



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 197 58 598 B4** 2005.09.01

(12)

## Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **197 58 598.1**  
(22) Anmeldetag: **20.11.1997**  
(43) Offenlegungstag: **20.04.2000**  
(45) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: **01.09.2005**

(51) Int Cl.7: **C12Q 1/18**  
**C12Q 1/06, C12M 1/34**

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

(62) Teilung aus:  
**197 51 581.9**

(71) Patentinhaber:  
**Bechert, Thorsten, Dr., 96103 Hallstadt, DE;**  
**Steinrücke, Peter, Dr., 07743 Jena, DE**

(74) Vertreter:  
**Gassner, W., Dr.-Ing., Pat.-Anw., 91052 Erlangen**

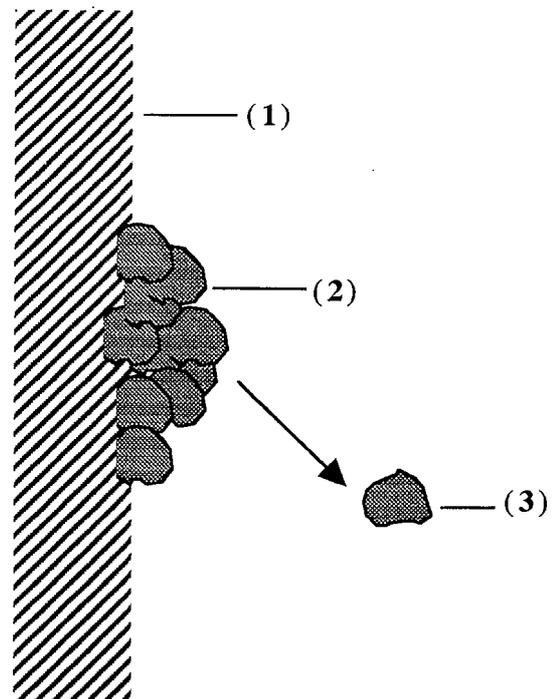
(72) Erfinder:  
**gleich Patentinhaber**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:  
**WO 95 20 878 A1**  
**WO 94 04 202 A1**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Prüfung von Materialien hinsichtlich ihrer potentiellen antimikrobiellen Wirksamkeit und der Proliferation von Zellen auf ihrer Oberfläche**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Prüfung der Proliferation von Mikroorganismen auf der Oberfläche von Proben eines Werkstoffs mit folgenden Schritten:

- a) Bereitstellen einer Vielzahl von losen Proben gleich großer Fläche,
- b) erste Inkubation der Proben in einer die Mikroorganismen enthaltenden ersten Lösung,
- c) Herausnehmen der Proben aus der ersten Lösung und Waschen der Proben mit einem physiologischen Puffer,
- d) zweite Inkubation der Proben in einem Minimalmedium, welches ausreicht, um den Mikroorganismus am Leben zu erhalten, wobei die Zellteilungsrate stark reduziert wird,
- e) Herausnehmen der Proben aus dem Minimalmedium,
- f1) Herstellung einer zweiten Lösung durch Hinzusetzen eines Vollmediums zum Minimalmedium, oder
- f2) Überführen der Proben in ein Vollmedium, und
- g) kontinuierliche Bestimmung der Trübung der zweiten Lösung bei Schritt lit. f1) oder Messen der optischen Dichte bei Schritt lit. f2).



**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen und qualitativen Untersuchung von Wechselwirkungen zweier Substanzen bzw. Reaktionspartner. Insbesondere können Werkstoffe (z. B. Biomaterialien) bzw. Beschichtungsmaterialien auf antimikrobielle Wirksamkeit getestet werden und diese kann quantifiziert werden; außerdem kann die Proliferation von lebenden Systemen, wie z. B. Mikroorganismen, auf Oberflächen, insbesondere den Oberflächen von Biomaterialien, quantifiziert werden. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren, mit dem eine große Anzahl von Proben simultan unter identischen Bedingungen untersucht werden kann.

**[0002]** In der Forschung und Industrie werden permanent neu- und weiterentwickelte Biomaterialien und Werkstoffe auf den Markt gebracht. In der Medizin umfassen diese Biomaterialien den Bereich der Prothetik (Künstliche Gelenke, Klappen, Zahnersatz etc.) und der Intensivmedizin (Zu- und Abführleitungen, Katheter). Weitere generelle Industrie-Entwicklungen umfassen Bereiche wie biologische Abbaufähigkeit von Kunststoffen (Umwelttechnik), Widerstandskraft und Haltbarkeit der Werkstoffe, sowie deren biochemische Eigenschaften (Inertheit, Hydrophobizität, Biokompatibilität etc.). Durch Forschung und Entwicklung werden Werkstoffe neu kreiert und Oberflächen modifiziert, um die gewünschten Eigenschaften zu erhalten.

**[0003]** Bei der Prüfung von Werkstoffen und Biomaterialien sind besonders die Prüfung auf antimikrobielle Wirksamkeit der Werkstoffe/Biomaterialien einerseits und die Quantifizierung der Adhäsion von (bio)chemischen Substanzen und Zellen auf Werkstoffoberflächen andererseits zu nennen.

**[0004]** Die Prüfung auf antimikrobielle Wirksamkeit betrifft hauptsächlich das Gebiet der Medizin. Die Implantation von Biomaterialien ist ein Meilenstein der modernen Medizin. Für den Patienten werden durch Biomaterialien lebenserhaltende Aufgaben wahrgenommen. Gleichzeitig verbirgt sich bei der Anwendung eines der vordringlichsten Probleme in der Klinik: die Fremdkörper-assoziierte Infektion, ausgelöst durch an sich harmlose Hautmikroorganismen, die das Implantat kolonisieren. In den USA werden jährlich allein bis zu 850000 Katheterassoziierte Infektionen festgestellt. Die Folgekosten von Katheterinfektionen werden mit 3000–6000 US-Dollar pro Fall beziffert. Neben dem klinischen Bereich findet die Prüfung auf antimikrobielle Wirksamkeit beispielsweise Verwendung in der Bier- und Weinindustrie. Auch bei Küchen- und Bad/WC-Einrichtungen, Spülmitteln und Lotionen etc. ist ein Trend zu antimikrobiellen Materialien erkennbar, so dass auch auf diesen Gebieten ein wachsender Bedarf an Prüfungsmethoden für an-

timikrobielle Wirksamkeit besteht.

**[0005]** Die Entwicklung von Materialien mit antimikrobiellen Eigenschaften ist ein Schwerpunktthema für Forschung und Industrie und bietet durch die Verhinderung von Infektionen das Potenzial zur Rettung von Menschenleben und zu Einsparungen in Milliardenhöhe. Die Zahl eingeführter neuer Produkte mit antimikrobiellen Eigenschaften steigt stetig.

**[0006]** Die Quantifizierung der Adhäsion von lebenden Systemen und (bio)chemischen Substanzen auf Werkstoffoberflächen findet sich mit dem gleichen Stellenwert sowohl in der medizinischen Forschung und Entwicklung als auch in der chemischen/biochemischen Industrie und Werkstoffwissenschaft.

**[0007]** Eine antimikrobielle Wirksamkeit (Aktivität) eines Werkstoffs oder einer Substanz kann grundsätzlich auf zwei, voneinander zu trennende, Eigenschaften des Materials zurückzuführen sein:

- entweder das Material lässt eine mikrobielle Besiedelung bzw. Anhaftung nicht zu, oder
- das Material entfaltet Eigenschaften, die zur Abtötung von Mikroorganismen führen, die das Material besiedeln haben.

**[0008]** Die Eigenschaft eines Stoffs, Mikroben abzutöten, muss in vitro in einem Versuchsmodell nachvollziehbar sein (Qualitätskontrolle oder "Screening"). Bei einem entsprechenden Test wird das Material zuerst mit Mikroorganismen besiedelt und anschließend das Wachstumsverhalten (Proliferation und Vitalität) der Mikroorganismen verfolgt.

**[0009]** Bei der Quantifizierung der Adhäsion von lebenden Systemen oder (bio)chemischen Substanzen wird die Probe mit dem zu untersuchenden Material inkubiert (in vitro), um das Adhäsionsverhalten (Affinität und Chemie der Wechselwirkung) studieren zu können.

**[0010]** Entsprechende Testverfahren sollen idealerweise folgenden Anforderungen genügen:

- Zur Prüfung auf antimikrobielle Wirksamkeit sollten potenziell antimikrobielle Probe und Kontrolle (Probe ohne antimikrobielle Wirkung) unter simultanen Versuchsbedingungen gegenübergestellt werden können.
- Um eine aussagekräftige Statistik und Fehlerrechnung zu ermöglichen und aus Gründen der Ökonomie soll das Verfahren die gleichzeitige Prüfung einer hohen Anzahl von Proben (ca. 100 Proben) ermöglichen.
- Für vergleichende quantitative Aussagen muss sichergestellt sein, dass bei allen Proben eine definierte, gleich große Fläche gemessen wird.
- Das Verfahren soll schnell, reproduzierbar (d. h. mit minimalem statistischen Fehler) und kostengünstig sein.

- Das Verfahren soll in der Lage sein, geringste Unterschiede in den Aktivitäten verschiedener Proben zu erfassen, d. h. hoch sensitiv sein.
- Die Auswertung der Daten sollte durch ein EDV-gesteuertes automatisiertes Auswerteverfahren erfolgen.
- Das Wachstumsverhalten (Proliferation) der Mikroorganismen auf den Proben sollte zeitaufgelöst (online) z. B. durch Fotometrie (d. h. Messung der optischen Dichte) auswertbar sein.

**[0011]** Bis heute gibt es kein Verfahren, das die oben angesprochenen Anforderungen auch nur annähernd erfüllt. Die Verfahren, die bis zum heutigen Zeitpunkt in der Wissenschaft/Forschung und Entwicklung zur Prüfung von Biomaterialien Anwendung finden, sind nicht eindeutig definiert und mit großen Fehlern behaftet und daher wenig aussagekräftig; außerdem sind sie nicht ökonomisch.

#### Stand der Technik

**[0012]** Bekannt sind folgende Methoden: Eine weltweit angewandte Methode ist der "semi-quantitative" Keimnachweis auf der Oberfläche von Biomaterialien durch Ausrolltechnik nach Maki (Maki D.G., C.E. Weise, H.W. Sarafin: A semi-quantitative culture method for identifying intravenous catheter related infection. *N. Engl J. Med.* 296 (1977), 1305–1309). Dabei wird das zu prüfende Biomaterial unter möglichst sterilen Bedingungen manuell auf einer Agarplatte mit einer Pinzette hin- und hergerollt (eine Probe pro Agarplatte). Nach anschließender Bebrütung der Agarplatte kann über das bakterielle Wachstum "semiquantitativ" (durch Zählen der Kolonien) die antimikrobielle Wirksamkeit oder Adhäsions-Eigenschaft des Biomaterials bestimmt werden.

**[0013]** Diese Methode weist folgende Nachteile auf: Die manuelle Durchführung ist nicht zu 100% reproduzierbar; außerdem bestehen keine simultanen Durchführungsbedingungen. Das Verfahren ist unökonomisch und mit einem hohen statistischen Fehler belegt. Des Weiteren gibt es keine definierte Messfläche.

**[0014]** Ein weiteres Verfahren ist die Flush-Technik nach Cleri et al., (Cleri D.J., M.L. Corrado, und S.J. Seligman: Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. *J. Infect. Dis.* 141 (1980), 781–786) bei der Biomaterialien (Schläuche) durchspült werden, das Eluat in verschiedenen Verdünnungsstufen (manuell) auf Agarplatten plattiert und die Keimzahlen ausgezählt werden.

**[0015]** Die Methode weist die gleichen Nachteile auf wie die oben beschriebene von Maki.

**[0016]** Auch die Ultraschallbehandlung nach She-

rertz (Sherertz R. J. et al., 1990: three-Year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory.

**[0017]** *Jour. of clin. microbiology* (1990), 76–82, bei der Bakterien auf der Oberfläche von Biomaterialien durch Ultraschall abgelöst (in Bouillon) werden und anschließend durch Ausplattieren die Anzahl der Keime bestimmt wird, findet Verwendung.

**[0018]** Abgesehen von unzureichenden Kenntnissen der Wirkungen von Ultraschall auf Mikroorganismen weist diese Methode ebenfalls die oben beschriebenen Nachteile auf.

**[0019]** Auch Hemmhofmessungen, bei denen die Zone der Inhibition mikrobiellen Wachstums gemessen wird, finden Verwendung (Raad I., R. Darouche, R. Hachem, M. Mansouri, G.P. Bodey: The broad-spectrum activity and efficacy of catheters coated with minocycline and rifampin. *J. Infec Dis.* 173 (1996), 418–424; und Sampath L.A. et al., 1995: Infection resistance of surface modified catheters with either short-lived or prolonged activity. *Jour. of hosp. infection* (1995), 201–210). Die Hemmhofmessung ist zur Beurteilung der Besiedelbarkeit von Materialien nur eingeschränkt geeignet, weil die potenzielle Aktivität unmittelbar auf der Oberfläche nicht erfasst wird. Ein fehlender Hemmhof muss nicht zwangsläufig eine fehlende antimikrobielle Aktivität bedeuten.

**[0020]** Aus der WO 95/20878 A1 ein Verfahren zur Prüfung der Proliferation von Mikroorganismen auf der Oberfläche von Proben eines Werkstoffs bekannt. Dabei wird der mit Keimsuspension belastete Werkstoff in einen Brutschrank eingebracht. Die Keimsuspension wird eingetrocknet. Nach dem Eintrocknen der Keimsuspension wird diese wieder resuspendiert und anschließend die Trübung der wieder hergestellten Suspension gemessen.

**[0021]** Die WO 94/04202 A1 beschreibt die Prüfung der Proliferation von Mikroorganismen auf der Oberfläche eines Katheters. Der Katheter wird dazu zunächst mit Keimsuspension durchspült. Dann wird der so behandelte Katheter in einem Vollmedium inkubiert und anschließend dessen Trübung bestimmt.

**[0022]** Die beschriebenen Verfahren basieren auf Techniken der klassischen Mikrobiologie. Keines der Verfahren erfüllt jedoch die oben angesprochenen Anforderungen. Die Hauptangriffspunkte der aufgeführten Methoden sind die unzureichend beschriebene Reproduzierbarkeit, die unvollständige Fehlererfassung der Methode und die fehlende simultane Versuchsdurchführung. Überaus ungenügend ist in vielen Arbeiten die Beschreibung "semiquantitativ", womit die verwendete Methode sich selbst als unzureichend deklariert.

## Aufgabenstellung

**[0023]** Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, einen Weg aufzuzeigen, wie die antimikrobielle Wirksamkeit von gegebenenfalls vorbehandelten Werkstoffen, insbesondere Biomaterialien, getestet werden kann und eine Quantifizierung der Proliferation von Mikroorganismen und Zellen auf Oberflächen möglich ist, wobei die oben genannten Anforderungen erfüllt sind.

**[0024]** Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren mit den im Anspruch 1 angegebenen Merkmalen gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 9.

**[0025]** [Fig. 1](#) zeigt die bakterielle Proliferation, die bei der Prüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit gemäß Beispiel 1 nachvollzogen wird. (1) Prüfling, (2) Proliferation von Mikroben oder Zellen, (3) vitale Tochterzelle, die in das umgebende Milieu entlassen wird.

**[0026]** [Fig. 2](#) zeigt die Ergebnisse von Beispiel 1, wie sie die Software des Mikrotiterplatten-Lesegeräts darstellt.

**[0027]** Beim Verfahren zur Prüfung von Werkstoffen auf antimikrobielle Wirksamkeit können die verschiedensten Arten von Werkstoffen getestet werden; besonders interessant ist die Verwendung von Biomaterialien, d. h. Materialien, die in der Prothetik und Intensivmedizin eine Rolle spielen. Die Proben können z. B. in Form von Kunststoff-Schläuchen, Strängen, Borsten und Kügelchen vorliegen. Auch Stoffe und Papiere, wie z. B. Taschentücher, Babywindeln und Tücher für den Klinikbereich können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren untersucht werden. Wichtig für vergleichende Aussagen ist, dass die zu vergleichenden Proben alle die gleiche Geometrie und Größe aufweisen, damit Effekte, die auf unterschiedliche Geometrie und Größe zurückzuführen wären, ausgeschlossen werden können. Die zu untersuchenden Proben können auf antimikrobielle Wirksamkeit gegenüber den unterschiedlichsten Bakterien, Pilzen und Hefen getestet werden. Wichtig im medizinischen Bereich ist z. B. die Wirksamkeit gegenüber Staphylokokken.

**[0028]** Bei den erfindungsgemäß zu untersuchenden Werkstoffproben kann es sich auch um vorbehandelte Werkstoffe handeln; unter Vorbehandlung wird z. B. auch eine Beschichtung mit Anstrichen oder Lacken aber auch mit Proteinen oder Detergenzien verstanden. Bei beschichteten Werkstoffen ist dann genau genommen das Beschichtungsmaterial die zu untersuchende Probe. Auf diese Weise ist es z. B. möglich, auch Flüssigkeiten und Lotionen auf potenzielle antimikrobielle Wirksamkeit zu testen. Der "Werkstoff" stellt dann nur einen Träger dar;

wichtig ist dabei allerdings, dass eine gleichmäßige Beschichtung erreicht wird, bevor die Probe erfindungsgemäß getestet werden kann.

**[0029]** Entscheidend für das Verfahren zur Prüfung der antimikrobiellen Wirksamkeit ist die Inkubation mit einem Minimalmedium zur Entfaltung und zum Nachweis der potenziellen Aktivität. Das zu verwendende Minimalmedium hängt von dem verwendeten Mikroorganismus ab und kann individuell zusammengesetzt werden, sofern gewährleistet ist, dass das Medium ausreicht, um den Mikroorganismus am Leben zu erhalten aber die Zellteilungsrate stark reduziert ist. Die Inkubationszeit mit dem Minimalmedium kann beliebig variiert werden und z. B. im Bereich von 2 bis 50 Stunden liegen.

**[0030]** Danach wird die Probe in eine Nährlösung ("Vollmedium") überführt, die dann einen Proliferationsreiz für den Mikroorganismus darstellt. Die Nährlösung richtet sich nach dem verwendeten Mikroorganismus und kann entweder der Fachliteratur entnommen oder im Labor individuell zusammengestellt werden. Bei der Proliferation von Zellen auf Oberflächen werden vitale Zellen ins Medium entlassen, was zu einer Trübung führt. Diese Trübung (optische Dichte) kann fotometrisch erfasst werden: Je trüber das Medium ist, desto mehr vitale Zellen wurden abgegeben, d. h. desto geringer ist die antimikrobielle Wirksamkeit der geprüften Probe.

**[0031]** Gemäß einer alternativen Ausführungsform wird die Probe aus dem Minimalmedium entfernt und 1 bis 1/100 Volumenanteil, bevorzugt 1 bis 1/10 Volumenanteil Vollmedium zum Minimalmedium zugegeben; danach erfolgt die zeitaufgelöste Bestimmung der optischen Dichte des Mediums (Kinetik). Die online entstehenden Wachstumskurven (EDV-überwacht) reflektieren das Ausmaß der antimikrobiellen Wirksamkeit.

**[0032]** Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann eine große Anzahl von Proben (bis 384) simultan untersucht werden, wenn Proben gleicher Geometrie und Größe in eine handelsübliche Mikrotiterplatte mit 96 bis 384 Vertiefungen oder eine entsprechende Vorrichtung eingebracht werden. Die Bestimmung der optischen Dichte kann mit einem kommerziellen EDV-gesteuerten Mikrotiterplatten-Lesegerät erfolgen. Anstelle einer Endpunktmessung kann auch eine zeitaufgelöste online Messung erfolgen.

**[0033]** Durch Zugabe kleiner Mengen (1 bis 1/2000 Volumenanteil, bevorzugt 1/25 bis 1/1000 Volumenanteil) Vollmedium zum Minimalmedium kann die Sensitivität des erfindungsgemäßen Verfahrens weiter gesteigert werden. Dadurch wird die Vitalität der Mikroorganismen so eingestellt, dass auch geringste antimikrobielle Aktivitäten der Probe nachweisbar sind.

**[0034]** Das beschriebene Verfahren wird mit losen Proben durchgeführt, wie das unten beschriebene Beispiel 1 zeigt. Die Proben werden dabei manuell mit einer sterilen Pinzette von einem Reaktionsgefäß zum nächsten überführt.

**[0035]** Die einheitliche Geometrie der Proben ist vorzugsweise zylindrisch; jedoch sind auch andere Formen wie bananenförmig, birnenförmig oder quaderförmig möglich, sofern alle Proben die gleiche Geometrie und Größe aufweisen. Der maximale Durchmesser der Proben ist vorzugsweise so groß wie die Hälfte des Durchmessers der Vertiefungen oder kleiner.

**[0036]** Bei der vorliegenden Erfindung werden antimikrobielle Werkstoffe einer Kontrolle (Werkstoff ohne antimikrobielle Wirkung) unter simultanen Versuchsbedingungen gegenübergestellt. Durch die gleichzeitige Untersuchung einer hohen Anzahl von Proben (z. B. 96 Proben) ist eine aussagekräftige Statistik und Fehlerrechnung möglich und das Verfahren ist außerdem sehr ökonomisch.

**[0037]** Das Verfahren zeichnet sich außerdem dadurch aus, dass bei allen Proben eine definierte gleich große Fläche gemessen wird, wodurch vergleichende quantitative Aussagen möglich sind.

**[0038]** Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass geringste Unterschiede in der Aktivität erfasst werden können und das Verfahren damit hochsensitiv ist.

**[0039]** Die Anwender-Freundlichkeit des bereitgestellten Verfahrens ist mit "sehr hoch" einzustufen. Die technischen Anforderungen (Geräte, Software, Laboratorien usw.) zur Anwendung des Verfahrens gehören zur Grundausstattung von Forschungseinrichtungen und erfordern keine weiteren größeren Investitionen. So ist z. B. die 96-Loch Mikrotiterplatte mit Deckel, die als Probengefäß dient, seit mehr als 20 Jahren Industriestandard und die EDV-gesteuerte Analyse übernimmt ein herkömmliches Mikrotiterplatten-Lesegerät (gleichzeitig Fotometer und "Plattenreader").

**[0040]** Das Verfahren kann in allen Bereichen zur Anwendung gelangen, die sich mit der Entwicklung/Prüfung von Werkstoffen/Biomaterialien, auch von Arzneimitteln wie Salben und Lotionen und Oberflächenbeschichtungen in Form von Anstrichen, Lacken etc. oder Detergenzien, befassen oder die die Wechselwirkung einer Matrix mit Mikroorganismen studieren (Adhäsion), z. B. in der Großindustrie, der Biomedizin und Pharmaindustrie, in mittelständischen Industrieunternehmen, der Lebensmittelindustrie, in Hochschulen, sowie in Forschungseinrichtungen für angewandte Forschung und Grundlagenforschung. Die Verfahren können bei der Produktent-

wicklung, -verbesserung und Qualitätskontrolle eingesetzt werden.

#### Ausführungsbeispiel

**[0041]** Das folgende Beispiel erläutert die Prüfung auf antimikrobielle Wirksamkeit von Biomaterialien (Beispiel 1).

**[0042]** In der Klinik für Kinder und Jugendliche der Universität Erlangen-Nürnberg wird seit ca. 5 Jahren an der Entwicklung neuer Kathetermaterialien mit antimikrobieller Wirksamkeit gearbeitet (siehe oben zur Problematik der Katheterinfektionen). Durch Einbringung von Silber in das aus Polyurethan bestehende Kathetermaterial wurde ein neues antimikrobielles Biomaterial entwickelt. Mit dem Mikrotiterplatten-Kamm-Modell wurde der neue Katheter-Werkstoff auf antimikrobielle und antiadhäsive Eigenschaften geprüft und Kontrollkathetern gegenübergestellt (silberfreie kommerzielle Katheter).

**[0043]** [Fig. 1](#) erläutert schematisch die bakterielle Proliferation **2**, wie sie im Verfahren nachvollzogen wird. Es ist eine Probe **1** sowie eine an das Medium abgegebene vitale Zelle **3** gezeigt.

**[0044]** Die [Fig. 2](#) zeigt den Ausdruck der Ergebnisse von Beispiel 1, wie er vom EDV-gesteuerten Mikrotiterplatten-Lesegerät erhalten wird.

#### Beispiel 1

Proliferationsassay zur Prüfung der antibakteriellen Wirksamkeit in Silberpolyurethan ([Fig. 2](#))

**[0045]** Es wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

1. Bereitstellung von losen Proben: 12 identische Proben Polyurethan (ohne Silber), 12 identische Proben Silberpolyurethan-Prototyp I, 12 identische Proben Silberpolyurethan-Prototyp II (alle Prüflinge haben die gleichen Abmessungen) wurden in die Vertiefung einer Mikrotiterplatte gelegt. Die Proben waren zylinderförmig mit einer Länge von 1,1 cm und einem Durchmesser von 2 mm.
2. Füllen der Mikrotiterplatte mit 20 µl Bakterienlösung pro Vertiefung (Testkeim Staphylokokkus epidermidis,  $10^8$  logphase Zellen pro ml Inkubationsmedium (handelsübliches Trypcase Soja; Trypcase Soja ist eine Marke der Firma bioMerieux) wurden 1 : 20 mit physiologischem Puffer (Phosphat) verdünnt).
3. Inkubation bei 37°C für 60 Minuten (37°C).
4. Absaugen der Bakterien und 3-maliges Waschen der Probe mit physiologischem Puffer.
5. Setzen der Probe in eine mit Minimal-Medium (physiologischer Phosphat-Puffer mit 0,25% Glucose, 0,2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1% Trypcase Soja Medium) gefüllte Mikrotiterplatte (200 µl/well), Inkuba-

tion für 24 Stunden bei 37°C (Nachweis der Proliferationsaktivität, [Fig. 1](#) entsprechend).

6. Entnahme und Verwurf der Probe. Zugabe von 50 µl/well Vollmedium (Trypcase Soja) zur Titerplatte. Kontinuierliche Trübungsmessung (48 Stunden, Intervall 30 min, 37°C, 587 nm) in einem geeigneten Lesegerät. Aufzeichnung der Kinetik der bakteriellen Proliferation.

7. Interpretation der Wachstumskurven ([Fig. 2](#)) oder statt Nr. 6 und 7

6a. Überführung der Probe in ein Vollmedium.

7a. Nach entsprechender Inkubationszeit Entnahme der Probe und Messen der optischen Dichte.

**[0046]** Die Wachstumskurven zeigen folgendes Ergebnis ([Fig. 2](#)):

Reihen 1/2: Polyurethan ohne Silber zeigt keine antimikrobielle Aktivität. Alle Prüflinge zeigen ein rapides logarithmisches Wachstum der Bakterien.

Reihen 3/4: Polyurethan-Silberprototyp I zeigt antimikrobielle Aktivität. Alle Prüflinge zeigen eine deutlich verlängerte Lagphase. Die ausgedehnte Lagphase deutet auf eine stark verminderte Proliferation der Bakterien. Die Prüflinge zeigen bakteriostatische Aktivität.

Reihen 5/6: Polyurethan-Silberprototyp II zeigt hohe antimikrobielle Aktivität. Alle Prüflinge zeigen sich steril, Bakterien wurden vollständig abgetötet, eine Proliferation ist nicht nachweisbar. Die Prüflinge zeigen somit bakterizide Aktivität.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Prüfung der Proliferation von Mikroorganismen auf der Oberfläche von Proben eines Werkstoffs mit folgenden Schritten:

- a) Bereitstellen einer Vielzahl von losen Proben gleich großer Fläche,
- b) erste Inkubation der Proben in einer die Mikroorganismen enthaltenden ersten Lösung,
- c) Herausnehmen der Proben aus der ersten Lösung und Waschen der Proben mit einem physiologischen Puffer,
- d) zweite Inkubation der Proben in einem Minimalmedium, welches ausreicht, um den Mikroorganismus am Leben zu erhalten, wobei die Zellteilungsrate stark reduziert wird,
- e) Herausnehmen der Proben aus dem Minimalmedium,
- f1) Herstellung einer zweiten Lösung durch Hinzusetzen eines Vollmediums zum Minimalmedium, oder
- f2) Überführen der Proben in ein Vollmedium, und
- g) kontinuierliche Bestimmung der Trübung der zweiten Lösung bei Schritt lit. f1) oder Messen der optischen Dichte bei Schritt lit. f2).

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Trübung über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachtet wird.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Trübung im Abstand von 30 Minuten gemessen wird.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Trübungsmessung mittels eines EDV-gesteuerten Lesegeräts, vorzugsweise eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts, durchgeführt wird.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Minimalmedium physiologischen Puffer mit 0,25% Glucose, 0,2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 1% Vollmedium enthält.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei dem Minimalmedium zur kontinuierlichen Trübungsmessung 1 bis 1/2000tel, vorzugsweise 1 bis 1/10tel, Volumenanteil eines Vollmediums zugesetzt wird.

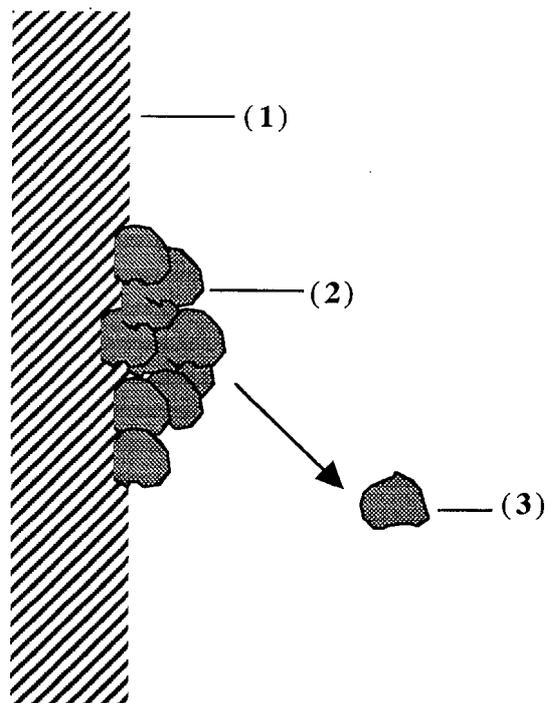
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Trübung photometrisch mit Licht einer Wellenlänge von 578 nm gemessen wird.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die zweite Inkubation für eine Dauer von 2 bis 50 Stunden erfolgt.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Prüfung der Proliferation bei allen Proben eine gleich große Fläche der Oberfläche gemessen wird.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



**Fig.1**

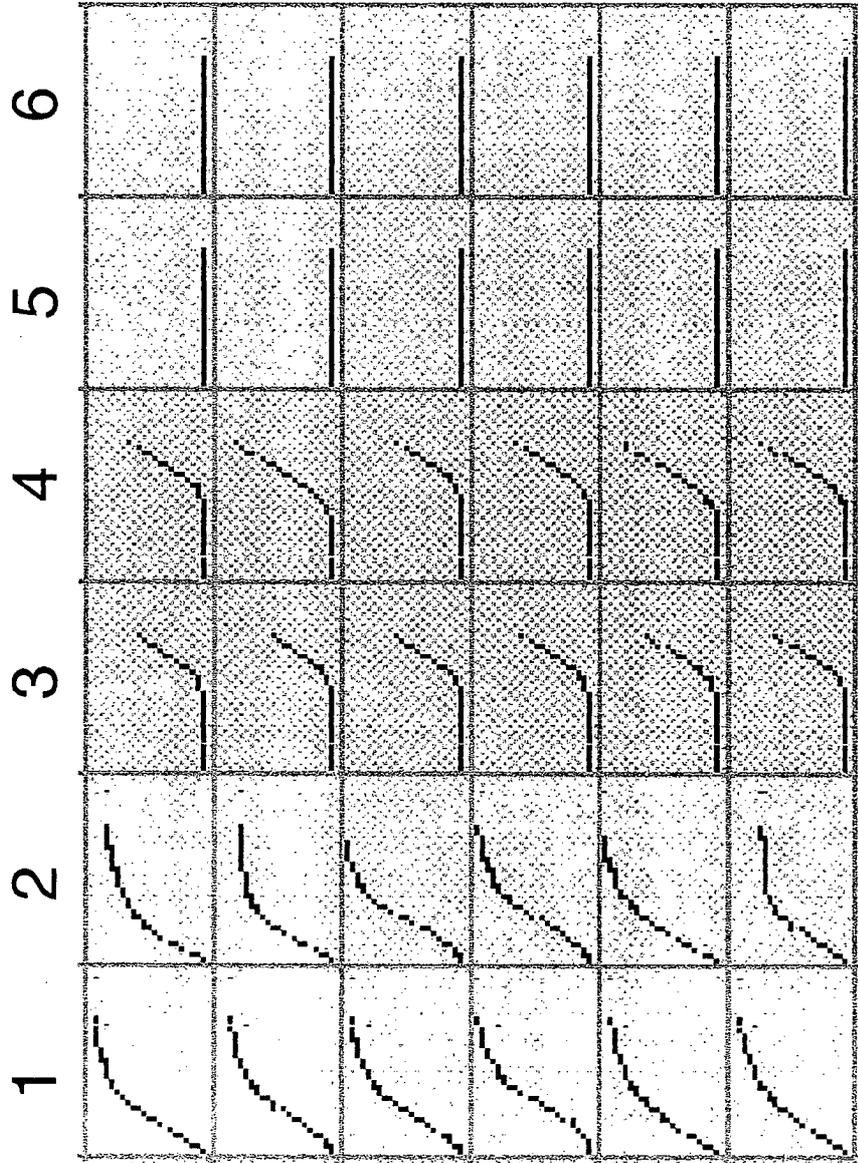


Fig. 2