

DISSERTATION

Ex-vivo-Studie zur Reinigungseffizienz kommerzieller
Zahnspangenreiniger bei der Biofilmentfernung von
PMMA-Prüfkörpern

Ex vivo study of the cleaning performance of commercial
orthodontic cleaning tablets on PMMA test specimens

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alice Arndt-Fink

Erstbetreuung: Prof. Dr. med. dent. Paul-Georg Jost-Brinkmann

Datum der Promotion: 30.06.2024

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	II
Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Vorwort	V
Zusammenfassung	1
Abstract	2
1 Einleitung	3
1.1 Dentaler Biofilm	3
1.2 Orale Mikroorganismen als Ursache für Erkrankungen	4
1.2.1 Lokale Erkrankungen	5
1.2.2 Systemische Erkrankungen	8
1.2.3 Die orale Mundflora während der Behandlung mit herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen	10
1.3 Reinigung von herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen	12
1.3.1 Mechanische Reinigung	13
1.3.2 Chemische Reinigung mit Reinigungstabletten oder -pulvern	14
1.3.3 Weitere Reinigungsverfahren	16
1.4 Aktueller Forschungsstand zur Reinigung mit chemischen Reinigungstabletten	17
1.5 Herleitung der Frage- und Aufgabenstellung	20
2 Materialien und Methode	22
2.1 Studienkohorte	22
2.1.1 Proband*innen	22
2.1.2 Randomisierung	24
2.2 Prüfobjekt	26
2.2.1 Herstellung der Prüfobjekte	26
2.2.2 Trageweise der Prüfschienen	29
2.3 Untersuchte Zahnspangenreiniger	29
2.4 Modifizierte OPA-Methode	30
2.4.1 Herstellung und Kontrolle der OPA-Lösung	31
2.4.2 Aufbereitung/Behandlung der Proben	32
2.5 Statistische Auswertung	32
3 Vorversuche	33
3.1 Vorversuche zu möglichen Störquellen der OPA-Methode durch Kontamination	33
3.1.1 Prüfung der Prüfkörperhalterungen und des Isoliermittels	33
3.1.2 Prüfung des Silikons	34
3.1.3 Prüfung der PMMA-Prüfkörperhälften	36
3.1.4 Prüfung der Reinigungslösungen	38
3.2 Vorversuche zur Anpassung der OPA-Methode	39

3.2.1	Vergleich der Proteinmengen zweier nebeneinander liegender Prüfkörperhälften	39
3.2.2	Ermittlung des Verhältnisses Probenvolumen zu OPA-Reagenz.....	40
3.2.3	Ermittlung des pH-Wertes für die 1%ige SDS-Lösung	42
4	Ergebnisse der Hauptversuche	45
4.1	Kalibrierung der modifizierten OPA-Methode	45
4.2	Lokalisationsspezifische Akkumulation	47
4.3	Verteilung der Proteinmengen	48
4.4	Reinigungsleistung	50
5	Diskussion.....	51
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	51
5.2	Diskussion und Interpretation der Ergebnisse.....	52
5.3	Stärken und Schwächen der Studie.....	58
5.4	Ausblick.....	61
6	Schlussfolgerungen.....	62
7	Literaturverzeichnis	64
8	Materialliste	75
8.1	Materialien/Geräte zur Herstellung der Prüfobjekte	75
8.2	Materialien/Geräte zur labortechnischen Analyse	77
8.3	Chemische Reinigungstabletten	78
	Eidesstattliche Versicherung.....	80
	Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	81
	Originalpublikation	82
	Lebenslauf	91
	Komplette Publikationsliste	92
	Danksagung.....	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Zusammensetzung der untersuchten chemischen Reinigungstabletten.	15
Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie.	23
Tabelle 3: Festlegung welche Reinigungslösung bei welchem Probanden/welcher Probandin für welches Kunststoffplättchen verwendet wird.....	25
Tabelle 4: Zusammensetzung des OPA-Reagenzes mit Mengenangabe.....	31
Tabelle 5: Messergebnisse der Prüfung der Halterungen und des Isoliermittels nach 48 h in Aqua dem.	35
Tabelle 6: Messergebnisse der Prüfung des Silikons 24 h nach dem Anmischen.	36
Tabelle 7: Extinktionswerte der PMMA-Prüfkörperhälften vor Reinigung und Extinktionswerte der drei Reinigungszyklen.....	37
Tabelle 8: Extinktionswerte der Reinigungslösungen der untersuchten Zahnspangereiniger.	39
Tabelle 9: In-vivo-Untersuchung der Extinktionswerte auf zwei benachbarten Prüfkörperhälften bei Prüfkörpern, die für 96 h getragen wurden.	40
Tabelle 10: Extinktionswerte/Messergebnisse nach siebentägigem Tragen einer Prüfschiene.....	41
Tabelle 11: Extinktionswerte/Messergebnisse nach siebentägigem Tragen einer zweiten Prüfschiene.	42
Tabelle 12: Extinktionswerte/Messergebnisse nach viertägigem Tragen einer Prüfschiene. 42	
Tabelle 13: Messwerte zum Einfluss des pH-Werts der 1%igen SDS-Lösung auf die Extinktion.	44
Tabelle 14: Verdünnungsschema der BSA-Standards zur Kalibrierung der OPA-Methode. 46	
Tabelle 15: Darstellung der Proteinmenge auf der Oberfläche der ungereinigten PMMA-Prüfkörperhälften in Abhängigkeit von deren Lokalisation.	48
Tabelle 16: Darstellung der Proteinmenge in µg auf den PMMA-Prüfkörpern in Abhängigkeit vom verwendeten Reiniger.....	49

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Skizze des Prüfobjekts im Bereich eines oberen Molaren.....	27
Abbildung 2: Darstellung einer Prüfschiene für den Oberkiefer.	28
Abbildung 3: Ansicht derselben Prüfschiene nach siebentägiger Tragezeit.....	28
Abbildung 4: Darstellung der in der vorliegenden Studie untersuchten kommerziell erhältlichen Reinigungstabletten.....	30
Abbildung 5: Kalibrationsgerade.	47
Abbildung 6: Box-Whisker-Plots mit Darstellung der Verteilung der Proteinmengen in µg..	49
Abbildung 7: Box-Whisker-Plots mit Darstellung der Proteinreduktion in %.....	51

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AGE	Advanced Glycation Endproduct
Aqua dem.	Aqua demineralisata
BSA	Bovines Serum Albumin
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
FKO	Funktionskieferorthopädie
g	Gramm
h	Stunde
HbA _{1c}	Hämoglobin A _{1c}
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
KbE	Koloniebildende Einheiten
l	Liter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MMA	Methylmethacrylat
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
PKH	Prüfkörperhälfte
PMMA	Polymethylmethacrylat
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
SDS	Natriumdodecylsulfat
SD	Standardabweichung
sp.	Spezies
TNF α	Tumornekrosefaktor α

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden unter dem Titel „Investigation of the cleaning performance of commercial orthodontic cleaning tablets regarding biofilm removal on PMMA test specimens: An ex vivo study“ von Alice Arndt-Fink und Paul-Georg Jost-Brinkmann am 02.06.2023 im Journal of Orofacial Orthopedics in englischer Sprache publiziert.

Im nachfolgenden Text wurde die Anwendung einer geschlechtergerechten Formulierung beachtet.

Die sprachliche Gleichstellung erfolgte durch die Verwendung des Gendersternchens.

Die Kennzeichnung von Waren als eingetragene Marke erfolgte durch die Angabe der entsprechenden Warenzeichen ® und ™.

Zusammenfassung

Herausnehmbare kieferorthopädische Apparaturen werden sowohl während der aktiven Behandlung als auch zur Retention angewendet. Nach Insertion in die Mundhöhle werden die künstlich eingebrachten Oberflächen von Biofilm, der Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen beherbergt, besiedelt. Um Erkrankungen der lokalen Hart- und Weichgewebe sowie systemische Erkrankungen zu verhindern, muss der Biofilm entfernt werden. Eine Möglichkeit ist die Reinigung mit Hilfe von chemischen Reinigern in Form von selbsttätigen Reinigungstabletten.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Reinigungsleistung dreier Zahnspangenreiniger und des Kontrollmediums Leitungswasser geprüft und verglichen. Die Untersuchungen fanden dabei an einem sieben Tage in vivo gereiften Biofilm statt. Dies zielte auf neue Erkenntnisse zur Wirksamkeit selbsttätiger chemischer Reiniger ab und sollte die Lücke zu vorhandenen Studien schließen, die die Effektivität dieser Reiniger bislang ausschließlich an wenige Tage alten weichen Belägen untersuchten.

Die Ermittlung der Reinigungsleistung erfolgte mit Hilfe der modifizierten OPA-Methode, einer quantitativen Proteinmessmethode. Hierzu wurden 80 Prüfkörper, bestehend aus jeweils zwei PMMA-Prüfkörperhälften, in vivo sieben Tage lang von Biofilm besiedelt. Eine Prüfkörperhälfte wurde zur Bestimmung des Proteingehalts ohne Reinigungsprozess herangezogen, während die andere Prüfkörperhälfte randomisiert mit Hilfe eines Zahnspangenreinigers (Retainer Brite®, Kukis® Xpress und Dontodent) oder Leitungswasser gereinigt wurde. Als Indikator für die Reinigungsleistung diente die nach Reinigung nachweisbare Proteinmenge im Vergleich zur Proteinmenge in der ungereinigten Kontrollgruppe.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen dar, dass chemische Reiniger in Form von selbsttätigen Reinigungstabletten nur einen begrenzten Anteil eines sieben Tage alten Biofilms entfernen. Retainer Brite®, der in dieser Untersuchung effektivste Zahnspangenreiniger, führte zu einer Proteinreduktion um $MW 54,5 \pm 7,1 \%$ und ließ somit knapp die Hälfte des Biofilms mitsamt den potenziell pathogenen Mikroorganismen zurück. An seit längerem verschmutzten kieferorthopädischen Apparaturen führen die untersuchten Reiniger zu keiner vollständigen Sauberkeit der Geräte und sollten folglich nicht als alleinige Maßnahme angewendet werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass sich chemische Zahnspangenreiniger in ihrer Reinigungsleistung signifikant voneinander unterscheiden können.

Abstract

Removable orthodontic appliances are used both during active treatment and for retention. After insertion into the oral cavity, the artificially inserted surfaces are colonised by biofilm harbouring pathogens such as bacteria, viruses, fungi, and protozoa. In order to prevent diseases of the local hard and soft tissues as well as systemic diseases, this biofilm must be removed. One possibility is cleaning with the help of chemical cleaners in the form of self-acting cleaning tablets. In this thesis, the cleaning performance of three orthodontic cleaners and the control medium tap water were investigated and compared. The investigations were carried out on biofilm that had matured *in vivo* for seven days. This aims to provide new insights into the effectiveness of self-acting chemical cleaners and to bridge the gap to existing studies that have so far only investigated the effectiveness of these cleaners on soft plaques that have accumulated within a few days.

The cleaning performance was determined by using the modified OPA method, a quantitative protein measurement method. For this purpose, 80 test specimens, each consisting of two PMMA test specimen halves, were colonised by biofilm *in vivo* for seven days. One half of the test specimen was used to determine the protein amount without any cleaning process, while the other half of the test specimen was cleaned with the help of an orthodontic cleaning tablet (Retainer Brite®, Kukis® Xpress or Dontodent) or tap water. The amount of protein detectable after cleaning compared to the amount of protein in the uncleaned control group served as an indicator of the cleaning efficiency.

The results obtained demonstrate that chemical cleaners in the form of self-acting cleaning tablets remove only a partial amount of a seven-day-old biofilm. Retainer Brite®, the most effective orthodontic cleaner in this study, led to a protein reduction of $MW 54.5 \pm 7.1 \%$, leaving behind almost half of the biofilm and its potentially pathogenic microorganisms. On removable orthodontic appliances that have been contaminated for a long time, the cleaners investigated do not lead to complete cleanliness of the appliances and should therefore not be used as the only measure. Furthermore, it was found that chemical orthodontic cleaners can differ significantly from each other in terms of cleaning performance.

1 Einleitung

1.1 Dentaler Biofilm

Im 17. Jahrhundert beschrieb der Niederländer Antoni van Leeuwenhoek als erster Bakterien, die er mit einem selbstgebautes Mikroskop entdeckte. Als eines der ersten Untersuchungsmaterialien diente van Leeuwenhoek hierbei menschlicher Speichel sowie sein eigener Zahnbelag. Bereits mit seinem einfachen Mikroskop charakterisierte er anhand ihrer äußeren Gestalt und ihres Bewegungsvermögens unterschiedliche Bakterienspezies [1]. Mit der Entwicklung von leistungsfähigeren Mikroskopen und Färbetechniken in den darauffolgenden Jahren wurde die Erforschung von Bakterien und Mikroorganismen zunehmend vereinfacht. Heute können in der Mundhöhle etwa 600 verschiedene Spezies nachgewiesen werden [2]. Laut Keijser et al. [3] besteht die bakterielle Zusammensetzung der oralen Mikroflora gesunder Erwachsener schätzungsweise aus über 19.000 Stammtypen. Die Bakterienkonzentration im Speichel beträgt 10^9 KbE/ml, auf den Zahnoberflächen liegen die Bakterienkonzentrationen bei 10^{11} KbE/ml [4]. Des Weiteren befinden sich neben Bakterien auch Viren, Pilze und Protozoen in der Mundhöhle.

Die Mikroorganismen der oralen Mikroflora können frei, sogenannte planktonisch, existieren. Die überwiegende Mehrheit organisiert sich jedoch zu dreidimensionalen Strukturen, dem dentalen Biofilm. Hierbei handelt es sich um eine Ansammlung von interagierenden Mikroorganismen, eingebettet in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS), hauptsächlich in Form von Polysacchariden. Die extrazellulären polymeren Verbindungen werden von den Mikroorganismen ausgeschieden und dienen der Aufrechterhaltung und Bildung komplexer Gemeinschaften. Die Organisation der Mikroorganismen zu Biofilmen hat für diese zahlreiche Vorteile. Unter anderem werden sie vor antimikrobiellen Substanzen und der Phagozytose durch wirtseigene Abwehrzellen geschützt. Extrapolymeren Substanzen stellen eine Diffusionsbarriere für antimikrobielle Substanzen dar, indem sie deren Transportgeschwindigkeit in das Innere des Biofilmes verlangsamen oder durch Interaktion mit den extrapolymeren Substanzen beeinträchtigen [5,6]. Des Weiteren ermöglicht die Heterogenität der bakteriellen Zusammensetzung den Austausch von Stoffwechselprodukten, Signalmolekülen, genetischem Material und Abwehrstoffen [7].

Horizontale Gentransfers, insbesondere solche, die mit Antibiotikaresistenzen zusammenhängen, finden zwischen Zellen in einem Biofilm wesentlich häufiger statt als zwischen ihren planktonischen Gegenstücken [8]. Diese Eigenschaften führen zu einer höheren Widerstandsfähigkeit gegenüber physikalischen und chemischen Belastungen [9]. Zusätzlich fördern sie die mikrobielle Adhäsion an Oberflächen, und das polymere 3-D-Matrixgerüst, in das die

Mikroorganismen eingebettet sind, verleiht ihnen mechanische Stabilität [10].

In der Mundhöhle besiedeln Biofilme sowohl körpereigene Strukturen wie Zähne, Zunge oder Schleimhäute, als auch Fremdmaterialien wie herausnehmbaren Zahnersatz und herausnehmbare kieferorthopädische Apparaturen, die aus therapeutischen Zwecken in die Mundhöhle eingebracht werden.

Die Biofilmbildung auf Oberflächen beginnt mit der Besiedlung eines dünnen, organischen, azellulären Konditionierungsfilms, dem sogenannten "erworbenen Pellicel", bestehend aus Albumin, Lysozym, Glykoproteinen, Phosphoproteinen, Lipiden und Sulkusfluid [11]. Innerhalb von Minuten nach Insertion kommt es zu einer anfänglich reversiblen Adhäsion von Mikroorganismen auf der von Pellicel bedeckten Oberfläche. Zu den Primärbesiedlern zählen vor allem Streptokokken, unter anderem *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* und *Streptococcus sanguis*, sowie *Veillonella*, *Prevotella* und *Campylobacter* [12,13].

Durch stetes Wachstum des Biofilmes ändern sich die Sauerstoffbedingungen im Inneren. Während die Primärbesiedlung vorwiegend durch aerobe Bakterien stattfindet, kommt es während der Reifung des dentalen Biofilms zu einer Vermehrung von anaeroben Bakterien, die den sauerstoffarmen Bedingungen angepasst sind. Eine wichtige Rolle spielt hierbei *Fusobacterium nucleatum* das als Brückenkeim zwischen Früh- und Spätbesiedlern fungiert und sowohl mit aeroben als auch anaeroben Bakterien koaggregiert [14].

Neben der Vermehrung von anaeroben Bakterien kommt es zu einer Gesamtzunahme aller Bakterien [15]. Während sich mikroskopisch zu Beginn zelluläre Inseln, die durch ausgedehnte Hohlräume voneinander getrennt sind, erkennen lassen, führt das Zusammenwachsen zu einem Verlust dieser Hohlräume [16]. Reife Biofilme besitzen Gebiete mit einer hohen Dichte an Bakterien zwischen Arealen mit flüssigkeitsgefüllten Kanälen [17]. Die Reifung unterliegt hierbei zahlreichen Einflüssen wie dem Nährstoffangebot, der Temperatur und dem pH-Wert [18]. Aus reifen Biofilmen können sich Mikrokolonien lösen und über den Speichel weitertransportiert werden [19]. Durch die Einlagerung von Kalziumphosphat in den dentalen Biofilm kann dieser kalzifizieren. Es entsteht mineralisierter Zahnstein, der durch Mundhygienemaßnahmen nicht mehr selbstständig entfernt werden kann, sondern mechanisch entfernt werden muss [20].

1.2 Orale Mikroorganismen als Ursache für Erkrankungen

Bakterien rückten in den Fokus der Zahnmedizin mit Millers chemoparasitärer Theorie, die er Ende des 19. Jahrhunderts veröffentlichte. Diese besagt, dass Karies durch Säuren, die von Bakterien der Mundhöhle sezerniert werden, verursacht wird [21].

Die spezifische Plaquehypothese, dass ein Pathogen beziehungsweise Pathogene der Gruppe der Streptokokken Karies auslösen, war lange Zeit vorherrschend. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf *Streptococcus mutans*, das 1924 erstmals durch J. K. Clarke isoliert wurde [22]. Heute werden sowohl für Karies als auch Parodontitis multifaktorielle Ursachenkomplexe als kausal angesehen. Des Weiteren ist bekannt, dass Bakterien der Mundhöhle durch den Blutkreislauf in den systemischen Kreislauf gelangen können und Erkrankungen hervorrufen sowie auf bestehende Erkrankungen Auswirkungen haben können [23-28].

1.2.1 Lokale Erkrankungen

Biofilme beherbergen Pathogene wie Bakterien, Viren oder Pilze, die Erkrankungen in der Mundhöhle auslösen können. Diese können sowohl die Weichgewebe sowie mit der dentalen Karies auch das Hartgewebe betreffen und gehören zu den häufigsten Erkrankungen der heutigen Zivilgesellschaft. Mit 2,4 Milliarden Betroffenen oder einem Anteil von 35 % der Weltbevölkerung war die dentale Karies im Jahr 2010 die weltweit am stärksten verbreitete Krankheit [29]. Als Auslöser für Karies galt lange Zeit, von der Antike bis ins Mittelalter, ein Zahnwurm, der in den Zähnen der Betroffenen lebt und neben Karies auch Zahnschmerzen verursacht [30]. Historisch gesehen erfolgte der früheste Versuch die Entstehung von Karies wissenschaftlich zu begründen durch den berühmten Pariser Zahnarzt Pierre Fauchard, der in seinem 1728 zweibändig veröffentlichten Buch „Le Chirurgien dentiste, ou Traité des dents“ die bis dahin verbreitete Zahnwurm-Theorie ablehnte [31].

Die Grundlagen für das heute allgemein anerkannte Verständnis zur Entstehung von Karies schuf 1892 Willoughby D. Miller [21]. Demnach handelt es sich um einen chemoparasitären Vorgang, bei dem Mikroorganismen aus niedermolekularen Kohlenhydraten organische Säuren bilden, die zur Demineralisation von Zahnhartsubstanz führen. Seit den 1960ern wird Karies im Rahmen der ökologischen Plaquehypothese als multifaktorielles dynamisches Geschehen angesehen, bei dem Mikroorganismen, Wirt, Substrat und Zeit eine entscheidende Rolle spielen [32,33]. Für kariogene Mikroorganismen entsteht bei erhöhter Zufuhr fermentierbarer Kohlenhydrate ein Wettbewerbsvorteil, da sie durch die Verstoffwechslung ein saures Milieu schaffen und nicht kariogene Bakterien verdrängen [34]. Eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Karies spielt dabei das Bakterium *Streptococcus mutans*, dessen kariogenes Potenzial auf seiner Azidogenität und Azidurität beruht [35]. Weitere Bakterienarten, die sich in einer kariesaktiven Mikroflora im Übermaß finden lassen, sind *Lactobacillus* sp. sowie *Actinomyces* sp. [36]. Kommt es zu einer gesteigerten Aufnahme und Frequenz von fermen-

tierbaren vor allem niedermolekularen Kohlehydraten, führt dies zu einer Persistenz niedriger pH-Bereiche, der Proliferation dieser Bakterien und folglich wird das Gleichgewicht aus De- und Remineralisation gestört. Ein Absinken des pH-Werts auf unter 6,2-6,4 induziert die Demineralisation von Dentin, bei Schmelz liegt der kritische pH-Wert bei 5,5 [37].

Dass vor allem ein hochfrequenter Konsum von Zucker diesen Prozess und die Entstehung von Karies begünstigt, konnte in der Vipeholm-Studie, die von 1945-1953 in Schweden durchgeführt wurde, gezeigt werden. Auch wenn die Studie wichtige Erkenntnisse lieferte, wird sie heute kritisch bewertet, da sie gegen Grundsätze der medizinischen Ethik verstößt.

Der Kariesprozess wird daneben von weiteren Nebenfaktoren wie dem Speichelfluss und der Speichelzusammensetzung, der Fluoridexposition sowie von genetischen Faktoren beeinflusst [38,39]. Modifizierend kann auf diesen Prozess mit Verhaltensfaktoren eingewirkt werden wie der Verbesserung der Mundhygiene, Fluoridierung oder der Anpassung der Ernährungsgewohnheiten. Diese Maßnahmen werden als non-invasiv bezeichnet. Invasive Therapien in Form einer Kariesexkavation und anschließender Restauration werden bei fortgeschrittenen, kavitierten Läsionen notwendig.

Erkrankungen der oralen Weichgewebe können Manifestationen systemischer Erkrankungen sowie hormoneller Veränderungen sein oder durch Medikamente hervorgerufen werden. Entzündungen der Mundschleimhaut werden als Stomatitis bezeichnet. Sie können sowohl durch Mikroorganismen als auch durch chemische und physikalische Noxen hervorgerufen werden. Zumeist sind Erkrankungen der oralen Weichgewebe jedoch plaqueinduziert, weshalb nachfolgend auf diese eingegangen wird [40].

Klinische Symptome einer Gingivitis sind Rötung, Schwellung, Exsudation von Sulkusflüssigkeit, eine erhöhte Blutungsneigung bzw. Blutung nach Sulkussondierung sowie die Ausbildung von Pseudotaschen (erhöhte Sondierungstiefen ohne Attachmentverlust) und Ulzerationen [41,42]. Voraussetzung für das Entstehen einer Gingivitis ist das Vorhandensein von Mikroorganismen. Werden Mundhygienemaßnahmen ausgesetzt, kommt es zu Veränderungen der bakteriellen Zusammensetzung der Plaque. Während in einer gesunden Mundflora grampositive Mikroorganismen überwiegen, begünstigt das sauerstoffarme Milieu des Subgingivalraums anaerobe Mikroorganismen. Innerhalb von zwei bis drei Tagen kommt es zu einer Zunahme von gramnegativen Kokken und gerader Stäbchen, zwischen dem 4.-9. Tag liegt ein großer Anteil fusiformer bzw. filamentöser Mikroorganismen, beweglicher Stäbchen und Spirochäten vor. Diese Entwicklung ist reversibel, werden adäquate Mundhygienemaßnahmen wieder aufgenommen kehrt innerhalb weniger Tage die Mikroflora aus grampositiven Kokken zurück und die klinischen Symptome klingen ab [43].

Wenn die Plaquebildung allerdings weiter ungestört voranschreitet, kommt es innerhalb weniger Wochen zu einer etablierten Gingivitis und es kann sich eine Zahnfleischtasche ausbil-

den, die mit keratinisiertem Taschenepithel ausgekleidet ist [44]. Bei einer etablierten Gingivitis kann es durch die Entfernung der Plaque zu einer Restitutio ad integrum kommen.

Geschieht dies allerdings nicht, kann sich, wie Lindhe et al. [45] in einem Tierversuch zeigen konnten, eine Parodontitis ausbilden. Die genauen Faktoren, die den Übergang von einer Gingivitis in eine Parodontitis bewirken, sind zumeist noch unbekannt.

Die Parodontitis ist eine bakteriell induzierte entzündliche Erkrankung, die zu einem irreversiblen Abbau des lokalen Gewebes und zur Ausbildung einer parodontalen Tasche führt [46]. Der Knochen-, Kollagen- und Attachmentverlust kann Rezessionen mit freiliegenden, empfindlichen Zahnhälsen sowie eine erhöhte Zahnbeweglichkeit und einen vorzeitigen Zahnverlust zur Folge haben. Primärer ätiologischer Faktor sind pathogene Mikroorganismen, die Entzündungsreaktionen hervorrufen können. Charakteristisch ist die Verschiebung der mikrobiellen Spezies im gingivalen Sulkus von fakultativen grampositiven Mikroorganismen zu vorwiegend anaeroben, gramnegativen und proteolytischen Organismen [47]. Zu den bisherigen Beispielen für Bakterien, die mit parodontaler Gesundheit in Verbindung gebracht wurden, gehören unter anderem verschiedene fakultative grampositive Bakterien wie *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces israelis* und *Actinomyces viscosus* [48]. Zu den anaeroben gramnegativen Spezies, die mit Parodontalerkrankungen assoziiert sind, gehören unter anderem *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* [49]. Parodontalkeime stimulieren die Synthese und Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie PGE₂, IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α aus Zellen der angeborenen und erworbenen Immunabwehr und des Parodonts [50,51]. IL-1 β und TNF α stimulieren die Synthese von Prostaglandin E₂, erhöhen die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und können gemeinsam mit anderen entzündungsfördernden Zytokinen Knochenresorptionen auslösen, ein wesentliches Merkmal chronisch entzündlicher Erkrankungen wie der Parodontitis [51,52]. IL-6 wird durch eine Reihe von Zytokinen, darunter IL-1 β und TNF α , aktiviert. IL-6 wird von Osteoblasten sezerniert und stimuliert die Osteoklastenentwicklung und Knochenresorption [53]. Daneben ist für die Knochenresorption das RANK/RANKL/OPG-System von Bedeutung. Eine erhöhte Expression von RANKL, der die Osteoklastenreifung fördert, wurde in entzündetem parodontalem Gewebe festgestellt [54].

Neben dem primären ätiologischen Faktor existieren verhaltensbedingte und allgemeinmedizinische Risikofaktoren für Parodontalerkrankungen. Hierzu zählen unter anderem Tabakkonsum, Diabetes mellitus, Osteoporose und genetische Faktoren wie Polymorphismen von Genclustern in Zytokinen [55-58].

Eine Candidose ist eine entzündliche Erkrankung der Mundschleimhaut und wird durch Pilze der Gattung *Candida* ausgelöst. Eine Candidose ist häufig asymptomatisch, kann jedoch verschiedene klinische Symptome wie Brennen, Schmerzempfindung, Geschmacksveränderun-

gen und Schluckbeschwerden auslösen [59,60].

Die Prävalenz von *Candida* ist mit 60-100 % bei Trägern von herausnehmbarem Zahnersatz gegenüber Nichtträgern erhöht. Häufige Vertreter sind hierbei *Candida albicans*, *Candida glabrata* und *Candida tropicalis* [60]. Des Weiteren scheint es eine Korrelation zwischen dem Auftreten von *Candida albicans* und oralem Lichen planus (OLP) zu geben. Lundström et al. [61] untersuchten Kulturen und histologische Präparate von OLP-Patienten und stellten fest, dass *Candida albicans* signifikant häufiger in den Präparaten und Kulturen der OLP-Patienten zu finden war als in der gesunden Kontrollgruppe.

1.2.2 Systemische Erkrankungen

Pathogene der Mundhöhle können neben der Mundhöhle Erkrankungen an anderen Lokalisationen auslösen. In der Literatur sind Zusammenhänge mit kardiovaskulären, pulmonalen, gastrointestinalen und neurodegenerativen Erkrankungen sowie Stoffwechselstörungen beschrieben worden [62-67].

Bakteriämien sind häufig Folge von oralen therapeutischen Eingriffen wie Zahnbehandlungen oder Zahnextraktionen, sie können jedoch auch Folge von täglichen Aktivitäten wie Zähneputzen sein [68].

Atherosklerose ist ein inflammatorischer Prozess und häufig Ursache von Folgeerkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit und von Folgeereignissen wie Myokardinfarkte und Schlaganfälle. Das C-reaktive Protein als klassisches Akute-Phase-Protein stellt einen geeigneten Biomarker für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und kardiovaskuläre Ereignisse dar. C-reaktives Protein (CRP) wird als Reaktion auf von Makrophagen stammende Signale, vor allem IL-6, produziert. Parodontalkeime erhöhen die Anzahl an Entzündungsmediatoren, unter anderem von IL-6. Diese sind nicht nur auf das lokale Gewebe begrenzt, sondern können über den Blutkreislauf systemisch verteilt werden. Parodontalerkrankungen werden sowohl mit einem erhöhten CRP-Wert als auch mit einer Verringerung des CRP-Wertes nach der Behandlung in Verbindung gebracht [69]. Meta-Analysen, die den Zusammenhang zwischen Parodontitis und kardiovaskulären Ereignissen untersuchten, konnten eine moderate Korrelation feststellen [23,24].

Eine potenziell lebensbedrohliche Erkrankung ist die infektiöse Endokarditis bei der *Staphylococcus aureus* und Streptokokken der Viridans-Gruppe als Hauptverursacher gelten [25]. Streptokokken der Viridans-Gruppe kommen überwiegend in der Mundhöhle und dem Nasenrachenraum vor. Sie können sich allerdings über den Blutkreislauf ausbreiten und verteilen. Ein bekannter Vertreter der Untergruppe der Streptokokken ist *Streptococcus mutans*.

Es konnte nachgewiesen werden, dass *Streptococcus mutans* und seine Virulenzfaktoren eine infektiöse Endokarditis auslösen können [26].

Bakterien aus der Mundhöhle sowie dem Nasen-Rachen-Raum können in die unteren Atemwege verschleppt werden und eine Pneumonie auslösen. Ein Zusammenhang zwischen Mundhygienemaßnahmen und bakteriellen Lungenentzündungen konnte in mehreren Untersuchungen nachgewiesen werden. Eine schlechte Mundhygiene mit einer daraus resultierenden höheren Belastung an Mikroorganismen erhöht das Risiko einer Pneumonie und kann vor allem bei immunsupprimierten Patienten lebensbedrohliche Folgen haben [70-72]. Des Weiteren konnte eine Assoziation zwischen Parodontitis und einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung gezeigt werden [63]. Hierbei scheinen vor allem der Plaque-Index sowie der Verlust von Attachment eine wichtige Rolle zu spielen.

Neurodegenerative Krankheiten umfassen eine Vielzahl von Erkrankungen die den schrittweisen Untergang von Nervenzellen des zentralen Nervensystems kennzeichnen und somit die Funktionen bestimmter Hirnareale und Nervenbahnen beeinträchtigen. Beispiele hierfür sind Morbus Alzheimer, das Parkinson-Syndrom und Chorea Huntington.

Merkmale von Morbus Alzheimer sind Ablagerungen von β -Amyloidpeptiden im Gehirn sowie die Ablagerung von hyperphosphorylierten, zytotoxischen Tau-Proteine aus Zellkörpern an Axone [73].

Studien konnten zeigen, dass das Risiko eines kognitiven Rückgangs von Patienten, die an Morbus Alzheimer erkrankt sind, mit zunehmendem Zahnverlust steigt [74,75]. Bei Patienten mit Gingiva- und Parodontalinfektionen wird häufig das gramnegative Bakterium *Porphyromonas gingivalis* nachgewiesen. Erhöhte Konzentrationen von *Porphyromonas gingivalis*-DNA und seinen sezernierten Virulenzfaktoren, sogenannten Gingipains, finden sich in den Gehirnen von Patienten mit Morbus Alzheimer wieder [67]. In einem Tierversuch korrelierte die orale Besiedlung von *Porphyromonas gingivalis* mit einer erhöhten Produktion von Beta-Amyloid [76]. Eine Inhibition der Gingipains durch synthetisierte niedermolekulare Inhibitoren könnte sich positiv auf neuroinflammatorische Prozesse auswirken, indem die Produktion von Beta-Amyloid gehemmt wird [67]. Inwieweit allerdings die Anwesenheit des Bakteriums Alzheimer auslöst, ist noch nicht abschließend beantwortet und Gegenstand aktueller Forschung.

Diabetes mellitus ist eine Erkrankung, die durch eine chronische Hyperglykämie aufgrund eines Defekts in der Insulinsekretion durch die β -Zellen der Bauchspeicheldrüse, einer Abnahme der Insulinempfindlichkeit oder einer Kombination aus beidem gekennzeichnet ist [77]. Gelangt Insulin in die Blutbahn und bindet an den Insulinrezeptor, wird die Aufnahme von Glukose in die Fett- und Muskelzellen stimuliert. Bleibt dieser Mechanismus durch einen Defekt der Sekretion oder einer Abnahme der Empfindlichkeit aus, führt dies zu chronisch erhöh-

ten Blutzuckerwerten [78].

Es ist bekannt, dass zwischen Parodontitis und Diabetes mellitus eine Korrelation besteht und sie sich gegenseitig beeinflussen. Diabetes mellitus gilt als Risikofaktor für die Entstehung einer Parodontitis. Die Prävalenz und der Schweregrad von Parodontitis ist bei Diabetikern im Vergleich zu Nicht-Diabetikern erhöht und ein erhöhter Schweregrad der Parodontitis wirkt sich negativ auf den Blutzuckerspiegel aus [27,28].

Wie bereits unter Punkt 1.2.1 erwähnt, führen Parodontalkeime zu einer Steigerung von Entzündungsmediatoren wie IL-1 β , IL-6, PGE2 oder TNF α . Bei Diabetikern führt ein chronisch erhöhter Blutzuckerspiegel zu einer beschleunigten Bildung von glykierten Endprodukten (AGEs). Die Interaktion von Makrophagen mit AGEs stimuliert die vermehrte Sekretion von entzündungsfördernden Mediatoren wie TNF- α und IL-1 [79]. Untersuchungen konnten zeigen, dass Probanden mit Typ-1-Diabetes im Vergleich zu Probanden ohne Diabetes erhöhte Werte von Entzündungsmediatoren wie IL-1 β und PGE2 in der Gingivasulkusflüssigkeit aufweisen [65,66]. Bei Typ-2-Diabetes spielt die Einstellung des Blutzuckerspiegels eine wichtige Rolle. Probanden mit schlecht eingestellten Werten (HbA_{1c}>8%) weisen im Vergleich zu gut eingestellten Diabetikern (HbA_{1c}<8%) eine signifikant höhere Konzentration von IL-1 β in der Gingivasulkusflüssigkeit auf [80]. Hyperglykämie führt zu einer verstärkten Entzündungsreaktion und kann zum Abbau des parodontalen Gewebes beitragen.

Eine bestehende Parodontitis hat umgekehrt einen Einfluss auf Diabetes mellitus. Erkenntnisse weisen darauf hin, dass eine moderate bis schwere Parodontitis den HbA_{1c}-Wert negativ beeinflusst und das Risiko für die Entstehung eines Diabetes mellitus erhöht [81]. Wie in Metaanalysen nachgewiesen wurde, kann eine Parodontistherapie zur Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage führen und den HbA_{1c}-Wert drei Monate nach parodontaler Therapie um bis zu 0,36 % senken [64].

1.2.3 Die orale Mundflora während der Behandlung mit herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen

Herausnehmbare kieferorthopädische Apparaturen finden sowohl während der aktiven Behandlung als auch zur Retention Anwendung.

Der Erfolg einer kieferorthopädischen Therapie mit herausnehmbaren Apparaturen hängt von der Mitarbeit des Patienten und der Einhaltung von Tragezeiten ab. In einer Befragung von Witt et al. [82] unter 172 deutschen Kieferorthopäden lag die durchschnittlich pro Tag geforderte Tragezeit bei 15,2 Stunden für FKO-Geräte und bei 16,2 Stunden für Platten. Die Forderung das Gerät immer, außer beim Essen und Sport, zu tragen, wird von 14 % der Befragten für FKO-Geräte und von 32,6 % der Befragten für Platten gestellt. Die für den Behandlungser-

folg als unverzichtbar geltende Mindesttragezeit beträgt 12,8 Stunden für FKO-Geräte und 13,9 Stunden für Platten.

Bereits innerhalb von Minuten nach Einsetzen einer Apparatur kommt es zu einer bakteriellen Besiedlung der in die Mundhöhle eingebrachten Oberflächen. Während der Behandlung mit herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen kommt es zu Veränderungen in der oralen Mundflora, die die qualitative und quantitative Zusammensetzung der Bakterien betrifft. Vor allem das Wachstum azidogener und azidurischer Mikroorganismen wird begünstigt. Sowohl Schlagenhauf et al. [83] als auch Batoni et al. [84] und Kundu et al. [85] konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass es während der Behandlung mit herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen zu einer Zunahme von *Streptococcus mutans* im Speichel der Patienten kommt. Auch ein signifikanter Anstieg von *Lactobacillus* sp. sechs Monate nach Eingliedern einer herausnehmbaren Apparatur konnte beobachtet werden [85,86]. Des Weiteren konnten mehrere Studien darlegen, dass die Eingliederung von herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen zu einer Zunahme von *Candida albicans* innerhalb des Untersuchungszeitraums führt [85-89].

Arendorf und Addy [88] konnten zeigen, dass nach der Insertion einer herausnehmbaren Apparatur die Prävalenz von *Candida albicans* in der Mundhöhle signifikant ansteigt. Nach Beendigung der Therapie folgte ein signifikanter Rückgang der Prävalenz, die das Ausgangsniveau erreichte.

Während der Therapie mit herausnehmbaren Apparaturen kommt es zum Absinken des pH-Werts des Speichels [90]. Des Weiteren kommt es zu einem Anstieg der Plaquewerte und der Gingivaindizes [88,89,91]. Auffällig ist, dass es vor allem in Bereichen, die von der Apparatur bedeckt werden, zu einer höheren Ansammlung von Plaque kommt. Ursache hierfür könnte sein, dass die von der Apparatur bedeckten Flächen der Selbstreinigung durch die Zunge entzogen werden.

Die Ergebnisse dieser Studien belegen, dass die Insertion von herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen die Kolonisierung dieser Mikroorganismen begünstigen kann. Allerdings ist die Datenlage limitiert, da bislang nur wenige Studien existieren, die die Veränderungen der oralen Mundflora während der Behandlung mit herausnehmbaren kieferorthopädischen Geräten untersuchten. Auf Grund einer vergleichbaren mikrobiologischen Situation sowie der Ähnlichkeit der Werkstoffe (PMMA) scheinen jedoch laut Eichenauer et al. [92] Analogieschlüsse mit herausnehmbarem Zahnersatz möglich. Ein Blick in vorhandene Studien, die die Veränderungen der oralen Mundflora nach Eingliederung von herausnehmbarem Zahnersatz untersuchten, zeigt, dass lokale Veränderungen in der Mundhöhle zu Veränderungen in der oralen Mikroflora führen. Wie bei der Eingliederung von herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen wird durch die Eingliederung von herausnehmbarem Zahnersatz die Kolonisierung und das Wachstum von azidogenen und azidurischen Mikroorganis-

men wie *Streptococcus mutans*, Laktobazillen sowie *Candida albicans* gefördert [93-97]. Begünstigend hierfür könnte der geringere Fluss von Sauerstoff und Speichel zum darunterliegenden, von Kunststoff verdeckten Gewebe sein, das ein lokales saures und anaerobes Milieu schafft [98]. Rocha et al. [93] stellten fest, dass die Anzahl von *Streptococcus mutans* im Speichel bereits wenige Tage nach Eingliederung einer Teilprothese ansteigt. Innerhalb von 48 Tagen nach Eingliederung ist der Anstieg von *Streptococcus mutans* gegenüber dem Zeitpunkt der Eingliederung (T0) signifikant erhöht. Närhi et al. [94] konnten zeigen, dass die Prävalenz von *Streptococcus mutans* bei Trägern von Voll- und Teilprothesen gegenüber Nichtträgern erhöht ist. Des Weiteren ist das Tragen von herausnehmbarem Zahnersatz mit einer erhöhten Prävalenz von Pilzen der Gattung *Candida* verbunden [60, 97,99-101]. *Candida* ist ein Kommensale der Mundhöhle und bei 3 bis 48 % gesunder Nicht-Prothesenträger feststellbar [102,103]. Bei Trägern von herausnehmbarem Zahnersatz steigt die Prävalenz von *Candida* auf Werte zwischen 60-100 %, am häufigsten wird *Candida albicans* isoliert [60, 99,100].

Als Folge des Anstiegs dieser Mikroorganismen sowie der Plaquewerte und Gingivaindizes kann geschlussfolgert werden, dass die Therapie mit herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen das Risiko kariöser Läsionen und parodontaler Probleme erhöhen kann. Daher sollten Patienten in kurzen Zeitabständen für Mundhygienemaßnahmen remotiviert werden, die Apparaturen regelmäßig gereinigt und ein optimales Produkt empfohlen werden.

1.3 Reinigung herausnehmbarer kieferorthopädischer Apparaturen

Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben, können Pathogene der oralen Mundflora eine Reihe von systemischen und lokalen Erkrankungen auslösen. Die Reinigung von mit Biofilm besiedelten Apparaturen und herausnehmbarem Zahnersatz mit dem Ziel einer größtmöglichen Keimreduktion hat folglich einen hohen Stellenwert. Für die Reinigung von herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen existieren bislang keine verbindlichen Leitlinien, was zu einer Vielzahl von Möglichkeiten der Reinigung führt. Die Wahl eines Reinigers basiert häufig auf den persönlichen Vorlieben und Erfahrungen des Verbrauchers sowie den Empfehlungen, die durch den Behandler oder das Praxispersonal ausgesprochen werden.

In einer Umfrage von Eichenauer et al. [92] aus dem Jahr 2015 wurden 447 deutsche Kieferorthopäden befragt, welche Empfehlungen Patienten hinsichtlich der Reinigung von herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen gegeben werden. Mehrfachantworten waren hierbei möglich. Die mechanische Reinigung mit einer Zahnbürste empfahlen 99,8 % der Be-

fragten. Die Kombination aus Zahnbürste und Zahnpasta wurde dabei am häufigsten genannt (90 %), seltener wird die Kombination aus Zahnbürste mit Leitungswasser (6 %) oder Geschirrspülmittel (3,8 %) empfohlen. Die chemische Reinigung mit Hilfe von Reinigungstabletten oder -pulver wird von 37,1 % und das Einlegen in Essigsäure von 30,5 % der Befragten angeraten.

In einer 2019 veröffentlichten Umfrage unter 279 teilnehmenden griechischen Kieferorthopäden empfahlen alle die manuelle Reinigung mit Hilfe einer Zahnbürste. Die Mehrheit empfahl den zusätzlichen Einsatz von Reinigungsadditiven, am häufigsten den Einsatz in Form von Prothesenreinigern (70,1 %), gefolgt von Essigsäure (36,9 %) [104].

Türkische Kieferorthopäden empfehlen für herausnehmbare kieferorthopädische Apparaturen zu 94,7 % die mechanische Reinigung mit einer Zahnbürste. Die Empfehlung von zusätzlichen Reinigungsadditiven sprechen 76,9 % der Kieferorthopäden aus, mehrheitlich in Form von chemischen Reinigungstabletten (72,1 %) [105].

Die Ergebnisse dieser Umfragen verdeutlichen, dass es sich bei der manuellen Reinigung mit einer Zahnbürste um die am häufigsten empfohlene Methode zur Reinigung von herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen handelt. Die Reinigung mit chemischen Reinigern in Form von Reinigungstabletten oder -pulvern wird am zweithäufigsten empfohlen.

1.3.1 Mechanische Reinigung

Die mechanische Reinigung ist die von Kieferorthopäden am häufigsten empfohlene Methode zur Reinigung von herausnehmbaren Apparaturen [92,104,105]. Sie kann mit Hilfe einer Zahnbürste oder einer Prothesenbürste erfolgen und mit zusätzlichen Produkten kombiniert werden. Vorteile dieser Reinigungsmethode sind die einfache Durchführbarkeit sowie die günstige und einfache Beschaffung. Bei richtiger Ausführung kann die mechanische Reinigung Biofilme effektiv entfernen und eine probate Methode zur Reinigung von herausnehmbaren Apparaturen und Zahnersatz sein [106]. In einer Untersuchung von Tarbet et al. [107] führte die mechanische Reinigung an Oberkiefertotalprothesen bei korrekter Anwendung zu einer effektiveren Entfernung der Plaque-Ablagerungen als Reinigungstabletten. Jedoch stellen herausnehmbare Apparaturen und ihre eingearbeiteten Elemente zusätzliche Anforderungen. Diedrich [108] stellte fest, dass vor allem in schwer zugänglichen Bereichen wie um Drahtelemente und Schrauben die mechanische Reinigung ungenügend ist. In seiner Untersuchung wurden lediglich die gut zu erreichenden Plattenkörper ausreichend gereinigt. Des Weiteren kann die häufig empfohlene Kombination von Bürste und Zahnpasta zu einer unerwünschten Abrasion, der Entstehung von Aufrauungen und dem Verlust der Oberflächen-

politur von PMMA führen. Die Stärke der abrasiven Wirkung ist hierbei unter anderem von dem verwendeten Putzmaterial abhängig [109]. Die dabei entstandenen raueren, unebenen Flächen können als zusätzliches Reservoir für Plaque dienen, die hier leichter akkumulieren kann [110]. Laut Freitas-Pontes et al. [111] sind spezielle Prothesenreiniger vorzuziehen, da sie die Oberfläche tendenziell weniger beschädigen.

1.3.2 Chemische Reinigung mit Reinigungstabletten oder -pulvern

Die chemische Reinigung mit Reinigungstabletten oder -pulvern werden von 37,1 % der deutschen Kieferorthopäden empfohlen, am häufigsten werden hierbei Kukis Zahnsparngereiniger (31 %), gefolgt von Cetron Reinigungspulver (3,3 %), Corega Tabs (1,8 %) und Medical Ortho-Junior (1 %) genannt [92].

Die Reinigungsleistung von selbstauflösenden chemischen Reinigungstabletten oder chemischen Reinigungslösungen ist unabhängig vom Geschick des Anwenders. Dies kann vor allem in der Kieferorthopädie, wo vorwiegend Kinder und Jugendliche therapiert werden, von Vorteil sein.

Anhand ihrer Wirkstoffe können chemische Reiniger in alkalische Peroxide, alkalische Hypochlorite, Säuren und Enzyme eingeteilt werden. Alkalische Peroxide werden häufig in Form von Tabletten angeboten. Sie produzieren eine sprudelnde alkalische Lösung, die bei Zugabe von Wasser Wasserstoffperoxid und aktiven Sauerstoff erzeugt. Dieser Prozess führt zu einer Desinfektion und zur Oxidation von farbigen Ablagerungen. In Gegenwart von Säuren reagiert Natriumhydrogenkarbonat unter Freisetzung von Kohlenstoffdioxid schäumend. Die aufsteigenden Gasblasen erzeugen eine mechanische Reinigungskomponente. Substanzen wie Tenside dienen als zusätzliche Reinigungskomponente. Die Zugabe von Kaliummonopersulfat wirkt bakterizid, fungizid und viruzid [112,113]. Weitere Inhaltsstoffe sind neben Füllstoffen Farb- und Aromastoffe, die dem Anwender ein Gefühl von Frische vermitteln sollen. Eine Übersicht zur Zusammensetzung chemischer Reinigungstabletten ist exemplarisch mit den in dieser Studie untersuchten Zahnsparngereiniger in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Übersicht der Zusammensetzung der untersuchten chemischen Reinigungstabletten.

Retainer® Brite	Natriumbicarbonat ¹ , Zitronensäure ¹ , Natriumcarbonat ¹ , Kaliumpersulfatverbindung ^{1,2} , Maissirup ^{1,6} , Natriumpercarbonat ¹ , Natriumsulfat ⁶ , Sorbitol ⁶ , Tetraacetylenhendiämin (TAED) ^{1,2} , PEG-180 ⁵ , Natriumdodecylsulfacetat ^{1,5} , Aroma ⁸ , PEG-8 ⁵ , Magnesiumstearat ⁹ , CI 42090 ⁷ , CI 73015 ⁷
Kukis® Xpress	Natriumsulfat ⁶ , Natriumbicarbonat ¹ , Natriumcarbonat ¹ , Zitronensäure ¹ , Apfelsäure ¹ , Kaliumcarbonat ^{1,2} , Natriumpercarbonat ¹ , PEG-150 ⁵ , Amidosulfonsäure ¹ , Maltodextrin ⁵ , Tetraacetylenhendiämin (TAED) ^{1,2} , PEG-90 ⁵ , Aroma ⁸ , Natriumchlorid ^{1,6} , Natriumdodecylbenzolsulfonat ¹ , Stärkenatrium-octenylsuccinat ^{5,6} , Carboxymethylcellulose ^{4,6} , Hexamethylenetetramin ⁴ , Cetylpyridiniumchlorid ³ , Wasser, CI 73015 ⁷
Dontodent	Natriumsulfat ⁶ , Natriumbicarbonat ¹ , Natriumcarbonat ¹ , Zitronensäure ¹ , Apfelsäure ¹ , Kaliumcarbonat ^{1,2} , Natriumpercarbonat ¹ , PEG-150 ⁵ , Aroma ⁸ , Amidosulfonsäure ¹ , Tetraacetylenhendiämin (TAED) ^{1,2} , PEG-90 ⁵ , Natriumdodecylbenzolsulfonat ¹ , Hexamethylenetetramin ⁴ , Cetylpyridiniumchlorid ³ , CI 42090 ⁷

¹ Reinigungsmittel/Entkalker, ² Antimikrobielle Substanz, ³ Antiseptikum, ⁴ Bindemittel, ⁵ Emulgator, ⁶ Füllstoff, ⁷ Farbstoff, ⁸ Geschmacksstoff, ⁹ Hilfsmittel zur Tablettenherstellung

Quelle: Eigene Darstellung.

Während des Reinigungsvorgangs werden herausnehmbare kieferorthopädische Apparaturen, die zumeist aus einem Plattenkörper aus Polymethylmethacrylat (PMMA) und eingearbeiteten Drahtelementen bestehen, in die sprudelnde chemische Reinigungslösung gelegt [114,115]. Dabei können chemische Bestandteile der Reinigungstabletten negative Auswirkungen auf Materialeigenschaften ausüben. Die häufige Anwendung dieser Reiniger kann zu einer erhöhten Oberflächenrauigkeit und zu einer verringerten Biegefestigkeit von PMMA führen [116]. Des Weiteren können Gefüge- und Festigkeitsveränderungen auftreten. Rabe et al. [117,118] untersuchten diese Veränderungen an Silberloten nach der Behandlung mit zwei kommerziellen Zahnsparngereinigern. Ein Zahnsparngereiniger führte bereits nach wenigen Reinigungszyklen zu auffallenden Oberflächenveränderungen in Form einer Korrosionskruste aus metallischem Silber. Derselbe Reiniger führte nach weiteren Reinigungszyklen (50-100) und nach 20-200 Belastungszyklen in einer Biegezugvorrichtung, die die Biegebelastungen beim Ein- und Ausgliedern einer herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparatur simuliert, zu kritischen Defekten, die die Funktion signifikant beeinträchtigen kann. Bei beiden Zahnsparngereinigern waren bereits nach 50 Reinigungszyklen deutliche Anzeichen von Materialermüdung erkennbar.

Die Materialoberflächen von herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen werden kurz nach ihrer Insertion von Bakterien besiedelt. Ein antimikrobieller und plaquereduzierender Effekt von chemischen Reinigern konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden [108,

119-121]. Die Bestandteile der chemischen Reinigungstabletten liegen kurz nach Einbringen in Wasser als Lösung vor und sind in der Lage Bereiche zu penetrieren und zu reinigen, die mit der Bürste nicht erreicht werden können. So konnte Diedrich [108] zeigen, dass Reinigungstabletten im Vergleich zur manuellen Reinigung zu einer besseren Sauberkeit von schwer erreichbaren Stellen führen. In einer In-vivo-Studie an einem vier Tage alten strukturierten Biofilm waren chemische Reinigungstabletten effektiver als Leitungswasser und führten zu einer Proteinreduktion zwischen 79,8 % (Kukis®) und 86,8 % (fittydent super®) [119]. Auch wurde die Wirksamkeit chemischer Reiniger zur Bekämpfung von *Candida albicans*-Biofilmen nachgewiesen. Ghazal et al. [120] verglichen verschiedene Methoden zur Entfernung von *Candida albicans*-Biofilmen. Neben dem manuellen Reinigen mit einer Zahnbürste und der chemischen Reinigung mit einer Reinigungstablette verglichen sie die Reinigung im Ultraschallbad und das Einlegen in eine 0,12%ige Chlorhexidin-Lösung. Die chemische Reinigung mit einer Reinigungstablette war die effektivste Methode um *Candida albicans* zu entfernen. Dass chemische Reiniger nicht nur gegen *Candida albicans*, sondern auch weitere *Candida*-Stämme effektiv sind, konnten de Freitas-Fernandes et al. [121] zeigen. Dabei untersuchten sie die Effektivität der Reiniger in vitro an Biofilmen aus *Candida albicans* und *Candida glabrata* sowie einem Biofilm, der aus beiden Stämmen gebildet wurde. Die Reinigung mit Reinigungstabletten verringerte die Anzahl lebender Zellen signifikant.

1.3.3 Weitere Reinigungsverfahren

Neben der mechanischen Reinigung und der chemischen Reinigung mit Reinigungstabletten oder -pulvern existieren zahlreiche weitere Methoden. Beispiele hierfür sind das Einlegen in verdünnte Essigessenz, Zitronensäure, Mundspüllösungen, die Reinigung in einem Ultraschallgerät oder das Reinigen in der Geschirrspülmaschine [92].

Die Vorteile von Essigsäure sind seine einfache Beschaffbarkeit, die niedrigen Kosten sowie seine geringe Toxizität. In ihrer Studie konnten da Silva et al. [122] zeigen, dass Essigsäure eine probate Option zur Desinfektion gegen zahlreiche Mikroorganismen, namentlich gegen *Candida albicans*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus aureus* und *Escherichia coli*, darstellt. Gegen *Candida albicans* war Essigsäure (Konzentration 100 %) genauso wirksam wie die häufig verwendeten Desinfektionsmittel Natriumhypochlorit (Konzentration 1 %) und Glutaraldehyd (Konzentration 2 %). Des Weiteren kann Essigsäure zum Auflösen von Zahnstein verwendet werden. Dabei sind die Konzentration der Essigsäure und die Verweildauer der Apparatur in der Essiglösung von Bedeutung. Die Auflösung von Zahnstein ist umso effektiver, je höher die Konzentration der Essigsäure ist [123]. Allerdings führt eine Lagerung

in Essigsäure zu negativen Nebeneffekten wie zur Korrosion von Drahtelementen aus Chrom-Nickel [124]. Maleinsäure, die in Apfelessig enthalten ist, kann als Antimykotikum, beispielsweise zur Therapie einer protheseninduzierten Stomatitis, eingesetzt werden. Bereits bei einer Konzentration von 0,25 % besitzt Maleinsäure gegen Candida-Stämme eine fungistatische Wirkung, bei Erhöhung der Konzentration und Expositionszeit, wirkt sie fungizid. Ein weiterer positiver Effekt ist, dass die Verlängerung der Expositionszeit (180 Minuten) zu keiner Veränderung der Oberflächenrauheit oder -farbe führt [125].

Chlorhexidin wird aufgrund seiner antiseptischen und antimikrobiellen Wirkung bei Erkrankungen in der Mundhöhle häufig eingesetzt. Eine Methode zur Reinigung von herausnehmbaren Apparaturen ist das Einlegen in Lösungen auf Basis von Chlorhexidin oder ätherischen Ölen. In einer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass ein Spray auf Chlorhexidin-Basis (Konzentration 0,12 %) eine hohe Wirksamkeit bei der Reduzierung von Streptococcus-mutans-Biofilmen auf Acryloberflächen besitzt [126]. Chlorhexidin hat auch eine hohe Wirksamkeit in der Reduzierung von Candida albicans [127]. Allerdings führt Chlorhexidin häufig zu Farbänderungen des Kunststoffes [128].

Die Reinigung im Ultraschallbad beruht auf dem physikalischen Prinzip der Kavitation. Die erzeugten Gasblasen führen zu einem mechanischen Abtrag von Plaque und Auflagerungen auf Apparaturen, die in das Flüssigkeitsbad eingebracht werden. Sie kann zur zielgerechten Entfernung von Plaque, Debris und Farbauflagerungen dienen [129].

Die Kombination mit chemischen Reinigungslösungen kann den Effekt von Ultraschall verstärken [130]. Die Reinigung mit einem Ultraschallgerät wird allerdings selten empfohlen und setzt die Anschaffung eines Geräts voraus [104].

Die Reinigung von herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen mit Hilfe einer Geschirrspülmaschine empfehlen 3,6 % der deutschen Kieferorthopäden. Von Wallis et al. [131] konnten durch ihre Untersuchung zeigen, dass die Reinigung in einer Geschirrspülmaschine zu befriedigenden bis sehr guten Ergebnissen führt. Die Reinigungsleistung ist vergleichbar mit den in der Literatur aufgeführten Werten von chemischen Reinigungstabletten. Dabei ist die Reinigungsleistung von der Wahl des Reinigungsmittels und des Spülprogrammes abhängig.

1.4 Aktueller Forschungsstand zur Reinigung mit chemischen Reinigungstabletten

Zahlreiche Studien haben die Reinigungsleistung von chemischen Zahnsparngereinigern untersucht [108,117-120,132-134]. Jedoch wurde die Reinigungseffizienz in diesen Studien

vorwiegend an weichen Belägen untersucht, die sich innerhalb einer kurzen Zeitspanne ansammeln. Die Reinigungsleistung von chemischen Reinigungstabletten, ohne den zusätzlichen Einsatz einer Zahnbürste, untersuchten Fathi et al. [119] in ihrer Pilotstudie. Sie prüften die Säuberungsleistung von drei Reinigungstabletten und Leitungswasser an weichen Belägen, die sich in vivo binnen vier Tagen angesammelt hatten. Die untersuchten Zahnsparngereiniger führten zu einer Proteinreduktion zwischen 79,9 % (Kukis®) und 86,8 % (fittydent super®), Wasser führte zu einer Proteinreduktion um 56,5 %.

Diedrich [108] verglich die Wirksamkeit dreier verschiedener Reinigungsmethoden. Neben einem selbsttätigen Zahnsparngereiniger wurde die Kombination aus Zahnbürste und Zahnpasta sowie die Reinigung im Ultraschallbad untersucht. Die drei Reinigungsverfahren wurden in drei aufeinanderfolgenden Untersuchungszyklen an derselben Probandengruppe angewendet. Hierzu wurden aktive Platten aus PMMA für den Ober- und Unterkiefer eingegliedert und zweimal täglich mit Hilfe einer der genannten Methoden gereinigt. Nach einem Monat wurden die Platten rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Selbsttätige chemische Reinigungstabletten führten zu einer weitreichenden Plaqueentfernung. Dass chemische Zahnsparngereiniger wirksam gegen *Candida albicans* und weitere *Candida*-Stämme eingesetzt werden können wurde mehrfach belegt [120,121].

Häufig wurden neben chemischen Reinigungstabletten andere Methoden zur Reinigung kieferorthopädischer Apparaturen, wie beispielsweise die manuelle Reinigung mit einer Zahnbürste oder die Reinigung mit antibakteriellen Mundspüllösungen oder die Kombination zweier Methoden, verglichen. Eine In-vivo-Studie aus dem Jahr 2015 untersuchte die Reinigungseffektivität von drei verschiedenen Reinigungsmethoden an thermoplastischen Alignern. Die Studie war in drei 2-wöchige Phasen unterteilt, in jeder Phase wurden die Probanden gebeten, eine andere Methode zur Reinigung ihrer Aligner anzuwenden. Getestet wurde die Kombination aus Reinigung mit einer chemischen Reinigungstablette (Invisalign® Cleaning System, Align Technology, San Jose, CA, USA) und anschließendem Bürsten mit einer Zahnbürste, das Bürsten mit einer Zahnbürste und Zahnpasta sowie die Reinigung unter fließendem Wasser als Kontrollmethode. Die Kombination aus chemischer Reinigungstablette und anschließendem manuellen Reinigen mit einer Zahnbürste war sowohl der manuellen Reinigung mit Zahnbürste und Zahnpasta als auch der Reinigung unter fließendem Wasser überlegen [132].

Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie aus dem Jahr 2021, in der die Kombination aus manueller Reinigung mit chemischen Reinigungstabletten zur höchsten Biofilmbildung führte [133].

Obwohl diese Studien einen positiven Effekt der Kombination aus chemischer und mechanischer Reinigung darlegen konnten, konnte dieser in einer Untersuchung von Albanna et al. [134] nicht bestätigt werden. Die Kombination aus chemischem Zahnsparngereiniger und ma-

nuellem Bürsten führte im Vergleich zu alleinigem Bürsten zu keiner signifikanten zusätzlichen Reduktion der Bakterienzahl.

Wie bereits unter Punkt 1.2.3 erwähnt, sind auf Grund der vergleichbaren mikrobiologischen Situation sowie der Ähnlichkeit der Werkstoffe (PMMA) laut Eichenauer et al. [92] Analogieschlüsse zu Studien mit herausnehmbarem Zahnersatz möglich.

Mehrere Studien untersuchten die Effizienz von chemischen Prothesenreinigern zur Reinigung von herausnehmbarem Zahnersatz [135-140]. Neben der Entfernung des Biofilms wurde häufig die antimykotische Wirkung von chemischen Prothesenreinigern, vornehmlich gegen *Candida albicans*, untersucht [120,121,141-143]. Grund hierfür ist die bedeutende Rolle bei der Ausbildung einer protheseninduzierten Stomatitis [144]. Sheen und Harrison [135] konnten belegen, dass die Lagerung in einer chemischen Reinigungslösung vor der Reinigung mit Hilfe einer Bürste zu einer deutlichen Reduktion der Plaqueanlagerung führt. Cruz et al. [136] untersuchten an achtzig Vollprothesenträgern die Effektivität verschiedener Reinigungsmethoden nach vorangegangener mechanischer Reinigung mit Hilfe einer Prothesenbürste. Neben der Reinigung mit chemischen Reinigungstabletten wurden die Reinigung mit Hilfe eines Ultraschallgeräts sowie die Kombination aus beiden Methoden untersucht. Sowohl die chemische Reinigung als auch die Reinigung mit Hilfe eines Ultraschallgeräts führten zu einer effektiveren Biofilmentfernung als die alleinige Reinigung mit Wasser. Eine vergleichbare Studie untersuchte den chemischen Prothesenreiniger NitrAdine™ (bonyf AG, Vaduz, Liechtenstein) hinsichtlich dessen Wirksamkeit bei der Biofilmentfernung von Totalprothesen sowie dessen antimikrobielle Wirkung gegen Pilze der Gattung *Candida*. NitrAdine™ erwies sich als effizient bei der Entfernung des Biofilms, darüber hinaus konnte eine antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden [137]. Jose et al. [138] untersuchten in einer In-vitro-Studie auf einem künstlich gezüchteten *Candida albicans*-Biofilm vier chemische Protheseneiniger. Die Reiniger wurden hinsichtlich ihrer Effektivität, die Biofilmmasse sowie die Stoffwechselaktivität zu reduzieren, untersucht. Sie führten zu einer Reduktion der Biofilmmasse um 73 bis über 90 % und zu einer Reduzierung der Stoffwechselaktivität.

Weitere Untersuchungen konnten darlegen, dass chemische Prothesenreiniger in der Lage sind, in vitro gezüchtete *Candida*-Biofilme von PMMA-Oberflächen zu entfernen [121,141], die Adhäsion von *Candida albicans* auf PMMA-Oberflächen zu verringern [142] sowie dessen Vermehrung zu hemmen [143].

Dieser antimykotische Effekt von chemischen Prothesenreinigern konnte in anderen Studien wiederum nicht bestätigt werden. Da Silva et al. [122] untersuchten die antimikrobielle Wirksamkeit sechs verschiedener Lösungen auf in vitro kontaminierten Acrylharzproben. Der untersuchte Prothesenreiniger in Form einer Reinigungstablette wies keine ausreichende antimikrobielle Effektivität gegen *Candida albicans* auf, obwohl eine antimikrobielle Wirksamkeit

gegen *Streptococcus mutans* und *Streptococcus aureus* festgestellt werden konnte.

Lucena-Ferreira et al. [145] untersuchten die Fragestellung, ob die tägliche Anwendung einer chemischen Reinigungstablette in Ergänzung zur routinemäßigen Reinigung bei Teilprothesenträgern zu einer signifikanten Keimreduktion führt. Die tägliche Anwendung des Reinigers konnte die Anzahl an Streptokokken und damit die Gesamtheit aller Mikroorganismen auf den Prothesenoberflächen verringern, führte jedoch zu keiner signifikanten Reduktion von Pilzen der Gattung *Candida*.

Andere Untersuchungen konnten darlegen, dass einzelne chemische Reiniger in der Lage sind antimikrobiell zu wirken, allerdings zu keiner weitgehenden Reduktion des *in vitro* gebildeten Multispezies-Biofilms führen [107,139,140]. Coimbra et al. [139] untersuchten die Auswirkungen von Reinigungstabletten auf Peroxidbasis auf einen von *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* gebildeten Biofilm. Der Biofilm bildete sich *in vitro* innerhalb von 24 Stunden auf Testkörpern aus Kunststoff. Die Reinigungstabletten hatten eine antimikrobielle Wirkung, erreichten aber nicht die weitgehende Entfernung des aggregierten Biofilms. Aus den Studienergebnissen von Tarbet et al. [107] geht neben der Erkenntnis, dass die zwei untersuchten chemischen Reiniger nicht dazu in der Lage sind, die angesammelten Plaqueablagerungen von Prothesen zu entfernen, hervor, dass die mechanische Reinigung der chemischen Reinigung überlegen ist.

Die Wirksamkeit von chemischen Reinigern in Form von Reinigungstabletten ist somit nicht eindeutig geklärt. Laut De Souza et al. [146] deuten die Ergebnisse aus sechs randomisierten, kontrollierten Studien dahingehend, dass chemische Reiniger bei der Reduzierung von Mikroorganismen sowie der Plaquebedeckung von Prothesenoberflächen wirksamer zu sein scheinen als die Reinigung mit Leitungswasser. Allerdings ist die Datenlage zur Effektivität von chemischen Prothesenreinigern sowie deren Vergleich mit anderen Reinigungsverfahren limitiert. Grund hierfür sind sowohl die fehlende Anzahl an randomisierten, kontrollierten Studien, eine Vielzahl an verschiedenen Interventionen sowie eine fehlende Standardisierung der Untersuchungsmethoden [146,147].

1.5 Herleitung der Frage- und Aufgabenstellung

Bisherige wissenschaftliche Studien zur Reinigungsleistung von Zahnsparrenreinigern untersuchten die Reinigungsleistung an einem Biofilm, der nur wenige Tage alt war. Die Zeitspanne, in der sich der Biofilm ansammelte, reichte dabei von wenigen Stunden bis zu vier Tagen [108,117-120,132-134]. Bislang blieb offen, wie gut die Reinigungsleistung von chemischen Reinigungstabletten an einem sieben Tage alten Biofilm und den damit einhergehen-

den strukturellen Veränderungen ist. Ziel dieser Studie war, Erkenntnisse zur Wirksamkeit von selbsttätigen Zahnsparngereinigern an einem sieben Tage alten strukturierten Biofilm zu gewinnen, um eine wissenschaftlich begründete Empfehlung zum Reinigen von herausnehmbaren kieferorthopädischen Geräten abzuleiten. Des Weiteren sollte die Reinigungsleistung von drei Sparngereinigern untereinander verglichen werden. Die Empfehlung eines oder mehrerer Produkte, die den Biofilm effektiv beseitigen, soll dazu beitragen, dass die Kariesaktivität und Gingivitisrate bei Patienten mit herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen zukünftig reduziert wird.

Die primäre Hypothese lautet: Die alleinige chemische Reinigung mit kommerziellen Zahnsparngereinigern führt zu einer ausreichenden Reinigungsleistung bei einem reifen Biofilm.

Die sekundäre Hypothese lautet: Die Reinigungsleistung der drei Zahnsparngereiniger unterscheidet sich voneinander.

2 Methodik und Materialien

2.1 Studienkohorte

2.1.1 Proband*innen

Diese Ex-vivo-Studie wurde von der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin genehmigt (EA4/048/21) und in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (1964) durchgeführt. Die Studie wurde nach dem positiven Entscheid der Ethikkommission im deutschen Register für klinische Studien registriert (DRKS00024882).

Die Fallzahlplanung erfolgte vor Rekrutierung mit der Prozedur MOE1-1 von nQuery 8.6.1.0 basierend auf einer früheren Pilotstudie [119]. Da drei Reiniger getestet werden sollten, wurde das multiple einseitige Signifikanzniveau von $\alpha = 0,025$ auf $\alpha = 0,0071$ abgesenkt. Weiter wurde angenommen, dass die Reinigungsleistung aller drei Produkte bei mindestens 80 % liegt und die Streuung der Reinigungsleistung $\sigma = 6,1$ % beträgt. Der einseitige Einstichproben t-Test gegen den festen Wert $\mu_0 = 75$ % hatte dann bei einem Stichprobenumfang von $n = 20$ eine Power von mindestens 80 %.

Alle Proband*innen wurden vorab über das Ziel sowie mögliche Risiken in mündlicher und schriftlicher Form aufgeklärt und erteilten ihre schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie. Sie konnten ihre Einwilligung und ihre Teilnahme jederzeit ohne Nennung von Gründen widerrufen. Es wurden insgesamt 20 gesunde volljährige Teilnehmer*innen (11 Frauen, 9 Männer, Mittel 34,5 Jahre, Min. 19 Jahre, Max. 61 Jahre) rekrutiert, die alle in der Lage waren, eigenverantwortlich über ihre Teilnahme an der Studie zu entscheiden. Das Alter sowie Vorerkrankungen wurden anhand eines Anamnesebogens erfasst, danach erfolgte die Untersuchung der Mundhöhle. Nur Personen, die alle Ein- bzw. die Ausschlusskriterien (Tabelle 2) erfüllten, wurden als Studienteilnehmer*innen akzeptiert. Wäre während der Studienteilnahme eines der Ausschlusskriterien eingetreten, so hätte dies zum Ausschluss aus der Studie geführt. Dies trat allerdings in keinem Fall ein.

Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> • Bereitschaft, sich an die siebentägige Tragedauer zu halten und die Schiene nur zur Zahnreinigung zu entfernen. • Proband*innen, die ≥ 18 Jahre alt sind. • Proband*innen, die eigenverantwortlich über ihre Teilnahme an der Studie entscheiden können. 	<ul style="list-style-type: none"> • Herausnehmbarer Zahnersatz oder herausnehmbare kieferorthopädische Apparaturen im Oberkiefer. • Das Fehlen erster und zweiter Molaren im Oberkiefer. • Während der Tragedauer Applikation von fluoridhaltigen Präparaten wie fluoridierter Zahnpasta, Fluoridgel, Fluoridlösung, Fluoridlack, Tooth Mousse® oder antibakteriellen Spüllösungen mit Chlorhexidin oder ätherischen Ölen. • Verwendung/Kauen von Kaugummis • Jugendliche unter 18 Jahren • Geistig retardierte Menschen • Aktive Karies/Parodontitis • Infektionskrankheiten, wie z. B. Hepatitis oder/und HIV-Infektion • Immunsuppression • Einnahme von oralen Antibiotika • Allergien gegen PMMA/MMA

Quelle: Eigene Darstellung.

2.1.2 Randomisierung

Die schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie und zur Datenverarbeitung wurde von allen Proband*innen in Form einer Einwilligungserklärung eingeholt. Hierzu zog der Proband/die Probandin zufällig einen Umschlag, in dem sich neben der Einwilligungserklärung eine Probandennummer von 1 bis 20 in unsortierter Reihenfolge befand. Damit wurden dem Probanden/der Probandin automatisch eine Probandennummer zugeteilt, die auch gleichzeitig als Identifikationsnummer diente. Die Identifikationsnummer wurde auf den Einwilligungserklärungen schriftlich festgehalten und beim Studienleiter hinterlegt.

Bei der Abgabe der Schiene nach der siebentägigen Tragezeit identifizierte sich der Proband/die Probandin mit dieser Probanden-/Identifikationsnummer. Die Festlegung, welche Reinigungslösung bei welchem Probanden für welches Kunststoffplättchen verwendet wird, wurde anhand dieser Probandennummer verschlüsselt. Im Voraus war festgelegt worden, welche Prüfkörperhälfte der Schiene des jeweiligen Probanden mit welcher Reinigungslösung gereinigt werden sollte (Tabelle 3). Dabei rotierte die Zuordnung Reiniger zu Prüfkörperhälfte, um lokal bestehende individuelle Unterschiede in der Ansammlung von Biofilm zwischen den Proband*innen auszugleichen.

Tabelle 3: Festlegung welche Reinigungslösung bei welchem Probanden/welcher Probandin für welches Kunststoffplättchen verwendet wird. Die Zuordnung, welche Prüfkörperhälfte (A2, B2, C2, D2) mit welcher Reinigungslösung gereinigt wird, wurde zufällig festgelegt. Die Prüfkörperhälften A1, B1, C1 und D1 wurden zur Quantifizierung der initialen Proteinmenge ungereinigt untersucht (siehe Punkt 4.4).

ID-Nr.	Prüfkörperhälfte							
	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2
1	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser
2	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent
3	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress
4	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®
5	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser
6	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent
7	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress
8	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®
9	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser
10	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent
11	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress
12	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®
13	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser
14	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent
15	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress
16	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®
17	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser
18	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent
19	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®	-/-	Kukis® Xpress
20	-/-	Kukis® Xpress	-/-	Dontodent	-/-	Leitungswasser	-/-	Retainer Brite®

Quelle: Eigene Darstellung.

2.2 Prüfobjekt

2.2.1 Herstellung der Prüfobjekte

Bei den Prüfobjekten handelte es sich um die für die Proband*innen individuell angefertigten Prüfschienen für den Oberkiefer, in die jeweils vier identische Prüfkörper integriert waren. Ein Prüfkörper wurde dabei aus einer Halterung und zwei identisch dimensionierten Prüfkörperhälften aus PMMA gebildet (Abbildungen 1 und 2). Die Prüfkörperhälften wurden während des siebentägigen Tragezeitraums von Biofilm besiedelt und anschließend mit Hilfe der OPA-Methode untersucht.

Für die Herstellung der Prüfobjekte wurden der Ober- und Unterkiefer der Studienteilnehmer*innen mit Alginat (Tetrachrom, Kaniedenta GmbH & Co. KG, Herford, Deutschland) abgeformt und Modelle aus Hartgips (OCTA-STONE® CN, Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) hergestellt. Über das Gipsmodell des Oberkiefers wurde eine 1 mm dicke hartelastische transparente DURAN® Folie (Scheu-Dental GmbH, Iserlohn, Deutschland) druckgeformt, die als Träger für die Prüfkörper diente. Die Prüfkörper wurden separat hergestellt. Zunächst wurden Halterungen für die Prüfkörperhälften im 3-D-Druckverfahren (UltiMaker 3 Extended, UltiMaker B.V., Utrecht, Niederlande) aus PLA (PLA-Filament Weiß Milky, Bernhardt Kunststoffverarbeitung GmbH, Velten, Deutschland) gedruckt (Außendurchmesser 7 mm, Innendurchmesser 5 mm, Höhe 1,5 mm). Der PLA-Ring war in der Mitte durch eine 0,5 mm dünne Trennwand geteilt, sodass sich zwei identisch dimensionierte Prüfkörperhälften ergaben (Abbildung 2). Die Innenfläche jeder Kunststoffhalterung wurde konisch gestaltet (7°). Dies verhinderte das vorzeitige Herausfallen der Prüfkörperhälften aus der Halterung in eine Richtung. Die Halterungen wurden isoliert (3D Isoliermittel, Dentaurum, Ispringen, Deutschland), 20 Minuten lang getrocknet und anschließend mit PMMA-Kunststoff (Orthocryl®, Dentaurum, Ispringen, Deutschland) im Streuverfahren befüllt. Um eine glatte Oberfläche zu erzielen, wurden die Prüfkörper zwischen zwei Glasplatten platziert, durch ein Gewicht (500 g) beschwert und dann im Drucktopf bei 2,2 bar und 40 °C polymerisiert. Die PMMA-Prüfkörper wurden nach dem Polymerisationsvorgang zur Reduzierung des Restmonomergehalts 24 Stunden lang in Wasser gelagert. Anschließend wurden die Prüfkörper symmetrisch auf den bukkalen Flächen der Oberkiefermolaren platziert und durch Kunststoff (Orthocryl LC®, Dentaurum, Ispringen, Deutschland) fest mit der Schiene verbunden (Abbildungen 1 und 2). Um einen stabilen Verbund zu erzielen, wurden die entsprechenden umliegenden Anteile der Schiene zuvor mit Sandpapier angeraut und mit Monomer (Orthocryl® Flüssigkeit, Dentaurum, Ispringen, Deutschland) benetzt. Im Bereich der Molaren wurde zuvor mit einem Rosenbohrer (Durchmesser 3 mm) jeweils mittig ein Loch gebohrt. Während der Tragezeit wur-

den die Löcher in der DURAN®-Schiene mit Silikon (Provil® novo, Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) abgedeckt, sodass nur die Bukkalflächen der Prüfkörper von Biofilm besiedelt wurden. Die Schiene wurde wie eine Retentionsschiene ausgearbeitet und anschließend eingegliedert. Nach Beendigung der siebentägigen Tragezeit wurden die verschmutzten Schienen eingesammelt und unmittelbar danach untersucht.

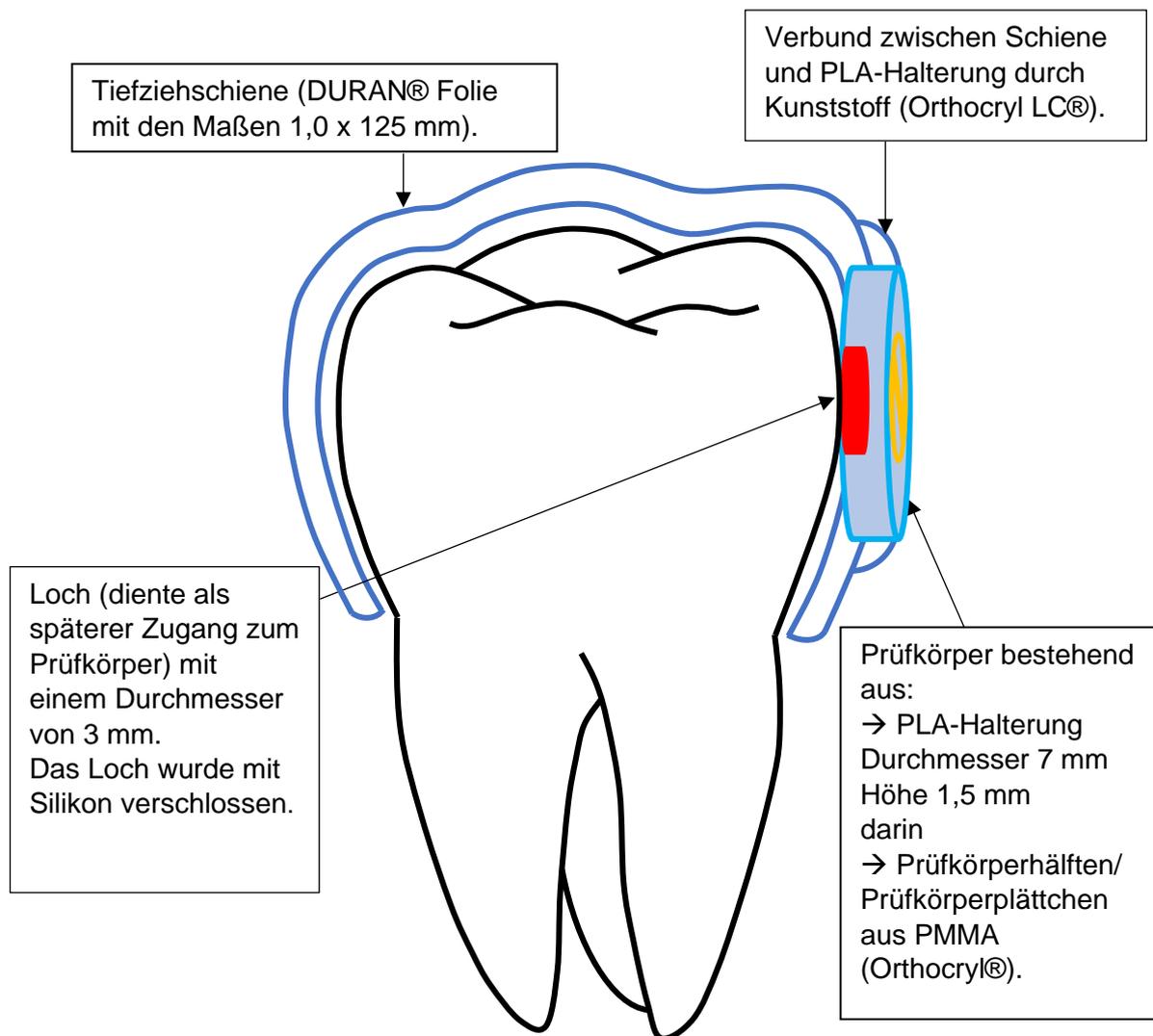


Abbildung 1: Skizze des Prüfobjekts im Bereich eines oberen Molaren. Eine DURAN® Folie diente als Träger für die Prüfkörper bestehend aus einer Prüfkörperhalterung und zwei identisch dimensionierten Prüfkörperhälften aus PMMA (Orthocryl®, Dentaurum, Ispringen, Deutschland). Die Verbindung beider Elemente erfolgte mit Hilfe von lichthärtendem Kunststoff (Orthocryl LC®, Dentaurum, Ispringen, Deutschland). Quelle: Eigene Darstellung.

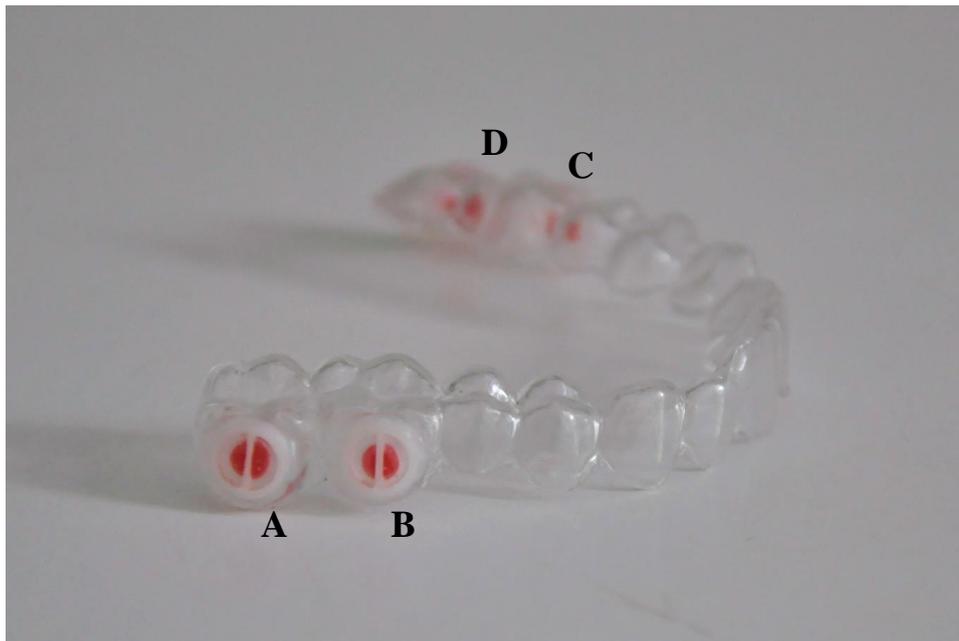


Abbildung 2: Darstellung einer Prüfschiene für den Oberkiefer mit vier Prüfkörpern lokalisiert an den bukkalen Flächen der Molaren. Der Zugang zu den Prüfkörpern wurde zur besseren Visualisierung von innen mit Wachs abgedeckt und für die Probandenversuche durch Silikon ersetzt. Die Lokalisation der Prüfkörper wurde mit den Buchstaben A, B, C und D nummeriert. Die Zuordnung der Reiniger zum Prüfkörper rotierte nach einem vorher festgelegten Protokoll (vgl. Tabelle 3). Quelle: Aus Arndt-Fink und Jost-Brinkmann, 2023 [148].



Abbildung 3: Ansicht derselben Prüfschiene nach siebentägiger Tragezeit. Quelle: Eigene Aufnahme.

2.2.2 Trageweise der Prüfschienen

Die Studienteilnehmer*innen wurden zur Trageweise der Prüfschiene mündlich aufgeklärt und bekamen ein Informationsblatt mit Trage- und Putzanweisungen (siehe drks.de – DRKS-ID: 00024882). Alle Proband*innen erklärten sich dazu bereit, sieben Tage lang ein Prüfobjekt in Form einer Tiefziehschiene mit vier Prüfkörpern zu tragen und diese lediglich zum Zähneputzen mit einer fluoridfreien Zahnpasta herauszunehmen. Während der siebentägigen Tragezeit durften keine fluoridhaltigen Präparate oder antibakterielle Mundspülungen mit Chlorhexidin oder ätherischen Ölen verwendet werden. Die Studienzahnärztin stellte den Teilnehmer*innen für den Tragezeitraum eine fluoridfreie Zahnpasta (Neobio Zahncreme fluoridfrei, LOGOCOS Natur-kosmetik GmbH & Co. KG, Salzhemmendorf, Deutschland) zur Verfügung. Das Einsetzen sowie das Rausnehmen der Prüfschiene wurde mit den Proband*innen vorab geübt. Die Prüfschiene, die auch zum Essen getragen wurde, durfte nicht gereinigt werden. Lediglich grobe Verunreinigungen durften vorsichtig ohne jegliche Berührung der bukkalen Prüfkörperoberflächen abgespült werden. Während des Zähneputzens sollte die Prüfschiene feucht in der mitgegebenen Spangendose aufbewahrt werden. Falls sich ein Prüfkörper lockerte oder von der Prüfschiene löste, sollte dieser in der mitgegebenen Dose aufbewahrt werden. Das Eintreten eines solchen Falls reduzierte die Anzahl der Prüfkörper und somit der Reinigungsvergleiche da diese für eine anschließende Untersuchung nicht berücksichtigt wurden.

2.3 Untersuchte Zahnsparngerreiniger

Untersucht wurden drei kommerziell erhältliche Zahnsparngerreiniger sowie Leitungswasser als Kontrollmedium. Es wurden ausschließlich Reiniger in Form von selbstauflösenden Reinigungstabletten auf Basis von alkalischen Peroxiden untersucht, die bei ihrer Zugabe zu Wasser eine sprudelnde alkalische Lösung erzeugen. Die chemische Zusammensetzung der Reinigungstabletten ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Bei den untersuchten Reinigungstabletten handelte es sich um Retainer Brite® (Dentsply International Raintree Essix, FL, Sarasota, USA), Kukis® Xpress (Reckitt Benckiser, Heidelberg, Deutschland) und Dontodent (Propack, Heidelberg, Deutschland) (Abbildung 4).

Jede Reinigungstablette wurde einzeln in ein mit 150 ml Leitungswasser gefülltes Glas gegeben, dessen Wassertemperatur 40 ± 2 °C betrug. Die Verweildauer der Prüfkörper in der Reinigungslösung entsprach den von den Herstellern angegebenen Einwirkzeiten von 15 Minuten für Retainer Brite®, 10 Minuten für Dontodent und 3 Minuten für Kukis® Xpress. Die Verweildauer der Prüfkörper in dem Kontrollmedium Leitungswasser betrug 15 Minuten.



Abbildung 4: Foto der in der vorliegenden Studie untersuchten kommerziell erhältlichen Reinigungstabletten. Von links: Retainer Brite®, Kukis® Xpress und Donto dent Zahnsplangenreiniger. Quelle: Eigene Aufnahme.

2.4 Modifizierte OPA-Methode

In dieser Studie wurde die Reinigungsleistung der Zahnsplangenreiniger und Leitungswasser mit Hilfe der modifizierten OPA-Methode (ortho-Phthaldialdehyd) erfasst. Bei der modifizierten OPA-Methode handelt es sich um eine Methode zur quantitativen Bestimmung des proteinhaltigen Kontaminationsgrades. Sie besitzt eine hohe Sensitivität mit einer Nachweisbarkeit bis in den Picomolbereich und stellt eine Standardmethode zur Überprüfung der Reinigung nach der maschinellen Instrumentenaufbereitung dar [149].

In Gegenwart einer Thiolkomponente reagiert o-Phthaldialdehyd mit freien α - und ϵ -terminalen Aminogruppen von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen zu einem zur Gruppe der Isoindole fluoreszierenden Endprodukt (1-Alkylthio-2-alkylisoindolen). Dieses Endprodukt ist spektral-photometrisch bei 340 nm detektierbar und durch Messung der Extinktion quantifizierbar [150]. Die modifizierte OPA-Methode unterscheidet sich von der Originalmethode durch den Ersatz des eingesetzten Thiolreagenzes Mercaptoethanol durch 2-Mercaptoethansulfonsäure als Natriumsalz. Dadurch wird das Extinktionsverhalten der Lösung wesentlich stabilisiert, weshalb heute vorwiegend die modifizierte OPA-Methode angewendet wird [151].

Zur Quantifizierung der unbekanntenen Proteinmenge der Prüfkörperproben erfolgte zuvor eine Kalibration mit bovinem Serum-Albumin (BSA, Fraktion V, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA) bekannter Konzentration.

Anhand der daraus erstellten Kalibrationsgeraden (siehe Kap. 4.1) konnte die Proteinmenge der ungereinigten Prüfkörperhälften sowie die Restproteinmenge der gereinigten Prüfkörperhälften ermittelt werden.

2.4.1 Herstellung und Kontrolle der OPA-Lösung

Die zur Herstellung des OPA-Reagenzes benötigten Chemikalien sind in Tabelle 4 aufgelistet. Zunächst wurden 40 mg o-Phthaldialdehyd und 1 ml Methanol in einem Erlenmeyerkolben mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt. Der homogenen Lösung wurde 116 mg 2-Mercaptoethansulfonsäure zugefügt (Lösung A). In einem weiteren Erlenmeyerkolben wurde mit Hilfe des Magnetrührers 1,005 g di-Natriumtetraborat in 50 ml Aqua dem. gelöst (Lösung B). Es folgte die Überführung von Lösung A in Lösung B und die Zugabe von 1,25 ml 20%iger SDS-Lösung. Das OPA-Reagenz wurde vor den Messungen täglich frisch hergestellt. Die Kontrolle des angesetzten OPA-Reagenzes erfolgte mit einer Leucin-Standardlösung. Zur Herstellung des Leucin-Standards wurden 65,5 mg Leucin in 50 ml Aqua dem. gelöst. Ein Milliliter des OPA-Reagenzes wurden entnommen und in eine Küvette pipettiert, anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl der Leucin-Lösung. Die Extinktion sollte nach zwei Minuten Inkubation im Bereich $E = 0,641 \pm 0,032$ liegen [152]. Sobald die Extinktion außerhalb dieses Wertebereiches lag, wurde die OPA-Lösung verworfen, und durch eine neu angesetzte Lösung, die im geforderten Bereich (von $E = 0,641 \pm 0,032$) lag, ersetzt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des OPA-Reagenzes mit Mengenangabe.

Zusammensetzung des OPA-Reagenzes	
40 mg	o-Phthaldialdehyd
1 ml	Methanol
116 mg	2-Mercaptoethansulfonsäure
1,005 g	di-Natriumtetraborat
50 ml	Aqua dem.
1,25 ml	SDS-Lösung 20 % in Aqua dem.

Quelle: Eigene Darstellung.

2.4.2 Aufbereitung/Behandlung der Proben

Nach Beendigung der siebentägigen Tragezeit wurden die Prüfschienen eingesammelt und untersucht. Hierzu wurde zunächst das innenliegende Silikon, das als Abdeckung diente, mit einer sterilen und in 1%iger SDS-Lösung geschwenkten Pinzette entnommen. Die von Biofilm unbesiedelten Innenflächen der PMMA-Prüfkörper lagen nun frei und konnten mit geringem Kraftaufwand aus der Halterung herausgedrückt werden. Eine Prüfkörperhälfte wurde entsprechend den Herstelleranweisungen gereinigt. Nach der vom Hersteller angegebenen Reinigungszeit wurde sie aus der Reinigungslösung entnommen und in ein Reagenzröhrchen mit 550 µl 1%iger SDS-Lösung (pH 11,5) überführt. Zur Elution der auf den Prüfkörperhälften vorhandenen Proteine wurden diese anschließend 30 Minuten lang im Ultraschallbad (SONOREX SUPER RK 103 H, BANDELIN, Berlin, Deutschland) bei 30 °C aufbereitet. Zur Bestimmung der Eigenextinktion wurden zweimal jeweils 250 µl des Proteineluats in eine Küvette pipettiert. Die Messung erfolgte mit einem Photometer (Shimadzu™ UVmini-1240, Kyoto, Japan) bei 340 nm. Anschließend wurden jeweils 250 µl des OPA-Reagenzes hinzupipettiert. Nach einer Reaktionszeit von zwei Minuten wurde die Extinktion der Lösung gemessen. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte mittels Kalibrationsgeraden mit bovinem Serumalbumin (siehe Kap. 4.1). Die zweite Prüfkörperhälfte wurde ungereinigt in ein Reagenzröhrchen überführt, das mit 550 µl 1%iger SDS-Lösung gefüllt war. Die Elution im Ultraschallbad und die Bestimmung der Eigenextinktion sowie der Extinktion der Lösung erfolgten analog der Vorgehensweise für die Aufbereitung der gereinigten Prüfkörperhälften.

2.5 Statistische Auswertung

Für alle statistischen Analysen und grafischen Darstellungen wurde IBM SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) Version 27.0 verwendet. Für jeden metrischen Endpunkt wurden Mittelwert, Standardabweichung, Median, Interquartilsabstand, Minimum und Maximum bestimmt. Zur grafischen Darstellung wurden Box-Whisker-Plots verwendet. Da die Linie innerhalb der Box definitionsgemäß den Median der Verteilung darstellt, wurden unter den Abbildungen 6 und 7 zusätzlich zu den Mittelwerten die Medianwerte angegeben. Für den Vergleich der Reinigungsleistung der drei Zahnsparngeräte wurde aufgrund der Datenverteilung ein parametrischer Test, der t-Test für abhängige Stichproben, gewählt. Alle p-Werte wurden nach Bonferroni mit dem Faktor 3, für drei Paarvergleiche, adjustiert, wobei ein p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant definiert wurde.

3 Vorversuche

Die Ergebnisse dieser Studie lassen sich in Resultate der Vor- und Hauptuntersuchungen unterteilen. Vor der Rekrutierung der Proband*innen für die Hauptuntersuchungen fanden mehrere Vorversuche statt. Diese dienten dazu, die Anwendbarkeit der OPA-Methode für das Studiendesign zu überprüfen und die Nachweisgrenze der OPA-Methode herabzusetzen. Zudem musste überprüft werden, ob neben der Besiedlung durch die Mundhöhle eine weitere Protein- beziehungsweise Kontaminationsquelle existiert, die das Messergebnis verfälschen könnte. Dass Bestandteile der eingesetzten Komponenten (Chemikalien, Materialien etc.) mit dem OPA-Reagenz reagieren, und so zu falsch positiven Messwerten führen, musste deshalb ausgeschlossen werden. Hierzu wurden alle Materialien untersucht, die mit den Prüfkörperhälften in Kontakt kamen. Mögliche Fehlerquellen waren die Halterungen, die als Träger für die Prüfkörperhälften dienten, und das Isoliermittel (3.1.1), das zum Abdecken verwendete Silikon (3.1.2), die aus PMMA hergestellten Prüfkörperhälften selbst (3.1.3) sowie die Reinigungslösungen bestehend aus den in Wasser aufgelösten Reinigungstabletten (3.1.4).

3.1 Vorversuche zu möglichen Störquellen der OPA-Methode durch Kontamination

3.1.1 Prüfung der Prüfkörperhalterungen und des Isoliermittels

Zunächst wurden zwanzig 3-D-gedruckte Prüfkörperhalterungen aus PLA untersucht. Hierzu wurden jeweils zwanzig Halterungen 48 Stunden lang in einem mit 150 ml Aqua dem. gefülltem Glas gelagert. Im Anschluss wurde jede Prüfkörperhalterung in ein Reagenzröhrchen überführt, das mit 500 µl 1%iger SDS-Lösung gefüllt war, und 30 Minuten lang im Ultraschallbad aufbereitet. In einer Küvette wurde zunächst die Eigenextinktion des Eluats photometrisch gemessen, anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µl OPA-Reagenz. Die Küvette wurde mit dem dazugehörigen Falzdeckel abgedeckt und mehrmals geschüttelt. Nach einer zweiminütigen Reaktionszeit erfolgte die photometrische Messung.

In einer darauffolgenden Untersuchungsreihe wurde der Untersuchungsvorgang mit zwanzig Prüfkörperhalterungen wiederholt, die zuvor mit Isoliermittel (3D Isoliermittel, Dentaurum, Ispringen, Deutschland) benetzt wurden.

Ergebnis:

Die Hinzugabe des OPA-Reagenzes führte in beiden Versuchsreihen nicht zu einem Anstieg der Extinktionswerte, sondern vielmehr zu einer nahezu konstanten Halbierung gegenüber dem Messwert der Eigenextinktion (Tabelle 5). Dies lässt sich durch einen Verdünnungseffekt erklären. Die Zugabe von 500 µl OPA-Reagenz führt zu einer Verdoppelung des Volumens der Lösung und zu einer Verdünnung der 1%igen SDS-Lösung. Sind keine Störkomponenten in der Probe enthalten, so ist durch den Verdünnungseffekt eine Halbierung der Eigenextinktion zu erwarten. Sollten hingegen Substanzen, die mit OPA reagieren, in der Probe enthalten sein, so sind in Abhängigkeit von deren Konzentration, höhere Messwerte zu erwarten. Vereinzelt, wie beispielsweise bei den Proben Nummer 9 und 11, führte die Hinzugabe des OPA-Reagenzes zu keiner Halbierung der Eigenextinktion sondern zu leicht niedrigeren beziehungsweise erhöhten Messwerten. Diese lassen sich jedoch auf geringe Messschwankungen zurückführen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass keine Störkomponenten, die mit dem OPA-Reagenz reagieren, vorhanden sind. Weder die Halterungen noch das Isoliermittel können die Messungen in den Hauptversuchen verfälschen.

3.1.2 Prüfung des Silikons

Der Zugang zu den Prüfkörperhälften wurde von innen mit Silikon (Provil® novo, Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) abgedeckt, sodass eine dünne Silikonschicht direkt mit den inneren, nicht von Biofilm besiedelten Flächen der Prüfkörper in Kontakt stand. Zwanzig zu einer Kugel geformte Silikonproben desselben Gewichts (2 g) wurden 24 Stunden nach dem Anmischen untersucht. Hierzu wurde jeweils eine Probe in ein Reagenzröhrchen überführt, das mit 500 µl 1%iger SDS-Lösung gefüllt wurde, und anschließend 30 Minuten lang im Ultraschallbad bei 30 °C aufbereitet. In eine Küvette wurden zunächst 500 µl des Eluats pipettiert und die Eigentrübung photometrisch gemessen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 500 µl OPA-Reagenz. Nach Abdeckung der Küvette mit einem Falzdeckel und mehrmaligem Schütteln erfolgte die Bestimmung der Extinktion nach einer zweiminütigen Reaktionszeit.

Ergebnis:

Die Aufbereitung führte zu einer deutlich sichtbaren Trübung der Lösung und einer hohen photometrisch gemessenen Eigenextinktion. Allerdings führte die anschließende Zugabe von 500 µl OPA-Reagenz zu einer Halbierung des Extinktionswerts gegenüber dem Messwert der Eigenextinktion (Tabelle 6). Die Halbierung ist auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen (siehe Kap. 3.1.1), es kam zu keiner Reaktion von möglichen gelösten Bestandteilen mit dem

OPA-Reagenz. In den Hauptuntersuchungen wurde das Silikon vor dem Herausdrücken der Prüfkörperhälften mit einer sterilen Pinzette entnommen. Selbst wenn ein Hauch des Silikons an den Prüfkörperhälften haften bleibt, würde dies die Messergebnisse nicht verfälschen.

Tabelle 5: Messergebnisse der Prüfung der Halterungen und des Isoliermittels nach 48 h in Aqua dem. E = Extinktion, EE = Eigenextinktion, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

PLA-Halterung			PLA-Halterung + Isoliermittel		
Nr.	EE	E	Nr.	EE	E
	500 µl Probe	500 µl Probe + 500 µl OPA		500 µl Probe	500 µl Probe + 500 µl OPA
1	0,338	0,108	21	0,169	0,087
2	0,288	0,143	22	0,288	0,145
3	0,261	0,106	23	0,293	0,157
4	0,262	0,130	24	0,228	0,100
5	0,192	0,087	25	0,303	0,178
6	0,284	0,152	26	0,298	0,145
7	0,309	0,167	27	0,323	0,149
8	0,229	0,111	28	0,272	0,143
9	0,227	0,064	29	0,298	0,163
10	0,202	0,100	30	0,290	0,151
11	0,244	0,154	31	0,182	0,086
12	0,216	0,104	32	0,248	0,129
13	0,296	0,116	33	0,198	0,099
14	0,200	0,091	34	0,232	0,118
15	0,153	0,104	35	0,229	0,112
16	0,199	0,099	36	0,278	0,137
17	0,274	0,141	37	0,217	0,059
18	0,222	0,108	38	0,199	0,102
19	0,301	0,156	39	0,175	0,080
20	0,262	0,140	40	0,220	0,108
MW ± SD	0,248 ± 0,046	0,119 ± 0,027	MW ± SD	0,247 ± 0,047	0,122 ± 0,031

Quelle: Eigene Darstellung.

Tabelle 6: Messergebnisse der Prüfung des Silikons 24 h nach dem Anmischen. E = Extinktion, EE = Eigenextinktion, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Silikon					
Nr.	EE 500 µl Probe	E 500 µl Probe + 500 µl OPA	Nr.	EE 500 µl Probe	E 500 µl Probe + 500 µl OPA
1	0,682	0,322	11	0,522	0,284
2	0,533	0,288	12	0,600	0,282
3	0,602	0,295	13	0,704	0,360
4	0,553	0,280	14	0,499	0,253
5	0,499	0,249	15	0,507	0,248
6	0,622	0,317	16	0,555	0,271
7	0,618	0,308	17	0,557	0,239
8	0,592	0,264	18	0,638	0,315
9	0,611	0,301	19	0,601	0,310
10	0,578	0,291	20	0,542	0,279
			MW ± SD	0,581 ± 0,056	0,288 ± 0,029

Quelle: Eigene Darstellung.

3.1.3 Prüfung der Prüfkörperhälften aus PMMA

Zehn Prüfkörperhälften aus PMMA (Orthocryl®, Dentaureum, Ispringen, Deutschland) wurden jeweils in ein Reagenzröhrchen mit 500 µl 1%iger SDS-Lösung überführt, und bei 30 °C 30 Minuten lang im Ultraschallbad aufbereitet. Zur Messung der Eigentrübung wurden jeweils 500 µl des Eluats in eine Küvette überführt und photometrisch gemessen. Anschließend wurden 500 µl OPA-Reagenz hinzupipettiert. Die Küvette wurde mit dem dazugehörigen Falzdeckel abgedeckt und das Eluat wurde durch mehrmaliges Schütteln mit dem OPA-Reagenz vermengt. Die Extinktion wurde nach einer zweiminütigen Reaktionszeit photometrisch gemessen (Tabelle 7).

Ergebnis:

Wären keine Störkomponenten, wie in Kapitel 3.1.1 erläutert, nachweisbar, wäre eine Halbierung der Extinktionswerte zu erwarten. Die Messwerte in Tabelle 7, beispielsweise der Wert

der ungereinigten Prüfkörperhälfte Nummer 2 oder der Mittelwert der ungereinigten Prüfkörperhälfen, zeigen jedoch, dass die Zugabe der OPA-Lösung nicht zu einer Halbierung, sondern zu einem leichten Anstieg der Extinktionswerte führte. Als mögliche Ursachen wurde die Freisetzung von Bestandteilen, die mit dem OPA-Reagenz reagieren, oder eine Kontamination der PMMA-Prüfkörper mit Proteinen im Drucktopf während der Polymerisation angenommen. Zur Verringerung der Kontamination wurden die Prüfkörper in einer weiteren Versuchsserie nach der Polymerisation in drei Zyklen mit 1%iger SDS-Lösung im Ultraschallbad aufbereitet beziehungsweise gereinigt. Nach dreimaliger Reinigung führte die anschließende Untersuchung zu keinem Anstieg der Extinktionswerte. Daher wurden die PMMA-Prüfkörper der Hauptversuche nach ihrer Herstellung zur Reinigung in drei Zyklen mit 1%igem SDS gereinigt, um eine mögliche Verfälschung der Messergebnisse auszuschließen.

Tabelle 7: Extinktionswerte der PMMA-Prüfkörperhälfen vor Reinigung und Extinktionswerte der drei Reinigungszyklen. E = Extinktion, EE = Eigenextinktion, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

PMMA-Prüfkörperhälfte								
Reinigungszyklus								
Nr.	ungereinigt		1		2		3	
	EE 500 µl Probe	E 500 µl Probe + 500 µl OPA						
1	0,109	0,060	0,030	0,001	0,033	0,010	0,042	-0,001
2	0,099	0,076	-0,010	-0,010	-0,010	0,002	-0,012	0,005
3	0,052	0,028	-0,011	0,001	-0,010	0,001	-0,010	-0,001
4	0,088	0,050	0,006	0,005	0,009	0,011	0,008	0,002
5	0,092	0,057	0,015	0,011	0,002	0,041	0,009	0,010
6	0,055	0,027	-0,014	0,000	-0,014	0,011	-0,018	-0,011
7	0,098	0,062	0,011	0,006	0,012	0,010	0,006	0,002
8	0,075	0,046	0,016	0,009	0,008	0,007	-0,014	-0,005
9	0,109	0,062	0,001	0,001	-0,007	-0,003	0,006	0,002
10	0,099	0,060	0,006	0,005	0,012	0,009	-0,001	0,003
MW ± SD	0,088 ± 0,019	0,053 ± 0,015	0,005 ± 0,013	0,003 ± 0,006	0,004 ± 0,014	0,010 ± 0,011	0,002 ± 0,016	0,001 ± 0,005

Quelle: Eigene Darstellung.

3.1.4 Prüfung der Reinigungslösungen

Zehn Reinigungstabletten jedes Zahnsparngereinigers wurden untersucht. Hierzu wurde jede Reinigungstablette entsprechend der Zeitvorgabe des Herstellers in 150 ml Wasser der Temperatur 40 ± 2 °C aufgelöst. Unmittelbar im Anschluss wurden zur Messung der Eigenextinktion 500 µl der Reinigungslösung in eine Küvette pipettiert und photometrisch gemessen. Anschließend wurden jeweils 500 µl OPA-Reagenz hinzupipettiert, durch mehrmaliges Schütteln miteinander gemischt und nach einer zweiminütigen Reaktionszeit photometrisch gemessen.

Ergebnis:

Die Hinzugabe von OPA-Reagenz führte nicht zu einer konstanten Halbierung der Extinktionswerte der gemessenen Lösung im Vergleich zur Eigenextinktion der Reinigungslösung (Tabelle 8). Als Beispiel hierfür können die Mittelwerte des Reinigers Kukis® Xpress dienen. Der Mittelwert der Eigenextinktion beträgt $E = -0,084$, der zu erwartende Mittelwert bei einer konstanten Halbierung der Werte wäre somit $E = -0,042$. Der tatsächlich gemessene Wert lag jedoch höher ($E = -0,006$). Somit konnte nicht sicher ausgeschlossen werden, dass nicht einzelne Bestandteile der Reinigungslösung mit dem OPA-Reagenz reagieren. Nach der Entnahme aus der Reinigungslösung erfolgte der Transfer der Prüfkörperhälften in die 1%ige SDS-Lösung. Die Prüfkörperhälften konnten während dieses Vorgangs von einem dünnen Feuchtigkeitfilm der Reinigungslösung benetzt sein und somit zu einer Verdünnung der Probe führen. Um die Flüssigkeitsmenge auf einer Prüfkörperhälfte und die daraus resultierende mögliche Verdünnung zu erfassen, wurden mehrere Prüfkörperhälften aus einer Reinigungslösung entnommen und sogleich auf eine Präzisionswaage (Precisa ES 320A, Precisa, Dietikon, Schweiz) transferiert. Die maximal mögliche Benetzung der Prüfkörperhälften lag bei 10 µl. Für die Hauptuntersuchungen ergab sich daraus eine mögliche Verdünnung von 1:55 (10 µl Reinigungslösung: 550 µl 1%ige SDS-Lösung).

Die daraus resultierenden möglichen Fehler liegen im Bereich zwischen 0,0 und 2,2 % (Tabelle 8) und sind somit vernachlässigbar klein. Selbst wenn die Oberfläche eines Prüfkörpers nach der Entnahme aus dem Reinigungsbad durch eine kleine Menge Reinigungslösung benetzt sein sollte, so würde dies nicht zu einer signifikanten Verfälschung der Messergebnisse führen.

Tabelle 8: Extinktionswerte der Reinigungslösungen der untersuchten Zahnsparngereiniger. E = Extinktion, EE = Eigenextinktion, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Nr.	Reinigungslösung								
	Retainer Brite®			Kukis® Xpress			Dontodent		
	EE 500 µl Probe	E 500 µl Probe + 500 µl OPA	Fehler [%]	EE 500 µl Probe	E 500 µl Probe + 500 µl OPA	Fehler [%]	EE 500 µl Probe	E 500 µl Probe + 500 µl OPA	Fehler [%]
1	-0,131	-0,068	0,1	-0,098	0,010	2,2	-0,080	-0,008	1,5
2	-0,098	-0,039	0,4	-0,096	0,001	1,9	-0,095	-0,007	1,6
3	-0,131	-0,049	0,5	-0,098	0,001	1,8	-0,113	-0,045	0,4
4	-0,138	-0,068	0,0	-0,101	-0,010	1,5	-0,008	-0,008	1,8
5	-0,126	-0,060	0,1	-0,114	-0,023	1,1	-0,108	-0,011	1,4
6	-0,100	-0,038	0,4	-0,111	-0,025	1,0	-0,091	-0,025	0,8
7	-0,133	-0,058	0,2	-0,058	0,000	1,8	-0,058	-0,024	0,3
8	-0,141	-0,060	0,3	-0,049	-0,006	1,4	-0,077	-0,028	0,5
9	-0,120	-0,048	0,4	-0,059	-0,003	1,6	-0,082	-0,038	0,1
10	-0,109	-0,033	0,7	-0,058	-0,012	1,1	-0,094	-0,009	1,5
MW ± SD	-0,123 ± 0,015	-0,052 ± 0,012		-0,084 ± 0,024	-0,006 ± 0,010		-0,080 ± 0,028	-0,020 ± 0,013	

Quelle: Eigene Darstellung.

3.2 Vorversuche zur Anpassung der OPA-Methode

3.2.1 Vergleich der Proteinmengen zweier nebeneinander liegender Prüfkörperhälften

In der vorliegenden Arbeit wird die Reinigungsleistung als die nach Reinigung nachweisbare Proteinmenge im Vergleich zur Proteinmenge der ungereinigten Kontrollgruppe (ungereinigte Prüfkörperhälften) angegeben. Dieses Vorgehen setzt voraus, dass die angesammelte Biofilmmenge auf den zwei Prüfkörperhälften jeweils sehr ähnlich ist. Um dies zu erreichen, wurde festgelegt, dass die zwei Prüfkörperhälften eines Prüfkörpers unter denselben Bedingungen nah beieinander lokalisiert sind, um möglicherweise lokal bestehende Unterschiede

in der Menge an angesammeltem Biofilm zu minimieren.

Zur Prüfung, ob die angesammelte Proteinmenge auf zwei Prüfkörperhälften derselben Halterung ähnlich ist, wurde eine Prüfschiene mit jeweils vier eingearbeiteten Prüfkörpern bestehend aus zwei Prüfkörperhälften, wie in Abbildung 2 dargestellt, von einer Probandin 96 Stunden lang getragen. Die Proteinmengen wurden anschließend bestimmt.

Ergebnis:

Die Extinktionswerte und somit die angesammelten Proteinmengen auf beiden Hälften eines Prüfkörpers sind nicht identisch, jedoch sehr ähnlich. Dies bedeutet, dass sich die Proteinansammlung auf zwei eng beieinanderliegenden Flächen unter Umständen geringfügig unterscheiden kann. Die geringen Unterschiede könnten allerdings auch auf Messschwankungen zurückgeführt werden. Die Ansammlung von Protein an verschiedenen Lokalisationen im Mundraum kann sich jedoch deutlicher unterscheiden (Tabelle 9, Prüfkörperhälften B1 und D1). Als Konsequenz rotierte die Zuordnung von Reiniger zu Prüfkörper in den Hauptuntersuchungen (Tabelle 3).

Tabelle 9: In-vivo-Untersuchung der Extinktionswerte auf zwei benachbarten Prüfkörperhälften bei Prüfkörpern, die für 96 h getragen wurden. Position A bis D kennzeichnet die Lokalisation der Prüfkörper (vgl. Abbildung 2). E = Extinktion, PKH = Prüfkörperhälfte.

Position	PKH	Eluat [μ l]	OPA-Reagenz [μ l]	E
A	A1	500	500	0,472
	A2	500	500	0,501
B	B1	500	500	0,398
	B2	500	500	0,409
C	C1	500	500	0,420
	C2	500	500	0,438
D	D1	500	500	0,513
	D2	500	500	0,500

Quelle: Eigene Darstellung.

3.2.2 Ermittlung des Verhältnisses von Probenvolumen zu OPA-Reagenz

Insbesondere auf den gereinigten Prüfkörperhälften waren Messwerte im Bereich der unteren Nachweisgrenze der OPA-Methode denkbar. Die Untersuchungen in diesem Abschnitt dienten daher zur Optimierung der Nachweisgrenze. Die Extinktionswerte der ungereinigten sowie der gereinigten Prüfkörperhälften sollten in dem für die modifizierte OPA-Methode optima-

len Messbereich von $E = 0,003-1,000$ liegen. In einem Vorversuch wurden in mehreren Untersuchungsreihen 60 PMMA-Prüfkörper bestehend aus jeweils zwei Prüfkörperhälften (insgesamt 120 Prüfkörperhälften) mit einer proteinreichen Lösung, hier Hühnereiweiß, benetzt und 24 Stunden lang getrocknet. Eine Prüfkörperhälfte wurde mit dem Zahnsparngereiniger Kukis® Xpress gereinigt, in ein mit 500 µl SDS-Lösung gefülltes Reagenzröhrchen überführt und im Ultraschallbad aufbereitet (30 °C, 30 Minuten lang). Die zweite Prüfkörperhälfte wurde ungereinigt in ein Reagenzröhrchen, das mit 500 µl 1%iger SDS-Lösung gefüllt war, überführt und im Ultraschallbad aufbereitet. Je zwanzig Proben mit dem Verhältnis 100 µl Proteineluat zu 500 µl OPA-Lösung, 200 µl Proteineluat zu 500 µl OPA-Lösung sowie 500 µl Proteineluat zu 500 µl OPA-Lösung wurden untersucht. Das Verhältnis von 500 µl Proteineluat zu 500 µl OPA-Lösung führte zu Extinktionswerten die sowohl für die gereinigten als auch für die ungereinigten Prüfkörper im geforderten Messbereich lagen.

In einem weiteren Vorversuch trug eine Probandin in drei Untersuchungsreihen eine Prüfschiene zweimal sieben und einmal vier Tage lang. Das Verhältnis von 500 µl Proteineluat zu 500 µl OPA-Lösung wurde hierfür übernommen. Die Extinktionswerte dieser In-vivo-Serie lagen bei diesem Verhältnis sowohl vor als auch nach Reinigung oberhalb der Nachweisgrenze (Tabellen 10-12). Als Folge wurde dieses Verhältnis für die Hauptversuche mit 20 freiwilligen Proband*innen übernommen. Im Gegensatz zu den Hauptuntersuchungen wurde in den Voruntersuchungen die Eigenextinktion der Probe noch nicht gemessen bzw. berücksichtigt und die gesamte Probe von 500 µl wurde noch in einem statt in zwei Messvorgängen gemessen (siehe Kap. 2.4.2). Die Schlussfolgerung, dass die Eigentrübung der Probe vorab bestimmt werden sollte und statt einem zwei Messvorgänge ratsam sind, wurde im Lauf der Vorversuche gezogen.

Tabelle 10: Extinktionswerte/Messergebnisse nach siebentägigem Tragen einer Prüfschiene. Die Berechnung der Reinigungsleistung [%] erfolgte mit der Formel $100 \times ((\text{OPA ungereinigt} - \text{OPA gereinigt}) / \text{OPA ungereinigt})$. Die Berechnung der Proteinmenge [µg] erfolgte mit Hilfe der Kalibrationsgeraden (siehe Kap. 4.1). E = Extinktion, PKH = Prüfkörperhälfte.

Position	PKH	Reiniger	E	Differenz E [%]	Proteinmenge [µg]	Reinigungsleistung [%]
A	A1	---	0,849	9,8	102,6	10,2
	A2	Leitungswasser	0,766			
B	B1	---	1,022	35,2	124,4	36,5
	B2	Retainer Brite®	0,662			
C	C1	---	0,904	33,6	109,5	35,0
	C2	Dontodent	0,600			
D	D1	---	0,648	17,4	77,2	18,4
	D2	Kukis® Xpress	0,535			

Quelle: Eigene Darstellung.

Tabelle 11: Extinktionswerte/Messergebnisse nach siebentägigem Tragen einer zweiten Prüfschiene. Die Berechnung der Reinigungsleistung [%] sowie der Proteinmenge [μg] erfolgte wie in Tabelle 10 beschrieben. E = Extinktion, PKH = Prüfkörperhälfte.

Position	PKH	Reiniger	E	Differenz E [%]	Proteinmenge [μg]	Reinigungsleistung [%]
A	A1	---	0,773		93,0	
	A2	Dontodent	0,447	42,2	51,9	44,2
B	B1	---	0,998		121,3	
	B2	Retainer Brite®	0,453	54,6	52,7	56,6
C	C1	---	0,803		96,8	
	C2	Kukis® Xpress	0,524	34,7	61,6	36,4
D	D1	---	0,827		99,8	
	D2	Leitungswasser	0,611	26,1	72,6	27,3

Quelle: Eigene Darstellung.

Tabelle 12: Extinktionswerte/Messergebnisse nach viertägigem Tragen einer Prüfschiene. Die Berechnung der Reinigungsleistung [%] und der Proteinmenge [μg] erfolgte wie in Tabelle 10 beschrieben. E = Extinktion, PKH = Prüfkörperhälfte.

Position	PKH	Reiniger	E	Differenz E [%]	Proteinmenge [μg]	Reinigungsleistung [%]
A	A1	---	0,441		51,2	
	A2	Retainer Brite®	0,095	78,5	7,6	85,2
B	B1	---	0,502		58,9	
	B2	Kukis® Xpress	0,112	77,7	9,7	83,5
C	C1	---	0,399		45,9	
	C2	Leitungswasser	0,207	48,1	21,7	52,7
D	D1	---	0,558		65,9	
	D2	Dontodent	0,190	65,9	19,6	70,4

Quelle: Eigene Darstellung.

3.2.3 Ermittlung des pH-Wertes für die 1%ige SDS-Lösung

Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) wird als anionisches Tensid zur Denaturierung von Proteinen eingesetzt. Es kommt zur Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine durch den Verlust der ursprünglichen Faltungsform ohne die Primärstruktur zu verändern. Die dadurch freigelegten α - und ϵ -terminalen Aminogruppen können nun quantifiziert werden.

Zur Herstellung einer 1%igen SDS-Lösung wurde zunächst mit Hilfe eines Magnetrührers eine 20%ige klare, homogene SDS-Lösung aus 10 g SDS und 50 ml Aqua dem. hergestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 950 ml Aqua dem. zur Gewinnung 1%iger SDS-Lösung.

In einer Veröffentlichung von Michels und Frister [151] wurden Prüfkörper mit heparinisiertem Schafsblut angeschmutzt und die Reinigungsleistung mit der OPA-Methode erfasst. Neben

einer neutralen Blutprobe wurde eine Blutprobe auf den pH-Wert 11,5 eingestellt. Letzgenannter pH-Wert wurde als günstig ermittelt und lieferte geringfügig höhere Werte als die neutralen Proben. In einer weiteren Veröffentlichung wurde die SDS-Lösung auf pH 9,3 eingestellt [150]. Bei Wehrli und Kircheis [152] wird die Einstellung auf pH 11 beschrieben. Auf Grund der unterschiedlichen Angaben war es wichtig, den optimalen pH-Wert vorab zu ermitteln. Die Einstellung des pH-Werts der SDS-Lösung erfolgte mit Natronlauge. Dies bewirkt, dass sich die Proteine auffalten und primäre Aminogruppen innerhalb des Proteins gut zugänglich für die Reaktion mit dem OPA-Reagenz sind [150].

In einer Voruntersuchung wurden Prüfkörperhalterungen mehrmals mit Hühnereiweiß angeschmutzt und getrocknet. Die Prüfkörperhalterungen in der vorliegenden Studie verfügten über eine größere Oberfläche als die Prüfkörperhälften, sodass die Menge der Anschmutzung mittels einer Präzisionswaage (Precisa ES 320A, Precisa, Dietikon, Schweiz) gemessen und zur Extinktion ins Verhältnis gesetzt werden konnte. Insgesamt 30 Prüfkörperhalterungen wurden vor und nach Anschmutzung mit Hühnereiweiß gewogen und die Differenz (Proteinmenge) berechnet. Jeweils zehn Halterungen wurden mit einer 1%igen SDS-Lösung mit pH-Wert 10,5, 11 oder 11,5 untersucht. Hierzu wurde eine verschmutzte Prüfkörperhalterung in ein Reagenzröhrchen, das mit 500 µl 1%iger SDS-Lösung des pH-Werts 10,5, 11 oder 11,5 gefüllt war, überführt und anschließend im Ultraschallbad 30 Minuten lang bei 30 °C aufbereitet. Von der Probe wurden 50 µl entnommen und in eine Küvette überführt, die mit 1 ml OPA-Reagenz gefüllt war. Das Eluat wurde durch mehrmaliges Schütteln miteinander gemischt, die photometrische Messung erfolgte nach einer zweiminütigen Reaktionszeit.

Ergebnis:

Ein höherer pH-Wert führte zu höheren Extinktionswerten. Der Mittelwert des Quotienten aus Proteinmenge und Extinktion liegt bei einem pH-Wert von 11,5 ($MW \pm SD 268,2 \pm 50,0$) deutlich über den Mittelwerten der 1%igen SDS-Lösungen, die auf den pH-Wert 11,0 ($MW \pm SD 239,8 \pm 32,6$) oder 10,5 ($MW \pm SD 177,0 \pm 33,7$) eingestellt wurden. Da die Extinktion der Prüfkörperhälften nach Reinigung im Bereich der unteren Nachweisgrenze lag, wurde als Konsequenz die 1%ige SDS-Lösung, die für die Hauptversuche verwendet wurde, auf pH 11,5 eingestellt.

Tabelle 13: Messwerte zum Einfluss des pH-Werts der 1%igen SDS-Lösung auf die Extinktion. E = Extinktion, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, *Quotient aus Proteinmenge und Extinktion.

Nr.	pH 10,5			pH 11,0			pH 11,5				
	Protein [mg]	E	[mg]/E*	Protein [mg]	E	[mg]/E*	Protein [mg]	E	[mg]/E*		
1	2,4	0,411	171,0	3,2	0,723	225,9	0,9	0,245	272,2		
2	1,9	0,372	195,5	2,1	0,569	271,0	1,0	0,161	160,5		
3	0,6	0,132	220,0	3,1	0,559	180,2	1,2	0,295	245,8		
4	0,6	0,122	202,5	1,9	0,448	235,5	0,7	0,213	303,6		
5	4,0	0,462	115,5	1,0	0,289	288,5	1,0	0,295	294,5		
6	1,3	0,204	156,5	1,5	0,324	216,0	2,6	0,585	224,8		
7	2,0	0,365	182,3	2,3	0,483	209,8	1,0	0,233	233,0		
8	1,1	0,226	205,5	0,7	0,196	280,0	0,8	0,256	319,4		
9	1,4	0,279	198,9	0,9	0,209	232,2	0,7	0,235	335,7		
10	2,5	0,307	122,6	0,7	0,181	258,6	1,4	0,410	292,9		
MW ± SD			177,0 ± 33,7				239,8 ± 32,6				268,2 ± 50,0

Quelle: Eigene Darstellung.

4 Ergebnisse der Hauptversuche

4.1 Kalibrierung der modifizierten OPA-Methode

Zur Quantifizierung der Proteinmenge der Prüfkörperproben erfolgten vor, während und nach der Beendigung der Hauptversuche mehrere Kalibrierungen mit einem Modellprotein, hier bovinem Serumalbumin (BSA, Fraktion V, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA), als Äquivalent. Eine homogen gelöste Stammlösung aus 50 mg BSA ad 50 ml Aqua dem. (1000 µg/ml) wurde in einem Messkolben angesetzt. Von der Stammlösung wurden 5 ml in ein Reagenzröhrchen pipettiert (Standard Nr. 1). Für den Standard Nr. 2 wurden hieraus 2,5 ml entnommen und in ein weiteres Reagenzröhrchen pipettiert, das mit 2,5 ml 1%iger SDS-Lösung gefüllt war. Die weiteren Verdünnungen wurden entsprechend dem Verdünnungsschema in Tabelle 14 angelegt. Zum Messen der einzelnen Konzentration wurden 500 µl des entsprechenden Standards mit 500 µl der OPA-Reagenz vermischt und nach einer zweiminütigen Reaktionszeit photometrisch gemessen. Die Messung der Standards begann mit dem Standard Nr. 12, das zur Nullung des Photometers diente. Da sowohl der Extinktionswert von Standard Nr.1 (Verdünnung 1000 µg BSA/ml) als auch von Standard Nr. 2 (Verdünnung 500 µg BSA/ml) $E > 1,000$ betrug, wurden diese Standards zur Erstellung der Kalibrationsgeraden nicht berücksichtigt. Die Kalibrationsgerade wurde für den für die Hauptuntersuchungen relevanten Messbereich von 1-250 µg/ml erstellt.

Anhand der gemessenen Extinktionswerte aus insgesamt sechs Messreihen wurde eine Regressionsgerade, $y = mx + b$, gemäß der Methode der kleinsten Quadrate erstellt. Die Quantifizierung der zunächst unbekannt Konzentrationen der Proteinproben erfolgte mittels dieser Geraden.

Tabelle 14: Verdünnungsschema der BSA-Standards zur Kalibrierung der OPA-Methode.

Standard Nr.	Proteingehalt BSA [µg/ml]	Volumen Standard	Volumen 1%ige SDS-Lösung
1	1000,0	5,0 ml Stammlösung	-
2	500,0	2,5 ml Standard Nr. 1	2,5 ml
3	250,0	2,5 ml Standard Nr. 2	2,5 ml
4	125,0	2,5 ml Standard Nr. 3	2,5 ml
5	62,5	2,5 ml Standard Nr. 4	2,5 ml
6	31,3	2,5 ml Standard Nr. 5	2,5 ml
7	15,6	2,5 ml Standard Nr. 6	2,5 ml
8	7,8	2,5 ml Standard Nr. 7	2,5 ml
9	3,9	2,5 ml Standard Nr. 8	2,5 ml
10	2,0	2,5 ml Standard Nr. 9	2,5 ml
11	1,0	2,5 ml Standard Nr. 10	2,5 ml
12	0,0	2,5 ml Standard Nr. 11	2,5 ml

Quelle: Modifiziert nach Wehrl und Kircheis, 2011 [152].

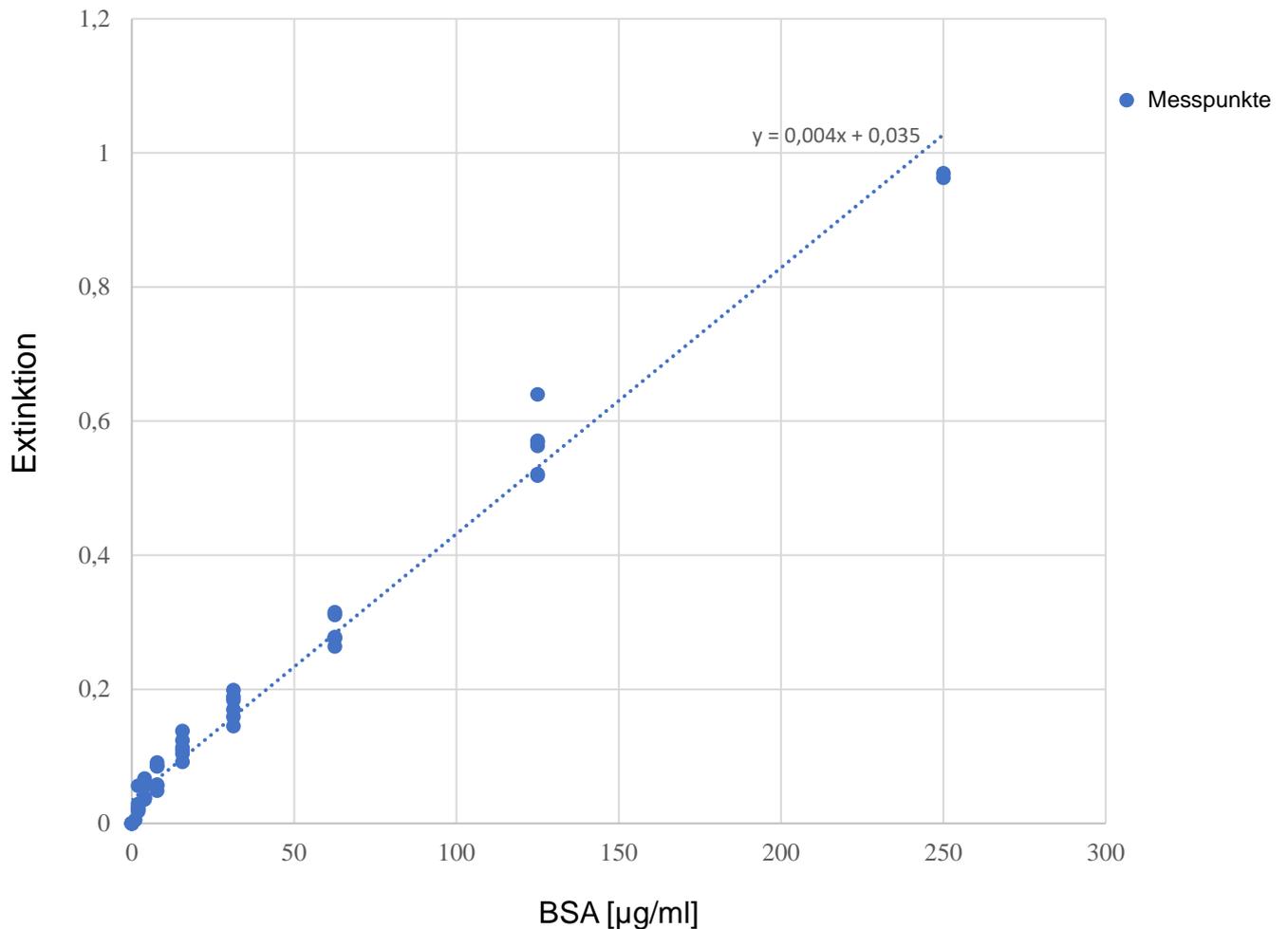


Abbildung 5: Kalibrationsgerade zwischen der definierten Menge an Protein (BSA, Fraktion V, Sigma Aldrich®, St. Louis, USA) und der Extinktion. Quelle: Eigene Darstellung.

4.2 Lokalisationsspezifische Akkumulation

Wie in Abbildung 2 zu sehen, wurden die vier Prüfkörper an vier verschiedenen Stellen im bukkalen Bereich der ersten und zweiten Molaren des Oberkiefers platziert. Zur Überprüfung einer lokalisationsspezifischen Akkumulation von Biofilm fasst Tabelle 15 die Proteinmengen der ungereinigten Prüfkörper der Hauptversuche zusammen. Auf den Positionen A, B und D kam es im Mittel zu einer Proteinakkumulation zwischen $41,3 \pm 16,6 \mu\text{g}$ bis $43,9 \pm 13,3 \mu\text{g}$. Auf Position C beträgt die durchschnittliche Proteinakkumulation aller untersuchten Prüfkörper $53,2 \pm 18,0 \mu\text{g}$ und liegt damit höher als auf den anderen Positionen.

Tabelle 15: Darstellung der Proteinmenge auf der Oberfläche der ungereinigten PMMA-Prüfkörperhälften in Abhängigkeit von deren Lokalisation. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Lokalisation	Proteinmengen [μg]	
	min. - max.	MW \pm SD
Position A	11,8 - 80,3	42,9 \pm 17,5
Position B	10,1 - 74,8	43,9 \pm 13,3
Position C	31,7 - 87,0	53,2 \pm 18,0
Position D	6,9 - 56,0	41,3 \pm 16,6

Quelle: Eigene Darstellung.

4.3 Verteilung der Proteinmengen

Mit Hilfe der Kalibrationsgeraden wurde der Proteingehalt der Prüfkörper aller 20 untersuchten Schienen ermittelt. Die Verteilung der Proteinmengen auf den Prüfkörperhälften vor und nach Reinigung ist in Tabelle 16 und in Abbildung 6 in Form eines Boxplot-Diagramms dargestellt. Der Maximalwert der ungereinigten Prüfkörperhälften betrug 87,0 μg , der Minimalwert der ungereinigten Prüfkörperhälften betrug 6,9 μg . Die Proteinmengen nach Reinigung der Prüfkörperhälften reichten vom Minimalwert 4,3 μg bis zum Maximalwert von 53,0 μg . Die Mittelwerte der Proteinmengen auf den ungereinigten Prüfkörperhälften lagen zwischen 42,4 \pm 16,3 μg (Leitungswasser) und 51,1 \pm 17,8 μg (Dontodent). Die Mittelwerte auf den gereinigten Prüfkörperhälften lagen zwischen 20,2 \pm 9,3 μg (Retainer Brite®) und 31,9 \pm 13,0 μg (Leitungswasser) Protein.

Die Proteinmengen auf den ungereinigten Prüfkörperhälften waren höher als die Proteinmengen nach Reinigung mit Hilfe eines Zahnsparngereinigens oder Leitungswasser. Leitungswasser ließ, sowohl absolut als auch relativ, die höchsten Mengen an Protein zurück. Der Zahnsparngereiniger Retainer Brite® ließ die geringste Menge an Protein zurück (absolut sowie relativ). Die Ergebnisse der Proteinreduktion in Prozent sind unter Punkt 4.4 dargestellt.

Tabelle 16: Darstellung der Proteinmenge in µg auf den PMMA-Prüfkörpern in Abhängigkeit vom verwendeten Reiniger. MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.

Gruppe	Proteinmengen [µg]			
	Ungereinigte Prüfkörper		Gereinigte Prüfkörper	
	min. - max.	MW ± SD	min. - max.	MW ± SD
Retainer Brite®	16,8 - 84,1	43,2 ± 16,3	6,7 - 41,8	20,2 ± 9,3
Kukis® Xpress	11,8 - 87,0	44,8 ± 16,5	6,5 - 43,0	27,3 ± 10,5
Dontodent	10,1 - 80,6	51,1 ± 17,8	6,6 - 53,0	29,8 ± 12,0
Leitungswasser	6,9 - 74,8	42,4 ± 16,3	4,3 - 52,3	31,9 ± 13,0

Quelle: Modifiziert nach Arndt-Fink und Jost Brinkmann, 2023 [148].

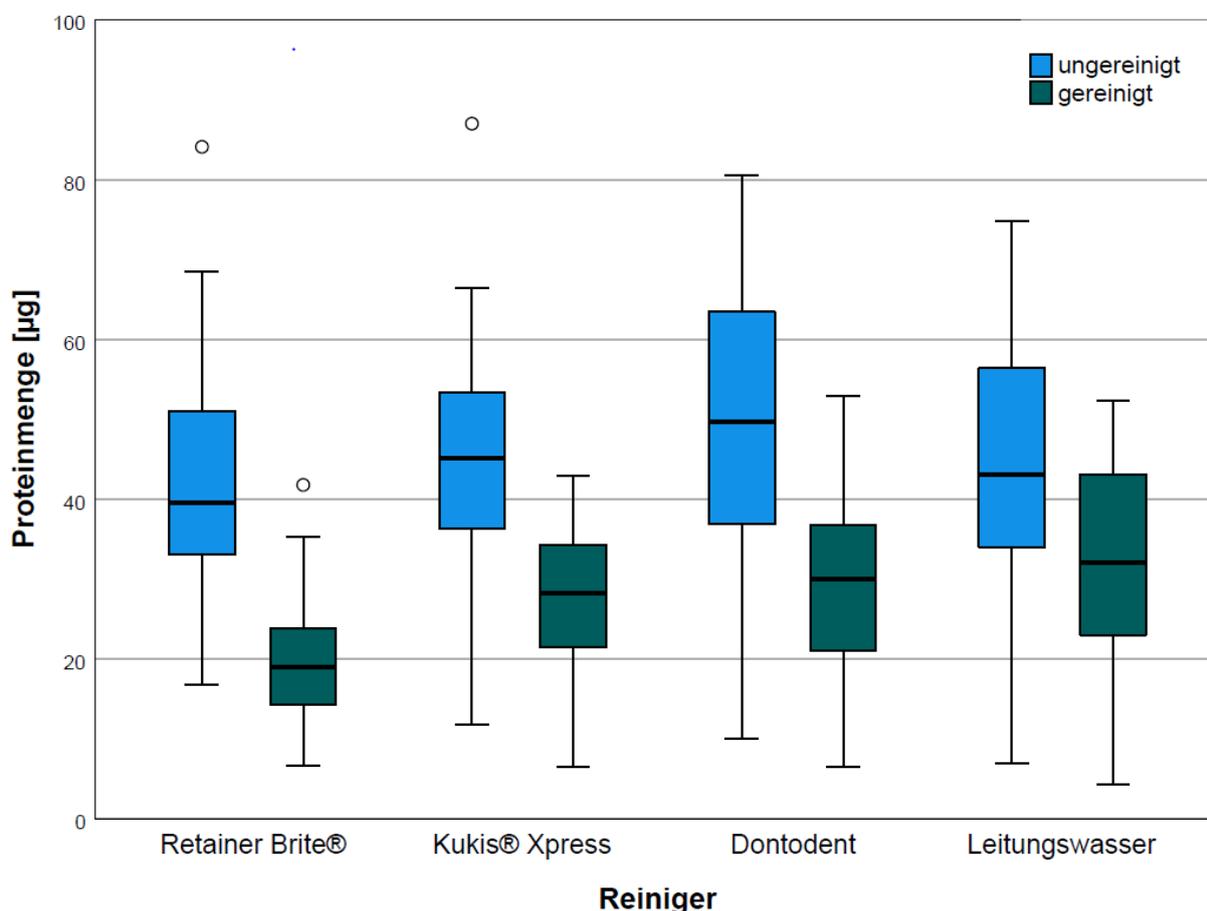


Abbildung 6: Box-Whisker-Plots mit Darstellung der Verteilung der Proteinmengen in µg. Die Mittelwerte sind in Tabelle 16 angegeben. Medianwerte ungereinigt: Retainer Brite® 39,6 µg, Kukis® Xpress 45,2 µg, Dontodent 49,7 µg und Leitungswasser 43,1 µg. Medianwerte gereinigt: Retainer Brite® 19,0 µg, Kukis® Xpress 28,3 µg, Dontodent 30,1 µg, Leitungswasser 32,1 µg. o = Ausreißer. Quelle: Übersetzt nach Arndt-Fink und Jost-Brinkmann, 2023 [148].

4.4 Reinigungsleistung

Mit Hilfe der modifizierten OPA-Methode wurde der Proteingehalt der ungereinigten Prüfkörperhälften und der Restproteingehalt der Prüfkörperhälften nach Reinigung mit einem Zahnsparngerreiniger oder Leitungswasser gemessen.

Als Kriterium für die Reinigungsleistung diente die nach Reinigung nachweisbare Proteinmenge im Vergleich zur Proteinmenge in der ungereinigten Kontrollgruppe.

Formel zur Berechnung der Reinigungsleistung in %:

$$\frac{100 \times (\text{OPA ungereinigt} - \text{OPA gereinigt})}{\text{OPA ungereinigt}}$$

Die Proteinreduktion der drei Zahnsparngerreiniger sowie des Kontrollmediums Wasser ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Mittelwerte der Proteinreduktion liegen zwischen 54,5 und 25,9 %. Die Zahnsparngerreiniger Retainer Brite® (MW 54,5 ± 7,1 %), Kukis® Xpress (MW 39,9 ± 11,5 %) sowie Dontodent (MW 41,5 ± 9,2 %) führten zu einer höheren Proteinreduktion als Leitungswasser (MW 25,9 ± 6,5 %). Der Mittelwert für die Proteinreduktion war bei dem Zahnsparngerreiniger Retainer Brite® am höchsten.

Die mittlere Reinigungsleistung der drei Zahnsparngerreiniger wurde durch den t-Test für abhängige Stichproben untereinander verglichen, wobei ein p-Wert von ≤ 0,05 als signifikant definiert wurde. Alle p-Werte wurden nach Bonferroni mit dem Faktor 3 adjustiert. Der Unterschied in der Reinigungsleistung zwischen Retainer Brite® und den beiden anderen Zahnsparngerreinigern war hoch signifikant (p<0,001), während zwischen den Reinigern Kukis® Xpress und Dontodent kein signifikanter Unterschied bestand (p=1).

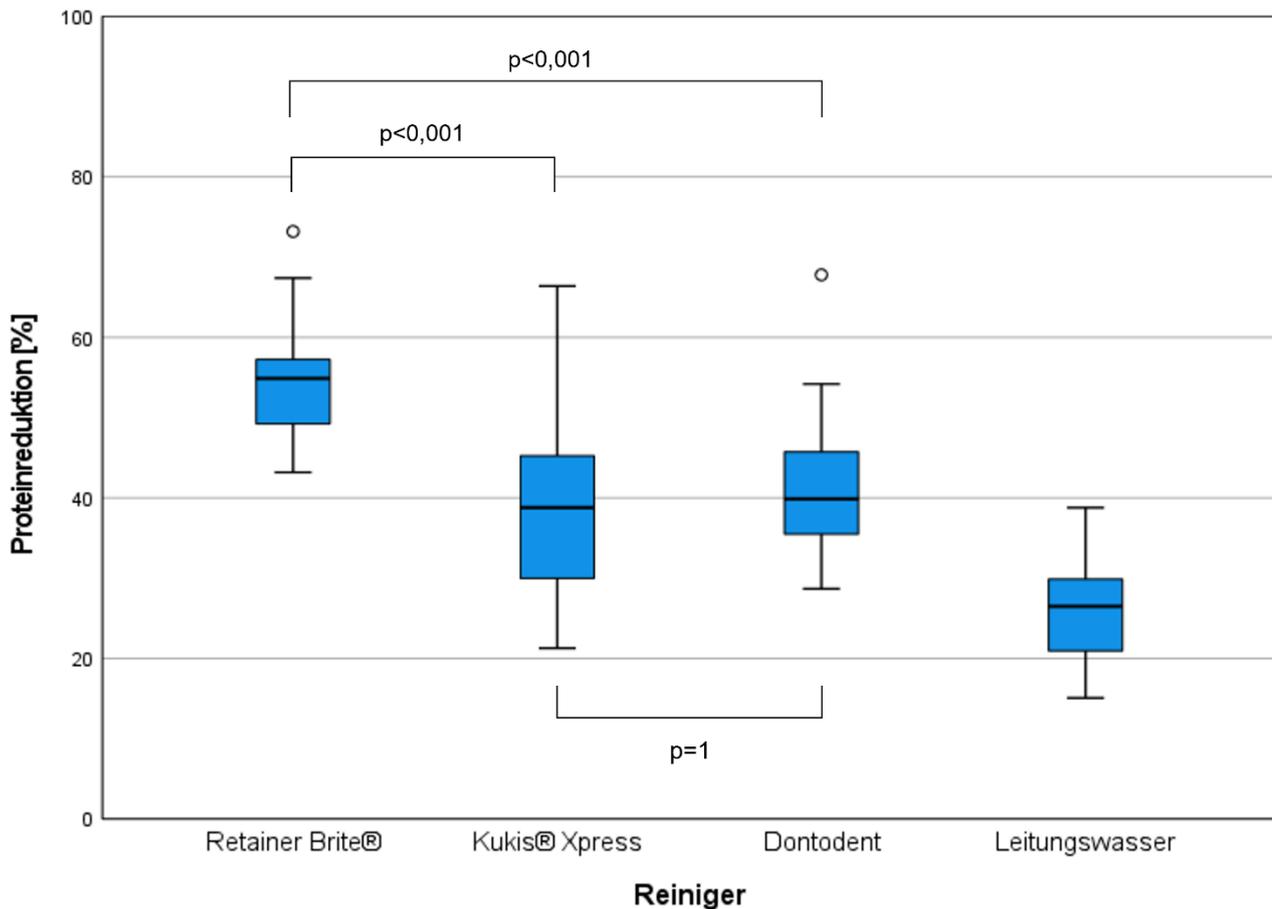


Abbildung 7: Box-Whisker-Plots der Proteinreduktion in %.

Mittelwerte ± SD: Retainer Brite® 54,5 ± 7,1 %, Kukis® Xpress 39,9 ± 11,5 %, Dontodent 41,5 ± 9,2 % und Leitungswasser 25,9 ± 6,5 %. Medianwerte: Retainer Brite® 54,9 %, Kukis® Xpress 38,8 %, Dontodent 39,9 % und Leitungswasser 26,5 %. ○ = Ausreißer. Quelle: Übersetzt nach Arndt-Fink und Jost-Brinkmann, 2023 [148].

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Ex-vivo-Studie führte der Zahnschmelzreiniger Retainer Brite® zur höchsten Proteinreduktion (MW 54,5 ± 7,1 %) und der Zahnschmelzreiniger Kukis® Xpress zur niedrigsten Proteinreduktion (MW 39,9 ± 11,5 %). Der Unterschied in der Reinigungsleistung zwischen Retainer Brite® und den beiden anderen Zahnschmelzreinigern war hochsignifikant ($p < 0,001$)

während zwischen den Reinigern Kukis® Xpress und Dontodent kein signifikanter Unterschied bestand ($p=1$) [148]. Die Reinigungsleistung aller Zahnsparngereiniger war höher als die von Leitungswasser (Abbildung 7). Demzufolge befanden sich nach Reinigung mit Leitungswasser die höchsten Mengen (MW $31,9 \pm 13,0 \mu\text{g}$) und bei Retainer Brite® die niedrigsten Mengen (MW $20,2 \pm 9,3 \mu\text{g}$) an Protein auf den Prüfkörpern. Dontodent (MW $29,8 \pm 12,0 \mu\text{g}$) und Kukis® Xpress (MW $27,3 \pm 10,5 \mu\text{g}$) ließen eine ähnliche Proteinmenge zurück. Die Proteinmengen auf den ungereinigten Prüfkörperhälften waren in der Gruppe Dontodent am höchsten. Wie der Tabelle 15 zu entnehmen ist, kam es zu einer höheren Biofilmmakkumulation auf Position C, während sich die Biofilmmakkumulation auf den übrigen Positionen kaum unterschied. Vorab wurde festgelegt, dass die Zuordnung der Reiniger zu den Prüfkörpern rotieren musste, um lokal bestehende Unterschiede in der Menge an angesammeltem Biofilm auszugleichen. Aus den Ergebnissen dieser Studie geht hervor, dass die Effektivität von chemischen Reinigungstabletten an einem sieben Tage alten Biofilm und seinen damit einhergehenden strukturellen Veränderungen limitiert ist. Zwar waren die Reinigungstabletten in der Lage einen Teil des Biofilms zu entfernen, jedoch blieb eine erhebliche Menge an Biofilm zurück [148]. Im Vergleich zu einer vorangegangenen Pilotstudie [119], die die Effektivität von Zahnsparngereinigern an einem vier Tage alten Biofilm untersuchte, kommt es nach sieben Tagen ohne Reinigung zu einer deutlich geringeren Proteinreduktion.

5.2 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse

Verschiedene Studien haben die Wirksamkeit von chemischen Reinigern in Form von selbstauflösenden Reinigungstabletten für die Anwendung an herausnehmbaren kieferorthopädischen Geräten sowie an herausnehmbarem Zahnersatz untersucht [108,117-122,132-143,145]. Dabei fanden die Untersuchungen an weichen Belägen, die sich innerhalb einer kurzen Zeitspanne ansammelten, statt. Mehrere Studien konnten die Effektivität von chemischen Zahnsparngereinigern ohne den zusätzlichen Einsatz einer mechanischen Komponente belegen [108,119,120]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus mechanischer Reinigung mit einem chemischen Zahnsparngereiniger zu besseren Reinigungsergebnissen führt als alleinige mechanische Reinigung oder in Kombination mit Zahnpasta [132,133].

In einer früheren Untersuchung von Fathi et al. [119] wurde die Reinigungsleistung von selbsttätigen chemischen Reinigungstabletten, ohne den zusätzlichen Einsatz einer Zahnbürste, untersucht. Dabei führten die getesteten Reiniger zu einer Proteinreduktion von 79,9 % (Kukis®), 81,8 % (NitrAdine® Ortho&Junior™) und 86,8 % (fittydent super®). Leitungswasser

fürte zu einer Proteinreduktion um 56,5 %. Der Vergleich der Säuberungsleistung von Leitungswasser zwischen einem vier Tage alten Biofilm (Fathi et al.) und einem sieben Tage alten Biofilm zeigt, dass die Proteinreduktion bei dem älteren Biofilm geringer war. Während die Proteinreduktion an einem vier Tage alten Biofilm 56,5 % betrug, beträgt sie an einem sieben Tage alten Biofilm nur noch $25,9 \pm 6,5$ %. Ein direkter Vergleich zwischen den untersuchten chemischen Reinigungstabletten kann nicht gezogen werden, da es sich in beiden Studien um unterschiedliche Reiniger handelt. Bei Kukis® handelt es sich um Produkte desselben Herstellers, allerdings wurde in der vorliegenden Studie das Nachfolgeprodukt Kukis® Xpress untersucht. Neben dem Produktnamen und einer verkürzten Einwirkzeit unterscheiden sich die Inhaltsstoffe der Reiniger gering voneinander. Änderungen in der Zusammensetzung könnten eine Weiterentwicklung des Produktes sein und damit zu einer Verbesserung der Reinigungswirkung führen. Ein direkter Vergleich lässt sich ebenfalls auf Grund der verkürzten Einwirkzeit von 10 Minuten auf 3 Minuten nicht ziehen.

Auch wenn nicht identische Reiniger untersucht wurden, so handelte es sich doch in beiden Studien bei den untersuchten Reinigungsprodukten um Reinigungstabletten auf Peroxidbasis. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass die Unterschiede in der Reinigungsleistung nicht vorrangig auf die Verwendung unterschiedlicher Reiniger zurückzuführen sind, sondern eine Folge der Reifung des Biofilms und seinen damit einhergehenden strukturellen Veränderungen sind [7]. Dies würde auch die geringere Säuberungsleistung im Vergleich zu vorhandener Literatur, die die Effektivität chemischer Zahnsparrenreiniger an weichen Belägen untersuchten, erklären. Diedrich [108] untersuchte die Wirksamkeit von drei verschiedenen Reinigungsmethoden in drei aufeinanderfolgenden Untersuchungszyklen an derselben Probandengruppe. Selbsttätige Zahnsparrenreiniger waren der Kombination aus Zahnbürste und Zahnpasta überlegen. Vor allem in schwer erreichbaren Arealen wie um Draht- und Schraubenelementen lies die mechanische Reinigung einen erheblichen Anteil an Biofilm zurück. Weitere Studien, die die Wirksamkeit selbsttätiger chemischer Reinigungstabletten prüften, konnten eine antimikrobielle Wirksamkeit sowie zum Teil eine Reduktion der Biomasse durch die Reinigungstabletten nachweisen [121,138,139,152]. Jedoch fand die überwiegende Mehrzahl dieser Arbeiten an künstlich gezüchteten Biofilmen statt, die aus nur wenigen unterschiedlichen Spezies gebildet wurden. So prüften Jose et al. [138] die Wirksamkeit von vier chemischen Prothesenreinigern an einem Monospezies-Biofilm aus *Candida albicans*. Zwar führten die Reiniger zu einer Reduzierung der Stoffwechselaktivität und zu einer Reduktion der Zellmasse, allerdings lag *Candida albicans* nur als initiale Haftschiicht und nicht als strukturierter Biofilm vor. Die Untersuchungen von Coenye et al. [153] fanden an vier Monospezies-Biofilmen statt. Coimbra et al. [139] prüften zwei chemische Reiniger auf einem Biofilm, der innerhalb von 24 Stunden aus *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* gebildet wurde. Zwar wird dieser von den Autoren als Multispezies-

Biofilm bezeichnet, allerdings wird die Komplexität und Heterogenität des oralen Biofilms durch diesen nicht widerspiegelt. Es konnte festgestellt werden, dass die chemischen Reiniger zwar eine antimikrobielle Aktivität besitzen, jedoch zu keiner weitgehenden Reduktion des Biofilms führen. Ein aus *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* und *Candida glabrata* gebildeter Biofilm konnte in einer Studie von Lopes et al. [140] durch keinen der vier untersuchten chemischen Reiniger weitgehend entfernt werden.

Bislang existieren nur wenige klinische Studien, die die alleinige Säuberungsleistung von selbsttätigen chemischen Reinigern auf einem in vivo gebildeten Biofilm untersuchten. Häufiger wurde die Kombination aus mechanischer Reinigung und chemischer Reinigungstablette untersucht [132-136]. Ein positiver Effekt des adjuvanten Einsatzes von chemischen Reinigern konnte hierbei in mehreren Studien festgestellt werden [132,133,136,137]. Aus den Ergebnissen einer Übersichtsarbeit von de Souza et al. [146] geht hervor, dass der Einsatz chemischer Reiniger bei der Reduzierung von Mikroorganismen und der Plaquebedeckung von Prothesenoberflächen wirksamer zu sein scheint als die Reinigung mit Wasser. Eine weitere Erkenntnis ist, dass der Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Reinigungsmethoden zur Prothesenreinigung zwar bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen war, jedoch nur eine begrenzte Anzahl an gut konzipierten, randomisierten klinischen Studien existiert. Aus der Analyse dieser Studien geht hervor, dass keine bestimmte Methode der Prothesenreinigung einer anderen überlegen ist.

Bislang gibt es keine standardisierte Methode zur Untersuchung der Wirksamkeit von chemischen Reinigern. Dies führt zu einer erheblichen Heterogenität im Studiendesign und der Auswertung [146,147]. Dies erschwert einen Vergleich verschiedener Reinigungsmethoden und lässt keine fundierte Aussage zu deren Wirksamkeit zu. Laut Nikawa et al. [147] ist eine Standardisierung in der Anwendung der Methoden und Materialien notwendig. Andererseits führt Pluralität zu neuen innovativen Ansätzen.

Bisherige Studien prüften häufig die antimikrobielle Wirkung von chemischen Reinigern gegen pathogene Mikroorganismen wie *Candida albicans* und *Streptococcus mutans*. Deutlich weniger Studien prüften deren Wirksamkeit bei der Entfernung eines in vivo gebildeten oralen Biofilms. Die Selektion bestimmter Mikroorganismen und die Untersuchung auf einem künstlich gezüchteten Biofilm limitiert eine Übertragung der dabei gewonnenen Erkenntnisse auf die klinische Situation. Die Wirksamkeit von selbsttätigen chemischen Reinigungstabletten zur Entfernung eines in vivo gebildeten oralen Biofilms kann bislang nicht abschließend beantwortet werden.

Anhand der Ergebnisse dieser Studie musste die primäre Hypothese, dass die alleinige chemische Reinigung mit kommerziellen Zahnsparngelbmitteln an einem sieben Tage alten Biofilm zu einer ausreichenden Proteinreduktion führt, verworfen werden.

Die untersuchten Zahnschwammreiniger entfernten nur einen Teil des sieben Tage alten Biofilms, ein erheblicher Anteil an Biofilm blieb zurück. Daraus lässt sich schließen, dass die Effektivität chemischer Reinigungstabletten an einem etablierten Biofilm limitiert ist [148]. Die vorliegenden Ergebnisse lassen Zweifel an der Aussage einiger Hersteller aufkommen, dass chemische Reinigungstabletten dazu beitragen, harte Ablagerungen wie Zahnstein auf herausnehmbaren Apparaturen zu entfernen. Des Weiteren ist fraglich, ob im Handel erhältliche Reiniger, die nur einmal wöchentlich verwendet werden sollen, wirksam sind und als einzige Reinigungsmethode genügen. Die sekundäre Hypothese, dass die Reinigungsleistung der drei Zahnschwammreiniger sich voneinander unterscheidet, musste beibehalten werden. Die Reinigungsleistung des Zahnschwammreinigers Retainer Brite® unterschied sich signifikant von der Reinigungsleistung der Zahnschwammreiniger Kukis® Xpress und Dontodent ($p < 0,001$), es bestand allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen Dontodent und Kukis® Xpress ($p = 1$).

Für die zunehmende Widerstandsfähigkeit reifer Biofilme gegenüber physikalischen und chemischen Belastungen sind zahlreiche Mechanismen verantwortlich. Neben einer Gesamtzunahme aller Bakterien kommt es zu einer zunehmenden Heterogenität der bakteriellen Zusammensetzung und zur Vermehrung von anaeroben Bakterien [15]. Diese Heterogenität ermöglicht den Austausch von Stoffwechselprodukten, Signalmolekülen, genetischem Material und Abwehrstoffen [7]. Des Weiteren stellen extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) eine Diffusionsbarriere für antimikrobielle Substanzen dar, indem sie die Transportgeschwindigkeit ins Innere des Biofilms verlangsamen oder durch Interaktion mit den extrapolymeren Substanzen beeinträchtigen [5]. Daraus resultiert ein erschwertes Eindringen von antimikrobiellen Substanzen in tiefe Schichten des Biofilms. Bakterien, die in ihrer planktonischen Form durch Antiseptika, wie beispielsweise Chlorhexidin, gehemmt werden, können durch Organisation zu einem Biofilm überleben [154]. Ein weiterer zu berücksichtigender Faktor ist die Verweildauer in einer Reinigungslösung. In dieser Studie wurde entsprechend den Herstelleranweisungen geprüft. Für Kukis® Xpress betrug die Verweildauer in der Reinigungslösung 3 Minuten, für Dontodent 10 Minuten und für Retainer Brite® und das Kontrollmedium Leitungswasser 15 Minuten.

Die Kinetik zur Abtötung von *Candida albicans*-Biofilmen, die auf PMMA-Prüfkörpern gezüchtet wurden, ermittelten Coenye et al. [153]. Durch die Verlängerung der Expositionszeit in einer Lösung auf Peroxidbasis (NitrAdine™, Medical Interporous, MSI Laboratories AG, Vaduz, Liechtenstein) konnte eine signifikante Reduzierung von *Candida albicans* erreicht werden. Während es in der Anfangsphase nur zu einer begrenzten Abtötung der *Candida albicans* Biofilmmasse kam, konnte durch die längere Expositionszeit (30 Minuten statt 15 Minuten) ei-

ne fast vollständige Abtötung erzielt werden. Yang et al. [155] untersuchten in ihrer In-vitro-Studie sieben chemische Reiniger in Form von Reinigungstabletten. Eine verlängerte Expositionszeit der kontaminierten Prüfkörper in den chemischen Reinigungslösungen von zwölf Stunden, anstelle von zehn Minuten, führte zu einer signifikant höheren Reduktion von Mikroorganismen und Proteinen. In der vorliegenden Studie waren die Unterschiede in der Reinigungsleistung zwischen Retainer Brite®, Dontodent und Kukis® Xpress signifikant. Während Retainer Brite® mit einer Einwirkzeit von 15 Minuten zur höchsten Proteinreduktion führte, erreichte der Reiniger Kukis® Xpress mit der kürzesten Einwirkzeit von 3 Minuten die niedrigste Proteinreduktion. Jedoch war der Unterschied in der Proteinreduktion zwischen Kukis® Xpress sowie Dontodent trotz einer längeren Verweildauer im Reinigungsbad nicht signifikant.

Die Verweildauer der Prüfkörper in Leitungswasser wurde mit Retainer Brite® und damit der längsten Einwirkzeit gleichgesetzt. Leitungswasser führte zur niedrigsten Proteinreduktion (MW $25,9 \pm 6,5$ %) und war damit ineffizienter als die chemischen Zahnspangenreiniger. Da lediglich die Reinigungsleistung gemäß Herstelleranweisung geprüft wurde, bleibt zu klären, ob eine längere Expositionszeit in der Reinigungslösung zu höheren Reinigungswerten führt. Des Weiteren bleibt zu prüfen, ob die Unterschiede in der Reinigungsleistung auf die Zusammensetzung der Reiniger zurückzuführen sind, oder ob sie Folge der unterschiedlichen Einwirkzeiten sind. Zur Klärung dieser Frage könnte in einer folgenden Studie die Verweildauer der Prüfkörper in den Reinigungslösungen gleichgesetzt werden.

Neben der Reinigungsdauer ist ein weiterer Faktor, der die Reinigungsleistung beeinflussen kann, die Temperatur des Wassers, das zur Herstellung der Reinigungslösung verwendet wird. Iwawaki et al. [156] prüften die Auswirkung der Wassertemperatur bei der Reinigung mit einem Ultraschallreinigungsgerät an einem in vitro gezüchteten *Candida-albicans*-Biofilm. Die Reinigung mit warmem Wasser (40 °C) führte zur größten Reduktion der Keimzahl sowie zum höchsten Grad an Sauberkeit und war der Reinigung mit kaltem Wasser (16 °C) überlegen. Um mögliche Verzerrungen aufgrund von Temperaturunterschieden auszuschließen, wurden zur Herstellung der Reinigungslösungen für alle Zahnspangenreiniger und Leitungswasser dieselbe Wassertemperatur gewählt. Laut den Herstellervorgaben soll zur Reinigung mit Kukis® Xpress 40 °C warmes Wasser verwendet werden. Die Reinigung mit Retainer Brite® und Dontodent soll den Herstelleranweisungen zufolge mit warmem Wasser erfolgen. Da nur Kukis® Xpress eine genaue Wassertemperatur von 40 °C zur Reinigung vorgibt, wurde diese auch für die Untersuchungen mit Retainer® Brite, Dontodent sowie dem Kontrollmedium Leitungswasser übernommen.

In der vorliegenden Studie wurden kommerziell erhältliche, selbsttätige Zahnspangenreiniger in Form von selbstauflösenden Reinigungstabletten untersucht, die in Deutschland einen ho-

hen Marktanteil besitzen. Durch die Wahl dieser Darreichungsform sollte die Vergleichbarkeit der Reiniger gewährleistet werden. Neben chemischen Reinigungslösungen auf Basis von alkalischen Peroxiden existieren Reiniger auf Basis von alkalischen Hypochloriten, Säuren und Enzymen. Säuren sind in der Lage, harte Kalkablagerungen aufzulösen, ein bekanntes Beispiel ist die Auflösung von Kalk durch Essigsäure. Inwieweit chemische Reinigungstabletten auf Basis von Säuren in der Lage sind, einen sieben Tage alten Biofilm effektiv zu entfernen bleibt zu klären.

Bislang existieren nur zwei Studien, die die Effektivität von enzymhaltigen chemischen Reinigern untersuchten [157,158]. Die in den Reinigern enthaltenen Enzyme wie beispielsweise Papain, Amylase und Trypsin dienen dem Abbau von Kohlenhydraten und Proteinen [159]. Diese könnten in der Lage sein, extrazelluläre polymere Substanzen zu spalten, das Strukturgerüst, in das die Mikroorganismen eingebettet sind, abzubauen und damit zu einer besseren Penetration der Reinigungslösung und zu einer höheren Reinigungsleistung führen. Die Klärung der Frage, ob Reiniger auf Basis von Säuren, Enzymen oder alkalischen Hypochloriten besser dazu in der Lage sind, einen sieben Tage alten Biofilm effektiv zu entfernen, könnte Ziel zukünftiger Studien sein.

Des Weiteren wurden die chemischen Zahnsparngereiniger ohne den zusätzlichen Einsatz einer mechanischen Komponente, wie beispielsweise einer Zahn- oder Prothesenbürste, untersucht. Andere Studien an weichen Belägen konnten zeigen, dass sich die Kombination aus Zahnbürste und chemischer Reinigungslösung positiv auf die Biofilmentfernung auswirkt [132,133,136,137].

Aufgrund dieser Erkenntnis wäre es interessant zu untersuchen, ob sich ein signifikant positiver Effekt bei der Kombination aus manueller Reinigung und chemischer Reinigungstablette an einem sieben Tage alten Biofilm nachweisen lässt.

In dieser Versuchsanordnung wurden die Oberflächen aller Prüfkörper so glatt wie möglich gestaltet. Dies erfolgte durch die Platzierung der Prüfkörper zwischen zwei Glasoberflächen während des Polymerisationsvorgangs. Die Gestaltung von möglichst glatten Oberflächen diente vor allem der Vergleichbarkeit der Ergebnisse und stellt eine Idealbedingung dar, die von den Oberflächen herausnehmbarer kieferorthopädischer Apparaturen nicht immer erfüllt wird. Nach der konventionellen Politur der Oberflächen mit Bimsstein hat PMMA eine durchschnittliche Oberflächenrauheit von $R_a=0,2 \mu\text{m}$ [160]. Raue Oberflächen, wie sie durch eine unzureichende Politur nach der Polymerisation oder durch mehrmaliges Putzen mit einer Zahnbürste und abrasiver Zahnpasta entstehen können, fördern die Retention von Mikroorganismen [109,110]. Des Weiteren stellen in herausnehmbare Apparaturen eingearbeitete Draht- und Schraubenelemente zusätzliche Anforderungen an Reinigungsverfahren. Diedrich [108] stellte fest, dass vor allem in schwer zugänglichen Bereichen, wie um Drahtelemente

und Schrauben, die mechanische Reinigung ungenügend ist. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die tatsächliche Reinigungsleistung von Zahnspangenreinigern an herausnehmbaren Apparaturen niedriger sein könnte als an den glatten Prüfkörperoberflächen, die in dieser Studie als Prüfobjekt dienten. Die Abweichung zwischen den glatten Prüfkörperoberflächen und den bisweilen raueren Oberflächen herausnehmbarer kieferorthopädischer Apparaturen betreffen jedoch alle Reiniger gleichermaßen.

5.3 Stärken und Schwächen der Studie

Die Wahl der Methode zur Untersuchung der Reinigungsleistung, die modifizierte OPA-Methode, hat sich in dieser Studie bewährt. Zur Untersuchung von Reinigungsverfahren sind Proteinmessmethoden ein etabliertes Vorgehen und als Prüfmethode anerkannt (DIN EN ISO 15883). In dieser Studie sollten Proteine quantitativ erfasst werden. Da die modifizierte OPA-Methode eine hohe Sensitivität mit einer Nachweisbarkeit bis in den Picomolbereich besitzt, fiel die Wahl auf diese Methode. Der für die OPA-Methode geforderte, ideale Messbereich von $E = 0,003-1,000$ konnte sowohl durch die Anpassung des Verhältnisses von OPA-Reagenz zu Proteineluat als auch durch die Einstellung des pH-Wertes der 1%igen SDS-Lösung auf pH 11,5 eingestellt werden. Diese Anpassungen ermöglichten die Gestaltung von kleinen Prüfkörpern, die im bukkalen Bereich der Oberkiefermolaren platziert werden konnten. Allerdings führen sehr niedrige Extinktionswerte die Methode in der vorliegenden Studie an die Grenzen der Nachweisbarkeit. Bei Werten unter $2 \mu\text{g/ml}$ BSA ist die Nachweisgrenze des Photometers erreicht, vor allem die Quantifizierung kleiner Proteinmengen wird zunehmend ungenau. Diese Problematik kann durch die Generierung von höheren Extinktionswerten, die im unkritischen Messbereich liegen, gelöst werden. Ansätze hierzu sind unter anderem eine Anpassung des Verhältnisses von OPA-Reagenz zu Proteineluat.

Zur Generierung von höheren Extinktionswerten wäre die Gestaltung größerer Prüfkörperflächen und eine damit einhergehende höhere Ansammlung von Biofilm ein möglicher Ansatz. Allerdings war die Gestaltung von größeren Prüfkörperoberflächen für diese Versuchsanordnung keine Option, da dies eine symmetrische Platzierung der Prüfkörper im Bereich der oberen Molaren deutlich erschwert hätte. Des Weiteren besteht bei größeren Prüfkörper das Risiko, dass sich die Ansammlung an Biofilm durch einen verstärkten Einfluss der umliegenden Gewebe stärker voneinander unterscheidet.

Ob und inwieweit eine Anpassung durch eine weitere Erhöhung des pH-Wertes der SDS-Lösung erfolgen kann, sollte untersucht werden.

Eine Möglichkeit, die Nachweisgrenze deutlich herabzusetzen, wäre eine Hydrolyse der Pro-

teine mit Hilfe von Salzsäure. Bei der Anwendung der modifizierten OPA-Methode, wie sie auch in dieser Untersuchung erfolgte, reagieren freie α - und ϵ -terminale Aminogruppen von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen zu einem fluoreszierenden Endprodukt. Durch die Messung der Extinktion bei 340 nm können diese terminalen Aminogruppen quantitativ erfasst werden. Bei einer Hydrolyse mit Salzsäure werden die Proteine zuvor in ihre einzelnen Aminosäuren gespalten. Als Folge liegen dann deutlich mehr Aminogruppen frei, die mit dem OPA-Reagenz reagieren und quantitativ erfasst werden können. Dies führt zu einer Erhöhung der gemessenen Extinktionswerte. In der Literatur ist zur Charakterisierung von Proteolyseprodukten der Einsatz der OPA-Methode nach einer vorherigen Hydrolyse bereits erfolgreich beschrieben worden [161].

Die für diese Versuchsanordnung idealen Messbedingungen, bei denen sowohl die Extinktionswerte der ungereinigten als auch die der gereinigten Prüfkörper im Bereich $E = 0,003-1,000$ lagen, wurden in den Voruntersuchungen ermittelt. Durch die Anpassung des Verhältnisses von Eluat zu OPA-Reagenz sowie eine Erhöhung des pH-Wertes lagen die Extinktionswerte der Proband*innen in dieser Studie mit Konzentrationen über $8,7 \mu\text{g/ml}$ im unkritischen Messbereich.

Neben der Ermittlung der idealen Messbedingungen konnte aus den Voruntersuchungen die Erkenntnis gewonnen werden, dass die Messergebnisse der Hauptuntersuchungen nicht durch Kontamination oder Nebenreaktionen von verwendeten Materialien signifikant verfälscht werden konnten. Als Prüfanschmutzung wurde hierbei Hühnereiweiß verwendet, in der Vermutung, dass die zähe Struktur der Struktur eines reifen Biofilms ähnelt.

Jedoch war aufgrund der Struktur eine gleichmäßige Benetzung der Prüfkörper nur bedingt möglich, vor allem bei großen Prüfkörperflächen kann dies zu größeren Unterschieden in der Menge an angesammeltem Protein führen. Als Konsequenz muss bei der Verwendung von großen Prüfkörperflächen die Verschmutzung gewogen und zur Extinktion ins Verhältnis gesetzt werden. Anderenfalls ist die Verwendung einer alternativen Proteinlösung als Prüfanschmutzung denkbar.

Vorab wurde überlegt, welches Gebiet der Mundhöhle am besten geeignet ist für die Platzierung der Prüfkörper. Der auf den Prüfkörpern angesammelte Biofilm sollte nicht durch den Einfluss von umliegenden Geweben wie der Zunge oder der Muskulatur versehentlich entfernt werden. Des Weiteren sollte die Platzierung den Proband*innen das durchgängige Tragen im Alltag ermöglichen, weder das Sprechen sollte beeinträchtigt werden, noch sollten sich die Prüfkörper bei Krafteinwirkungen wie Essen oder Zähneknirschen vorzeitig lösen. Trotz der symmetrischen Platzierung der Prüfkörper kam es zu einer höheren Proteinakkumulation auf einer Position (Position C). Die übrigen Positionen unterschieden sich kaum.

Um solche Unterschiede zu minimieren, könnten in einer neuen Versuchsanordnung die PMMA-Prüfkörperhälften gegenüber den Halterungen weiter nach innen versetzt werden, sodass der Einfluss der umliegenden Gewebe weiter minimiert wird.

Die übrige Gestaltung des Prüfobjektes, einer Tiefziehschiene, die als Träger für vier Prüfkörper diente, sowie der Verbund zwischen den beiden Elementen mit Orthocryl LC® war zufriedenstellend. Allerdings führten erhöhte Belastungen zum Lösen des Verbundes und zum vorzeitigen Verlust von insgesamt zwei Prüfkörpern bei zwei Probanden. Um dem vorzeitigen Verlust eines Prüfkörpers entgegenzuwirken, wäre es für zukünftige Studien denkbar, dass das Prüfobjekt samt Trägerschiene additiv gedruckt wird.

Aufgrund der Verteilung der Daten wurde festgelegt, dass zur statistischen Analyse ein parametrischer Test gewählt werden musste. Im Vorfeld der Untersuchungen wurde die einseitige Varianzanalyse (ANOVA) in Betracht gezogen. Da jedoch in einem verbundenen Stichprobendesign für die Varianzanalyse in den gängigen Statistikprogrammen keine Post-hoc-Tests implementiert sind, wurde nach statistischer Beratung die Varianzanalyse (ANOVA) zugunsten des t-Tests für verbundene Stichproben verworfen. Grund hierfür ist das verbundene Studiendesign; die gewonnenen Proteinmengen auf den vier Prüfkörpern entstammten alle derselben Prüfschiene eines Probanden/einer Probandin. Da alle Reiniger und Leitungswasser an derselben Prüfschiene untersucht wurden, waren die ermittelten Werte voneinander abhängig. Um einer Kumulierung des α -Fehlers durch multiples Testen entgegenzuwirken, wurden die drei p-Werte der Paarvergleiche nach Bonferroni mit dem Faktor 3 adjustiert. Neben einer Korrektur der p-Werte, bei der diese mit der Anzahl an durchzuführenden statistischen Tests multipliziert werden, ist eine weitere Möglichkeit der Bonferroni-Korrektur die Anpassung des α -Levels. Hierbei wird das globale α -Level durch die Anzahl an durchzuführenden statistischen Tests dividiert. Die einfache Durchführbarkeit ist ein Vorteil der Bonferroni-Korrektur. Nachteilig ist jedoch die konservative Vorgehensweise; das Ergebnis muss einen sehr kleinen p-Wert aufweisen, um statistisch signifikant zu sein. Dies führt dazu, dass Nullhypothesen zu oft beibehalten werden.

Aufgrund der Anwendung des t-Tests erfolgte die Angabe der Reinigungsleistung mit Mittelwerten und Standardabweichungen. Zur grafischen Darstellung der Reinigungsleistung waren Box-Whisker-Plots am geeignetsten. Da die Linie innerhalb einer Box definitionsgemäß den Medianwert angibt, wurden unter den Abbildungen 6 und 7 zusätzlich Medianwerte angegeben.

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine klinische Untersuchung, bei der der Biofilm auf den Prüfkörpern während einer siebentägigen Tragezeit in vivo gebildet wurde. Die Zusammensetzung eines Biofilms ist nicht homogen und unterliegt individuellen sowie probandenbezogenen starken Schwankungen. Einflussfaktoren für die Zusammensetzung sind

beispielsweise die Ernährung, Mundhygienegewohnheiten, Rauchen oder die Einnahme von Medikamenten [18]. Des Weiteren existieren zwischen unterschiedlichen Proband*innen verschiedene anatomische Gegebenheiten. Beispielsweise könnte es durch Bewegung des innenliegenden Wangengewebes zu unterschiedlich starkem Abrieb an verschiedenen Stellen, beispielsweise den vorderen Positionen B und C, kommen.

Diese Vielzahl an individuellen Einflussfaktoren erklärt auch die Streubreite bei der Ansammlung an Biofilm (Tabelle 16, Abbildung 6). Eine Alternative hierzu wäre die Biofilmbildung *in vitro*. Ein Vorteil ist die Reproduzierbarkeit des künstlich gezüchteten Biofilms durch die immer gleiche Zusammensetzung. Andererseits ist die Züchtung eines älteren Biofilms sehr aufwendig und vor allem besitzt er nicht die Eigenschaften eines natürlichen Biofilms. Um realitätsnahe Ergebnisse zu erzielen, ist eine Untersuchung an *in vivo* gebildetem Biofilm vorzuziehen.

Die Untersuchung der Reinigungsleistung der Zahnspangenreiniger fand ausschließlich auf glatten Prüfkörperoberflächen aus PMMA statt. Die Reinigungsleistung auf weiteren Materialoberflächen wie thermoplastischen Kunststoffen für transparente Aligner oder Drahtelementen aus Chrom-Nickel-Stahl, die in herausnehmbare Apparaturen eingearbeitet sind, wurden nicht untersucht. Die ermittelten Ergebnisse können auf anderen Materialoberflächen abweichen. Wie bereits erwähnt, können die Ergebnisse auf PMMA abweichen, das keine glatte Oberfläche, sondern Aufrauungen aufweist.

5.4 Ausblick

Für eine Vielzahl von Medizinprodukten, wie beispielsweise Endoskope, existieren verbindliche Leitlinien für Reinigungs- und Desinfektionsgeräte, die nach DIN (DIN EN ISO 15883) standardisiert sind. Hingegen ist die Reinigungsleistung von chemischen Spangen-/Prothesenreinigern noch nicht standardisiert. Diese Studie kann als Anregung genommen werden, auch für chemische Reiniger, die für die Reinigung von herausnehmbarem Zahnersatz oder herausnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen zugelassen sind, Kriterien für die Reinigungsleistung zu entwickeln.

In dieser Studie wurde die Reinigungsleistung auf Prüfkörpern aus PMMA untersucht. Angesichts des zunehmenden Einsatzes von transparenten Alignern in der kieferorthopädischen Therapie wäre die Untersuchung der Reinigungseffizienz auf weitere Materialien ausdehnbar. Darüber hinaus wäre interessant zu untersuchen, was in mehreren Reinigungszyklen mit den Restbelägen geschieht. Hierfür könnte in zukünftigen Studien untersucht werden, ob durch mehrere aufeinanderfolgende Reinigungszyklen die Reinigungsleistung gesteigert werden

kann. Des Weiteren bleibt zu klären, ob sich nach erneuter Insertion in die Mundhöhle der Biofilm aufsummiert.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Reinigungsleistung von chemischen Reinigern an einem sieben Tage gereiften Biofilm limitiert ist. Die Suche nach geeigneten Methoden, die eine effektive Biofilmentfernung garantieren, ohne dabei negative Auswirkungen auf Materialeigenschaften, wie eine erhöhte Oberflächenrauigkeit und eine verringerte Biegefestigkeit von PMMA oder Gefüge- und Festigkeitsveränderungen von Drahtelementen [116-118], zu haben, bleibt folglich von hoher Bedeutung.

Jenseits der klassischen Entfernung durch Reinigung bleibt ein vielversprechender Ansatz die Gestaltung von Oberflächen, die die Biofilmformation reduzieren. Die Verringerung der Anhaftung von Bakterien kann durch eine chemische Modifizierung von Materialien mit Hilfe von Nanopartikeln oder die Verknüpfung von Molekülen mit antimikrobieller Wirkung erfolgen [162]. Acosta et al. [163] untersuchten in einer In-vitro-Studie ob zwei photopolymerisierte Beschichtungen aus Polyacrylsäure und Polyitaconsäure die Adhäsion von *Candida albicans* auf PMMA wirksam reduzieren können. Durch den Einschluss von Carbonsäuregruppen aus den Beschichtungsmaterialien konnte die Anhaftung von *Candida-albicans*-Biofilm um bis zu 90 % reduziert werden. In einer weiteren Studie konnte ebenfalls die Adhäsion von *Candida albicans* durch Oberflächenmodifizierung, in diesem Fall durch die Einlagerung von Silberbromid-Nanopartikeln in PMMA (AgBr/NPVP), reduziert werden [164].

Trotz vielversprechender Resultate bleiben die Ergebnisse von klinischen Untersuchungen abzuwarten. Des Weiteren müssen die verwendeten Materialien zusätzlich hinsichtlich ihrer Biokompatibilität untersucht und als unbedenklich eingestuft werden.

Ein weiterer möglicher Ansatz ist die Modifikation von chemischen Reinigern und die Kombination mehrerer Wirkstoffklassen. Um eine maximale Wirksamkeit zu erzielen, könnten EPS-abbauende Enzyme als Zusatzstoffe verwendet werden. Die durch den Abbau der Biofilmstruktur erhöhte Durchlässigkeit gegenüber der chemischen Reinigungslösung könnte die mikrobielle Abtötungsaktivität verbessern und die Reinigungseffizienz fördern. Inwieweit diese Modifikation jedoch zu einer höheren Reinigungsleistung führt bleibt eine Vermutung und zu untersuchen.

6 Schlussfolgerung

Herausnehmbare kieferorthopädische Apparaturen werden kurz nach ihrer Insertion in die Mundhöhle von Biofilm besiedelt. Dabei kommt es zu Veränderungen in der Zusammensetz-

ung der oralen Mikroorganismen und zu einer Zunahme spezifischer Arten [91].

Herausnehmbare Apparaturen begünstigen die Besiedlung mit *Streptococcus mutans* und Laktobazillen und erhöhen damit das Kariesrisiko. Des Weiteren wird das Risiko einer Gingivitis, verbunden mit einem Anstieg der Plaquewerte und der Gingivaindizes, erhöht [83-90]. Mikroorganismen der Mundhöhle können systemisch in den Blutkreislauf gelangen und stellen insbesondere für immunsupprimierte Patienten ein Risiko dar. Folglich hat die Reinigung von herausnehmbaren Apparaturen eine hohe Bedeutung und jedes kieferorthopädische Gerät, das in die Mundhöhle eingeführt wird, sollte möglichst frei von Bakterien sein. Zusätzlich sollte das angewendete Reinigungsverfahren zu einer vollständigen Sauberkeit des zu reinigenden kieferorthopädischen Gerätes führen. Eine vollständig gereinigte und geruchsfreie Apparatur erhöht den Tragekomfort und kann die Mitarbeit des Patienten fördern.

In dieser Studie wurde die Reinigungswirkung von drei chemischen Zahnspangenreinigern in Form von selbstauflösenden Reinigungstabletten und Leitungswasser an sieben Tage alten Biofilmen untersucht. Von den drei untersuchten Reinigern führte der von deutschen Kieferorthopäden am häufigsten empfohlene Zahnspangenreiniger Kukis® Zahnspangenreiniger zur niedrigsten Biofilmreduktion ($39,9 \pm 11,5$ %). Der Zahnspangenreiniger Retainer Brite® mit der höchsten Biofilmreduktion von $54,5 \pm 7,1$ % führte zu einer Entfernung von etwas mehr als der Hälfte des Biofilms. Schlussfolgernd verbleibt auf den Prüfkörpern selbst mit dem effektivsten Reinigungsprodukt nach Reinigung noch knapp die Hälfte des Biofilms. Um einheitliche Untersuchungsbedingungen zu schaffen, erfolgte die Bestimmung der Reinigungsleistung ausschließlich auf glatten Prüfkörperoberflächen. Die Reinigungsleistung von chemischen Zahnspangenreinigern könnte an herausnehmbaren Apparaturen, die neben rauen Oberflächen eingearbeitete Draht- und Schraubenelementen aufweisen, noch niedriger liegen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung führen zu der Schlussfolgerung, dass chemische Reiniger nicht als alleinige Maßnahme geeignet sind, um seit längerem verschmutzte Apparaturen zu reinigen. Zwar wird ein Teil des sieben Tage alten Biofilms entfernt, doch bleibt ein erheblicher Teil an Biofilm samt potenziell pathogener Mikroorganismen zurück.

Folglich ist die Reinigungsleistung von chemischen Zahnspangenreinigern an einem sieben Tage Biofilm und seinen damit einhergehenden strukturellen Veränderungen limitiert.

An einem etablierten Biofilm führt das alleinige Einlegen in Leitungswasser nicht zu einer adäquaten Reinigung [148]. Ob der tägliche Gebrauch von Zahnspangenreinigern die akkumulierende Entstehung von Biofilm verhindern kann, könnte in zukünftigen Studien untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser und vorheriger Studien unterstreichen die Notwendigkeit, chemische Reinigungstabletten mit weiteren Methoden zu verbinden, um eine angemessene Biofilmentfernung zu gewährleisten.

7 Literaturverzeichnis

1. Drews, G. Bakterien – ihre Entdeckung und Bedeutung für Natur und Mensch. 2. Auflage, Berlin, Springer Spektrum; 2015,25-79.
2. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192(19):5002-17.
3. Keijser BJ, Zaura E, Huse SM, van der Vossen JM, Schuren FH, Montijn RC, ten Cate JM, Crielaard W. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res.* 2008;87(11):1016-20.
4. Evaldson G, Heimdahl A, Kager L, Nord CE. The normal human anaerobic microflora. *Scand J Infect Dis Suppl.* 1982;35:9-15.
5. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-93.
6. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(9):623-33.
7. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(9):563-75.
8. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35(4):322-32.
9. Wang R, Kalchayanand N, Schmidt JW, Harhay DM. Mixed biofilm formation by shiga toxin-producing escherichia coli and salmonella enterica serovar typhimurium enhanced bacterial resistance to sanitization due to extracellular polymeric substances. *J Food Prot.* 2013;76(9):1513-22.
10. Hopley L, Harkins C, MacPhee CE, Stanley-Wall NR. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiology Reviews.* 2015;39(5):649-69.
11. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):881-90.
12. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(4):2837-48.
13. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(3):486-505.
14. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun* 1998;66(10):4729-32.
15. Kim YS, Kang SM, Lee ES, Lee JH, Kim BR, Kim BI. Ecological changes in oral microcosm biofilm during maturation. *J Biomed Opt.* 2016;21(10):101409.
16. Palmer RJ Jr, White DC. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol.* 1997;5(11):435-40.

17. Wood SR, Kirkham J, Shore RC, Brookes SJ, Robinson C. Changes in the structure and density of oral plaque biofilms with increasing plaque age. *FEMS Microbiol Ecol.* 2002;39(3):239-44.
18. Sharma N, Bhatia S, Sodhi AS, Batra N. Oral microbiome and health. *AIMS Microbiol.* 2018;4(1):42-66.
19. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.
20. Akcalı A, Lang NP. Dental calculus: the calcified biofilm and its role in disease development. *Periodontol 2000.* 2018;76(1):109-15.
21. Miller WD. Dental Caries. *Am J Dent Sci.* 1883;17(3):126-30.
22. Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol.* 1924;5(3):141-7.
23. Janket SJ, Baird AE, Chuang SK, Jones JA. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(5):559-69.
24. Qin X, Zhao Y, Guo Y. Periodontal disease and myocardial infarction risk: a meta-analysis of cohort studies. *Am J Emerg Med.* 2021;48:103-9.
25. Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *Lancet.* 2004;363(9403):139-49.
26. Nomura R, Otsugu M, Naka S, Teramoto N, Kojima A, Muranaka Y, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T, Nakano K. Contribution of the interaction of *Streptococcus mutans* serotype k strains with fibrinogen to the pathogenicity of infective endocarditis. *Infect Immun.* 2014;82(12):5223-34.
27. Guzman S, Karima M, Wang HY, Van Dyke TE. Association between interleukin-1 genotype and periodontal disease in a diabetic population. *J Periodontol.* 2003;74(8):1183-90.
28. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002;30(3):182-92.
29. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 2015;94(5):650-8.
30. Gerabek WE. The tooth-worm: historical aspects of a popular medical belief. *Clin Oral Investig.* 1999;3(1):1-6.
31. Fauchard P. *Le Chirurgien dentiste, ou Traité des dents* (Ed.1746) 1. Auflage. Paris, Hachette Livre; 2017,142-69.
32. Keyes PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol.* 1960;1:304-20.
33. König KG. *Karies und Parodontopathien. Ätiologie und Prophylaxe.* Stuttgart, Thieme; 1987,240-7.

-
34. Meyer-Lückel H, Paris S, Ekstrand K. Karies: Wissenschaft und Klinische Praxis (ZMK Praxis). 1. Auflage. Stuttgart, Thieme; 2012,23-41.
 35. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ. The biology of streptococcus mutans. *Microbiol Spectr*. 2019;7(1):10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
 36. Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, Goss J, Corby AL, Junior HM, Weyant RJ, Paster BJ. Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol*. 2005;43(11):5753-9.
 37. Sung YH, Son HH, Yi K, Chang J. Elemental analysis of caries-affected root dentin and artificially demineralized dentin. *Restor Dent Endod*. 2016;41(4):255-61.
 38. Llana-Puy C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(5):449-55.
 39. Seow WK. Developmental defects of enamel and dentine: challenges for basic science research and clinical management. *Aust Dent J*. 2014;59(1):143-54.
 40. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non-plaque-induced gingival diseases. *J Periodontol*. 2018;89(1):28-45.
 41. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 1965;36:177-87.
 42. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: case definition and diagnostic considerations. *J Periodontol*. 2018;89(1):46-73.
 43. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Loe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res*. 1966;1:1-13.
 44. Page RC. Gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1986;13(5):345-59.
 45. Lindhe J, Hamp S, Loe H. Experimental periodontitis in the beagle dog. *J Periodontal Res*. 1973;8(1):1-10.
 46. Eickholz P, Nickles K. Glossar der Grundbegriffe für die Praxis: Klassifikation der Parodontalerkrankungen. *Parodontologie* 2013;24(1):99-106.
 47. Feng Z, Weinberg A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000*. 2006;40:50-76.
 48. Sbordone L, 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*. 2003;7(4):181-8.
 49. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998;25(2):134-44.
 50. Duarte PM, da Rocha M, Sampaio E, Mestnik MJ, Feres M, Figueiredo LC, Bastos MF, Faveri M. Serum levels of cytokines in subjects with generalized chronic and aggressive periodontitis before and after non-surgical periodontal therapy: a pilot study. *J Periodontol* 2010;81(7):1056-63.

-
51. Taylor JJ. Cytokine regulation of immune responses to porphyromonas gingivalis. *Periodontol* 2000. 2010;54(1):160-94.
 52. Stashenko P, Dewhirst FE, Peros WJ, Kent RL, Ago JM. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone resorption. *J Immunol*. 1987;138(5):1464-8.
 53. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol*. 1990;145(10):3297-303.
 54. Cochran DL. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*. 2008;79(8 Suppl):1569-76.
 55. Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol*. 1993;64(1):16-23.
 56. Tsai C, Hayes C, Taylor GW. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2002;30(3):182-92.
 57. Martínez-Maestre MÁ, González-Cejudo C, Machuca G, Torrejón R, Castelo-Branco C. Periodontitis and osteoporosis: a systematic review. *Climacteric*. 2010;13(6):523-9.
 58. Karimbux NY, Saraiya VM, Elangovan S, Allareddy V, Kinnunen T, Kornman KS, Duff GW. Interleukin-1 gene polymorphisms and chronic periodontitis in adult whites: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol*. 2012;83(11):1407-19.
 59. Hoshi N, Mori H, Taguchi H, Taniguchi M, Aoki H, Sawada T, Kawabata M, Kuwabara A, Oono A, Tanaka K, Hori N, Toyoda M, Kimoto K. Management of oral candidiasis in denture wearers. *J Prosthodont Res*. 2011;55(1):48-52.
 60. Loster BW, Loster J, Wieczorek A, Ryniewicz W. Mycological analysis of the oral cavity of patients using acrylic removable dentures. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012:951572.
 61. Lundström IM, Anneroth GB, Holmberg K. Candida in patients with oral lichen planus. *Int J Oral Surg*. 1984;13(3):226-38.
 62. Meregildo-Rodríguez ED, Robles-Arce LG, Chunga-Chávez EV, Asmat-Rubio MG, Zavaleta-Alaya P, Vásquez-Tirado GA. Periodontal disease as a non-traditional risk factor for acute coronary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Infez Med*. 2022;30(4):501-15.
 63. Si Y, Fan H, Song Y, Zhou X, Zhang J, Wang Z. Association between periodontitis and chronic obstructive pulmonary disease in a Chinese population. *J Periodontol*. 2012;83(10):1288-96.
 64. Engebretson S, Kocher T. Evidence that periodontal treatment improves diabetes outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2013;40(14):153-63.
 65. Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, Arnold RR, Offenbacher S. Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol*. 1997;68(2):127-35.

-
66. Salvi GE, Collins JG, Yalda B, Arnold RR, Lang NP, Offenbacher S. Monocytic TNF alpha secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 1997;24(1):8-16.
67. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, Nguyen M, Haditsch U, Raha D, Griffin C, Holsinger LJ, Arastu-Kapur S, Kaba S, Lee A, Ryder MI, Potempa B, Mydel P, Hellvard A, Adamowicz K, Hasturk H, Walker GD, Reynolds EC, Faull RLM, Curtis MA, Dragunow M, Potempa J. *Porphyromonas gingivalis* in alzheimer's disease brains: evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv.* 2019;5(1):eaau3333.
68. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation.* 2008;117(24):3118-25.
69. Ebersole JL, Machen RL, Steffen MJ, Willmann DE. Systemic acute-phase reactants, C-reactive protein and haptoglobin, in adult periodontitis. *Clin Exp Immunol.* 1997;107(2):347-52.
70. Azarpazhooh A, Leake JL. Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. *J Periodontol.* 2006;77(9):1465-82.
71. Scannapieco FA, Bush RB, Paju S. Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003;8(1):54-69.
72. Khadka S, Khan S, King A, Goldberg LR, Crocombe L, Bettiol S. Poor oral hygiene, oral microorganisms and aspiration pneumonia risk in older people in residential aged care: a systematic review. *Age Ageing.* 2021;50(1):81-7.
73. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 2010;362(4):329-44.
74. Kaye EK, Valencia A, Baba N, Spiro A 3rd, Dietrich T, Garcia RI. Tooth loss and periodontal disease predict poor cognitive function in older men. *J Am Geriatr Soc.* 2010;58(4):713-8.
75. Noble JM, Borrell LN, Papapanou PN, Elkind MS, Scarmeas N, Wright CB. Periodontitis is associated with cognitive impairment among older adults: analysis of NHANES-III. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2009;80(11):1206-11.
76. Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Funaki-Kato Y, Hagiwara M, Ferdous T, Abdullah M, Mitani A, Michikawa M, Matsushita K. Periodontitis induced by bacterial infection exacerbates features of alzheimer's disease in transgenic mice. *NPJ Aging Mech Dis.* 2017;3:15.
77. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2005;28(1):37-42.
78. Karas JA, Wade JD, Hossain MA. The chemical synthesis of insulin: an enduring challenge. *Chem Rev.* 2021;121(8):4531-60.
79. Riches DW, Chan ED, Winston BW. TNF-alpha-induced regulation and signalling in macrophages. *Immunobiology.* 1996;195(4-5):477-90.

-
80. Engebretson SP, Hey-Hadavi J, Ehrhardt FJ, Hsu D, Celenti RS, Grbic JT, Lamster IB. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1 β and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol*. 2004;75(9):1203-8.
81. Chapple IL, Genco R; working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the joint EFP/AAP workshop on periodontitis and systemic diseases. *J Periodontol*. 2013;84(4):106-12.
82. Witt E, Bartsch A, Sahm G. Tragezeitverordnungen bei herausnehmbaren Geraten-Ergebnisse einer Umfrage. *Fortschr Kieferorthop*. 1992;53(2):124-30.
83. Schlagenhauf U, Tobien P, Engelfried P. Effects of orthodontic treatment on individual caries risk parameters. *Dtsch Zahnarztl Z*. 1989;44(10):758-60.
84. Batoni G, Pardini M, Giannotti A, Ota F, Giuca MR, Gabriele M, Campa M, Senesi S. Effect of removable orthodontic appliances on oral colonisation by mutans streptococci in children. *Eur J Oral Sci*. 2001;109(6):388-92.
85. Kundu R, Tripathi AM, Jaiswal JN, Ghoshal U, Palit M, Khanduja S. Effect of fixed space maintainers and removable appliances on oral microflora in children: an in vivo study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2016;34(1):3-9.
86. Topaloglu-Ak A, Ertugrul F, Eden E, Ates M, Bulut H. Effect of orthodontic appliances on oral microbiota--6 month follow-up. *J Clin Pediatr Dent*. 2011;35(4):433-6.
87. Rodríguez-Rentera M, Márquez-Preciado R, Ortiz-Magdaleno M, Bermeo-Escalona J, Sánchez-Vargas LO. Frequency of pathogenic microorganisms in removable orthodontic appliances and oral mucosa in children. *J Clin Pediatr Dent*. 2021;45(2):135-9.
88. Arendorf T, Addy M. Candidal carriage and plaque distribution before, during and after removable orthodontic appliance therapy. *J Clin Periodontol*. 1985;12(5):360-8.
89. Addy M, Shaw WC, Hansford P, Hopkins M. The effect of orthodontic appliances on the distribution of *Candida* and plaque in adolescents. *Br J Orthod*. 1982;9(3):158-63.
90. Kukreja P, Hugar SM, Hallikerimath S, Sogi S, Badakar C, Thakkar P. Evaluation of the effect of fixed and removable appliances on salivary parameters (salivary flow rate pH and buffering capacity) in children aged 5-12 years: an in vivo study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2021;14(6):774-8.
91. Rego RO, Oliveira CA, dos Santos-Pinto A, Jordan SF, Zambon JJ, Cirelli JA, Haraszthy VI. Clinical and microbiological studies of children and adolescents receiving orthodontic treatment. *Am J Dent*. 2010;23(6):317-23.
92. Eichenauer J, Serbesis C, Ruf S. Cleaning removable orthodontic appliances: a survey. *J Orofac Orthop*. 2011;72(5):389-95.
93. Rocha EP, Francisco SB, Del Bel Cury AA, Cury JA. Longitudinal study of the influence of removable partial denture and chemical control on the levels of *Streptococcus mutans* in saliva. *J Oral Rehabil*. 2003;30(2):131-8.
94. Nrhi TO, Ainamo A, Meurman JH. Mutans streptococci and lactobacilli in the elderly. *Scand J Dent Res*. 1994;102(2):97-102.

-
- 95 Mihalow DM, Tinanoff N. The influence of removable partial dentures on the level of streptococcus mutans in saliva. *J Prosthet Dent.* 1988;59(1):49-51.
- 96 Tanaka J, Tanaka M, Kawazoe T. Longitudinal research on the oral environment of elderly wearing fixed or removable prostheses. *J Prosthodont Res.* 2009;53(2):83-8.
- 97 Lyon JP, da Costa SC, Totti VM, Munhoz MF, de Resende MA. Predisposing conditions for candida spp. carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. *Can J Microbiol.* 2006;52(5):462-7.
98. Gleiznys A, Zdanavičienė E, Žilinskas J. Candida albicans importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija.* 2015;17(2):54-66.
99. Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Prevalence of candida spp. associated with bacteria species on complete dentures. *Gerodontology.* 2012;29(3):203-8.
100. Zomorodian K, Nejabat Haghighi N, Rajaei N, Pakshir K, B Tarazooie B, Vojdani M, Sedaghat F, Vosoghi M. Assessment of candida species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers, *Med Mycol.* 2011;49(2):208–11.
101. Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W, Fiedoruk K, Sciepek M, Zaremba ML, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, Kedra BA, Anielska I, Górka M, Kedra BR. Occurrence rate of oral candida albicans in denture wearer patients. *Adv Med Sci.* 2006;51(1):77-80.
102. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence and intra-oral distribution of candida albicans in man. *Arch Oral Biol.* 1980;25(1):1-10.
103. Farah CS, Lynch N, McCullough MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J* 2010;55(1):48-54.
104. Tsolakis AI, Kakali L, Prevezanos P, Bitsanis I, Polyzois G. Use of different cleaning methods for removable orthodontic appliances: a questionnaire study. *Oral Health Prev Dent.* 2019;17(4):299-302.
105. Akgün FA. Cleaning methods and materials for removable orthodontic appliances: a questionnaire study. *BSJ Health Sci* 2021;4:136-40.
106. Paranhos HF, Silva-Lovato CH, Souza RF, Cruz PC, Freitas KM, Peracini A. Effects of mechanical and chemical methods on denture biofilm accumulation. *J Oral Rehabil.* 2007;34(8):606-12.
107. Tarbet WJ, Axelrod S, Minkoff S, Fratarcangelo PA. Denture cleansing: a comparison of two methods. *J Prosthet Dent.* 1984;51(3):322-5.
108. Diedrich P. Microbial colonization and various cleaning procedures for orthodontic appliances. *Fortschr Kieferorthop.* 1989;50(3):231-9.
109. Richmond R, Macfarlane TV, McCord JF. An evaluation of the surface changes in PMMA biomaterial formulations as a result of toothbrush/dentifrice abrasion. *Dent Mater.* 2004;20(2):124-32.

-
110. Bollen CM, Lambrechts P, Quirynen M. Comparison of surface roughness of oral hard materials to the threshold surface roughness for bacterial plaque retention: a review of the literature. *Dent Mater.* 1997;13(4):258-69.
111. Freitas-Pontes KM, Silva-Lovato CH, Paranhos HF. Mass loss of four commercially available heat-polymerized acrylic resins after toothbrushing with three different dentifrices. *J Appl Oral Sci.* 2009;17(2):116-21.
112. Blankenstein FH, Peroz I. Sind Reinigungstabletten für die alltägliche Zahnprothesenhygiene geeignet. *Z Gerontol Geriatr.* 2011;44(3):192-7.
113. Pitner P, Rossiwall B. Untersuchungen über die Korrosion von abnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen durch selbsttätige Reinigungsmittel. *Fortschr Kieferorthop* 1975;36(4):570-82.
114. Faltermeier A, Rosentritt M, Müssig D. Acrylic removable appliances: comparative evaluation of different postpolymerization methods. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131(3):301.e16-22.
115. Frazer RQ, Byron RT, Osborne PB, West KP. PMMA: an essential material in medicine and dentistry. *J Long Term Eff Med Implants.* 2005;15(6):629-39.
116. Peracini A, Davi LR, de Queiroz Ribeiro N, de Souza RF, Lovato da Silva CH, de Freitas Oliveira Paranhos H. Effect of denture cleansers on physical properties of heat-polymerized acrylic resin. *J Prosthodont Res.* 2010;54(2):78-83.
117. Rabe H, Miethke RR, Newesely H. Gefüge und Festigkeit von Silberloten für die Kieferorthopädie nach Behandlung mit handelsüblichen "Zahnspangenreinigern". *Dtsch Zahnärztl Z.* 1986;41(7):714-19.
118. Rabe H, Miethke RR, Magwitz A. Ergebnisse werkstoffkundlicher und mikrobiologischer Untersuchungen von sogenannten Zahnspangenreinigern. *Prakt. Kieferorthop.* 1987;1:111-20.
119. Fathi H, Martiny H, Jost-Brinkmann P-G. Efficacy of cleaning tablets for removable orthodontic appliances: an in vivo pilot study. *J Orofac Orthop.* 2015;76(2):143-51.
120. Ghazal ARA, Idris G, Hajeer MY, Alawer K, Cannon RD. Efficacy of removing candida albicans from orthodontic acrylic bases: an in vitro study. *BMC Oral Health.* 2019;19(1):71.
121. de Freitas Fernandes FS, Pereira-Cenci T, da Silva WJ, Filho AP, Straioto FG, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on candida spp. biofilm formed on polyamide and polymethyl methacrylate resins. *J Prosthet Dent.* 2011;105(1):51-8.
122. da Silva FC, Kimpara ET, Mancini MN, Balducci I, Jorge AO, Koga-Ito CY. Effectiveness of six different disinfectants on removing five microbial species and effects on the topographic characteristics of acrylic resin. *J Prosthodont.* 2008;17(8):627-33.
123. Shrestha B, Wichai W, Srihirin T, Dechkunakorn S, Anuwongnukroh N. Impact of household vinegar on calculus removal and mechanical properties of orthodontic resin. *J Orofac Orthop.* 2021;82(1):54-63.
124. Fitjer LC, Jonas IE, Kappert HF. Corrosion susceptibility of lingual wire extensions in removable appliances. An in vitro study. *J Orofac Orthop.* 2002;63(3):212-26.

-
125. Mota AC, de Castro RD, de Araújo Oliveira J, de Oliveira Lima E. Antifungal activity of apple cider vinegar on candida species involved in denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2015;24(4):296-302.
126. Lessa FC, Enoki C, Ito IY, Faria G, Matsumoto MA, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131(6):705.e11-7.
127. Aoun G, Saadeh M, Berberi A. Effectiveness of hexetidine 0.1% compared to chlorhexidine digluconate 0.12% in eliminating candida albicans colonizing dentures: a randomized clinical in vivo study. *J Int Oral Health.* 2015;7(8):5-8.
128. Patel A, Sethuraman R, Prajapati P, Patel J, Naveen YG. A comparative analysis of staining characteristics of mouthrinses on provisional acrylic resin: An in vitro study. *J Interdiscip Dentistry* 2013;3:167-73.
129. Raab FJ, Taylor CA, Bucher JA, Mann BL. Scanning electron microscopic examination of ultrasonic and effervescent methods of surface contaminant removal from complete dentures. *J Prosthet Dent.* 1991;65(2):255-8.
130. Nishi Y, Seto K, Kamashita Y, Kaji A, Kurono A, Nagaoka E. Survival of microorganisms on complete dentures following ultrasonic cleaning combined with immersion in peroxide-based cleanser solution. *Gerodontology.* 2014;31(3):202-9.
131. Von Wallis K. Reinigungsleistung von Geschirrspülmaschinen bei PMMA-Prüfkörpern 2015. Dissertation, Charité - Universitätsmedizin Berlin.
132. Levrini L, Novara F, Margherini S, Tenconi C, Raspanti M. Scanning electron microscopy analysis of the growth of dental plaque on the surfaces of removable orthodontic aligners after the use of different cleaning methods. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2015;7:125-31.
133. Farhadifard H, Soheilifar S, Bakhshaei A. Plaque removal efficacy of three cleaning methods for removable orthodontic appliances: a crossover randomized clinical trial. *Turk J Orthod.* 2021;34(3):170-5.
134. Albanna RH, Farawanah HM, Aldrees AM. Microbial evaluation of the effectiveness of different methods for cleansing clear orthodontic retainers: a randomized clinical trial. *Angle Orthod.* 2017;87(3):460-5.
135. Sheen SR, Harrison A. Assessment of plaque prevention on dentures using an experimental cleanser. *J Prosthet Dent.* 2000;84(6):594-601.
136. Cruz PC, Andrade IM, Peracini A, Souza-Gugelmin MC, Silva-Lovato CH, de Souza RF, Paranhos Hde F. The effectiveness of chemical denture cleansers and ultrasonic device in biofilm removal from complete dentures. *J Appl Oral Sci.* 2011;19(6):668-73.
137. Silva-Lovato CH, Wever Bd, Adriaens E, Paranhos Hde F, Watanabe E, Pisani MX, Souza RF, Ito IY. Clinical and antimicrobial efficacy of NitrAdine™-based disinfecting cleaning tablets in complete denture wearers. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(6):560-5.
138. Jose A, Coco BJ, Milligan S, Young B, Lappin DF, Bagg J, Murray C, Ramage G. Reducing the incidence of denture stomatitis: are denture cleansers sufficient? *J Prosthodont.* 2010;19(4):252-7.

-
139. Coimbra FCT, Rocha MM, Oliveira VC, Macedo AP, Pagnano VO, Silva-Lovato CH, Paranhos HFO. Antimicrobial activity of effervescent denture tablets on multispecies biofilms. *Gerodontology*. 2021;38(1):87-94.
140. Lopes Vasconcelos GL, Curylofo PA, Targa Coimbra FC, de Cássia Oliveira V, Macedo AP, de Freitas Oliveira Paranhos H, Pagnano VO. In vitro antimicrobial activity of effervescent denture tablets on the components of removable partial dentures. *Int J Prosthodont*. 2020;33(3):315-20.
141. Harrison Z, Johnson A, Douglas CW. An in vitro study into the effect of a limited range of denture cleaners on surface roughness and removal of candida albicans from conventional heat-cured acrylic resin denture base material. *J Oral Rehabil*. 2004;31(5):460-7.
142. Han Y, Liu X, Cai Y. Effects of two peroxide enzymatic denture cleaners on candida albicans biofilms and denture surface. *BMC Oral Health*. 2020;20(1):193.
143. Hayran Y, Sarikaya I, Aydin A, Tekin YH. Determination of the effective anticandidal concentration of denture cleanser tablets on some denture base resins. *J Appl Oral Sci*. 2018;26:e20170077.
144. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011;20(4):251-60.
145. Lucena-Ferreira SC, Cavalcanti IM, Cury AA. Efficacy of denture cleansers in reducing microbial counts from removable partial dentures: a short-term clinical evaluation. *Braz Dent J*. 2013;24(4):353-6.
146. de Souza RF, de Freitas Oliveira Paranhos H, Lovato da Silva CH, Abu-Naba'a L, Fedorowicz Z, Gurgan CA. Interventions for cleaning dentures in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009;(4):CD007395.
147. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H. A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont*. 1999;12(2):153-9.
148. Arndt-Fink A, Jost-Brinkmann PG. Investigation of the cleaning performance of commercial orthodontic cleaning tablets regarding biofilm removal on PMMA test specimens: an ex vivo study. *J Orofac Orthop*. Epub 2023 Jun 2 [zitiert am 30.7.2023]. Doi: 10.1007/s00056-023-00474-2.
149. Frister H, Meisel H, Schlimme E. Einsatzmöglichkeiten der modifizierten OPA-Methode in der Proteinanalytik. *Ernahr Umsch*. 1990;37:442-5.
150. Michels W, Frister H. Detektionsmethoden der prEN ISO 15883 für die Reinigungsprüfung in der Praxis—Teil 4. *Aseptica*. 2006;12:12-3.
151. Michels W, Frister H. Die modifizierte OPA-Methode mit alternativer Thiolkomponente. *Zentr Steril* 2004;12:115-8.
152. Wehrl M, Kircheis U. Methode zur Überprüfung der Reinigungsleistung von Reinigungs-Desinfektionsgeräten für flexible Endoskope. *Hyg Med* 2011;36:402-6.
153. Coenye T, De Prijck K, De Wever B, Nelis HJ. Use of the modified Robbins device to study the in vitro biofilm removal efficacy of NitrAdine, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medical devices. *J Appl Microbiol*. 2008;105(3):733-40.

-
154. Marrie TJ, Costerton JW. Prolonged survival of *Serratia marcescens* in chlorhexidine. *Appl Environ Microbiol.* 1981;42(6):1093-102.
155. Yang SY, Choi JW, Kim KM, Kwon JS. Evaluation of the time-dependent efficacy of commercial denture or orthodontic appliance cleansers: an in vitro study. *Dent Mater J.* 2022;41(2):214-25.
156. Iwawaki Y, Matsuda T, Kurahashi K, Honda T, Goto T, Ichikawa T. Effect of water temperature during ultrasonic denture cleaning. *J Oral Sci.* 2019;61(1):140-45.
157. Odman PA. The effectiveness of an enzyme-containing denture cleanser. *Quintessence Int.* 1992;23(3):187-90.
158. Budtz-Jørgensen E, Kelstrup J, Poulsen S. Reduction of formation of denture plaque by a protease (Alcalase). *Acta Odontol Scand.* 1983;41(2):93-8.
159. Budtz-Jørgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. *J Prosthet Dent.* 1979;42(6):619-23.
160. Onwubu SC, Mdluli PS. Comparative analysis of abrasive materials and polishing system on the surface roughness of heat-polymerized acrylic resins. *Eur J Dent.* 2022;16(3):573-9.
161. Frister H, Meisel H, Schlimme E. Modifizierte OPA-Methode zur Charakterisierung von Proteolyse-Produkten. *Milchwissenschaft.* 1986;41:483-7.
162. Sterzenbach T, Helbig R, Hannig C, Hannig M. Bioadhesion in the oral cavity and approaches for biofilm management by surface modifications. *Clin Oral Investig.* 2020;24(12):4237-60.
163. Acosta LD, Pérez-Camacho O, Acosta R, Escobar DM, Gallardo CA, Sánchez-Vargas LO. Reduction of *Candida albicans* biofilm formation by coating polymethyl methacrylate denture bases with a photopolymerized film. *J Prosthet Dent.* 2020;124(5):605-13.
164. Zhang Y, Chen YY, Huang L, Chai ZG, Shen LJ, Xiao YH. The antifungal effects and mechanical properties of silver bromide/cationic polymer nano-composite-modified Poly-methyl methacrylate-based dental resin. *Sci Rep.* 2017;7(1):1547.

8 Materialliste

8.1 Materialien/Geräte zur Herstellung der Prüfobjekte

Materialbezeichnung	Orthocryl® Flüssigkeit (Monomer), rosa-transparent
Größe	500 ml
Hersteller	Dentaurum, Ispringen, Deutschland
Chargennummer	505919 A
Referenznummer	161-300-00

Materialbezeichnung	Orthocryl® Pulver (Polymer), klar
Größe	1000 g
Hersteller	Dentaurum, Ispringen, Deutschland
Chargennummer	505124 C
Referenznummer	160-112-00

Materialbezeichnung	Orthocryl® LC lichthärtender Spezialkunststoff
Größe	30 g
Hersteller	Dentaurum, Ispringen, Deutschland
Chargennummer	503811
Referenznummer	160-401-00

Materialbezeichnung	Orthocryl® LC Kartuschenspritzen
Größe	50 Stück
Hersteller	Dentaurum, Ispringen, Deutschland
Chargennummer	506477
Referenznummer	160-421-00

Materialbezeichnung	3D Isoliermittel/3D Separating medium
Größe	100 ml
Hersteller	Dentaurum, Ispringen, Deutschland
Chargennummer	502585 A
Referenznummer	162-801-00

Materialbezeichnung	DURAN®-Folie
Größe	1,0x125 mm
Hersteller	Scheu-Dental GmbH, Iserlohn, Deutschland
Chargennummer	0116A
Referenznummer	3415.2
Materialbezeichnung	Silikon Provil® novo, Putty soft regular set
Größe	450 ml Base, 450 ml Katalysator
Hersteller	Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland
Chargennummer	66037403/00
Referenznummer	K010152
Gerätebezeichnung	Biostar® VI Universal-Druckform-Gerät
Hersteller	Scheu-Dental GmbH, Iserlohn, Deutschland
Seriennummer	60308
Referenznummer	3000.1
Gerätebezeichnung	Polyclav® Drucktopf
Hersteller	Dentaurum, Ispringen, Deutschland
Seriennummer	5778
Referenznummer	070-000-00
Gerätebezeichnung	3-D Drucker UltiMaker 3 Extended
Hersteller	UltiMaker B.V., Utrecht, Niederlande
Seriennummer	BPP-003479-025123
Referenznummer	E114168
Materialbezeichnung	PLA-Filament Weiß Milky
Hersteller	Bernhardt Kunststoffverarbeitung GmbH, Velten, Deutschland
Chargennummer	71.004248 Produkt ID 4251169201852

8.2 Materialien/Geräte zur labortechnischen Analyse

Materialbezeichnung	Phthaldialdehyde, ≥ 97 % (HPLC), powder
Größe	25 g
Hersteller	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Chargennummer	BCBW3354
Referenznummer	P1378-25G
Materialbezeichnung	2-(Dimethylamino)ethanethiol hydrochloride – 95 %
Größe	25 g
Hersteller	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Chargennummer	BCBZ4943
Referenznummer	D141003-25G
Materialbezeichnung	Dodecylsulfate·Na-salt, cryst. research grade, Sodiumdodecylsulfat (SDS)
Größe	250 g
Hersteller	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Chargennummer	090031
Referenznummer	20760.03
Materialbezeichnung	di-Natriumtetraborat, wasserfrei zur Analyse
Größe	250 g
Hersteller	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chargennummer	A965906 928
Referenznummer	1.06306.0250
Materialbezeichnung	Methanol, gradient grade für die Flüssigkeitschromatographie
Größe	2,5 l
Hersteller	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chargennummer	K33553307430
Referenznummer	1060072500
Materialbezeichnung	L-Leucin, für biochemische Zwecke
Größe	25 g
Hersteller	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chargennummer	K23005460 624
Referenznummer	1.05360.0025

Materialbezeichnung	Albumin Fraktion V, proteasefrei>98 %, proteasefrei, für die Molekularbiologie
Größe	50 g
Hersteller	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Chargennummer	286246809
Referenznummer	T844.2
Gerätebezeichnung	Precisa Präzisionswaage
Modell	ES 320A
Seriennummer	4600352
Hersteller	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz
Gerätebezeichnung	Magnetrührer
Modell	MR 2002
Seriennummer	89171669
Hersteller	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Gerätebezeichnung	Halbmikro-Küvette 104-QS, 10 mm, mit Falzdeckel
Modell	104-QS
Schichtdicke	10 mm
Artikelnummer	195513106
Hersteller	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland

8.3 Chemische Reinigungstabletten

Materialbezeichnung	Retainer Brite® Reinigungstabletten
Einwirkzeit	15 Minuten
Hersteller	Ortho Technology®, Dentsply Sirona
Chargennummer	0301107
Materialbezeichnung	Dontodent Reinigungstabletten
Einwirkzeit	10 Minuten
Hersteller	Propack GmbH, Heidelberg, Deutschland
Chargennummer	S0351309, Produkt ID 0008242
Materialbezeichnung	Kukis® Xpress Reinigungstabletten
Einwirkzeit	3 Minuten

Hersteller	Reckitt Benckiser, Heidelberg, Deutschland
Chargennummer	S1004319, Produkt ID 0008242

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alice Arndt-Fink, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Ex-vivo-Studie zur Reinigungseffizienz kommerzieller Zahnschwammreiniger bei der Biofilmentfernung von PMMA-Prüfkörpern / Ex vivo study of the cleaning performance of commercial orthodontic cleaning tablets on PMMA test specimens* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Alice Arndt-Fink hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Arndt-Fink A, Jost-Brinkmann P-G.

Investigation of the cleaning performance of commercial orthodontic cleaning tablets regarding biofilm removal on PMMA test specimens

Journal of Orofacial Orthopedics/Fortschritte der Kieferorthopädie. 2023

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00056-023-00474-2>

Beitrag im Einzelnen:

Die Konzeption der Studie erfolgte durch die Autoren Alice Arndt-Fink und Prof. Dr. Paul-Georg Jost-Brinkmann.

Für die Herstellung aller Prüfobjekte und die Durchführung der klinischen Untersuchungen war die Erstautorin Alice Arndt-Fink verantwortlich. Sämtliche daraus folgenden Daten, die dieser Publikation zugrunde liegen, wurden durch die Erstautorin generiert und ausgewertet. Das Manuskript der Publikation sowie alle Fotos, Abbildungen und Tabellen wurden, in Abstimmung mit Herrn Prof. Dr. Paul-Georg Jost-Brinkmann, von Alice Arndt-Fink erstellt. Optimierungsvorschläge am Manuskript nach Peer Review wurden durch Alice Arndt-Fink umgesetzt.

Herr Prof. Dr. Paul-Georg Jost-Brinkmann war während des gesamten Zeitraums beratend und unterstützend tätig. An der finalen Version des Manuskripts hat Prof. Dr. Jost-Brinkmann durch Ergänzungen und Korrekturen mitgewirkt.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin



Investigation of the cleaning performance of commercial orthodontic cleaning tablets regarding biofilm removal on PMMA test specimens

An ex vivo study

A. Arndt-Fink¹ · P.-G. Jost-Brinkmann¹

Received: 24 December 2022 / Accepted: 18 April 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Purpose The purpose of this ex vivo study was to compare the cleaning performance of three commercially available orthodontic cleaners on polymethyl methacrylate (PMMA) test specimens covered with biofilm.

Methods Twenty subjects wore an individually manufactured vacuum-formed maxillary splint with four integrated PMMA test specimens for 7 days. The four test specimens were located on the buccal surfaces of the maxillary molars. After a 7-day wearing period, the PMMA test specimens colonized by biofilm were divided into two halves. One half was placed in 150ml of tap water or in 150ml of cleaning solution of the cleaners Retainer Brite® (Dentsply International Raintree Essix, Sarasota, FL, USA), Kukis® Xpress (Reckitt Benckiser, Heidelberg, Germany) or Dontodent (Propack, Heidelberg, Germany) while the other half remained uncleaned. The modified o-phthalaldehyde (OPA) method was used to determine the amount of protein on both halves of the test specimens. The difference was tested for significance as a measure of the cleaning effect using a paired sample t-test.

Results The cleaning performance of the three orthodontic cleaners was higher than the cleaning performance of tap water (mean 25.9 ± 6.5%). While Retainer Brite® (mean 54.5 ± 7.1%) removed significantly more biofilm than Dontodent (mean 41.5 ± 9.2%, $p < 0.001$) and Kukis® Xpress (mean 39.9 ± 11.5%, $p < 0.001$), there was no significant difference in the cleaning performance between Kukis® Xpress and Dontodent ($p = 1$).

Conclusion Seven-day-old biofilm is only removed partially by the investigated orthodontic cleaners, so that they are not suitable as the only measure for removing established biofilms.

Keywords Polymethyl methacrylate · Removable orthodontic appliances · Removal of biofilms · Denture hygiene · o-phthalaldehyde (OPA) method

Untersuchung der Reinigungswirkung handelsüblicher kieferorthopädischer Reinigungstabletten im Hinblick auf die Entfernung von Biofilm auf PMMA-Probekörpern

Eine Ex-vivo-Studie

Zusammenfassung

Ziel Ziel dieser Ex-vivo-Studie war ein Vergleich der Reinigungswirkung von drei kommerziell angebotenen Zahnsparngereinigern auf Biofilm-behaftetem PMMA (Polymethylmethacrylat)-Kunststoff.

Clinical Trial Registration This study was registered in the German Clinical Trials Register (DRKS00024882) in April 2021.

✉ A. Arndt-Fink
alice.arndt93@gmail.com

¹ CharitéCenter 3 for Oral Health Sciences (CC 3), Department of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Charité—Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Abmannshäuser Str. 4–6, 14197 Berlin, Germany

Material und Methode 20 Proband*innen trugen 7 Tage lang eine Schiene mit 4 integrierten PMMA-Prüfkörpern bukkal im Bereich der oberen Molaren. Nach 7 Tagen Tragezeit wurden die von Biofilm besiedelten PMMA-Prüfkörper halbiert. Eine Hälfte wurde in 150 ml Leitungswasser oder in 150 ml Reinigungslösung der Reiniger Retainer Brite® (Dentsply International Raintree Essix, Sarasota, FL, USA), Kukis® Xpress (Reckitt Benckiser, Heidelberg, Germany) oder Dontodent (Propack, Heidelberg, Germany) gelegt, während die andere Hälfte ungereinigt blieb. Mit der modifizierten OPA(o-Phthalaldehyd)-Methode wurde die Proteinmenge auf beiden Prüfkörperhälften bestimmt. Die Differenz wurde als Maß der Reinigungswirkung mittels t-Test für verbundene Stichproben verglichen.

Ergebnisse Die Reinigungsleistung der drei Spangereiniger war höher als die Reinigungsleistung von Leitungswasser (Mittelwert $25,9 \pm 6,5\%$). Während Retainer Brite® (Mittelwert $54,5 \pm 7,1\%$) signifikant mehr Biofilm entfernte als die beiden Reiniger Dontodent (Mittelwert $41,5 \pm 9,2\%$, $p < 0,001$) und Kukis® Xpress (Mittelwert $39,9 \pm 11,5\%$, $p < 0,001$) bestand kein signifikanter Unterschied in der Reinigungsleistung zwischen Kukis® Xpress und Dontodent ($p = 1$).

Schlussfolgerung Sieben Tage alter Biofilm wird von den untersuchten Zahnsparrenreiniger nur unzureichend entfernt, sodass diese als alleiniges Mittel zum Entfernen etablierter Biofilme nicht ausreichen.

Schlüsselwörter Polymethylmethacrylat · Herausnehmbare kieferorthopädische Apparaturen · Biofilmentfernung · Prothesenhygiene · OPA(o-Phthalaldehyd)-Methode

Introduction

Removable orthodontic appliances (ROAs) are used for active treatment and retention. ROAs consist of wire elements and mostly of polymethyl methacrylate (PMMA) [14, 19]. Within minutes of inserting an appliance into the oral cavity, the surfaces of the appliance become colonised with bacteria [33]. They associate together to form biofilms, a complex matrix-like structure and harbour pathogens such as bacteria, viruses, fungi and protozoa [23]. Bacteria of the oral flora are the cause of local diseases such as periodontitis, peri-implantitis and dental caries [5, 17, 29]. The risk of caries can increase during the use of ROAs as they can promote for the colonisation of *Streptococcus mutans* [6, 38] and lactobacilli [40, 42] in the oral cavity. Furthermore, oral bacteria can be the cause of systemic diseases and are associated with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease [11, 26, 37, 39]. Consequently, removing biofilm from these appliances and removable partial dentures is of great importance.

Common cleaning methods include manual cleaning with a toothbrush, often in combination with toothpaste or dishwashing liquid, as well as chemical cleaning with cleaning tablets and immersion in disinfectant solutions or acetic acid [12].

According to Diedrich [10] especially in hard-to-reach areas such as around wire elements embedded in acrylic and screws, mechanical cleaning is insufficient, while cleaning tablets lead to better cleaning.

Based on their active ingredients, chemical denture cleaners can be classified into alkaline peroxides, alkaline hypochlorites, acids, disinfecting agents and enzymes [7, 32]. Alkaline peroxides are often available in form of tablets. They produce an effervescent alkaline solution that generates hydrogen peroxide and active oxygen when

added to water. This process leads to disinfection and oxidation of coloured deposits. In the presence of acids, sodium bicarbonate reacts forming carbon dioxide and creating a foam. Furthermore, the rising gas bubbles create a mechanical component. Substances such as surfactants serve as an additional cleaning component, and the addition of potassium monopersulfate has bactericidal, fungicidal and virucidal effects [7, 34]. Other ingredients include fillers as well as colouring and flavouring agents, which are intended to give the consumer a feeling of freshness.

The use of cleaning tablets in addition to mechanical cleaning is recommended to their patients by 70% of Greek [41] and 72% of Turkish orthodontists [2], while 37% of German orthodontists recommend cleaning with chemical adjuvants only [13]. In previous studies on the performance of orthodontic cleaners, cleaning efficiency was investigated on soft plaque which accumulated within a few hours or days [3, 9, 16, 30]. Yet, it has remained unclear whether orthodontic cleaners are effective on a 7-day-old established biofilm and its associated structural changes. The aim of the present study was to clarify this question.

Materials and methods

Sample size calculation

Sample size calculation was done with the procedure MOE1-1 of nQuery 8.6.1.0 prior to recruitment based on an earlier pilot study [16]. As three cleaners were tested, the multiple one-sided significance level was adjusted from $\alpha = 0.025$ to $\alpha = 0.0071$. It was further assumed that the cleaning performance of all three products is at least 80% and that the dispersion of the cleaning performance amounts to $\sigma = 6.1\%$. The one-sided one-sample

t-test against $\mu_0 = 75\%$ has a power of at least 80% with a sample size of $n = 20$.

Study cohort

All participants of this study were informed in advance about the purpose of the study and possible risks in both verbal and written form. They gave their written consent to participate in the study. A total of 20 healthy, adult participants (11 women and 9 men, mean 34.5 years, range 19–61 years) were recruited.

All participants included in this study agreed to wear a test device in the form of a vacuum-formed splint for 7 days. The splint was also worn while eating and was only allowed to be removed for toothbrushing with a non-fluoride toothpaste. The splint was not allowed to be cleaned; only food remnants were allowed to be removed carefully without touching the surfaces of the PMMA test specimens. The participants consented to not using fluoride-containing preparations or antibacterial mouth rinses containing chlorhexidine or essential oils during the 7-day study period. Exclusion criteria for participation were severe general diseases, active caries or periodontitis, the absence of first or second molars in the upper jaw or allergies to PMMA/MMA. The use of oral antibiotics during the wearing period or within the last 3 months also led to exclusion from the study.

Test device

The test device contained four identical PMMA test specimens in an individual manufactured vacuum-formed splint for the upper jaw. For this purpose, an alginate impression was taken of the upper jaw and models were made of hard dental stone. A 1 mm, hard-elastic and transparent splint (DURAN®, Scheu-Dental, Iserlohn, Germany) was pressure-moulded over the plaster models of the study participants. The PMMA test specimens were produced separately. For this purpose, the holders for the test specimens were printed using a standardised three-dimensional (3D) printing process from polylactic acid (PLA; 7 mm, 5 mm, 1.5 mm). The inner surface of each PLA holder was designed to be conical (7°) and thus prevented the test specimen halves from falling out of the holder. The PLA ring was split in the middle by a thin partition wall, creating two identically dimensioned test specimen halves. The PLA holders were coated with a separating agent (3D Isoliermittel, Dentauro, Germany) and then filled with PMMA (Orthocryl®, Dentauro, Ispringen, Germany). To achieve an even surface, the test specimens were placed between two glass plates, loaded by a constant weight (500 g) and then polymerised in a pressure pot at 2.2 bar and 40°C. The test specimens were then placed symmetrically on the

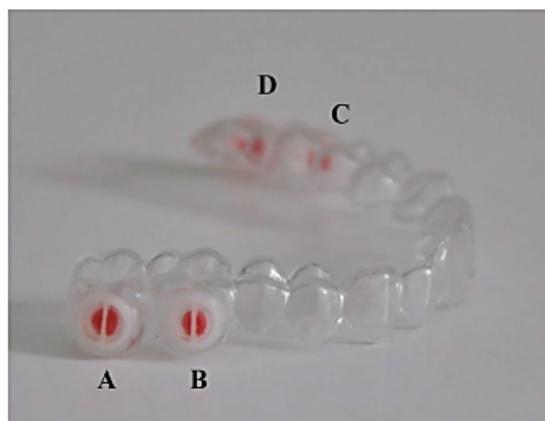


Fig. 1 Vacuum-formed maxillary splint with four integrated test specimens located on the buccal surface of the molars. The access to the test specimens was covered with wax for better visualisation and replaced with silicone for the trials. The location of the test specimens was numbered with the letters A–D. The allocation of the cleaners to the test specimens rotated according to a predefined protocol

Abb. 1 Tiefziehschiene für den Oberkiefer mit 4 Prüfkörpern lokalisiert an den bukkalen Flächen der Molaren. Der Zugang zu den Prüfkörpern wurde zur besseren Visualisierung mit Wachs abgedeckt und für die Probandenversuche durch Silikon ersetzt. Die Lokalisation der Prüfkörper wurde mit den Buchstaben A–D nummeriert. Die Zuordnung der Reiniger zum Prüfkörper rotierte nach einem vorher festgelegten Protokoll

buccal surfaces of the maxillary molars and firmly bonded to the splint using Orthocryl LC® (Dentauro, Ispringen, Germany; Fig. 1). To achieve a stable bond, the surrounding areas of the splint were first roughened with sandpaper and covered with monomer. Four holes, previously drilled in the middle of the molar range (diameter 3 mm) served as an access to the two halves of the test specimens. During the wearing period, the holes in the DURAN® splint were covered with silicone so that only the buccal surfaces of the test specimens were colonised by biofilm. The device was finished like a retention splint and then inserted. At the end of the 7-day wearing period, the contaminated splints were collected and were promptly examined using the modified o-phthaldialdehyde (OPA) method.

Cleaning of the test specimens

Four test specimen halves of every participant were each placed in tap water (control medium) and respectively in the cleaning solution of the following three cleaning tablets: Retainer Brite® (Dentsply International Raintree Essix, Sarasota, FL, USA), Kukis® Xpress (Reckitt Benckiser, Heidelberg, Germany) and Dontodent (Propack, Heidelberg, Germany). The cleaning tablets were each added to a glass filled with 150 ml water at a temperature of $40 \pm 2^\circ\text{C}$. The PMMA test specimen halves to be cleaned

were simultaneously placed in the bubbling cleaning solution. The immersion time of the PMMA test specimens in the cleaning solution was, according to the manufacturers' time instructions, 3 min for Kukis® Xpress, 10 min for Dontodent and 15 min for Retainer Brite® and tap water. The uncleaned half of each test specimen was used to determine the amount of protein before cleaning. After completing the cleaning time, the cleaned test specimen halves were transferred to a sample tube filled with 500 µl of 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) solution and shaken for 30 min in an ultrasonic bath at 30 °C. The protein solution was transferred to a cuvette and the extinction was measured photometrically. Afterwards, 500 µl of OPA reagent were added to the solution. The OPA reagent was prepared daily and had to be replaced by a newly prepared solution as soon as the absorbance was not in the range of $E=0.641 \pm 0.032$, measured against a leucin standard solution. For this purpose, 0.04 g o-phthaldialdehyde and 1 ml methanol were stirred in an Erlenmeyer flask with the aid of a magnetic stirrer. To the homogeneous solution 0.116 g 2-mercaptothanesulfonic acid was added (solution A). In another Erlenmeyer flask, 50 ml aqua dem. and 1.005 g disodium tetraborate were stirred with the aid of

a magnetic stirrer (solution B). This was followed by the transfer of solution A into solution B and the addition of 1.25 ml of 20% SDS solution.

Protein quantification using the modified OPA method

Protein quantification as an indicator of contamination was determined for the cleaned and the uncleaned test specimen halves using the modified OPA method.

Free α - and ϵ -terminal amino groups in amino acids, peptides and proteins react in the presence of a thiol component to form a fluorescent end product (1-alkylthio-2-alkylisoindoles). This product is spectrophotometrically detectable at 340 nm and quantifiable by measuring the extinction [21].

To quantify the amount of protein on the test specimens, calibration with bovine serum albumin (BSA, fraction V, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA) of known concentration was carried out previously. Several dilution standards were made from a prepared BSA solution (concentration 1000 µg/ml) and measured photometrically. A regression line, $y = mx + b$, was created using the measured absorbance values from a total of six measurement series. The quantifi-

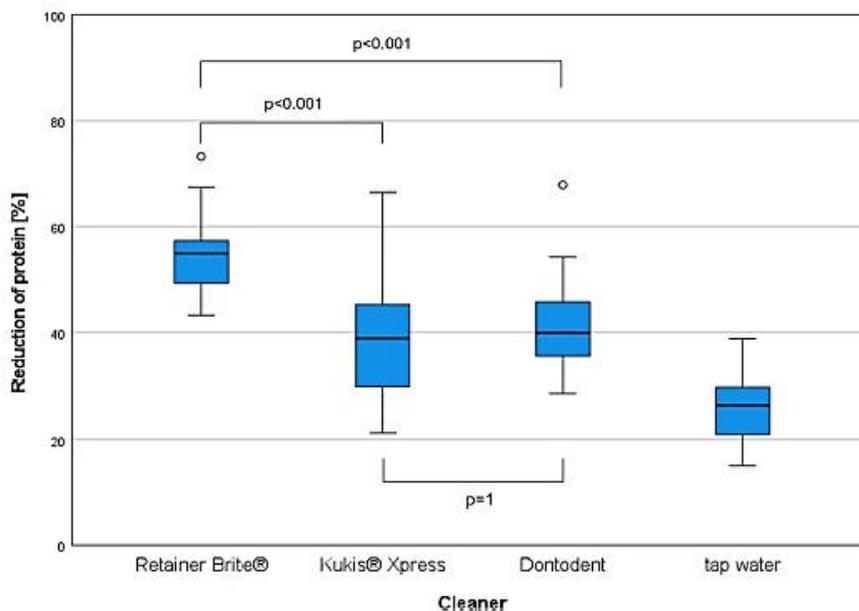


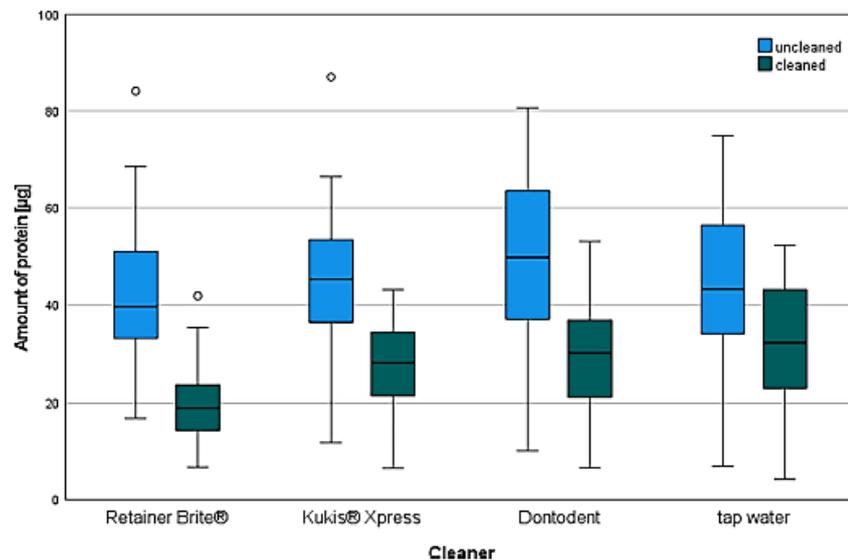
Fig. 2 Boxplot diagram showing the reduction of protein in % on the surface of the polymethyl methacrylate (PMMA) test specimens after cleaning compared to the uncleaned control group. Mean values \pm standard deviation: Retainer Brite® 54.5 \pm 7.1%, Kukis® Xpress 39.9 \pm 11.5%, Dontodent 41.5 \pm 9.2% and tap water 25.9 \pm 6.5%. Median values: Retainer Brite® 54.9%, Kukis® Xpress 38.8%, Dontodent 39.9% and tap water 26.5%

Abb. 2 Boxplot-Diagramm, das die Proteinreduktion in % auf der Oberfläche der PMMA (Polymethylmethacrylat)-Prüfkörper nach Reinigung im Vergleich zur ungereinigten Kontrollgruppe darstellt. Mittelwerte \pm Standardabweichung: Retainer Brite® 54,5 \pm 7,1%, Kukis® Xpress 39,9 \pm 11,5%, Dontodent 41,5 \pm 9,2% und Leitungswasser 25,9 \pm 6,5%. Medianwerte: Retainer Brite® 54,9%, Kukis® Xpress 38,8%, Dontodent 39,9% und Leitungswasser 26,5%

Investigation of the cleaning performance of commercial orthodontic cleaning tablets regarding biofilm removal on PMMA test..

Fig. 3 Boxplots illustrating the distribution of the amount of protein in the different cleaning groups before and after cleaning. values $1.5 \times IQR$ (interquartile range) above the third quartile. circles Outliers

Abb. 3 Boxplots zur Darstellung der Verteilung der Proteinmengen in den verschiedenen Reinigergruppen vor und nach Reinigung. Werte $1,5 \times IQR$ (Interquartilsabstand) über dem dritten Quartil. Kreise Ausreißer



cation of the initially unknown concentrations of the protein samples was carried out using this regression line. The amount of protein detectable after cleaning compared to the detectable amount of protein of the uncleaned control group served as an indicator for the cleaning performance.

Statistical analysis

Statistical Package for Social Sciences (SPSS version 27.0; IBM, Armonk, NY, USA) was used for all statistical analyses and graphical presentations. For the comparison of the cleaning performance of the three cleaners, a paired sample t-test was used, with a p -value of ≤ 0.05 defined as significant. All p -values were adjusted by a factor of 3 after Bonferroni.

Results

The protein reduction of the three orthodontic cleaners and the control medium water is shown in a boxplot diagram (Fig. 2). The cleaning performance of the orthodontic cleaner Retainer Brite® (mean $54.5 \pm 7.1\%$) was significantly higher than that of Kukis® Xpress (mean $39.9 \pm 11.5\%$, $p < 0.001$) and Dontodent (mean $41.5 \pm 9.2\%$, $p < 0.001$). There was no statistical difference in cleaning performance between the cleaners Kukis® Xpress and Dontodent ($p = 1$). The cleaning performance of the control medium water was 25.9% (Table 1).

The amount of protein of all uncleaned test specimens ranged from 6.9 to 87.0 µg; the protein amount of the cleaned test specimens ranged from 4.3 to 53.0 µg protein. The distribution of the protein amounts of all uncleaned

Table 1 Descriptive statistics regarding cleaning efficacy and p -values

Tab. 1 Deskriptive Statistik der Reinigungsleistung und p -Werte

	Retainer Brite®	Kukis® Xpress	Dontodent	Tap water
N^a	19	19	20	20
Mean \pm SD	54.5 ± 7.1	39.9 ± 11.5	41.5 ± 9.2	25.9 ± 6.5
95% CI for mean	51.1; 57.9	34.3; 45.4	37.1; 45.8	22.8; 28.9
Minimum	43.2	21.3	28.7	15.1
Maximum	73.2	66.4	67.8	38.8
Median	54.9	38.8	39.9	26.5
Bonferroni p and (unadjusted p)	Retainer Brite®–Kukis® Xpress Retainer Brite®–Dontodent Kukis® Xpress–Dontodent		$p < 0.001^*$ $p < 0.001^*$ $p = 1^b$	($p < 0.001$) ($p < 0.001$) ($p = 0.408$)

95% CI 95% confidence interval, SD standard deviation

^aNumber of test specimens examined/investigated

^b p -value adjusted by factor 3 according to Bonferroni, the result was a value of $p > 1$, which was then set to $p = 1$

^{*} $p < 0.05$ indicates statistical significance

and cleaned test specimens in relation to the cleaner used is shown in a boxplot diagram (Fig. 3). The median values of the protein amounts on the uncleaned test specimen halves ranged from 39.6 µg (Retainer Brite®) to 49.7 µg (Dontodent). The median values of the protein amounts on the cleaned test specimen halves ranged from 19.0 µg (Retainer Brite®) to 32.1 µg (tap water). The amount of protein on the uncleaned test specimen halves was higher than the protein amounts after cleaning using an orthodontic cleaning tablet or tap water. Tap water left the highest amounts of protein; Retainer Brite® left the lowest amount of protein.

Discussion

Quantitative detection methods for proteins are, in addition to the OPA method, the BCA (bicinchoninic acid assay) method, the Bradford reagent and the Lowry method [25]. Furthermore, there are semiquantitative methods, such as the biuret reaction, and qualitative methods, such as the ninhydrin reaction [20]. The modified OPA method is a suitable method for the quantitative detection of proteins. It has a high sensitivity, with a detectability down to the picomole range [22], which enabled the use of small test samples in this study. However, very low absorbance values led to a limitation of the method in the present study. At values below 2 µg/ml BSA, the detection limit of the photometer (Shimadzu™ UV mini-1 240, Kyoto, Japan) was approached, thus, especially the quantification of small protein amounts became increasingly inaccurate. This problem can be solved by generating higher extinction values that lie in the noncritical measurement range. For example, larger test specimen surfaces with resulting higher accumulation of biofilm could have been used. It is also possible to adjust the ratio of protein solution to OPA solution. However, the absorbance values of the samples in this study were not in the critical measurement range with concentrations above 8.7 µg/ml, so an adjustment was not necessary.

The OPA method was proven to be suitable in this study, and it can be concluded that quantitative protein measurement methods are appropriate for investigating the cleaning performance of orthodontic cleaners. Thus, protein measurement methods can be an alternative to common techniques such as analysis by scanning electron microscopy [3, 30].

The use of the test device, a thin vacuum-formed maxillary splint, that served as a holder for the test specimens was satisfactory. From previous investigations, it was found that the amount of protein on two closely spaced areas, in this case two halves of the test specimens, is almost identical. The assignment of the cleaners to the test specimens was rotated in order to compensate locally existing individual differences in the accumulation of biofilm between the par-

ticipants. During the 7-day wearing period, out of a total of 80 test specimens, only 2 were lost prematurely. For future studies, it is possible that the test device, consisting of the splint together with the holders, is 3D printed in a single piece.

Fixed orthodontic appliances facilitate plaque accumulation and complicate adequate daily plaque removal by toothbrushing [36]. During treatment with multibracket appliances especially patients with poor oral hygiene show a high prevalence of *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* and lactobacilli [28]. From a caries-risk point of view ROAs are considered an alternative to fixed appliances as they can be removed by the patient and oral hygiene can be carried out more easily. The clinical consequences, including plaque and inflammation of the gingiva, are lower and there is a lower risk of the development of caries compared to treatment with fixed appliances [1, 31]. However, shortly after being inserted into the oral cavity, ROAs are colonised by biofilm harbouring pathogens [33]. ROAs colonised by biofilm, in turn, increase the risk of caries and gingivitis [4, 6, 35]. Consequently, it is important that any orthodontic appliance that is inserted into the oral cavity is clean and as free as possible of bacteria. The aim of the present *ex vivo* study was the recommendation of an optimal product that would eliminate an established biofilm and help to reduce the development of caries and the rates of gingivitis in patients with removable orthodontic appliances. However, the question which product sufficiently removes biofilm and how much biofilm a product may leave on an appliance and still may be considered an acceptable cleaning product remains open. The point at which cleaning can be described as sufficient has not yet been standardised internationally and there are no binding standards for the cleaning performance of chemical denture cleaners.

The literature shows that the cleaning performance of orthodontic cleaning tablets has already been the subject of previous studies [3, 9, 16, 30]. Other methods for cleaning orthodontic appliances, such as manual cleaning with a toothbrush or cleaning with antiseptic mouth rinses, have often been compared alongside chemical cleaning tablets. A study published in 2015 investigated the cleaning efficacy of three different cleaning methods on thermoplastic aligners. The combination of chemical cleaning tablets followed by manual cleaning was superior to both manual cleaning with toothpaste and manual cleaning without toothpaste [30]. Similar results were obtained in a recent study published in 2021, in which the combination of manual cleaning with chemical cleaning tablets led to the highest biofilm reduction [15].

Coimbra et al. [9] investigated the impact of peroxide-based solutions on multispecies biofilm formed by *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The biofilm was formed *in vitro* on acrylic resin

specimens within 24h. Cleaning tablets had an antimicrobial effect but did not promote widespread removal of the aggregated biofilm. The cleaning performance of chemical cleaning tablets, without the additional use of a mechanical component, was investigated in a pilot study by Fathi et al. [16]. They tested the cleaning performance of cleaning tablets on soft plaque that had accumulated in vivo over 4 days. The investigated orthodontic cleaners led to a protein reduction between 79.9% (Kukis®) and 86.8% (fittydent super®), while water led to a protein reduction of 56.5%. The question of whether an orthodontic appliance contaminated by a longer, undisturbed biofilm formation is equally effectively cleaned by orthodontic cleaners remained open and was the aim of this study.

The inferior ability of orthodontic cleaners to reduce protein levels in the present study compared to Fathi et al. [16] seems to be a consequence of the maturation of the biofilm and its associated structural changes [18]. Several mechanisms are responsible for the increasing resistance of mature biofilms to physical and chemical stresses. In addition to the proliferation of anaerobic bacteria, there is an overall increase in all bacteria and an increase in the heterogeneity of bacterial composition [27]. This enables the exchange of metabolic products, signalling molecules, genetic material and defence substances [18]. Extracellular polymeric substances (EPS) represent a diffusion barrier for antimicrobial substances by slowing down the transport speed into the interior of the biofilm or impairing it through interaction with extrapolymeric substances. This makes it increasingly difficult for antimicrobial substances to penetrate into deep layers of the biofilm [12, 24].

In this study, Retainer Brite® achieved the highest protein reduction and Kukis® Xpress and Dontodent achieved an equally significantly lower protein reduction. The cleaning performance of all three orthodontic cleaners was higher than that of tap water (Fig. 2, Table 1). On the other hand, the results of this study demonstrated that the effectiveness of chemical cleaning tablets is limited on a mature biofilm due to the associated structural changes. Compared to a 4-day-old biofilm [16], there was a clear decrease in protein reduction. The results of this study, and the results of previous studies, reinforce the need to combine the use of chemical cleaning tablets with manual brushing to assure adequate biofilm removal. Although the orthodontic cleaning tablets were able to remove some of the biofilm, a significant amount of biofilm remained. Orthodontic cleaners did not promote broad elimination of the biofilm, within the time of use recommended by the manufacture.

The time of immersion is an important factor to consider. He et al. [24] investigated the penetration of chlorhexidine into the inner part of a mature biofilm. They were able to show that a limited penetration time did not result in concentrations necessary to kill the bacteria. Coenye et al. [8]

determined the kinetics of killing for *C. albicans* biofilms grown on PMMA specimens. By increasing the time of exposure in a peroxide-based solution (NitrAdine™, Medical Interporous, MSI Laboratories AG, Vaduz, Liechtenstein) a significant reduction of *C. albicans* could be achieved. They stated that the time of exposure to peroxide-based solutions must be long enough for them to penetrate into the deep layers of the biofilm. In the present study, the difference in the cleaning performance between Retainer Brite® vs. Dontodent and Kukis® Xpress, respectively, was significant. While Retainer Brite® with an exposure time of 15 min led to the highest protein reduction, the cleaner Kukis® Xpress with the shortest exposure time of 3 min achieved the lowest protein reduction. However, the difference in protein reduction between Kukis® Xpress and Dontodent was not significant despite a longer exposure time in the cleaning solution for Dontodent. Since only cleaning performance of the use according to the manufacturers' time instructions was tested, it remains to be clarified whether a longer soaking time in the cleaning solution leads to better cleaning results. Furthermore, it remains to be clarified whether the daily use of orthodontic cleaners can prevent the accumulating formation of biofilm. This question should be investigated in future studies.

Conclusion

The results of this ex vivo study demonstrate that under the condition of a 7-day-old biofilm, orthodontic cleaners removed some of the biofilm, but a significant amount of biofilm remained. The cleaning performance on a mature biofilm with its associated structural changes is limited. On a mature biofilm the single use of water is ineffective and leads to inadequate cleaning results.

Acknowledgements The authors would like to thank Dr. Monika Emmrich for her support in implementing the OPA method.

Author Contribution A. Arndt-Fink and P.-G. Jost Brinkmann conceived the study. A. Arndt-Fink conducted the clinical trial, collected the data and performed the statistical analysis. A. Arndt-Fink wrote the original draft of the manuscript. A. Arndt-Fink and P.-G. Jost-Brinkmann revised subsequent drafts and approved the final draft for submission. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Declarations

Conflict of interest A. Arndt-Fink and P.-G. Jost-Brinkmann declare that they have no competing interests.

Ethical standards All procedures performed in studies involving human participants or on human tissue were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1975 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. This study was formally approved by the Ethics Committee of Charité-Universitätsmedizin Berlin (EA4/048/21). Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Abbate GM, Caria MP, Montanari P, Mannu C, Orrù G, Caprioglio A, Levini L (2015) Periodontal health in teenagers treated with removable aligners and fixed orthodontic appliances. *J Orofac Orthop* 76:240–250. <https://doi.org/10.1007/s00056-015-0285-5>
- Akgün FA (2021) Cleaning methods and materials for removable orthodontic appliances: a questionnaire study. *BSJ Health Sci* 4:136–140. <https://doi.org/10.19127/bshealthscience.827851>
- Albanna RH, Farawanah HM, Aldrees AM (2017) Microbial evaluation of the effectiveness of different methods for cleansing clear orthodontic retainers: a randomized clinical trial. *Angle Orthod* 87:460–465. <https://doi.org/10.2319/072916-585.1>
- Al-Moghrabi D, Johal A, O'Rourke N, Donos N, Pandis N, Gonzales-Marin C, Fleming PS (2018) Effects of fixed vs removable orthodontic retainers on stability and periodontal health: 4-year follow-up of a randomized controlled trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 154:167–174. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2018.01.007>
- Babaahmady KG, Challacombe SJ, Marsh PD, Newman HN (1998) Ecological study of streptococcus mutans, streptococcus sobrinus and lactobacillus spp. at sub-sites from approximal dental plaque from children. *Caries Res* 32:51–58. <https://doi.org/10.1159/000016430>
- Batoni G, Pardini M, Giannotti A, Ota F, Giuca MR, Gabriele M, Campa M, Senesi S (2001) Effect of removable orthodontic appliances on oral colonisation by mutans streptococci in children. *Eur J Oral Sci* 109:388–392. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2001.00089.x>
- Blankenstein FH, Peroz I (2011) Sind Reinigungstabletten für die alltägliche Zahnprothesenhygiene geeignet? [Are denture cleansing tablets suitable for daily use?]. *Z Gerontol Geriatr* 44:192–197. <https://doi.org/10.1007/s00391-010-0153-2>
- Coenye T, De Prijck K, De Wever B, Nelis HJ (2008) Use of the modified Robbins device to study the in vitro biofilm removal efficacy of NitrAdine, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medical devices. *J Appl Microbiol* 105:733–740. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03784.x>
- Coimbra FCT, Rocha MM, Oliveira VC, Macedo AP, Pagnano VO, Silva-Lovato CH, Paranhos H (2021) Antimicrobial activity of effervescent denture tablets on multispecies biofilms. *Gerodontology* 38:87–94. <https://doi.org/10.1111/ger.12500>
- Diedrich P (1989) Microbial colonization and various cleaning procedures for orthodontic appliances. *Fortschr Kieferorthop* 50:231–239
- Dominy SS, Lynch C, Ermini F et al (2019) Porphyromonas gingivalis in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. *Sci Adv* 5(1):eaau3333. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau3333>
- Donlan RM, Costerton JW (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Eichenauer J, Serbesic C, Ruf S (2011) Cleaning removable orthodontic appliances: a survey. *J Orofac Orthop* 72:389–395. <https://doi.org/10.1007/s00056-011-0043-2>
- Faltermeier A, Rosentritt M, Müssig D (2007) Acrylic removable appliances: comparative evaluation of different postpolymerization methods. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 131:301.e16–301.e22. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2006.07.019>
- Farhadifard H, Soheilifar S, Bakhsaei A (2021) Plaque removal efficacy of 3 cleaning methods for removable orthodontic appliances: A crossover randomized clinical trial. *Turk J Orthod* 34:170–175. <https://doi.org/10.5152/TurkJOrthod.2021.20079>
- Fathi H, Martiny H, Jost-Brinkmann P-G (2015) Efficacy of cleaning tablets for removable orthodontic appliances: an in vivo pilot study. *J Orofac Orthop* 76:143–151. <https://doi.org/10.1007/s00056-014-0277-x>
- Feng Z, Weinberg A (2006) Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol* 2000 40:50–76. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00148.x>
- Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14:563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Frazer RQ, Byron RT, Osborne PB, West KP (2005) PMMA: an essential material in medicine and dentistry. *J Long Term Eff Med Implants* 15:629–639. <https://doi.org/10.1615/jlongtermeffmedimplants.v15.i6.60>
- Friedrich T, Roth K, Gauer J, Heeg P (2007) Sensitivity of detection methods for assessment of residual contamination on reprocessed surgical instruments. *Zentr Steril* 15:29–38
- Frister H, Meisel H, Schlimme E (1988) OPA method modified by use of N,N-dimethyl-2-mercaptoethylammonium chloride as thiol component. *Fresenius Z Anal Chem* 330:631–633
- Frister H, Meisel H, Schlimme E (1990) Einsatzmöglichkeiten der modifizierten OPA-Methode in der Proteinanalytik. *Ernähr Umsch* 37:442–445
- Hall-Stoodley L, Stoodley P (2002) Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol* 13:228–233. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(02\)00318-x](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(02)00318-x)
- He Y, Peterson BW, Jongsma MA, Ren Y, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mei HC (2013) Stress relaxation analysis facilitates a quantitative approach towards antimicrobial penetration into biofilms. *Plos One* 8(5):e63750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063750>
- Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL (2020) Methods for measuring the concentrations of proteins. *Cold Spring Harb Protoc*. <https://doi.org/10.1101/pdb.top102277>
- Kilian M, Chapple IL, Hannig M, Marsh PD, Meuric V, Pedersen AM, Tonetti MS, Wade WG, Zaura E (2016) The oral microbiome—an update for oral healthcare professionals. *Br Dent J* 221:657–666. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>
- Kim YS, Kang SM, Lee ES, Lee JH, Kim BR, Kim BI (2016) Ecological changes in oral microcosm biofilm during maturation. *J Biomed Opt* 21(10):101409. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.21.10.101409>
- Klaus K, Eichenauer J, Sprenger R, Ruf S (2016) Oral microbiota carriage in patients with multibracket appliance in relation to the

Investigation of the cleaning performance of commercial orthodontic cleaning tablets regarding biofilm removal on PMMA test...

- quality of oral hygiene. *Head Face Med* 12:28. <https://doi.org/10.1186/s13005-016-0125-x>
29. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K (2012) Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol* 39:425–433. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01856.x>
30. Levrini L, Novara F, Margherini S, Tenconi C, Raspanti M (2015) Scanning electron microscopy analysis of the growth of dental plaque on the surfaces of removable orthodontic aligners after the use of different cleaning methods. *Clin Cosmet Investig Dent* 7:125–131. <https://doi.org/10.2147/CCIDE.S95814>
31. Mummolo S, Tieri M, Nota A, Caruso S, Darvizeh A, Albani F, Gatto R, Marzo G, Marchetti E, Quinzi V, Tecco S (2020) Salivary concentrations of streptococcus mutans and lactobacilli during an orthodontic treatment. An observational study comparing fixed and removable orthodontic appliances. *Clin Exp Dent Res* 6:181–187. <https://doi.org/10.1002/cre2.261>
32. Nikawa H, Hamada T, Yamashiro H, Kumagai H (1999) A review of in vitro and in vivo methods to evaluate the efficacy of denture cleansers. *Int J Prosthodont* 12:153–159
33. Pathak AK, Sharma DS (2013) Biofilm associated microorganisms on removable oral orthodontic appliances in children in the mixed dentition. *J Clin Pediatr Dent* 37:335–339. <https://doi.org/10.17796/jcpd.37.3.92230h6256v8697t>
34. Pitner P, Rossiwall B (1975) Untersuchungen über die Korrosion von abnehmbaren kieferorthopädischen Apparaturen durch selbsttätige Reinigungsmittel. *Fortschr Kieferorthop* 36:570–582
35. Rego RO, Oliveira CA, dos Santos-Pinto A, Jordan SF, Zambon JJ, Cirelli JA, Haraszthy VI (2010) Clinical and microbiological studies of children and adolescents receiving orthodontic treatment. *Am J Dent* 23:317–323
36. Ren Y, Jongsma MA, Mei L, van der Mei HC, Busscher HJ (2014) Orthodontic treatment with fixed appliances and biofilm formation—a potential public health threat? *Clin Oral Invest* 18:1711–1718. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1240-3>
37. Scannapieco FA (1999) Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol* 70:793–802. <https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.7.793>
38. Schlagenhaut U, Tobien P, Engelfried P (1989) Effects of orthodontic treatment on individual caries risk parameters. *Dtsch Zahnärztl Z* 44:758–760
39. Schwahn C, Frenzel S, Holtfreter B, Van der Auwera S, Pink C, Bülow R, Friedrich N, Völzke H, Biffar R, Kocher T, Grabe HJ (2021) Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. Effect of periodontal treatment on preclinical Alzheimer's disease—Results of a trial emulation approach. *Alzheimers Dement*. <https://doi.org/10.1002/alz.12378>
40. Topaloglu-Ak A, Ertugrul F, Eden E, Ates M, Bulut H (2011) Effect of orthodontic appliances on oral microbiota—6 month follow-up. *J Clin Pediatr Dent* 35:433–436. <https://doi.org/10.17796/jcpd.35.4.61114412637mt661>
41. Tsolakis AI, Kakali L, Prevezanos P, Bitsanis I, Polyzois G (2019) Use of different cleaning methods for removable orthodontic appliances: a questionnaire study. *Oral Health Prev Dent* 17:299–302. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a42685>
42. Türköz C, Canigür Bavbek N, Kale Varlik S, Akça G (2012) Influence of thermoplastic retainers on streptococcus mutans and lactobacillus adhesion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 141:598–603. <https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2011.11.021>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Komplette Publikationsliste

Arndt-Fink A, Jost-Brinkmann P-G.

Investigation of the cleaning performance of commercial orthodontic cleaning tablets regarding biofilm removal on PMMA test specimens

Journal of Orofacial Orthopedics / Fortschritte der Kieferorthopädie. 2023

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00056-023-00474-2>

Danksagung

Folgenden Personen möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen:

Herrn Prof. Dr. Paul-Georg Jost-Brinkmann danke ich sehr herzlich für die Vergabe dieses Forschungsthemas, seine unermüdlich inspirierende Begleitung während der Erstellung dieser Arbeit und dafür, dass er jederzeit für einen Gedankenaustausch zur Verfügung stand.

Frau PD Dr. Monika Emmrich möchte ich sehr herzlich für ihre Unterstützung im Labor, den konstruktiven Vorschlägen bei der Etablierung der OPA-Methode sowie den zahlreichen ermutigenden Gesprächen danken.

Allen Proband*innen möchte ich hiermit meinen Dank für deren Bereitschaft zur Teilnahme an dieser Studie aussprechen.

Meinem Mann danke ich für seine Unterstützung und seinen liebevollen Zuspruch, den ich von der Idee bis zur Fertigstellung dieser Dissertation stets erfahren habe.

Mein abschließender und liebevollster Dank gilt meinen Eltern, deren Rückhalt mich in allen Phasen meines Promotionsvorhabens begleitete.