

DIN EN ISO 7405

ICS 11.060.10; 11.100.99

Einsprüche bis 2017-05-17
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 7405:2013-12

Entwurf

**Zahnheilkunde –
Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten
Medizinprodukten (ISO/DIS 7405:2017);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 7405:2017**

Dentistry –
Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry (ISO/DIS 7405:2017);
German and English version prEN ISO 7405:2017

Médecine bucco-dentaire –
Évaluation de la biocompatibilité des dispositifs médicaux utilisés en médecine
bucco-dentaire (ISO/DIS 7405:2017);
Version allemande et anglaise prEN ISO 7405:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-03-17 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 103 Seiten

DIN-Normenausschuss Dental (NADENT)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 7405:2017) 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.

Im DIN-Normenausschuss Dental (NADENT) ist hierfür der Arbeitsausschuss NA 014-00-20 AA „Biologische und klinische Werkstoffprüfung“ zuständig.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN ISO 7405 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 6344-1	siehe	DIN ISO 6344-1
ISO 10993-1	siehe	DIN EN ISO 10993-1
ISO 10993-2	siehe	DIN EN ISO 10993-2
ISO 10993-3	siehe	DIN EN ISO 10993-3
ISO 10993-5	siehe	DIN EN ISO 10993-5
ISO 10993-6	siehe	DIN EN ISO 10993-6
ISO 10993-10	siehe	DIN EN ISO 10993-10
ISO 10993-11	siehe	DIN EN ISO 10993-11
ISO 10993-12	siehe	DIN EN ISO 10993-12
ISO 10993-18	siehe	DIN EN ISO 10993-18
ISO 14971	siehe	DIN EN ISO 14971

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 7405:2013-12 sind folgende Änderungen vorgesehen:

- a) Streichung des Anhangs C (Akute Toxizitätsprüfung);
- b) Hinzufügen der ISO/TS 22911 als neuen Anhang C.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 10993-2, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 2: Tierschutzbestimmungen*

DIN EN ISO 10993-3, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 3: Prüfungen auf Gentoxizität, Karzinogenität und Reproduktionstoxizität*

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

DIN EN ISO 10993-6, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 6: Prüfungen auf lokale Effekte nach Implantationen*

DIN EN ISO 10993-10, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 10: Prüfungen auf Irritation und Hautsensibilisierung*

DIN EN ISO 10993-11, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 11: Prüfungen auf systemische Toxizität*

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*

DIN EN ISO 14971, *Medizinprodukte — Anwendung des Risikomanagements auf Medizinprodukte*

DIN ISO 6344-1, *Schleifmittel auf Unterlagen — Korngrößenanalyse — Teil 1: Prüfung der Korngrößenverteilung*

— Leerseite —

Zahnheilkunde — Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten (ISO/DIS 7405:2017)

Médecine bucco-dentaire — Évaluation de la biocompatibilité des dispositifs médicaux utilisés en médecine bucco-dentaire (ISO/DIS 7405:2017)

Dentistry — Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry (ISO/DIS 7405:2017)

ICS:

Deskriptoren:

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Einteilung der Medizinprodukte	9
4.1 Einteilung nach der Art des Körperkontakts	9
4.1.1 Allgemeines	9
4.1.2 Medizinprodukte ohne Kontakt zu Körperoberflächen	9
4.1.3 Medizinprodukte mit Kontakt zu Körperoberflächen	10
4.1.4 Medizinprodukte, die von außen mit dem Körperinneren in Kontakt kommen	10
4.1.5 Implantate, die in der Zahnheilkunde verwendet werden	10
4.2 Einteilung nach der Kontaktdauer	10
4.2.1 Allgemeines	10
4.2.2 Produkte im kurzzeitigen Kontakt	10
4.2.3 Produkte im längeren Kontakt	10
4.2.4 Produkte im Dauerkontakt	10
5 Prozess der biologischen Beurteilung	11
5.1 Allgemeines	11
5.2 Auswahl der Prüfungen und Gesamtbeurteilung	11
5.3 Auswahl der Prüfverfahren	11
5.4 Typen von Prüfungen	12
5.5 Erneute Beurteilung der Biokompatibilität	13
6 Spezielle Prüfverfahren für zahnärztliche Werkstoffe	13
6.1 Empfehlungen zur Probenherstellung	13
6.1.1 Allgemeines	13
6.1.2 Allgemeine Empfehlungen zur Probenherstellung	13
6.1.3 Besondere Empfehlungen für lichthärtende Werkstoffe	14
6.1.4 Besondere Empfehlungen für chemisch abbindende Werkstoffe	15
6.1.5 Positivkontrollmaterial	15
6.2 Agardiffusionsprüfung	15
6.2.1 Ziel	15
6.2.2 Zelllinie	15
6.2.3 Kulturmedium, Reagenzien und Ausrüstung	16
6.2.4 Probenvorbereitung	16
6.2.5 Kontrollen	16
6.2.6 Durchführung der Prüfung	16
6.2.7 Beurteilungskriterien	17
6.2.8 Beurteilung der Ergebnisse	18
6.2.9 Prüfbericht	18
6.3 Filterdiffusionsprüfung	18
6.3.1 Ziel	18
6.3.2 Zelllinie	18
6.3.3 Kulturmedium, Reagenzien und Ausrüstung	19
6.3.4 Probenvorbereitung	19
6.3.5 Kontrollen	20

6.3.6	Durchführung der Prüfung	20
6.3.7	Beurteilung der Zellschädigung.....	20
6.3.8	Beurteilung der Ergebnisse	21
6.3.9	Prüfbericht.....	21
6.4	Pulpa- und Dentin-Anwendungsprüfung.....	21
6.4.1	Ziel.....	21
6.4.2	Tiere und Tierschutz.....	22
6.4.3	Durchführung der Prüfung	22
6.4.4	Beurteilung der Ergebnisse	28
6.4.5	Prüfbericht.....	28
6.5	Pulpaüberkappungsprüfung.....	28
6.5.1	Ziel.....	28
6.5.2	Tiere und Tierschutz.....	28
6.5.3	Durchführung der Prüfung	28
6.5.4	Beurteilung der Ergebnisse	31
6.5.5	Prüfbericht.....	31
6.6	Endodontische Anwendungsprüfung.....	31
6.6.1	Ziel.....	31
6.6.2	Tiere und Tierschutz.....	31
6.6.3	Durchführung der Prüfung	31
6.6.4	Beurteilung der Ergebnisse	34
6.6.5	Prüfbericht.....	34
Anhang A (informativ) Prüfungen, die bei der Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten in Erwägung gezogen werden müssen		35
Anhang B (informativ) Dentin-Barriere-Zytotoxizitätsprüfung		37
Anhang C (informativ) Anwendungsprüfung eines enossalen Implantats		45
Literaturhinweise.....		50

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 7405:2017) 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 7405:2017 wurde von CEN als prEN ISO 7405:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees 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 Organisationen, staatlich und nicht staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen 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. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien 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 empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 106, „Dentistry“.

Diese dritte Ausgabe ersetzt die zweite Ausgabe (ISO 7405:2008), die technisch überarbeitet wurde. Folgende Änderungen wurden vorgenommen:

- a) Aufnahme der Änderung 1:2013;
- b) Streichung des Anhangs C (Akute Toxizitätsprüfung);
- c) Hinzufügen der ISO/TS 22911 als neuen Anhang C.

Einleitung

Dieses Dokument beschreibt die Bewertung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten. Es ist zusammen mit der Normenreihe ISO 10993 anzuwenden. Dieses Dokument enthält spezielle Prüfungen, über die in der Zahnheilkunde viele Erfahrungen vorliegen und die die speziellen Bedürfnisse der Zahnheilkunde anerkennen.

Es wurden nur die Prüfverfahren einbezogen, von denen die Mitglieder des Komitees der Ansicht waren, dass veröffentlichte Daten in ausreichendem Maße vorhanden waren. Bei der Empfehlung von Prüfverfahren wurde der Notwendigkeit des minimalen Einsatzes von Versuchstieren hohe Priorität eingeräumt. Es ist von wesentlicher Bedeutung, dass die Entscheidung zur Durchführung von Prüfungen unter Einbeziehung von Tieren ausschließlich nach einer vollständigen und sorgfältigen Überprüfung der Aussage erfolgt, dass ein ähnliches Ergebnis durch andere Prüfungen nicht erreicht werden kann. Um die für die Prüfungen erforderliche Anzahl von Tieren auf einem absoluten Minimum zu halten und dabei die angegebene Zielstellung zu erreichen, kann es angemessen sein, mehr als eine Prüfung an dem gleichen Tier zur gleichen Zeit durchzuführen, z. B. Pulpa- und Dentin-Anwendungsprüfung und Pulpaüberkappungsprüfung. Dennoch sind diese Prüfungen in Übereinstimmung mit ISO 10993-2 sowohl auf effiziente als auch humane Weise durchzuführen. Immer wenn Tierversuche durchgeführt werden, sind diese Prüfungen einfühlsam und in Übereinstimmung mit den für jede Prüfung beschriebenen normierten Verfahren vorzunehmen.

Dieses Dokument beschreibt keine speziellen Prüfverfahren für berufsbedingte Risiken.

Anhang B wurde aufgenommen, um die Entwicklung von *In-vitro*- und *Ex-vivo*-Prüfverfahren zu fördern, damit der Einsatz von Versuchstieren bei der Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten weiter verringert werden kann. Anhang C beruht auf und wird die vorherige ISO/TS 22911 ersetzen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Prüfverfahren zur Beurteilung der biologischen Wirkungen von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten fest. Enthalten sind auch Prüfungen von pharmakologischen Stoffen, die ein integraler Bestandteil des zu prüfenden Medizinprodukts sind.

Dieses Dokument gilt nicht für die Prüfung von Materialien und Produkten, die weder direkt noch indirekt mit dem Körper des Patienten in Kontakt kommen.

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

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

ISO 10993-2, *Biological evaluation of medical devices — Part 2: Animal welfare requirements*

ISO 10993-3, *Biological evaluation of medical devices — Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity*

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

ISO 10993-6, *Biological evaluation of medical devices — Part 6: Tests for local effects after implantation*

ISO 10993-10, *Biological evaluation of medical devices — Part 10: Tests for irritation and skin sensitization*

ISO 10993-11, *Biological evaluation of medical devices — Part 11: Tests for systemic toxicity*

ISO 10993-12:2012, *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 materials*

ISO 10993-19, *Biological evaluation of medical devices — Part 19: Physico-chemical, morphological and topographical characterization of materials*

ISO 14971, *Medical devices — Application of risk management to medical devices*

ISO/TR 15499, *Biological evaluation of medical devices — Guidance on the conduct of biological evaluation within a risk management process*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 1942, ISO 10993-1, ISO 10993-12, ISO 16443 und die folgenden Begriffe.

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

- IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online browsing platform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

Medizinprodukt

alle Instrumente, Apparate, Vorrichtungen, Software, Stoffe oder andere Gegenstände, die einzeln oder miteinander verbunden verwendet werden, zusammen mit allem Zubehör, einschließlich der Software, die für die vom Hersteller vorgesehene medizinische Anwendung am Menschen für folgende Zwecke erforderlich ist:

- Erkennung, Verhütung, Überwachung, Behandlung oder Linderung von Krankheiten;
- Erkennung, Überwachung, Behandlung, Linderung oder Kompensierung einer Verletzung oder Behinderung;
- Untersuchung, Ersetzung oder Veränderung der Anatomie oder eines physiologischen Vorgangs;
- Empfängnisregelung;

und deren bestimmungsgemäße Hauptwirkung im oder am menschlichen Körper weder durch pharmakologische oder immunologische Mittel noch metabolisch erreicht wird, deren Wirkungsweise aber durch solche Mittel unterstützt werden kann

3.2

zahnärztlicher Werkstoff

Werkstoff und (oder) Substanz oder Verbindung von Werkstoffen und (oder) Substanzen, der (die) speziell für die Anwendung in der zahnärztlichen Praxis und (oder) in zugehörigen Verfahren zusammengesetzt und hergestellt wurde

3.3

Endprodukt

Medizinprodukt im „gebrauchsfähigen“ Zustand, wie durch die Spezifikation oder Beschilderung des Herstellers definiert

Anmerkung 1 zum Begriff: Viele zahnärztliche Werkstoffe werden in einem frisch angemischten Zustand verwendet und eine Beurteilung der Werkstoffe sollte sowohl im frisch angemischten als auch im festen Zustand in Betracht gezogen werden.

3.4

Positivkontrolle

Positivkontrollmaterial

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

3.5

Negativkontrolle

Negativkontrollmaterial

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

Anmerkung 1 zum Begriff: In der Praxis schließen Negativkontrollen Blindbestimmungen, Bindemittel/Lösemittel und Referenzwerkstoffe ein.

3.6

Referenzmaterial

Material mit einem oder mehreren Eigenschaftswert(en), der (die) ausreichend reproduzierbar und gut festgelegt ist (sind), um die Anwendung des Werkstoffs oder der Substanz zur Kalibrierung eines Geräts, die Bewertung eines Messverfahrens oder die Zuordnung von Werten zu dem Werkstoff zu ermöglichen

Anmerkung 1 zum Begriff: Für die Zwecke dieses Dokuments ist ein Referenzmaterial jeder gut charakterisierte Werkstoff und (oder) jede Substanz, der (die) bei einer Prüfung mithilfe des beschriebenen Verfahrens die Eignung des Verfahrens demonstriert, eine reproduzierbare, vorhersagbare Reaktion hervorzurufen. Die Reaktion kann negativ oder positiv sein.

3.7

In-vitro-Pulpakammer

Gerät, das eine dünne Dentinscheibe zwischen zwei Kammern hält und Flüssigkeiten und Moleküle filtert oder durch die Dentin-Barriere diffundieren lässt

3.8

hydraulischer Leitwert

aktive Bewegung oder Filtration einer Flüssigkeit und von deren Bestandteilen durch eine Barriere, wie das Dentin, mithilfe eines Druckgefälles

3.9

Diffusion

Einrichtung einer passiven Bewegung gelöster Stoffe (gelöste Bestandteile) mithilfe eines Druckgefälles durch die „Dentin-Barriere“

4 Einteilung der Medizinprodukte

4.1 Einteilung nach der Art des Körperkontakts

4.1.1 Allgemeines

Für die Zwecke des vorliegenden Dokuments wird die Einteilung von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten aus ISO 10993-1 abgeleitet. Wenn ein Produkt oder ein Material in mehr als eine Kategorie eingeteilt werden kann, müssen die strengeren Prüfanforderungen angewandt werden. Bei Mehrfachexpositionen müssen für die Entscheidung, in welche Kategorie ein Produkt eingeteilt werden soll, mögliche kumulative Wirkungen unter Berücksichtigung der Dauer, über die diese Expositionen vorkommen, betrachtet werden.

ANMERKUNG In diesem Kontext schließt der Begriff Zahnheilkunde die Mund-Kiefer-Gesichtsumgebung ein.

4.1.2 Medizinprodukte ohne Kontakt zu Körperoberflächen

Diese Medizinprodukte kommen mit dem Körper des Patienten nicht in Berührung, weder direkt noch indirekt und sind in ISO 10993-1 nicht enthalten.

4.1.3 Medizinprodukte mit Kontakt zu Körperoberflächen

Dazu gehören Medizinprodukte, die die Oberfläche der gesunden oder verletzten oder sonst wie beeinträchtigten Haut bzw. Mundschleimhaut berühren, und solche Medizinprodukte, die mit den Außenflächen der Zahnhartsubstanz, einschließlich Schmelz, Dentin und Zement, in Berührung kommen.

ANMERKUNG Unter bestimmten Umständen werden Dentin und Zement als Oberflächen betrachtet, z. B. nach einer Gingivarezession.

4.1.4 Medizinprodukte, die von außen mit dem Körperinneren in Kontakt kommen

Dazu gehören Medizinprodukte, die in die Mundschleimhaut, die Zahnhartsubstanz, das Pulpagewebe oder den Knochen oder eine Kombination dieser Gewebe eindringen bzw. damit in Kontakt kommen und die dem Mundmilieu ausgesetzt sind.

ANMERKUNG Diese Gruppe enthält auch alle Arten von Unterfüllungs- oder Basiswerkstoffen, die unter einer Restauration verwendet werden.

4.1.5 Implantate, die in der Zahnheilkunde verwendet werden

Dazu gehören Medizinprodukte, einschließlich der Dentalimplantate und der sonstigen zahnärztlichen Medizinprodukte, die teilweise oder vollständig in ein oder mehrere der folgenden Gewebe eingebettet sind:

- a) Weichgewebe, z. B. subperiostale Implantate und subdermale Implantate;
- b) Knochen, z. B. enossale Implantate und Knochenersatz;
- c) Pulpa-Dentin-System des Zahns, z. B. endodontische Werkstoffe;
- d) in eine Kombination dieser Gewebe, z. B. transdentale Implantate.

4.2 Einteilung nach der Kontaktdauer

4.2.1 Allgemeines

Für die Zwecke des vorliegenden Dokuments werden die in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukte entsprechend der Kontaktdauer nach ISO 10993-1 und wie in 4.2.2 bis 4.2.4 aufgelistet eingeteilt.

4.2.2 Produkte im kurzzeitigen Kontakt

Medizinprodukte, deren kumulative einmalige oder mehrfache Anwendung oder Kontaktdauer wahrscheinlich bis zu 24 h beträgt.

4.2.3 Produkte im längeren Kontakt

Medizinprodukte, deren kumulative einmalige, mehrfache oder Langzeitanwendung oder Kontaktdauer wahrscheinlich über 24 h, aber nicht länger als 30 Tage dauert.

4.2.4 Produkte im Dauerkontakt

Medizinprodukte, deren kumulative einmalige, mehrfache oder Langzeitanwendung oder Kontaktdauer über 30 Tage beträgt.

ANMERKUNG 1 Die Definition von „Dauerkontakt“ soll in dieser Bedeutung ausschließlich in diesem Dokument verwendet werden. Sie stimmt mit der Definition in ISO 10993-1 überein.

ANMERKUNG 2 Für mehrfachen Kontakt mit dem Medizinprodukt sollten bei der Entscheidung über die Einteilung eines Produkts in eine Kategorie der mögliche kumulative Effekt und der Zeitraum berücksichtigt werden, in dem diese Kontakte erfolgen.

5 Prozess der biologischen Beurteilung

5.1 Allgemeines

Alle in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukte müssen im Rahmen des Risikomanagementprozesses einem strukturierten biologischen Beurteilungsprogramm unterzogen werden (siehe ISO 10993-1). Eine Anleitung zur Umsetzung dieses Programms wird in ISO 14971 und ISO 10993-1 gegeben. Weitere Informationen können der ISO/TR 15499 entnommen werden.

Das biologische Beurteilungsprogramm muss einen Überblick über die Datensätze zu den biologischen Eigenschaften der in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukte enthalten. Sofern dieser Teil des biologischen Beurteilungsprogramms aufzeigt, dass ein Datensatz oder mehrere Datensätze unvollständig ist (sind) und weitere Prüfungen erforderlich sind, sollten die Prüfungen aus den in der Normenreihe ISO 10993 oder den in der vorliegenden Internationalen Norm oder in beiden beschriebenen Verfahren ausgewählt werden. Falls Prüfungen ausgewählt wurden, die in diesen Internationalen Normen nicht enthalten sind, muss eine Aussage darüber getroffen werden, dass die in den Internationalen Normen beschriebenen Prüfungen in Erwägung gezogen wurden. Diese Aussage muss eine Begründung für die Auswahl der anderen Prüfungen enthalten.

Bei Kombinationsprodukten sollte das Endprodukt in Übereinstimmung mit diesem Dokument und in Zusammenhang mit möglichen anwendbaren Normen beurteilt werden.

ANMERKUNG 1 In diesem Kontext sind Kombinationsprodukte zahnärztliche Medizinprodukte jeder Art, die als integraler Bestandteil eine Substanz enthalten oder dazu vorgesehen sind, eine zu enthalten, die:

- a) bei getrennter Anwendung ein Arzneimittel oder ein biologisches Präparat sein würde;
- b) dazu neigt, im Körper des Patienten die Wirkung des Medizinprodukts zu unterstützen.

Ein Beispiel dafür ist ein Knochenfüllungsmaterial/Augmentationsmaterial mit einem Wachstumsfaktor (d. h. ein biologisches Produkt).

ANMERKUNG 2 Bei Kombinationsprodukten, bei denen das Medizinprodukt und pharmakologische Bestandteile getrennt verpackt sind, kann es aufschlussreich sein, die Produktkomponente allein zu prüfen.

Alle Prüfungen müssen nach anerkannten aktuellen/gültigen besten Laboren/Qualitätsverfahren durchgeführt werden, wo zutreffend.

ANMERKUNG 3 Beispiele relevanter Anleitungen enthält GLP (Good Laboratory Practice) oder ISO/IEC 17025 [11].

5.2 Auswahl der Prüfungen und Gesamtbeurteilung

Die Auswahl der Prüfungen und die Gesamtbeurteilung der Ergebnisse müssen von einem Experten vorgenommen werden, der über entsprechende chemische, physikalische und biologische Daten über das Medizinprodukt verfügt und der die vorgesehenen Anwendungsbedingungen kennt.

5.3 Auswahl der Prüfverfahren

Bei der Auswahl der Prüfverfahren müssen folgende Punkte beachtet werden:

- a) die beabsichtigte Anwendung des Medizinprodukts;
- b) das bzw. die Gewebe, mit dem (denen) das Medizinprodukt möglicherweise in Kontakt kommt;
- c) die Kontaktdauer.

Sofern eine ausgewählte Prüfung in den Internationalen Normen nicht enthalten ist, muss für jedes Medizinprodukt in den Prüfbericht eine Begründung für die Auswahl dieses Prüfverfahrens aufgenommen werden. Sofern in den Normen mehr als ein Prüfverfahren in der gleichen Kategorie empfohlen wird, sollte die Auswahl einer Prüfung aus den anderen Verfahren begründet werden.

5.4 Typen von Prüfungen

Entsprechend der Einteilung des Medizinprodukts sind die in Tabelle A.1 zusammengefassten, zur Anwendung angegebenen Prüfungen zu berücksichtigen. Diese Tabelle gibt an, welche Typen von Prüfverfahren in Erwägung gezogen werden müssen. Dies bedeutet jedoch nicht, dass es erforderlich ist, diese Prüfungen durchzuführen. Die Entscheidung, ein in Tabelle A.1 angegebenes Prüfverfahren nicht durchzuführen, ist im Prüfbericht für jedes Medizinprodukt zu begründen. Die aufgelisteten Typen von Prüfungen stellen einen Rahmen für die Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten dar. Für die meisten Typen von Prüfungen werden bestimmte Verfahren angegeben, obwohl für einzelne Medizinprodukte andere, in den Internationalen Normen nicht enthaltene Methoden geeigneter sein können.

Zweckmäßigerweise werden die Prüfungen in drei Gruppen eingeteilt.

a) Gruppe I

Diese Gruppe umfasst *In-vitro*-Prüfungen auf Zytotoxizität. Eine allgemeine Anleitung für *In-vitro*-Prüfungen auf Zytotoxizität wird in ISO 10993-5 gegeben und ist zu befolgen. Genaue Prüfprotokolle für die Agar- oder Agarosediffusionsprüfung und die Filterdiffusionsprüfung, die für zahnärztliche Werkstoffe geeignet sind, sind in diesem Dokument enthalten. Die Verfahren zur *In-vitro*-Prüfung auf Zytotoxizität beinhalten:

- 1) die Agardiffusionsprüfung (siehe 6.2);
- 2) die Filterdiffusionsprüfung (siehe 6.3);
- 3) Prüfungen bei direktem Kontakt oder Verfahren zur Prüfung von Extrakten nach ISO 10993-5;
- 4) die Dentin-Barriere-Zytotoxizitätsprüfung (siehe Anhang B);

ANMERKUNG 1 Die Reihenfolge dieser Auflistung ist willkürlich gewählt und bedeutet keine Bevorzugung eines Prüfverfahrens.

ANMERKUNG 2 Die Auflistung bedeutet nicht, dass alle aufgeführten Zytotoxizitätsprüfungen für jedes zu bewertende Medizinprodukt durchgeführt werden müssen.

ANMERKUNG 3 Die Anwendung der Dentin-Barriere-Zytotoxizitätsprüfung wird unterstützt und eine Beschreibung dieser Prüfung ist in Anhang B enthalten. Verweisungen auf diese Prüfung sind in den Literaturhinweisen angegeben.

b) Gruppe II

Diese Gruppe umfasst Prüfungen nach der Normenreihe ISO 10993 und bestimmte Prüfverfahren, falls geeignet, werden angegeben:

- 1) akute systemische Toxizität — orale Applikation — nach ISO 10993-11;
- 2) akute systemische Toxizität — Applikation durch Inhalation — nach ISO 10993-11;
- 3) subakute und subchronische systemische Toxizität — orale Applikation — nach ISO 10993-11;
- 4) Hautreizung und intrakutane Reaktivität nach ISO 10993-10;
- 5) verzögerte Hypersensibilität nach ISO 10993-10;

- 6) Gentoxizität nach ISO 10993-3;
- 7) lokale Effekte nach Implantation nach ISO 10993-6.

ANMERKUNG 1 Um die Anwendung der neuesten Ausgabe eines verwiesenen Dokuments nur zuzulassen, ist ein undatiertes Verweis möglich. Eine Angabe des entsprechenden Abschnitts und Unterabschnitts ist nur bei datierten Verweisungen möglich. Deshalb wird der Anwender dieser Internationalen Norm aufgefordert, die verwiesenen Dokumente auf die entsprechenden Abschnittsnummern hin zu überprüfen.

ANMERKUNG 2 Bei der Beurteilung von Materialien, die mineralisierte Gewebe enthalten, nach einer lokalen Implantation nach ISO 10993-6, wird zusätzlich zur routinemäßigen Prüfung der demineralisierten Schnitte eine Prüfung der nicht demineralisierten Schnitte empfohlen.

ANMERKUNG 3 Wenn geeignet, dürfen die lokalen Effekte nach der Implantation in Übereinstimmung mit der Anwendungsprüfung eines Implantats anstatt der ISO 10993-6 bewertet werden. (Siehe 5.4 c) 4).)

c) Gruppe III

Diese Gruppe umfasst Prüfungen, die speziell für die in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukte vorgesehen sind und die in der Normenreihe ISO 10993 nicht erwähnt sind:

- 1) Pulpa- und Dentin-Anwendungsprüfung (siehe 6.4);
- 2) Pulpaüberkappungsprüfung (siehe 6.5);
- 3) endodontische Anwendungsprüfung (siehe 6.6);
- 4) Anwendungsprüfung eines enossalen Dentalimplantats (siehe Anhang C).

ANMERKUNG Die Anwendungsprüfung eines enossalen Dentalimplantats ist nicht gefordert, aber wird, falls anwendbar, empfohlen.

5.5 Erneute Beurteilung der Biokompatibilität

In Übereinstimmung mit ISO 10993-1 muss für ein Medizinprodukt eine erneute Beurteilung der Biokompatibilität nach 5.4 durchgeführt werden, wenn Überarbeitungen oder Modifikationen der Zusammensetzung, Qualität und (oder) Leistungsangaben vorgenommen werden.

ANMERKUNG Siehe auch ISO/TR 15499, die Angaben dazu enthält, wann eine Neubewertung zu erfolgen hat.

6 Spezielle Prüfverfahren für zahnärztliche Werkstoffe

6.1 Empfehlungen zur Probenherstellung

6.1.1 Allgemeines

Diese Empfehlungen wurden für *In-vitro*-Prüfungen entwickelt, können aber auch für andere Zwecke verwendet werden, wenn sie dafür geeignet sind.

6.1.2 Allgemeine Empfehlungen zur Probenherstellung

Für die Herstellung von Prüfkörpern 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. Die folgenden Faktoren (z. B. Umweltfaktoren) müssen bei der Betrachtung der Endanwendung des Medizinprodukts berücksichtigt werden:

- a) Temperatur;

- b) Luftfeuchte;
- c) Lichtexposition: Prüfkörper aus lichtempfindlichen Werkstoffen sollten 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;

ANMERKUNG Geeignete Materialien der Form zur Herstellung der Prüfkörper können halbtransparente oder weiße Kunststoffmaterialien sein, wie Polyethylen oder Polytetrafluorethylen (PTFE).

- e) Sauerstoffexposition: Für Werkstoffe, die während des Aushärtens eine sauerstoffinhibierende Oberflächenschicht bilden, ist sicherzustellen, dass die Form für den Prüfkörper während des Aushärtens entsprechend abgedichtet ist;
- f) Sterilisation: Prüfkörper sollten entweder unter aseptischen Bedingungen hergestellt oder mit dem für den Werkstoff geeigneten Verfahren sterilisiert werden, sofern dies erforderlich und möglich ist. Es ist sicherzustellen, dass die Sterilisation den Werkstoff nicht angreift (z. B. darf die Sterilisation nicht Substanzen aus dem Werkstoff eluieren);
- g) Verhältnis von Probenoberfläche zur Zellschichtoberfläche oder zum Zellkulturmedium: Das Verhältnis der Probenoberfläche zur Zellschichtoberfläche oder zum Zellkulturmedium ist zu dokumentieren. Die Auswahl der Form und Probenoberfläche sowie das angewandte Verhältnis von Probenoberfläche zur Zellschichtoberfläche oder zum Zellkulturmedium sind zu begründen;
- h) Extrakte: Sofern für die Durchführung einer Prüfung Extrakte erforderlich sind, müssen die Proben nach ISO 10993-12:2012, Abschnitt 10, hergestellt werden.

6.1.3 Besondere Empfehlungen für lichthärtende Werkstoffe

Die folgenden Faktoren müssen bei der Betrachtung der Endanwendung von lichthärtenden Werkstoffen berücksichtigt werden:

- a) **Material der Form zur Herstellung der Prüfkörper:** Der Reflexionskoeffizient des Materials, das für die Form zur Herstellung der Prüfkörper verwendet wird, sollte so genau wie möglich dem Dentin entsprechen, damit die klinische Situation möglichst genau abgebildet wird;

ANMERKUNG Geeignete Materialien der Form zur Herstellung der Prüfkörper können halbtransparente oder weiße Kunststoffmaterialien sein, wie Polyethylen oder PTFE.

- b) **Lichtexposition:** Die Lichthärtung sollte erfolgen, damit die klinische Anwendung so genau wie möglich abgebildet wird. Die Gebrauchsanweisung des Herstellers sollte eingehalten werden, damit der gleiche Aushärtungsgrad wie in der praktischen Anwendung erreicht wird. Dies wird oft eine Lichthärtung nur von einer Seite erfordern, aber manchmal auch eine zweiseitige Aushärtung mit sich bringen. Das Aushärteverfahren ist material- und (oder) prozessspezifisch. Sofern vollständig ausgehärtete Prüfkörper für die Prüfung benötigt werden, ist es wichtig sicherzustellen, dass die Prüfkörper nach der Entnahme aus der Form homogen sind. Bei Einkomponenten-Werkstoffen sollten bei Betrachtung ohne Vergrößerung keine Hohlräume, Spalten oder Luftblasen vorhanden sein. Angaben über die verwendete Lichtquelle sollten erfolgen (Lichtstärke, Aushärtungsdauer, spektrale Verteilung des aushärtenden Lichts und die Art des aushärtenden Lichts sollten dokumentiert werden). Insbesondere ist sicherzustellen, dass die Lichtquelle für die zu prüfenden Werkstoffe empfohlen wurde und dass sich diese in einem zufriedenstellenden Betriebszustand befindet;
- c) **Sauerstoffexposition:** Bei Werkstoffen, die während des Lichthärtens eine sauerstoffinhibierende Oberflächenschicht bilden können, sollten während des Lichthärtens beide Enden der Form mit transparenten, sauerstoffundurchlässigen Materialien (z. B. eine Polyesterfolie) bedeckt werden. Sofern vom Hersteller für den Werkstoff nach dem Aushärten eine Oberflächennachbearbeitung empfohlen

wird, sollten 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, sollten die Prüfkörper an beiden Enden mit Schleifpapier der Körnung P2 000 nach ISO 6344-1 geschliffen werden, nachdem sie zuerst auf das transparente, sauerstoffundurchlässige Material gelegt wurden.

6.1.4 Besondere Empfehlungen für chemisch abbindende Werkstoffe

Die folgenden Faktoren müssen bei der Betrachtung der Endanwendung von chemisch abbindenden Werkstoffen berücksichtigt werden:

- a) **Anmischen:** Es ist ausreichend Werkstoff anzumischen, um sicherzustellen, dass jeder Prüfkörper aus einer Mischung hergestellt wird. Für jeden Prüfkörper 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 sauerstoffinhibierende Oberflächenschicht bilden, sollten während des Aushärtens beide Enden der Form mit sauerstoffundurchlässigen Materialien (z. B. einer Polyesterfolie) bedeckt werden. Sofern vom Hersteller für den Werkstoff nach dem Aushärten eine Oberflächennachbearbeitung empfohlen wird, sollten 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, sollten die Prüfkörper an beiden Enden mit Schleifpapier der Körnung P2 000 nach ISO 6344-1 geschliffen werden, nachdem sie zuerst auf das sauerstoffundurchlässige Material gelegt wurden.

6.1.5 Positivkontrollmaterial

Sowohl für *In-vitro*-Prüfungen als auch für *In-vivo*-Prüfungen (z. B. Pulpa- und Dentin-Anwendungsprüfung) ist es sinnvoll, eine genormte Positivkontrolle einzuschließen, die wie das zu prüfende Material behandelt und verarbeitet wird (d. h. nach dem Mischen im plastischen Zustand und dann abbindend erhärtend) und die auf frei verfügbaren Chemikalien oder Materialien beruht.

Solch eine Positivkontrolle für *In-vitro*-Prüfungen von plastischen Werkstoffen wird in Anhang B, Tabelle B.1, beschrieben. Die Anwendung dieser speziellen Positivkontrolle ist optional und andere Positivkontrollen mit validierten historischen oder anderen Daten zur reproduzierbaren Toxizität können stattdessen verwendet werden.

6.2 Agardiffusionsprüfung

6.2.1 Ziel

Das Ziel dieser Prüfung ist es, die unspezifische Zytotoxizität der zu prüfenden Werkstoffe nach Diffusion durch Agar oder Agarose nachzuweisen. Dieses Prüfverfahren ist nicht geeignet für herauslösbare Bestandteile, die durch Agar oder Agarose nicht diffundieren.

6.2.2 Zelllinie

Verwendet wird eine Fibroblasten- oder Epithelzelllinie, die leicht zu beziehen ist [z. B. von der American Type Culture Collection (ATCC), siehe <http://www.atcc.org>].

Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu identischen Ergebnissen führen.

Im Prüfbericht sind die Identifikationsnummer der Zelllinie, falls vorhanden, die Beschreibung und Bezeichnung der verwendeten Zelllinie sowie eine Begründung für die Auswahl anzugeben.

6.2.3 Kulturmedium, Reagenzien und Ausrüstung

Das für die ausgewählte Zelllinie festgelegte Kulturmedium wird verwendet. Durch Filtration wird sterilisiert. Um den Agar herzustellen, wird das Kulturmedium doppelt konzentriert zubereitet. Durch Filtration wird sterilisiert. Es wird entweder 3%iger Agar oder eine 3%ige Agarose hergestellt. Durch Autoklavieren wird sterilisiert.

Der Vitalfarbstoff wird durch Verdünnung einer Stammlösung von 1 % wässriger Neutralrot-Lösung (Bezugsquelle angeben) 1:100-fach mit 0,01 mol/l Phosphat gepufferter physiologischer Kochsalzlösung [z. B. Dulbeccos Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung¹⁾] unmittelbar vor der Anwendung hergestellt. Die Neutralrot-Lösungen müssen vor Lichteinstrahlung geschützt gelagert werden. Verwendet werden Zellkulturplatten mit 6 Aussparungen (6-Well) (mit 35 mm Durchmesser) oder für Zellkulturen geeignete Petrischalen mit einem Nenndurchmesser von 50 mm bis 100 mm.

6.2.4 Probenvorbereitung

Die Proben sind nach 6.1 herzustellen. Die Prüfung ist entweder an einem Extrakt des Werkstoffs und (oder) am Werkstoff selbst, entsprechend der Anleitung in ISO 10993-5, durchzuführen.

- a) Für feste Werkstoffe werden runde Prüfkörper mit einem Durchmesser von etwa 5 mm und einer flachen Oberfläche vorbereitet, um einen ausreichenden Kontakt mit der Agarschicht zu garantieren.
- b) Für abbindende Werkstoffe wird der frisch angemischte Werkstoff in Ringe mit einem Innendurchmesser von 5 mm und einer Höhe von 2 mm eingebracht. Das Material, aus dem die Ringe bestehen, muss im Prüfbericht angegeben werden. Bei der Prüfung von Werkstoffen in frisch angemischtem Zustand werden die Ringe auf den Agar gelegt, bevor der Werkstoff eingebracht wird. Bei der Prüfung nach verschiedenen Abbindezeiten werden die Ringe so gefüllt, dass der Werkstoff eben mit dem Rand abschließt. Die Abbindung erfolgt bei $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchte von $(90 \pm 10) \%$, bis der Werkstoff zur Prüfung bereit ist.
- c) Für flüssige Prüfkörper oder Extrakte wird 0,01 ml Flüssigkeit auf eine auf den Agar gelegte Filterscheibe aus Borosilicatmikroglas von 5 mm Durchmesser pipettiert.

ANMERKUNG 1 Geeignete inerte Materialien sind Glas oder PTFE.

ANMERKUNG 2 Geeignete Filterscheiben können aus Vorfiltern hergestellt werden.

6.2.5 Kontrollen

Für die Prüfung werden Positivkontrollen, Negativkontrollen und Referenzmaterialien verwendet.

6.2.6 Durchführung der Prüfung

Die Zellen werden bis zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Das geeignete Volumen (z. B. 10 ml für eine Petrischale mit 100 mm) der Zellsuspension ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml) wird in eine ausreichende Anzahl von Petrischalen pipettiert und bei $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ in einer wassergesättigten Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % (Volumenanteil) für 24 h inkubiert. Wenn für die Kultivierung der Zellkultur davon abweichende Bedingungen verwendet werden, muss dies begründet werden.

1) Dulbecco ist ein Warenzeichen. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch die ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu identischen Ergebnissen führen.

Der sterile Agar oder die sterile Agarose wird im Wasserbad auf 100 °C erhitzt und danach auf 48 °C abgekühlt. Ein Teil des Agar bzw. der Agarose wird mit einem Teil des 2-fach konzentrierten, frisch zubereiteten Kulturmediums vermischt und auf 48 °C erwärmt. Von jeder Petrischale wird das flüssige Kulturmedium abgesaugt und durch 10 ml frisch zubereitete Agar- oder Agarose/Kulturmedium-Mischung ersetzt.

Diese Agar- oder Agarose-/Kulturmedium-Mischung bei Raumtemperatur gelieren lassen (etwa 30 min). 10 ml Neutralrot-Lösung wird hinzugefügt und für 15 min bis 20 min im Dunkeln gelassen. Die überschüssige Neutralrot-Lösung wird abgesaugt.

Die Zellkultur ist bei Anwesenheit von Neutralrot vor Lichteinstrahlung zu schützen, da die Zellen geschädigt werden können.

Auf jede Petrischale wird eine geeignete Anzahl von Proben des zu prüfenden Werkstoffs und der Kontrollen mit einem angemessenen Abstand (> 20 mm) zwischen zwei Proben, sofern zutreffend, gelegt. Sie werden bei (37 ± 2) °C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % (Volumenanteil) für 24 h inkubiert. Jeder zu prüfende Werkstoff ist mindestens in vierfacher Ausfertigung zu untersuchen (d. h. zwei Schalen je Werkstoff).

6.2.7 Beurteilungskriterien

Die Entfärbungszone, die die zu prüfenden Werkstoffe und die Kontrollen umgibt, ist mithilfe eines Umkehrmikroskops mit einem kalibrierten Raster zu beurteilen. Dabei wird für jeden Prüfkörper ein Entfärbungs- und ein Lysis-Index nach den in Tabelle 1 und Tabelle 2 festgelegten Kriterien bestimmt.

Tabelle 1 — Entfärbungs-Index

Entfärbungs-Index	Beschreibung
0	Keine erkennbare Entfärbungszone um oder unter dem Prüfkörper
1	Die Entfärbungszone ist auf die Fläche unter dem Prüfkörper begrenzt
2	Die Entfärbungszone um den Prüfkörper ist kleiner als 0,5 cm
3	Die Entfärbungszone um den Prüfkörper ist zwischen 0,5 cm und 1,0 cm groß
4	Die Entfärbungszone um den Prüfkörper ist größer als 1,0 cm, umfasst aber nicht die gesamte Schale
5	Die Entfärbungszone betrifft die gesamte Schale

Tabelle 2 — Entfärbungs-Index

Lysis-Index	Beschreibung der Entfärbungszone
0	Keine erkennbare Zytotoxizität
1	< 20 % der Entfärbungszone sind betroffen
2	20 % bis < 40 % der Entfärbungszone sind betroffen
3	40 % bis < 60 % der Entfärbungszone sind betroffen
4	60 % bis 80 % der Entfärbungszone sind betroffen
5	> 80 % der Entfärbungszone sind betroffen

Für jeden zu prüfenden Werkstoff wird der Median für den Entfärbungs-Index und der Median für den Lysis-Index separat berechnet. Weichen die Indexwerte für die vier Replikate des zu prüfenden Werkstoffs um mehr als 2 Einheiten im Bereich von 0 bis 3 ab, muss die Prüfung wiederholt werden. Bei Indexwerten von 4 und 5 ist keine Wiederholung notwendig. Bei der Prüfung von Extrakten wird der Median des Index für das Extraktionsmedium allein vom Median des Index für das Extraktionsmedium, das den zu prüfenden Werkstoff enthält, subtrahiert, um den Index für den zu prüfenden Werkstoff allein zu erhalten. Ist der Median des Index für das Extraktionsmedium, das als Kontrolle dient, größer als 1, so ist die Prüfung mit einem anderen Extraktionsmedium zu wiederholen.

ANMERKUNG Für eine gültige Prüfung sollte die Zellschicht unter der Negativkontrolle intakt sein.

6.2.8 Beurteilung der Ergebnisse

Alle Informationen, die während der Prüfung gesammelt werden, insbesondere alle Abweichungen in den Ergebnissen zwischen der Prüfgruppe und der Kontrollgruppe, sind für die Beurteilung der Prüfergebnisse zu berücksichtigen. Die Zellreaktion basiert auf dem Median des Entfärbungs-Index und des Lysis-Index von mindestens vier Wiederholungen der Prüfungen. Die Zellreaktion muss für jeden Parameter separat, entsprechend Tabelle 3, beurteilt werden.

Tabelle 3 — Zellreaktion (separat eingeteilt für den Entfärbungs-Index und den Lysis-Index) und Interpretation der Zytotoxizität

Skala	Zellreaktion	Interpretation
0	0	nicht zytotoxisch
1	1	schwach zytotoxisch
2	2 bis 3	moderat zytotoxisch
3	4 bis 5	stark zytotoxisch

Die Ergebnisse der Beurteilung müssen in den Prüfbericht aufgenommen werden.

ANMERKUNG Es sollte beachtet werden, dass bei der Interpretation von Daten aus Zellkulturprüfungen die Grenzen dieses Prüfsystems berücksichtigt werden müssen; d. h. ein zytotoxischer Werkstoff ist nicht per se ungeeignet, aber die Daten müssen für jede spezielle Anwendung beurteilt werden.

6.2.9 Prüfbericht

Die Ergebnisse sind in einem Prüfbericht festzuhalten, der eine vollständige Aufzeichnung aller durchgeführten Prüfungen, der erzielten Ergebnisse und weitere andere Daten beinhaltet, die für die Beurteilung der Ergebnisse benötigt werden. Genaue Angaben über die Vorbereitung und Anwendung des geprüften Werkstoffs, zusammen mit der Losnummer des Werkstoffs, sind ggf. hinzuzufügen.

6.3 Filterdiffusionsprüfung

6.3.1 Ziel

Das Ziel dieser Prüfung ist es, die unspezifische Zytotoxizität der zu prüfenden Werkstoffe nach Diffusion durch einen Zelluloseacetat-Filter nachzuweisen.

6.3.2 Zelllinie

Verwendet wird eine etablierte Fibroblasten- oder Epithelzelllinie, die leicht zu beziehen ist [z. B. von der American Type Culture Collection (ATCC), siehe <http://www.atcc.org>]. Im Prüfbericht sind die Identifikationsnummer der Zelllinie, falls vorhanden, die Beschreibung und Bezeichnung der verwendeten Zelllinie sowie eine Begründung für die Auswahl anzugeben.

6.3.3 Kulturmedium, Reagenzien und Ausrüstung

Das Kulturmedium und der Agar oder die Agarose sind, wie in 6.2.3 beschrieben, für eine Überschichtung anzusetzen. Die Lösungen sind entweder für eine Färbung mit Succinatdehydrogenase oder für eine unspezifische Färbung mit Hydrolase herzustellen.

Für die Färbung mit Succinatdehydrogenase sind folgende Stammlösungen vorzubereiten:

- a) **Succinat-Lösung**, 13,6 g Natriumsuccinat in 100 ml Phosphatpuffer mit 0,2 mol/l, pH 7,6;
- b) **Nitroblau-Tetrazoliumchlorid-Lösung**, 100 mg Nitroblau-Tetrazoliumchlorid in 100 ml Phosphatpuffer mit 0,2 mol/l, pH 7,6;
- c) **Phenazin-Methosulfat-Lösung**, 4 mg Phenazin-Methosulfat in 10 ml frisch angesetzttem destilliertem Wasser.

Es wird eine Färbelösung aus 1 ml Succinat-Lösung, 9 ml Nitroblau-Tetrazoliumchlorid-Lösung und 1 ml Phenazin-Methosulfat-Lösung hergestellt.

Für eine unspezifische Färbung mit Hydrolase wird eine Stammlösung Fluoresceindiacetat hergestellt, bestehend aus 5 mg Fluoresceindiacetat in 1 ml Azeton. Für den Gebrauch werden 20 µl der Stammlösung in 100 ml Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (z. B. Dulbeccos Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) gegeben. Verwendet werden Petrischalen mit einem Nenndurchmesser von 60 mm, die für Gewebekulturen geeignet sind.

Es sind Filter aus einer Mischung aus Zelluloseacetat und Zellulosenitrat mit 47 mm Durchmesser und einer Porengröße von 0,45 µm zu verwenden.²⁾

6.3.4 Probenvorbereitung

Die Proben sind nach 6.1 herzustellen. Die Prüfung ist entweder an einem Extrakt des Werkstoffs oder an dem Werkstoff selbst, entsprechend der Anleitung in ISO 10993-5, durchzuführen.

- a) Für feste Werkstoffe werden runde Prüfkörper mit einem Durchmesser von etwa 5 mm und einer flachen Oberfläche vorbereitet, um einen ausreichenden Kontakt mit dem Filter sicherzustellen. Die Masse der Prüfkörper darf nicht mehr als 3,5 g betragen.
- b) Für abbindende Werkstoffe wird der frisch angemischte Werkstoff in Ringe mit einem Innendurchmesser von 5 mm und einer Höhe von 2 mm eingebracht. Bei der Prüfung der Werkstoffe in frisch angemischtem Zustand werden die Ringe auf den Filter gelegt, bevor der Werkstoff eingebracht wird. Bei der Prüfung nach verschiedenen Abbindezeiten werden die Ringe so gefüllt, dass der Werkstoff eben mit dem Rand abschließt. Die Abbindung erfolgt bei $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchte von $(90 \pm 10)\%$, bis der Werkstoff zur Prüfung bereit ist. Die Masse der Prüfkörper darf nicht mehr als 3,5 g betragen.

ANMERKUNG Geeignete inerte Materialien können Glas oder PTFE sein.

- c) Für flüssige Prüfkörper oder Extrakte wird 0,01 ml Flüssigkeit auf eine auf den Agar gelegte Filterscheibe aus Borosilicatmikroglas von 5 mm Durchmesser pipettiert.

ANMERKUNG Geeignete Filterscheiben können aus Vorfiltern hergestellt werden.

2) Millipore HATF 04700 ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch die ISO. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweislich zu identischen Ergebnissen führen.

6.3.5 Kontrollen

Für die Prüfung werden Positivkontrollen, Negativkontrollen und Referenzmaterialien verwendet werden.

6.3.6 Durchführung der Prüfung

Die Zellen werden bis zum Ende der logarithmischen Wachstumsphase kultiviert. Die Zelluloseacetat-Filter werden auf den Boden einer ausreichenden Anzahl von Petrischalen gelegt und 6 ml Zellsuspension ($2,5 \times 10^5$ Zellen/ml) wird in jede pipettiert. Sie wird bei $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ in einer wassergesättigten Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % (Volumenanteil) für 24 h inkubiert. Wenn für die Kultivierung der Zellkultur davon abweichende Bedingungen verwendet werden, muss dies im Prüfbericht begründet werden. 5 ml einer frisch angesetzten Agar- oder Agarose-/Kulturmedium-Mischung (siehe 6.2.6), die bei 48°C aufbewahrt wurde, werden in eine ausreichende Anzahl von Petrischalen pipettiert. Danach lässt man sie bei Raumtemperatur gelieren. Das überschüssige Kulturmedium wird aus den mit Zelluloseacetat-Filtern besetzten Petrischalen abgesaugt. Die Filter werden mit Phosphat-gepuffelter Kochsalzlösung (z. B. Dulbeccos Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) bei $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ gewaschen und auf die Oberfläche des Agars oder der Agarose mit der Zellseite nach unten gelegt. Drei bis fünf Prüfkörper werden auf die Oberfläche des Filters in jede Petrischale appliziert und für weitere 2 h und 24 h bei $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ in einer wassergesättigten Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % (Volumenanteil) inkubiert. Es ist sicherzustellen, dass die Prüfkörper in engem Kontakt mit der Filteroberfläche stehen.

Der Nachweis der Zytotoxizität muss nach Expositionszeiten von 2 h und 24 h bewertet werden. In jede Petrischale wird eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle gelegt. Zusätzlich sind weitere Kontrollen erforderlich: ein Filter mit einer Zellschicht, jedoch ohne Prüfkörper, sowie ein Filter ohne Zellen, jedoch mit Prüfkörpern. Bei der Prüfung von Extrakten muss eine Kontrolle mit dem Extraktionsmedium allein verwendet werden. Jeder Prüfkörper muss mindestens in 4-facher Ausfertigung geprüft werden.

Nach der Inkubation werden die Prüfkörper entfernt und der Filter wird vorsichtig vom Agar oder der Agarose gelöst. Der Bereich reduzierter Zellenzymaktivität wird zytochemisch mit Verfahren A oder Verfahren B beurteilt.

a) Verfahren A

Die Succinatdehydrogenase (EC 1.3.99.1) wird nach dem Verfahren von Barka und Anderson [17] nachgewiesen. Die Inkubationszeit liegt bei 3 h bei $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$. Die Anwesenheit von Kohlenstoffdioxid sollte während der Inkubation vermieden werden, weil dies die Aktivität der Succinatdehydrogenase hemmen kann, was zu einer verblassten Filterfärbung führt. Der Filter wird in destilliertem Wasser gewaschen und vor der Messung an der Luft getrocknet.

ANMERKUNG Das Anhaften der Zellen kann durch Fixieren der Zellen mit 10 % Neutralformalin für 15 min vor dem Waschen in destilliertem Wasser unterstützt werden.

b) Verfahren B

Die unspezifische Hydrolase wird durch Inkubation mit einer Fluoresceindiacetatlösung für 30 min bei 4°C nachgewiesen. Der Filter wird unter ultravioletterem Licht untersucht.

6.3.7 Beurteilung der Zellschädigung

Die Zellschädigung wird entweder

- a) durch die Messung der Entfärbungszone (z. B. mithilfe eines Bildanalysesystems) oder
- b) durch die Anwendung der in Tabelle 4 festgelegten Skala beurteilt.

Tabelle 4 — Beurteilung der Zellschädigung

Skala	Beurteilung	Bereich der Entfärbung
0	Kein Unterschied in der Farbintensität über den gesamten Filter	Keine
1	Eine Zone reduzierter Farbintensität oder eine entfärbte Zone mit einem Durchmesser, der kleiner als der Durchmesser des Prüfkörpers (5 mm) ist	< 20 mm ²
2	Eine entfärbte Zone mit einem Durchmesser von 5 mm bis 7 mm	20 mm ² bis 40 mm ²
3	Eine entfärbte Zone mit einem Durchmesser von über 7 mm	> 40 mm ²

ANMERKUNG Die Filter unter den Negativkontrollen und die Kontrollfilter sollten einheitlich dunkelblau (wenn Succinatdehydrogenase verwendet wird) oder hellgrün (wenn unspezifische Hydrolase verwendet wird) gefärbt sein. Die Kontrollfilter ohne Zellen erlauben es, eine mögliche Wirkung des Prüfkörpers auf den Filter festzustellen.

6.3.8 Beurteilung der Ergebnisse

Alle in der Prüfung gesammelten Informationen, insbesondere alle Abweichungen in den Ergebnissen zwischen den Prüfgruppen und den Kontrollen, sind bei der Beurteilung der Prüfergebnisse zu berücksichtigen. Eine sinnvolle Vorgehensweise zur Einstufung der zu prüfenden Werkstoffe wird in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5 — Einstufung des Prüfmaterials

Index der Zellschädigung	Beschreibung der Entfärbungszone
0	nicht zytotoxisch
1	schwach zytotoxisch
2	moderat zytotoxisch
3	stark zytotoxisch

Die Ergebnisse der Beurteilung müssen in den Prüfbericht aufgenommen werden.

Die Interpretation von Daten aus Zellkulturprüfungen muss die Grenzen dieses Prüfsystems berücksichtigen, d. h. ein zytotoxischer Werkstoff ist nicht per se ungeeignet, aber die Daten müssen für jede spezielle Anwendung beurteilt werden.

6.3.9 Prüfbericht

Die Ergebnisse sind in einem Prüfbericht festzuhalten, der eine vollständige Aufzeichnung aller durchgeführten Prüfungen, der erzielten Ergebnisse und weitere andere Daten beinhaltet, die für die Beurteilung der Ergebnisse benötigt werden. Genaue Angaben über die Vorbereitung und Anwendung des geprüften Werkstoffs, zusammen mit der Losnummer des Werkstoffs, sind ggf. hinzuzufügen.

6.4 Pulpa- und Dentin-Anwendungsprüfung

6.4.1 Ziel

Das Ziel dieser Prüfung ist es, die Biokompatibilität von zahnärztlichen Werkstoffen zu beurteilen, die im Kontakt mit dem Dentin und der Pulpa stehen.

ANMERKUNG Das gleiche Format darf für menschliche Zähne angewandt werden (vorgesehen für Extraktion aus kieferorthopädischen, periodontologischen oder prothetischen Gründen), vorausgesetzt, die Studie wurde nach den relevanten nationalen und (oder) internationalen Vorschriften entsprechend zugelassen.

6.4.2 Tiere und Tierschutz

Zum Schutz der Tiere sind entweder einzuhalten:

- a) ISO 10993-2; oder
- b) nationale gesetzliche Bestimmungen für Labortiere.

ANMERKUNG 1 Die Tiere sollten nach ISO 10993-2 gehalten werden und freien Zugang zu Futter und Wasser haben.

Säugetiere aus nur einer Gattung (aber keine Nagetiere) sind zu verwenden. Das Alter der Tiere sollte so gewählt werden, dass ihr Gebiss intakte permanente Zähne mit abgeschlossenem Wurzelwachstum aufweist.

Affen, Hunde, Frettchen oder Minischweine sind geeignete Gattungen. Andere Gattungen können für spezielle Zwecke geeignet sein. Die ausgewählten Gattungen sollten die zum Erfüllen der wissenschaftlichen Zielstellung erforderlichen niedrigsten Gattungen bei geringster Beeinträchtigung des Tierschutzes sein. Die Auswahl der Gattung ist zu begründen und zu dokumentieren.

ANMERKUNG 2 Affen, Hunde und Minischweine sind geeignet, wenn alle permanenten Zähne, außer M3, durchgebrochen sind. Frettchen sind geeignet, wenn die vier permanenten Eckzähne durchgebrochen sind, da nur diese Zähne zur Prüfung geeignet sind.

6.4.3 Durchführung der Prüfung

6.4.3.1 Vorbereitung der Tiere

Es wird eine ausreichende Anzahl von Tieren ausgewählt, um mindestens sieben Zähne mit dem Prüfwerkstoff für jeden Zeitraum zur Verfügung zu haben.

Die Tiere werden betäubt und die Behandlung der Zähne wird nach 6.4.3.2 vorgenommen.

6.4.3.2 Behandlung der Zähne

6.4.3.2.1 Alle Konkreme und Zahnbeläge werden von den Zahnoberflächen entfernt. Die Oberflächen der Zähne, die behandelt werden sollen, werden gereinigt und desinfiziert, indem sie mit 3 % (Volumenanteil) Wasserstoffperoxid abgetupft und anschließend mit einem Desinfektionsmittel, das aus Polyvidon-Iod (Povidon-Iod) oder Chlorhexidin besteht, desinfiziert werden. Die erforderliche Anzahl an bukkalen oder labialen Kavitäten der Klasse V wird mit scharfen Bohrern und ausreichendem Luft-Wasser-Spray präpariert. Alle Kavitäten sind so tief zu präparieren, dass die Restdentindicke weniger als 1,0 mm und vorzugsweise weniger als 0,5 mm beträgt, jedoch die Pulpa nicht freigelegt wird. Die Kavitäten werden mit Wasser gespült und mit Wattepellets getrocknet, es sei denn, die Einsetzmethode des Prüfwerkstoffs erfordert ein anderes Vorgehen.

ANMERKUNG 1 Weist das Gebiss der Tiere eine ausgeprägte Gingivaentzündung auf, so kann es notwendig sein, die Konkreme und Zahnbeläge einige Tage vor der Kavitätenpräparation zu entfernen und dies eventuell mehrmals zu wiederholen, bis die Gingivaentzündung unter Kontrolle ist.

ANMERKUNG 2 Elektrische Impedanzmessgeräte, wie zum Beispiel ein Apexlokalisator, können vorkalibriert und verwendet werden, um die verbleibende Dentindicke während der Kavitätenpräparation abzuschätzen.

6.4.3.2.2 Wenn ein dentales Medizinprodukt als Befestigungsmaterial Klasse V verwendet wird, sollte die Kavitätenpräparation der Einlage nach der Entfernung aller Konkreme und Zahnbeläge von den Zahnoberflächen erfolgen. Um einen hydraulischen Druck während der Kronenzementierung der Klasse V zu simulieren, müssen Einlagen aus Kompositkunststoff hergestellt werden. Künstlicher Speichel kann in der Kavitätenpräparation als ein Gleitmittel verwendet werden, wonach ein lichthärtender Kompositkunststoff eingesetzt wird. Nach der Lichthärtung und der Entfernung des Kompositkunststoffs muss die Kavität sorgfältig gespült und vorbereitet werden, um die Einlage für Endzementierung zu erhalten. (Anmerkung: Die Überfüllung der Einlagenpräparation erleichtert die Entfernung der Einlage und das Überschüssige kann nach der Zementierung und Härtung des Befestigungsmaterials zurückgeschnitten werden. Ein feiner

Diamantbohrer mit hoher Geschwindigkeit und Lichtdruck mit reichlicher Wasserkühlung werden empfohlen, um ungewollte Störungen der Zementintegrität zu vermeiden.) Die Einlagen sollten für die benötigte Zeit für den Aufbau des Zements unter Druck gehalten werden, dadurch werden die hydraulischen Kräfte der vollen Kronenzementierung simuliert. In kleinen Tieren muss sichergestellt werden, dass die Kavitäten in 1/3 des Dentins ohne Freilegung der Pulpa reichen.

ANMERKUNG Es ist nicht akzeptabel, ein Befestigungsmaterial in einer stärkeren Konsistenz zu mischen und es als Füllungswerkstoff zu prüfen.

Wenn ganze Kronen hergestellt werden und um eine akzeptable Nähe zur Pulpa (0,5 mm bis 1,0 mm) sicherzustellen, wird empfohlen, zuerst eine Kavität der Klasse V vorzubereiten, mit deren Hilfe die gewünschte Nähe zur Pulpa wesentlich erreicht wird, und dann die Kronenpräparation zu beenden.

6.4.3.2.3 Bei der Vorbereitung des zu prüfenden Werkstoffs muss die Gebrauchsanweisung des Herstellers eingehalten werden. Empfiehlt der Hersteller des zu prüfenden Werkstoffs dessen Anwendung mit einem Unterfüllungswerkstoff oder einem Kavitätenbehandlungsmittel (z. B. einem Dentinadhäsiv), so sind diese zusätzlichen Verfahren nach den Herstellerangaben durchzuführen.

6.4.3.2.4 Für jeden Zeitraum sind mindestens sieben Kavitäten mit dem zu prüfenden Werkstoff und vier Kavitäten mit einer Negativkontrolle in zufälliger Reihenfolge zu präparieren. Falls notwendig (siehe Anmerkung 1), sind für jeden Zeitraum bis zu vier Kavitäten mit einer Positivkontrolle zu präparieren.

Die ausgewählten Gattungen sollten die zum Erfüllen der wissenschaftlichen Zielstellung erforderlichen niedrigsten Gattungen bei geringster Beeinträchtigung des Tierschutzes sein. Die Auswahl der Gattung ist zu begründen und zu dokumentieren. Bei Versuchen mit Affen, Hunden oder Minischweinen sollte für jeden Zeitraum ein Tier verwendet werden. Bei Frettchen sollten es für jeden Zeitraum mindestens drei Tiere sein.

ANMERKUNG 1 Negativkontrolle. Eine schnelle Abbindung eines Zinkoxid-Eugenolzements ist eine geeignete Negativkontrolle, vorausgesetzt, er wird im akzeptablen Abstand von der Pulpa platziert, d. h. > 0,5 mm. Alle Zähne mit einer verbleibenden Dentindicke von < 0,5 mm sollten von der Bewertung ausgeschlossen werden (je näher die Füllung zur Pulpa ist, desto mehr wird das nicht reagierende Eugenol zu einem Reizstoff). Für eine Langzeitbewertung sollte der Zinkoxid-Eugenolzement vor Auswaschung geschützt werden. Nach einem Schnitt kann ein selbsthärtender konventioneller Glasionomer eine effektive Dichtheit bieten.

ANMERKUNG 2 Falls der zu prüfende Werkstoff so zusammengesetzt ist, dass eine lang anhaltende Oberflächenabdichtung angebracht ist, ist Zinkoxid-Eugenolzement kontraindiziert, da nicht reagierendes Eugenol im Material (reichlich vorhanden nach Abbindung) in den zu prüfenden Werkstoff entweicht und den Boden der Kavitätspräparation erreicht, was die wahre Reaktion des experimentellen zu prüfenden Werkstoffs verschleiert. Eine histologische Reaktion des Eugenols wird stattdessen bewertet. Wenn ein zu prüfender Werkstoff vor dem Auswaschen geschützt werden muss, wird das folgende Verfahren empfohlen. Nach einer konservativen Kürzung des zu prüfenden Werkstoffs um 0,5 mm bis 1,0 mm, gefolgt vom Ätzen der Schmelzränder, Spülen und leichten Trocknen, werden ein Klebstoff und ein lichtgehärteter Komposit-Klebstoff verwendet.

ANMERKUNG 3 Positivkontrolle. Ein Füllungswerkstoff oder eine Füllungstechnik ohne Freilegung der Pulpa, die durchweg zu einer mäßigen bis starken Pulpareaktion führt, ist eine geeignete Positivkontrolle. Weil Silicatzement, der traditionell als Positivkontrolle genutzt wurde, nicht länger verfügbar ist, ist es schwierig, den Kliniker an einen anderen Werkstoff zu weisen. Eine „nasse“ Mischung Zinkphosphatzement ist die vertretbare geeignetste Positivkontrolle. Eine nasse Mischung wird so definiert, dass zu wenig Pulver in der fertigen Mischung enthalten ist. Für Labore, die eine Datenbank von ein und demselben Betreiber hinterlegt haben und die das gleiche Tiermodell nutzen, darf ein Vergleich mit einem vorherigen geprüften Werkstoff, der den Markt erreicht hat, vorgenommen werden, vorausgesetzt, dass günstige klinische Daten verfügbar sind.

6.4.3.2.5 Eine zufällige Auswahl sollte erfolgen, um zu bestimmen, welche Kavitäten den Füllungswerkstoff der Prüfung, das Negativkontrollmaterial und Positivkontrollmaterial vor der Kavitätenpräparation erhalten. Wie praktisch und anatomisch möglich, werden die Kontroll- und experimentellen Zähne gepaart, d. h. Prämolare rechts im Oberkiefer und Prämolare links im Oberkiefer, Prämolare rechts im Unterkiefer und Prämolare rechts im Oberkiefer usw. Durch zufällige Auswahl wird ein Zahn zum Probekörper und die kontralateralen und gegensätzlichen Zähne werden zu Kontrollprobekörpern. Je nach Tiergattung und deren Verfügbarkeit darf die Zahnauswahl verändert werden.

6.4.3.2.6 Der Zustand der Tiere sollte postoperativ mindestens einmal täglich überprüft und aufgezeichnet werden. Es sollten Maßnahmen ergriffen werden, um Schmerzen oder Stress infolge veränderter Essgewohnheiten, Entzündungen oder Infektionen zu minimieren. Schmerzmittel sollten, falls postoperativ erforderlich, verabreicht werden.

6.4.3.3 Tötung

Am Ende des Versuchszeitraums wird das Tier mit einer Überdosis Betäubungsmittel oder durch andere akzeptierte humane Verfahren getötet (siehe ISO 10993-2 oder die neuesten Empfehlungen der nationalen/internationalen ethischen Richtlinien des Tierschutzes zum schmerzfreien Töten).

6.4.3.4 Erhaltung der Pulpa

Eine vaskuläre Perfusion der Gewebe mit dem Fixativ zum Zeitpunkt der Tötung verbessert die Fixierung. Das Tötungsverfahren der Perfusion schont die meisten Gewebe, aber nicht die Pulpa. Chemische Fixative dringen nicht schnell genug in einen intakten Zahn ein (innerhalb von 20 Minuten), um eine Autolyse zu verhindern. Das apikale Drittel der Wurzel muss nach dem Sezieren des Kiefers aus dem Kopf entfernt werden. Ein akzeptiertes und effektives Verfahren sind ein Hochgeschwindigkeitshandstück und ein Diamant- oder Hartmetallbohrer mit reichlicher Wasserkühlung, um die Wurzel ungefähr 4 mm bis 5 mm vom Apex abzuschneiden, indem durch den Knochen und die Wurzel oder durch das apikale Drittel geschnitten wird, in dem Fall, dass die Zähne extrahiert wurden. Dieses Verfahren beeinträchtigt nicht die Kronenpulpa und ist für Studien indirekter und direkter Pulpaüberkappung angegeben. Sorgfältiges Spülen, nachdem ein Zugang zu Wurzel und Pulpagewebe vorhanden ist, entfernt Zahnbeläge vom Schneiden, die vermeiden können, dass das Fixativ die Pulpa erreicht.

Ein roter Punkt, der die Pulpa repräsentiert, sollte in jedem Wurzelkanal des Apex sichtbar sein, bevor die Kieferquadranten im Fixativ positioniert werden. Wenn menschliche Zähne für die Extraktion genutzt wurden, ist das Verfahren ähnlich. Es werden mindestens 3 mm bis 4 mm vom Apex entfernt, es wird gespült und die Pulpa wird auf Sichtbarkeit geprüft, die als roter Punkt erscheinen sollte.

Wenn das Experiment auf die Bewertung des apikalen Teils abzielt, ist das Tötungsverfahren der Perfusion die bevorzugte Methode, um die bestmögliche Erhaltung des Gewebes in dem apikalen Bereich zu erreichen; jedoch ist das Pulpagewebe nicht hinreichend fixiert und erfordert den Zugang der Pulpa durch den Knochen und die Wurzel im zervikalen Bereich mithilfe der oben beschriebenen Technik.

6.4.3.4.1 Der Kieferblock wird für mindestens 24 h in dem chemischen Fixativ gelassen, mit frischem Fixativ aufgefüllt und für weitere 24 h bis 48 h darin gelassen, bis zum Beginn der Demineralisierung (siehe 3.3.3.5 zur Demineralisierung). Die Menge des Fixativs sollte das 5-fache Volumen der Probe sein. Nach der Fixierung werden die Zähne in einer geeigneten Substanz demineralisiert und mithilfe von Standardverfahren wird Paraffin eingebettet.

6.4.3.4.2 Anzeichen autolytischer Veränderungen umfassen die zytoplasmische Vakuolisierung der Odontoblasten, retikuläre Atrophie, verschmierte Erythrozyten und große, erweiterte leere Kanäle, die Lymphgefäßen ähneln (manchmal als Varizen bezeichnet) und die allgemeine Verlagerung der Odontoblasten in die Dentintubuli. Vakuolen im Zytoplasma der Odontoblasten, die mit dem Lichtmikroskop sichtbar sind, entwickeln sich so leicht, dass sie selten als ein pathologisches Anzeichen angesehen werden können, sogar in den besterhaltenen Probekörpern. Die vollständige autolytische Zerstörung der Pulpa wird noch in vielen Lehrbüchern als das klassische Merkmal „retikulärer Atrophie“ beschrieben, der die Auswirkungen der Alterung, Parodontose, viele Arten restaurativer Werkstoffe, operative Verfahren und sogar die allgemeine Anästhesie zugeschrieben werden.

6.4.3.4.3 Viele Arten der Demineralisierungstechniken und -Chemikalien können genutzt werden und die üblichsten Agenzien sind 10%ige Ameisensäure, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Salpetersäure oder Ameisensäure-Natriumcitrat. Ein anderes geeignetes Medium ist Cal-X II Fixativ/Entkalkungsmittel aus Salzsäure, Dinatrium-EDTA und einem Fixativ, das dem Verlust der Zellstrukturen vorbeugt. Ohne Rücksicht auf die Technik müssen die Personen mit einer Technik vertraut sein, um sie am effektivsten zu nutzen. Beispielsweise bei der Ameisensäure (das 10-fache Volumen der Probekörpergröße nutzen) sollte die

Lösung alle 4 bis 5 Tage gewechselt werden, weil sich Wasser sammelt, wenn Ameisensäure verwendet wird. Außerdem muss die Lösung mechanisch agitiert werden, um die Säure-Wasser-Grenzfläche um den Zahn zu unterbrechen, da sich das Wasser um den Zahn sammelt. Die Probekörper sollten auch in einer Wanne ausgesetzt werden, weil die Flächen der Zähne am Boden des Containers nicht von der Säure angegriffen werden.

6.4.3.4.4 Wenn die Säurelösung gewechselt wird, können die mesialen und distalen Flächen der Zähne beschnitten werden. Durch die Entfernung des überschüssigen Gewebes wird die Demineralisierung beschleunigt. Die Demineralisierung ist gewöhnlich nach 10 bis 21 Tagen in Abhängigkeit von der Größe und der Mineraldichte abgeschlossen. Um den Endpunkt der Demineralisierung zu schützen, wird Radiographie eingesetzt. Auch wurden Zähne mit einer scharfen Rasierklinge beschnitten, bis sie leicht zu schneiden sind, was auch eine Über-Demineralisierung anzeigen kann. Eine sorgfältige, tägliche Überprüfung und Beurteilung der Leichtigkeit des Schneidens kann dem jedoch vorbeugen.

6.4.3.4.5 5 µm bis 10 µm dicke Serienschnitte werden durch jede Kavität in der Längsachse des Zahns angefertigt. Jeder zweite Schnitt wird mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Dazwischen liegende Schnitte (angrenzend an die entsprechende Pulpa-Läsion, vorzugsweise die neben dem Schnitt mit der schmalsten verbleibenden Dentindicke) werden mit einer geeigneten Bakterienfärbung (z. B. Brown und Brenn, McKay oder Gram-Weigert-Farben) gefärbt, um die Zahl der vorhandenen Mikroorganismen und das Ausmaß von Microleakage zu schätzen. Es gibt Mängel, verbunden mit solchen Färbungstechniken: Gram-negative Bakterien können in den meisten Fällen nicht leicht identifiziert werden und es können keine Informationen über die Lebensfähigkeit oder die Identität dieser Organismen erhalten werden. Eine große Anzahl Mikroorganismen kann während der Verarbeitung des Gewebes verloren gehen, was die Quantifizierung erschwert. Die Demineralisierung verursacht eine deutliche Verringerung der Zahl und Nachhaltigkeit der Mikroorganismen. Die Anwesenheit von Plaque oder Mikroorganismen in den Rändern und Wänden der Kavitätenpräparation und auf dem Boden der Präparation sowie in den Dentintubuli sollte als ja oder nein in jedem Probekörper notiert werden. Der Prozentsatz der Probekörper mit Mikroorganismen sollte im Prüfbericht angegeben werden.

6.4.3.5 Histologische Aufarbeitung

6.4.3.3.1 Nach (5 ± 2) Tagen, (25 ± 5) Tagen und (70 ± 5) Tagen wird eine ausreichende Anzahl der Tiere mit einer Überdosis Betäubungsmittel oder durch die Anwendung von anderen allgemein akzeptierten Substanzen getötet, um mindestens sieben Zähne mit dem zu prüfenden Werkstoff zur Verfügung zu haben. Die Restaurationen, die Zähne und deren Stützgewebe sind zu untersuchen und genaue Angaben über alle Abnormalitäten sind festzuhalten. Jeder behandelte Zahn ist zusammen mit dem umgebenden Hart- und Weichgewebe zu entfernen und in einem geeigneten Medium zu fixieren.

6.4.3.6 Beurteilung von Dentin und Pulpa

Die histologischen Schnitte werden untersucht, ohne vorherige Kenntnis darüber, ob sie von dem zu prüfenden Werkstoff oder einem Kontrollmaterial stammen. Für jede Schnittserie ist eine vollständige Beschreibung aller histologischen Merkmale im Dentin, in der Pulpa und im periapikalen Gewebe erforderlich, einschließlich solcher Merkmale, die sich möglicherweise aus der Kavitätenpräparationstechnik ergeben haben. Von den Serienschnitten sind für die nachfolgende Untersuchung auf Entzündungen mindestens fünf auszuwählen, die gleichmäßig durch die Kavität verteilt sind. Das entzündliche Infiltrat in den Oberflächengeweben (Odontoblastenschicht, zellfreier Bereich und zellreicher Bereich) wird separat vom restlichen (tieferen) Pulpagewebe nach der in Tabelle 6 festgelegten Skala beurteilt.

Tabelle 6 — Einstufungsskala für die Pulpa- und Dentin-Anwendungsprüfung

Entzündungs-grad	Beschreibung entzündlicher Veränderungen
0	Keine Entzündung: normal strukturiertes, am Dentin anliegendes Pulpagewebe in tubularem Kontakt mit dem Kavitätenboden
1	Schwache Entzündung: verstreute Entzündungszellen innerhalb eines ansonsten normal strukturierten, am Dentin anliegenden Pulpagewebes in tubularem Kontakt mit dem Kavitätenboden
2	Mäßige Entzündung: Entzündungszellen mit kleinen Herdgruppen innerhalb eines Pulpagewebes, das noch normal strukturierte, am Dentin anliegende Bereiche in tubularem Kontakt mit dem Kavitätenboden enthält
3	Starke Entzündung: ausgeprägte Infiltration von Entzündungszellen mit Verlust der normalen Struktur in dem am Dentin anliegenden Pulpagewebe in tubularem Kontakt mit dem Kavitätenboden
4	Abszessbildung oder ausgeprägte Infiltration von Entzündungszellen, nicht nur auf das am Dentin anliegende Pulpagewebe in tubularem Kontakt mit dem Kavitätenboden begrenzt

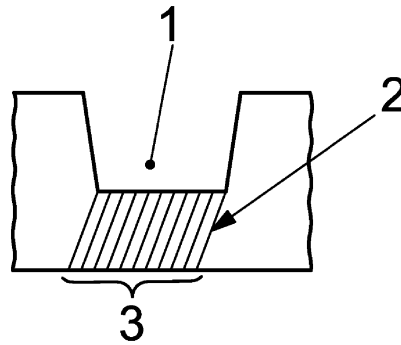
Für jeden bewerteten Schnitt ist die verbleibende Mindest-Dentindicke durch Messung im rechten Winkel vom Kavitätenboden zur Pulpa-(Prä-)Dentingrenzfläche und durch Messung entlang des Verlaufs der Dentintubuli aufzuzeichnen. Im letztgenannten Fall ist die Messung entlang der Linie der Hauptrichtung der Dentintubuli vorzunehmen, wenn die Schnittebene nicht genau mit der der Dentintubuli übereinstimmt, sodass jedes Kanälchen im interessierenden Bereich nicht über die volle Länge vom Kavitätenboden bis zur Pulpa-(Prä-)Dentingrenzfläche verläuft. Es ist ein Reaktionsindex für beide Entzündungsstellen in jedem Zeitraum zu berechnen, indem die einzelnen Abstufungen addiert und durch die Gesamtanzahl der Beobachtungen dividiert werden.

Die Daten für die mit dem Prüfwerkstoff gefüllten Kavitäten, einschließlich des Unterfüllungswerkstoffs oder des Werkstoffs zur Kavitätenbehandlung, falls vom Hersteller empfohlen, werden getrennt von den Daten für die Kavitäten, die allein mit der Negativkontrolle gefüllt sind, sowie für die Kavitäten, die als Positivkontrolle dienen, dargestellt. Die Daten für die mit Positivkontrolle gefüllten Kavitäten dürfen aus früheren Studien stammen, sofern die Prüfbedingungen identisch waren. Zusätzlich ist die Anzahl der Kavitäten, die Bakterien auf dem Kavitätenboden oder an der Kavitätenwand enthalten, in jedem Zeitraum für den zu prüfenden Werkstoff und die Kontrollen aufzuzeichnen. Dadurch wird ein Index für die Entzündungsreaktion in jedem Zeitraum für jeden Werkstoff entsprechend der obigen Einstufung angegeben, der durch die Darstellung des Bereichs der gemessenen, verbleibenden Mindest-Dentindicke und des beobachteten Umfangs der bakteriellen Undichtigkeit (Microleakage) charakterisiert.

6.4.3.7 Analyse der Überlebensrate von Odontoblastenzellen (optional)

Zur histomorphometrischen Analyse der Überlebensrate von Odontoblastenzellen sind mindestens fünf gleichmäßig über den Kavitätenboden verteilte und mit Hämotoxylin und Eosin angefärbte Schnitte auszuwählen und bei einer Vergrößerung zu untersuchen, die eine Identifizierung einzelner getrennter Zellen ermöglicht und einen Sehbereich bietet, der die gesamte Pulpa-(Prä-)Dentingrenzfläche unter der Kavität erfasst. Mit einem Okularfadenkreuz ist die Anzahl morphologisch unbeschädigter Odontoblasten je Längeneinheit der (Prä-)Dentinoberfläche auf der gesamten Länge der Pulpa-(Prä-)Dentingrenzfläche unter der Kavität zu zählen.

Die Grenzfläche wird als der Bereich definiert, in dem die Dentintubuli mit dem Boden der Kavität in Verbindung stehen, wie in Bild 1 gezeigt.



Legende

- 1 Kavität
- 2 Dentintubuli
- 3 Pulpa-(Prä-)Dentingrenzfläche zum Zählen der Odontoblasten

Bild 1 — Pulpa-(Prä-)Dentingrenzfläche zum Zählen der Odontoblasten

Das Zählen der Odontoblastenzellen je Längeneinheit der Pulpa-(Prä-)Dentingrenzfläche unter der Kavität ist für jeden der fünf Schnitte aus jedem Prüfkörper vorzunehmen und es ist der Mittelwert der Zellzahl für diese Kavität abzuleiten. Dann sind die Mittelwerte der Zellzahlen für alle Prüf- (T) und die Negativkontroll-Kavitäten (NC) abzuleiten. Der Zelltod in % wird aus Gleichung (1) berechnet:

$$CD = \left(\frac{NC - T}{NC} \right) \times 100 \quad (1)$$

Dabei ist

CD der Zelltod in Prozent;

NC die gezählte Zellzahl in der Negativkontrolle der Kavität;

T die gezählte Zellzahl für den zu prüfenden Werkstoff in der Kavität.

Der Zelltod der Odontoblasten wird auf einer Skala, wie in Tabelle 7 angegeben, eingeteilt.

Tabelle 7 — Einstufung des Zelltodes der Odontoblasten

Skala	Zelltod der Odontoblasten
0	Keine
1	< 25 % Zelltod
2	25 % bis 50 % Zelltod
3	> 50 % bis 75 % Zelltod
4	> 75 % Zelltod

Für jeden eingestuften Schnitt wird die verbliebene Mindest-Dentindicke aufgezeichnet, wie es oben beschrieben ist. Dadurch wird ein Index für die Überlebensrate der Odontoblasten für jeden Werkstoff entsprechend der obigen Einstufung angegeben, der durch die Darstellung des Bereichs der gemessenen, verbleibenden Mindest-Dentindicke für die Kavitäten in dieser Werkstoffgruppe charakterisiert wird. Sofern vom Hersteller empfohlen, sind die Daten getrennt für die mit dem zu prüfenden Werkstoff, einschließlich Unterfütterung oder Kavitäten-Behandlungsmittel, gefüllten und für die als Positivkontrollen verwendeten Kavitäten aufzuführen. Die Daten für die Positivkontrollen sind als prozentualer Anteil der Negativkontrollen je obiger Prüfkavitäten anzugeben. Sofern zutreffend, dürfen die Daten für die