus Chitin besteht, zusammenhängen. Chitin ist ein Polysaccharid, welches aus Acetylglucosamin-Einheiten aufgebaut ist. Es ist vergleichbar mit Cellulose. Die stärkeren Wasserstoffbrückenbindungen beim Chitin entstehen durch die Acetamidogruppen, die anstelle der Hydroxygruppen stehen, dadurch ist Chitin deutlich stabiler und in wässrigen Lösungen und organischen Lösungsmitteln unlöslich. In stark ionischen Lösungen kommt es zu einer Depolymerisation des Chitins [20].

Die hohe und effektive Wirksamkeit von Chlorhexidin auf die ausgewählten Vertreter der gramnegativen und grampositiven Bakterien und Candida albicans ist in den Versuchen, die im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit durchgeführt wurden, eindeutig nachgewiesen (Tab. 8 und Abb. 54, 56 und 58). Diese Ergebnisse entsprechen den zahlreichen Studien, die zum Thema Chlorhexidin und dessen Wirksamkeit bereits durchgeführt wurden [101], [105], [113].

Chlorhexidin wirkt auf Bakterien antiseptisch. Es gliedert sich in die Bakterienmembranen ein, in dem es Membranmoleküle verdrängt. Durch diese Membranstörungen kommt es anschließend zur Ausfällung cytoplasmatischer Proteine. Dieses Antiseptikum verändert Membranen, zerstört diese oder beeinflusst

den mikrobiellen Stoffwechsel. Durch die hohe Substantivität von Chlorhexidin an der Mundschleimhaut und den Zahnoberflächen, kann es lange vor Ort wirken „slow release“. Es wird nicht absorbiert von der Mundschleimhaut und hat daher auch keine systemische Wirkung [28], [42], [59].

Die Wirksamkeit gegen Candida albicans erklärt sich durch die Depolymerisation des Chitins. Chlorhexidindigluconat liegt in neutral wässriger Lösung zweifach positiv geladen vor. In dieser ionischen Lösung kommt es zur Depolymerisation des Chitins, welches die Pilzzellwand bildet. Diese Depolymerisation beeinflusst die Zellwandstabilität und somit ist die Wirkung des Chlorhexidins gegen Candida albicans erklärbar [7], [20], [101].

Die antimikrobielle Photodynamische Therapie hat bei keiner Versuchsdurchführung mit Flüssigkulturen Wirkung gezeigt. Wie in den tabellarischen und grafischen Darstellungen (Tab. 9 und Abb. 55, 57 und 59) zu erkennen, gab es weder bei den gramnegativen und grampositiven Bakterien noch bei Candida albicans Keimzahlreduktionen. Bei den qualitativen Versuchen konnte man Keimzahlreduktionen erkennen, daher sollten diese quantitativ bestimmt werden. Mikroorganismen in Flüssigkulturen liegen wie in planktonischen Lösungen vor und haben daher ein anderes Verhalten, als auf festen Oberflächen und Nährböden, wie es bei den qualitativen Versuchen der Fall war [56]. In verschiedenen Studien ist die Effektivität der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie nachgewiesen und belegt worden. In diesen Versuchen wurde die Behandlung stets auf festen Oberflächen durchgeführt. Die antimikrobielle Photodynamisch Therapie wirkte direkt auf den vorherrschenden Biofilm, der sich in planktonischen Lösungen nicht ausbilden kann. In vielen Studien wird die antimikrobielle Photodynamische Therapie als Alternative zur Antibiotikatherapie gesehen und weiter in vitro und vivo getestet [2], [22], [31], [134].

5.3 Kritische Betrachtung der Anwendung von Ozon, Chlorhexidin und der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie bei verschiedenen Erkrankungen

5.3.1 Parodontitis

Die 4. Mundgesundheitsstudie von 2006 zeigt eine deutliche Prävalenz der neuen „Volkskrankheit“ Parodontitis. Im Vergleich zur 3. Mundgesundheitsstudie von 1997 ist eine deutliche Zunahme der Parodontopathien vor allem bei den Erwachsenen und Senioren zu verzeichnen. Im Vergleich der 35- bis 44jährigen im Jahr 1997 und 2005 ist die Erkrankung an einer mittelschweren Parodontitis von 32,2% 1997 auf 52,7% 2005 angestiegen. Und bei der schweren Parodontitis stieg die Zahl der Erkrankungen in dieser Altersgruppe um 6,4% von 14,1% auf 20,5%. Dieser Negativanstieg ist auch der guten Kariesprophylaxe und der umfangreichen konservierenden und prothetischen Zahnrestaurationen zu zuschreiben, da in dieser Altersgruppe deutlich mehr Zähne erhalten sind. Doch jeder Zahn, der länger in der Mundhöhle verweilt und in Funktion steht, unterliegt einem erhöhten Risiko an einer Form der Parodontitis zu erkranken. Bei den Senioren ist die Parodontitis mit 87,8% am weitesten verbreitet, davon sind 48,0% von einer mittelschweren Parodontitis betroffen und 39,7% von der schweren Erkrankungsform des Zahnhalteapparates. In dieser Altersgruppe kam es zu einem Negativanstieg um 23,7% seit der 3. Mundgesundheitsstudie von 1997 [75].

Anhand dieser 4. Mundgesundheitsstudie wird deutlich, wie sich die orale Mundgesundheit zu Ungunsten der Parodontitis verschiebt. Gleichzeitig zeigt diese Studie, welch großen Stellenwert die erfolgreiche Therapie dieser Erkrankung hat und in der Zukunft vermehrt haben wird [63], [75].

Parodontitis ist eine komplexe multifaktorielle Erkrankung, deren Entstehung und Progression primär dem Vorhandensein von parodontalen pathogenen Mikroorganismen im subepithelialen Biofilm zugeschrieben wird [128]. Parodontitis wird von zahlreichen ätiologischen Faktoren, wie Rauchen [52], [126], psychischer Stress, genetische Disposition, Medikation, systemischen Erkrankungen [40] und Zahnfehlstellungen, in ihrem Fortschreiten negativ beeinflusst. Diese Kofaktoren haben

großen Einfluss auf die immuninflammatorische Reaktion des Patienten. Folglich führen sie unbehandelt zu einer progressiven Destruktion des gesamten Parodonts, das bedeutet apikale Verschiebung des Saumenepithels, Attachmentverlust und Knochenresorption mit abschließendem Zahnverlust [59], [129].

Aber nicht nur die orale Beeinflussung durch die Manifestation einer Parodontitiserkrankung ist ausschlaggebend für eine umfangreiche Behandlung von Parodontopathien. In umfangreichen Studien wurde ein enger Zusammenhang zwischen parodontalen pathogenen Mikroorganismen und schweren systemischen Erkrankungen festgestellt [40]. So hat man einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Parodontitis und Diabetes mellitus festgestellt [35]. Die Prävalenz an einer Parodontitis zu erkranken ist dreimal höher bei Diabetikern als bei Nichtdiabetikern sowie auch die Inzidenz deutlich erhöht ist. Nicht nur das bei Diabetikern die Möglichkeit an einer Parodontitis zu erkranken erhöht ist, so ist auch der progressive Verlauf der Parodontopathien deutlich beschleunigt, was in Longitudinalstudien belegt ist. Im Umkehrschluss sind Patienten mit Parodontitis zweimal häufiger von Diabetes betroffen, als parodontal gesunde Menschen [35], [129].

Bei Schwangeren mit unbehandelten parodontalen Erkrankungen wurde eine signifikant höhere Prävalenz an Frühgeburten und untergewichtigen Neugeborenen festgestellt. Man hat parodontal pathogene Mikroorganismen entdeckt, die wehenauslösende Wirkung haben [96].

Es gibt Vermutungen, dass chronische und obstruktive Lungenerkrankungen sowie auch kardio- und zerebrovaskuläre Erkrankungen im Zusammenhang mit Parodontopathien stehen, um einige hier zu nennen. Der Zusammenhang zwischen kaubedingten entzündlichen Bakteriämien, besonders bei parodontal insuffizient behandelten Patienten, und Endokarditiden gilt heute als gesichert [40]. Man kann noch nicht in allen Fällen die Kausalität zwischen Parodontopathien und Allgemeinerkrankungen belegen, doch ist die beobachtete Häufigkeit der Zusammenhänge auffällig.

In der heutigen Zahnheilkunde haben sich die Prioritäten insoweit verändert, dass es allgemein gilt, die Zähne und das Parodont so lange zu erhalten wie es möglich ist. Um eine erfolgreiche Parodontitistherapie durchzuführen, müssen die eventuell vorhandenen Kofaktoren behandelt und die Mundhygiene optimiert werden. Die Compliance des Patienten ist gefordert und regelmäßige Motivationen sind unabdingbar. Erst wenn die äußeren Umstände es zulassen, kann in Form einer geschlossenen oder offenen Kürettage die Parodontitis behandelt werden. Zu den wichtigsten Maßnahmen zählt die mechanische Entfernung des supra- und infragingivalen Biofilms [48], [59]. Es gilt insgesamt die Anzahl der parodontalen pathogenen Keime auf den Zahnoberflächen, der Schleimhaut und der gesamten Mundhöhle zu minimieren, durch die „full mouth desinfection“ [15]. Diese Desinfektion wird in den meisten Fällen mittels Chlorhexidin durchgeführt und ist in zahlreichen Studien als das Mittel der Wahl beschrieben in der Behandlung von Parodontitis [28], [125], [132]. Bei persistierenden parodontalen Taschen werden mit viel Erfolg zur Langzeittherapie sogenannte Chlorhexidinchips, zum Beispiel Perio Chip®, in die Taschen eingelegt, die lokal gegen parodontal pathogene Mikroorganismen wirken sollen und somit die offene Parodontitistherapie vermeidbar machen könnten [59], [60].

In sehr schweren Fällen der Parodontitis, so zum Beispiel die aggressive Parodontitis mit persistierend aktiven Taschen, kann nach einem speziellen Antibiogramm auch Antibiotika systemisch oder lokal eingesetzt werden [102], [104]. Doch auf Grund der vermehrten Antibiotikaresistenzen [123] wird nach Alternativen auch in diesem Behandlungsbereich gesucht.

Zur Desinfektion der parodontalen Taschen wird immer wieder Ozon eingesetzt. Nach der mechanischen Entfernung des Biofilms und Debridements werden die parodontalen Taschen mit Ozon begast, um die noch darin enthaltenen parodontalen pathogenen Keime zu eliminieren. Die tägliche Applikation von ozoniertem Wasser fördert vor allem in den ersten 48 Stunden die epitheliale Wundheilung. Auf Grund der oxidativen Wirkung des Ozons wird die Durchblutung des Gewebes gesteigert und somit zur Behandlung von Gingivitis und Parodontitis empfohlen [49], [73] sowie zur antimikrobiellen Mundspülung [18]. Der Positiveffekt des Ozons in der Behandlung von

Parodontopathien ist mehrfach schon erkannt worden, dennoch fehlen weiterführende Studien [95].

Auch die antimikrobielle Photodynamische Therapie findet immer mehr Anwendung in der parodontalen Behandlung. So hat unter anderem eine Pilotstudie von Prof. Dr. G. Romanos und Dr. B. Brink von 2008 gezeigt, dass bei Parodontitisbehandlungen, bei denen zusätzlich zum scaling und root planing auch die antimikrobielle Photodynamische Therapie zum Einsatz kam, eine signifikante Bakterienreduktion während einer Beobachtungszeit von drei Monaten zu verzeichnen war [107]. Die Studien von Mortiz und Dobsen ergaben ähnliche Ergebnisse [37], [89]. Bereits 2007 hat die Studie von Andersen verdeutlicht, dass bei der zusätzlichen Anwendung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie zur konventionellen Kürettage, deep scaling und root planing, die pathogenen Taschentiefen sich innerhalb von 6 bis 12 Wochen effektiv reduzierten und somit den erfolgreichen Einsatz der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie bei der Behandlung chronischer Parodontopathien belegt [1]. In unterschiedlichen Studien wird die ergänzende Anwendung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie zur konventionellen Parodontitistherapie als sehr positiv beschrieben und bietet somit eine Alternative unter den Desinfektionsmethoden in der Zahnheilkunde.

5.3.2 Periimplantitis

Mittlerweile kann fast jeder Patient erfolgreich mit Implantaten versorgt werden. Einschränkende Erkrankungen wie Parodontitis, Diabetes mellitus, Bisphosphonat-therapie und Nikotinabusus gelten nicht mehr als absolute Kontraindikation bei Implantatinsertion [67]. Gesichert ist die Tatsache, dass diese Faktoren unter anderem die Einheilung der Implantate negativ beeinflussen und zu sogenannten Periimplantitiden führen könnten. Diese Entzündungen des periimplantären Knochens und er beteiligten Mukosa könnten im schlimmsten Fall das Implantatbett so schädigen, dass Implantate wieder entfernt werden müssten, da die Osseointegration aufgehoben ist [111]. Um diesen Schritt zu vermeiden, werden unterschiedliche Dekontaminationsverfahren in der Wissenschaft getestet und nach persönlichen

Erfahrungen bereits eingesetzt, aber eine verbindliche Therapieempfehlung gibt es bisher nicht. Sicher ist, dass die Infektion begünstigenden Faktoren vor, während und nach der Implantatinsertion durch die entsprechenden Therapien auf ein nicht infektionsauslösendes Maß reduziert werden müssen.

Bei der konservativen Periimplantitistherapie werden die freiliegenden Implantatoberflächen mechanisch oder auch chemisch behandelt. Der Erfolg der unterschiedlichen konservativen Therapieansätze ist sehr fraglich, lediglich die Säuberung der freiliegenden Implantatoberflächen mittels eines Sandstrahlgeräts oder mit Diamantschleifkörpern bringt eine bakterielle Reduktion. Die adäquate häusliche Mundhygiene ist mitunter eine der wichtigsten Faktoren gegen Periimplantitis, wie es auch bei der Parodontitis der Fall ist [88]. So kann eine Vielzahl von Periimplantitiden im Anfangsstadium schon vermieden werden, wenn mittels häuslicher Mundhygiene die tägliche Reduktion von pathogenen Plaquebakterien erfolgt [48], [59].

Die lokale Applikation von Antibiotikum zusätzlich zur mechanischen Oberflächenreinigung und adäquaten Mundhygiene, analog zur Parodontitistherapie [57], bringt zeitlich begrenzte Besserung der parodontalen und bakteriologischen Befunde [45], doch fehlen hierzu die Langzeitstudien, wie es sie für die Parodontalbehandlungen bereits gibt.

Periimplantitis bezeichnet die entzündliche Erkrankung des Gewebes und Knochens um das betroffene Implantat herum. Schreitet diese Entzündung weiter fort, bilden sich durch den Abbau des Knochens bakterielle Nischen und Taschen. Diese sind für die einfache Desinfektion und Oberflächenreinigung nicht mehr zugänglich und ein fortschreitender Knochen- und Gewebeverlust sind die Folge. In diesen Fällen ist nicht nur die bakterielle Dekontamination Ziel der Therapie, sondern vor allem der Erhalt und im besten Fall die Neugewinnung knöcherner Substanz, um die Explantation zu vermeiden [130]. In zahlreichen Studien wird die Therapie von Periimplantitis mittels der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie getestet. In der Implantologie, besonders in der implantologischen Nachsorge findet diese Form der Therapie bereits zahlreich Anwendung. Dieses Verfahren zur Desinfektion von Implantaten erzielt nachweislich gute Erfolge bei der Keimzahlreduktion. Das eigentliche

Behandlungsbenefit bezieht sich vor allem auf die positiv stimulierte Geweberegeneration und Knochenneubildung. Beides führt zur vermehrten Stabilität und erhöhten Osseointegration des Implantats [6], [108], [115], [119]. Die Indikationen für diese Therapieform bei Periimplantitis entsprechen denen der Parodontitis und auch die Durchführung erfolgt analog [88], [130].

Da die Anwendung von Ozon bereits bei der Parodontalbehandlung positive Ergebnisse erzielt hat, wird weiterführend auch der Einsatz von Ozon in der Periimplantitistherapie getestet. Auf Grund der positiven biophysiologischen Eigenschaften von Ozon, wie zum Beispiel die Induktion von Akutphaseproteinen, Verbesserung der Mikrozirkulation und Verbesserung der natürlichen Immunität wird die Entzündungsreaktion minimiert und die Wundheilung positiv beeinflusst [49]. Die Zunahme der Zellsynthese und die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, sowie die Beschleunigung der Epithelregeneration führen zur Geweberegeneration des periimplantären Lagers [73]. Dennoch fehlen klinischen Studien zur Ozoneffektivität auch beim Einsatz gegen Periimplantitis [3], [95].

5.3.3 Chirurgische Eingriffe

In der zahnärztlichen Chirurgie kann man als Zahnarzt die bakterielle Kontamination des Operationsbereiches nur schwer kontrollieren. Auf Grund des bakteriellen Mundmilieus ist jeder invasive orale Eingriff mit Bakteriämien verbunden. Die präoperative “full-mouth-desinfection” zum Beispiel mit Chlorhexidin [15], [125] und die präoperative professionelle Zahnreinigung sollten bereits vor allen invasiven chirurgischen Eingriffen lege artis sein. Durch die Keimzahlreduktion im Vorfeld [28] wird auch das postoperative Infektionsrisiko minimieren [97]. Kommt es dennoch zu intraoralen Infektionen, wie Alveolitis oder Ostitis nach Zahnextraktionen oder Wurzelspitzenresektionen, bisphosphonatassoziierten Knochennekrosen nach invasiven Eingriffen, Parodontitis nach parodontal-chirurgischen Behandlungen und Periimplantitis, gibt es eine Vielzahl von möglichen Desinfektionsmaßnahmen. Seit langer Zeit bewährt ist die desinfizierende Anwendung von unterschiedlichen Chlorhexidinpräparaten [85], [99], [105], [113]. Die Ozontherapie findet zurzeit vermehrt

in der allgemeinen Medizin Anwendung [10]. In der Zahnmedizin wird Ozon bereits zur Behandlung oberflächlicher epithelialer Veränderungen und Entzündungen, wie Ulceri und Aphthen sowie in der Parodontalbehandlung angewendet [30]. In der zahnärztlichen Chirurgie steht der Einsatz von Ozon noch am Anfang. Auch wenn auf diesem Gebiet schon zahlreiche Studien durchgeführt wurden, fehlen signifikante Behandlungserfolge und Langzeitstudien beim Einsatz von Ozon nach chirurgischen Maßnahmen [3], [95]. Anders sieht es aus bei der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie. Die Infektionsbehandlung mittels Photosensitizer und Low Level Laser wird immer mehr eingesetzt und bietet gute Ergebnisse bei der epithelialen und ossären Wundheilung, wie in den Studien von Dr. Neugebauer bereits gezeigt [92]. Der Vorteil der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie liegt in der non-invasiven Vorgehensweise und sie wirkt zusätzlich positiv schmerzlindernd bei der Wundheilung [64], [124].

5.3.4 Karies

In der konservierenden Zahnerhaltung möchte man sich vom bekannten Verfahren „drilling and filling“ entfernen. Es werden alternative Behandlungsmethoden gesucht, mit denen Initialkaries substanzschonend, möglichst ohne Kariesexkavation behandelt werden können. Einen Ansatz für diese Kariestherapie bietet die Ozonbehandlung. In der Studie von Baysan und Lynch konnte die Keimzahl signifikant und zeitabhängig in primären Wurzelkariesläsionen reduziert werden [8], [9]. Holmes konnte in seiner doppelblind randomisierten und kontrollierten Studie nach 18 Monaten bei 100% der ozontherapierten primären Wurzelkariesläsionen klinisch befriedigende Ergebnisse erkennen. In den unbehandelten Kontrollgruppen kam es nur teilweise zur Kariesprogression [62]. Bei initialen Fissurenläsionen, die nicht exkaviert wurden, kam es nach der Behandlung mit Ozongas zu einer Besserung der Ausgangssituation oder zu verlangsamter Kariesprogression im Vergleich zu unbehandelten initialen Fissurenkaries [29], [65]. Insgesamt ist festzuhalten, dass Ozon ein effektives Oberflächendekontaminationsmittel in der Anwendung gegen Initialkaries, frisch eingebrochene Kariesläsionen und Milchzahnkaries ist [30], da es nachweislich die pathogenen Mikroorganismen reduziert [90], [95].

In der konservierenden Zahnheilkunde findet Chlorhexidin Anwendung in der Kariesprophylaxe, als „full-mouth-desinfection“, zur generellen intraoralen kariogenen Keimzahlreduktion [15], [28], [125]. Als Applikationsgel, zum Beispiel Cervitec® (1% Chlorhexidin und 1% Thymol) oder EC40® (40% Chlorhexidin) wird es auf Initialläsionen, freiliegende Zahnhälse und in Fissuren aufgetragen zur Kariesprotektion [5], [17], [116]. Nach Exkavation können die Oberflächen zusätzlich mit Chlorhexidin desinfiziert werden, um vor der Füllungstherapie die verbliebenen pathogenen Mikroorganismen zu minimieren [28]. Die Beständigkeit von Chlorhexidin in der konservierenden Zahnheilkunde und die zahlreichen Studien belegen die Effektivität dieses Desinfektionsagens gegen pathogene Mikroorganismen.

5.3.5 Endodontie

Da die Wirkung von Ozon als Desinfektionsmittel gegen pathogene Mikroorganismen in zahlreichen Studien immer häufiger belegt wird, wird auch in der Endodontologie nach Einsatzmöglichkeiten von Ozon als Wurzelkanaldesinfektionsagens geforscht [95]. Zurzeit ist die Anwendung von 2,5 bis 5%igem Natriumhypochlorid zur Reinigung und Desinfektion von Wurzelkanälen lege artis. Problematisch erscheint das steigende Risiko von Gewebenekrosen bei höher konzentriertem Natriumhypochlorid. Diese spülbedingten Gewebenekrosen haben negativen Einfluss auf die Wurzelkanalbehandlung, deshalb wird nach effektiven Spülalternativen gesucht. In der Studie von Nagayoshi wurden Wurzelkanäle mittels Ozonwasser mit und ohne Ultraschall durchgespült. Die Ergebnisse zeigten eine Keimzahlreduktion in den Dentintubuli. In Kombination mit Ultraschall war das Ergebnis noch signifikanter [91]. Huth bestätigte die Ozoneffektivität gegen Mikroorganismen in Wurzelkanälen, verwies aber auch gleichzeitig auf die Abhängigkeit von Ozondosis und Bakterienarten [66]. Das 2,5%ige Natriumhypochlorid diente in der Studie von Nagayoshi als Referenzdesinfektionsmittel und bewirkte zusätzlich zur Keimzahlreduktion auch die Schädigung der vitalen Dentinkeime, was zwangsläufig Gewebenekrosen nach sich ziehen wird [91]. Die Überlegungen gehen soweit, dass die Konzentration des Natriumhypochlorids reduziert werden könnte, um die gewebetoxische Wirkung zu minimieren und mit Ozon, das sehr biokompatibel ist, zu kombinieren, für ein neues Wurzelkanaldesinfektionsmittel [86].

5.3.6 Mundschleimhauterkrankungen

Die positive Wirkung von Ozon auf die Wundheilung wurde bereits mehrfach bewiesen [49]. Grundsätzlich sind es die biophysiologischen Eigenschaften des Ozons. Die Ozonbegasung findet Einsatz bei der Therapie von Aphthen und Ulceri [79]. Durch die erhöhte Gewebedurchblutung und die angeregte Zellsynthese kommt es zur beschleunigten Wundheilung und Schmerzlinderung [10], [49]. Der non-invasive Therapieeinsatz ermöglicht eine schnelle und einfache Handhabung der oberflächlichen Ozonbegasung von intraoralen Effloreszenzen [18]. Auch wenn in verschiedenen Anwendungsberichten positiv über die Ozonwirkung gegen oberflächliche intraorale Schleimhautveränderungen referiert wurde, fehlen auch hier Studien und klinische Tests. Diese intraoralen Oberflächenanwendungen basieren vermehrt auf den effektiven allgemeinmedizinischen Anwendungen von Ozon zum Beispiel in der Onkologie [72], Dermatologie [79] und internistischen Medizin wie zum Beispiel der Eigenblutbehandlung und Darminsufflation mittels Ozon [36]. In der Zahnmedizin müssen weitere Ozonanwendungen und die Ozonwirkungen auf oberflächliche Schleimhauteffloreszenzen getestet werden, um aussagekräftige Empfehlungen für oder gegen den Ozoneinsatz in diesem Anwendungsbereich geben zu können.

6 Schlussfolgerung

Schlussfolgernd lässt sich festhalten, dass nur eine zusätzliche Anwendung von Ozon zur Desinfektion von oralen Geweben in der Zahnmedizin sinnvoll erscheint. Anhand der Versuchsdurchführungen und den daraus resultierenden Ergebnissen wird eine keimreduzierende Wirkung von Ozon ersichtlich. Die geforderte Keimzahlreduktion um 10^5, wie es für Desinfektionsmittel und –maßnahmen vorgeschrieben ist [24], kann mit Ozon in diesen Versuchen nicht erzielt werden. Wie schon im Versuch der Salzburger Universität von 2009 gezeigt [32], ist die Länge der Einwirkzeit von Ozon entscheidend für die Höhe der Keimzahlreduktion, da diese mit verlängerter Begasungszeit exponentiell steigt. Die entsprechende Begasungszeit wird vom Ozongenerator „Prozone“ nicht ausreichend vorgegeben und sollte zu Gunsten einer verlängerten Ozonbegasungszeit verändert werden.

Eine reduzierende Ozonwirkung konnte nur gegen die verwendeten Bakterien Escherichia coli und Staphylococcus aureus erzielt worden. Keine Wirkung wurde bei Candida albicans erreicht, so dass die Behandlung mittels Ozon in diesen Versuchen nicht erfolgreich war.

Eine absolute Keimzahlelimination erzielte die Chlorhexidinbehandlung. Die Desinfektion mit 1%igem Chlorhexidin führte bei allen Versuchen zur vollständigen Abtötung aller Mikroorganismen.

Die Desinfektionsversuche mittels der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie zeigten keinerlei Positivergebnisse. In zahlreichen Studien wurde bereits die Wirksamkeit dieser Therapie bewiesen. Die praktischen Anwendungen und Erfolge belegen eine desinfizierende Wirkung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie. Der fehlende Erfolg dieser Therapiemethode in den hier durchgeführten Versuchen kann in dem gewählten Versuchsmodell begründet liegen.

In weiterführenden Versuchen sollte die Wirksamkeit von Ozon gegen pathogene Mikroorganismen auf festen oralen und epithelialen Oberflächen, sowie Implantaten

getestet werden, wie es auch methodisch im Versuch der Universität Salzburg [32] schon angedacht war.

Des Weiteren wären Vergleiche der Wirksamkeit von Ozon auf unterschiedliche gramnegative und grampositive Bakterien sinnvoll. Sowie die Bestimmung der absoluten Begasungszeit, um die gewünschte Keimzahlreduktion von 10^5 zum Ausgangswert zu erzielen.

7 Zusammenfassung

Der stetige Fortschritt und die Entwicklungen im zahnmedizinischen Sektor bringen auch im Bereich der Desinfektionsmaßnahmen neue Methoden und Materialien auf den Markt. Der Ozongenerator „Prozone“ bietet eine Möglichkeit der Desinfektion mittels Ozon. Ziel dieser Arbeit war der Nachweis der Effektivität einer Keimzahlreduktion von Escherichia coli, Staphylococcus aureus und Candida albicans nach der Behandlung mit Ozon auf festen Oberflächen und in Flüssigkulturen im Vergleich zu 1%igem Chlorhexidin und der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie.

Die qualitativen Versuche auf Blutagarplatten erbrachten den optischen Beweis der Wirksamkeit von Ozon auf die ausgewählten Mikroorganismen nach unterschiedlicher Begasungszeit. Bei der Desinfektion mit Chlorhexidin kam es zur absoluten Keimelemination und bei der Verwendung der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie zeigte sich im behandelten Bereich kein Kolonienwachstum. Die nachfolgenden Flüssigkulturversuche dienten der Quantifizierung der Ozonwirkung, um die Ergebnisse mit der Wirkung des 1%igem Chlorhexidins und der antimikrobiellen Photodynamischen Therapie vergleichen zu können. Dabei ergab sich für 1%iges Chlorhexidin in jedem Versuch eine absolute Keimzahlelimination. Die antimikrobielle Photodynamische Therapie hat in keinem Versuch, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, ein Positivergebnis erbracht, was auf den Versuchsaufbau zurückzuführen sein könnte. Die Ozonbehandlung hat keine Wirkung gegen Candida albicans gezeigt, weder in den qualitativen noch in den quantitativen Versuchen. Der Ausgangswert von Escherichia coli wurde etwa um 10^3 reduziert bei einer Ozonbegasungszeit von mindestens 48 Sekunden. Beim Staphylococcus aureus fand nach 48 Sekunden Begasungszeit eine Keimzahlreduktion um 10^2 und bei 72 Sekunden eine Reduktion von 10^3 statt.

Die zusätzliche Ozonanwendung zu etablierten Desinfektionsverfahren, vor allem bei schwer zugänglichen Bereichen, erscheint nach den hier ermittelten Ergebnissen und zum jetzigen Zeitpunkt als sinnvoll.

8 Literaturverzeichnis

[1] Andersen, R., Loebel, N., Hammond, D. and Wilson, M.
Treatment of periodontal disease by photodisinfection compared to scaling and root planing
J Clin Dent, 18, 34-38, (2007)

[2] Araujo, P.V., Teixeira, K.I., Lanza, L.D., Cortes, M.E. and Poletto, L.T.
In vitro lethal photosensitization of S. mutans using methylene blue and toluidine blue O as photosensitizers
Acta Odontol Latinoam, 22, 93-97, (2009)

[3] Azarpazhooh, A. and Limeback, H.
The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature
J Dent, 36, 104-116, (2008)

[4] Azeredo, J. and Sutherland, I.W.
The use of phages for the removal of infectious biofilms
Curr Pharm Biotechnol, 9, 261-266, (2008)

[5] Baca, P., Munoz, M.J., Bravo, M., Junco, P. and Baca, A.P.
Effectiveness of chlorhexidine-thymol varnish in preventing caries lesions in primary molars
J Dent Child (Chic), 71, 61-65, (2004)

[6] Bach, G., Neckel, C., Mall, C. and Krekeler, G.
Conventional versus laser-assisted therapy of periimplantitis: a five-year comparative study
Implant Dent, 9, 247-251, (2000)

[7] Barasch, A., Safford, M.M., Dapkute-Marcus, I. and Fine, D.H.
Efficacy of chlorhexidine gluconate rinse for treatment and prevention of oral candidiasis in HIV-infected children: a pilot study
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 97, 204-207, (2004)

[8] Baysan, A. and Lynch, E.
Clinical reversal of root caries using ozone: 6-month results
Am J Dent, 20, 203-208, (2007)

[9] Baysan, A. and Lynch, E.
Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries
Am J Dent, 17, 56-60, (2004)

[10] Baysan, A. and Lynch, E.
The use of ozone in dentistry and medicine
Prim Dent Care, 12, 47-52, (2005)

[11] Best, M. and Neuhauser, D.
Ignaz Semmelweis and the birth of infection control
Qual Saf Health Care, 13, 233-234, (2004)

[12] Bjerring, P., Clement, M., Heickendorff, L., Lybecker, H. and Kiernan, M.
Dermal collagen production following irradiation by dye laser and broadband light source
J Cosmet Laser Ther, 4, 39-43, (2002)

[13] Bocci, V.
The case for oxygen-ozonetherapy
Br J Biomed Sci, 64, 44-49, (2007)

[14] Bode, L.G., Kluytmans, J.A., Wertheim, H.F., Bogaers, D., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Roosendaal, R., Troelstra, A., Box, A.T., Voss, A., van der Tweel, I., van Belkum, A., Verbrugh, H.A. and Vos, M.C.
Preventing surgical-site infections in nasal carriers of Staphylococcus aureus
N Engl J Med, 362, 9-17,

[15] Bollen, C.M., Vandekerckhove, B.N., Papaioannou, W., Van Eldere, J. and Quirynen, M.
Full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of periodontal infections. A pilot study: long-term microbiological observations
J Clin Periodontol, 23, 960-970, (1996)

[16] Braham, P., Herron, C., Street, C. and Darveau, R.
Antimicrobial photodynamic therapy may promote periodontal healing through multiple mechanisms
J Periodontol, 80, 1790-1798, (2009)

[17] Bratthall, D., Serinirach, R., Rapisuwon, S., Kuratana, M., Luangjarmekorn, V., Luksila, K. and Chaipanich, P.
A study into the prevention of fissure caries using an antimicrobial varnish
Int Dent J, 45, 245-254, (1995)

[18] Brauner, A.
Klinische Untersuchung über den therapeutischen Erfolg von ozonisiertem Wasser bei Gingivitis und Parodontitis
Zahnärztl. Praxis, 2, 48-50, (1991)

[19] Brooun, A., Liu, S. and Lewis, K.
A dose-response study of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa biofilms
Antimicrob Agents Chemother, 44, 640-646, (2000)

[20] Brucker, M.O., Gutjahr, I.
Candida albicans - Pilze, Mykosen, Bakterien
4. Auflage, emu - Verlag, (2006)

[21] Brunner, E., Dassinger, M., Grohmann, I., Jung, B.
Rote Liste - Arzneimittelverzeichnis für Deutschland
www.rote-liste.de/Online/texte

[22] Carvalho, G.G., Felipe, M.P. and Costa, M.S.
The photodynamic effect of methylene blue and toluidine blue on Candida albicans is dependent on medium conditions
J Microbiol, 47, 619-623, (2009)

[23] Chaiyanan, S., Huq, A., Maugel, T. and Colwell, R.R.
Viability of the nonculturable Vibrio cholerae O1 and O139
Syst Appl Microbiol, 24, 331-341, (2001)

[24] Christiansen, B., Dettenkofer, M., Becker, E.M., Eikmann, Th., Exner, M., Heeg, P., Kramer, A., Ruf, B.,Schwebke, I.
Anforderungen an die Hygiene bei der Reinigung und Desinfektion von Flächen
Robert-Koch-Institut
www.rki-de/cIn_169/nn_201414/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Kommission/Downloads/Flaeche

[25] Classic pages in obstetrics and gynecology. (Antoni Van Leeuwenhoek)
Am J Obstet Gynecol, 131, 469-470, (1978)

[26] Corliss, J.O.
Three centuries of protozoology: a brief tribute to its founding father, A. van Leeuwenhoek of Delft
J Protozool, 22, 3-7, (1975)

[27] Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P.
Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections
Science, 284, 1318-1322, (1999)

[28] Cousido, M.C., Tomas, M., Tomas, I., Limeres, J., Garcia-Caballero, L. and Diz, P.
Effect of a neutralising agent on the evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine on the bacterial salivary flora
Arch Oral Biol, 53, 981-984, (2008)

[29] Dahnhardt, J.E., Jaeggi, T. and Lussi, A.
Treating open carious lesions in anxious children with ozone. A prospective controlled clinical study
Am J Dent, 19, 267-270, (2006)

[30] Dähnhardt, J.E., Lussi, A.
Rund ums Ozon - in der Zahnmedizin
ZM, 7, 40, (2004)

[31] Dai, T., Huang, Y.Y. and Hamblin, M.R.
Photodynamic therapy for localized infections--state of the art
Photodiagnosis Photodyn Ther, 6, 170-188, (2009)

[32] Dallinger, C., Plätzer, K., Krammer, B.
Inaktivierung von Bakterien mittels W&H Prozone
Universität Salzburg, (2009)

[33] Darouiche, R.O., Wall, M.J., Jr., Itani, K.M., Otterson, M.F., Webb, A.L., Carrick, M.M., Miller, H.J., Awad, S.S., Crosby, C.T., Mosier, M.C., Alsharif, A. and Berger, D.H.
Chlorhexidine-Alcohol versus Povidone-Iodine for Surgical-Site Antisepsis
N Engl J Med, 362, 18-26,

[34] de Souza-Filho, F.J., Soares Ade, J., Vianna, M.E., Zaia, A.A., Ferraz, C.C. and Gomes, B.P.
Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials
Braz Dent J, 19, 28-33, (2008)

[35] Deschner, J., Jepsen, S.
Wechselwirkungen zwischen Parodontitiden und Diabetes
ZM, 98, 28-40, (2008)

[36] Die freie Enzyklopädie
Wikipedia - Die freie Enzyklopädie
http://de.wikipedia.org

[37] Dobson, J. and Wilson, M.
Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser
Arch Oral Biol, 37, 883-887, (1992)

[38] Donlan, R.M.
Role of biofilms in antimicrobial resistance
Asaio J, 46, S47-52, (2000)

[39] Donlan, R.M. and Costerton, J.W.
Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms
Clin Microbiol Rev, 15, 167-193, (2002)

[40] Dörfer, C.
Parodont und Allgemeingesundheit
ZM, 9, 38, (2002)

[41] Emilson, C.G., Axelsson, P. and Kallenberg, L.
Effect of mechanical and chemical plaque control measures on oral microflora in schoolchildren
Community Dent Oral Epidemiol, 10, 111-116, (1982)

[42] Emilson, C.G., Ericson, T., Lilja, J. and Heyden, G.
Effect of chlorhexidine on human oral streptococci
J Periodontal Res, 7, 189-191, (1972)

[43] Emilson, C.G. and Fornell, J.
Effect of toothbrushing with chlorhexidine gel on salivary microflora, oral hygiene, and caries
Scand J Dent Res, 84, 308-319, (1976)

[44] Emilson, C.G., Krasse, B. and Westergren, G.
Effect of a fluoride-containing chlorhexidine gel on bacteria in human plaque
Scand J Dent Res, 84, 56-62, (1976)

[45] Ericsson, I., Persson, L.G., Berglundh, T., Edlund, T. and Lindhe, J.
The effect of antimicrobial therapy on periimplantitis lesions. An experimental study in the dog
Clin Oral Implants Res, 7, 320-328, (1996)

[46] EU-Ozon Gesetz
Umweltbundesamt
www.umweltbundesamt.de/luft/schadstoffe/ozon.htm

[47] Exner, M., Vacata, V., Hornei, B., Dietlein, E. and Gebel, J.
Household cleaning and surface disinfection: new insights and strategies
J Hosp Infect, 56 Suppl 2, S70-75, (2004)

[48] Feres, M., Gursky, L.C., Faveri, M., Tsuzuki, C.O. and Figueiredo, L.C.
Clinical and microbiological benefits of strict supragingival plaque control as part of the active phase of periodontal therapy
J Clin Periodontol, 36, 857-867, (2009)

[49] Filippi, A.
Der Einfluss von ozoniertem Wasser auf die epitheliale Wundheilung. The effects of ozonized water on epithelial wound healing
Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift, 56, 104, (2001)

[50] Ford, B.J.
The Leeuwenhoekiana of Clifford Dobell (1886-1949)
Notes Rec R Soc Lond, 41, 95-105, (1986)

[51] Fuchs, G.
Allgemeine Mikrobiologie
8. Auflage, Thieme Verlag, (2006)

[52] Fullmer, S.C., Preshaw, P.M., Heasman, P.A. and Kumar, P.S.
Smoking cessation alters subgingival microbial recolonization
J Dent Res, 88, 524-528, (2009)

[53] Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Stoodley, P.
Survival strategies of infectious biofilms
Trends Microbiol, 13, 34-40, (2005)

[54] Groß, U.
Kurzlehrbuch medizinische Mikrobiologie und Infektiologie
2. Auflage, Thieme Verlag, (2009)

[55] Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P.
Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases
Nat Rev Microbiol, 2, 95-108, (2004)

[56] Harrison, J.J., Ceri, H., Stremick, C. and Turner, R.J.
Differences in biofilm and planktonic cell mediated reduction of metalloid oxyanions
FEMS Microbiol Lett, 235, 357-362, (2004)

[57] Heitz-Mayfield, L.J. and Lang, N.P.
Comparative biology of chronic and aggressive periodontitis vs. peri-implantitis
Periodontol 2000, 53, 167-181,

[58] HELBO
www.helbo.de

[59] Hellwig, E., Klimek, J. and Attin, T.
Einführung in die Zahnerhaltung
3. Auflage, Urban & Fischer, (2003)

[60] Henke, C.J., Villa, K.F., Aichelmann-Reidy, M.E., Armitage, G.C., Eber, R.M., Genco, R.J., Killoy, W.J., Miller, D.P., Page, R.C., Polson, A.M., Ryder, M.I., Silva, S.J., Somerman, M.J., Van Dyke, T.E., Wolff, L.F., Evans, C.J. and Finkelman, R.D.
An economic evaluation of a chlorhexidine chip for treating chronic periodontitis: the CHIP (chlorhexidine in periodontitis) study
J Am Dent Assoc, 132, 1557-1569, (2001)

[61] Hilger, R.
Infektionsschutz in der Zahnarztpraxis
Karl-Häupl-Institut Zahnärztekammer Nordrhein, (2007)

[62] Holmes, J.
Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomised, controlled 18-month trial
Gerodontology, 20, 106-114, (2003)

[63] Holtfreter, B., Schwahn, C., Biffar, R., Kocher, Th.
Epidemiology of periodontal diseases in the Study of Health in Pomerania
J of clinical periodontology, 36, 114-123, (2009)

[64] Hopkins, J.T., McLoda, T.A., Seegmiller, J.G. and David Baxter, G.
Low-Level Laser Therapy Facilitates Superficial Wound Healing in Humans: A Triple-Blind, Sham-Controlled Study
J Athl Train, 39, 223-229, (2004)

[65] Huth, K.C., Paschos, E., Brand, K. and Hickel, R.
Effect of ozone on non-cavitated fissure carious lesions in permanent molars. A controlled prospective clinical study
Am J Dent, 18, 223-228, (2005)

[66] Huth, K.C., Quirling, M., Maier, S., Kamereck, K., Alkhayer, M., Paschos, E., Welsch, U., Miethke, T., Brand, K. and Hickel, R.
Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model
Int Endod J, 42, 3-13, (2009)

[67] Implantologie in der Zahnheilkunde
Wissenschaftliche Stellungnahme der DGZMK und DGI
www.dgzmk.de/uploads/tx_szdgzmkdocuments/Implantologie_in_der_Zahnheilkunde_2005.pdf

[68] James, G.A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E., Secor, P., Sestrich, J., Costerton, J.W. and Stewart, P.S.
Biofilms in chronic wounds
Wound Repair Regen, 16, 37-44, (2008)

[69] Jay, V.
Ignaz Semmelweis and the conquest of puerperal sepsis
Arch Pathol Lab Med, 123, 561-562, (1999)

[70] Jerrett, M., Burnett, R.T., Pope, C.A., 3rd, Ito, K., Thurston, G., Krewski, D., Shi, Y., Calle, E. and Thun, M.
Long-term ozone exposure and mortality
N Engl J Med, 360, 1085-1095, (2009)

[71] Junqueira, J.C., Martins Jda, S., Faria, R.L., Colombo, C.E. and Jorge, A.O.
Photodynamic therapy for the treatment of buccal candidiasis in rats
Lasers Med Sci, 24, 877-884, (2009)

[72] Kämper, S.
Ozontherapie in der Onkologie
Deutsche Heilpraktiker Zeitschrift, 3, 43-44, (2006)

[73] Karapetian, V.E., Lowden, E., Zöller, J.E.
The Use of Ozone in Periimplantitis-Treatment; Die Verwendung von Ozon in der Periimplantitistherapie - Klinische Studie
ZWR, 116, 214-218, (2007)

[74] Kayser, F.H., Bienz, K.A., Eckert, J., Zinkernagel, R.M.
Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie
11. Auflage, Thieme Verlag, (2005)

[75] Kern, R., Krämer, J. and Micheelis, W.
Vierte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS IV)
Bundeszahnärztekammer (2006)
http://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/PM/2006/061121.pdf

[76] Kowalski, W.J., Bahnfleth, W.P., Whittam, T.S.
Bacterial Effects of High Airborne Ozone Concentrations on Escherichia coli and Staphylococcus aureus;
Ozone Sci and Eng, 20, 205-221, (1998)

[77] Kramer, A., Heeg, P., Botzenhartk,
Krankenhaus- und Praxishygiene
13. Auflage, Urban & Fischer, (2001)

[78] Krause, F.a.B., A.
Die antimikrobielle photodynamische Therapie
Wissen kompakt, 3, 43-51, (2009)

[79] Krivatkin, S., Krivatkina, E.V.
Ozontherapie bei dermatologischen Erkrankungen
Erfahrungsheilkunde (Heidelberg), 49, 736-739, (2000)

[80] Lenski, R.
The ecology, genetics and evolution of bacteria in an experimental setting
Curr Biol, 13, R466-467, (2003)

[81] Lewis, K.
Multidrug tolerance of biofilms and persister cells
Curr Top Microbiol Immunol, 322, 107-131, (2008)

[82] Lewis, K.
Persister cells and the riddle of biofilm survival
Biochemistry (Mosc), 70, 267-274, (2005)

[83] Lewis, K.
Persister cells, dormancy and infectious disease
Nat Rev Microbiol, 5, 48-56, (2007)

[84] Lewis, K.
Riddle of biofilm resistance
Antimicrob Agents Chemother, 45, 999-1007, (2001)

[85] Loe, H. and Schiott, C.R.
The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man
J Periodontal Res, 5, 79-83, (1970)

[86] Lynch, E.
Evidence-based efficacy of ozone for root canal irrigation
J Esthet Restor Dent, 20, 287-293, (2008)

[87] Mah, T.F. and O'Toole, G.A.
Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents
Trends Microbiol, 9, 34-39, (2001)

[88] Meffert, R.M.
Periodontitis and periimplantitis: one and the same?
Pract Periodontics Aesthet Dent, 5, 79-80, 82, (1993)

[89] Moritz, A., Gutknecht, N., Doertbudak, O., Goharkhay, K., Schoop, U., Schauer, P. and Sperr, W.
Bacterial reduction in periodontal pockets through irradiation with a diode laser: a pilot study
J Clin Laser Med Surg, 15, 33-37, (1997)

[90] Nagayoshi, M., Fukuizumi, T., Kitamura, C., Yano, J., Terashita, M. and Nishihara, T.
Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms
Oral Microbiol Immunol, 19, 240-246, (2004)

[91] Nagayoshi, M., Kitamura, C., Fukuizumi, T., Nishihara, T. and Terashita, M.
Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules
J Endod, 30, 778-781, (2004)

[92] Neugebauer, J., Jozsa, M. and Kubler, A.
[Antimicrobial photodynamic therapy for prevention of alveolar ostitis and post-extraction pain]
Mund Kiefer Gesichtschir, 8, 350-355, (2004)

[93] Newsom, S.W.
Pioneers in infection control-Joseph Lister
J Hosp Infect, 55, 246-253, (2003)

[94] Nicoletti, G., Boghossian, V. and Borland, R.
Hygienic hand disinfection: a comparative study with chlorhexidine detergents and soap
J Hosp Infect, 15, 323-337, (1990)

[95] Noetzel, J.K., A.M.
Ozone - a Useful Treatment Modality in Dentistry?
ZWR, 115, 485-491, (2006)

[96] Offenbacher, S., Katz, V., Fertik, G., Collins, J., Boyd, D., Maynor, G., McKaig, R. and Beck, J.
Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight
J Periodontol, 67, 1103-1113, (1996)

[97] Paocharoen, V., Mingmalairak, C. and Apisarnthanarak, A.
Comparison of surgical wound infection after preoperative skin preparation with 4% chlorhexidine [correction of chlohexidine] and povidone iodine: a prospective randomized trial
J Med Assoc Thai, 92, 898-902, (2009)

[98] Paolantonio, M., D'Angelo, M., Grassi, R.F., Perinetti, G., Piccolomini, R., Pizzo, G., Annunziata, M., D'Archivio, D., D'Ercole, S., Nardi, G. and Guida, L.
Clinical and microbiologic effects of subgingival controlled-release delivery of chlorhexidine chip in the treatment of periodontitis: a multicenter study
J Periodontol, 79, 271-282, (2008)

[99] Paolantonio, M., D'Ercole, S., Pilloni, A., D'Archivio, D., Lisanti, L., Graziani, F., Femminella, B., Sammartino, G., Perillo, L., Tete, S., Perfetti, G., Spoto, G., Piccolomini, R. and Perinetti, G.
Clinical, microbiologic, and biochemical effects of subgingival administration of a Xanthan-based chlorhexidine gel in the treatment of periodontitis: a randomized multicenter trial
J Periodontol, 80, 1479-1492, (2009)

[100] Parker, V.
Antony Van Leeuwenhoek
Bull Med Libr Assoc, 53, 442-447, (1965)

[101] Pizzo, G., Giuliana, G., Milici, M.E. and D'Angelo, M.
Effect of antimicrobial mouthrinses on the in vitro adhesion of Candida albicans to human buccal epithelial cells
Clin Oral Investig, 5, 172-176, (2001)

[102] Polson, A.M., Southard, G.L., Dunn, R.L., Yewey, G.L., Godowski, K.C., Polson, A.P., Fulfs, J.C. and Laster, L.
Periodontal pocket treatment in beagle dogs using subgingival doxycycline from a biodegradable system. I. Initial clinical responses
J Periodontol, 67, 1176-1184, (1996)

[103] Posten, W., Wrone, D.A., Dover, J.S., Arndt, K.A., Silapunt, S. and Alam, M.
Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy
Dermatol Surg, 31, 334-340, (2005)

[104] Radvar, M., Pourtaghi, N. and Kinane, D.F.
Comparison of 3 periodontal local antibiotic therapies in persistent periodontal pockets
J Periodontol, 67, 860-865, (1996)

[105] Ribeiro, L.G., Hashizume, L.N. and Maltz, M.
Effect of different 1% chlorhexidine varnish regimens on mutans streptococci levels in saliva and dental biofilm
Am J Dent, 21, 295-299, (2008)

[106] Rolla, G., Loe, H. and Schiott, C.R.
The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins
J Periodontal Res, 5, 90-95, (1970)

[107] Romanos, G.E. and Brink, B.
Photodynamic therapy in periodontal therapy: microbiological observations from a private practice
Gen Dent, 58, e68-73,

[108] Romanos, G.E., Gutknecht, N., Dieter, S., Schwarz, F., Crespi, R. and Sculean, A.
Laser wavelengths and oral implantology
Lasers Med Sci, 24, 961-970, (2009)

[109] Roy, D., Wong, P.K., Engelbrecht, R.S. and Chian, E.S.
Mechanism of enteroviral inactivation by ozone
Appl Environ Microbiol, 41, 718-723, (1981)

[110] Rutala, W.A. and Weber, D.J.
Surface disinfection: should we do it?
J Hosp Infect, 48 Suppl A, S64-68, (2001)

[111] Sanchez-Garces, M.A. and Gay-Escoda, C.
Periimplantitis
Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 9 Suppl, 69-74; 63-69, (2004)

[112] Sbordone, L. and Bortolaia, C.
Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease
Clin Oral Investig, 7, 181-188, (2003)

[113] Schiott, C.R., Loe, H., Jensen, S.B., Kilian, M., Davies, R.M. and Glavind, K.
The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora
J Periodontal Res, 5, 84-89, (1970)

[114] Schröter, W., Lautenschläger, K.-H. und Bibrack, H.
Chemie, Fakten und Gesetze
13. Auflage, Köln Buch- und Zeit-Verlagsgesellschaft, (1997)

[115] Schwarz, F., Bieling, K., Bonsmann, M., Latz, T. and Becker, J.
Nonsurgical treatment of moderate and advanced periimplantitis lesions: a controlled clinical study
Clin Oral Investig, 10, 279-288, (2006)

[116] Skold-Larsson, K., Fornell, A.C., Lussi, A. and Twetman, S.
Effect of topical applications of a chlorhexidine/thymol-containing varnish on fissure caries assessed by laser fluorescence
Acta Odontol Scand, 62, 339-342, (2004)

[117] Spoering, A.L. and Lewis, K.
Biofilms and planktonic cells of Pseudomonas aeruginosa have similar resistance to killing by antimicrobials
J Bacteriol, 183, 6746-6751, (2001)

[118] Stewart, P.S. and Costerton, J.W.
Antibiotic resistance of bacteria in biofilms
Lancet, 358, 135-138, (2001)

[119] Stubinger, S., Henke, J., Donath, K. and Deppe, H.
Bone regeneration after peri-implant care with the CO2 laser: a fluorescence microscopy study
Int J Oral Maxillofac Implants, 20, 203-210, (2005)

[120] Teichert, M.C., Jones, J.W., Usacheva, M.N. and Biel, M.A.
Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model
Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 93, 155-160, (2002)

[121] Tomas, I., Cousido, M.C., Tomas, M., Limeres, J., Garcia-Caballero, L. and Diz, P.
In vivo bactericidal effect of 0.2% chlorhexidine but not 0.12% on salivary obligate anaerobes
Arch Oral Biol, 53, 1186-1191, (2008)

[122] Tomas, I., Garcia-Caballero, L., Cousido, M.C., Limeres, J., Alvarez, M. and Diz, P.
Evaluation of chlorhexidine substantivity on salivary flora by epifluorescence microscopy
Oral Dis, 15, 428-433, (2009)

[123] Tschäpe, H.
Aktuelles zur Antibiotikaresistenz - Das Problem aus humanmedizinischer Sicht
Bundesinstitut für Risikobewertung
www.bfr.bund.de/cm/232/aktuelles_zur_antibiotikaresistenz_das_problem_aus_humanmedizinischer_sicht.pdf

[124] Turhani, D., Scheriau, M., Kapral, D., Benesch, T., Jonke, E. and Bantleon, H.P.
Pain relief by single low-level laser irradiation in orthodontic patients undergoing fixed appliance therapy
Am J Orthod Dentofacial Orthop, 130, 371-377, (2006)

[125] Turkoglu, O., Becerik, S., Emingil, G., Kutukculer, N., Baylas, H. and Atilla, G.
The effect of adjunctive chlorhexidine mouthrinse on clinical parameters and gingival crevicular fluid cytokine levels in untreated plaque-associated gingivitis
Inflamm Res, 58, 277-283, (2009)

[126] Van der Velden, U., Varoufaki, A., Hutter, J.W., Xu, L., Timmerman, M.F., Van Winkelhoff, A.J. and Loos, B.G.
Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora
J Clin Periodontol, 30, 603-610, (2003)

[127] van Rijen, M.M., Bonten, M., Wenzel, R.P. and Kluytmans, J.A.
Intranasal mupirocin for reduction of Staphylococcus aureus infections in surgical patients with nasal carriage: a systematic review
J Antimicrob Chemother, 61, 254-261, (2008)

[128] van Winkelhoff, A.J.
Microbiology in diagnosis and treatment planning in periodontics
Int J Dent Hyg, 1, 131-137, (2003)

[129] van Winkelhoff, A.J., Winkel, E.G. and Vandenbroucke-Grauls, C.M.
[Periodontitis: a hidden chronic infection]
Ned Tijdschr Geneeskd, 145, 557-563, (2001)

[130] Vizethum, F.
aPDT in der Periimplantitistherapie
Zahnärztl. Praxis, 12, 100-104, (2009)

[131] W&H
www.wh.com/de_germany

[132] Walsh, T.F., Unsal, E., Davis, L.G. and Yilmaz, O.
The effect of irrigation with chlorhexidine or saline on plaque vitality
J Clin Periodontol, 22, 262-264, (1995)

[133] Wiberg, N., Wiberg, E. und Holleman, A.
Lehrbuch der anorganischen Chemie
102. Auflage, de Gruyter, (2007)

[134] Wilson, M., Dobson, J. and Harvey, W.
Sensitization of oral bacteria to killing by low-power laser radiation
Curr Microbiol, 25, 77-81, (1992)

[135] Wimpenny, J., Manz, W. and Szewzyk, U.
Heterogeneity in biofilms
FEMS Microbiol Rev, 24, 661-671, (2000)

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.