

DIN EN ISO 7405



ICS 11.060.10; 11.100.99

Einsprüche bis 2024-05-15
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 7405:2019-03**Entwurf****Zahnheilkunde –
Bewertung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten
Medizinprodukten (ISO/DIS 7405:2024);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 7405:2024**

Dentistry –

Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry (ISO/DIS 7405:2024);
German and English version prEN ISO 7405:2024

Médecine bucco-dentaire –

Évaluation de la biocompatibilité des dispositifs médicaux utilisés en médecine
bucco-dentaire (ISO/DIS 7405:2024);

Version allemande et anglaise prEN ISO 7405:2024

AnwendungswarnvermerkDieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-03-15 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme
vorgelegt.Weil das beabsichtigte Dokument 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.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind,
mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 145 Seiten

DIN-Normenausschuss Dental (NADENT)

Nationales Vorwort

Das Dokument (prEN ISO 7405:2024) 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 nationale 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 Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 1942	siehe	DIN EN ISO 1942
ISO 6344-3	siehe	DIN ISO 6344-3
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 10993-5:2009	siehe	DIN EN ISO 10993-5:2009-10
ISO 10993-6	siehe	DIN EN ISO 10993-6
ISO 10993-7	siehe	DIN EN ISO 10993-7
ISO 10993-9	siehe	DIN EN ISO 10993-9
ISO 10993-10	siehe	DIN EN ISO 10993-10
ISO 10993-11	siehe	DIN EN ISO 10993-11
ISO 10993-12:2021	siehe	DIN EN ISO 10993-12:2021-08
ISO 10993-13	siehe	DIN EN ISO 10993-13
ISO 10993-14	siehe	DIN EN ISO 10993-14
ISO 10993-15	siehe	DIN EN ISO 10993-15
ISO 10993-16	siehe	DIN EN ISO 10993-16
ISO 10993-17	siehe	DIN EN ISO 10993-17
ISO 10993-18:2020	siehe	DIN EN ISO 10993-18:2021-03
ISO 10993-18:2020/Amd 1:2022	siehe	DIN EN ISO 10993-18:2023-11
ISO 10993-23	siehe	DIN EN ISO 10993-23
ISO 14801	siehe	DIN EN ISO 14801
ISO 14971	siehe	DIN EN ISO 14971
ISO 16443	siehe	DIN EN ISO 16443
ISO/IEC 17025	siehe	DIN EN ISO/IEC 17025

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 7405:2019-03 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- Aktualisierung der normativen Verweisungen (z. B. Ersetzung von ISO 6344-1 durch ISO 6344-3);
- Klärung zum Text von Definitionen und Hinzufügen der Definition für Dentin-Barriere (3.8);

- c) bei der Agardiffusionsprüfung (6.2) wurden die Kriterien für die Beurteilung der Entfärbungszone (Tabelle 1) und des qualitativen morphologischen/Lysis-Index (Tabelle 2) mit ISO 10993-5 harmonisiert;
- d) Hinzufügen von Anhang D mit einer Antioxidant-Response-Element (ARE)-Reporterassay-Zytotoxizitätsprüfung.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 1942, *Zahnheilkunde — Vokabular*

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 10993-5:2009-10, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität (ISO 10993-5:2009); Deutsche Fassung EN ISO 10993-5:2009*

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

DIN EN ISO 10993-7, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 7: Ethylenoxid-Sterilisationsrückstände*

DIN EN ISO 10993-9, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 9: Rahmen zur Identifizierung und Quantifizierung von möglichen Abbauprodukten*

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

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

DIN EN ISO 10993-12:2021-08, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien (ISO 10993-12:2021); Deutsche Fassung EN ISO 10993-12:2021*

DIN EN ISO 10993-13, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 13: Qualitativer und quantitativer Nachweis von Abbauprodukten in Medizinprodukten aus Polymeren*

DIN EN ISO 10993-14, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 14: Qualitativer und quantitativer Nachweis von keramischen Abbauprodukten*

DIN EN ISO 10993-15, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 15: Qualitativer und quantitativer Nachweis von Abbauprodukten aus Metallen und Legierungen*

DIN EN ISO 10993-16, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 16: Entwurf und Auslegung toxikokinetischer Untersuchungen hinsichtlich Abbauprodukten und herauslösbaren Substanzen*

DIN EN ISO 10993-17, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 17: Toxikologische Risikobewertung von Medizinproduktbestandteilen*

DIN EN ISO 10993-18:2021-03, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 18: Chemische Charakterisierung von Werkstoffen für Medizinprodukte im Rahmen eines Risikomanagementsystems (ISO 10993-18:2020); Deutsche Fassung EN ISO 10993-18:2020*

DIN EN ISO 10993-18:2023-11, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 18: Chemische Charakterisierung von Werkstoffen für Medizinprodukte im Rahmen eines Risikomanagementsystems (ISO 10993-18:2020 + Amd 1:2022); Deutsche Fassung EN ISO 10993-18:2020 + A1:2023*

DIN EN ISO 10993-23, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 23: Prüfungen auf Irritation*

DIN EN ISO 14801, *Zahnheilkunde — Implantate — Dynamische Belastungsprüfung für enossale Dentalimplantate*

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

DIN EN ISO 16443, *Zahnheilkunde — Vokabular für Dentalimplantatsysteme und zugehörige Verfahren*

DIN EN ISO/IEC 17025, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*

DIN ISO 6344-3, *Schleifmittel auf Unterlagen — Korngrößenanalyse — Teil 3: Bestimmung der Korngrößenverteilung der Mikrokörnungen P240 bis P2 500*

– Leerseite –

März 2024

prEN ISO 7405

**Zahnheilkunde – Bewertung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde
verwendeten Medizinprodukten (ISO/DIS 7405:2024)**

Dentistry – Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry (ISO/DIS 7405:2024)

Médecine bucco-dentaire – Évaluation de la biocompatibilité des dispositifs médicaux utilisés en médecine
bucco-dentaire (ISO/DIS 7405:2024)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	6
Vorwort	7
Einleitung	8
1 Anwendungsbereich	9
2 Normative Verweisungen	9
3 Begriffe	10
4 Einteilung der Medizinprodukte	11
4.1 Einteilung nach der Art des Körperkontakts	11
4.1.1 Allgemeines	11
4.1.2 Produkte ohne Körperkontakt	11
4.1.3 Produkte mit Kontakt zur Körperoberfläche	11
4.1.4 Produkte, die von außen mit dem Körperinneren in Kontakt kommen	12
4.1.5 Implantate, die in der Zahnheilkunde verwendet werden	12
4.2 Einteilung nach der Kontaktdauer	12
4.2.1 Allgemeines	12
4.2.2 Produkte mit kurzem Kontakt	12
4.2.3 Produkte mit längerem Kontakt	12
4.2.4 Produkte mit langzeitigem Kontakt	12
5 Biologisches Beurteilungsverfahren	13
5.1 Allgemeines	13
5.2 Auswahl der Prüfungen und Gesamtbewertung	13
5.3 Auswahl der Prüfverfahren	13
5.4 Typen von Prüfungen	14
5.4.1 Allgemeines	14
5.4.2 Physikalische und chemische Charakterisierung	14
5.4.3 Gruppe I	14
5.4.4 Gruppe II	15
5.4.5 Gruppe III	15
5.5 Erneute Beurteilung der Biokompatibilität	15
6 Spezielle Prüfverfahren für Dentalwerkstoffe	16
6.1 Empfehlungen zur Probenherstellung	16
6.1.1 Allgemeines	16
6.1.2 Allgemeine Empfehlungen zur Probenherstellung	16
6.1.3 Besondere Empfehlungen für lichthärtende Werkstoffe	16
6.1.4 Besondere Empfehlungen für chemisch abbindende Werkstoffe	17
6.1.5 Positivkontrolle	17
6.2 Agardiffusionsprüfung	18
6.2.1 Ziel	18
6.2.2 Zelllinie	18
6.2.3 Kulturmedium, Reagenzien und Ausrüstung	18
6.2.4 Probenvorbereitung	18
6.2.5 Kontrollmaterialien	19
6.2.6 Durchführung der Prüfung	19
6.2.7 Beurteilungskriterien	20
6.2.8 Bewertung der Ergebnisse	21
6.2.9 Prüfbericht	21
6.3 Filterdiffusionsprüfung	21
6.3.1 Ziel	21
6.3.2 Zelllinie	21
6.3.3 Kulturmedium, Reagenzien und Ausrüstung	22
6.3.4 Probenvorbereitung	22

6.3.5	Kontrollmaterialien	23
6.3.6	Durchführung der Prüfung	23
6.3.7	Bewertung der Zellschädigung	23
6.3.8	Bewertung der Ergebnisse	24
6.3.9	Prüfbericht	24
6.4	Pulpa- und Dentin-Anwendungsprüfung	24
6.4.1	Ziel	24
6.4.2	Tiere und Tierschutz	25
6.4.3	Durchführung der Prüfung	25
6.4.4	Bewertung der Ergebnisse	31
6.4.5	Prüfbericht	31
6.5	Pulpaüberkappungsprüfung	31
6.5.1	Ziel	31
6.5.2	Tiere und Tierschutz	31
6.5.3	Durchführung der Prüfung	31
6.5.4	Bewertung der Ergebnisse	34
6.5.5	Prüfbericht	34
6.6	Endodontische Anwendungsprüfung	34
6.6.1	Ziel	34
6.6.2	Tiere und Tierschutz	34
6.6.3	Durchführung der Prüfung	34
6.6.4	Bewertung der Ergebnisse	37
6.6.5	Prüfbericht	37
Anhang A (informativ) Typen von Prüfungen, die zur Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten betrachtet werden		38
Anhang B (informativ) Dentin-Barriere-Zytotoxizitätsprüfung		40
B.1	Ziel	40
B.2	Geräte und Materialien	40
B.2.1	Zellen	40
B.2.2	Kulturmedium	40
B.2.3	Reagenzien	40
B.2.4	Geräte und Prüfmittel	41
B.3	Durchführung der Prüfung	44
B.3.1	Herstellung der Zellkulturen	44
B.3.2	Herstellung der Dentinscheiben	44
B.4	Kontrollmaterial	46
B.5	Bewertung der Ergebnisse	46
B.6	Prüfbericht	47
Anhang C (informativ) Anwendungsprüfung eines enossalen Implantats		49
C.1	Allgemeines	49
C.2	Prüfverfahren	49
C.2.1	Prüfprotokoll	49
C.2.2	Tiere und Tierschutz	50
C.2.3	Durchführung der Prüfung	50
C.2.4	Beurteilung	51
C.2.5	Prüfbericht	53
Anhang D (informativ) Antioxidant-Response-Element (ARE)-Reporterassay-Prüfung zum Nachweis von oxidativem Stress		54
D.1	Allgemeines	54
D.2	Übersicht über das Prüfverfahren	54
D.3	Zelllinie	54
D.4	Kulturmedium und Reagenzien	54
D.5	Geräte	55
D.6	Vorbereitung der Lösungen	56
D.6.1	Allgemeines	56
D.6.2	Prüfkörper	56
D.6.3	Medien	56

D.6.4	Reinigungsmittel	56
D.6.5	Lumineszenz-Stoffe	56
D.7	Anleitung zu den Verfahren	57
D.7.1	Allgemeines	57
D.7.2	Qualitätsprüfung des Assays (I); Positivkontrolle und Negativkontrolle	57
D.7.3	Qualitätsprüfung des Assays (II); Blindprobe	57
D.7.4	Qualitätsprüfung des Assays (III); Referenzmaterial	57
D.7.5	Qualitätsprüfung des Assays (IV); antioxidatives Material (Material mit entgegenwirkender Wirkung)	57
D.8	Durchführung der Prüfung	57
D.8.1	Arbeitsablauf	57
D.8.2	Vorbereitung der Zellen	58
D.8.3	Erster Tag	58
D.8.4	Zweiter Tag	58
D.8.5	Datenaufzeichnung	59
D.8.6	Datenanalyse	59
D.8.7	Beurteilung des oxidativen Stresses	60
D.8.8	Beispiele für typische ARE-Response-Kurven	60
D.9	Prüfbericht	62
Anhang E (informativ)	Sicherheitsspanne (MoS) für in der Zahnheilkunde verwendete Medizinprodukte	63
E.1	Allgemeines	63
E.2	Tolerierbare Aufnahme	64
E.3	Geschätzte ungünstigste Expositions-dosis	64
E.4	MoS-Berechnung	68
E.4.1	Allgemeines	68
E.4.2	Hypothetischer ungünstigster Fall	68
E.4.3	Ungünstigster Fall	69
E.4.4	Realistischer ungünstigster Fall	70
E.4.5	Simulierter ungünstigster Fall	71
E.5	Schlussfolgerung	72
Literaturhinweise		73

Bilder

Bild 1	— Pulpa-(Prä-)Dentingrenzfläche zum Zählen der Odontoblasten	30
Bild B.1	— Experimenteller Aufbau für die Dentin-Barriere-Zytotoxizitätsprüfung	41
Bild B.2	— Halter aus nichtrostendem Stahl zur Fixierung der Dentinscheibe und der Zellkultur in der Prüfapparatur	42
Bild B.3	— ADA-Perfusionskammer	43
Bild D.1	— Typische Kurve eines ARE-Response-Tests und eines MTT-Assays unter Verwendung von MMA und HEMA	61
Bild D.2	— Typische Kurve eines ARE-Response-Tests und eines MTT-Assays unter Verwendung einer Positivkontrolle (ZDEC)	61
Bild D.3	— Typische Kurve eines ARE-Response-Tests unter Verwendung einer Positivkontrolle (ZDEC) mit 5 mmol/l NAC	62

Tabellen

Tabelle 1	— Entfärbungs-Index	20
Tabelle 2	— Qualitativer morphologischer/Lysis-Index	20
Tabelle 3	— Bewertung der Zellschädigung	24
Tabelle 4	— Einstufung des Prüfmateri- als	24

Tabelle 5 — Einstufungsskala für die Pulpa- und Dentin-Anwendungsprüfung	29
Tabelle 6 — Einstufung des Zelltodes der Odontoblasten	30
Tabelle 7 — Einstufungsskala für die Pulpaüberkappungsprüfung	33
Tabelle 8 — Einstufungsskala für die endodontische Anwendungsprüfung	36
Tabelle A.1 — Typen von Prüfungen, die zur Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten betrachtet werden	39
Tabelle B.1 — Beispiel für eine Positivkontrolle	46
Tabelle B.2 — Bewertung der Zellschädigung	47
Tabelle B.3 — Einstufung des Prüfmaterials	47
Tabelle D.1 — Arbeitsablauf beim ARE-Response-Test	58
Tabelle E.1 — Ungünstigstes Volumen und ungünstigste biologische Kontaktfläche der für einige Behandlungen benötigten Dentalwerkstoffe	66

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 7405:2024) 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.

Dieses Dokument wird EN ISO 7405:2018 ersetzen.

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.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 7405:2024 wurde von CEN als prEN ISO 7405:2024 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

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 Directives, 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 Directives, 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*, in Zusammenarbeit mit dem Europäischen Komitee für Normung (CEN), Technisches Komitee CEN/TC 55, *Zahnheilkunde*, in Übereinstimmung mit der Vereinbarung zur technischen Zusammenarbeit zwischen ISO und CEN (Wiener Vereinbarung) erarbeitet.

Diese vierte Ausgabe von ISO 7405 ersetzt ISO 7405:2018, die technisch überarbeitet wurde.

Die wesentlichen Änderungen im Vergleich zur Vorgängerausgabe sind folgende:

- Aktualisierung der normativen Verweisungen (z. B. Ersetzung von ISO 6344-1 durch ISO 6344-3);
- Klärung zum Text von Definitionen und Hinzufügen der Definition für Dentin-Barriere (3.8);
- bei der Agardiffusionsprüfung (6.2) wurden die Kriterien für die Beurteilung der Entfärbungszone (Tabelle 1) und des qualitativen morphologischen/Lysis-Index (Tabelle 2) mit ISO 10993-5 harmonisiert;
- Hinzufügen von Anhang D mit einer Antioxidant-Response-Element (ARE)-Reporterassay-Zytotoxizitätsprüfung.

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

Dieses Dokument beschreibt die Bewertung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten. Es soll zusammen mit der Normenreihe ISO 10993 angewendet werden. 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 Minimierung der Anzahl und der Exposition 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 am selben 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 Risiken am Arbeitsplatz.

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 ersetzt ISO/TS 22911.

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 1942, *Dentistry — Vocabulary*

ISO 6344-3, *Coated abrasives — Grain size analysis — Part 3: Determination of grain size distribution of microgrits P240 to P2 500*

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 10993-5:2009, *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 skin sensitization*

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

ISO 10993-12:2021, *Biological evaluation of medical devices — Part 12: Sample preparation and reference materials*

ISO 10993-17, *Biological evaluation of medical devices — Part 17: Toxicological risk assessment of medical device constituents*

ISO 10993-18:2020, *Biological evaluation of medical devices — Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process*

ISO 10993-18:2020/Amd 1:2022, *Biological evaluation of medical devices — Part 18: Chemical characterization of medical device materials within a risk management process — Amendment 1: Determination of the uncertainty factor*

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

ISO 10993-23, *Biological evaluation of medical devices — Part 23: Tests for irritation*

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

ISO 16443, *Dentistry — Vocabulary for dental implants systems and related procedure*

CIE S 017, *ILV: International Lighting Vocabulary*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 1942, ISO 10993-1, ISO 10993-12, ISO 10993-17, ISO 16443, CIE S 017 und die folgenden Begriffe.

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

Dentalwerkstoff

Substanz oder Kombination von Substanzen, die speziell formuliert und für die Anwendung in der Zahnheilkunde und/oder bei dazugehörigen Verfahren hergestellt wurde

Anmerkung 1 zum Begriff: „Substanz“ in dieser Definition umfasst auch Werkstoffe.

[QUELLE: ISO 1942:2020, 3.1.4.8, modifiziert — Anmerkung 1 zum Begriff wurde hinzugefügt.]

3.2

Endprodukt

Medizinprodukt oder Komponente eines Medizinprodukts, das/die alle Herstellungsprozesse für das „zu vermarktende“ Produkt durchlaufen hat, einschließlich Verpackung und Sterilisation, falls zutreffend, und das die Verarbeitungsschritte vor der beabsichtigten Anwendung, solche wie Mischen, Vorkonditionieren und Präparieren, enthält

[QUELLE: ISO 10993-1:2018, 3.8, modifiziert — „falls zutreffend, und das die Verarbeitungsschritte vor der beabsichtigten Anwendung, solche wie Mischen, Vorkonditionieren und Präparieren, enthält“ wurde hinzugefügt.]

3.3

Positivkontrolle

Positivkontrollmaterial

gut charakterisierte(r) Werkstoff 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

3.4

Negativkontrolle

Negativkontrollmaterial

gut charakterisierte(r) Werkstoff 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 enthalten Negativkontrollen Blindbestimmungen, Überträgersubstanzen oder Lösemittel und *Referenzmaterialien* (3.5).

3.5

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 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.

3.6

In-vitro-Pulpakammer

Gerät, das eine dünne Dentinscheibe zwischen zwei Kammern hält und Flüssigkeiten und Moleküle filtert oder durch die *Dentin-Barriere* (3.8) diffundieren lässt

3.7

Diffusion

Einrichtung einer passiven Bewegung gelöster Stoffe (gelöste Bestandteile) mithilfe eines Druckgefälles durch die *Dentin-Barriere* (3.8)

3.8

Dentin-Barriere

Barriere aus einer Dentinscheibe menschlichen oder tierischen Ursprungs

4 Einteilung der Medizinprodukte

4.1 Einteilung nach der Art des Körperkontakts

4.1.1 Allgemeines

Für die Zwecke dieses 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 mehrmaligem Kontakt 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 Für die Zwecke dieses Dokuments schließt der Begriff „Zahnheilkunde“ die Mund-Kiefer-Gesichtsumgebung ein.

4.1.2 Produkte ohne Körperkontakt

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

4.1.3 Produkte mit Kontakt zur Körperoberfläche

Zu diesen Produkten gehören Produkte, die die Oberfläche der gesunden oder verletzten oder sonst wie beeinträchtigten Haut bzw. Mundschleimhaut berühren, und solche Produkte, die mit den Außenflächen der Zahnhartsubstanz, einschließlich Schmelz, Dentin und Zement, in Kontakt kommen.

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

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

Zu diesen Produkten gehören Dentalprodukte, 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 1 Diese Gruppe enthält auch alle Arten von Unterfüllungs- oder Basiswerkstoffen, die unter einer Restauration verwendet werden.

ANMERKUNG 2 Diese Gruppe enthält keine Implantate, die in der Zahnheilkunde verwendet werden (4.1.5).

4.1.5 Implantate, die in der Zahnheilkunde verwendet werden

Zu diesen Produkten gehören Dentalimplantate und andere Dentalprodukte, 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) jede Kombination davon, z. B. transdentale Implantate.

4.2 Einteilung nach der Kontaktdauer

4.2.1 Allgemeines

Für die Zwecke dieses 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.

Bei mehrfachem Kontakt mit dem Medizinprodukt muss 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.

ANMERKUNG Bei der Berechnung der Kontaktdauer für die Einteilung des Kontakts mit wiederholt verwendeten Medizinprodukten kann die gesamte Kontaktdauer in Tagen zwischen der ersten und letzten Verwendung des Medizinprodukts berücksichtigt werden. Zum Beispiel kann dasselbe Medizinprodukt wiederholt an mehreren Tagen wiederverwendet werden, oder es können Ersatzprodukte über mehrere Tage verwendet werden. Wenn erwartet wird, dass die Behandlungsabstände lang im Vergleich zur Eliminationszeit von aus dem Körper herauslösbaren Toxinen sind, kann diese seltene Verwendung wie eine einzelne Behandlungsepisode angesehen werden.

4.2.2 Produkte mit kurzem Kontakt

Produkte, deren kumulative Summe der einmaligen, mehrfachen oder wiederholten Kontaktdauer bis zu 24 h beträgt.

4.2.3 Produkte mit längerem Kontakt

Produkte, deren kumulative Summe der einmaligen, mehrfachen oder wiederholten Kontaktdauer wahrscheinlich über 24 h, aber nicht mehr als 30 Tage beträgt.

4.2.4 Produkte mit langzeitigem Kontakt

Produkte, deren kumulative Summe der einmaligen, mehrfachen oder wiederholten Kontaktdauer über 30 Tage beträgt.

5 Biologisches Beurteilungsverfahren

5.1 Allgemeines

Alle in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukte müssen einem strukturierten biologischen Beurteilungsprogramm im Rahmen eines Risikomanagementprozesses unterzogen werden (siehe ISO 10993-1). Die Anleitungen zur Umsetzung dieses Programms in ISO 14971 und ISO 10993-1 müssen angewandt werden.

Das biologische Beurteilungsprogramm muss die Übersicht über die Datensätze zu den biologischen Eigenschaften für alle in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukte enthalten. Sofern dieser Teil des biologischen Beurteilungsprogramms anzeigt, dass ein Datensatz oder mehrere Datensätze unvollständig ist (sind) und weitere Prüfungen erforderlich sind, müssen die Prüfungen aus den in der Normenreihe ISO 10993 oder in diesem Dokument, 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, einschließlich einer Begründung für die Auswahl der anderen Prüfungen.

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

ANMERKUNG 1 In diesem Kontext sind Kombinationsprodukte Dentalprodukte aller 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 Knochenfüllmaterial/Augmentationsmaterial, das einen Wachstumsfaktor enthält (d. h. ein biologisches Produkt).

Bei Kombinationsprodukten, bei denen das Medizinprodukt und die pharmakologischen Komponenten getrennt verpackt sind, kann es aufschlussreich sein, die Produktkomponenten allein zu prüfen.

Alle Prüfungen müssen nach anerkannten aktuellen/gültigen Labor-/Qualitätssicherungsverfahren durchgeführt werden, wo zutreffend.

ANMERKUNG 2 Beispiele relevanter Anleitungen enthält GLP (en: Good Laboratory Practice) oder ISO/IEC 17025.

5.2 Auswahl der Prüfungen und Gesamtbewertung

Die Auswahl der Prüfungen und die Gesamtbewertung der Ergebnisse müssen von einem Experten vorgenommen werden, der die entsprechenden chemischen, physikalischen und biologischen Daten über das Medizinprodukt besitzt 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, und
- c) die Kontaktdauer.

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

5.4 Typen von Prüfungen

5.4.1 Allgemeines

Entsprechend der Einteilung des Medizinprodukts müssen für die Anwendung die in Tabelle A.1 zusammengefassten Prüfungen berücksichtigt werden. 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, muss im Prüfbericht für jedes Medizinprodukt begründet werden. 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 alternative Verfahren geeigneter sein können.

5.4.2 Physikalische und chemische Charakterisierung

Die Materialcharakterisierung des Medizinprodukts oder der Komponente (siehe Tabelle A.1) ist ein entscheidender erster Schritt in der biologischen Beurteilung. Die Materialcharakterisierung, falls durchgeführt, muss in Übereinstimmung mit ISO 10993-18 und ISO/TS 10993-19 durchgeführt werden. Für Nanomaterialien siehe ISO/TR 10993-22.

Die Arten der biologischen Prüfungen werden in drei Gruppen eingeteilt.

Die toxikologische Risikobewertung chemischer Bestandteile sollte nach ISO 10993-17 durchgeführt werden und im Rahmen der toxikologischen Risikobewertung sollte die Sicherheitsspanne (en: margin of safety, MoS) berücksichtigt werden. Eine Anleitung für die Sicherheitsspanne (MoS) ist Anhang E zu entnehmen.

5.4.3 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 muss befolgt werden. Genaue Prüfprotokolle für die Agar- oder Agarosediffusionsprüfung und die Filterdiffusionsprüfung, die für Dentalwerkstoffe geeignet sind, sind in diesem Dokument enthalten. Die Verfahren zur *In-vitro*-Prüfung auf Zytotoxizität beinhalten:

- a) Agardiffusionsprüfung (siehe 6.2);
- b) Filterdiffusionsprüfung (siehe 6.3);
- c) Prüfungen mit direktem Kontakt oder Verfahren zur Prüfung von Extrakten nach ISO 10993-5;
- d) Dentin-Barriere-Zytotoxizitätsprüfung (siehe Anhang B);
- e) Antioxidant-Response-Element (ARE)-Reporterassay-Zytotoxizitätsprüfung (siehe Anhang D).

ANMERKUNG 1 Die Reihenfolge der 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 brauchen.

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.

ANMERKUNG 4 Die Anwendung der ARE-Reporterassay-Zytotoxizitätsprüfung wird unterstützt, wenn die Messung des oxidativen Stresses von Zellen nach dem Kontakt mit Prüf- und Kontrollmaterialien über Stoffwechselaktivität anwendbar, berechtigt oder beides ist.

5.4.4 Gruppe II

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

- a) akute systemische Toxizität — orale Applikation — nach ISO 10993-11;
- b) akute systemische Toxizität — Applikation durch Inhalation — nach ISO 10993-11;
- c) subakute und subchronische systemische Toxizität — orale Applikation — nach ISO 10993-11;
- d) Hautsensibilisierung nach ISO 10993-10;
- e) Gentoxizität nach ISO 10993-3;
- f) lokale Effekte nach Implantation nach ISO 10993-6;
- g) Irritation nach ISO 10993-23.

ANMERKUNG 1 Um nur die Anwendung der neuesten Ausgabe eines in Bezug genommenen Dokuments zu erlauben, ist ein undatierter Verweis möglich. Eine Angabe des entsprechenden Abschnitts und Unterabschnitts ist nur bei datierten Verweisungen möglich. Deshalb wird der Anwender dieses Dokuments aufgefordert, die in Bezug genommenen Dokumente auf die entsprechenden Abschnittsnummern hin zu überprüfen.

Bei der Beurteilung von Materialien nach einer lokalen Implantation nach ISO 10993-6, einschließlich mineralisiertem Gewebe, wird zusätzlich zur routinemäßigen Prüfung der demineralisierten Schnitte eine Prüfung der nicht demineralisierten Schnitte empfohlen.

ANMERKUNG 2 Wenn geeignet, werden die lokalen Effekte nach der Implantation nach der Anwendungsprüfung für ein enossales Dentalimplantat anstatt nach ISO 10993-6 bewertet [siehe 5.4.5, d)].

5.4.5 Gruppe III

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

- a) Pulpa- und Dentin-Anwendungsprüfung (siehe 6.4);
- b) Pulpaüberkappungsprüfung (siehe 6.5);
- c) endodontische Anwendungsprüfung (siehe 6.6);
- d) Anwendungsprüfung eines enossalen Dentalimplantats (siehe Anhang C).

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, der Qualität oder der Leistungsangaben, oder eine Kombination daraus, vorgenommen werden.

ANMERKUNG Siehe auch ISO 10993-1:2018, B.4.5.1, die Angaben dazu enthält, wann eine erneute Bewertung zu erfolgen hat.

6 Spezielle Prüfverfahren für Dentalwerkstoffe

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 werden entweder die entsprechenden Produktnormen oder die jeweiligen Gebrauchsanweisungen des Herstellers, oder beide, eingesehen und diesen Beschreibungen möglichst genau Folge geleistet. Jede Abweichung von den Angaben in der Gebrauchsanweisung wird begründet. Eine genaue Beschreibung der Probenherstellung muss in den Prüfbericht aufgenommen werden. Die folgenden Faktoren (z. B. Umweltfaktoren) werden bei der Betrachtung der Endanwendung des Medizinprodukts berücksichtigt:

- a) Temperatur;
- b) Luftfeuchte;
- 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 wird sichergestellt, 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, wird sichergestellt, dass die Form für den Prüfkörper während des Aushärtens entsprechend abgedichtet ist;
- f) Sterilisation: Prüfkörper müssen entweder unter aseptischen Bedingungen hergestellt oder mit dem für den Werkstoff geeigneten Verfahren sterilisiert werden, sofern dies erforderlich und möglich ist. Es wird sichergestellt, 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 wird dokumentiert. Die Auswahl der Form und Probenoberfläche sowie das angewandte Verhältnis von Probenoberfläche zur Zellschichtoberfläche oder zum Zellkulturmedium wird begründet;
- h) Extrakte: Sofern für ein Prüfverfahren Extrakte erforderlich sind, werden die Proben nach ISO 10993-12:2021, Abschnitt 10, hergestellt.

6.1.3 Besondere Empfehlungen für lichthärtende Werkstoffe

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

- 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 für die Form zur Herstellung der Prüfkörper können halbtransparente oder weiße Kunststoffmaterialien sein, wie Polyethylen oder PTFE.

- b) **Lichtexposition:** Die Lichthärtung muss erfolgen, damit die klinische Anwendung so genau wie möglich nachgebildet wird. Die Gebrauchsanweisung des Herstellers muss eingehalten werden, damit der gleiche Aushärtungsgrad wie in der praktischen Anwendung erreicht wird. Oft wird dies eine Lichthärtung nur von einer Seite erfordern, aber manchmal auch eine zweiseitige Aushärtung mit sich bringen. Das Aushärteverfahren ist entweder material- oder prozessspezifisch oder beides. 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 dürfen bei Betrachtung ohne Vergrößerung keine Hohlräume, Spalten oder Luftblasen vorhanden sein. Angaben über die Eigenschaften der verwendeten Lichtquelle müssen erfolgen (Bestrahlungsstärke auf der Werkstoffoberfläche, spektrale Verteilung der Bestrahlungsstärke oder des Strahlungsflusses, Aushärtungsdauer und Art des aushärtenden Lichts müssen dokumentiert werden). Es muss sichergestellt werden, dass die Lichtquelle und der Betriebszustand der Gebrauchsanweisung des Herstellers der Lichtquelle und des Werkstoffs entsprechen;
- c) **Sauerstoffexposition:** Bei Werkstoffen, die während des Lichthärtens eine sauerstoffinhibierende Oberflächenschicht bilden, müssen während des Lichthärtens beide Enden der Form mit transparenten, sauerstoffundurchlässigen Materialien (z. B. eine Polyesterfolie) abgedeckt werden. 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 P2 000 nach ISO 6344-3 geschliffen werden, nachdem sie auf dem transparenten sauerstoffundurchlässigen Material ausgehärtet 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 wird ausreichend Werkstoff angemischt, um sicherzustellen, dass jeder Prüfkörper aus einer Mischung hergestellt wird. Für jeden Prüfkörper wird eine neue Mischung hergestellt. 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. einer Polyesterfolie) bedeckt werden. 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 P2 000 nach ISO 6344-3 beschliffen werden, nachdem sie auf dem sauerstoffundurchlässigen Material ausgehärtet wurden.

6.1.5 Positivkontrolle

Für *In-vitro*-Prüfungen und sicherlich für *In-vivo*-Prüfungen (z. B. Pulpa- und Dentin-Anwendungsprüfung) ist es sinnvoll, eine genormte Positivkontrolle einzuschließen, die wie das zu prüfende Material gehandhabt und verarbeitet wird (d. h. plastisch nach dem Mischen und dann abbindend) und die auf frei verfügbaren Chemikalien oder Materialien beruht.

Solch eine Positivkontrolle für *In-vitro*-Prüfungen von plastischen Füllwerkstoffen wird in 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 mit Agar oder Agarose in Wechselwirkung treten.

6.2.2 Zelllinie

Verwendet wird eine etablierte Fibroblasten- oder Epithelzelllinie, die leicht zu beziehen ist [z. B. von der American Type Culture Collection (ATCC), siehe <https://www.atcc.org>]¹. Im Prüfbericht werden die Identifikationsnummer der Zelllinie, falls vorhanden, die Beschreibung und Bezeichnung der verwendeten Zelllinie sowie eine Begründung für ihre Auswahl angegeben. Siehe auch ISO 10993-5.

6.2.3 Kulturmedium, Reagenzien und Ausrüstung

Das für die ausgewählte Zelllinie festgelegte Kulturmedium wird verwendet. Durch Filtration wird sterilisiert. Um 3%igen Agar oder 3%ige Agarose, aufgetaut, temperiert und durch Autoklavieren sterilisiert, herzustellen, wird 1:1 mit dem Kulturmedium gemischt.

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 Kochsalzlösung²) unmittelbar vor der Anwendung hergestellt. Die Neutralrot-Lösungen werden vor Lichteinstrahlung geschützt gelagert. Verwendet werden 6-Well-Zellkulturplatten (mit 6 Vertiefungen von 35 mm Durchmesser) oder für Zellkulturen geeignete Petrischalen mit einem Nenndurchmesser von 50 mm bis 100 mm.

6.2.4 Probenvorbereitung

Die Proben werden nach 6.1 und den folgenden Verfahren hergestellt. Die Prüfung ist entweder an einem Extrakt des Werkstoffs oder am Werkstoff selbst oder an beiden, 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 hergestellt, um einen ausreichenden Kontakt mit der Agarüberlagerungsschicht sicherzustellen.
- b) Wenn die Prüfkörper aus unterschiedlichen Werkstoffen bestehen, muss sichergestellt werden, dass alle Komponenten ausreichend Kontakt zum Agar / zur Agarose haben. Wenn dies nicht möglich ist, kann diese Prüfung nicht durchgeführt werden.
- c) 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 Abbindezeit erfolgt bei $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchte von $(90 \pm 10) \%$, bis der Werkstoff zur Prüfung bereit ist.

1 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 nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

2 Dulbecco ist ein Warenzeichen. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO.

- d) Für flüssige Prüfkörper oder Extrakte wird 0,01 ml Flüssigkeit auf eine auf den Agar gelegte Filterscheibe aus Borosilicatomikroglas 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 Kontrollmaterialien

Für die Prüfung werden Positivkontrollen, Negativkontrollen und Referenzmaterialien mit wiederholbaren Ergebnissen verwendet.

ANMERKUNG 1 Der Zweck der Positivkontrolle ist es, eine angemessene Reaktion des Prüfsystems anzuzeigen. Zum Beispiel wurde ein mit organischem Zinn stabilisiertes Polyurethan³ als Positivkontrolle für feste Werkstoffe und Extrakte verwendet. Verdünnungen von Phenol werden zum Beispiel als Positivkontrolle für Extrakte verwendet. Zusätzlich zu einem Werkstoff können auch reine Chemikalien zum Nachweis der Leistung des Prüfsystems verwendet werden.

ANMERKUNG 2 Der Zweck der Negativkontrolle ist es, einen Hintergrund-Response der Zellen anzuzeigen. Zum Beispiel wurden als Negativkontrollen Polyethylen hoher Dichte⁴ für synthetische Polymere und Stäbe aus keramischem Aluminiumoxid für Dentalwerkstoffe verwendet.

6.2.6 Durchführung der Prüfung

Die Zellen werden kultiviert, bis das Ende der logarithmischen Phase der Wachstumskurve erreicht ist. 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.

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 wird bei Raumtemperatur gelieren gelassen (etwa 10 min bei Raumtemperatur oder zusätzlich 10 min im CO_2 -Inkubator vor dem Hinzufügen von Neutralrot-Lösung). 10 ml Neutralrot-Lösung wird hinzugefügt und für 15 min bis 20 min im Dunkeln gelassen. Die überschüssige Neutralrot-Lösung wird abgesaugt.

Die Zellkultur wird bei Anwesenheit von Neutralrot vor Lichteinstrahlung geschützt, da die Zellen geschädigt werden können.

Auf jede Petrischale wird eine geeignete Anzahl von Proben des zu prüfenden Werkstoffs und der Kontrollmaterialien mit einem angemessenen Abstand (> 20 mm) zwischen zwei Proben, sofern zutreffend, gelegt. Wenn vermutet wird, dass der zu prüfende Werkstoff durch die Positivkontrolle verunreinigt wurde, wird in Betracht gezogen, den zu prüfenden Werkstoff und die Positivkontrolle voneinander getrennt zu halten (separate Petrischalen). Sie werden bei $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ in einer wassergesättigten Atmosphäre mit einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 5 % (Volumenanteil) für 24 h inkubiert. Jeder zu prüfende Werkstoff wird mindestens in vierfacher Ausfertigung untersucht (d. h. zwei Schalen je Werkstoff).

3 Die Polyurethane ZDEC und ZDBC können vom Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Japan) bezogen werden.

4 Polyethylen hoher Dichte kann von U.S. Pharmacopeia (Rockville, MD, USA) und vom Food and Drug Safety Center, Hatano Research Institute (Ochiai 729-5, Hadanoshi, Kanagawa 257, Japan) bezogen werden.

6.2.7 Beurteilungskriterien

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

Tabelle 1 — Entfärbungs-Index

Gradeinteilung	Reaktivität	Beschreibung der Reaktivitätszone
0	Keine	Keine Zone um oder unter dem Prüfkörper erkennbar.
1	Gering	Einige fehlgebildete oder degenerierte Zellen unter dem Probekörper.
2	Leicht	Die Zone ist auf die Fläche unter dem Prüfkörper begrenzt.
3	Mäßig	Die Zone erstreckt sich bis 1,0 cm über den Probekörper hinaus.
4	Stark	Die Zone erstreckt sich mehr als 1,0 cm über den Probekörper hinaus.

Tabelle 2 — Qualitativer morphologischer/Lysis-Index

Gradeinteilung	Reaktivität	Zustand aller Kulturen
0	Keine	Diskrete intrazytoplasmatische Granuli, keine Zellauflösung, keine Verringerung des Zellwachstums
1	Gering	Nicht mehr als 20 % der Zellen sind rund, lose anhaftend und ohne intrazytoplasmatische Granuli oder zeigen Änderungen in der Morphologie; vereinzelt sind aufgelöste Zellen vorhanden, nur geringe Wachstumshemmung bemerkbar.
2	Leicht	Nicht mehr als 50 % der Zellen sind rund, frei von intrazytoplasmatischen Granuli, keine ausgedehnte Zellauflösung; nicht mehr als 50 % Wachstumshemmung bemerkbar.
3	Mäßig	Nicht mehr als 70 % der Zellschichten enthalten runde Zellen oder sind aufgelöst; Zellschichten sind nicht vollständig zerstört, jedoch ist mehr als 50 % Wachstumshemmung bemerkbar.
4	Stark	Fast vollständige oder vollständige Zerstörung der Zellschichten.

Der Median für den Entfärbungs-Index und der Median für den Lysis-Index werden separat für jeden zu prüfenden Werkstoff bestimmt. Weichen die Indexwerte für die vier Replikate des zu prüfenden Werkstoffs um mehr als 2 Einheiten im Bereich von 0 bis 3 ab, wird die Prüfung wiederholt. 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, > 1, wird die Prüfung mit einem anderen Extraktionsmedium wiederholt.

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

ANMERKUNG Das Beurteilungssystem für die Agardiffusionsprüfung wurde an das in ISO 10993-5 beschriebene System angepasst. Demnach gibt es Unterschiede im Vergleich zum Beurteilungssystem in der Vorgängerausgabe von ISO 7405. ISO 10993-1:2018, 4.11, kann in Bezug genommen werden, um mit diesem Problem umzugehen.

Wenn aus bestimmten Gründen eine andere Beurteilungsart angewendet wird, muss diese begründet und im Prüfbericht angegeben werden [26].

6.2.8 Bewertung der Ergebnisse

Alle Informationen, die während der Prüfung gesammelt werden, insbesondere alle Abweichungen in den Ergebnissen zwischen der Prüfgruppe und der Kontrollgruppe, werden für die Bewertung der Prüfergebnisse berücksichtigt. Die Zellreaktion basiert auf dem Median des Entfärbungs-Index und des morphologischen/Lysis-Index von mindestens vier Wiederholungen der Prüfungen. Die Zellreaktion muss für jeden Parameter separat, entsprechend Tabelle 1 und Tabelle 2, beurteilt werden.

Die Ergebnisse der Bewertung werden in den Prüfbericht aufgenommen.

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

Ein Prüfbericht muss erstellt werden. Der Prüfbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) die Probe, einschließlich Losnummer, und die Details zu den Kontrollmaterialien (z. B. Positivkontrollen, Negativkontrollen und Referenzmaterialien);
- b) den Namen und die Adresse der Organisation, die das Produkt beurteilt;
- c) den Ort, an dem die Beurteilung stattgefunden hat;
- d) das Prüfdatum;
- e) die verwendete Norm (d. h. ISO 7405:202X);
- f) das verwendete Verfahren;
- g) das/die Ergebnis(se), einschließlich Verweisung auf den Abschnitt, in dem erläutert wird, wie das/die Ergebnis(se) berechnet wurden;
- h) alle Abweichungen vom Verfahren;
- i) alle festgestellten Auffälligkeiten;
- j) die Identität der Person, die den Bericht erstellt, einschließlich Datum und Unterschrift.

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 <https://www.atcc.org>]. Im Prüfbericht werden die Identifikationsnummer der Zelllinie, falls vorhanden, die Beschreibung und Bezeichnung der verwendeten Zelllinie sowie eine Begründung für ihre Auswahl angegeben. Siehe auch ISO 10993-5.

6.3.3 Kulturmedium, Reagenzien und Ausrüstung

Das Kulturmedium und der Agar oder die Agarose werden, wie in 6.2.3 beschrieben, für eine Übersichtung angesetzt. Die Lösungen werden entweder für eine Färbung mit Succinatdehydrogenase oder für eine unspezifische Färbung mit Hydrolase hergestellt.

Für die Färbung mit Succinatdehydrogenase werden folgende Stammlösungen vorbereitet:

- 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 demineralisiertem 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.

Verwendet werden Filter aus einer Mischung aus Zelluloseacetat und Zellulosenitrat mit 47 mm Durchmesser und einer Porengröße von 0,45 µm⁵.

6.3.4 Probenvorbereitung

Die Proben werden nach 6.1 hergestellt. 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 etwa 5 mm Durchmesser 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) Wenn die Prüfkörper aus unterschiedlichen Werkstoffen bestehen, muss sichergestellt werden, dass alle Komponenten ausreichend Kontakt zum Agar / zur Agarose haben. Wenn dies nicht möglich ist, kann diese Prüfung nicht durchgeführt werden.
- c) 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 1 Geeignete inerte Materialien können Glas oder PTFE sein.

- d) Für flüssige Prüfkörper oder Extrakte wird 0,01 ml Flüssigkeit auf eine Filterscheibe aus Borosilicatmikroglas mit 5 mm Durchmesser pipettiert, die auf den Agar gelegt wird.

5 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 ISO.

ANMERKUNG 2 Geeignete Filterscheiben können aus Vorfiltern hergestellt werden.

6.3.5 Kontrollmaterialien

Für die Prüfung werden Positivkontrollen, Negativkontrollen und Referenzmaterialien verwendet.

Siehe 6.2.5, ANMERKUNG 1 und ANMERKUNG 2.

6.3.6 Durchführung der Prüfung

Die Zellen werden kultiviert, bis das Ende der logarithmischen Phase der Wachstumskurve erreicht ist. 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 werden 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 werden sie bei Raumtemperatur gelieren gelassen. 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 Zellschicht nach unten gelegt. Drei bis fünf Prüfkörper werden auf die Oberfläche des Filters in jede Petrischale appliziert und für weitere 2 h und mindestens 24 h bei $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$ in einer wassergesättigten Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % (Volumenanteil) inkubiert. Es wird sichergestellt, 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 werden 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 wird mindestens in 4-facher Ausfertigung geprüft.

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 nachgewiesen [14]. 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 demineralisiertem 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 demineralisiertem 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 ultraviolettem Licht untersucht; z. B. entweder UVA oder sichtbares Licht $< 460\text{ nm}$ oder beides.

6.3.7 Bewertung der Zellschädigung

Bewertet wird die Zellschädigung entweder durch

a) Messung der Entfärbungszone (z. B. mithilfe eines Bildanalysesystems), oder

b) Anwendung der in Tabelle 3 festgelegten Skala.

Tabelle 3 — Bewertung der Zellschädigung

Skala	Einstufungsbewertung	Bereich der Entfärbung
0	Kein Unterschied in der Farbintensität über den Filter	Keine
1	Eine Zone reduzierter Farbintensität, oder eine entfärbte Zone mit einem Durchmesser kleiner als der Durchmesser des Prüfkörpers (5 mm)	$< 20 \text{ mm}^2$
2	Eine entfärbte Zone 5 mm bis 7 mm im Durchmesser	20 mm^2 bis 40 mm^2
3	Eine entfärbte Zone größer als 7 mm im Durchmesser	$> 40 \text{ mm}^2$

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 Bewertung der Ergebnisse

Alle in der Prüfung gesammelten Informationen, insbesondere alle Abweichungen in den Ergebnissen zwischen den Prüfgruppen und den Kontrollen, sind bei der Bewertung der Prüfergebnisse zu berücksichtigen. Eine sinnvolle Vorgehensweise zur Einstufung der zu prüfenden Werkstoffe wird in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4 — Einstufung des Prüfmateri als

Index der Zellschädigung	Interpretation
0	Nicht zytotoxisch
1	Schwach zytotoxisch
2	Moderat zytotoxisch
3	Stark zytotoxisch

Die Ergebnisse der Bewertung werden in den Prüfbericht aufgenommen.

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

Ein Prüfbericht nach 6.2.9 muss erstellt werden.

6.4 Pulpa- und Dentin-Anwendungsprüfung

6.4.1 Ziel

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

Das gleiche Format kann für menschliche Zähne angewandt werden (die aus kieferorthopädischen, parodontalen oder prothetischen Gründen zur Extraktion vorgesehen sind), vorausgesetzt, die Studie wurde nach den relevanten nationalen oder internationalen Vorschriften oder beiden entsprechend zugelassen.

6.4.2 Tiere und Tierschutz

Zum Schutz der Tiere muss ISO 10993-2 eingehalten werden.

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

ANMERKUNG 1 Es besteht die Möglichkeit, dass nationale gesetzliche Bestimmungen für Labortiere existieren.

Säugetiere aus nur einer Gattung (aber keine Nagetiere) werden verwendet. 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 müssen die zum Erfüllen der wissenschaftlichen Zielstellung erforderlichen niedrigsten Gattungen bei geringster Beeinträchtigung des Tierschutzes sein. Die Auswahl der Gattung muss begründet und dokumentiert werden.

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

Eine ausreichende Anzahl von Tieren wird ausgewählt, um für jeden Zeitraum mindestens sieben Zähne mit dem zu prüfenden Werkstoff 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 Konkremete 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 werden so tief präpariert, dass die Restdentindicke weniger als 1,0 mm und vorzugsweise mehr 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 zu prüfenden Werkstoffs erfordert ein anderes Vorgehen.

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

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

6.4.3.2.2 Wenn ein Dentalprodukt als Befestigungsmaterial, Klasse V Kavität, verwendet wird, muss die Kavitätenpräparation für ein Inlay nach der Entfernung aller Konkremete 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 lichterhärtender Kompositkunststoff eingesetzt wird. Nach der Lichthärtung und der Entfernung des Kompositkunststoffs muss die Kavität sorgfältig gespült und vorbereitet werden, um das Inlay für endgültige Zementierung zu erhalten.

Die Überfüllung der Inlaypräparation erleichtert die Entfernung des Inlays und der Überschuss 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 Inlays müssen für die für den Aufbau des Zements benötigte Zeit unter Druck gehalten werden, dadurch werden die hydraulischen Kräfte der vollen Kronenzementierung simuliert. In kleinen Tieren muss sichergestellt werden, dass die Kavitäten in das innere 1/3 des Dentins reichen, ohne die Pulpa freizulegen.

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 zu präparieren, die im Wesentlichen dazu dient, die gewünschte Nähe zur Pulpa zu erreichen, und dann die Kronenpräparation zu beenden.

6.4.3.2.3 Bei der Vorbereitung des zu prüfenden Werkstoffs wird die Gebrauchsanweisung des Herstellers eingehalten. Empfiehlt der Hersteller des zu prüfenden Werkstoffs dessen Anwendung mit einem Unterfüllungswerkstoff oder einem Kavitätenbehandlungsmittel (z. B. einem Dentinadhäsiv), so werden diese zusätzlichen Verfahren wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt.

6.4.3.2.4 Für jeden Zeitraum werden mindestens sieben Kavitäten mit dem zu prüfenden Werkstoff und vier Kavitäten mit einer Negativkontrolle in zufälliger Reihenfolge präpariert. Falls notwendig, werden für jeden Zeitraum bis zu vier Kavitäten mit einer Positivkontrolle präpariert.

ANMERKUNG Zu typischen Bewertungselementen für das Risiko systematischer Abweichungen bei Tierversuchen zählen weiter identische Expositionsbedingungen für Tiere, verdeckte Gruppenzuteilung, Verblindung von Personal (während der Zuteilung und Prüfung), Schwund (werden alle Tiere/Prüferte in den Ergebnissen berücksichtigt?). Zu Beispielen und Relevanz siehe z. B. Office of Health Assessment and Translation (OHAT), National Toxicology Program (NTP) <https://ntp.niehs.nih.gov/whatwestudy/assessments/noncancer/riskbias/index.html>.

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

Negativkontrolle. Ein schnell abbindender Zinkoxid-Eugenolzement (ZOE) 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 müssen von der Beurteilung ausgeschlossen werden (je näher die Füllung an der Pulpa ist, desto mehr wird das nicht reagierte Eugenol zu einem Reizstoff). Für eine Langzeitbewertung muss der Zinkoxid-Eugenolzement vor Auswaschung geschützt werden. Nach dem Entfernen der Oberfläche kann ein selbsthärtender konventioneller Glasionomer eine effektive Dichtheit bieten.

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 einem konservativen Entfernen der Oberfläche 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.

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 muss erfolgen, um vor der Kavitätenpräparation festzulegen, welche Kavitäten den Füllungswerkstoff der Prüfung, die Negativkontrollen und die Positivkontrolle erhalten. Falls praktisch möglich, werden die Kontroll- und experimentellen Zähne anatomisch 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 Prüfkörper und die kontralateralen und gegensätzlichen Zähne werden zu Kontrollprüfkörpern. Je nach Tiergattung und deren Verfügbarkeit darf die Zahnauswahl verändert werden.

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

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 Herstellung der Schnitte

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 werden untersucht und genaue Angaben über jede Abnormität festgehalten. Jeder behandelte Zahn, zusammen mit dem umgebenden Hart- und Weichgewebe, wird entfernt und in einem geeigneten Fixationsmedium fixiert.

6.4.3.5 Erhaltung der Zahnpulpa

6.4.3.5.1 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 geeignet. 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, muss 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.

6.4.3.5.2 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 6.4.3.5.4 zur Demineralisierung). Die Menge des Fixativs muss 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.

6.4.3.5.3 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 sollten, sogar in den besterhaltenen Prüfkörpern. 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.

6.4.3.5.4 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 Prüfkörpergröße nutzen) muss die Lösung alle 4 Tage 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 Prüfkörper müssen auch in einer Wanne ausgesetzt werden, weil die Flächen der Zähne am Boden des Containers nicht von der Säure angegriffen werden.

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

6.4.3.5.6 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 Anfärbbarkeit 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 muss als ja oder nein in jedem Prüfkörper aufgezeichnet werden. Der Prozentsatz der Prüfkörper mit Mikroorganismen sollte im Prüfbericht angegeben werden.

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 einer Kontrolle 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 aus der Kavitätenpräparationstechnik ergeben haben können. Von den Serienschnitten werden für die nachfolgende Untersuchung auf Entzündungen mindestens fünf ausgewählt, 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 5 festgelegten Skala beurteilt.

Tabelle 5 — 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	Moderate 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

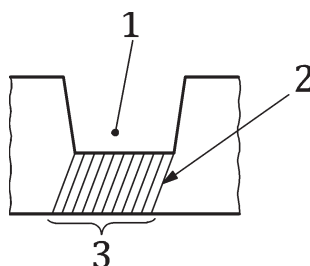
Für jeden bewerteten Schnitt wird die verbleibende Mindest-Dentindicke durch Messung im rechten Winkel vom Kavitätenboden zur Pulpa-(Prä-)Dentingrenzfläche und durch Messung entlang des Verlaufs der Dentintubuli aufgezeichnet. Im letztgenannten Fall wird die Messung entlang der Linie der Hauptrichtung der Dentintubuli vorgenommen, 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 wird ein Reaktionsindex für beide Entzündungsstellen in jedem Zeitraum berechnet, indem die einzelnen Abstufungen addiert und durch die Gesamtanzahl der Beobachtungen dividiert werden.

Die Daten für die mit dem zu prüfenden Werkstoff gefüllten Kavitäten, einschließlich des Unterfüllungswerkstoffes oder des Werkstoffs zur Kavitätenbehandlung, falls vom Hersteller empfohlen, werden getrennt von den Daten für die Kavitäten, die allein mit dem Negativkontrollmaterial gefüllt sind, sowie für die Kavitäten, die als Positivkontrollmaterial dienen, dargestellt. Die Daten für die mit Positivkontrollmaterial gefüllten Kavitäten können aus früheren Studien stammen, sofern die Prüfbedingungen identisch waren. Zusätzlich wird die Anzahl der Kavitäten, die Bakterien auf dem Kavitätenboden oder an der Kavitätenwand enthalten, in jedem Zeitraum für den zu prüfenden Werkstoff und die Kontrollmaterialien aufgezeichnet. 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 ist.

6.4.3.7 Analyse der Überlebensrate von Odontoblastenzellen (optional)

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

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 wird für jeden der fünf Schnitte aus jedem Prüfkörper vorgenommen und der Mittelwert der Zellzahl für diese Kavität wird abgeleitet. Dann werden die Mittelwerte der Zellzahlen für alle Prüf- (T) und die Negativkontroll-Kavitäten (NC) abgeleitet. 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 6 angegeben, eingeteilt.

Tabelle 6 — Einstufung des Zelltodes der Odontoblasten

Skala	Zelltod der Odontoblasten
0	Kein Zelltod
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, werden die Daten getrennt für die mit dem zu prüfenden Werkstoff, einschließlich Unterfütterung oder Kavitäten-Behandlungsmittel, gefüllten und für die als Positivkontrollen verwendeten Kavitäten aufgeführt. Die Daten für die Positivkontrollmaterialien werden als prozentualer Anteil der Negativkontrollmaterialien je obiger Prüfkavitäten angegeben. Sofern zutreffend, dürfen die Daten für die Positivkontrollmaterialien aus früheren Studien entnommen werden, bei denen die Prüfbedingungen mit denen der aktuellen Studie identisch waren.

6.4.4 Bewertung der Ergebnisse

6.4.4.1 Allgemeines

Alle in der Prüfung gesammelten Informationen, insbesondere jede Abweichung in den Ergebnissen zwischen den Versuchs- und den Kontrollgruppen, werden für die Bewertung der Prüfergebnisse in Betracht gezogen. Die Ergebnisse der Bewertung werden im Prüfbericht angegeben.

6.4.4.2 Statistische Analyse der verbleibenden Dentindicke

Die Zahlenwerte der verbleibenden Dentindicke (en: remaining dentine thickness, RDT) werden in mm aufgezeichnet und müssen mithilfe einer parametrischen Analyse auf Grundlage der Annahme analysiert werden, dass die Daten normal verteilt sind und dass die Abweichungen gleich sind. Die RDT darf sich statistisch nicht von experimentellen und Referenz-/Kontrollgruppen unterscheiden. Wenn die Ergebnisse durch eine Einstufung (nicht parametrische Daten) in Kategorien gemeldet werden, wie oben unter „Histologische Merkmale“ aufgelistet ist, muss eine nicht-parametrische Prüfung verwendet werden.

6.4.5 Prüfbericht

Ein Prüfbericht nach 6.2.9 muss erstellt werden.

6.5 Pulpaüberkappungsprüfung

6.5.1 Ziel

Das Ziel der Prüfung ist es, die Biokompatibilität von Pulpaüberkappungswerkstoffen in Kontakt mit der Pulpa zu beurteilen. Methodische Verfahren, die für die empfohlene klinische Anwendung des Werkstoffs erforderlich sind, werden in die Beurteilung einbezogen.

ANMERKUNG Mit wenigen Änderungen kann diese Prüfung auch für die Pulpotomieprüfung verwendet werden.

Die Pulpa- und Dentinanwendungsprüfung und die Pulpaüberkappungsprüfung dürfen gleichzeitig an den gleichen Tieren unter Verwendung unterschiedlicher Zähne durchgeführt werden.

6.5.2 Tiere und Tierschutz

Der Tierschutz wird entsprechend 6.4.2 umgesetzt.

Wie in 6.4.2 beschrieben, werden mindestens zwei Säugetiere (keine Nagetiere) einer Gattung verwendet.

6.5.3 Durchführung der Prüfung

6.5.3.1 Vorbereitung der Tiere

Eine ausreichende Anzahl von Tieren wird ausgewählt, um für jeden Zeitraum mindestens 10 Zähne mit dem zu prüfenden Werkstoff zur Verfügung zu haben.

Die Tiere werden betäubt und das in 6.5.3.2 beschriebene Verfahren wird angewandt.

6.5.3.2 Behandlung der Zähne

6.5.3.2.1 Alle Konkremente und Zahnbeläge werden von den Zahnoberflächen entfernt. Um die zu verwendenden Zähne zu isolieren, wird Kofferdam angelegt. Die Zahnoberflächen und das Behandlungsfeld werden gereinigt und getrocknet. Dieser Bereich wird mit 3 % (Volumenanteil) Wasserstoffperoxid abgetupft und mit einem aus Polyvidon-Iod oder Chlorhexidin bestehenden Desinfektionsmittel desinfiziert. Die erforderliche Anzahl bukkaler oder labialer Kavitäten der Klasse V wird mit einem scharfen Bohrer unter ausreichender Luft-Wasserkühlung präpariert. Die Präparationen sollten durch den Schmelz begrenzt werden, aber nach mesial und distal extendiert werden und in das innere Drittel des Dentins reichen. In der Kavitätenmitte wird ein Pul-

penbereich von 0,5 mm bis 1,0 mm Durchmesser vorsichtig unter Einsprühen einer sterilen Kochsalzlösung [0,9 % (Massenanteil)] freigelegt, ohne mit dem Präparationsinstrument in das Pulpagewebe einzutauchen. Der Durchmesser des freigelegten Bereichs muss in Zehntelmillimetern gemessen werden. Der Durchmesser des freigelegten Bereichs kann vom bekannten Durchmesser des Präparationsinstruments bewertet werden. Zur Blutstillung wird die freigelegte Stelle gründlich mit steriler Kochsalzlösung gespült und danach mit sterilen Wattepellets getrocknet.

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

6.5.3.2.2 Bei der Vorbereitung des zu prüfenden Werkstoffs wird die Gebrauchsanweisung des Herstellers eingehalten. Empfiehlt der Hersteller andere Spüllösungen oder Substanzen zur Blutstillung oder eine spezifische Vorbehandlung der Pulpawunde, so werden diese Anweisungen befolgt.

6.5.3.2.3 Eine zufällige Auswahl muss erfolgen, um festzulegen, welche Kavitäten den zu prüfenden Füllungswerkstoff, die Negativkontrolle und die Positivkontrolle vor der Kavitätenpräparation erhalten. Falls praktisch möglich, werden die Kontroll- und experimentellen Zähne anatomisch 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 Prüfkörper und die kontralateralen und gegensätzlichen Zähne werden zu Kontrollprüfkörpern. Je nach Tiergattung und deren Verfügbarkeit kann die Zahnauswahl verändert werden.

6.5.3.2.4 Für jeden Zeitraum werden mindestens 10 Kavitäten mit dem zu prüfenden Werkstoff und fünf Kavitäten mit einem geeigneten Referenzwerkstoff nach zufälliger Reihenfolge präpariert. Die Überkappungsmaterialien und die Kontrollen werden auf einer Platte (Anmischblock) angemischt, wobei eine mikrobielle Kontamination zu vermeiden ist. Die Werkstoffe werden ohne Druck auf die offene Pulpa aufgetragen. Die Kavität wird entweder mit einem Kompomer oder mit einem Glasionomerzement geschlossen. Diesem Schritt sollte eine Komposit-Kunststoff-Restauration mittels Klebetechnik folgen.

6.5.3.2.5 Die ausgewählten Gattungen sollten die zum Erfüllen der wissenschaftlichen Zielstellung erforderlichen niedrigsten Gattungen bei geringster Beeinträchtigung des Tierschutzes sein. Die Auswahl der Gattung muss begründet und dokumentiert werden. Bei Versuchen mit Affen, Hunden oder Minischweinen sollte für jeden Zeitraum mindestens ein Tier verwendet werden. Bei Frettchen sollten es für jeden Zeitraum mindestens vier Tiere sein, da nur die Eckzähne geeignet sind.

ANMERKUNG 1 Calciumsilicat-Keramizemente (ohne Kunststoff) sind geeignete Referenzmaterialien. Calciumhydroxid, das mit 0,9 % (Massenanteil) steriler Kochsalzlösung frisch zu einer sehr festen Konsistenz angemischt wird, ist ebenfalls geeignet.

ANMERKUNG 2 Um ein Auswaschen des Calciumsilicatzements nach dem Legen zu verhindern, wird ein kunststoffmodifizierter Glasionomerwerkstoff auf den Zement und 0,5 mm bis 1,0 mm umgebendes Dentin aufgetragen. Die Wiederherstellung der Endkontur erfolgt mit einem säureätzenden (oder selbstätzenden) Dentin-Haftvermittler zusammen mit einem polymerbasierenden Komposit.

ANMERKUNG 3 Zusätzlich zu den oben erwähnten Referenzmaterialien werden keine Positiv- oder Negativkontrollen benötigt, weil das Referenzmaterial biologisch aktiv ist.

ANMERKUNG 4 Wenn eine Calciumhydroxidpräparation genutzt wird, wird eine dünne Schicht von entweder einem Polycarboxylatzement oder einem konventionellen (selbsthärtenden) Glasionomerzement über die Präparation des Calciumhydroxids aufgetragen, gefolgt von einer Restauration mithilfe eines säureätzenden (oder selbstätzenden) Dentin-Haftvermittlers und einem polymerbasierenden Komposit.

6.5.3.2.6 Die Tiere werden, wie in 6.4.3.2.6 beschrieben, beobachtet und behandelt.

6.5.3.3 Histologische Aufarbeitung

6.5.3.3.1 Nach (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 10 Zähne mit dem zu prüfenden Werkstoff zur Verfügung zu haben. Die Restaurationen, die Zähne und deren Stützgewebe werden untersucht und genaue Angaben über jede Abnormität festgehalten. Jeder behandelte Zahn wird zusammen mit dem umgebenden Hart- und Weichgewebe in einem Block entfernt und in einem geeigneten Medium fixiert.

ANMERKUNG Eine vaskuläre Perfusion der Gewebe mit dem Fixativ zum Zeitpunkt der Tötung, bevor sie entnommen werden, verbessert die Fixierung.

6.5.3.3.2 Nach der Fixierung wird von jedem Gewebeblock ein Röntgenbild aufgenommen, um festzustellen, ob röntgenologische Veränderungen aufgetreten sind. Danach werden die histologischen Schnitte für die Untersuchung, wie in 6.4.3.5 beschrieben, vorbereitet.

6.5.3.4 Bewertung der Pulpa

Wie in dem in 6.4.3.6 beschriebenen Protokoll, werden die histologischen Schnitte untersucht, die histologischen Merkmale beschrieben, wird das entzündliche Infiltrat eingestuft und der Index der Entzündungsreaktion berechnet. Da das Pulpaoberflächengewebe beim Freilegen des Pulpabereichs zerstört wird, wird mithilfe der in Tabelle 7 festgelegten Skala eine einfache Einstufung des entzündlichen Infiltrats vorgenommen.

Tabelle 7 — Einstufungsskala für die Pulpaüberkappungsprüfung

Entzündungs- grad	Beschreibung entzündlicher Veränderungen
0	Keine Entzündung
1	Schwache Entzündung: verstreute Entzündungszellen im am freigelegten Pulpabereich anliegenden Pulpagewebe
2	Moderate Entzündung: Entzündungszellen mit kleinen Herdgruppen im am freigelegten Pulpabereich anliegenden Pulpagewebe
3	Starke Entzündung: ausgeprägte Infiltration von Entzündungszellen im am freigelegten Pulpabereich anliegenden Pulpagewebe
4	Abszessbildung oder ausgeprägte Infiltration von Entzündungszellen, nicht nur auf das am freigelegten Pulpabereich anliegende Pulpagewebe begrenzt

Zusätzlich muss das Ausmaß, die Verteilung und die Art von Dentinbrücken vollständig beschrieben werden, wobei besondere Aufmerksamkeit auf das Vorhandensein von Tunneldefekten und Zelleinschlüssen, die die Wirksamkeit der Brücke als Barriere beeinträchtigen können, zu richten ist. Der Grad der Brückenbildung der Pulpaeröffnung durch tertiäres Reizdentin wird auf einer Skala mit den Beurteilungskriterien „keine“, „teilweise“ oder „vollständig“ eingestuft. In der nachfolgenden Anmerkung wird eine Anleitung zur Interpretation der histologischen Merkmale der Dentin-Brückenbildung gegeben.

Das Ausmaß und die Verteilung einer möglichen Dentinbrücke müssen dahingehend betrachtet werden, ob der freigelegte Pulpabereich vollständig überbrückt ist, wie tief oder dick dies ist sowie auch dessen Verteilung in Bezug auf den freigelegten Bereich. Eine unvollständige Brücke bietet keinen wirksamen Schutz für die freigelegte Pulpa. Obwohl eine angemessene Brückentiefe für einen wirksamen Pulpaschutz gefordert wird, kann eine unkontrollierte reparative Dentinogenese zur Brückenbildung einen Verschluss der Pulpakammer hervorrufen und die Vitalität der Pulpa beeinträchtigen. Eine ausgedehnte reparative Dentinogenese außerhalb der lokalen Begrenzungen der Dentinbrücke und von deren tubularen Verbindungen mit dem Werkstoff kann neben der direkten Reaktion auf den Werkstoff auf eine Zellreaktion infolge einer Verletzung (z. B. chirurgische Verletzung) hindeuten. Die Regelmäßigkeit der tubularen Struktur in der Dentinbrücke kann auf den Grad der Dysplasie während der Bildung hinweisen, wobei die Abwesenheit oder das Vorhandensein weniger

Kanälchen auf eine größere dysplastische Gewebebildung hindeutet. Das Vorhandensein von Tunneldefekten und Zelleinschlüssen in der Dentinbrücke ist auch ein Hinweis auf eine dysplastische Gewebebildung und kann die Permeabilität und den Grad der Dichtheit, den diese Brücke bieten kann, beeinträchtigen.

6.5.4 Bewertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden, wie in 6.4.4 angegeben, beurteilt, einschließlich der statistischen Analyse der Ergebnisse. Wenn die Ergebnisse durch eine Einstufung (nicht parametrische Daten) in Kategorien gemeldet werden, wie oben unter „Histologische Merkmale“ aufgelistet ist, muss eine nicht-parametrische statistische Prüfung verwendet werden.

6.5.5 Prüfbericht

Ein Prüfbericht nach 6.2.9 muss erstellt werden.

6.6 Endodontische Anwendungsprüfung

6.6.1 Ziel

Das Ziel der Prüfung ist es, die Biokompatibilität endodontischer Werkstoffe in Kontakt mit den verbleibenden apikalen Pulpengeweben (Pulpastümpfe) und den periapikalen Geweben zu bewerten. Zur Bewertung gehören Verfahren, die für die empfohlene klinische Anwendung des Werkstoffs erforderlich sind.

Die endodontische Anwendungsprüfung sollte für bioaktive endodontische Werkstoffe verwendet werden, z. B. für Werkstoffe, für die angegeben wird, dass sie die Bildung von apikalem Hartgewebe stimulieren, und die entweder zur orthograden oder retrograden Applikation vorgesehen sind.

6.6.2 Tiere und Tierschutz

Der Tierschutz muss entsprechend 6.4.2 erfolgen.

Mindestens vier Säugetiere (keine Nagetiere) einer Gattung werden wie in 6.4.2 beschrieben in einem Alter verwendet, so dass ihr Gebiss intakte permanente Zähne mit abgeschlossenen (reifen) Wurzeln aufweist; die Verwendung der Schneide-, Eckzähne und Prämolaren wird bevorzugt. Die Verwendung von Prämolaren ist fakultativ, wenn zwei Wurzeln vorhanden sind.

6.6.3 Durchführung der Prüfung

6.6.3.1 Vorbereitung der Tiere

Eine ausreichende Anzahl von Tieren wird ausgewählt, um für jeden Zeitraum mindestens 10 Zähne mit dem zu prüfenden Werkstoff zur Verfügung zu haben.

Bei speziellen Hunderassen kann die Morphologie des apikalen Teils des Wurzelkanals eine Wurzelpräparation erschweren.

Die Tiere werden betäubt und die in 6.6.3.2 beschriebene Vorgehensweise wird durchgeführt.

6.6.3.2 Behandlung der Zähne

6.6.3.2.1 Es werden Röntgenaufnahmen vom periapikalen Bereich aller zu füllenden Zähne angefertigt. Alle Konkrement und Zahnbeläge werden von den Zahnoberflächen entfernt und die Zähne werden, wie in 6.5.3.2.1 beschrieben, gereinigt und isoliert.

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

Die erforderliche Anzahl an Zähnen für das Legen der Wurzelkanalfüllungen wird präpariert. Dazu wird eine geeignete Öffnung in die Pulpakammer mit scharfen Bohrern unter aseptischen Bedingungen gebohrt. Die freigelegte Pulpa wird mit Kochsalzlösung [0,9 % (Massenanteil)] gespült und mit sterilen Wattepellets getrocknet. Die Pulpa wird mit einer neuen, sterilen Wurzelkanalfeile oder einer geeigneten Exstirpationsnadel ($1,0 \pm 0,5$) mm von dem Foramen apicale abgetrennt und entfernt, indem die Instrumentenanwendung mithilfe der Röntgenbilder kontrolliert wird. Der Wurzelkanal wird mehrmals mit Natriumhypochloritlösung gespült [empfohlener Konzentrationsbereich von 1,0 % bis 5,25 % (Massenanteil)] und danach mit steriler 0,9 % (Massenanteil) Kochsalzlösung ausgespült.

Der Wurzelkanal wird durch mehrere, zunehmend größer werdende sterile Wurzelkanalfeilen erweitert, die in der Länge bis zur Stelle kalibriert sind, an der die Pulpa verletzt wurde, bis eine geeignete Größe für die Füllung erreicht ist. Es werden alle Anstrengungen unternommen, um alle Dentinsplitters aus dem Wurzelkanal zu entfernen, die den Apex blockieren können und dadurch den Kontakt des endodontischen Werkstoffs mit dem apikalen Gewebe verhindern. Nach Abschluss der instrumentellen Aufbereitung wird der Wurzelkanal mit Natriumhypochloritlösung [empfohlener Konzentrationsbereich von 1,0 % bis 5,25 % (Massenanteil)] gespült und danach mit steriler 0,9 % (Massenanteil) Kochsalzlösung ausgespült. Die Trocknung erfolgt mit sterilen Wattepellets und großen, stumpfen, sterilen Papierspitzen, ohne den verbliebenen apikalen Pulpastumpf zu berühren.

6.6.3.2.2 Bei der Vorbereitung des zu prüfenden Werkstoffs wird die Gebrauchsanweisung des Herstellers eingehalten. Wenn der Hersteller Verfahren zur Zahnpräparation empfiehlt, die von den oben genannten abweichen, dann werden die Anweisungen des Herstellers befolgt.

6.6.3.2.3 Eine zufällige Auswahl muss erfolgen, um vor der Kavitätenpräparation festzulegen, welche Kavitäten den zu prüfenden Füllungswerkstoff, die Negativkontrolle und die Positivkontrolle 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 Prüfkörper und die kontralateralen und gegensätzlichen Zähne werden zu Kontrollprüfkörpern. Je nach Tiergattung und deren Verfügbarkeit darf die Zahnauswahl verändert werden.

6.6.3.2.4 Für jeden Zeitraum werden mindestens 10 Zähne mit dem zu prüfenden Werkstoff und mindestens fünf Zähne mit einem geeigneten Referenzwerkstoff gefüllt. Die endodontischen Werkstoffe und die Referenzwerkstoffe werden auf einer Platte (Anmischblock) angemischt, wobei eine mikrobielle Kontamination vermieden wird. Der Wurzelkanal wird entweder mit dem zu prüfenden Werkstoff oder dem Referenzwerkstoff mit Guttapercha bis zum abgetrennten Teil der Pulpa gefüllt. Die Zugangskavität wird mit einem verstärkten Zinkoxideugenol-Zement geschlossen, der entweder mit einem Polycarboxylatzement oder einem konventionellen (selbsthärtenden) Glasionomerzement oder einem durch Säureätzen befestigten Kompositkunststoff abgedeckt wird. Es werden Röntgenbilder aufgenommen, die den periapikalen Bereich von allen Zähnen zeigen, die gefüllt wurden.

6.6.3.2.5 Bei Versuchen mit Affen, Hunden oder Minischweinen sollten für jeden Zeitraum mindestens zwei Tiere verwendet werden. Bei Frettchen sollten es für jeden Zeitraum mindestens vier Tiere sein, da nur die Eckzähne geeignet sind.

6.6.3.2.6 Wenn ein Kompositkunststoff verwendet wird, sollte eine dünne Schicht aus entweder konventionellem (selbsthärtendem) Glasionomerzement oder Polycarboxylatzement zuerst über den Zinkoxid-Eugenol-Zement gelegt werden. Das Aufbringen eines Kompositkunststoffs in direktem Kontakt mit dem Zinkoxid-Eugenol-Zement kann zu einer Hemmung der Polymerisation des Kompositkunststoffs führen.

ANMERKUNG Zinkoxideugenol-Zement, entweder allein oder mit weiteren Zusätzen, wie im Grossmann-Sealer, ist ein geeignetes Referenzmaterial.

6.6.3.2.7 Die Tiere werden wie in 6.4.3.2.6 beschreiben beobachtet und gehalten.

6.6.3.3 Herstellung der Schnitte

6.6.3.3.1 Nach (28 ± 3) Tagen und (90 ± 5) Tagen wird eine ausreichende Anzahl der Tiere mit einer Überdosis Betäubungsmittel oder durch die Anwendung von anderen allgemein akzeptierten Substanzen getötet, um mindestens 10 Zähne mit dem zu prüfenden Werkstoff zur Verfügung zu haben. Die Restaurationen, die Zähne sowie deren Stützgewebe werden untersucht und genaue Angaben über alle Abnormität werden aufgezeichnet. Jeder behandelte Zahn wird zusammen mit dem umgebenden Hart- und Weichgewebe in einem Block entfernt und in einem geeigneten Fixationsmedium fixiert.

ANMERKUNG Eine vaskuläre Perfusion der Gewebe mit dem Fixativ zum Zeitpunkt der Tötung, bevor sie entnommen werden, verbessert die Fixierung.

6.6.3.3.2 Nach der Fixierung wird von jedem Gewebeblock ein Röntgenbild aufgenommen, um festzustellen, ob röntgenologische Veränderungen aufgetreten sind. Die Schnitte für die Untersuchung werden, wie in 6.4.3.5 beschrieben, angefertigt, parallel zur Längsachse des Zahns durch den Wurzelkanal und dessen Verzweigungen, und zeigen die Grenzfläche zwischen Werkstoff/Pulpagewebe und dem angrenzende periapikalen Gewebe.

6.6.3.4 Gewebewertung

Die Schnitte werden untersucht ohne vorherige Kenntnis darüber, ob sie von dem zu prüfenden Werkstoff oder einer Kontrolle stammen. Für jede Schnittserie wird eine vollständige Beschreibung aller histologischen Merkmale in der Pulpa, im periapikalen Gewebe, im Dentin und im Zement des apikalen Teils des Zahns festgehalten. Für jeden zu prüfenden Werkstoff werden die Veränderungen im Gewebe nach den in Tabelle 8 festgelegten Kriterien eingestuft. Beispiele für histologische Merkmale, die zu berücksichtigen sind, sind in den nachfolgenden Beispielen enthalten.

Tabelle 8 — Einstufungsskala für die endodontische Anwendungsprüfung

Skala	Beobachtung
0	Keine Entzündung
1	Schwache Entzündung: Die Prüfkörper zeigen verstreute Entzündungszellen, überwiegend chronische Entzündungszellen und die Strukturmerkmale der restlichen Pulpa sind noch erkennbar
2	Moderate Entzündung: Die Prüfkörper zeigen eine umschriebene Ansammlung von Entzündungszellen, jedoch keine Gewebenekrose und einige Störungen der Strukturmerkmale der restlichen Pulpa und des periapikalen Gewebes
3	Starke Entzündung: Die Prüfkörper zeigen einen umfangreichen Ersatz der restlichen Pulpa oder des periapikalen Gewebes durch ein Infiltrat der Entzündungszellen
4	Abszessbildung

Beispiele für histologische Merkmale, die aufgezeichnet werden müssen, sind im Folgenden dargestellt.

- Eine Bewertung zum Nachweis, ob die Wurzelkanalfüllung kurz, bündig oder extrudiert ist: Diese Beobachtung wird mit dem Vorhandensein einer Entzündung, Wurzelresorption und Knochenreaktion in Beziehung gebracht.
- Extrusion des Wurzelkanalversiegelungswerkstoffs (Zement): Es wird festgestellt, ob der Wurzelkanalversiegelungswerkstoff durch den Apex in den umgebenden parodontalen Raum und in das Knochengewebe extrudiert ist. Auch wenn dies wahrscheinlich am 28. Tag beobachtet wird, darf der Langzeitraum von dieser Bewertung nicht ausgeschlossen werden.
- Das Vorhandensein von nekrotischem Apikalgewebe.

- d) Die Qualität der Adaptation des Wurzelkanalfüllungswerkstoffes eingestuft als gut, deutlich oder gering: Eine gute Adaptation bedeutet, dass der Füllungswerkstoff gut an die Kanalwände bei nicht nur einem Schnitt, sondern bei Serienschnitten angepasst ist, ohne dass freie Stellen vorhanden sind. Mit deutlich wird eingestuft, wenn einige Schnitte freie Stellen oder Bereiche aufweisen, an denen der Füllungswerkstoff nicht gut an die Wurzel angepasst ist. Eine geringe Adaptation wird aufgezeichnet, wenn der Füllungswerkstoff mit der Kanalwand nicht bündig ist oder wenn zahlreiche freie Stellen vorhanden sind.
- e) Weitere Spezifikation der oben ausgeführten Entzündung (und von 0 bis 4 eingestuft) nach dem vorliegenden Typ der vorhandenen Entzündungszellen: Der vorherrschende Zelltyp wird aufgelistet und es wird anerkannt, dass die akuten Zellen (Leukozyten) früher auftreten, während mononukleare Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und vielkernige Riesenzellen) später erscheinen. Die Entzündungsreaktionen werden als akut (A), chronisch (C) oder gemischt (M) eingestuft.
- f) Wurzelresorption (vorhanden oder nicht vorhanden).
- g) Die Reaktion des apikalen Knochens, eingestuft als normal oder entzündet (Grad der Entzündung), und eine Bestimmung, ob ein Granulom vorhanden ist und ob der Knochen Anzeichen einer Resorption aufweist.
- h) Grad der Entzündungsreaktion, auf einer Skala von 0 bis 3, wie in Tabelle 9 beschrieben.

6.6.4 Bewertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden, wie in 6.4.4 angegeben, bewertet, einschließlich einer statistischen Analyse der Ergebnisse. Wenn die Ergebnisse durch eine Einstufung (nicht parametrische Daten) in Kategorien aufgezeichnet werden, wie die oben unter „Histologische Merkmale“ aufgelisteten, muss eine nicht-parametrische statistische Prüfung verwendet werden.

6.6.5 Prüfbericht

Ein Prüfbericht nach 6.2.9 muss erstellt werden.

Anhang A (informativ)

Typen von Prüfungen, die zur Beurteilung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten betrachtet werden

Tabelle A.1 enthält die Typen von Prüfungen, die zur Bewertung der Biokompatibilität von in der Zahnheilkunde verwendeten Medizinprodukten betrachtet werden.