

DIN EN ISO 3990



ICS 11.060.10

Einsprüche bis 2022-06-22

Entwurf

**Zahnheilkunde –
Bewertung der antibakteriellen Wirkung von dentalen
Restaurationswerkstoffen, Befestigungszementen, Fissurenversiegeln
und kieferorthopädischen Klebe- oder Befestigungswerkstoffen
(ISO/DIS 3990:2022);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 3990:2022**

Dentistry –

Evaluation of antibacterial activity of dental restorative materials, luting cements, fissure sealants and orthodontic bonding or luting materials (ISO/DIS 3990:2022);
German and English version prEN ISO 3990:2022

Médecine bucco-dentaire –

Évaluation de l'activité antibactérienne des produits pour restauration dentaires
(ISO/DIS 3990:2022);
Version allemande et anglaise prEN ISO 3990:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-04-22 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nadent@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Dental (NADENT), Alexander-Wellendorff-Str. 2, 75172 Pforzheim.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 56 Seiten

DIN-Normenausschuss Dental (NADENT)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 3990:2022) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 106 „Dentistry“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 55 „Zahnheilkunde“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 014-00-20 AA „Biologische und klinische Werkstoffprüfung“ im DIN-Normenausschuss Dental (NADENT).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 1942	siehe	DIN EN ISO 1942
ISO 4049	siehe	DIN EN ISO 4049
ISO 6344-1	siehe	DIN ISO 6344-1
ISO 7405	siehe	DIN EN ISO 7405
ISO 10993-1	siehe	DIN EN ISO 10993-1
ISO 10993-5	siehe	DIN EN ISO 10993-5
ISO 10993-12	siehe	DIN EN ISO 10993-12
ISO 10993-18	siehe	DIN EN ISO 10993-18

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 1942, Zahnheilkunde — Vokabular

DIN EN ISO 4049, Zahnheilkunde — Polymerbasierende Restaurationswerkstoffe

DIN EN ISO 7405, Zahnheilkunde — Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten

DIN EN ISO 10993-1, Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines Risikomanagementsystems

DIN EN ISO 10993-5, Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität

DIN EN ISO 10993-12, Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien

DIN EN ISO 10993-18, Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 18: Chemische Charakterisierung von Werkstoffen für Medizinprodukte im Rahmen eines Risikomanagementsystems

DIN ISO 6344-1, Schleifmittel auf Unterlagen — Korngrößenanalyse

– Leerseite –

April 2022

prEN ISO 3990

**Zahnheilkunde – Bewertung der antibakteriellen Wirkung von dentalen
Restaurationswerkstoffen, Befestigungszementen, Fissurenversieglern und
kieferorthopädischen Klebe- oder Befestigungswerkstoffen (ISO/DIS 3990:2022)**

Dentistry – Evaluation of antibacterial activity of dental restorative materials, luting cements, fissure sealants and orthodontic bonding or luting materials (ISO/DIS 3990:2022)

Médecine bucco-dentaire – Évaluation de l'activité antibactérienne des produits pour restauration dentaires (ISO/DIS 3990:2022)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Anforderungen	8
4.1 Allgemeines	8
4.2 Extrakt	8
4.3 Direkter Kontakt	8
5 Probenherstellung und Vorbereitung des Kontrollmaterials	8
5.1 Allgemeines	8
5.2 Allgemeine Empfehlungen zur Probenherstellung	9
5.3 Besondere Empfehlungen für lichthärtende Werkstoffe	10
5.4 Besondere Empfehlungen für chemisch abbindende Werkstoffe	10
5.5 Spezifische Empfehlungen für CAD/ CAM-gefräste oder subtraktiv hergestellte Materialien	11
5.6 Herstellung von Flüssigextrakten des Materials	11
5.6.1 Extraktionsprinzipien	11
5.6.2 Extraktionsmittel	11
5.6.3 Extraktionsbedingungen	12
5.6.4 Aufeinanderfolgende Auswaschzyklen	12
5.7 Vorbereitung der Materialien für Prüfungen mit direktem Kontakt	13
5.7.1 Form der Proben	13
5.7.2 Grundlagen für Prüfungen mit direktem Kontakt	13
5.7.3 Sterilität der Proben	14
6 Bakterienstämme, Nährbouillons und Vorbereitung von Bakterienkulturen	14
7 Prüfverfahren	15
7.1 Allgemeines	15
7.2 Prüfung an Extrakten	15
7.2.1 Prüfung an Extrakten mit planktonischen Bakterienkulturen	15
7.2.2 Prüfung an Extrakten mit bakteriellen Biofilmen	16
7.3 Prüfung mit direktem Kontakt	17
7.3.1 Prüfung mit direktem Kontakt zu planktonischen Bakterienkulturen	17
7.3.2 Prüfung mit direktem Kontakt zu bakteriellen Biofilmen	18
7.4 Bestimmung der antibakteriellen Wirkung	19
7.4.1 Allgemeines	19
7.4.2 Untersuchung der Minderung der bakteriellen Vermehrungsfähigkeit	20
7.4.3 Untersuchung von Schäden der Bakterienmembran	21
7.4.4 Untersuchung der Verminderung bakterieller Stoffwechselaktivitäten	22
8 Bewertung der Ergebnisse	23
9 Abschließender Prüfbericht	24
Anhang A (normativ) Bakterienstämme und zugehörige Nährbouillons	25
A.1 Auswahl	25
A.2 Anzuchtverfahren	26
Literaturhinweise	27

Bilder

Bild 1 — Gestell zum Anordnen der Proben (Beispiel)	13
---	----

Tabellen

Tabelle A.1 — Bakterienstämme und zugehörige Nährbouillons	25
--	----

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 3990:2022) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 106 „Dentistry“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 55 „Zahnheilkunde“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 3990:2022 wurde von CEN als prEN ISO 3990:2022 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 106, *Dentistry* erarbeitet.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Einleitung

Der Zweck dieses Dokuments besteht darin, aufgrund der allgemeinen Anwendbarkeit von In-Vitro-Tests für antibakterielle Aktivität und ihre weitverbreitete Anwendung zur Evaluierung einer Vielzahl von restaurativen Dentalwerkstoffen, ein Prüfschema festzulegen, das anstelle der Spezifizierung eines Einzeltests Entscheidungen bezüglich mehrerer Schritte erfordert. Dies sollte zur Auswahl der für den jeweiligen zu evaluierenden restaurativen Dentalwerkstoff geeignetsten Prüfung führen.

Es werden zwei Prüfkategorien aufgeführt: Extraktionsprüfungen und Prüfungen mit direktem Kontakt.

Die Auswahl einer oder mehrerer dieser Kategorien hängt von der Art des zu evaluierenden Werkstoffes, dem möglichen Einsatzort und der Verwendungsart des entsprechenden Werkstoffes, ab. Extraktionsprüfungen richten sich vorwiegend an Substanzen, die aus Werkstoffen austreten, während sich Prüfungen mit direktem Kontakt sowohl an Auswirkungen herauslösbarer Stoffe als auch Oberflächenauswirkungen richten. Die Prüfungsauswahl wirkt sich auf die Einzelheiten bei der Probenherstellung, der Vorbereitung der gezüchteten Bakterien und der Biofilme sowie die Art, wie die Bakterien oder Biofilme den Proben oder deren Extrakten ausgesetzt werden, aus.

Für beide Prüfungskategorien ist zuerst die Durchführung an planktonischen Bakterienkulturen und dann, im Falle eines positiven Ergebnisses, an bakteriellen Biofilmen, vorgesehen.

In diesem Dokument wird als Hauptverfahren zur Feststellung antibakterieller Wirkungen die Messung der Verminderung der bakteriellen Vermehrungsfähigkeit vorgeschlagen. Außerdem können zur weiteren Bestätigung des bakteriellen Zelltods Schäden an der Bakterienmembran erfasst sowie als weitere Messung der bakteriellen Lebensfähigkeit die Verminderung bakterieller Stoffwechselaktivitäten untersucht werden.

Bei beiden Prüfungskategorien gibt es mehrere Möglichkeiten, Ergebnisse herbeizuführen. Der Prüfer sollte die Prüfungskategorien kennen und wissen, in welche Kategorie bestimmte Verfahren fallen, um die laborinterne Vergleichbarkeit sowie die Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen anderer Labore für ähnliche Werkstoffe sicherzustellen.

Neben Richtlinien zur Ergebnisauswertung, sind in diesem Dokument auch Beispiele für quantitative Prüfprotokolle zur Prüfung der Verminderung der bakteriellen Vermehrungsfähigkeit durch Erfassung der koloniebildenden Einheiten (KBE) und zusätzlich zur Prüfung von Schäden an der Bakterienmembran durch Durchflusszytometrie und zur Prüfung der Verminderung bakterieller Stoffwechselaktivitäten durch MTT-Tests, angegeben.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Prüfverfahren zur Evaluierung von restaurativen Dentalwerkstoffen, Befestigungszepten, Fissurenversiegelungen und orthodontische Verbindungs- oder Befestigungsmaterialien fest, die laut ihren jeweiligen Herstellern „antibakterielle“ Wirkung haben.

ANMERKUNG Materialien zur Pulpaüberkappung (z. B. Calciumhydroxidformulierungen), Endodontie-Füllmaterialien, Dentalimplantate oder -implantatsysteme, Knirschschienen, sowie additiv gefertigte (z. B. 3D-gedruckte) Materialien werden von diesem Dokument nicht abgedeckt.

Dieses Dokument deckt keine Prüfungen zur Wirksamkeit von Sterilisations- oder Desinfektionsverfahren ab, noch darf es für den Abwesenheitsnachweis mikrobieller Verunreinigungen an in der Zahnheilkunde verwendeten Medizingeräten verwendet werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 1942, *Dentistry — Vocabulary*

ISO 4049, *Dentistry — Polymer-based restorative materials*

ISO 6344-1, *Coated abrasives — Grain size analysis — Part 1: Grain size distribution test*

ISO 7405, *Dentistry — Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry*

ISO 10993-1, *Biological evaluation of medical devices — Part 1: Evaluation and testing within a risk management process*

ISO 10993-5, *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*

ISO 10993-12, *Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials*

ISO 10993-18, *Biological evaluation of medical devices — Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 1942, ISO 7405, ISO 10993-1 und ISO 10993-5.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>

3.1

restaurativer Dentalwerkstoff

Material oder Materialkombination, die speziell für die Verwendung in der Zahnheilkunde und/oder zugehörigen Verfahren zur Wiederherstellung der Zahnintegrität oder für den Zahnersatz formuliert und hergestellt werden

3.2

Positivkontrollmaterial

gut charakterisierter Werkstoff und/oder Substanz, der (die) durch Beurteilung mithilfe eines spezifischen Prüfverfahrens die Eignung des Prüfsystems demonstriert, eine reproduzierbare, entsprechend positive oder reaktive Wirkung im Prüfsystem hervorzurufen

[QUELLE: ISO 7405:2018, 3.3]

3.3

Negativkontrollmaterial

gut charakterisierter Werkstoff und/oder Substanz, der (die) durch Beurteilung mithilfe eines spezifischen Prüfverfahrens die Eignung des Prüfsystems demonstriert, eine reproduzierbare, entsprechend negative, nicht reaktive oder minimale Reaktion im Prüfsystem hervorzurufen

Anmerkung 1 zum Begriff: In der Praxis zählen Materialien, die die für die antibakterielle Wirkung verantwortliche Komponente nicht enthalten oder in der klinischen Praxis verwendete Materialien ohne antibakterielle Wirkung zu den Negativkontrollmaterialien.

[QUELLE: ISO 7405:2018, 3.4, Anmerkung 1 modifiziert]

3.4

antibakterielles Material

Material, das im Vergleich zum Negativkontrollmaterial eine antibakterielle Wirkung aufweist.

4 Anforderungen

4.1 Allgemeines

Das als antibakteriell bezeichnete Material muss eine der folgenden Anforderungen erfüllen.

4.2 Extrakt

Bei Extraktionsprüfungen muss das antibakterielle Material, bei Prüfung in Übereinstimmung mit Abschnitt 7.1, eine mittlere Verminderung der bakteriellen Aktivität aufweisen, die im Vergleich zum Negativkontrollmaterial mindestens 99,9% (3 log₁₀ Schritte) entspricht.

ANMERKUNG Diese Anforderung entspricht den Definitionen der American Society of Microbiology (<https://aac.asm.org/content/abbreviations-and-conventions>) [1, 2].

4.3 Direkter Kontakt

Bei Prüfungen mit direktem Kontakt muss das antibakterielle Material, bei Prüfung in Übereinstimmung mit Abschnitt 7.2, eine mittlere Verminderung der bakteriellen Aktivität aufweisen, die im Vergleich zum Negativkontrollmaterial mindestens 99% (2 log₁₀ Schritte) entspricht.

ANMERKUNG Diese Anforderung entspricht den in JIS Z 2801 [3] dargelegten Definitionen.

5 Probenherstellung und Vorbereitung des Kontrollmaterials

5.1 Allgemeines

Die in diesem Dokument beschriebenen Prüfungen müssen an

a) einem Extrakt der Probe

und/oder

b) der Probe selbst durchgeführt werden.

Die Untersuchung der antibakteriellen Eigenschaften muss am gemäß den Herstelleranweisungen vorbereiteten Material erfolgen. Vor der Prüfung der antibakteriellen Eigenschaften restaurativer Dentalwerkstoffe in Übereinstimmung mit dieser Norm, müssen zunächst die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Materials (und der Extrakte) in Übereinstimmung mit ISO 10993-1 und ISO 10993-18 untersucht werden. Vor der Prüfung der antibakteriellen Eigenschaften restaurativer Werkstoffe auf Polymerbasis, sollte zunächst das physikalische Verhalten des Materials in Übereinstimmung mit ISO 4049 charakterisiert werden.

Bei jeder Untersuchung müssen sowohl Negativ- als auch Positivkontrollmaterialien Verwendung finden. Sofern angemessen und umsetzbar, sollten die Kontrollen mit dem gleichen Verfahren vorbereitet werden wie die Probe (siehe 5.2 bis 5.5). In allen Fällen müssen die Kontrollen die gleichen Abmessungen und weiteren Materialeigenschaften, wie z. B. Rauheit, wie die Prüfmaterialien aufweisen. Bei Prüfungen mit direktem Kontakt müssen die Materialien und Kontrollen eine runde Form von 10 mm Durchmesser zur Verwendung auf 48-Well-Platten aufweisen (siehe 7.3).

Bei Prüfungen an Extrakten, muss Chlorhexidindigluconat 0,2% als Positivkontrolle verwendet werden [4]. Zusätzlich zu den Extrakten aus dem Negativkontrollmaterial muss zur Sicherstellung der experimentellen Gültigkeit die für die im jeweiligen Experimentsatz verwendete Bakterienkultur erforderliche Nährbouillon verwendet werden.

Bei Prüfungen mit direktem Kontakt müssen Kupferplatten (runde Form; 10 mm Durchmesser; Reinheit $\geq 99\%$; ohne sichtbare Oberflächenverunreinigungen) als Positivkontrolle verwendet werden [5]. Diese Platten müssen in Übereinstimmung mit ISO 6344-1 mit P2000-Papier abgeschliffen werden, um eine ähnliche Rauheit wie an den Proben zu erzielen.

Alle Prüf- oder Kontrollproben müssen vor der Prüfung und nach dem Anmischen/Aushärten/Fräsen entsprechend der Herstellerangaben 24 h lang in sterilem Wasser (37 ± 1) °C gelagert werden, um z. B. das Austreten von Monomeren in Polymeren zu ermöglichen. Nach diesen anfänglichen 24 h, müssen alle Prüf- oder Kontrollproben gleichzeitig und zusätzlich nach 10 aufeinanderfolgenden Auswaschzyklen (siehe 5.6.4) geprüft werden, um einen Hinweis auf die langfristige antibakterielle Wirkung zu erhalten [6]. Sofern nach 10 Auswaschzyklen immer noch eine antibakterielle Wirkung feststellbar ist, sollte nach 20 Auswaschzyklen eine weitere Prüfung erfolgen, um eine Plateauwirkung (= bleibende Wirkung) der antibakteriellen Aktivität nachzuweisen.

ANMERKUNG Zusätzlich sollte eine chemische Analyse der Extrakte nach ISO 10993-18 erfolgen.

5.2 Allgemeine Empfehlungen zur Probenherstellung

Die Probenherstellung muss in Übereinstimmung mit ISO 7405, ISO 10993-12 und ISO 4049 durchgeführt werden.

Für die Herstellung von Proben sind die entsprechenden Produktnormen und/oder die jeweiligen Gebrauchsanweisungen des Herstellers einzusehen und diesen Beschreibungen ist möglichst genau Folge zu leisten. Jede Abweichung von den Angaben in der Gebrauchsanweisung muss begründet werden. Eine genaue Beschreibung der Probenherstellung muss in den Prüfbericht aufgenommen werden. Bei der Probenherstellung müssen folgende Faktoren berücksichtigt werden.

- a) Temperatur;
- b) Feuchtigkeit;
- c) Lichtexposition: Prüfkörper aus lichtempfindlichen Werkstoffen müssen unter der Voraussetzung hergestellt werden, dass das Umgebungslicht diese nicht aktiviert;

- d) Material der Form zur Herstellung der Prüfkörper: Es ist sicherzustellen, dass das Material für die Form zur Herstellung der Prüfkörper und ein mögliches anzuwendendes Gleitmittel den Abbindeprozess des Werkstoffs nicht stören;
- e) Sauerstoffexposition: Bei Werkstoffen, die während des Härtens eine sauerstoffinhibierende Oberflächenschicht bilden können, müssen während des Härtens beide Enden der Form mit transparenten, sauerstoffundurchlässigen Materialien (z. B. eine Polyesterfolie) abgedeckt werden.
- f) Proben müssen unter aseptischen Bedingungen hergestellt werden. In Fällen, in denen dies nicht möglich ist, können die Proben, sofern erforderlich und möglich, auf eine für das jeweilige Material geeignete Weise sterilisiert werden (siehe 5.7.3).

5.3 Besondere Empfehlungen für lichthärtende Werkstoffe

In Übereinstimmung mit ISO 7405 müssen die folgenden Faktoren bei der Betrachtung der Endanwendung von lichthärtenden Werkstoffen berücksichtigt werden:

- a) Material der Form zur Herstellung der Probe: Die Form zur Herstellung der Prüfkörper sollte mit ISO 4049 übereinstimmen; d. h. Formen aus nichtrostendem Stahl mit weißem Hintergrund ((weißes Filterpapier) auf der Unterseite der Probe). Falls dies nicht möglich ist, sollte der Reflexionskoeffizient des Materials, das für die Form zur Herstellung der Prüfkörper verwendet wird, so genau wie möglich dem der oralen Oberfläche entsprechen, auf die das Material aufgetragen wird, damit die klinische Situation möglichst genau abgebildet wird.

ANMERKUNG Geeignete Materialien der Form zur Herstellung der Probe, deren Reflexionskoeffizient dem harter Dentalgewebe ähneln, können halbdurchsichtige oder weiße Kunststoffmaterialien sein, wie Polyethylen (PE) oder Polytetrafluorethylen (PTFE).

- b) Lichtexposition: Die Lichthärtung muss erfolgen, damit die klinische Anwendung so genau wie möglich nachgebildet wird. Oft wird dies eine Lichthärtung nur von einer Seite erfordern, aber manchmal auch eine zweiseitige Aushärtung mit sich bringen. Das Aushärteverfahren ist material- und/oder prozessspezifisch. Bei Einkomponenten-Werkstoffen dürfen bei Betrachtung ohne Vergrößerung keine Hohlräume, Spalten oder Luftblasen vorhanden sein. Um einen ähnlichen Härtegrad wie bei der klinischen Anwendung zu erzielen, die Gebrauchsanweisung des Materialherstellers, einschließlich der Angaben zum Lichtpolymerisationsgerät, die den/die Bereich(e) der Emissionswellenlänge, die Bestrahlungsstärke ($\geq 1\,000\text{ mW/cm}^2$), und die Expositionsdauer umfassen müssen, befolgen. Diese Angaben müssen in den Prüfbericht aufgenommen werden. Es muss darauf geachtet werden, dass sich die Lichtquelle in einem zufriedenstellenden Betriebszustand befindet und es wird empfohlen, vor der Verwendung der Lichtquelle ein Radiometer zu verwenden, um die von der Einheit ausgehende Strahlungsstärke zu verifizieren.
- c) Sauerstoffexposition: Bei Werkstoffen, die während des Lichthärtens eine sauerstoffinhibierende Oberflächenschicht bilden können, müssen während des Lichthärtens beide Enden der Form mit transparenten, sauerstoffundurchlässigen Materialien (z. B. Polyester-/Mylarstreifen) abgedeckt werden.
- d) Behandlung der Probenoberfläche: Sofern vom Hersteller für den Werkstoff nach dem Aushärten eine Oberflächennachbearbeitung empfohlen wird, müssen die Prüfkörperoberflächen mit einer in der klinischen Anwendung üblichen Vorgehensweise geschliffen und poliert werden. Sofern derartige Anweisungen nicht vorliegen und für die Prüfung gefordert sind, müssen die Prüfkörper an beiden Enden mit Schleifpapier der Körnung P2000 nach ISO 6344-1 geschliffen werden, nachdem sie auf dem transparenten sauerstoffundurchlässigen Material ausgehärtet wurden.

5.4 Besondere Empfehlungen für chemisch abbindende Werkstoffe

In Übereinstimmung mit ISO 7405 müssen die folgenden Faktoren bei der Betrachtung der Endanwendung von chemisch abbindenden Werkstoffen berücksichtigt werden:

- a) Anmischen: Es ist ausreichend Werkstoff anzumischen, um sicherzustellen, dass jede Probe aus einer Mischung hergestellt wird. Für jede Probe ist eine neue Mischung herzustellen. Das Anmischen muss in Übereinstimmung mit den entsprechenden Produktnormen, falls anwendbar, durchgeführt werden;
- b) Sauerstoffexposition: Bei Werkstoffen, die während des chemischen Aushärtens eine sauerstoffundurchlässige Oberflächenschicht bilden, müssen während des Aushärtens beide Enden der Form mit sauerstoffundurchlässigen Materialien (z. B. Polyester-/Mylarstreifen) bedeckt werden.
- c) Behandlung der Probenoberfläche: Sofern vom Hersteller für den Werkstoff nach dem Aushärten eine Oberflächennachbearbeitung empfohlen wird, müssen die Prüfkörperoberflächen mit einer in der klinischen Anwendung üblichen Vorgehensweise geschliffen und poliert werden. Sofern derartige Anweisungen nicht vorliegen und für die Prüfung gefordert sind, müssen die Prüfkörper an beiden Enden mit Schleifpapier der Körnung P2000 nach ISO 6344-1 geschliffen werden, nachdem sie auf dem transparenten sauerstoffundurchlässigen Material ausgehärtet wurden.

5.5 Spezifische Empfehlungen für CAD/ CAM-gefräste oder subtraktiv hergestellte Materialien

Hinsichtlich der endgültigen Verwendung CAD/ CAM-gefräster oder subtraktiv hergestellter Materialien müssen folgende Faktoren berücksichtigt werden:

- a) Behandlung der Probenoberfläche: Sofern vom Hersteller für den Werkstoff nach dem CAD/ CAM-Fräsen oder der subtraktiven Herstellung eine Oberflächennachbearbeitung empfohlen wird, müssen die Probenoberflächen mit einer in der klinischen Anwendung üblichen Vorgehensweise geschliffen und poliert werden. Sofern derartige Anweisungen nicht vorliegen und für die Prüfung gefordert sind, müssen die Proben an beiden Enden mit Schleifpapier der Körnung P2000 nach ISO 6344-1 geschliffen werden.

5.6 Herstellung von Flüssigextrakten des Materials

5.6.1 Extraktionsprinzipien

Die Probenherstellung muss nach dem Anmischen/Härten gemäß den Herstellerangaben und nach 24 h-Lagerung in sterilem Wasser bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ und zusätzlich nach 10 aufeinanderfolgenden Auswaschzyklen (siehe 5.6.4) erfolgen, um einen Hinweis auf die langfristige antibakterielle Wirkung zu erhalten [6].

Sofern nach dem 10. Auswaschzyklus immer noch eine antibakterielle Wirkung am Extrakt feststellbar war, sollte nach 20 Auswaschzyklen eine weitere Prüfung an diesem Extrakt erfolgen, um eine Plateauwirkung (= bleibende Wirkung) der antibakteriellen Aktivität nachzuweisen.

ANMERKUNG Zusätzlich sollte eine chemische Analyse der Extrakte nach ISO 10993-18 erfolgen.

Die Extraktionsbedingungen sollten den klinischen Verwendungsbedingungen möglichst entsprechen oder diese übersteigen, um die mögliche antibakterielle Wirkung ohne signifikante Änderungen an der Probe, wie Fusion, Schmelzen oder jegliche Änderungen an der chemischen Struktur, zu bestimmen, sofern diese nicht im Zuge der klinischen Anwendung erwartet werden. Aufgrund der Eigenschaften bestimmter Materialien (z. B. biologisch abbaubarer Materialien) kann im Zuge des Extraktionsverfahrens eine Veränderung der chemischen Struktur auftreten.

ANMERKUNG Die Konzentration jeglicher endogener oder Fremdschubstanzen im Extrakt, und somit die den Prüfbakterien ausgesetzte Menge, hängt von der Grenzfläche, dem Extraktionsvolumen, dem pH-Wert, der chemischen Löslichkeit, der Diffusionsrate, der Osmolarität, der Agitation, der Temperatur, der Dauer und weiteren Faktoren ab.

5.6.2 Extraktionsmittel

Die Auswahl des/der Extraktionsmittel unter Berücksichtigung der chemischen Eigenschaften der Probe muss begründet und dokumentiert werden. Eines oder mehrere der folgenden Mittel muss eingesetzt werden:

- a) die für die im jeweiligen Experimentsatz verwendete Bakterienkultur erforderliche Nährbouillon (siehe z. B. Anhang A);
- b) phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS);
- c) Serum (zur Lipidextraktion);

Die Auswahl des Mittels sollte dem Extraktionsziel entsprechen. Nährbouillon ist das bevorzugte Extraktionsmittel, da sie sowohl das Bakterienwachstum fördern, als auch polare und nicht polare Substanzen extrahieren kann.

ANMERKUNG Es ist wichtig zu beachten, dass Proteine aus proteinreichen oder serumhaltigen Nährbouillons dafür bekannt sind, extrahierbare Stoffe bis zu einem bestimmten Grad zu binden.

5.6.3 Extraktionsbedingungen

Das Extraktionsverfahren muss in Übereinstimmung mit ISO 10993-5 durchgeführt werden.

Die Extraktion muss in sterilen, chemisch inerten, geschlossenen Behältern unter Verwendung aseptischer Techniken mit einem auf der exponierten Oberfläche basierenden Extraktionsmittelvolumen nach ISO 10993-12 erfolgen.

Mit Ausnahme der unten aufgeführten Umstände, muss die Extraktion unter einer der folgenden Bedingungen und den Materialeigenschaften und spezifischen Nutzungsbedingungen ausgeführt werden:

- a) (24 ± 2) h bei (37 ± 1) °C;
- b) (72 ± 2) h bei (37 ± 1) °C.

Es dürfen andere Bedingungen, die die im Zuge der klinischen Verwendung auftretende Extraktion wiedergeben oder eine angemessene Erhebung der antibakteriellen Materialeigenschaften ermöglichen, verwendet werden, diese müssen jedoch begründet und dokumentiert werden.

Sofern der Extrakt vor dem Kontakt mit den Bakterien gefiltert, zentrifugiert oder auf andere Weise bearbeitet wird, müssen diese Informationen, zusammen mit einer Begründung für die zusätzlichen Schritte, in den Abschlussbericht aufgenommen werden. Jegliche Anpassungen des pH-Werts des Extrakts müssen notiert werden. Eine Bearbeitung des Extrakts, zum Beispiel durch pH-Anpassung, sollte vermieden werden, da sie sich auf die Ergebnisse auswirken kann.

5.6.4 Aufeinanderfolgende Auswaschzyklen

Um einen Nachweis für eine langfristige antibakterielle Wirkung zu liefern, werden, wie weiter oben beschrieben, unter Verwendung von Extraktionsmittel (siehe 5.6.2) und unter Extraktionsbedingungen (siehe 5.6.3) aufeinanderfolgende Auswaschzyklen durchgeführt [6].

Das gesamte Auswaschverfahren muss durch die aufeinanderfolgende Ausführung von mindestens 10 einzelnen Auswaschschritten erfolgen. Bei jedem Auswaschschritt müssen die Proben bei (37 ± 1) °C für entweder (24 ± 2) h oder (72 ± 2) h dunkel gelagert werden. Nach diesem Zeitraum muss das Extraktionsmittel erneuert und ein weiterer Auswaschschritt durchgeführt werden. Dieses Verfahren muss 10-mal wiederholt werden. Zu diesem Zweck, die Proben über einen Zeitraum von 2 Wochen extrahieren. Das Extraktionsmittel 4-Mal wöchentlich im Abstand von 24 h und ein Mal nach 72 h austauschen. Dies entspricht insgesamt 10 Austauschen. Bei den für die Prüfung verwendeten Extrakten sollte es sich um 24-h-Extrakte und nicht um 72-h-Extrakte handeln.

Falls nach dem 10. Auswaschzyklus eine antibakterielle Wirkung am Extrakt feststellbar ist, an diesem Extrakt weitere 10 Auswaschzyklen und nach 20 Auswaschzyklen eine weitere Prüfung durchführen, um eine Plateauwirkung (= bleibende Wirkung) der antibakteriellen Aktivität nachzuweisen. Zu diesem Zweck, die Proben über einen Zeitraum von 4 Wochen extrahieren. Das Extraktionsmittel 4-Mal wöchentlich im Abstand von 24 h

und ein Mal nach 72 h austauschen. Dies entspricht insgesamt 20 Austauschen. Bei den für die Prüfung verwendeten Extrakten sollte es sich um 24-h-Extrakte und nicht um 72-h-Extrakte handeln.

5.7 Vorbereitung der Materialien für Prüfungen mit direktem Kontakt

5.7.1 Form der Proben

Die bevorzugte Probe eines festen Materials muss eine runde Form von 10 mm Durchmesser zur Verwendung auf 48-Well-Platten aufweisen. Es sollte mindestens eine flache Oberfläche vorhanden sein. Ist dies nicht der Fall, sollten Anpassungen vorgenommen werden, um flache Oberflächen zu erzielen.

Falls es sich nicht um feste Materialien handelt (sondern z. B. um Gele usw.) können diese in ihren jeweiligen verschiedenen Formen oder Größen, ohne Anpassung der antibakteriellen Bestimmungen, geprüft werden. In diesen Fällen muss das Volumen der für die jeweiligen Bakterienkulturen verwendeten Nährbouillons entsprechend angepasst werden.

5.7.2 Grundlagen für Prüfungen mit direktem Kontakt

Prüfungen mit direktem Kontakt müssen nach dem Anmischen/Härten gemäß den Herstellerangaben und nach 24 h-Lagerung in sterilem Wasser bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ und zusätzlich nach 10 aufeinanderfolgenden Auswaschzyklen (siehe 5.6.4) erfolgen, um einen Hinweis auf die langfristige antibakterielle Wirkung zu erhalten [6].

Sofern nach dem 10. Auswaschzyklus immer noch eine antibakterielle Wirkung am Material feststellbar war, sollte nach 20 Auswaschzyklen eine weitere Prüfung an diesem Material erfolgen, um eine Plateauwirkung (= bleibende Wirkung) der antibakteriellen Aktivität nachzuweisen.

Es muss sichergestellt werden, dass sämtliche Oberflächen der Probe der Extraktion ausgesetzt sind. Bei zusammenklebenden Proben werden manche Oberflächen möglicherweise keiner Extraktion ausgesetzt, was zu falsch positiven Ergebnissen führen könnte. Ein passendes Gestell (siehe Bild 1) verwenden, um die Proben für die Extraktion anzuordnen. Das Volumen des für die Extraktion der Proben verwendeten Extraktionsmittels muss groß sein, d. h. mindestens 10 ml je cm^2 Probenoberfläche entsprechen.

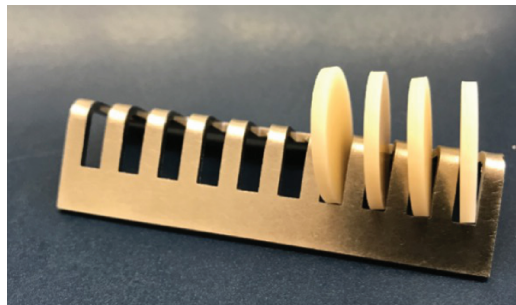


Bild 1 — Gestell zum Anordnen der Proben (Beispiel)

Eines der folgenden Extraktionsmittel verwenden:

- die für die im jeweiligen Experimentsatz verwendete Bakterienkultur erforderliche Nährbouillon (siehe z. B. Anhang A);
- phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

Bei nicht pH-neutralen Materialien, z. B. Zementen, Produkten, die alkalihaltige Gläser enthalten usw. oder die Korrosion ausgesetzt sein könnten, sollte PBS verwendet werden. In diesem Fall muss auch die Wiederaufladbarkeit berücksichtigt werden (z. B. bei Materialien auf Glasionomerbasis).