

3. Material und Methode

3.1 Vorversuche: Mikrobiologische Versuche

Kunststoffbrackets aus Polyoxymethylen (POM) sowie das Einkomponenten-Adhäsiv und der Primer wurden nach Lieferung vom Hersteller auf Sterilität geprüft.⁴ Um die Keimadhärenz zu testen, wurden POM-Brackets mit einem oralen Keimgemisch kontaminiert. Außerdem wurde die Wirkung verschiedener Desinfektionsmittel an den bakteriell kontaminierten POM-Brackets untersucht.

3.1.1 Sterilitätsprüfung

3.1.1.1 Kunststoffbrackets

Aus einer handelsüblichen geschlossenen Verpackung (Abb. 18 im Anhang) mit 20 POM-Brackets wurden neun Brackets mit steriler Pinzette entnommen und durch leichtes Andrücken der Bracketbasisfläche auf eine Columbia-Blut-Agarplatte (CoBI) übertragen (Abb. 1). Der Nährboden wurde sieben Tage im Brutschrank bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (5–10 % CO_2) bebrütet.

Die Kunststoffbrackets wurden nach der Direktbeimpfung der CoBI-Agarplatte mit einer sterilen Pinzette in ein Reagenzglas mit Anreicherungsbouillon⁵ überführt und weitere 14 Tage bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (5–10 % CO_2) bebrütet.

⁴ Brilliant-Brackets[®], Quick-Bond[®]-Adhäsiv und Primer, Firma Forestadent[®], Pforzheim, Deutschland.

⁵ Herz-Hirn-Glucose-Bouillon, Firma Oxoid Ltd, CM 225, England.

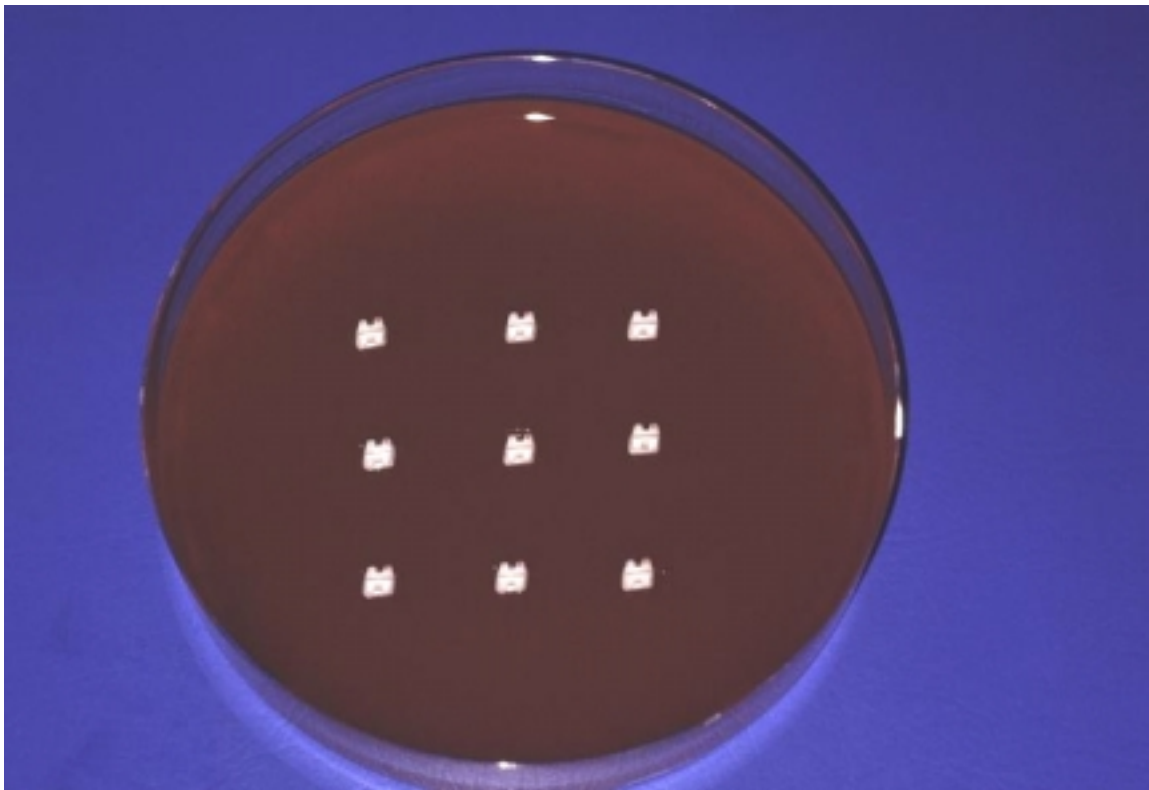


Abb. 1: Kunststoffbrackets (POM) auf CoBI-Agarplatten

3.1.1.2 Quick-Bond[®]-Adhäsiv und Primer

Der Primer wurde mit einer sterilen Pipette aus der handelsüblichen Glasflasche entnommen und jeweils zwei Tropfen auf eine CoBI-Agarplatte gebracht. Zusätzlich wurden zwei Stränge des Adhäsivs aus dem Tubenbeginn sowie dem Ende einer handelsüblichen Verpackung entnommen und mit einer sterilen Kunststofföse auf dieselbe CoBI-Agarplatte aufgetragen. Anschließend erfolgte eine Bebrütung von 24 Stunden bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (5–10 % CO_2).

3.1.2 Kontamination der Kunststoffbrackets

Die von uns vorgenommene Auswahl des Keimspektrums orientierte sich an physiologischen und oralpathogenen Keimen, welche adhärenente Fähigkeiten besaßen. Mit einer sterilen Platinöse (1 µl) wurden die Testkeime

- 1) *Streptococcus mutans* (DSM 20523),
- 2) *Streptococcus sanguis* (A22-2),
- 3) *Hämophilus aphrophilus* (FR41/16-7),
- 4) *Actinomyces viscosus* (A22-3),
- 5) *Porphyromonas gingivalis* (FR07/24-1)

in Reinkultur von ihrem Nährboden entnommen und in 2 ml steriler Pepton-Hefeextrakt-Bouillon (Basis-Medium, McFarland 1 = 3×10^8 Keime/ml) suspendiert. Aus der Suspension wurden jeweils 0,1 ml der oben genannten fünf Keimarten in 10 ml Pepton-Hefeextrakt-Glucose-Bouillon pipettiert, dies entspricht einer Keimzahl von 10^{6-7} /ml.

Im folgenden Text wird dieses Keimgemisch als Bakteriensuspension bezeichnet.

3.1.2.1 Keimadhärenenz

Drei Brackets wurden aus ihrer Verpackung mit einer sterilen Pinzette entnommen und in der Bakteriensuspension mit den fünf Keimarten für 60 Minuten bei $36^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ (5–10 % CO_2) inkubiert. Die Kunststoffbrackets wurden mit einer sterilen Pinzette aus der Bakteriensuspension entnommen und fünfmal in 4 ml physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Dadurch werden die nicht adhärenenten Keime abgelöst, während die an den Brackets haftenden Keime nachgewiesen werden können.

Mit den drei kontaminierten Brackets wurden drei Columbia-Blut- (CoBI) und drei Hefe-Cystein-Blut-aerobe- und drei Hefe-Cystein-Blut-anaerobe-Agarplatten (HCBI a/an) beimpft und 72 Stunden bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (5–10 % CO_2) inkubiert (Tab. 1).

Tab. 1: Keimadhärenz an den Kunststoffbrackets (POM)

POM-Bracket (n = 3)	POM-Bracket in Bakteriensuspension ¹ (min)	Kulturmedia (n = 9)			Inkubations- zeit im Brutschrank (h)
		CoBI ²	HCBI ³		
			aerob	anaerob	
Bracket 1	60 min bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ 5–10 % CO_2	1	1	1	72 h bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ 5–10 % CO_2
Bracket 2		1	1	1	
Bracket 3		1	1	1	

¹ Bakteriensuspension mit fünf Keimarten (siehe 3.1.2)

² Columbia-Blut-Agarplatten, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg

³ Hefe-Cystein-Blut(aerob/anaerob)-Agarplatten, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg

3.1.2.2 Quantitativer Nachweis der Keimadhärenz

Die Keimzahl pro Bracket wurde mittels einer Verdünnungsreihe bestimmt. Dazu wurden drei weitere steril entnommene Brackets in die genannte Bakteriensuspension für eine Stunde gelegt und anschließend zehnmals in 4 ml physiologischer NaCl-Lösung gewaschen, um die nichtadhärenten Keime zu entfernen. Jedes Kunststoffbracket wurde in 1 ml Trypsin (0,25%ig) überführt und für zehn Minuten bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (5–10 % CO_2) inkubiert.

Das Ablösen der adhärennten Keime durch Trypsin wurde durch Vortexen⁶ für zehn Sekunden unterstützt. Anschließend wurde aus jeder trypsinhaltigen Lösung 0,1 ml entnommen und in drei weitere Reagenzgläser mit 0,9 ml Pepton-Hefeextrakt-Bouillon (Basismedium) pipettiert. Die Verdünnung in jedem Reagenzglas entsprach der Konzentration 1 : 10. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal mit anschließendem Vortexen wiederholt, so dass vier Verdünnungen (Konzentration 1 : 1, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000) pro Bracket entstanden (Tab. 2).

Tab. 2: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Keimzahl pro POM-Bracket

POM-Bracket (n = 3)	Verdünnungsreihe			
	1 1 ml 0,25 % Trypsin	2 0,1 ml in 0,9 ml Basismedium ¹	3 0,1 ml in 0,9 ml Basismedium	4 0,1 ml in 0,9 ml Basismedium
Bracket 1	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100	Konz. 1 : 1000
Bracket 2	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100	Konz. 1 : 1000
Bracket 3	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100	Konz. 1 : 1000

¹ Basismedium entspricht Standard-Pepton-Hefeextrakt-Bouillon

Aus jeder Verdünnung wurden 0,1 ml auf jeweils eine CoBI-, eine HCBI-aerobe- und eine HCBI-anaerobe-Agarplatte ihrer Verdünnung entsprechend ausgespatelt. Die zwölf CoBI- sowie die zwölf aeroben und zwölf anaeroben HCBI-Nährböden (im Anhang Abb. 19) wurden drei Tage im Brutschrank bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (5–10 % CO₂) bebrütet (Abb. 2).

⁶ Vortexen: Verfahren der Durchmischung einer Substanz auf einem Schüttler (Heidolph Reax 1R).



Abb. 2: Columbia-Blut- und Hefe-Cystein-Blut(aerob/anaerob)-Agarplatten im Brutschrank

Für den Anaerobier-Nachweis wurden die zwölf HCBI-Platten im Anaerobier-Topf in Verbindung mit einem Anaerocult[®] A (Fa. Merck, Darmstadt, im Anhang Abb. 20) ebenfalls drei Tage bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (5–10 % CO_2) im Brutschrank bebrütet.

3.1.2.3 Bracketdesinfektion

Aus einer neuen, geschlossenen Verpackung wurden 15 POM-Brackets entnommen und in der Bakteriensuspension für 60 Minuten bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (5–10 % CO_2) inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Brackets einzeln zehnmal in 20 ml physiologischer Natriumchloridlösung für fünf Sekunden gewaschen, um die nichtadhärenten Keime zu entfernen. Die Aufteilung erfolgte in fünf Gruppen mit jeweils drei Brackets (Tab. 3). Die drei Brackets der jeweiligen Gruppe wurden steril in eine der fünf verschiedenen Desinfektionsmittellösungen überführt. Bei den verwendeten Lösungen handelt es sich um Desinfektionsmittel, die in der zahnärztlichen- und kieferorthopädischen Praxis angewendet werden.

Pro Bracket wurden 5 ml Desinfektionsmittel festgelegt, um eine quantitativ reproduzierbare Mengenangabe zu erhalten.

Der Einwirkungszeitraum ist der Tab. 3 zu entnehmen und entspricht dem Desinfektionsmittelspezifisch zugeordneten mikrobiologischen Wirkungsspektrum.

Tab. 3: Desinfektionsversuch mit künstlich kontaminierten POM-Brackets

Gruppe	POM-Brackets (n = 15)	Desinfektionsmittel	Konzentration	Menge (ml)	Zeit (min)
1	1, 2, 3	Chlorhexamed-Fluid ^{®7}	gebrauchsfertig	15	5
2	4, 5, 6	Meliseptol ^{®8}	gebrauchsfertig	15	5
3	7, 8, 9	Ethanol ⁹	70 %	15	1
4	10, 11, 12	NaOCl ¹⁰	3 %	15	1
5	13, 14, 15	H ₂ O ₂ ¹¹	3 %	15	1

3.1.2.4 Verdünnungsreihe zum Nachweis der Keimreduktion adhärenter Keime nach Desinfektion

Verdünnungsreihen dienen dazu, die Anzahl Kolonie bildender Einheiten (KBE) pro Bracket genau zu bestimmen. Diese werden in den jeweiligen Stufen pro ml (KBE/ml) ausgezählt und entsprechend ihrer Verdünnung hochgerechnet.

Aus den fünf Desinfektionslösungen wurden jeweils die drei desinfizierten Kunststoffbrackets steril entnommen, einzeln in 4 ml sterilem Aqua dest. 60 Sekun-

⁷ Chlorhexamed-Fluid[®], Block-Drug-Company[®], Ratingen.

⁸ Meliseptol[®], Fa. Braun Medical[®] AG, Melsungen.

⁹ Ethanol, Fa. Merck[®] KGaA, Darmstadt.

¹⁰ Natriumhypochlorid, Fa. Roth[®] AG, Karlsruhe.

¹¹ Wasserstoffperoxid, Fa. Merck[®] KGaA, Darmstadt.

den gewaschen, um das Desinfektionsmittel zu entfernen, und in jeweils 1 ml 0,25%iges Trypsin überführt. Anschließend erfolgte die Inkubation für zehn Minuten im Brutschrank bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (5–10 % CO_2). Mit einer sterilen Pipette wurden 0,1 ml aus der Trypsin-Ausgangskonzentration (1 : 1) in 0,9 ml Pepton-Hefeextrakt-Bouillon (Basismedium) überführt, um die Verdünnungen von 1 : 10 zu erhalten. Aus der Trypsin-Verdünnung (1 : 10) wurden 0,1 ml in 0,9 ml Basismedium überführt, um Verdünnungen von 1 : 100 zu erhalten (siehe Abb. 3, Tab. 4).

Eine solche Verdünnungsreihe wurde für alle fünf Gruppen mit jeweils drei desinfizierten Brackets hergestellt.

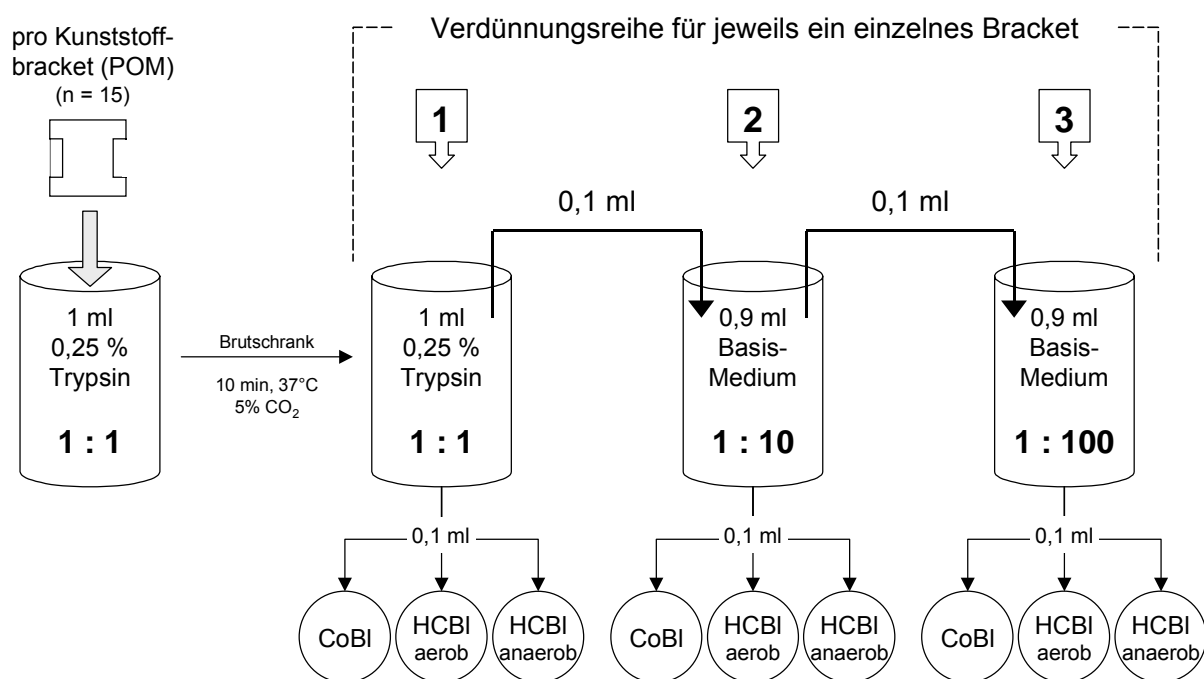


Abb. 3: Verdünnungsreihe für ein desinfiziertes Kunststoffbracket

Aus den drei Verdünnungsstufen 1 : 1, 1 : 10 und 1 : 100 der insgesamt 15 Verdünnungsreihen wurden jeweils 0,1 ml entnommen und auf CoBI- und HCBI-a/an-Agarplatten geimpft. Das heißt, dass aus der 1. Verdünnungsreihe jeweils 0,1 ml Trypsin-Verdünnung der Konzentration 1 : 1 auf eine CoBI-, eine HCBI-aerobe-, und

eine HCBI-anaerobe Agarplatte gebracht wurden. Jeweils 0,1 ml Trypsin-Verdünnung der Konzentration 1 : 10 bzw. der Konzentration 1 : 100 wurden ebenso auf separate CoBI- und HCBI-a/an-Agarplatten aufgetragen. Dieser Vorgang wurde für alle restlichen 14 Verdünnungsreihen in gleicher Weise durchgeführt (Abb. 3). Die aufgetragenen Flüssigkeiten wurden mit einem Glasspatel auf der Oberfläche verteilt. Die so entstandenen, insgesamt 135 Blut-Agarplatten wurden für 72 Stunden bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (5–10 % CO_2) im Brutschrank bebrütet.

Tab. 4: Verdünnungsreihe der künstlich kontaminierten POM-Brackets

Gruppe	Desinfektionsmittel	POM-Bracket (n = 15)	Verdünnungsreihe		
			1 ml 0,25 % Trypsin	0,1 ml in 0,9 ml Basismedium ¹	0,1 ml in 0,9 ml Basismedium
1	Chlorhexamed- Fluid®	1	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
		2	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
		3	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
2	Meliseptol®	4	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
		5	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
		6	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
3	Ethanol	7	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
		8	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
		9	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
4	Natriumhypochlorid	10	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
		11	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
		12	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
5	H_2O_2	13	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
		14	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100
		15	Konz. 1 : 1	Konz. 1 : 10	Konz. 1 : 100

¹ Basismedium entspricht Standard-Pepton-Hefeextrakt-Bouillon

3.2 Ergebnisse der Vorversuche

3.2.1 Sterilitätsprüfung

- Kunststoffbrackets (POM)

Die steril der Originalverpackung entnommenen neun Brackets zeigten weder auf der beimpften CoBI-Agarplatte noch in den Flüssigkulturen Bakterienwachstum. Somit werden die Brackets steril geliefert (siehe 3.1.1.1).

- Quick-Bond[®]-Adhäsiv und Primer

Die CoBI-Agarplatten mit den Adhäsivsträngen und dem Primer wurden nach einer Inkubation von sieben Tagen bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ (5–10 % CO_2) ausgewertet (siehe 3.1.1.2).

Bei der visuellen Untersuchung des Nährbodens zeigte sich weder bei dem Adhäsiv noch bei dem Primer Bakterienwachstum. Adhäsiv und Primer waren steril.

3.2.2 Keimadhärenz an den Brackets

Nach Inkubation der Brackets in einer Keimsuspension (mit fünf Keimarten, siehe 3.1.2.1) und Entfernen der nicht adhärenen Keime durch Waschen wurden an den Bracketbasen 288 Kolonie bildende Einheiten pro ml (KBE/ml) nachgewiesen, siehe Tab. 5. Die Zahl entspricht der Summe der Gesamtkeimzahl der an den untersuchten Brackets adhärenen Keime. Die höchste Keimzahl wurde bei *S. sanguis* mit 159 KBE/ml festgestellt, die niedrigsten bei *H. aphrophilus* mit 4 KBE/ml. Bei *P. gingivalis* waren keine vermehrungsfähigen Keime nachweisbar.

Tab. 5: Keimadhärenz an den POM-Brackets

Testkeime ¹	Keimzahl in Kolonie bildenden Einheiten pro ml [KBE/ml]							
	POM-Bracket 1		POM-Bracket 2		POM-Bracket 3		Mittelwert [KBE/ml]	
	CoBI ²	HCBI ³ a/an	CoBI	HCBI a/an	CoBI	HCBI a/an	CoBI	HCBI a/an
S. mutans	60	20	30	10	40	20	30	
S. sanguis	150	80	200	200	200	120	159	
H. aphrophilus	20	0	0	1	0	0	4	
A. viscosus	100	80	80	100	150	60	95	
P. gingivalis	0	0	0	0	0	0	0	
							288	

¹ Inkubation der POM-Brackets in künstlicher Bakteriensuspension für 1 h (siehe 3.1.2)

² Columbia-Blut-Agarplatten

³ Gemittelte Werte für Hefe-Cystein-Blut(aerob/anaerob)-Agarplatten

Die Werte für HCBI a/an wurden gemittelt, die Untersuchung erfolgte durch visuelle Erkennung und Auszählen der Kolonie bildenden Einheiten auf den Nährböden.

3.2.2.1 Reihenverdünnungstest zum Nachweis der Keimadhärenz an den Brackets

Aus den Verdünnungsreihen (1 : 1 und 1 : 10, siehe 3.1.2.2) wurde die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten pro ml auf dem Kulturmedium pro Bracket, differenziert nach den verwendeten Testkeimen, ermittelt. Anhand der ermittelten Werte (Tab. 6) der gelösten Kolonienzahl eines jeden Brackets wurde die Gesamtkeimzahl pro Bracket und pro Testkeim errechnet.

Da sich auf den CoBI- und HCBI-a/an-Nährböden mit Trypsin-Medium 1 : 100 und 1 : 1000 keine Kolonien entwickelten, wurden diese Stufen des Reihenverdünnungstests (siehe Tab. 2, 3.1.2.2) in der nachfolgenden Tabelle nicht berücksichtigt.

Tab. 6: Keimzahl adhärenter Bakterien an den POM-Brackets

Testkeime	Bracket ¹ (n=3)	Gelöste Kolonienzahl pro 0,1 ml				Gesamtkeimzahl	
		Verdünnung: 1 : 1		Verdünnung: 1 : 10		pro Bracket [KBE/ml]	pro Keim [KBE/ml]
		CoBI ²	HCBI ³ a/an	CoBI	HCBI a/an		
S. mutans	1	7	8	2	2	138	155
	2	5	6	5	1	178	
	3	20	20	1	1	150	
S. sanguis	1	70	90	4	4	600	692
	2	40	40	5	10	575	
	3	80	100	7	11	900	
H. aphrophilus	1	12	80	5	3	430	284
	2	6	60	1	2	240	
	3	3	50	0	1	183	
A. viscosus	1	2	1	0	0	15	98
	2	6	5	0	0	55	
	3	40	30	1	1	225	
P. gingivalis	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0		

¹: Inkubation der POM-Brackets in künstlicher Bakteriensuspension für 1 h (siehe 3.1.2)

² Columbia-Blut-Agarplatten

³ Gemittelte Werte für Hefe-Cystein-Blut(aerob/anaerob)-Agarplatten

Die Werte für HCBI-a/an-Agarplatten und für die Verdünnung 1 : 1 und 1 : 10 sind gemittelt worden. Die Berechnung der Mittelwerte als gelöste, Kolonie bildende Einheit pro ml erfolgte nach der Formel:

Gesamtkeimzahl (GKZ) pro Bracket :

$$GKZ = \frac{\frac{(CoBl_{1:1} + HCBl_{1:1})}{2} \times 10 + \frac{(CoBl_{1:10} + HCBl_{1:10})}{2} \times 100}{n = 2} \quad [KBE / ml]$$

Die Faktoren 10 und 100 leiten sich aus den jeweiligen Verdünnungen ab und wurden eingeführt, um die Korrelation der Werte pro ml zu erreichen. Die Vergleichbarkeit der Daten wurde durch die Gesamtkeimzahl aus drei Parallelversuchen gewährleistet.

Die höchsten Werte wurden für *S. sanguis* (692 KBE/ml) und *H. aphrophilus* (284 KBE/ml) gefunden. Die Adhärenz von *S. sanguis* war somit an den Bracketbasen am stärksten, die von *A. viscosus* mit 98 KBE/ml am geringsten. Bei *P. gingivalis* wurden keine adhärenen Kolonie bildenden Einheiten ermittelt.

3.2.3 Reihenverdünnungstest der Brackets nach Desinfektion

Nach der Desinfektion der in der Keimsuspension inkubierten Brackets (Desinfektionsverfahren, siehe Tab. 3, 3.1.2.3) wurde eine Verdünnungsreihe zum Nachweis der Keimreduktion in Chlorhexamed-Fluid[®], Meliseptol[®], Ethanol, NaOCl und H₂O₂ durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand der 135 CoBI- und HCBI-a/an-Agarplatten.

Bei der Anwendung von Chlorhexamed-Fluid[®], Meliseptol[®], Ethanol und NaOCl konnten keine Keime aerob oder anaerob angezüchtet werden (Tab. 7). Die Keime

wurden vollständig durch ein- bzw. fünfminütige Anwendung der Desinfektionsmittel abgetötet. Die getesteten Substanzen wurden in der Anwendungskonzentration der Hersteller eingesetzt.

Tab. 7: Zahl adhärenter Bakterien an den desinfizierten Brackets der Gruppen 1–4

Gruppe	Desinfektionsmittel ¹	Bracket ² (n = 12)	Nach Desinfektion gelöste Kolonienzahl pro 0,1 ml						Gesamtkeimzahl [KBE/ml]
			Verdünnung: 1 : 1		Verdünnung: 1 : 10		Verdünnung: 1 : 100		
			CoBI ³	HCBI ⁴ a/an	CoBI	HCBI a/an	CoBI	HCBI a/an	
1	Chlorhexamed-Fluid [®]	1							0
		2	0	0	0	0	0	0	
		3							
2	Meliseptol [®]	4							0
		5	0	0	0	0	0	0	
		6							
3	Ethanol (70 %)	7							0
		8	0	0	0	0	0	0	
		9							
4	NaOCl (3 %)	10							0
		11	0	0	0	0	0	0	
		12							

¹ Konzentration und Wirkungszeitraum siehe Tab. 3

² Desinfizierte POM-Brackets nach Inkubation in künstlicher Bakteriensuspension für 1 h (siehe 3.1.2)

³ Columbia-Blut-Agarplatten

⁴ Hefe-Cystein-Blut(aerob/anaerob)-Agarplatten

Bei den mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂, 3%ig) desinfizierten Kunststoffbrackets der Gruppe 5 konnte keine vollständige Keimreduktion nachgewiesen werden (Tab. 8).

Tab. 8: Zahl adhärenter Bakterien an den Brackets der Gruppe 5 nach Desinfektion mit H₂O₂

Test-keime	Bracket ¹ (n = 3)	Gelöste Kolonienzahl pro 0,1 ml						Gesamtkeimzahl	
		Verdünnung: 1 : 1		Verdünnung: 1 : 10		Verdünnung: 1 : 100		pro Bracket ⁴	pro Keim
		CoBI ²	HCBI ³ a/an	CoBI	HCBI a/an	CoBI	HCBI a/an	[KBE/ml]	[KBE/ml]
S. mutans	1	8	13	1	2	0	0	128	129
	2	3	16	0	2	0	0	148	
	3	8	16	1	1	0	0	110	
S. sanguis	1	11	3	3	1	0	0	135	131
	2	9	4	3	1	0	0	133	
	3	13	7	1	2	0	0	125	
H. aphro- philus	1	0	0	0	0	0	0	-	< 10
	2	0	0	0	0	0	0	-	
	3	0	1	0	0	0	0	-	
A. viscosu s	1	0	0	0	0	0	0	-	< 10
	2	1	0	0	0	0	0	-	
	3	0	0	0	0	0	0	-	
P. gingiva- lis	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0	0		

¹ Desinfizierte POM-Brackets nach Inkubation in künstlicher Bakteriensuspension für 1 h² Columbia-Blut-Agarplatten³ Gemittelte Werte für Hefe-Cystein-Blut(aerob/anaerob)-Agarplatten⁴ Gesamtkeimzahl für H. aphrophilus und A. viscosus nicht bestimmbar, da zu geringe Keimzahl

Die Werte für HCBI a/an und der Verdünnung 1 : 1 und 1 : 10 wurden gemittelt, die weitere Berechnung der Gesamtkeimzahl pro Bracket erfolgte in Anlehnung an die oben erwähnte Gleichung (siehe 3.2.2.1).

Die höchste Gesamtkeimzahl pro Keim wurden bei *S. sanguis* und *S. mutans* festgestellt. Bei *S. mutans* war eine geringe Keimreduktion von 155 KBE/ml auf 129 KBE/ml zu verzeichnen. Bei *S. sanguis* reduzierten sich die KBE/ml auf circa ein Fünftel des Ausgangswertes (von 692 KBE/ml auf 131 KBE/ml). Bei *H. aphrophilus* (von 284 KBE/ml auf < 10 KBE/ml) und bei *A. viscosus* (von 98 auf < 10 KBE/ml) erfolgte eine deutliche Keimreduktion.

S. mutans und *S. sanguis* waren am stärksten adhärent und überlebten eine Desinfektion mit H₂O₂ am besten.

3.3 Zusammenfassung der mikrobiologischen Versuche

Ein Ziel der mikrobiologischen Versuche war es, Kunststoffbrackets aus Polyoxymethylen und Tropfen des Quick-Bond[®]-Adhäsiv sowie des Primers¹², aus der handelsüblichen Verpackung, auf Sterilität zu untersuchen. Die Proben wurden anhand standardisierter mikrobiologischer Verfahren durch Bebrütung und Kultivierung auf Columbia-Blut- und Hefe-Cystein-Blut(aerob/an-aerob)-Agarnährböden auf Kolonie bildende Einheiten pro ml (KBE/ml) visuell ausgewertet. Die POM-Brackets, das Quick-Bond[®]-Adhäsiv und der Primer zeigten kein Bakterienwachstum und waren in den verwendeten handelsüblichen Verpackungen steril. Eine bakterielle Kontamination kann demnach nur außerhalb der Verpackung erfolgen.

¹² Brilliant-Brackets[®], Quick-Bond[®]-Adhäsiv und Primer, Firma Forestadent[®], Pforzheim, Deutschland.

Zur Feststellung der Keimadhärenz wurden drei Brackets mit einem oralen Keimgemisch kontaminiert, bestehend aus fünf verschiedenen Bakterienstämmen (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Hämophilus aphrophilus*, *Actinomyces viscosus* und *Porphyromonas gingivalis*).

An allen Brackets konnte eine Keimadhärenz nachgewiesen werden.

Anhand eines Reihenverdünnungstests wurde die gelöste Kolonienzahl für die einzelnen adhärennten Testkeime in Kolonie bildenden Einheiten pro ml (KBE/ml) quantitativ erfasst.

Die Adhärenz von *S. sanguis* (692 KBE/ml) war am stärksten, die von *A. viscosus* (98 KBE/ml) am geringsten. Bei *P. gingivalis* ergab sich keine Keimadhärenz.

Die mikrobiologische Wirksamkeit fünf verschiedener Desinfektionsmittel wurde an 15 bakteriell kontaminierten Brackets untersucht. Von klinischer Bedeutung ist die Frage, mit welchen Desinfektionsmitteln eine Keimfreiheit an den Brackets erzielt werden kann.

Wir verwendeten als Desinfektionsmittel Chlorhexamed-Fluid[®] (gebrauchsfertig, 5 min), Meliseptol[®] (gebrauchsfertig, 5 min), Ethanol (70 %, 1 min), Natriumhypochlorid (3 %, 1 min) und Wasserstoffperoxid (3 %, 1 min) in den vom Hersteller angegebenen und wirksamen Konzentrationen.

Die mit Chlorhexamed-Fluid[®], Meliseptol[®], Ethanol und Natriumhypochlorid desinfizierten Brackets waren vollständig keimfrei. Demzufolge ist die Desinfektionswirkung zuverlässig und kann in der Praxis eingesetzt werden.

Mit 3%igem Wasserstoffperoxid desinfizierte Brackets mussten weiterhin als kontaminiert angesehen werden. H₂O₂ (3%ig) erwies sich insbesondere bei *S. mutans* (129 KBE/ml) als wirkungslos. Bei *S. sanguis* reduzierte sich die KBE/ml auf ein

Fünftel des Ausgangswertes, bei *H. aphrophilus* und *A. viscosus* (< 10 KBE/ml) erfolgte eine deutliche, aber keine vollständige Keimreduktion. Insofern ist dieses Desinfektionsmittel wegen seiner unsicheren Wirkung nicht zu verwenden, insbesondere bei geringen Einwirkungszeiten.

Die bakterizide Wirkung von Wasserstoffperoxid kann nur durch eine höhere Konzentration über 3 % oder eine längere Einwirkdauer verstärkt werden.

3.4 Hauptversuche: Abscherversuche

Es ist nicht auszuschließen, dass diverse Desinfektionsmittel die Haftfestigkeit der POM-Brackets an der Zahnoberfläche beeinträchtigen und somit ein schnellerer Bracketverlust auftritt. In der folgenden Untersuchung sollte deshalb geklärt werden, bei welchen Desinfektionsmitteln eine Haftverschlechterung zu erwarten ist.

3.4.1 Untersuchungsmaterial

3.4.1.1 Rinderzähne

Für die In-vitro-Untersuchung der Abscherversuche standen 50 Oberkiefer frisch geschlachteter Rinder zur Verfügung. Es wurden ausschließlich obere, mittlere und seitliche Schneidezähne der 2. Dentition verwendet. Die Rinderschneidezähne wurden in 0,2%iger Thymol-Lösung in einem Glasbehälter für 14 Tage aufbewahrt.

3.4.1.2 Kunststoffbrackets

Für diesen Versuch wurden 150 Kunststoffbrackets (POM) für Oberkieferfrontzähne (11 und 21) verwendet (Abb. 4).



Abb. 4: Kunststoffbracket und Bracketbasis, Oberkiefer 11

Dieser Brackettyp hat mit 10 mm² die größte Basis und Passgenauigkeit, um einen gleichmäßigen Verbund zwischen Bracket und Rinderzahnoberfläche herzustellen. Die Bracketbasis der POM-Brackets besteht aus mechanischen Retentionsrillen (Abb. 4), die durch Spritzgießen der gesamten Form hergestellt werden. Zusätzlich wird nach Herstellerangaben die Basis durch „Mikrosandblasting“ mit Keramiksand, Körnung 40–70 µm, und 2 bar Druck aufgeraut (Abb. 4).

3.4.1.3 Quick-Bond®-Einphasenkleber

Die Kunststoffbrackets wurden mit dem chemisch härtenden Quick-Bond®-Einphasenkleber¹³ nach Herstellerangaben auf dem Rinderzahnschmelz befestigt.

Das Quick-Bond®-Set (Abb. 5) besteht aus Einkomponenten-Adhäsiv-Paste (5g-Spritze), Primer (14g-Glasflasche) und Ätzelgel (9g-Flasche) mit 37%iger Phosphorsäure (pH~1). Angaben zur Zusammensetzung der einzelnen Komponenten stellte der Hersteller nicht zur Verfügung.



Abb. 5: Quick-Bond®-Einphasenkleber-Set mit Adhäsiv-Paste, Primer und Ätzelgel

¹³Firma Forestadent®, Pforzheim, Deutschland.

3.4.1.4 Chemische Desinfektionsmittel

Zur Desinfizierung der Kunststoffbrackets (POM) wurden die folgenden Desinfektionslösungen eingesetzt:

- Chlorhexamed-Fluid® (Zusammensetzung von 100 g Lösung: 0,1 g Chlorhexidindigluconat, Glycerol, Ethanol)
- Meliseptol® (Zusammensetzung von 100 g Lösung: 50 g 1-Propanol, 0,08 g Glyoxal)
- Ethanol (70%ig, verdünnt mit destilliertem Wasser)
- Natriumhypochlorid (3%ig, verdünnt mit destilliertem Wasser)
- Wasserstoffperoxid (3%ig, verdünnt mit destilliertem Wasser)

3.4.2 Herstellung der Prüfkörper

3.4.2.1 Gewinnung der Rinderzähne

Mit einer Knochensäge wurden die Zähne von den Kiefern getrennt und mit einem scharfen Raspatorium und einer Extraktionszange aus dem Knochen herausgelöst. Es wurden nur makroskopisch unbeschädigte und nicht verfärbte Rinderzähne ohne makroskopisch erkennbare Mineralisationsstörungen ausgewählt.

Die Schneidezähne wurden mit einem scharfen Messer von Gewebe- und Knochenresten gereinigt. Mit einer Trennscheibe wurde die Wurzel an der Schmelz-Zement-Grenze von der Zahnkrone entfernt. Um eine Überhitzung des Schmelzes und Dentins zu vermeiden, erfolgte die Trennung konstant bei 5000 U/min und laufender Kühlung. Zusätzlich wurde die Pulpa mit einer chirurgischen Pinzette entfernt.

Eine Aufbewahrung der gesammelten Rinderzähne erfolgte in einem Glasbehälter mit 0,2%iger Thymollösung bei Zimmertemperatur für 14 Tage.

3.4.2.2 Vorbereitung der Rinderzähne

Insgesamt 170 Rinderschneidezähne wurden nochmals auf Schmelzrisse, Größe der Labialfläche und Beschaffenheit der Schmelzoberfläche selektiert. Um homogene und reproduzierbare Ergebnisse der Untersuchung zu erzielen, wurden weitere 20 Zähne aussortiert.

Die verbleibenden 150 Zähne wurden in sechs Gruppen mit jeweils 25 Zähnen aufgeteilt und folgendermaßen für den Klebevorgang vorbereitet:

- Entfernen des Thymols mit destilliertem Wasser pro Gruppe für 60 Sekunden
- Reinigen der Labialflächen mit einem Bimsstein-Wasser-Gemisch und Nylonbürstchen für 60 Sekunden bei 5000 U/min
- Abspülen mit Aqua dest. und Trocknen mit ölfreier Druckluft
- Anätzen der Labialfläche mit 37%iger Orthophosphorsäure für 60 Sekunden unter Verwendung des Quick-Bond®-Ätzgels
- Abspülen des Ätzgels mit Aqua dest. für 60 Sekunden und Trocknen mit ölfreier Druckluft

Eine systematische Vorbereitung wurde für jeden einzelnen Zahn einer Gruppe wiederholt und die Zeiten mit einer Stoppuhr der Firma Junghans eingehalten.

3.4.2.3 Desinfektion der Kunststoffbrackets

150 POM-Brackets wurden in sechs Gruppen mit jeweils 25 Brackets auf 25 Rinderzähne aufgeteilt.

Eine Gruppe diente als Kontrollgruppe (KOG), deren Brackets nicht desinfiziert wurden. Diese Kunststoffbrackets wurden direkt auf die vorbehandelten Rinderzahnkronen aufgeklebt (Tab. 9).

Eine systematische Vorbereitung der weiteren fünf Gruppen wurde der Reihenfolge nach durchgeführt.

Gruppe 1 wurde mit Chlorhexamed-Fluid[®] (gebrauchsfertig, 5 min), Gruppe 2 mit Meliseptol[®] (gebrauchsfertig, 5 min), Gruppe 3 mit Ethanol (70%ig, 1 min), Gruppe 4 mit Natriumhypochlorid (3%ig, 1 min) und Gruppe 5 mit Wasserstoffperoxid (3%ig, 1 min) behandelt. Die Mengen (in ml), Konzentrationen (in %) und Wirkungszeiträume (in min) der Desinfektionsmittel sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Für die Desinfektion wurden jeweils 25 Frontzahnbrackets steril aus ihren ungeöffneten Verpackungen entnommen und in einen sterilen Glasbehälter in 125 ml Desinfektionsmittel überführt. Die Konzentration des jeweiligen Desinfektionsmittels richtete sich nach herkömmlichen Anwendungskriterien und einem desinfektionsmittelspezifisch festgelegten Wirkungszeitraum (Tab. 9).

Tab. 9: Anwendung der Desinfektionsmittel

Gruppe	POM-Brackets (n = 150)	Desinfektionsmittel	Konzentration	Menge (ml)	Zeit (min)
KOG ¹	25	–	–	–	–
1	25	Chlorhexamed-Fluid [®]	gebrauchsfertig	125	5
2	25	Meliseptol [®]	gebrauchsfertig	125	5
3	25	Ethanol	70 %	125	1
4	25	NaOCl	3 %	125	1
5	25	H ₂ O ₂	3 %	125	1

¹: Kontrollgruppe

Mit einer sterilen kieferorthopädischen Bracketpinzette wurden die Kunststoffbrackets gruppenweise aus der Flüssigkeit entnommen und jeweils für fünf Sekunden mit keim- und ölfreier Druckluft getrocknet.

Das Kleben der Brackets auf die Rinderzahnkronen fand für die einzelnen Gruppen direkt im Anschluss an die Desinfektion statt.

3.4.2.4 Kleben der Kunststoffbrackets (POM)

Die vorbehandelten Brackets wurden nacheinander auf die vorbereiteten Rinderzähne aufgebracht. Für jedes Bracket wurden die nachfolgenden Arbeitsschritte nach Herstellerangaben eingehalten:

- Mit einem Pinsel wird eine dünne Schicht Quick-Bond[®]-Primer auf Schmelz und Bracketbasis auftragen und leicht verblasen.
- Anschließend wird Quick-Bond[®]-Adhäsiv-Paste auf die Bracketbasis aufgebracht, das Bracket sofort auf die konditionierte Schmelzoberfläche positioniert und mit leichtem Druck für 20 Sekunden fest und gleichmäßig angedrückt.
- Der Überschuss wird mit einer Dentalsonde vom Rand des Brackets entfernt.
- Es folgt ein kontrolliertes chemisches Aushärten des Adhäsivs für zwei Minuten.

Das Einbetten der Proben fand direkt im Anschluss an das Bekleben mit den POM-Brackets statt.

3.4.2.5 Versuchsgruppen im Überblick

Alle sechs Versuchsgruppen – der Brackettyp, der verwendeter Kleber und das jeweils verschiedene Desinfektionsmittel – sind in der folgenden Abb. 6 dargestellt.

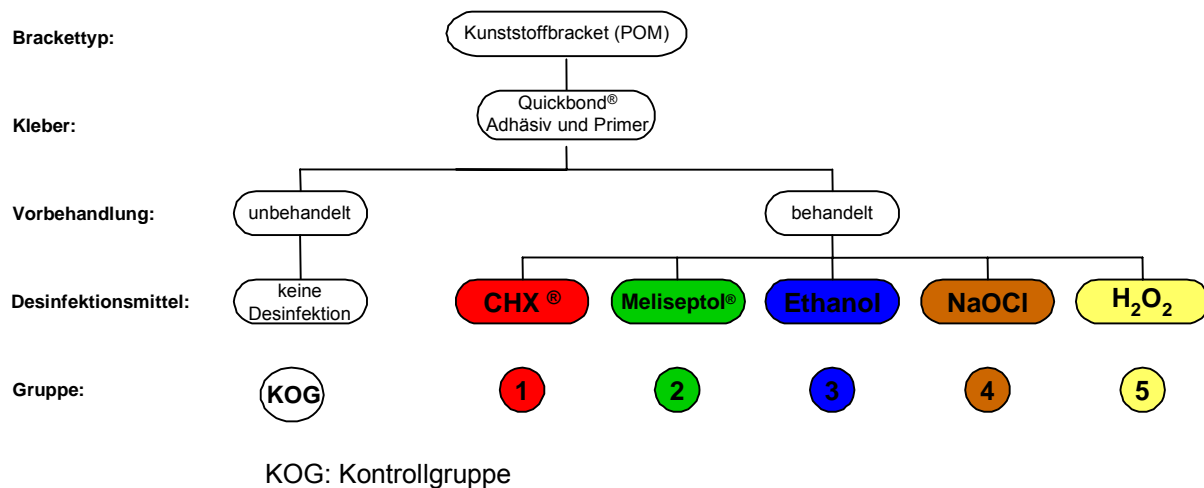


Abb. 6: Versuchsgruppen im Überblick

3.4.2.6 Einbetten der Prüfkörper zum Abscherversuch

Die 25 Prüfkörper wurden nacheinander in einer speziell aus Kunststoff (Ultraform H2320) angefertigten Justierhilfe und Einbettform fixiert und eingebettet.

Die Justierhilfe (Abb. 7) bestand aus einer horizontalen Klemmvorrichtung, die über einen vertikalen Haltearm am Aufnahmekörper mit einer Justierschraube befestigt war. Mit der hinter den Bracketflügeln auf den Bracketkörper ausgerichteten Klemmvorrichtung konnten die Brackets, unabhängig von der Zahnachse, exakt parallel und im rechten Winkel zur späteren Kraftapplikation einheitlich ausgerichtet werden.

Die Konstruktion der Klemmvorrichtung erlaubte eine reproduzierbare Position aller Proben und damit eine gleichmäßige Kraftapplikation des Abscherbolzens der Instron-Universal-Prüfmaschine¹⁴ zwischen den Bracketflügeln und dem Bracketkörper (Abb. 8).

¹⁴Modell 6025, Firma Instron Limited, Buckshire, UK.

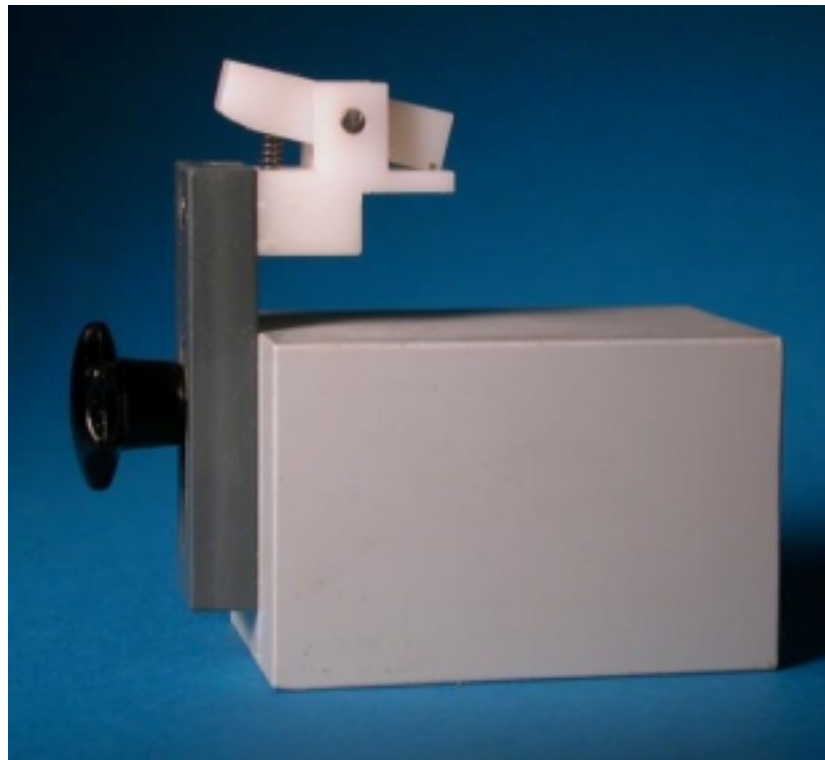


Abb. 7: Justierhilfe zur Ausrichtung des Brackets und Fixierung der Probenkörper

Mit einer Justierschraube am Haltearm der Klemmvorrichtung konnte der Probenkörper zentriert und parallel zur Oberfläche des Aufnahmekorpus in die Einbettform herabgelassen werden.

Die Einbettform bestand aus drei Kunststoffanteilen: zwei Halbmondhälften eines Töpfchens und einem passgenauen Ring, der beide Hälften gegeneinander fixierte. Der Innendurchmesser des Töpfchens betrug 16 mm und die Tiefe 10 mm (im Anhang Abb. 21).

Der Zahnhals der Versuchsprobe wurde zentral in die Öffnung plaziert und mit einem flüssigen Zwei-Komponenten-Kunstharz Akemi^{®15} auf Polyesterbasis fixiert (Abb. 8).

¹⁵Firma Wirtz-Buehler GmbH, Düsseldorf, Deutschland.

Nach dem Aushärten des Kunstharzes (60 min) wurde der Ring um die Einbettform abgezogen und die Kunststoffhälften getrennt. Der in den Kunstharzsockel eingebettete Probenkörper wurde entfernt, nummeriert, die Kunststoffhälften gereinigt und für die nächste Einbettung zusammengefügt.

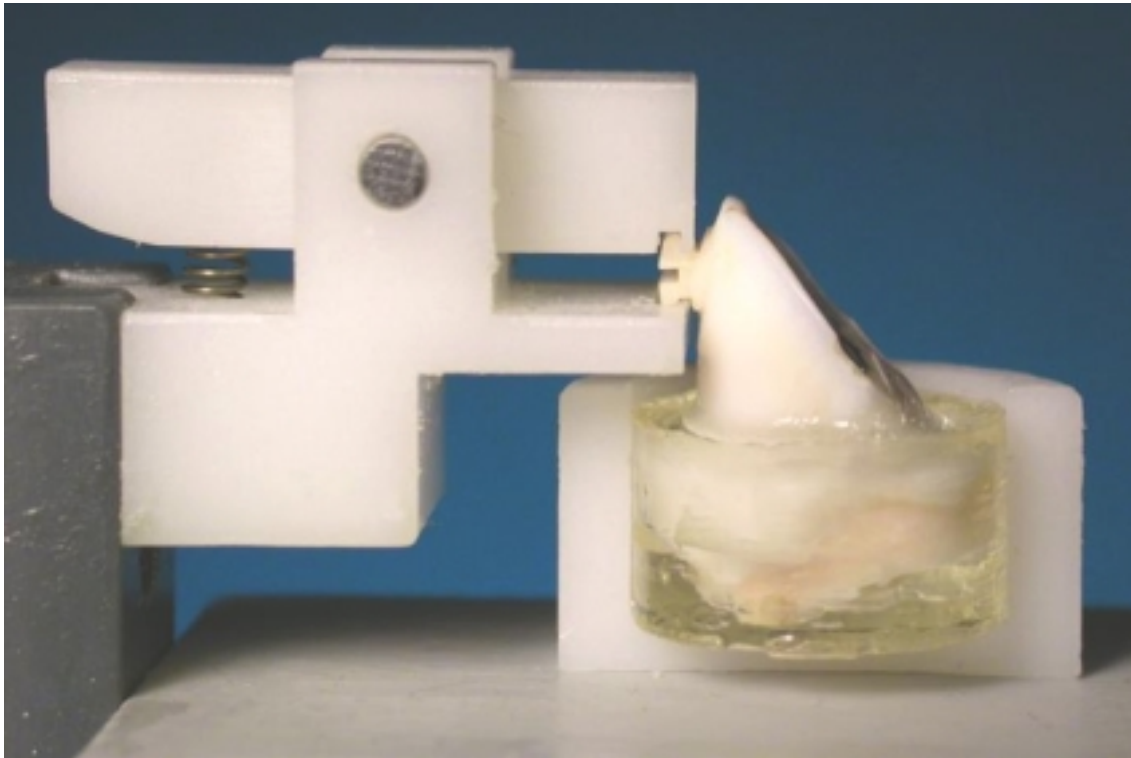


Abb. 8: In der Einbettform parallel und zentriert ausgerichteter Probenkörper

3.4.3 Scherfestigkeitsprüfung

Für die Durchführung der Abscherversuche wurde ein Abschergerät nach Fritz/Schulmeyer (im Anhang Abb. 22) in der Instron-Universal-Prüfmaschine verwendet.

Die modifizierte Abschervorrichtung nach Fritz/Schulmeyer besteht aus einem Metallschlitten, mit einer Einspannvorrichtung zur Aufnahme des Probensockels (im Anhang Abb. 23).

Nacheinander wurden alle Proben mit dem Sockel in die Einspannvorrichtung des Aufnahmeschlittens eingesetzt. Der Schlitten wurde auf die Führungsebene des Abschergerätes aufgesetzt und mit der Probe unter dem Abscherbolzen platziert.

Parallel und im rechten Winkel zur Bracketbasis wurde die Spitze des Abscherbolzens hinter den inzisalen Flügeln ausgerichtet (Abb. 9).

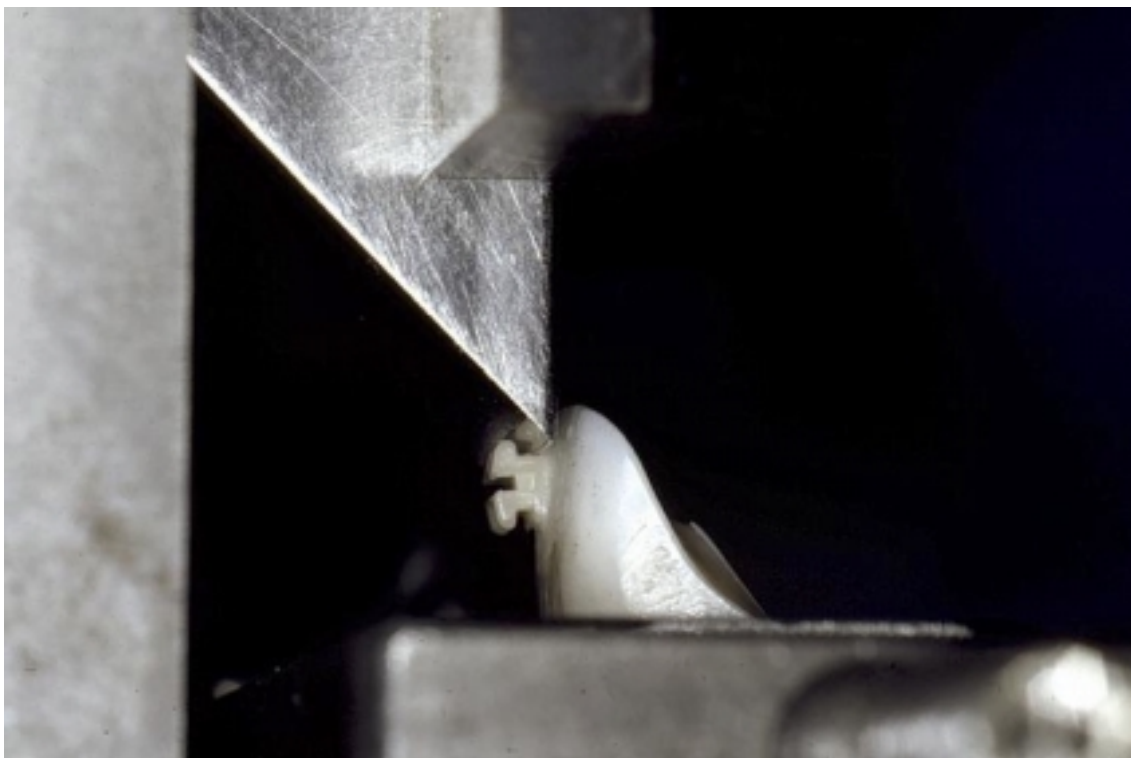


Abb. 9: Ausgerichteter Abscherbolzen auf der Bracketbasis der Probe

Die auf den Abscherbolzen übertragene Kraft der Instron-Prüfmaschine wirkt auf die Verbundstelle zwischen Bracketbasis und Schmelzoberfläche und trennt somit das Bracket vom Prüfkörper.

Dazu wurden die Proben sowie der Schlitten mit den seitlichen Stellschrauben in reproduzierbarer Stellung fixiert und das Abschergerät unter den planen, Kraft zuführenden Stempel der Instron-Prüfmaschine eingebracht (im Anhang Abb. 24 und Abb.

25). Mit einem Vorschub von 1 mm/min und einem Traversenweg von 0,02 mm erfolgte die Kraftzufuhr automatisch und stoppte bei einem Kraftabfall von 30 %.

Die Abscherkräfte wurden über eine Messdose von 100 KN (max. Kraft) und einen angeschlossenen PC (PC-Methode: Druck 21) für jede einzelne Probe aufgezeichnet.

3.4.4 Schematischer Ablauf der Probenherstellung

Der schematische Ablauf der Probenherstellung ist der Abb. 10 zu entnehmen.

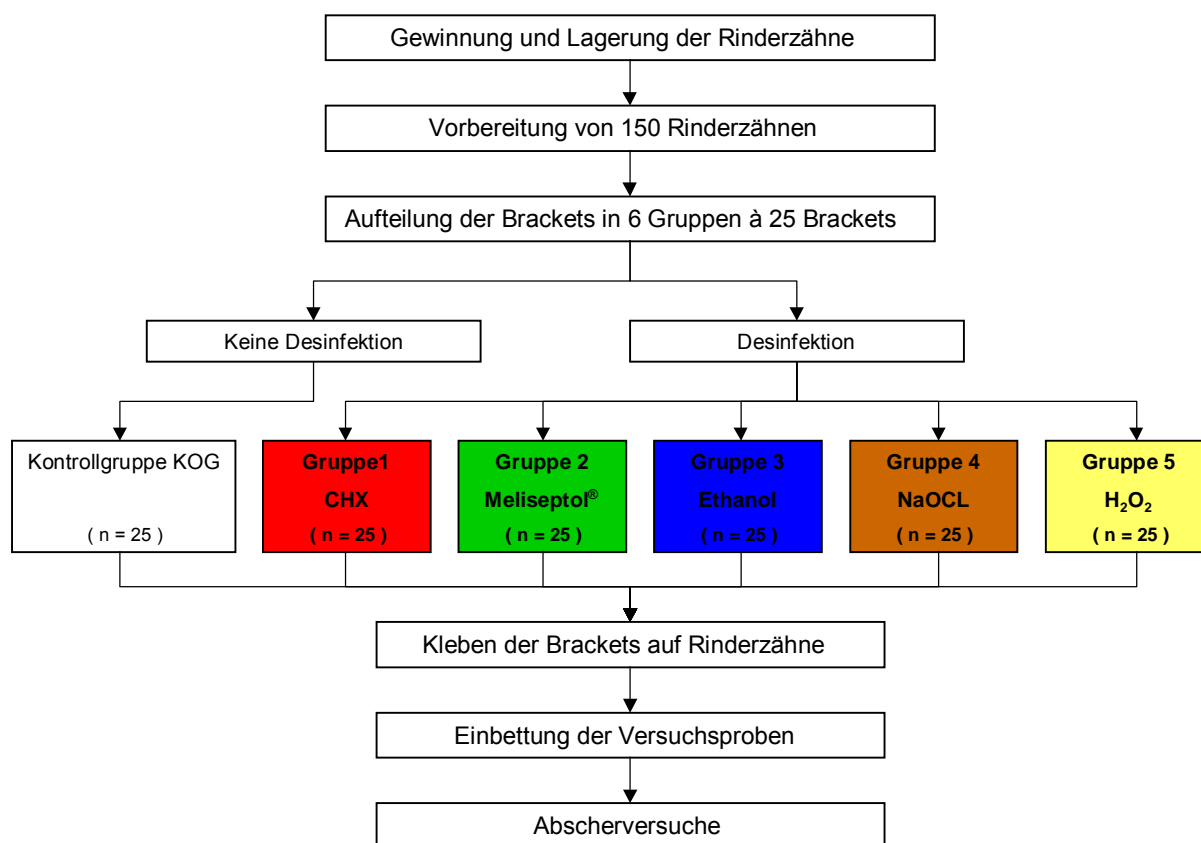


Abb. 10: Schematischer Ablauf der Probenherstellung

3.4.5 Experimentelle Auswertung

3.4.5.1 Verbundfestigkeitswerte

Die resultierenden Kräfte, die zum Abscheren der Kunststoffbrackets führten, wurden an der Instron-Prüfmaschine in Newton [N] abgelesen.

Unter Berücksichtigung der Größe der retentiven Bracketbasen von 10 mm² wurden die Werte in Verbundfestigkeit N/mm² [MPa] nach der folgenden Formel umgerechnet:

$$\text{Verbundfestigkeit [MPa]} = \frac{\text{Kraft [N]}}{\text{Bracketbasisfläche [mm}^2\text{]}}$$

3.4.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Abscherversuche erfolgte mit dem SPSS-Programm für Windows (Version 11.0), an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Abteilung für Medizinische Statistik und Epidemiologie.

3.4.6.1 Messfehlerberechnung

Als Messfehler wurde der Variationskoeffizient (in %) jeder der sechs Gruppen nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Variationskoeffizient [\%]} = \frac{\text{Standardabweichung [N]}}{\text{Mittelwert [N]}} \times 100$$

Anschließend wurde der Mittelwert aller sechs Koeffizienten ermittelt. Dieser Gesamt-Variationskoeffizient betrug 8,42 %. Auf den Medianwert der KOG (215,80 N) bezogen, entspricht dies einem Messfehler von 18,17 N (siehe Tab. 12 im Anhang). Medianwerte innerhalb des Messfehlerbereiches (215,80 N ± 18,17 N) sind statistisch nicht signifikant, außerhalb des Messfehlerbereiches statistisch signifikant

3.4.6.2 Deskriptive Statistik

Im ersten Schritt der Kontrollgruppenvergleiche werden die Eigenschaften der jeweiligen Merkmalsverteilungen mit Hilfe

- des Medianwertes (als Maß der zentralen Tendenz),
- der Standardabweichung (als Streuungsmaß) und
- des 25%-, des 50%- und des 75%-Perzentil (als Ordnungsstatistiken)

charakterisiert.

Die experimentellen Ergebnisse der Verbundfestigkeitswerte werden in tabellarischer und grafischer Form (Box-Whisker-Plots) dargestellt.

Die Boxplots repräsentieren grafisch die Verteilung und die Lage der Beobachtungswerte. Sie stellen den Medianwert, das 25%- und das 75%-Perzentil, extreme Werte und „Ausreißer“ sowie den Maximal- als auch den Minimalwert dar. Die so genannten „Ausreißer“ sind Werte, deren Abstand vom 25%-Perzentil nach unten bzw. vom 75%-Perzentil nach oben zwischen dem 1,5fachen und dem 3fachen der Boxhöhe liegt. Die Boxhöhe gibt den Abstand zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil wieder. Ein Wert wird als extremer Wert bezeichnet, wenn der Abstand dieses Wertes vom 25%- oder vom 75%-Perzentil mehr als das 3fache der Boxhöhe beträgt.

3.4.6.3 Teststatistik

Um die Auswirkungen der Desinfektion auf die Verbundfestigkeit zu überprüfen, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ durchgeführt. Im Rahmen des vorliegenden Versuchsdesigns prüft die einfaktorielle Varianzanalyse die Nullhypothese, dass die mittlere Verbundfestigkeit der nicht des-

infizierten Kontrollgruppe gegenüber den unterschiedlich desinfizierten Kunststoffbrackets sich nicht unterscheidet (der F-Test der Varianzanalyse wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ durchgeführt).

Um herauszufinden, welche der unterschiedlich vorbehandelten Bracketgruppen sich in ihrer Verbundfestigkeit signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden, wurden multiple paarweise Einzelvergleiche durchgeführt. Multiple paarweise Einzelvergleiche machen eine so genannte α -Adjustierung bzw. eine α -Fehler-Korrektur erforderlich, weil beim multiplen Testen mehrerer (richtiger) Nullhypothesen die Wahrscheinlichkeit, mindestens eine von ihnen (fälschlicherweise) abzulehnen, im Allgemeinen größer ist als das Signifikanzniveau α des Tests einer Einzelhypothese (BORTZ et al. 1990).

Das α -adjustierte Signifikanzniveau ($\alpha_{adj.}$) der hier durchgeführten multiplen paarweisen Einzeltests liegt bei $\alpha_{adj.} = 0,001$ (Bonferoni-Korrektur) und wird nach folgender Formel berechnet:

$$\alpha_{adj.} = \frac{\text{angenommenes Signifikanzniveau } (\alpha)}{\text{Anzahl der getesteten Gruppen}}$$