

# Antibakterielle Aktivität von Anti-Fog-/Anti-Scratch-Silber-Beschichtungen auf Polymethylmethacrylat-Probekörper gegenüber Polymethylmethacrylat-Referenz nach DIN ISO 22196

Auftraggeber /Firma:	Global Prefer AG
Adresse:	Lagerlechfelder Straße 38 86836 Untermeitingen z.Hd. Herrn Ostermeier
Angebotsnummer:	10/237/20
Probekörper:	unbehandelte Polymethylmethacrylat (PMMA)-Referenzkörper (6 Stück): <ol style="list-style-type: none"><li>Größe 5 x 5cm</li><li>Dicke 2 mm</li><li>3 Referenzprobekörper für t0 (PMMA 1-3)</li><li>3 Referenzprobekörper für t24h (PMMA 4-6)</li></ol> AcryFlex 7003 AF + 1% Ag-Disp.1-Probekörper (6 Stück): <ol style="list-style-type: none"><li>Anti-Fog-Beschichtung mit zugesetzten Ag-Partikeln</li><li>Größe 5 x 5cm</li><li>Dicke 1 mm</li><li>6 Probekörper für t24h</li></ol> AcryFlex 1001-1 AS + 1% Ag-Disp.2-Probekörper (3 Stück): <ol style="list-style-type: none"><li>Anti-Scratch-Beschichtung mit zugesetzten Ag-Partikeln</li><li>Größe 5 x 5cm</li><li>Dicke 1 mm</li><li>3 Probekörper für t24h</li></ol>
Testanforderung:	Testung der antibakteriellen Aktivität von Produktoberflächen nach DIN ISO 22196 (2007)
Testadaption:	<ul style="list-style-type: none"><li>- 5 ml 0.9% NaCl als Spülflüssigkeit</li><li>- Reduktion des Inokulumvolumens auf 100µl</li><li>- Erhöhung KBE/ml des Inokulums auf <math>2,0 \times 10^6</math> KBE/ml</li></ul>
Teststamm:	Gram-negatives Bakterium: <i>E.coli</i> DSM 1607
Datum der Testdurchführung:	07.12.2020
Datum des Berichts:	15.12.2020
Seitenanzahl des Berichts:	5
Laborleiter:	Dr. Jürgen Weisser
Testdurchführung:	Dr. Svea Sachse Monika Döpel
Testlabor:	INNOVENT e.V. Prüssingstraße 27 B 07745 Jena

## Probenvorbereitung

Die Probekörper sowie die Folienzuschnitte wurden mit in 70% Ethanol (v/v) getränkter sterilen Watte gereinigt und mit sterilem Reinstwasser sorgfältig abgespült. Die Trocknung der Probekörper als auch der Folienzuschnitte erfolgte unter der Sterilbank.

## Methode

Der Test wird nach der DIN ISO 22196 durchgeführt. Je 400 µl des *E. coli*-Inokulums mit einer Keimdichte von ca.  $0,5 \times 10^6$  KBE/ml werden auf die beschichtete Seite der Probekörper (5 x 5 cm) pipettiert, und mit einer sterilen Folie (4 x 4 cm) bedeckt. Die Folie verhindert die Verdunstung des Inokulumvolumens und sorgt für eine gleichmäßige Verteilung der Bakteriensuspension auf einer definierten Fläche. Der Test wird durch das Entfernen der Folie und das ausgiebige Spülen der Probekörperfläche sowie der Folie mit 5 ml 0,9 % NaCl abgestoppt. Für drei Replikate der Referenz-Probekörper erfolgt das Abstoppen unmittelbar nach Inkubationsbeginn zum Zeitpunkt  $t_0$ . Alle anderen zu testenden Probekörper werden für 24 h bei 37 °C in einer feuchten Kammer bebrütet und am Folgetag wie oben beschrieben behandelt ( $t_{24}$  h). Die Kolonien bildenden Einheiten (KBE) jedes Spülvolumens/pro Probekörper werden durch das Auftragen von Aliquots einer seriellen Verdünnungsreihe in Doppelbestimmung auf CASO-Agarplatten ermittelt. Die Anzahl lebensfähiger Bakterien wird durch das Auszählen der vorhandenen Kolonien auf den Agarplatten nach Inkubation von 18 h bei 35 °C erhalten. Gemäß der DIN ISO 22196 werden die erhaltenen KBE-Werte auf die Testfläche bezogen. Im Fall, dass der KBE-Wert auf der Platte Null beträgt, also keine Kolonien auf der Platte nachweisbar sind, wird mit dem Wert von 1 KBE bei unverdünnter Probenauftragung gerechnet und das als Nachweisgrenze betrachtet. Der theoretische Hintergrund ist, dass die Nachweisgrenze vom Volumen des auf die Platte aufgetragenen Aliquots abhängt. Beispielsweise können bei Auftragung von 30 µl der seriellen Verdünnungsreihe die KBE-Konzentrationen  $< 33$  KBE/ml prinzipiell zu leeren Platten führen, wobei statistische Verteilungsprobleme außer Acht gelassen werden.

Die antibakterielle Aktivität R basiert auf der logarithmischen Verrechnung der KBE/ml/cm<sup>2</sup> der Referenzprobekörper zum Zeitpunkt  $t_{24}$  ( $U_t = \log_{10}(\text{KBE/ml/cm}^2 \text{ Referenz } t_{24})$ ) und der behandelten Probekörper (T) zum Zeitpunkt  $t_{24}$  ( $A_t = \log_{10}(\text{KBE/ml/cm}^2 \text{ Probe } t_{24})$ ). Der Aktivitätswert R wird als Differenz  $R = U_t - A_t$  berechnet. Der R-Wert repräsentiert also die Abnahme des KBE-Wertes der Probe gegenüber der Referenz auf einer logarithmischen Skala (log-Stufen-Reduktion). Eine Abnahme um 1-log<sub>10</sub>-Stufe korreliert mit einer KBE-Reduzierung um 90 %, eine Abnahme um 2-log<sub>10</sub>-Stufen entspricht einer 99 % Keimreduzierung usw. Keine antibakterielle Aktivität liegt bei einem Wert von  $R = 0$  vor. (Negative R-Werte stehen für eine Zunahme der KBE-Werte gegenüber der Referenz.)

## Bemerkungen zur Methode

Um sicher zu stellen, dass die „aktive“ Oberfläche getestet wird, empfiehlt es sich, die nicht aktive Oberfläche der Probekörper (Rückseite) mit einer Probenkennung zu versehen. In dieser Untersuchung wurden bei allen Probekörpern die in der Aufbewahrungsbox nach oben zeigende Fläche getestet.

Bei hydrophilen Oberflächen wird die Reduzierung des Testvolumens empfohlen, um ein Abfließen der Bakteriensuspension von den Probekörpern zu verhindern. In diesem Versuch wurde das Inokulumvolumen von 400 µl (Standard) auf 100µl gesenkt. Die Senkung des Testvolumens erfordert eine Anhebung der KBE/ ml der *E. coli*-Inokulums um den Faktor 4 auf  $2,0 \times 10^6$  KBE/ml.

## Ergebnisdokumentation

*E. coli* DSM 1607 initiale Bakteriensuspension:  $2,37 \times 10^6$  KBE/ml

eingesetztes Volumen: 100µl

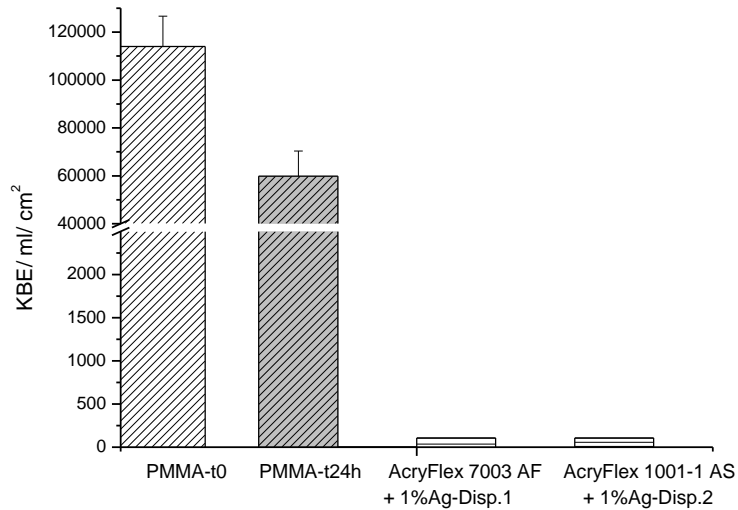


Abbildung 1: Grafik mit KBE/ml/cm<sup>2</sup> der PMMA-Referenzprobekörper ohne Beschichtung zum Zeitpunkt t0 und t24h im Vergleich zu den Anti-Fog-beschichteten Probekörpern AcryFlex 7003 AF + 1% Ag-Disp.1 und die Anti-Scratch-beschichteten Probekörpern AcryFlex 1001-1 AS + 1% Ag-Disp.2 zum Zeitpunkt t24h. Die Werte der beschichteten Probekörper sind als Grenzwert dargestellt und nehmen je einen Wert von < 106 KBE/ml/cm<sup>2</sup> ein.

Tabelle 1: Gemittelte Anzahl der KBE/ml/cm<sup>2</sup> von *E. coli* nach Inkubation der Referenz- und der beschichteten Probekörper zum Zeitpunkt t0 und t24h. Die Angaben der KBE/ml beziehen sich gemäß der DIN ISO 22196 auf die cm<sup>2</sup> der bedeckten Testfläche. Die Ergebnisse werden aus den KBE der relevanten Verdünnungsstufe und –faktoren errechnet, siehe Anhang Tabelle 4. (CV = Variationskoeffizient in Prozent, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n. e. = nicht ermittelbar.)

Proben	Proben-ID	t	MW KBE/ml/cm <sup>2</sup>	SD	CV
Referenz	PMMA	t0	1,14E+05	1,27E+04	11,18 %
Referenz	PMMA	t24h	5,98E+04	1,06E+04	17,67 %
behandelte Probe	AcryFlex 7003 AF + 1% Ag-Disp.1	t24h	< 1,06E+02	n.e.	n.e.
behandelte Probe	AcryFlex 1001-1 AS + 1% Ag-Disp.2	t24h	< 1,06E+02	n.e.	n.e.

## Berechnung der biologischen Aktivität R

Bei Agarplatten ohne bakterielles Wachstum lässt sich kein exakter Wert für die antibakterielle Aktivität R berechnen. Jedoch kann der Grenzwert berechnet werden, der sich ergibt, sobald 1 KBE bei unverdünnter Auftragung registriert wird. Der wahre KBE-Wert ist dann niedriger, die wahre biologische Aktivität größer.

Tabelle 2: Angaben der KBE/ml/cm<sup>2</sup> (gegebenenfalls als Grenzwert), die KBE-Reduzierung in Prozent sowie die Validität.

Proben	Proben-ID	MW KBE/ml/cm <sup>2</sup>	KBE-Reduzierung um	Validität
Referenz	PMMA	5,98E+04	-	ja
behandelte Probe	AcryFlex 7003 AF + 1% Ag-Disp.1	< 1,06E+02	> 99,82 %	
behandelte Probe	AcryFlex 1001-1 AS + 1% Ag-Disp.2	< 1,06E+02	> 99,82 %	

Tabelle 3: Grenzwerte der antibakteriellen Aktivität R als Differenz der logarithmischen KBE/ml/cm<sup>2</sup> (Tabelle 2) der Referenzprobekörper nach 24h (Ut) sowie der KBE/ml/cm<sup>2</sup> der behandelten Proben (T) nach 24 h (At), basierend auf Mittelwerten.

Proben	Proben-ID	U0	Ut	At	Antibakterielle Aktivität (R)
Referenz	PMMA	5,06	4,78	-	-
behandelte Probe	AcryFlex 7003 AF + 1% Ag-Disp.1	-	-	2,03	> 2,75
behandelte Probe	AcryFlex 1001-1 AS + 1% Ag-Disp.2	-	-	2,03	> 2,75

Im Ergebnis des Tests wurde für die beschichteten Probearten AcryFlex 7003 AF + 1% Ag-Disp.1 und AcryFlex 1001-1 AS + 1 % Ag-Disp.2 eine antibakterielle Aktivität gegenüber *E. coli* nachgewiesen, die zu einer Verringerung der KBE-Werte um > 2 log<sub>10</sub>-Stufen bzw. um > 99,82 % führt.

## Anhang

Tabelle 4: Ausgangsdaten der KBE pro Replik pro PMMA-Referenz- bzw. Anti-Fog-beschichteten (Acry Flex 7003 AF + 1% Ag-Disp.1) und Anti-Scratch-beschichteten Probekörpern (Acry Flex 1001-1 AS + 1% Ag-Disp.2) in Abhängigkeit der auf CASO-Agarplatten aufgetragenen Verdünnungsstufen sowie des Inokulumvolumens, die resultierenden Werte von KBE/ml und KBE/ml/cm<sup>2</sup>, basierend auf den grau unterlegten Feldern. Zur Berechnung der biologischen Aktivität wird bei Platten ohne bakteriellen Wachstums der Grenzwert von 10<sup>6</sup> KBE/ml/cm<sup>2</sup> verrechnet werden.

Proben-ID	Replik	10 E3	10 E2	10 E1	10 E0	KBE/ml	KBE/ml/cm <sup>2</sup>	MW KBE/ml/cm <sup>2</sup>
Arbeitssuspension	-	71	≥ 100	≥ 100	≥ 100	2,37E+06	-	-
PMMA-t0h-1	1	3	13	107	≥ 100	1,82E+06	1,14E+05	1,14E+05
	2	0	15	96	≥ 100	1,63E+06	1,02E+05	
PMMA-t0h-2	1	1	10	103	≥ 100	1,75E+06	1,09E+05	
	2	1	11	124	≥ 100	2,11E+06	1,32E+05	
PMMA-t0h-3	1	1	15	94	≥ 100	1,60E+06	9,99E+04	
	2	0	9	118	≥ 100	2,01E+06	1,25E+05	
PMMA-t24h-1	1	2	1	55	≥ 100	9,35E+05	5,84E+04	5,98E+04
PMMA-t24h-2	2	0	3	39	≥ 100	6,63E+05	4,14E+04	
	1	0	11	63	≥ 100	1,07E+06	6,69E+04	
PMMA-t24h-3	2	0	5	59	≥ 100	1,00E+06	6,27E+04	
	1	0	9	54	≥ 100	9,18E+05	5,74E+04	
2	0	11	68	≥ 100	1,16E+06	7,22E+04		
AcryFlex 7003 AF- + 1% Ag-Disp.1-1	1	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2	0	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
AcryFlex 7003 AF- + 1% Ag-Disp.1-2	1	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
2	0	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
AcryFlex 7003 AF- + 1% Ag-Disp.1-3	1	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
2	0	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
AcryFlex 7003 AF- + 1% Ag-Disp.1-4	1	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
2	0	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
AcryFlex 7003 AF- + 1% Ag-Disp.1-5	1	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
2	0	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
AcryFlex 7003 AF- + 1% Ag-Disp.1-6	1	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
2	0	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
AcryFlex 1001-1 AS- + 1% Ag-Disp.2-1	1	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
2	0	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
AcryFlex 1001-1 AS- + 1% Ag-Disp.2-2	1	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
2	0	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
AcryFlex 1001-1 AS- + 1% Ag-Disp.2-3	1	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	
2	0	0	0	0	0	0,00E+00	0,00E+00	