

# Герметичность внутреннего конического соединения абатментов с имплантатами по отношению к молекулам эндотоксинов - исследование *in vitro*.

Sönke Harde, Birka Dimaczek, Yaha Açil, Hendrik Terheyden, Sandra Freitag-Wolf, Matthias Kern

Получено: 6.01.2009/Одобрено: 8.07.2009  
© Издательство Springer-Verlag

## Краткое содержание исследования

Нарушение герметичности на микроуровне давно обсуждается в качестве одной из основных причин воспаления биологических тканей вокруг соединения имплантата с абатментом. Ранее проводились успешные исследования герметичности данного соединения по отношению к живым микроорганизмам в условиях статической и динамической моделей. Цель данного исследования - проверить герметичность двух имплантационных систем с коническим интерфейсом (AstraTech и Ankylos) к проникновению эндотоксинов в условиях статической модели. Внутри восьми имплантатов каждой системы был помещён раствор эндотоксина.

Затем имплантаты были собраны с соответствующими им абатментами и помещены, в изостатических условиях, в апиерогенную воду в течение 168 часов. Пробы данной воды брались через 5 мин., 24 ч., 72 ч. и 168 ч. после погружения в нее образцов, и её загрязнение проверялось амебоцит-лизатным тестом (ЛАЛ-тест). Только один имплантат из группы AstraTech не стал источником указанного загрязнения в течение 168 ч. Образцы из группы Ankylos была загрязнена эндотоксином уже через 5 мин. Другими словами, испытанные внутренние конические интерфейсы имплантатов, судя по всему, не обладают герметичностью против эндотоксинов. Но, в целом, имплантаты AstraTech продемонстрировали лучшую герметичность, чем имплантаты Ankylos.

S. Harder B. Dimaczek M. Kern - Отделение дентального протезирования, пропедевтики и материалов Стоматологической школы при больнице Университета Шлезвиг-Гольштейна, Киль, Германия

Y. Açil - Отделение оральной и челюстно-лицевой хирургии Стоматологической школы при больнице Университета Шлезвиг-Гольштейна, Киль, Германия

H. Terheyden - Отделение оральной и челюстно-лицевой хирургии больницы Красного Креста, Кассель, Германия

S. Freitag-Wolf - Институт медицинской статистики при больнице Университета Шлезвиг-Гольштейна, Киль, Германия

Контактное лицо для корреспонденции: M. Kern  
Адрес: Arnold-Heller-Str. 3, Building 26, 24105 Kiel, Germany  
e-mail: mkern@proth.uni-kiel.de

## Введение

Недостаточная герметичность соединения абатментов с имплантатами является одним из ключевых факторов в возникновении периимплантита. Предотвращение проникновения микроорганизмов внутрь интерфейса имплантата - главная задача при проектировании современных систем для двухэтапной имплантации, с целью минимизации воспалительных процессов и повышения стабильности костной ткани вокруг глеца имплантата. Зазоры и полости внутри имплантата и между имплантатом и абатментом все ещё имеют место, даже в самых современных системах для имплантации (рис. 1).

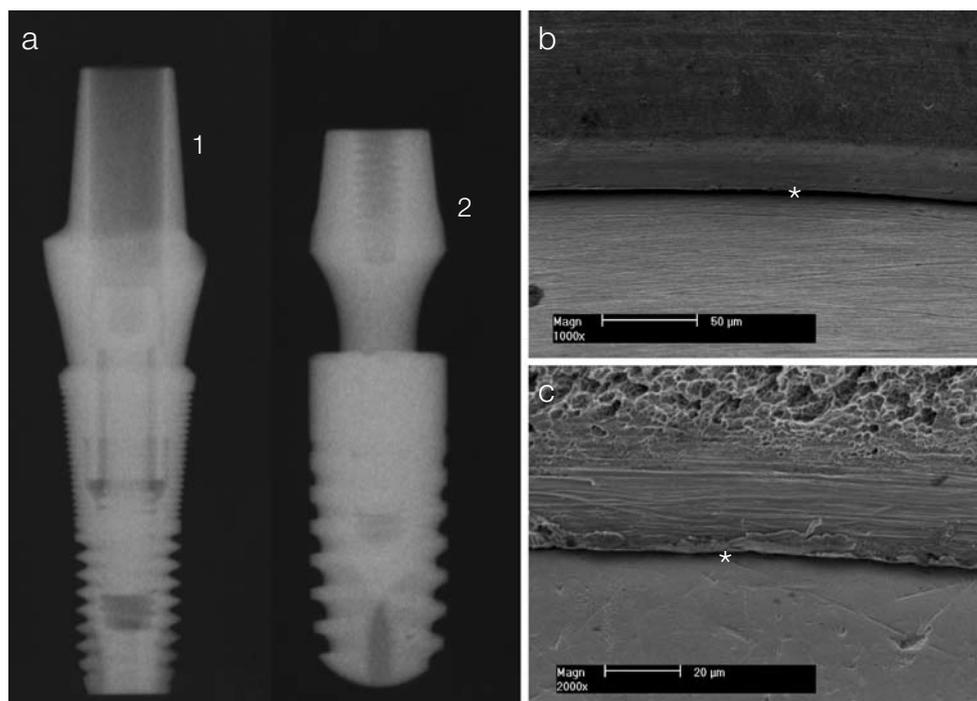
Соединение абатмента с имплантатом в виде двух входящих друг в друга конусов считается более стабильным (1) и герметичным, чем соединения типа "плоскость-плоскость" (например, у шестигранного интерфейса) или "цилиндр-цилиндр". Проникновение микробов внутрь интерфейса имплантата - одна из главных причин хронического воспаления и маргинальной резорбции кости (2, 3).

Рис. 1: а) Рентгеновские снимки имплантата MicroThread-OsseoSpeed со смонтированным абатментом TiDesign (AstraTech) (1) и имплантата AnkylosPlus со стандартным прямым абатментом (2).

Снимки с электронного микроскопа зазора соединения имплантата с абатментом (обозначен звездочкой):

б) AstraTech (увеличение 1000х)

с) Ankylos (увеличение 2000х)



Производители имплантатов стараются избавиться от этого недостатка за счёт увеличения стабильности соединения абатмента с имплантатом. Главным условием герметичности данного соединения является минимизация его микроподвижности путем создания прецизионных интерфейсов с максимально плотной посадкой и субмикронными зазорами (1). Ряд исследователей предприняли попытки выяснить количество проникающих внутрь имплантата живых микроорганизмов размером 1-10 мкм (4-8). Однако воспаление вызывается не только микробами, но и меньшими по размеру биомолекулами - такими, например, как токсины и составные части клеточных стенок бактерий. Эти крошечные молекулы могут проникать в гораздо меньшие зазоры, чем живые бактерии. Хорошо известно, что эндотоксины - небольшие комплексы молекул липополисахаридов и протеинов - наиболее вредные продукты жизнедеятельности грамотрицательных бактерий, и они играют главную роль в процессе разрушения костной ткани (9).

Насколько нам известно, явление проникновения молекул внутрь соединения имплантата с абатментом на сегодняшний день изучено недостаточно. В одном исследовании *in vitro* герметичность трех таких соединений разного типа проверялась помещением раствора красителя "толуидиновый синий" в дистиллированной воде внутрь сборки имплантата с абатментом. Все три проверенных соединения оказались негерметичными. Это согласуется с другим исследованием, выявившим, что два из этих трех соединений имеют микроразоры и микросмещения между абатментом и имплантатом (1). Третье соединение не было включено в это исследование микроподвижности, однако в нем участвовали ещё две системы имплантатов с коническими соединениями, у которых не было выявлено зазоров и микросмещений.

Поскольку проникновение эндотоксинов внутрь интерфейса имплантата может иметь большее клиническое значение, чем его проницаемость для красителя, целью нашего исследования было выяснение герметичности по отношению к молекулам эндотоксина двух имплантационных систем с внутренним коническим соединением, участвовавших в упомянутом выше исследовании.

## Материалы и методы

Для нашего исследования мы взяли следующие имплантаты и абатменты:

1. Имплантаты MicroThread-OsseoSpeed 4.5×11 мм и абатменты TiDesign 4.5/5.0–5.5, 3 мм (AstraTech Corp., Германия)
2. Имплантаты Ankylos Plus B11 4.5×11 мм и прямые стандартные абатменты b/3.0/4.0 (Dentsply Friadent, Германия).

Все имплантаты имели внутренние конические интерфейсы. Абатменты Ankylos выполнены монолитно с крепежным винтом, в то время как абатменты AstraTech фиксируются на имплантате отдельным винтом. Все использованные компоненты - стандартные, изготовленные в заводских условиях и применены в том виде, в котором они поставляются производителями.

## Источник эндотоксина

В качестве стандартного эндотоксина в данном исследовании использовались липополисахариды бактерий *Salmonella enterica*, серотип Миннесота (штамм ATCC 9700; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия), сепарированные методом водно-фенольной экстракции.

Согласно информации производителя, данные липополисахариды способны обеспечить концентрацию эндотоксина в 500 000 EU/мг (Примечание: EU - эндотоксинная единица - мера активности эндотоксина. Введена для сравнения пирогенной активности растворов разных эндотоксинов с разной концентрацией, дающих одинаковые результаты в ЛАЛ-тестах). 1 нг данного эндотоксина эквивалентен 5 EU (ЛАЛ-тест) и 10 EU (хромогенный тест). 1 EU эндотоксина равна 1 ME (международной единице).

Тестовый раствор эндотоксина был приготовлен согласно инструкции производителя, из расчёта получения его максимальной концентрации, путем растворения 100 мг чистого эндотоксина в 50 мл воды для инъекций, с последующим перемешиванием раствора и его нагреванием до 70–80°C. В итоге образовался концентрированный, немного мутный раствор.

## Обращение с имплантатами и абатментами во время тестов

Во избежание загрязнения эндотоксином, все имплантаты, абатменты, лабораторная посуда, щипцы и другие инструменты, использовавшиеся при работе с тестовыми материалами, перед исследованием были подвергнуты термообработке в течение, как минимум, 4х часов при температуре 250°C в сухом автоклаве. Это - хорошо проверенный и высокоэффективный метод депирогенизации, рекомендованный Европейской фармакопеей (11).

Работа с имплантатами и абатментами, а также само проведение экспериментов производились в стерильных условиях в микробиологическом шкафу с вертикальной ламинарной вентиляцией.

## Испытательный стенд

Образцы представляли собой сборки абатментов с имплантатами, размещенные в держателях, изготовленных из стали V2A, с центральным отверстием, соответствующим диаметру имплантата. Имплантаты были вкручены в держатели в вертикальном положении. На время исследования образцы были помещены в апиrogenные стеклянные сосуды диаметром 50 мм и высотой 30 мм из стекла марки Duran (Duran Group Inc., Германия). Сосуды были заполнены водой для инъекций (DeltaSelect Corp., Германия) в объёме 10 мл - так, чтобы она покрывала зазор между имплантатом и абатментом. Во избежание загрязнения образцов, сосуды с ними были накрыты крышками из стекла Duran. После этого сосуды были помещены на платформу для перемешивания (HS250 basic, KIKA Labortechnik, Германия) с постоянными чередующимися движениями в горизонтальной плоскости (20 движений в мин.).

## Подготовка имплантатов

В условиях стерильности, каждый из 8 имплантатов обеих систем (образцы AS1-AS8 [AstraTech] и AN1-AN8 [Ankylos]) был инокулирован 0,5 мкл приготовленного раствора эндотоксина с помощью одноканальной пипетки (Research Pipette, Eppendorf Corp., Германия) и специальных стерильных наконечников для нее (epTips, Eppendorf Corp.).

Раствор эндотоксина был осторожно помещён в самую глубокую часть интерфейса имплантатов. После этого на имплантатах, при помощи динамометрических инструментов, были смонтированы абатменты, согласно инструкциям производителей, при этом внутренние и внешние поверхности имплантатов не контактировали ни с чем, кроме абатментов и их винтов. После затяжки винтов абатментов, все образцы были тщательно проверены на предмет вытеснения наружу раствора эндотоксина в результате сборки.

## Взятие проб

Пробы воды из сосудов с образцами и контрольных сосудов брались одноканальной пипеткой со стерильными наконечниками. Объём каждой пробы составил 200 мкл. Стерильные имплантаты из каждой группы и вода для инъекций без эндотоксина служили в качестве контрольных образцов. После взятия, каждая проба была помещена в микропробирку из апиrogenного стекла (Safe-lock micro test tubes, Eppendorf Corp.) и заморожена до проведения теста.

## Процедура проверки проб

Определение утечки эндотоксина проводилось с применением ЛАЛ-теста (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., США). Это количественный тест на присутствие в растворе эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Тест базируется на открытии Ф. Бэнга (1956), который обнаружил, что эндотоксины вызывают фатальную внутрисосудистую коагуляцию клеток крови у морских животных - меченосцев (*Limulus polyphemus*) (12).

Было выяснено, что данная коагуляция является результатом каскадной реакции, вызываемой эндотоксином, а именно энзимного свертывания протеина коагулогена, содержащегося в клетках крови (амебоцитах) *L. polyphemus* (13, 14) (рис. 1).

В хромогенной разновидности ЛАЛ-теста коагулоген полностью или частично заменяется на хромогенный субстрат (15). Хромогенный тест обычно проводится в два этапа: сначала проэнзим активируется эндотоксином, причём порог активации определяется концентрацией эндотоксина. Затем, после добавления хромогенного субстрата, наступает фаза высвобождения хромофора, который окрашивает раствор в жёлтый цвет. Степень оптической плотности окрашенного раствора измеряется спектрофотометром с длиной волны 405-410 нм (16).

После размораживания, взятые ранее пробы тестируются согласно инструкции производителя для спектрофотометра. Спектрофотометр термостатируется при температуре 37±1.0°C. После размещения в нем микропробирок с пробами и контрольных образцов, в каждую пробирку с пробой, одновременно, при помощи многоканальной пипетки, подается раствор ЛАЛ-препарата.

После каждого этапа итоговая смесь слегка взбалтывалась постукиванием по корпусу спектрофотометра. Через 10 минут после добавления к образцам ЛАЛ-препарата, к ним был добавлен раствор хромогенного субстрата в объёме 100 мкл, нагретый до температуры 37±1.0°C.

Ещё через 6 минут туда же был добавлен реагент, прекращающий реакцию. После этого были произведены измерения оптической плотности полученных смесей. Для сравнения результатов загрязнения всех имеющихся образцов эндотоксином по истечении 168 часов был использован критерий Фридмана.

Множественные сравнения результатов всех контрольных точек эксперимента для обеих групп образцов производились с применением критериев знаковых рангов Уилкоксона. Различия в уровне загрязнения эндотоксином образцов двух групп имплантатов по прошествии 168 часов определялись с использованием критерия суммы рангов Уилкоксона. Для всех статистических критериев уровень значимости при множественных сравнениях был установлен в 5%.

## Результаты исследования

### Контроль тестового разведения эндотоксина

На рис. 2 показано сравнение поглощения света с длиной волны 405 нм приготовленными тестовыми растворами эндотоксина, использованными, в частности, для инокуляции исследованных имплантатов, и стандартных образцов его разведения. Коэффициент корреляции (R) между средним индивидуальным поглощением света контрольных образцов и тестовых образцов составил 0,989, что соответствует рекомендациям производителя теста ( $\geq 0.980$ ).

### Анализ загрязнения образцов эндотоксином

Загрязнение образцов эндотоксином измерялось на момент помещения в них сборок имплантатов с абатментами (AS1–AS8 и AN1–AN8) (первая контрольная точка); через 5 мин. (2я контрольная точка); через 24 ч. (3я контрольная точка); через 72 ч. (4я контрольная точка) и через 168 ч. (5я контрольная точка). В группе имплантатов AstraTech (AS1–AS8) три образца не стали источником загрязнения через 5 мин. нахождения в тестовом растворе (AS2, AS4 и AS7).

Через 24 и 72 часа два из них (AS2 и AS4) также не стали причиной загрязнения раствора. По истечении 164 ч. лишь один из имплантатов не стал источником загрязнения (рис. 2).

Все имплантаты из группы Ankylos (AN1–AN8) стали источником загрязнения раствора уже через 5 мин. после начала эксперимента. Для обеих групп имплантатов загрязнение тестового раствора росло с увеличением времени нахождения в нем образцов ( $p \leq 0.001$ ).

Различия были значительны для всех сравнений контрольных точек (AstraTech,  $p \leq 0.022$ ; Ankylos Plus,  $p \leq 0.018$ ). Для группы AstraTech выявлено существенно меньшее загрязнение раствора на всех контрольных точках ( $p \leq 0.05$ ; таблицы 1 и 2).

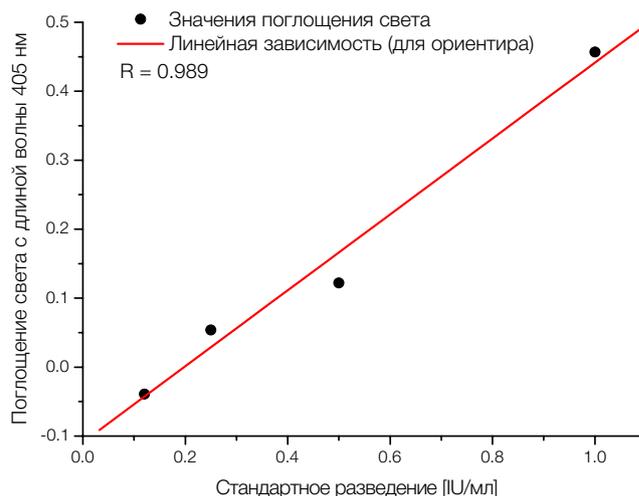


Рис. 2

## Обсуждение

Настоящее исследование демонстрирует, что даже внутренние конические соединения имплантатов с абатментами не являются герметичными к проникновению извне на молекулярном уровне.

Перед экспериментом все компоненты были простерилизованы в сухом автоклаве. Однако остаётся неясным, не могло ли это повлиять на герметичность их последующей сборки.

Из-за возможного дополнительного разбавления раствора эндотоксина, помещенного внутрь имплантатов, компоненты не подвергались мытью после сборки. Депириогенизация с использованием сухого нагрева описывается как самая эффективная процедура из данного разряда (11). Однако мы не стали подвергать образцы депириогенизации во избежание испарения помещенного внутрь эндотоксина. Для минимизации влияния возможного загрязнения внешней поверхности образцов на результаты эксперимента, первые пробы были взяты сразу же после помещения сборок в воду. Если первая проба показывала присутствие загрязнения, данный образец исключался из дальнейших тестов. Выбор объёма в 0,5 мкл раствора эндотоксина для инокуляции имплантатов позволил предотвратить его вытеснение через зазоры в сборке с абатментами.

Jansen и др. выявили уровень загрязнения в 56.8% (21 из 37 имплантатов) для группы Ankylos и 60% (24 из 40 имплантатов) для группы AstraTech (17). В том исследовании инокуляция производилась тем же объёмом (0,5 мкл), что и в этом, но контаминант помещался на кончик винта абатмента, а не во внутренний объём имплантата, как здесь.

Табл. 1: Загрязнение образцов эндотоксином (среднее, медиана, минимум, максимум) в 5ти контрольных точках эксперимента.

Видно значительное увеличение концентрации эндотоксина для обеих групп имплантатов ( $p \leq 0,001$ ) и значительные различия для всех множественных сравнений (AstraTech,  $p=0,022$ ; AnkylosPlus,  $p=0,018$ )

		Контрольные точки				
		0м (IU/мл)	5м	24ч	72ч	168ч
AstraTech (N=8)	Mean	0	1.3	2.0	2.1	2.4
	Median	0	0.7	3.0	3.0	3.1
	Minimum	0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Maximum	0	3.2	3.2	3.2	3.3
Ankylos Plus (N=8)	Mean	0	3.1	3.2	3.2	3.4
	Median	0	3.2	3.2	3.2	3.3
	Minimum	0	2.4	3.2	3.2	3.2
	Maximum	0	3.2	3.3	3.3	4.2

Данный подход нам видится более оправданным, поскольку эндотоксин находится в пространстве под винтом и изначально не контактирует с резьбой винта. Поэтому при сборке удаётся избежать его выдавливания вдоль резьбы и далее через зазор интерфейса.

Результаты данного исследования показали, что негерметичность конического соединения проявляется уже через непродолжительное время после начала эксперимента.

Таким образом, негерметичность по отношению к проникновению эндотоксина может наблюдаться для данного типа соединения даже при его стойкости к проникновению бактерий (17). Данные результаты можно сравнить с наблюдениями Соelho и др., которые обнаружили, что три различных группы двухэтапных имплантатов оказались негерметичны к проникновению красителя после инокуляции им их внутреннего интерфейса (10). Однако такая параллель должна проводиться с осторожностью, поскольку нельзя напрямую сравнивать свойства молекул эндотоксина и красителя.

Значительное увеличение ( $p \leq 0.001$ ) степени загрязнения образцов эндотоксином было зарегистрировано для обеих групп имплантатов. Однако в меньшей степени это касалось группы AstraTech, для всех контрольных точек.

Учитывая, что для большинства образцов загрязнение воды наблюдалось уже через 5 мин. после начала эксперимента (для 5 образцов из группы AstraTech и для 8 образцов из группы Ankylos), лучшие показатели у группы AstraTech (только один имплантат не стал источником загрязнения по прошествии 168 ч.) можно не принимать в расчёт.

Со времени открытия феномена микробной колонизации внутренних частей имплантатов (6, 18, 19), было получено очень мало сведений, касающихся анализа герметичности соединения имплантатов с абатментами.

Табл. 2: Образцы группы AstraTech продемонстрировали значительно меньшее загрязнение эндотоксином. Различия в загрязнении образцов обеих групп для четырех контрольных точек определялись с использованием критерия суммы рангов Уилкоксона.

Контр. точки	значения p
5 мин.	0.008
24 ч	0.003
72 ч	0.005
168 ч	0.021

Разными исследователями было описано несколько методов для проверки данной герметичности. В одном из методов регистрировалась миграция бактерий кишечной палочки и рост микробов в тестовом растворе, в котором размещались образцы (5, 7, 17). В другом методе проверка негерметичности производилась фотометром с использованием цветowych проб (20). Наш метод, в этом смысле, является уникальным, и, насколько нам известно, ни в одном другом подобном исследовании для исследования герметичности не использовался эндотоксин. Единственное сравнимое с нашим исследованием двух систем имплантатов было опубликовано Jansen et al. (17). В нем, после 14 дней инкубации, было обнаружено загрязнение 50% образцов в группе Ankylos (8 из 16) и 69% - в группе AstraTech (11 из 16). Использование эндотоксина из-за малой массы его молекул является преимуществом нашего эксперимента. Данная молекулярная масса составляет 50-100 kDa, по данным Jann et al. (21).

Зазор конического соединения имплантата с абатментом был измерен Jansen et al. Маргинальный зазор для имплантатов AstraTech составил 1-2 мкм и 4 мкм для имплантатов Ankylos. Похоже, что молекулы эндотоксина способны проникать через данные зазоры лучше, чем бактерии с поперечником от 1,1 до 1,5 мкм.

Это в какой-то мере может объяснить результаты нашего исследования. Следует заметить, однако, что эксперименты с применением эндотоксина в качестве маркера герметичности предъявляют высокие требования к лабораторным процедурам и стандартам гигиены.

Основываясь на исследованиях Brogginì et al., можно заключить, что наличие проникаемого для биологических загрязнений микрозазора в интерфейсе имплантата на уровне поверхности кости в сочетании с постоянным присутствием в этой зоне микроорганизмов приводит к аккумулярованию в ней воспалительных клеток (в частности, моноцитов и макрофагов), которые, взаимодействуя с остеокластами, приводят к резорбции костной ткани альвеолярного отростка (2).

Не так давно была описана роль эндотоксинов в бактериальном разрушении костной ткани. В обзоре мировой специальной литературы Nair et al. указали, что, если говорить о липополисахаридах, то эти полимерные вещества, вырабатываемые грамотрицательными бактериями, могут связываться с остеобластами и другими клетками, и инициируют процесс выработки ими цитокинов и эйкозаноидов, которые, в свою очередь, вызывают рост и активацию остеокластов (9).

Это заставляет задуматься не только о важности герметичности соединения имплантатов с абатментами по отношению к живым микроорганизмам, но и по отношению к эндотоксинам.

## Выводы

Условия эксперимента позволили получить убедительные результаты. Гипотеза, что коническое соединение имплантата с абатментом способно противостоять проникновению эндотоксинов, на текущий момент можно считать несостоятельной. Имплантаты AstraTech показали лучшую герметичность к эндотоксину, чем имплантаты Ankylos: некоторые из образцов AstraTech оставались герметичными на протяжении всего периода испытаний, в то время как все образцы Ankylos показали негерметичность уже через 5 минут после начала испытаний.

Авторы выражают признательность за помощь сотрудникам лаборатории отделения оральной и челюстно-лицевой хирургии Стоматологической школы при больнице Университета Шлезвиг-Гольштейна, Киль, Германия.

Данный проект финансировался грантом Ассоциации имплантологов Германии (Deutsche Gesellschaft für Implantologie).

## Список литературы

1. Zipprich H, Weigl P, Lange B, Lauer HC (2007) Erfassung, Ursachen und Folgen von Mikrobewegungen am Implantat-Abutment-Interface. *Implantologie* 15:31–46
2. Brogini N, McManus LM, Hermann JS, Medina RU, Oates TW, Schenk RK, Buser D, Mellonig JT, Cochran DL (2003) Persistent acute inflammation at the implant-abutment interface. *J Dent Res* 82:232–237
3. Hermann JS, Schoolfield JD, Schenk RK, Buser D, Cochran DL (2001) Influence of the size of the microgap on crestal bone changes around titanium implants. A histometric evaluation of unloaded non-submerged implants in the canine mandible. *J Periodontol* 72:1372–1383
4. Besimo CE, Guindy JS, Lewetag D, Meyer J (1999) Prevention of bacterial leakage into and from prefabricated screw-retained crowns on implants in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14:654–660
5. Quirynen M, Bollen CM, Eyssen H, van Steenberghe D (1994) Microbial penetration along the implant components of the Branemark system. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 5:239–244
6. Quirynen M, van Steenberghe D (1993) Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. An in vivo study. *Clin Oral Implants Res* 4:158–161
7. Steinebrunner L, Wolfart S, Bossmann K, Kern M (2005) In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of different implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants* 20:875–881
8. Wahl G, Muller F, Schaal KP (1992) The microbial colonization of implant elements made of plastics and titanium. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 102:1321–1326
9. Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B (1996) Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun* 64:2371–2380
10. Coelho PG, Sudack P, Suzuki M, Kurtz KS, Romanos GE, Silva NR (2008) In vitro evaluation of the implant abutment connection sealing capability of different implant systems. *J Oral Rehabil* 35:917–924. doi:10.1111/j.1365-2842.2008.01886.x JOR1886 [pii]
11. Nakata T (1994) Destruction of challenged endotoxin in a dry heat oven. *J Pharm Sci Technol* 48:59–63
12. Bang FB (1956) A bacterial disease of *Limulus polyphemus* Bull Johns Hopkins Hosp 98:325–351
13. Levin J, Bang FB (1968) Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh* 19:186–197
14. Young NS, Levin J, Prendergast RA (1972) An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. *J Clin Invest* 51:1790–1797
15. Scully MF, Newman YM, Clark SE, Kakkar VV (1980) Evaluation of a chromogenic method for endotoxin measurement. *Thromb Res* 20:263–270
16. Hurley JC (1995) Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clin Microbiol Rev* 8:268–292
17. Jansen VK, Conrads G, Richter EJ (1997) Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants* 12:527–540
18. Persson LG, Lekholm U, Leonhardt A, Dahlen G, Lindhe J (1996) Bacterial colonization on internal surfaces of Branemark system implant components. *Clin Oral Implants Res* 7:90–95
19. O'Mahony A, MacNeill SR, Cobb CM (2000) Design features that may influence bacterial plaque retention: a retrospective analysis of failed implants. *Quintessence Int* 31:249–256
20. Gross M, Abramovich I, Weiss EI (1999) Microleakage at the abutment-implant interface of osseointegrated implants: a comparative study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14:94–100
21. Jann B, Reske K, Jann K (1975) Heterogeneity of lipopolysaccharides. Analysis of polysaccharide chain lengths by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Biochem* 60:239–246