

Aus der Poliklinik für Präventive Zahnmedizin, Parodontologie und Kariologie  
(Prof. Dr. med. dent. A. Wiegand)  
im Zentrum Zahn-Mund-Kieferheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

*In-vitro-Analyse der antimikrobiellen Effektivität von Octenidol<sup>®</sup>,  
Natriumhypochlorit und Chlorhexidin gegen Enterococcus faecalis  
anhand eines intrakanalären Biofilm-Modells*

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
für Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Carolin Yvonne Hoffmann**

aus

Bayreuth

Göttingen 2015

**Dekan:** Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

**I. Berichterstatter/in:** Priv.-Doz. Dr. med. dent. T. Rödiger

**II. Berichterstatter/in:** Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers

**III. Berichterstatter/in:** Prof. Dr. med. dent. R. Mausberg

**Tag der mündlichen Prüfung:** 22. Februar 2016

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1	Klinische Bedeutung der chemo-mechanischen Aufbereitung	3
2.2	Bedeutung der Schmierschicht	4
2.3	Die persistierende Wurzelkanalinfektion	4
2.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	5
2.5	Der Biofilm	6
2.6	Spüllösungen für den Wurzelkanal	6
2.6.1	Natriumhypochlorit (NaOCl)	7
2.6.2	Chlorhexidindigluconat (CHX)	8
2.6.3	Octenidol®	8
2.7	Vorstellung eines In-vitro-Modells zur Infektion und Desinfektion extrahierter Zähne	9
<b>3</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methode</b>	<b>12</b>
4.1	Studiendesign	12
4.2	Vorversuche	14
4.3	Hauptversuch	15
4.3.1	Versuchsdurchführung	15
4.3.2	Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop	22
4.4	Statistische Auswertung	23
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>25</b>
5.1	Resultat der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung	25
5.1.1	Entfernung der Schmierschicht durch Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und Natriumhypochlorit (NaOCl)	25
5.1.2	Präsenz des Biofilms	26
5.2	Ergebnisse des Hauptversuchs	27
5.2.1	Übersicht der Auszählung	27
5.2.2	Absolute Keimzahlen	28
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>31</b>
6.1	Studiendesign	31
6.1.1	Material	32

## Inhaltsverzeichnis

---

6.1.2 Versuchsaufbau .....	33
6.2 Ergebnisse.....	35
6.2.1 Schmierschichtentfernung.....	35
6.2.2 Bewertung der Biofilmentwicklung .....	36
6.2.3 Effektivität der Spülungen .....	37
<b>7 Zusammenfassung.....</b>	<b>41</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>43</b>
<b>9 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen.....</b>	<b>61</b>
<b>10 Materialliste.....</b>	<b>63</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

### A

AL Arbeitslänge

### B

BF Biofilm

BHI brain heart infusion

### C

Ca(OH)<sub>2</sub> Kalziumhydroxid

CFU colony forming units

CHX Chlorhexidindigluconat

CMPC Kampfermonochlorphenol

CPD critical point drying

### D

DGZMK Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde

### E

E. faecalis Enterococcus faecalis

EDTA Ethylendiamintetraacetat

### F

FM FlexMaster

### G

GG Gates-Glidden-Bohrer

### K

KI Konfidenzintervall

### N

NaCl Natriumchlorid, Kochsalzlösung

NaOCl Natriumhypochlorit

NiTi Nickel-Titan

## Abkürzungsverzeichnis

---

### **R**

REM Rasterelektronenmikroskop

### **S**

SL smear layer

## 1 Einleitung

Jonathan Taft beschrieb 1859 erstmals die Effektivität häufigen Spülens im Wurzelkanalsystem von Zähnen (Taft 1859). Seither untersuchten zahlreiche Studien die Effektivität antibakterieller Desinfektionslösungen im Rahmen der endodontischen Behandlung. Der Einsatz von Wurzelkanalspülungen stellt bis zum heutigen Zeitpunkt ein unverzichtbares Hilfsmittel dar, Mikroorganismen und infiziertes Gewebe aus Wurzelkanälen zu eliminieren, was bei der Heilung endodontischer Erkrankungen und damit zur langfristigen Erhaltung des Zahnes notwendig ist (Schäfer et al. 2000).

Mikroorganismen spielen bei der Ätiologie apikaler Parodontitiden eine zentrale Rolle und können sich in Form von Biofilmen in unzugänglichen Bereichen des Wurzelkanalsystems, wie beispielsweise kleinen Seitenkanälchen der apikalen Ramifikationen, einer mechanischen Aufbereitung entziehen (Nair 2006). Die Persistenz dieser Mikroorganismen beziehungsweise eine mikrobielle Rekolonisierung nach erfolgter Wurzelkanalfüllung kann zu periapikalen Erkrankungen führen und gilt als Hauptursache für den Misserfolg einer endodontischen Therapie (Sjögren et al. 1997). Die Heilungsrate apikaler Parodontitiden in einem Zeitraum bis zu zehn Jahre nach initialer Behandlung wird mit 73% bis 90% beziffert (Farzaneh et al. 2004; Friedman und Mor 2004; Friedman et al. 2003). Da jedoch selbst mit modernsten endodontischen Präparationsinstrumenten eine vollkommene Keimfreiheit im Wurzelkanal nicht realisierbar ist (Schäfer und Zapke 2000), ist die Effizienz der desinfizierenden Wurzelkanalspülung von großer therapeutischer Bedeutung und soll in der vorliegenden Arbeit analysiert werden.

Das von Henry Drysdale Dakin erstmals während des Ersten Weltkriegs eingesetzte Wunddesinfektionsmittel Natriumhypochlorit (NaOCl) (Dakin 1915) wird heute weltweit in der Endodontie angewendet und gilt als die Spülflüssigkeit der ersten Wahl. Dennoch ist die Wirksamkeit dieser Spüllösung gegen persistierende Keime im Wurzelkanal, besonders bei geringen Konzentrationen, umstritten (Arias-Moliz et al. 2009; Ayhan et al. 1999). Darüber hinaus wurde in der Vergangenheit von Zwischenfällen während und nach der Wurzelkanalspülung berichtet (Hülsmann und

Hahn 2000), die eine uneingeschränkte Eignung im klinischen Alltag zusätzlich in Frage stellen.

Aus diesem Grund erscheint die Suche nach einer antibakteriellen Wurzelkanal-spülung, welche effizient auch gegen resistente Keime wirkt und zugleich eine geringe Nebenwirkungsrate aufweist, relevant. Eine mögliche Alternative könnte Chlorhexidindigluconat (CHX) darstellen, das in der Zahnheilkunde bereits seit 1970 erfolgreich gegen dentale Biofilme eingesetzt wird (Loe und Schiott 1970) und über ein breites antibakterielles Spektrum verfügt. Auch Octenidindihydrochlorid – als Wirkkomponente der Mundspüllösung Octenidol® – bietet ein breites mikrobiozides Spektrum bei vergleichsweise sehr guter Schleimhaut- und Gewebeverträglichkeit. Dennoch gibt es zur Effektivität von Octenidindihydrochlorid gegen endodontische Keime bisher nur wenige Studien.

Im Rahmen dieser In-vitro-Studie wurde ein Vergleich der antimikrobiellen Effektivität von Octenidol®, NaOCl und CHX gegenüber *Enterococcus faecalis* anhand eines intrakanalären Biofilm-Modells vorgenommen.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Klinische Bedeutung der chemo-mechanischen Aufbereitung

Der Erfolg einer endodontischen Behandlung hängt insbesondere von der chemo-mechanischen Aufbereitung des Wurzelkanalsystems ab. Diese schließt sowohl die mechanische Präparation des Wurzelkanals (*cleaning and shaping*) (Schilder 1974) als auch die Desinfektion mit antibakteriellen und gewebeauflösenden Substanzen ein und führt zu einer signifikanten Bakterienreduktion (Siqueira et al. 2002). Eine optimale Formgebung des Wurzelkanalsystems verbessert die Applikation desinfizierender Spüllösungen und erleichtert die Durchführung einer homogenen Wurzelkanalfüllung (Hülsmann et al. 2005). Die mechanische Präparation kann sowohl maschinell mit Nickel-Titan-Instrumenten (NiTi) als auch manuell mit Wurzelkanalinstrumenten aus Edelstahl erfolgen. Der wesentliche Vorteil der maschinellen Präparation ist der effektive und zeitsparende Materialabtrag (Hata et al. 2002) unter Berücksichtigung der Wurzelkanalkrümmung (Hülsmann et al. 2003b; Schäfer und Lohmann 2002).

Obwohl durch die Präparation des Wurzelkanaldentins eine Reduktion der Mikroorganismen um den Faktor 100 bis 1000 möglich ist (Byström und Sundqvist 1981), findet aufgrund der anatomischen Komplexität des Wurzelkanals keine ausreichende Keimreduktion statt (Vertucci 1984). Sogar moderne maschinelle NiTi-Systeme können keine umfassende Reinigung des Wurzelkanalsystems herbeiführen (Peters 2004; Schäfer und Zapke 2000) und es verbleiben nach der Präparation des Wurzelkanals bis zu 35% der Dentinwände unbearbeitet (Peters et al. 2001; Bolanos und Jensen 1980). Die Kanalwände ovaler Wurzeln bleiben sogar bis zu 80% uninstrumentiert (Paqué et al. 2010). Aus diesem Grund ist eine zusätzliche chemische Desinfektion des Wurzelkanals mithilfe von Spüllösungen erforderlich. Studien zeigten, dass die Präparationstechnik, die chemischen Eigenschaften der Spülflüssigkeit und die Zusammensetzung der mikrobiellen Flora das Ergebnis der chemo-mechanischen Aufbereitung maßgeblich beeinflussen (Soares und Pires Junior 2006; Siqueira et al. 2000; Siqueira et al. 1999).

## 2.2 Bedeutung der Schmierschicht

Während der Präparation entsteht eine das Wurzelkanalentin bedeckende Schmierschicht (*smear layer*), welche den Mikroorganismen als Substrat dient. Dieser *Smear layer* ist ein amorpher, irregulärer Film aus organischen und anorganischen Komponenten und tritt lediglich bei instrumentierten Kanalwänden in Erscheinung (Torabinejad et al. 2002). Die Schmierschicht enthält als wesentliche Bestandteile Dentintrümmer, Gewebereste der Pulpa, Odontoblastenfortsätze (Gwinnett 1984) und Bakterien mit ihren Stoffwechselprodukten (Akpata und Blechman 1982). Die Dicke des *Smear layer* beträgt 1 bis 5  $\mu\text{m}$  und kann die Dentintubuli bis in eine Tiefe von 6 bis 40  $\mu\text{m}$  verblocken (Mader et al. 1984). Obwohl in der Vergangenheit die Entfernung bzw. das Belassen der Schmierschicht kontrovers diskutiert wurde (Mozayeni et al. 2009; Shahravan et al. 2007; Drake et al. 1994), befürworten mittlerweile die meisten Autoren ihre Entfernung (Violich und Chandler 2010; Carvalho et al. 2008; Hülsmann et al. 2003a; Torabinejad et al. 2002). Durch Belassen der Schmierschicht können intrakanaläre Medikamente und Spülflüssigkeiten nicht in die verschlossenen Dentintubuli penetrieren und werden in ihrer Wirkung reduziert (Shahravan et al. 2007; McComb und Smith 1975). Die Schmierschicht verhindert weiterhin eine wandständige Adaptation von Sealer und Guttapercha und verursacht Undichtigkeiten (*microleakages*) zwischen Dentin und Wurzelkanalfüllung (Clark-Holke et al. 2003). In diesen Bereichen können sich Mikroorganismen erneut vermehren, wodurch die Persistenz von Wurzelkanalinfektionen gefördert wird (Love 2001).

Auch die Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK) empfiehlt in ihrer Stellungnahme von 2006 eine Entfernung der Schmierschicht mithilfe von Ethylendiamintetraacetat (EDTA) oder Zitronensäure, gefolgt von Natriumhypochlorit (NaOCl) (Barthel et al. 2006).

## 2.3 Die persistierende Wurzelkanalinfektion

Persistierende intrakanaläre Infektionen gelten als Hauptursache für den Misserfolg einer Wurzelkanalbehandlung (Siqueira und Rocas 2008) und sind durch das Auftreten apikaler Parodontitiden (Vieira et al. 2012) und klinischer Symptome nach abgeschlossener Behandlung gekennzeichnet. Als Ursache gelten vor allem Mikroorganismen, welche gegenüber Desinfektionsmaßnahmen unempfindlich sind

und sich schnell veränderten Umwelteinflüssen anpassen können. Diese können einerseits aus der primären mikrobiellen Flora stammen oder sekundär während oder nach der Behandlung in das Wurzelkanalsystem eingedrungen sein (Siqueira 2002). Generell unterscheidet sich das Bakterienspektrum wurzelkanalbehandelter Zähne mit persistierender Parodontitis apicalis von dem primärer Infektionen (Siqueira und Rocas 2005; Sundqvist et al. 1998) und umfasst nur wenige Spezies (Hancock et al. 2001; Molander et al. 1998; Sundqvist et al. 1998; Baumgartner und Falkler 1991). Verschiedene Studien zeigten, dass auch nach erfolgter chemo-mechanischer Aufbereitung 40% bis 60% kultivierbare Bakterien im Wurzelkanal zurückblieben (Siqueira et al. 2007; Shuping et al. 2000; Sjögren et al. 1997; Byström und Sundqvist 1985).

### 2.4 *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ist ein grampositives, fakultativ anaerobes Bakterium, das sowohl im Endodont als auch bei nosokomialen Infektionen und Endokarditis in Erscheinung tritt (Portenier et al. 2006). Der Keim besitzt die Fähigkeit, sich als Monokultur im Wurzelkanalsystem zu etablieren. Seine dominierende Präsenz bei Zähnen mit misslungener endodontischer Behandlung ist in der Literatur gut dokumentiert (Pinheiro et al. 2003; Hancock et al. 2001; Molander et al. 1998; Sundqvist et al. 1998). Stuart et al. gaben im Rahmen einer Übersichtsarbeit eine Prävalenz von *E. faecalis* mit bis zu 77% bei wurzelkanalgefüllten Zähnen mit periapikaler Läsion an (Stuart et al. 2006). Dagegen wurde der Keim bei primären Infektionen des Endodonts in nur 18% der Fälle gefunden (Rocas et al. 2004). Sind Enterokokken erst in das Endodont eingedrungen, gestaltet sich ihre Entfernung kompliziert (Meire et al. 2009). Der geringe Durchmesser des Erregers von 0,5 bis 1 Mikrometer befähigt ihn, sich in Nischen des Wurzelkanals – wie Dentinkanälchen, Ramifikationen und Isthmen – zu etablieren (Love 2001; Waltimo et al. 2000) und sich der chemo-mechanischen Aufbereitung des Wurzelkanalsystems zu entziehen. Die besonders ausgeprägte Virulenz von *E. faecalis* ist durch sein hohes spezifisches und erworbenes Resistenzvermögen geprägt. Das Bakterium kann auch unter schlechten Stoffwechselbedingungen überleben (Portenier et al. 2005; Figdor et al. 2003; Hartke et al. 1998) und ein alkalisches Umfeld mit pH-Werten bis zu 11,1 tolerieren. Eine spezifische Protonenpumpe in der Bakterienzellmembran

transportiert dafür aktiv Protonen ins Zellinnere und hält den intrazellulären pH-Wert konstant (Evans et al. 2002). Der Keim erhält dadurch eine Widerstandsfähigkeit gegen eine Vielzahl an Medikamenten, wie beispielsweise Antibiotika oder Kalziumhydroxid (Nakajo et al. 2006; Ørstavik und Haapasalo 1990). *E. faecalis* ist darüber hinaus in der Lage, auf der Wurzelkanalwand einen Biofilm zu bilden (Kishen et al. 2006; George et al. 2005; Distel et al. 2002). Durch Auflösen des anorganischen Anteils des Dentinsubstrates kann das Bakterium eine zunehmende Kalzifizierung des Biofilms hervorrufen und seine Widerstandsfähigkeit nach endodontischer Behandlung zusätzlich steigern (Kishen et al. 2006).

### **2.5 Der Biofilm**

In infizierten Wurzelkanälen wachsen Mikroorganismen vornehmlich in Aggregationen und sind in der Lage, sessile Biofilme zu bilden (Ricucci und Siqueira 2010; Chavez de Paz 2007). Als Biofilm bezeichnet man dreidimensional organisierte Anhäufungen von Mikroorganismen, die in einer Matrix aus selbstständig produzierten extrazellulären Polysacchariden eingebettet sind und auf einer Oberfläche haften (Donlan und Costerton 2002; Costerton et al. 1999; Costerton et al. 1994). Es entstehen komplexe pilz- oder turmartige Mikrokolonien, die von wasserführenden Kanälen durchsetzt sind (Stoodley et al. 2002). Die extrazelluläre Matrix verleiht den Mikroorganismen innerhalb des Biofilms zusätzlich eine mechanische Widerstandsfähigkeit (Korstgens et al. 2001) und dient als Abwehr gegen zahlreiche Medikamente und Desinfektionsmaßnahmen. Durch die verlangsamte Stoffwechselrate der im Biofilm organisierten Bakterien wird die Wirkung antimikrobieller Substanzen vermindert (Sandoe et al. 2006; Donlan und Costerton 2002). Es konnte gezeigt werden, dass in Biofilmen organisierte Bakterien rund tausendfach resistenter als in planktonischer Form sind (Ceri et al. 1999; Gilbert et al. 1997).

### **2.6 Spüllösungen für den Wurzelkanal**

Eine ideale Spüllösung verfügt über ein breites antimikrobielles Spektrum und löst sowohl vitales als auch nekrotisches Pulpagewebe auf (Barthel et al. 2006). Durch eine niedrige Oberflächenspannung wird die Eindringtiefe der Spüllösungen in die Dentintubuli erhöht. Neben der desinfizierenden Wirkung dient eine Spüllösung auch

als Gleitmittel für Wurzelkanalinstrumente (Hülsmann 2006; Peters et al. 2005). Falk und Sedgley stellten fest, dass die Präparationsgröße bei der Wurzelkanalaufbereitung einen signifikanten Einfluss auf die mechanische Wirksamkeit der Spülung ausübt (Falk und Sedgley 2005). Da sich das Pulpagewebe vor allem im apikalen Anteil des Wurzelkanals häufig deltaförmig in kleine Seitenäste aufteilt, ist die Spülung dieses Bereichs von besonderer Bedeutung. Aufgrund der komplexen Anatomie des Endodonts können auch nach der Instrumentierung Mikroorganismen und Gewebereste in Isthmen und Ramifikationen verbleiben und zu einer persistierenden Infektion führen. Sowohl die Kanalanatomie als auch die Präparationsgröße beeinflussen somit die Fähigkeit einer Spülflüssigkeit, in apikale Bereiche des Wurzelkanalsystems vorzudringen (Vertucci 1984). Die minimale apikale Präparationsgröße wird in der Literatur zwischen ISO 30 (Khademi et al. 2006) und ISO 40 (Albrecht et al. 2004) angegeben. Für die effektive Applikation der Spüllösungen sollten Kanülen mit einem möglichst geringen Durchmesser von 0,3 bis 0,4 mm verwendet werden (Barthel et al. 2006). Nur dünne Spülnadeln sind imstande, bis in apikale Bereiche vorzudringen und eine effektive Applikation der Spüllösungen bis 1 mm vor Arbeitslänge zu gewährleisten.

### 2.6.1 Natriumhypochlorit (NaOCl)

Natriumhypochlorit ist das am häufigsten angewendete Spülmedium im Rahmen der endodontischen Therapie (Zehnder 2006; Basrani und Lemonie 2005) und gilt aufgrund seiner klinischen Effizienz als Goldstandard der Wurzelkanalspülung. Natriumhypochlorit ist ein stark alkalisches Oxidationsmittel, das unter Bildung von Chloramin bakterielle Enzyme oxidiert und inhibiert (Estrela et al. 2002). Diese Eigenschaft erklärt die antimikrobielle Wirkung gegenüber den meisten endodontisch bedeutsamen Bakterien (Portenier et al. 2005; Spratt et al. 2001; Ørstavik und Haapasalo 1990) und die besondere Fähigkeit, vitales und nekrotisches Gewebe aufzulösen (Naenni et al. 2004; Haikel et al. 1994). Unvorteilhaft ist der toxisch ätzende Effekt, der bereits einige Unfälle während der Behandlung durch Überpressen des NaOCl in die periradikulären Gewebe verursachte (Hülsmann et al. 2007; Hülsmann und Hahn 2000). Seltene allergische Reaktionen wurden ebenfalls beschrieben (Hostynek et al. 1989; Kaufman und Keila 1989). Darüber hinaus weist NaOCl einen schlechten Geschmack und ein Korrosionspotential gegenüber zahnärztlichen Instrumenten auf (Busslinger et al. 1998). Die antibakterielle und

gewebeauflösende Aktivität von NaOCl, aber auch seine Toxizität (Spangberg et al. 1973) ist von der Konzentration abhängig (Dunavant et al. 2006). Obwohl in der Endodontie Natriumhypochlorit-Konzentrationen zwischen 0,5% und 5,25% zum Einsatz kommen, werden mehrheitlich hochvolumige Spülungen einer Konzentration von 1% empfohlen (Zehnder 2006; Siqueira et al. 2000).

### 2.6.2 Chlorhexidindigluconat (CHX)

Chlorhexidindigluconat ist ein hochwirksames Antiseptikum, welches insbesondere zur Plaque-Kontrolle und Behandlung von Gingivitis verwendet wird (Addy und Moran 1997). Für diesen Zweck werden wässrige Lösungen von 0,1% bis 0,2% genutzt. Im endodontischen Bereich hingegen findet CHX in 2%iger Konzentration Anwendung. Chlorhexidin bekämpft insgesamt ein breites Spektrum an Mikroorganismen (Siqueira et al. 1998; Siqueira und de Uzeda 1997), wobei grampositive Bakterien, wie beispielsweise *E. faecalis*, besser eliminiert werden als gramnegative (Athanasiadis et al. 2007; Emilson 1977; Hennessey 1973). Dennoch ist abschließend nicht sicher geklärt, ob CHX effektiver gegen *E. faecalis* wirkt als NaOCl. Aktuell wird CHX besonders in Revisionsfällen mit persistierenden apikalen Parodontitiden eingesetzt, bei welchen *E. faecalis* meist in Form einer Monoinfektion vorliegt (Sundqvist et al. 1998). Aufgrund seines kationischen Charakters bindet sich das Bisguanid an negativ geladene Phosphatgruppen des Hydroxylapatits und an anionische Strukturen in Bakterienzellwänden. Die bakterizide Wirkung beruht auf der Erhöhung der Membranpermeabilität und anschließendem Austreten des Zellinhaltes. Eine anhaltende Depotwirkung über einen Zeitraum von etwa 12 Wochen ist für Chlorhexidin charakteristisch (Rosenthal et al. 2004; Grenier 1996; Parsons et al. 1980; Rolla et al. 1971). Bei geringerer Toxizität besitzt CHX im Gegensatz zu NaOCl jedoch nicht die Fähigkeit, nekrotisches Gewebe aufzulösen und wirkt zudem hautirritierend (Foulkes 1973).

### 2.6.3 Octenidol®

Octenidol® wird üblicherweise als Spüllösung im Rahmen der zahnärztlichen Prophylaxe zur Desinfektion der Mundhöhle verwendet. Als Wirkstoff ist Octenidindihydrochlorid in einer Konzentration von 0,1% enthalten. Chemisch betrachtet handelt es sich um ein Bispyridin, welches zwei kationisch aktive Zentren

pro Molekül trägt und mit der negativ geladenen Zytoplasmamembran von Mikroorganismen interferiert (Tandjung et al. 2007). Als Desinfizienz wirkt es gegen ein breites bakterielles Spektrum (Sedlock und Bailey 1985), fungizid und eingeschränkt viruzid. Nach Angaben des Herstellers erreicht die Mundspülung bei parodontal relevanten Mikroorganismen bereits bei geringer Einwirkzeit eine Keimreduktion um 4,7 bis 8 Logarithmus-Stufen. Beiswanger et al. stellten dazu fest, dass eine 0,1%ige Octenidinlösung statistisch signifikant 39% der Plaque, 50% der Gingivitis und zu 60% Zahnfleischbluten reduziert (Beiswanger et al. 1990).

In der klinischen Praxis wird Octenidin auch in anderer Zusammensetzung als Sprühdesinfektion für Wunden und Schleimhaut (Octenisept®) eingesetzt.

Nur wenige In-vitro-Studien untersuchten bisher die Effektivität von Octenidin in Form von Octenidol® bzw. Octenisept® zur Eliminierung endodontischer Keime (de Lucena et al. 2013; Tirali et al. 2013b; Tirali et al. 2013a; Tirali et al. 2012; Tirali et al. 2009).

### **2.7 Vorstellung eines In-vitro-Modells zur Infektion und Desinfektion extrahierter Zähne**

Eine Vielzahl experimenteller Untersuchungen beschäftigte sich in der Vergangenheit mit der Wurzelkanal-desinfektion (Cohenca et al. 2013; Soares et al. 2010; Arias-Moliz et al. 2009; Zehnder 2006; Spratt et al. 2001). An extrahierten Zähnen durchgeführte In-vitro-Studien sind jedoch mit den Bedingungen, welche am lebenden Patienten tatsächlich vorzufinden sind, nicht zwingend vergleichbar (Chavez de Paz et al. 2010). Daher sollten standardisierte Versuchsaufbauten entwickelt werden, die eine realitätsnahe Abbildung der klinischen Situation ermöglichen. Haapasalo und Ørstavik galten mit ihrem 1987 vorgestellten In-vitro-Modell zur standardisierten Infektion und Desinfektion extrahierter Zähne als Pioniere auf diesem Gebiet (Haapasalo und Ørstavik 1987). Ihr Ziel war es, eine einfache und verlässliche Behandlungsweise zur Analyse der Effektivität von Medikamenten in Wurzelkanälen unter kontrollierten Bedingungen zu etablieren. Dabei wurden aus extrahierten, bovinen Schneidezähnen zylindrische Dentinblöcke angefertigt. Nachdem die Schmierschicht in einem Ultraschallbad mit EDTA 17% und NaOCl 5,25% entfernt wurde, erfolgten die Autoklavierung und eine nachfolgende Sterilitätskontrolle. Als Testkeim diente *E. faecalis*, der in einer Nährlösung (*yeast extract-glucose broth*) herangezüchtet wurde. Anschließend wurden die Prüfkörper in

einem mit der Bakteriensuspension gefüllten Gefäß über 28 Tage infiziert. Es resultierte eine Bakterienpenetration, die sich im Rasterelektronenmikroskop mehrere hundert Mikrometer tief in die Dentintubuli erstreckte. Die äußere Dentinoberfläche der infizierten Blöcke wurde mit Nagellack versiegelt und die Prüfkörper mit Klebewachs auf dem Boden einer Kulturschale befestigt. Kampfermonochlorphenol (CMPC) und ein Kalziumhydroxidpräparat wurden in das Kanallumen appliziert und die Kulturschalen bei 37 °C für 5 min bis zu 10 Tagen inkubiert. Mit Rosenbohrern aufsteigender ISO-Größen wurden Dentinspäne aus dem Wurzelkanal entnommen und in Gefäßen mit *brain heart infusion* (BHI) als Nährlösung aufgefangen. Nach erneuter Inkubation bis zu 7 Tagen wurden die Proben auf Bakterienwachstum überprüft. Letztendlich erwies sich die von Haapasalo und Ørstavik vorgestellte Methode als ausreichend sensitiv und schien „für eine In-vitro Untersuchung von Wurzelkanalmedikamenten geeignet zu sein“ (Haapasalo und Ørstavik 1987). Da dieses Testmodell jedoch in einigen Aspekten nicht mit den tatsächlichen Bedingungen am Patienten übereinstimmt, wurde es in der vorliegenden Studie weiterentwickelt.



### 3 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie war die Evaluation der antimikrobiellen Effektivität von Octenidol<sup>®</sup>, Natriumhypochlorit und Chlorhexidin auf einen in Wurzelkanälen extrahierter Zähne gezüchteten *Enterococcus faecalis*-Biofilm.

Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

1. Wie erfolgreich ist die labortechnische Heranzüchtung eines Biofilms aus *E. faecalis* in den Wurzelkanälen extrahierter, humaner Zähne?
2. Verfügt die Mundspüllösung Octenidol<sup>®</sup> über eine vergleichbare antibakterielle Wirkung gegenüber *E. faecalis* wie die endodontischen Spüllösungen Natriumhypochlorit (1%) und Chlorhexidin (2%)?

## 4 Material und Methode

### 4.1 Studiendesign

Mit dieser weiterentwickelten In-vitro-Methode wurde die antimikrobielle Effektivität unterschiedlicher Wurzelkanalspüllösungen auf einen künstlich gezüchteten *Enterococcus faecalis*-Biofilm in menschlichen Zähnen untersucht. Verglichen wurde dabei Octenidol® mit den bereits etablierten, keimreduzierenden Spüllösungen Natriumhypochlorit (NaOCl) 1% und Chlorhexidindigluconat (CHX) 2%.

Abbildung 1 zeigt ein Flussdiagramm des Versuchsablaufs. Nach Auswahl von insgesamt 60 Zähnen nach festgelegten Kriterien (vgl. Abbildung 2) erfolgte die Vorbereitung der Proben für den Versuch.

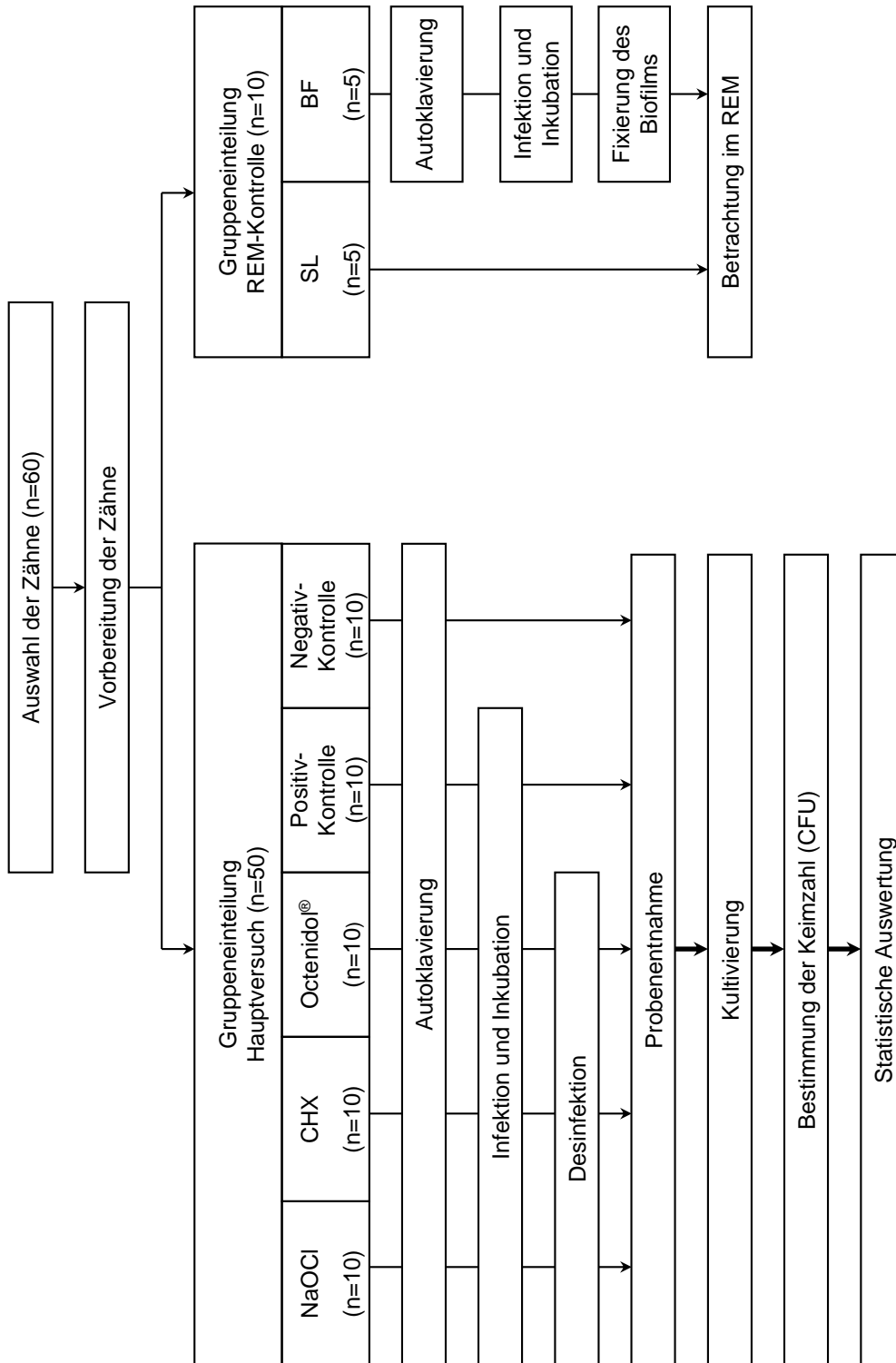
Fünfzig extrahierte Zähne wurden trepaniert, ihre Krone abgetrennt und die Wurzelkanäle maschinell präpariert. Die Schmierschicht wurde durch eine Spülung mit 5 ml EDTA 17% und 2 ml NaOCl 1% entfernt. Anschließend erfolgte die Einteilung der Versuchszähne in drei Test- und zwei Kontrollgruppen. Die Testgruppen wurden mit je einer Spüllösung behandelt. Die Positivkontrollgruppe wurde lediglich mit *E. faecalis* beimpft. Dagegen wurde die Negativkontrolle weder infiziert noch desinfiziert. Die Gruppenstärke betrug pro Gruppe zehn Zähne (n=10). Unabhängig dieser fünfzig Versuchszähne wurden zehn weitere Zähne für eine rasterelektronenmikroskopische Untersuchung vorbereitet und in zwei Gruppen eingeteilt.

Je eine REM-Gruppe diente dem Nachweis der Schmierschichtentfernung (n=5) sowie des gezüchteten Biofilms unter dem Rasterelektronenmikroskop (n=5).

Mit Ausnahme der für die REM-Untersuchung vorgesehenen Zähne wurden alle Proben in Kunststoffzylinder eingebettet und autoklaviert. Mithilfe von sterilen Spülnadeln und Einmalspritzen wurden die Wurzelkanäle der Testgruppen NaOCl, CHX, Octenidol® und die Positivkontrolle mit einer Suspension aus *E. faecalis* infiziert und inkubiert. Anschließend wurden die Testgruppen mit den entsprechenden Desinfektionslösungen behandelt.

Die Probenentnahme der Test- und Kontrollgruppen erfolgte durch Abschaben von Dentinspänen mit Hedström-Feilen. Die dabei gewonnenen Dentinspäne wurden in Gefäßen mit Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) aufgefangen, mit einem Vortexer gemischt und einem Nährboden plattiert. Nach Inkubation der Nährböden für 24 h erfolgte die

Auszählung der sichtbaren Bakterienkolonien. Die REM-Kontrollgruppen wurden unabhängig von den anderen Untersuchungsgruppen vorbereitet und behandelt. Die Ergebnisse wurden statistisch analysiert.



**Abb. 1:** Studienübersicht

CHX (Chlorhexidin), NaOCl (Natriumhypochlorit), CFU (colony forming units), SL (smear layer, Schmierschicht), BF (Biofilm), REM (Rasterelektronenmikroskop)

## 4.2 Vorversuche

### 1) *Auswahl eines apikalen Versiegelungsmaterials*

Zunächst sollte ein geeignetes Material für die apikale Versiegelung der Wurzeln bestimmt werden. Voraussetzung war die einfache Verarbeitung, eine ausreichende Dichtigkeit und die Haltbarkeit über den gesamten Untersuchungszeitraum. Da sich eine Versiegelung mit Nagellack als nicht beständig herausstellte, wurde der kaltpolymerisierende Prothesenreparaturkunststoff Paladur® (Heraeus Kulzer, Hanau) verwendet. Sowohl die Härte als auch das Volumen des Kunststoffes wurden durch die Autoklavierung nicht negativ beeinflusst.

### 2) *Festlegen der Spülmenge und Spülzeit*

In einem weiteren Pilotversuch wurde ein optimales Verhältnis von Spülzeit und Spülvolumen in Wurzelkanälen getestet. Mit einer Stoppuhr wurde die Zeit gemessen, in der eine Handspülung von 5 ml Flüssigkeit konstant und mit geringem Druck in den Wurzelkanal erfolgte. Hierbei erwies sich eine Spülzeit von 3 min als praktikabel. Zudem sollte eine vermeintlich mechanische Wirkung des Flüssigkeitsdrucks auf den Biofilm experimentell geprüft und weitestgehend ausgeschlossen werden. Dafür wurde in vier extrahierten und sterilisierten Zähnen ein Biofilm mit *E. faecalis* gezüchtet. Während zwei Wurzelkanäle mit reiner Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, B. Braun, Melsungen) in der getesteten Spülzeit und Spülmenge behandelt wurden, dienten die verbleibenden zwei Zähne als Positivkontrolle. Dentinproben wurden durch Abrieb mit Hedströmfeilen entnommen und auf Agarböden plattiert. Auf allen Nährböden zeigte sich nach 24 h Inkubation ein gleichmäßig starkes Keimwachstum an *E. faecalis*. Ein rein mechanischer Einfluss des Flüssigkeitsstromes der Spüllösungen auf den Biofilm konnte dadurch im Vorfeld der Studie ausgeschlossen werden.

### 3) *Verdünnungsverhältnis*

Mit verschiedenen Testreihen wurde ein geeignetes Verdünnungsverhältnis des Aliquots aus gewonnenen Dentinspänen in NaCl 0,9% zur Auszählung sichtbarer Kolonien auf den Agarplatten bestimmt. Das Aliquot der Untersuchungsgruppen wurde dafür in verschiedenen Verdünnungsgraden kultiviert. Nach eintägiger Inkubation erfolgte eine Bewertung der Kolonieentwicklung und Festlegung eines Verdünnungsverhältnisses für den Hauptversuch. Für die Positivkontrolle wurde eine

1:200-fache Verdünnung bestimmt. Das Aliquot der Testgruppen konnte unverdünnt plattiert werden.

### 4.3 Hauptversuch

#### 4.3.1 Versuchsdurchführung

##### ***Auswahl und Vorbereitung der Zähne***

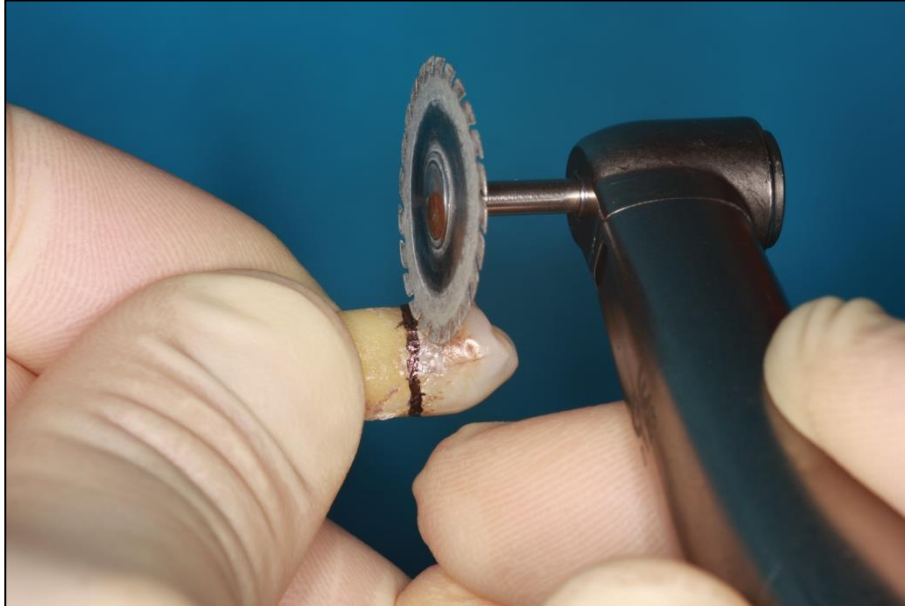
Für die Versuche wurden 60 menschliche einwurzelige Zähne der bleibenden Dentition verwendet, die im Rahmen zahnärztlicher Eingriffe im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Universität Göttingen extrahiert worden waren. Bei der Auswahl der Zähne wurde darauf geachtet, dass die Wurzel bestimmte Merkmale aufwies (vgl. Abbildung 2). Um eine Austrocknung zu vermeiden wurden die extrahierten Zähne bis zur Probenherstellung und Autoklavierung in einem Glasbehälter mit thymolhaltigem Leitungswasser bei Raumtemperatur aufbewahrt.

- intakter Apex
- abgeschlossenes Wurzelwachstum
- Wurzellänge von mindestens 15 mm
- gerade Wurzel mit einem Wurzelkanal
- keine endodontische Vorbehandlung
- kein Einbringen eines Reamers > ISO 20 bis apikal möglich

**Abb. 2:** Auswahlkriterien zur Standardisierung der Versuchszähne

Die Wurzeloberflächen wurden mit einem Sichel scaler (Hu-Friedy, Chicago, USA) vollständig von Debris gereinigt. Anschließend erfolgte die Trepanation bei 40.000 U/min unter Wasserkühlung mit einer diamantierten Walze (Gebr. Brasseler, Lemgo). Die eröffneten Wurzelkanäle wurden mit einem Reamer der ISO-Größe 10 sondiert, um ein zweites Wurzelkanalsystem auszuschließen. Alle Zähne wurden anschließend mit einem Reamer der ISO-Größe 20 auf apikale Gängigkeit überprüft. Die Spitze des Reamers sollte dabei das apikale Foramen nicht durchdringen können. Obliterierte Wurzelkanäle wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Es erfolgte das Abtrennen der Zahnkrone mit einer diamantierten Trennscheibe (Durchmesser 19 mm; Henry Schein vet, Hamburg) bei 20.000 U/min unter Wasserkühlung auf eine einheitliche Wurzellänge von 15 mm (vgl. Abbildung 3). Die Arbeitslänge wurde auf 14 mm festgelegt.



**Abb. 3:** Abtrennen einer Prämolaren-Krone mithilfe einer diamantierten Trennscheibe

### ***Präparation der Zähne und Herstellung der Prüfkörper***

Die Präparation der Wurzelkanäle erfolgte standardisiert mit Gates-Glidden-Bohrer (GG) der Größe 4, 3 und 2 (Henry Schein, Hamburg) sowie mit FlexMaster-NiTi-Instrumenten (VDW, München). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der verwendeten Instrumentensequenz.

Instrument	Arbeitslänge (14mm)
GG #4	AL - 11mm
GG #3	AL - 8mm
GG #2	AL - 5mm
FM .06/30	AL - 3mm
FM .06/25	AL - 1mm
FM .04/30	AL
FM .02/35	AL
FM .02/40	AL

**Tab. 1:** Präparation der Wurzelkanäle mit unterschiedlichen Instrumentengrößen unter Berücksichtigung der Arbeitslänge  
GG (Gates-Glidden-Bohrer), AL (Arbeitslänge), FM (Flex-Master), # (Instrumentengröße)

Die koronale Erweiterung des Wurzelkanals mit GG-Bohrer erfolgte ohne Wasserkühlung bei 1000 U/min. Mit dem GG-Bohrer der Größe 4 wurde 3 mm in die Tiefe präpariert. Die GG-Bohrer der Größe 3 und 2 erweiterten den Kanal in einer Tiefe von 6 mm bzw. 9 mm. Anschließend erfolgte die maschinelle Präparation mit FlexMaster-Instrumenten, die mithilfe eines drehmomentkontrollierten Motors (Endo IT professional; VDW, München) verwendet wurden. Die Instrumente wurden in folgender Reihenfolge eingesetzt: .06/30, .06/25, .04/30, .02/35, .02/40. Die apikale Aufbereitung auf die Arbeitslänge erfolgte mit den Größen .04/30, .02/35 und .02/40. Alle Instrumente wurden mit einem Gummistopper versehen, der die entsprechende Länge markierte.

Um eine Verblockung der Wurzelkanäle zu vermeiden, wurde nach jedem Instrumentenwechsel mit einer Spülkanüle (VMK-Endoneedle; Vedefar, Dilbeek, Belgien) 2 ml NaOCl 1% (Hedinger, Stuttgart) gespült und die Arbeitslänge mit einem Reamer der ISO-Größe 10 rekapituliert. Eine Abschlusspülung mit 5 ml EDTA 17% (Lege artis, Dettenhausen) und 2 ml NaOCl 1% für je 2 min unter gleichmäßigem Druck entfernte die präparationsbedingte Schmierschicht. Zehn Zähne wurden anschließend zufällig ausgesucht und weiteren Vorbereitungsmaßnahmen zur Untersuchung im REM unterzogen (siehe Seite 22).

Die verbliebenen 50 Wurzeln wurden anschließend in Paladur® eingebettet (vgl. Abbildung 4). Dafür wurden Formen aus Silaplast Futur® (Detax, Ettlingen) angefertigt, die später mit dem Kunststoff ausgegossen wurden. Das weiche Silikon wurde zunächst zu einem Block geformt und ein zylindrischer Körper mit einem

Durchmesser von 1,8 cm und einer Höhe von 3 cm eingepresst. Nach Aushärtung wurden die Silikonformen ausgegossen und die Wurzeln mithilfe einer zahnärztlichen Pinzette bis zur Schliffkante in den dickflüssigen Kunststoff versenkt.



**Abb. 4:** Eingebettete Zahnwurzel in einem Zylinder aus Paladur® (Prüfkörper)

Nach dem vollständigen Aushärten des Kunststoffs wurden die Prüfkörper in Bechergläser gegeben und bis zur Sterilisation erneut feucht gelagert. Es folgte eine 20minütige Autoklavierung der Proben bei 121°C. Um die Keimfreiheit bis zum Zeitpunkt der Infektion sicher zu stellen, wurden die Proben unverzüglich der weiteren Behandlung unterzogen.

Alle fünfzig Proben wurden mit einem wasserfesten Filzstift nummeriert und randomisiert in fünf Gruppen eingeteilt. Für den Transport wurden die Proben gruppenweise in eine sterile zwölfkammrige Multischale (Nunc, Wiesbaden) platziert und luftdicht verschlossen (vgl. Abbildung 5).





**Abb. 5:** Prüfkörper einer Gruppe gelagert in einer zwölfkammrigen Multischale

### **Vorbereitung des Bakterienstamms**

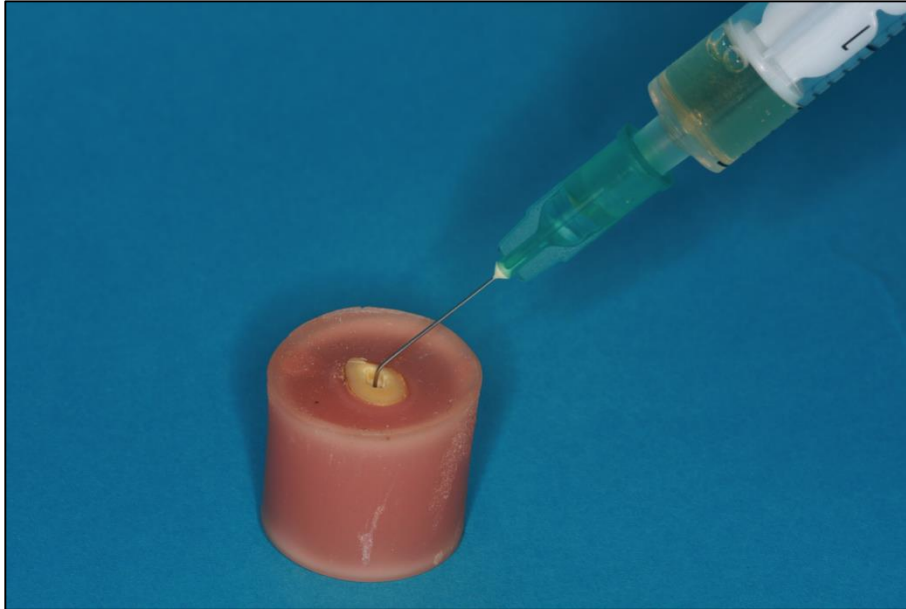
Von einer Kultur isoliertem *E. faecalis* (Stamm ATCC 29212) wurden mit einer Impfschlinge (10 µl; Sarstedt, Nürnberg) 10 ml *brain heart infusion* (BHI; Oxoid, Wesel) inokuliert und für 24 h bei 37°C inkubiert. Die Reinheit der Suspension wurde durch eine Übernachtskultivierung auf einem Agar-Nährboden und anschließender morphologischer Bestimmung der Bakterienkolonien nach Form und Struktur überprüft. Zur Quantifizierung der Mikroorganismen diente im vorliegenden Versuch der Parameter *colony forming units* (CFU).

Nach der Inkubation erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl an *E. faecalis* mithilfe eines Photometers (Biophotometer; Eppendorf AG, Hamburg). Für einen standardisierten Ausgangswert der Bakterien wurde die Suspension auf einen Extinktionswert von 0,3 bei einer Wellenlänge von 600 nm verdünnt. Die Verdünnung erfolgte mit reiner BHI. Umgerechnet entspricht eine optische Dichte von 0,3 einer Bakterienanzahl von  $1,5 \times 10^8$  pro ml.

### **Infektion der Wurzelkanäle**

Die Infektion erfolgte unter aseptischen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank. Mit Ausnahme der Negativkontrollgruppe wurden alle Versuchsgruppen mit *E. faecalis* beimpft. Die Bakteriensuspension wurde mit einer Spülnadel unter

gleichmäßigem Druck in die Wurzelkanäle injiziert. Hierfür wurde die Spülkanüle mit einem sterilen Messblock auf die Arbeitslänge von 14 mm markiert und gebogen. Die Proben wurden vollständig bis zur Schliffkante mit der Suspension gefüllt und bei 35°C für 72 h inkubiert (vgl. Abbildung 6).



**Abb. 6:** Inokulation der Bakteriensuspension aus *E. faecalis* in das Wurzelkanallumen

### ***Desinfektion der Wurzelkanäle***

Die Desinfektionslösungen CHX 2%, NaOCl 1% und Octenidol® (vgl. Abbildung 7) wurden in eine sterile Einmalspritze (5 ml) aufgezogen und mit einer sterilen Spülnadel appliziert. Diese wurde analog zu der bei der Infektion genutzten Spülnadel auf Arbeitslänge markiert und gebogen. Unter gleichmäßigem Druck wurden die Prüfkörper einer Gruppe mit je 5 ml einer Desinfektionslösung für 3 min gespült. Ein Becherglas fing die koronal entweichende Spülflüssigkeit auf, welche anschließend verworfen wurde. Unmittelbar danach wurden die Wurzelkanäle mit sterilen Papierspitzen der ISO-Größe 40 getrocknet. Die Zähne der Positivkontrollgruppe wurden nicht desinfiziert.



**Abb. 7:** Verwendete Spüllösungen: Chlorhexidindigluconat 2%, Octenidol®, Natriumhypochlorit 1%

### **Probengewinnung und Kultivierung**

Durch zirkumferentes Instrumentieren der Kanalwände mit Hedström-Feilen der ISO-Größen 35, 40 und 45 (VDW, München) erfolgte die Entnahme der Proben des infizierten Wurzelkanaldentins, wobei die Feilen mit einem Gummistopper auf Arbeitslänge markiert waren. Für jeden Zahn wurde ein Eppendorfgefäß mit 1 ml NaCl 0,9% bereitgestellt und beschriftet. Die Wurzelkanalwände der Prüfkörper wurden mit jedem der drei Instrumente dreimal zirkumferent präpariert. Die auf diese Weise gewonnenen Dentinspäne wurden sorgfältig von jeder Hedström-Feile in die Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) übertragen. Nach dem vollständigen Instrumentieren eines Wurzelkanals wurden die benutzten Hedström-Feilen in das Gefäß gegeben und verschlossen. Mithilfe eines Vortexers (Heidolph Elektro, Kelheim) wurde der Inhalt des Eppendorfgefäßes für 20 s durchmischt. Anschließend wurden die Feilen mit einer sterilen Pinzette aus dem Gefäß entfernt und die Proben erneut für 5 s durchmischt.

Um das spätere Auszählen der sichtbaren Kolonien auf den Nährböden zu erleichtern, wurden die Proben der Positivkontrollgruppe im Verhältnis 1:200 mit NaCl 0,9% verdünnt (siehe Seite 14). Alle anderen Proben blieben unverdünnt. Mit einer geeichten Pipette (Eppendorf AG, Hamburg) wurden je 50 µl Aliquot einer Probe auf drei Agarplatten mit Columbia-Blut (Biomérieux, Nürtingen) beimpft. Die

Nährböden wurden anschließend bei 37°C für 24 h kultiviert und die Anzahl an sichtbaren CFU ausgezählt.

#### 4.3.2 Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop

Für die Untersuchungen im Rasterelektronenmikroskop wurden insgesamt zehn Zähne vorbereitet und in zwei Untergruppen eingeteilt (vgl. Tabelle 2). Fünf Zähne dienten zum Nachweis der entfernten Schmierschicht (Gruppe SL). Anhand der anderen fünf Zähne erfolgte der Nachweis eines *E. faecalis*-Biofilms (Gruppe BF).

<b>Gruppeneinteilung zur Untersuchung im REM (n=10)</b>	
<b>Gruppe SL</b>	<b>Gruppe BF</b>
Nachweis der entfernten Schmierschicht (n=5)	Nachweis des Biofilmes mit <i>E. faecalis</i> (n=5)

**Tab. 2:** Gruppeneinteilung für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung  
REM (Rasterelektronenmikroskop), SL (*smear layer*, Schmierschicht), BF (Biofilm)

#### **Vorbereitungen zur Kontrolle der Schmierschichtentfernung**

Die Zähne der Gruppe „Schmierschichtentfernung“ (SL) wurden nach Dekoronation, Präparation und Entfernung der Schmierschicht (siehe Seite 16 f.) mit einem wasserfesten Filzstift beschriftet. An den beiden Längskanten der Wurzel (palatal/lingual und bukkal) wurden zudem vertikale Hilfslinien aufgezeichnet, die eine symmetrische Halbierung mit einer rotierenden Trennscheibe gewährleisten. Ein farbiger Guttaperchastift der Größe ISO 30 wurde in den Kanal eingebracht, um ein Penetrieren der rotierenden Trennscheibe in den Wurzelkanal zu vermeiden. Die Wurzel wurde an der markierten Linie nur soweit aufgetrennt, bis der farbige Guttaperchastift durch die dünne Dentinwand durchschien. Mit einem sterilen Hebel nach Bein wurden die Zähne in zwei Hälften gebrochen. Alle Wurzelhälften wurden anschließend auf ihren Außenseiten mit einem Tropfen Sekundenkleber (UHU® plus schnellhärtend; Uhu GmbH, Bühl) auf Metallpins geklebt. Die REM-Proben wurden in den Einsatz eines sterilen Transportbehältnisses gesteckt und in einem Exsikkator für 24 h getrocknet.

### **Vorbereitungen und Fixierung des Biofilms**

Die Zähne der Gruppe „Biofilm“ (BF) wurden gemäß dem oben geschilderten Versuchsaufbau mit *E. faecalis* infiziert, kultiviert und längs gespalten. Anschließend wurden die Wurzelhälften in jeweils drei Portionen à 50 ml Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) gegeben und mit einer sterilen Pinzette kurz darin geschwenkt. Zur Fixierung des Biofilms wurde eine Lösung gemäß Tabelle 3 hergestellt. Die Menge der Fixierlösung entsprach dem 40fachen des Probenvolumens.

Menge	Lösung
20 ml	Glutaraldehyd 25%
20 ml	Paraformaldehyd 25%
150 ml	0,2 M Phosphatpuffer
ad 330 ml	Aqua bidest

**Tab. 3:** Zusammensetzung der Fixierlösung für den Biofilm

Unter dem Abzug wurden die Proben mit einer sterilen Pinzette in die Lösung gelegt und lagerten für 24 h bei 4°C. Die Entwässerung und Trocknung der Proben erfolgte mit 70%igem Alkohol unter Anwendung der *criticle point drying*-Methode (CPD). Nach der Trocknung wurden die Zähne ebenfalls auf Metallpins geklebt. In einem Sputter (SEM Coating System; Fisons Instruments, East Sussex, UK) wurden die Proben für 30 min mit Gold-Palladium in einer Argon-Atmosphäre bedampft. Die Schichtdicke betrug etwa 40 bis 48 nm.

### **Betrachtung im Rasterelektronenmikroskop**

Die Wurzelkanäle aller vorbereiteten Zähne wurden anschließend im Rasterelektronenmikroskop (DSM 960; Carl Zeiss, Oberkochen) betrachtet. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurden Mikrofotografien bei 1000- und 5000facher Vergrößerung angefertigt.

## **4.4 Statistische Auswertung**

Alle ermittelten Daten wurden in eine Tabelle (Microsoft Excel für Mac 2011; Version 14.0.0) übertragen. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte unter Verwendung des Softwareprogramms Statistica Version 10 (StatSoft,

Hamburg). Die Daten wurden mit nichtparametrischen Varianzanalysen ausgewertet (Brunner et al. 2001). Das Signifikanzniveau wurde standardmäßig auf 5% gesetzt. Bei multiplen Vergleichen wurde das Signifikanzniveau nach Tukey adjustiert.

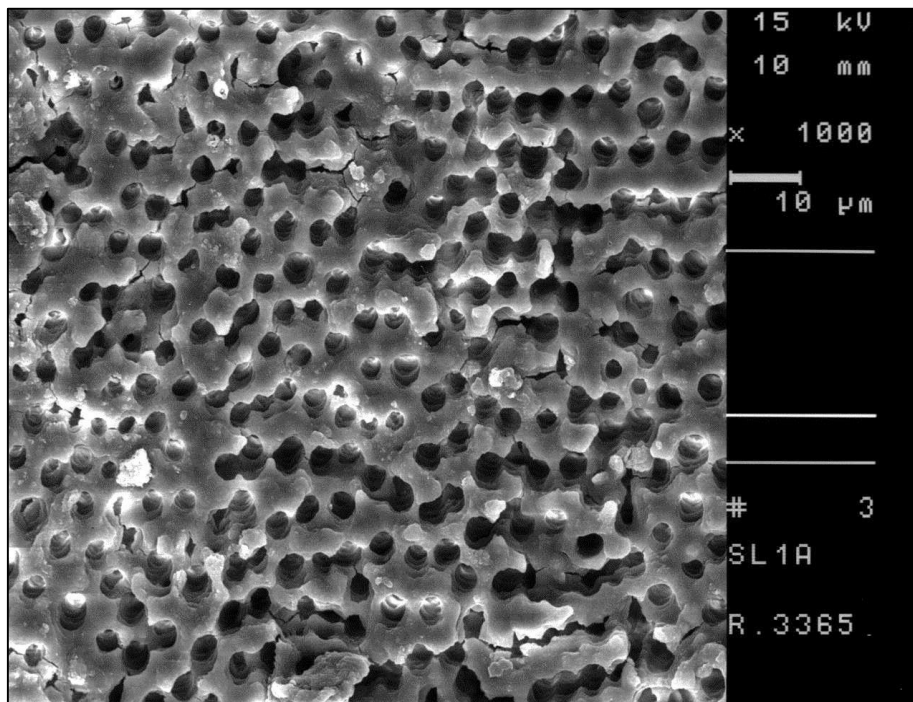
In der Analyse wurden die Proben der Testgruppen gegeneinander verglichen und in Beziehung zur Positivkontrolle gesetzt. Dafür wurde die Verdünnung der Positivkontrolle (1:200) auf die entsprechende Ausgangskeimzahl hochgerechnet. Zur statistischen Interpretation der Ergebnisse wurde zusätzlich ein Konfidenzintervall berechnet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Resultat der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung

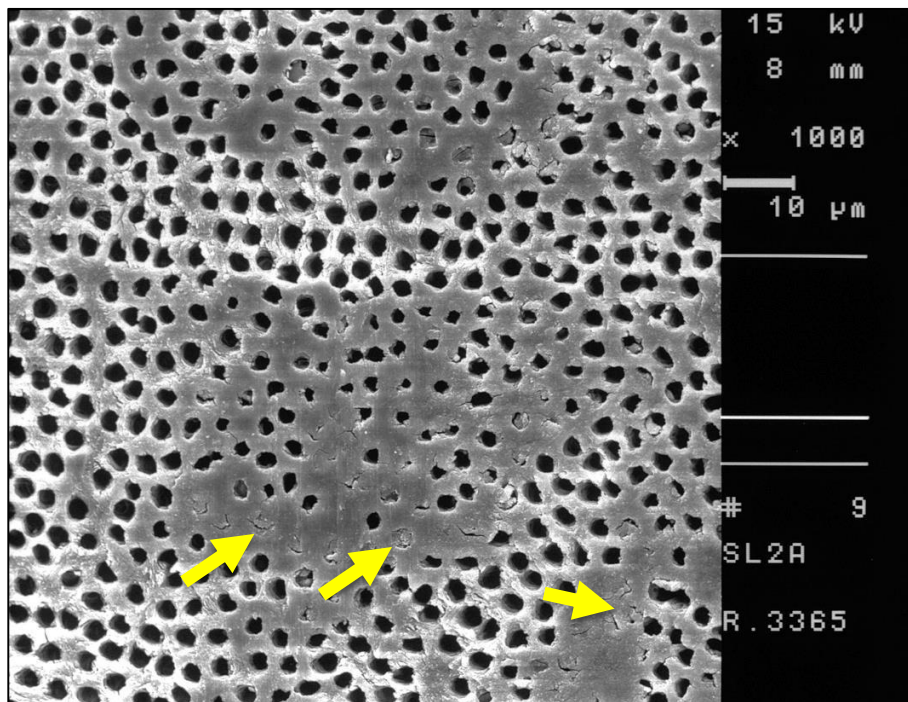
#### 5.1.1 Entfernung der Schmierschicht durch Ethylendiamintetraacetat (EDTA) und Natriumhypochlorit (NaOCl)

Die Begutachtung im Rasterelektronenmikroskop diente der Analyse der Effektivität von EDTA 17% und NaOCl 1% zur Entfernung der präparationsbedingten Schmierschicht an den Versuchszähnen. Alle zehn Wurzelhälften der Gruppe SL wurden nach erfolgter Spülung bei 1000facher Vergrößerung betrachtet und fotografiert. Die Ergebnisse der Untersuchung werden in Abbildung 8 und 9 dargestellt. Beide Fotografien zeigen die typische Oberflächenstruktur von Wurzelkanalwänden, geprägt durch zahlreiche Dentinkanälchen. Mithilfe der Spülung wurde die Schmierschicht sichtbar von der Kanaloberfläche und aus den Eingängen der Dentintubuli beseitigt. An einigen Stellen der Wurzelkanäle war EDTA und NaOCl jedoch nicht imstande, die Dentinkanälchen vollständig freizulegen. Vereinzelt verblieben kleine Reste der Schmierschicht (vgl. Abbildung 9).



**Abb. 8:** Dentinwandstruktur mit zahlreichen Tubuli nach Spülung mit EDTA 17% und NaOCl 1% (1000fache Vergrößerung)



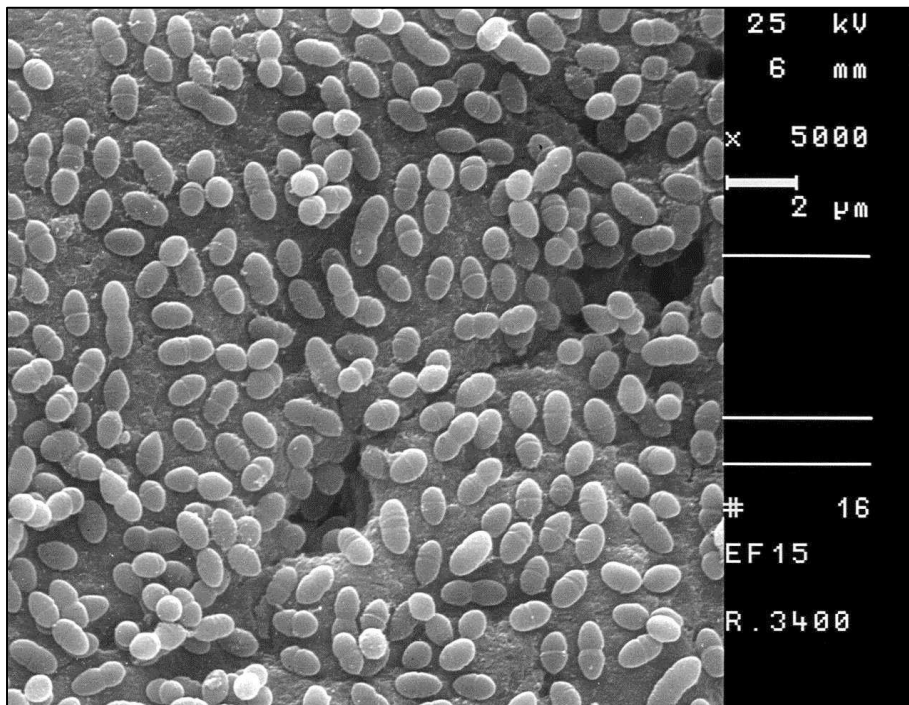


**Abb. 9:** Öffnungen der Tubuli nach Spülung mit EDTA 17% und NaOCl 1%  
Pfeile zeigen verblockte Dentinkanälchen durch Reste der Schmier-  
schicht (1000fache Vergrößerung)

### 5.1.2 Präsenz des Biofilms

Die Wurzelhälften der Gruppe Biofilm (BF) wurden ebenfalls rasterelektronenmikroskopisch betrachtet, um die Präsenz eines Biofilms aus *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) nachzuweisen. Die beimpften Proben zeigten nach dreitägiger Inkubation bei 5000facher Vergrößerung eine dichte Besiedelung an Keimen auf der Kanaloberfläche (vgl. Abbildung 10). Hierbei war eine homogene, filmartige Verteilung von Erregern entlang des gesamten Kanallumens zu beobachten. Es waren sowohl typische Mikrokolonien auf der Wurzelkanaloberfläche als auch in Dentinkanälchen eingedrungene Bakterien zu erkennen.



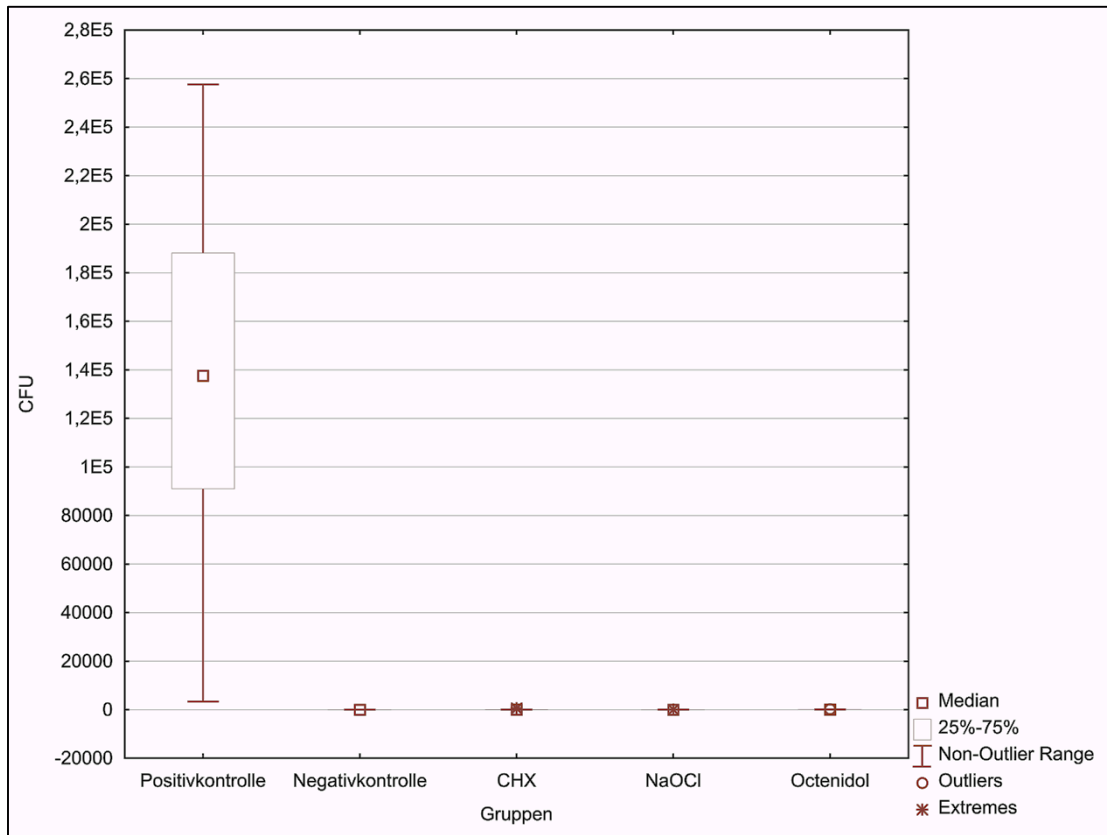


**Abb. 10:** Besiedelung der Dentinwand durch *E. faecalis* (5000fache Vergrößerung)

## 5.2 Ergebnisse des Hauptversuchs

### 5.2.1 Übersicht der Auszählung

Die Nährböden der Positivkontrolle waren zum Zeitpunkt der Auszählung ausschließlich mit reinen *E. faecalis*-Stämmen besiedelt. In der Negativkontrollgruppe war kein bakterielles Wachstum zu verzeichnen. Insgesamt betrachtet reduzierte jedes untersuchte Desinfizienz die Keimanzahl in den Wurzelkanälen im Vergleich zur Positivkontrolle signifikant. Keine der untersuchten Spüllösungen war jedoch in der Lage, *E. faecalis* vollständig zu eliminieren. Die Anzahl der *colony forming units* (CFU) aller Proben nach erfolgter Desinfektion und Kultivierung ist in Abbildung 11 und 12 dargestellt. Die 1:200 verdünnte Positivkontrolle wurde auf die Ausgangskeimzahl hochgerechnet.



**Abb. 11:** Hochgerechnete Anzahl der CFU auf den Nährböden aller Versuchsgruppen CFU (*colony forming units*), CHX (Chlorhexidin), NaOCl (Natriumhypochlorit)

### 5.2.2 Absolute Keimzahlen

Die Positivkontrollgruppe gibt Aufschluss über die Keimzahl, die vor Beginn der desinfizierenden Maßnahme in den Wurzelkanälen vorlag. Die Proben der Positivkontrolle erreichten nach Hochrechnung der Verdünnung (1:200) einen Mittelwert von  $1,36 \times 10^5$  CFU. Mit einer durchschnittlichen Endkeimzahl von 3,7 CFU hatte NaOCl, verglichen mit der Negativkontrolle (0,0 CFU), die Keime nahezu vollständig reduziert. Die Gruppe CHX wies dagegen durchschnittlich 58,8 CFU auf. Auf den Nährböden der Gruppe Octenidol® war das Keimwachstum mit 74,1 CFU am stärksten ausgeprägt. Die Mittelwerte der einzelnen Untersuchungsgruppen sowie das Konfidenzintervall sind in Tabelle 4 aufgeführt.

## 5 Ergebnisse

Gruppen	Mittelwert CFU	KI (-95 %)	KI (+95 %)	n
Positivkontrolle*	135746,7	109853,9	161639,4	30
Negativkontrolle	0	-	-	30
CHX	58,8	-0,9	118,6	30
NaOCl	3,7	0,7	6,7	30
Octenidol®	74,1	56,9	91,3	30

**Tab. 4:** Hochrechnung der Mittelwerte der CFU und des Konfidenzintervalls  
CFU (*colony forming units*), KI (Konfidenzintervall), CHX (Chlorhexidin),  
NaOCl (Natriumhypochlorit), \* Hochrechnung der Verdünnung

### **Effizienz der Spüllösungen im Vergleich**

Bei der statistischen Auswertung ergaben sich unter Berücksichtigung der Untersuchungsgruppen sechs Kombinationsmöglichkeiten für Paarvergleiche. Bei allen traten signifikante Unterschiede in der Keimreduktion auf.

#### *Vergleich der Spüllösungen mit der Positivkontrolle*

Im Vergleich zur Positivkontrollgruppe war die Reduktion von *E. faecalis* sowohl bei NaOCl 1% und Chlorhexidin 2% als auch bei Octenidol® hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ) (vgl. Tabelle 5).

Paarvergleich	p-Wert
Positivkontrolle versus CHX	<b>&lt; 0,0001</b>
Positivkontrolle versus NaOCl	<b>&lt; 0,0001</b>
Positivkontrolle versus Octenidol®	<b>&lt; 0,0001</b>

**Tab. 5:** Paarvergleiche der Positivkontrolle mit den Spüllösungen  
CHX (Chlorhexidin), NaOCl (Natriumhypochlorit)

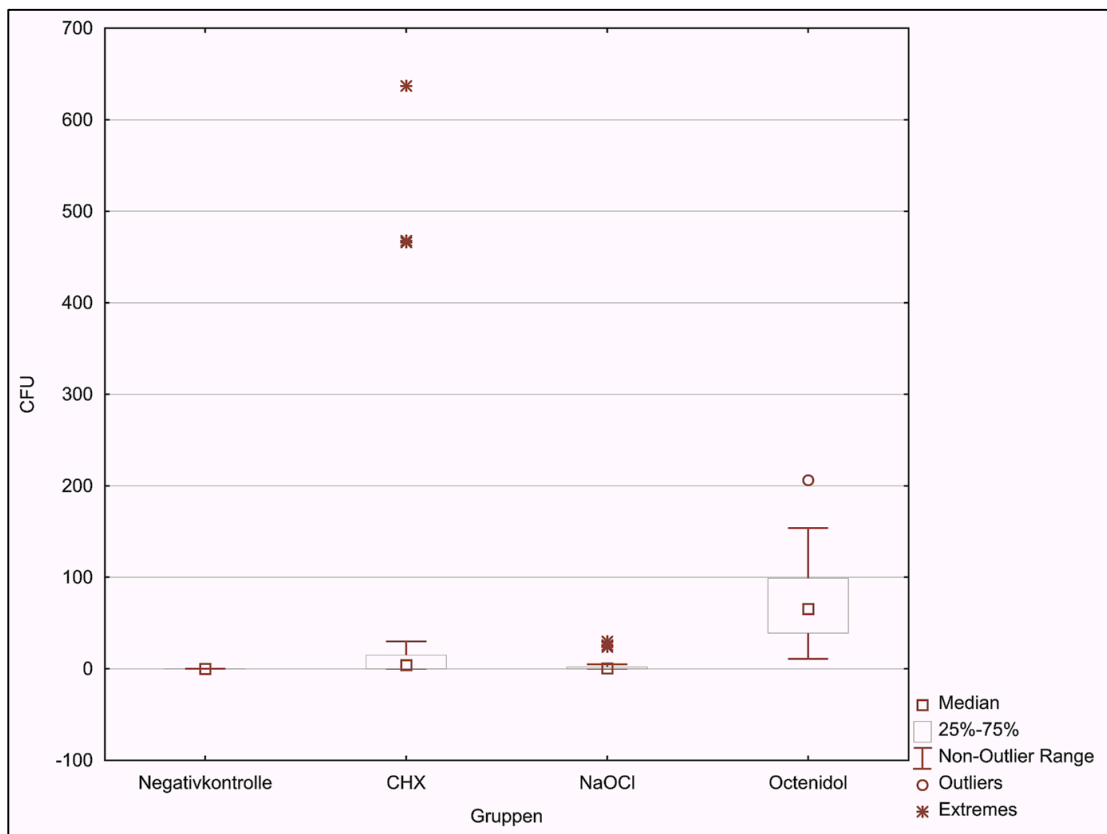
#### *Vergleich der Keimreduktion der Spüllösungen untereinander*

Ein ebenso signifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ) konnte zwischen NaOCl und Octenidol® festgestellt werden (vgl. Tabelle 6). Die Anzahl an CFU in der Gruppe NaOCl war darüber hinaus signifikant geringer als in der Gruppe CHX ( $p = 0,0219$ ). Einen hoch signifikanten Unterschied in der Anzahl an *E. faecalis* ergab zuletzt auch der Paarvergleich zwischen CHX und Octenidol® ( $p = 0,0002$ ).

## 5 Ergebnisse

Paarvergleich	p-Wert
NaOCl versus Octenidol®	<b>&lt; 0,0001</b>
NaOCl versus CHX	<b>0,0219</b>
CHX versus Octenidol®	<b>0,0002</b>

**Tab. 6:** Paarvergleich der getesteten Spüllösungen  
CHX (Chlorhexidin), NaOCl (Natriumhypochlorit)



**Abb. 12:** Detaillierte Übersicht der Anzahl der CFU aller Spülgruppen unter Berücksichtigung von Ausreißern und Extremwerten  
CFU („colony forming units“), CHX (Chlorhexidin), NaOCl (Natriumhypochlorit)

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde die antimikrobielle Effektivität von Natriumhypochlorit (NaOCl), Chlorhexidin (CHX) und Octenidol® gegen *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) in Wurzelkanälen menschlicher Zähne untersucht. Die Analyse zeigte, dass alle Spüllösungen signifikant die Bakterienzahl im Wurzelkanal reduzierten. Die intrakanaläre Desinfektion mit Octenidol® fiel im direkten Vergleich der Testgruppen signifikant am geringsten aus. Die geringste Anzahl an Enterokokken wurde nach einer Spülung mit Natriumhypochlorit beobachtet.

### 6.1 Studiendesign

Das Studiendesign dieser Arbeit entstand in Anlehnung an den Versuchsaufbau von Haapasalo 1987 (Haapasalo und Ørstavik 1987) (siehe Seite 9). Diese In-vitro-Methode zur Infektion und Desinfektion des Wurzelkanal Dentins extrahierter Zähne war bereits Grundlage einer Vielzahl experimenteller Studien (de Lucena et al. 2013; Tirali et al. 2012; Ma et al. 2011; Estrela et al. 2009; Tandjung et al. 2007; Nagayoshi et al. 2004; Basrani et al. 2003). Der Vorteil des vorliegenden, weiterentwickelten Modells liegt in der direkten Heranzüchtung und Desinfektion des Biofilms in Wurzelkanälen menschlicher Zähne. Dagegen besitzen Rinderzähne, wie sie von Haapasalo verwendet wurden, signifikant mehr Dentinkanälchen (Camargo et al. 2007). Das Ergebnis einer Infektion beziehungsweise Desinfektion würde sich folglich von dem menschlicher Zähne unterscheiden.

Andere Studien hingegen untersuchten die Effektivität von Desinfektionsmethoden auf planktonische Bakterien (Huth et al. 2009; Tirali et al. 2009; Hems et al. 2005), mithilfe eines Agar-Diffusionstests (Basrani et al. 2003; Siqueira und de Uzeda 1997) oder an Biofilmen, die auf Zellulose-Nitrat-Membran-Filtern gezüchtet wurden (Giardino et al. 2007; Hems et al. 2005; Lima et al. 2001; Spratt et al. 2001; Siqueira et al. 1998). Im Gegensatz dazu entspricht ein in extrahierten Zähnen etabliertes Biofilm-Modell eher der klinischen Situation (Spratt et al. 2001). Ziel der vorliegenden Studie war es demnach, ein In-vitro-Modell zu entwickeln, welches realitätsnah die klinische Situation abbildet und einfach reproduzierbar ist.

### 6.1.1 Material

#### **Zähne**

Um für das vorliegende Experiment Proben mit möglichst wenig anatomischen Differenzen zu erhalten, wurden die extrahierten Zähne anhand verschiedener Einschlusskriterien ausgewählt (vgl. Abbildung 2). Zähne mit mehreren oder gekrümmten Wurzelkanälen wurden für eine einfachere Standardisierung der Proben ausgeschlossen, obwohl die Untersuchung verschiedener, desinfizierender Spüllösungen auch bei gekrümmten Kanälen klinisch bedeutsam ist. Eine standardisierte Bearbeitung gekrümmter Wurzelkanäle wäre jedoch vor allem im Hinblick auf die Probenentnahme nicht sicher gegeben. Die wenig flexiblen Hedström-Feilen könnten im apikalen Drittel vom Wurzelkanalverlauf zur Außenwand abweichen und Dentinbereiche der Innenkurvatur unbearbeitet lassen. Die Probenentnahme würde vermutlich das Desinfektionsergebnis des gesamten Wurzelkanals falsch repräsentieren. Eine genaue Beurteilung der Effektivität der eingesetzten Spüllösungen ist jedoch gerade im apikalen Bereich des Endodonts entscheidend.

#### **Mikrobiologie**

Da *E. faecalis* häufig aus bereits behandelten Wurzelkanälen isoliert und mit persistierenden apikalen Parodontitiden in Verbindung gebracht wird, setzten ihn in der Vergangenheit viele Autoren als Modell-Testkeim für ihre In-vitro-Untersuchungen ein (Karale et al. 2011; Souza et al. 2010; Giardino et al. 2007; Dunavant et al. 2006; Hems et al. 2005; Basrani et al. 2003; Spratt et al. 2001; Haapasalo und Ørstavik 1987). Ein besonderes Merkmal dieses Bakteriums ist vor allem seine Penetrationsfähigkeit in Dentinkanälchen (Ørstavik und Haapasalo 1990) und die damit verbundene Unempfindlichkeit gegenüber vielen intrakanalären Desinfektionsmaßnahmen und Medikamenten (Love 2001). Aus mikrobiologischer Sicht liegen die wesentlichen Vorzüge von *E. faecalis* in seinem schnellen Wachstum (Bergmans et al. 2008) und in seiner einfachen Kultivierung (Tandjung et al. 2007; Lode et al. 2005; Haapasalo et al. 2000). Mithilfe der Fotospektrometrie wurde das Bakterienwachstum in der Suspension überprüft. Das gepufferte, nährstoffreiche Flüssigkeitsmedium *brain heart infusion* (BHI) ließ bereits nach 24 h Inkubation eine starke Bakterienvermehrung erkennen und trübte sichtbar ein. Die Quantifizierung lebensfähiger *E. faecalis*-Keime erfolgte auf Columbia-Agarplatten. Dieses mit

Schafsblut angereicherte Isolationsmedium eignet sich für ein breites Spektrum an Mikroorganismen und ist ebenfalls reich an Nährstoffen.

### 6.1.2 Versuchsaufbau

#### **Die Prüfkörper**

Anstatt zylindrisch genormter Dentinblöcke (Ma et al. 2011; Zehnder et al. 2004; Haapasalo und Ørstavik 1987) wurden in dem vorliegenden Modell ganze Wurzeln einschließlich des Wurzelzements herangezogen. Durch Belassen des Zements wird die Infektion auf die pulpale Fläche der Dentintubuli beschränkt, was den In-vivo-Konditionen eher entspricht. Darüber hinaus sollte die Morphologie und Variabilität des natürlichen, vollständigen Wurzelkanalsystems in die Untersuchung einbezogen werden. Um eine annähernd standardisierte und reproduzierbare Kanalgeometrie zu erhalten, wurden FlexMaster-Nickel-Titan-Instrumente verwendet. Diese werden motorbetrieben unter exakter Drehzahlkontrolle und Drehmomentbegrenzung im Wurzelkanal eingesetzt und reduzieren die Wahrscheinlichkeit von iatrogenen Fehlern im Aufbereitungsprozess (Schäfer et al. 2004). Mit Instrumentengrößen bis ISO-Größe 40 wurden die Wurzelkanäle für ein Vordringen der Spülnadel (0,35 mm Durchmesser) bis in den apikalen Bereich ausreichend dimensioniert (Khademi et al. 2006).

Ein weiterer Vorteil des verwendeten Prüfkörpers liegt in der vollständigen Ummantelung der Wurzelaußenflächen mit Kunststoff. Dadurch wurde das apikale Foramen dicht verschlossen, so dass die Spülflüssigkeiten nicht extrudiert wurden. Durch die Versiegelung konnte zudem eine retrograde Rekontamination der Kanäle nach der Sterilisierung ausgeschlossen werden.

#### **Das Biofilm-Modell**

Da sich Bakterien infizierter Wurzelkanäle in vivo in Form eines Biofilms an den Dentinwänden etablieren (Giardino et al. 2007), wurde diese Wachstumsstruktur in der vorliegenden Studie mithilfe von Labortechniken simuliert. Allgemein ist zur Evaluation eines Biofilm-Modells neben der Kolonisationsstruktur auch der Kultivierungszeitraum von entscheidender Bedeutung (Estrela et al. 2009). Die Inkubationszeiten von *E. faecalis* unterscheiden sich in der Literatur erheblich und reichen von 24 h (Ma et al. 2011; Arias-Moliz et al. 2010; Chavez de Paz et al. 2010; Ozdemir et al. 2010; Arias-Moliz et al. 2009; Duggan und Sedgley 2007) bis über

acht Wochen (de Lucena et al. 2013). Im vorliegenden Versuch erfolgte die Inkubation über 72 h. Frühere Studien demonstrierten, dass dieser Zeitraum ausreicht, um die Etablierung eines *E. faecalis*-Biofilms zu erzielen (Bhuva et al. 2010; Foschi et al. 2007; Soukos et al. 2006; Gulabivala et al. 2004). Da durch eine alleinige Auswertung der *colony forming units* (CFU) keine Aussage über die Bildung eines Biofilms innerhalb des Wurzelkanals getroffen werden konnte, erfolgte eine zusätzliche rasterelektronenmikroskopische Untersuchung.

### **Desinfektionslösungen und Probenentnahme**

Eine vergleichende Analyse der antibakteriellen Aktivität von NaOCl, CHX und Octenidol® in extrahierten Zähnen erscheint aus folgenden Gründen relevant: Bisher ist die Wirksamkeit von Octenidol® im Rahmen der endodontischen Therapie kaum untersucht. Zudem wird das Potential von CHX und NaOCl zur Eliminierung von *E. faecalis* kontrovers diskutiert (Wang et al. 2012; Mehrvarzfar et al. 2011; Violich und Chandler 2010; Menezes et al. 2004). Schon über eine optimale inhibitorische Konzentration von NaOCl wird in der Literatur keine übereinstimmende Aussage getroffen. Gomes et al. testeten verschiedene Konzentrationen von NaOCl (0,5%, 1,0%, 2,5%, 4,0%, 5,25%) auf eine Bakteriensuspension aus *E. faecalis* (Gomes et al. 2001). Prinzipiell wirkten alle Spülungen antimikrobiell, NaOCl 5,25% jedoch am effektivsten. Zehnder hingegen legte in einer Übersichtsstudie dar, dass die Reduktion intrakanalärer Mikroorganismen mit NaOCl 5% nicht größer ist als mit 0,5% (Zehnder 2006). Aufgrund seines toxischen Charakters erscheint ihm zudem die Verwendung einer Natriumhypochlorit-Konzentration über 1% als unbegründet. In niedriger Konzentration (0,5% und 1%) ist NaOCl dagegen ausreichend biokompatibel (Estrela et al. 2002). Auch bezüglich der Wirksamkeit von CHX gegenüber *E. faecalis* stimmen die Untersuchungsergebnisse vieler Studien nicht überein (Karale et al. 2011; Rödiger et al. 2010; Nair 2006; Friedman et al. 2003; Corman 1983).

Für eine Standardisierung des Versuchsaufbaus wurden alle Wurzelkanäle mit dem gleichen Volumen an Spülflüssigkeit (5 ml) in derselben Zeit (3 min) desinfiziert. Eine vorherige Studie demonstrierte, dass bereits eine konventionelle Spülung mit NaOCl 1% in 2 min ausreichte, um einem Biofilm aus *E. faecalis* effektiv entgegenzuwirken (Bhuva et al. 2010). Sassone et al. zeigten anhand einer Methodik bei direktem Kontakt der Desinfektionslösungen mit einer Bakteriensuspension aus *E. faecalis*,



dass NaOCl 1% alle Keime unabhängig von der Kontaktzeit (sofort, 5 min, 15 min, 30 min) und einer Neutralisierung abtötete (Sassone et al. 2008). Eine Neutralisierung der Spüllösungen durch inhibierende Substanzen, wie beispielsweise 0,6% Natriumthiosulfat für NaOCl (Tirali et al. 2009; Delany et al. 1982) unterblieb im vorliegenden Versuch. Denn auch bei der klinischen Verwendung von NaOCl, CHX oder Octenidol® ist eine Inaktivierung nicht vorgesehen. Für eine standardisierte Einwirkzeit der desinfizierenden Spüllösung wurden die Wurzelkanäle unmittelbar nach der dreiminütigen Spülung mit Papierspitzen getrocknet. Die Probenentnahme mit Hedström-Feilen aufsteigender ISO-Größe ermöglichte es, Dentinspäne aus dem gespülten Wurzelkanal zu entnehmen und Enterokokken auch aus tiefen Schichten des Wurzelkanal Dentins zu erfassen.

## 6.2 Ergebnisse

### 6.2.1 Schmierschichtentfernung

Die Kontrolle der Effektivität der Schmierschichtentfernung war nicht primäre Zielsetzung dieser Studie. Dennoch scheint die Schmierschicht bei der Infektion von Dentinkanälchen eine entscheidende Rolle zu spielen. Yang et al. zeigten, dass durch eine vorhandene Schmierschicht die initiale Adhärenz von *E. faecalis* zum Dentin begünstigt wird (Yang et al. 2006). Da eine suffiziente Entfernung der Schmierschicht die Qualität der Wurzelkanal desinfektion (Violich und Chandler 2010) und somit vermutlich die Prognose eines endodontisch behandelten Zahnes verbessert, sollte ihre Effizienz im Rahmen des vorliegenden Versuchs zusätzlich analysiert werden.

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (REM) verdeutlicht, dass eine Abschlusspülung mit Ethylendiamintetraacetat 17% (EDTA) und NaOCl 1% den überwiegenden Teil der Schmierschicht von der Dentin Oberfläche und aus den Tubuli entfernte. Dennoch waren an vereinzelten Stellen Dentinkanälchen mit Schmierschicht verblockt (vgl. Abbildung 9). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Studienergebnissen von Hülsmann et al. (Hülsmann et al. 2003a). Sie zeigten in einer Übersichtsarbeit, dass bei vielen Untersuchungen vor allem in den apikalen Bereichen der Wurzeln keine effektive Entfernung der Schmierschicht erzielt wurde. O'Connell et al. testeten diesbezüglich verschiedene EDTA-Salze und demonstrierten, dass keine der Lösungen die Schmierschicht vollständig aus allen

Bereichen des Wurzelkanals entfernte (O'Connell et al. 2000). Bei einer Spülung mit 10 ml EDTA 17% und NaOCl 5% hingegen wurde eine vollständige Säuberung apikaler Dentinkanälchen beobachtet, jedoch erschien das Dentin im REM erosiv verändert (Calt und Serper 2000).

### 6.2.2 Bewertung der Biofilmentwicklung

Die Entwicklung eines gleichmäßigen Biofilms aus *E. faecalis* auf der Wurzelkanaloberfläche impliziert, dass die in der vorliegenden Studie angewendete Methode zur Infektion von Wurzelkanälen geeignet ist. Dabei ließen eine dichte Besiedelung der Kanalwand und der Dentinkanälchen mit mehrschichtigen Bakterienaggregationen auf die Formation eines Monospezies-Biofilms schließen. Auch bakterielle Filamente, wie sie auch von Distel et al. nach zweitägiger Inkubation von *E. faecalis* beschrieben wurden, waren in der REM-Analyse erkennbar (Distel et al. 2002). Diese ermöglichen eine Haftung des Biofilms auf der Dentinoberfläche und verbessern die nutritive Versorgung der Mikroorganismen. Eine Ausbildung typischer pilz- und pallisadenartiger Mikrostrukturen unterblieb jedoch. Die Ursache dafür könnte in den biochemischen und physikalischen Umgebungsbedingungen des Wurzelkanals liegen, welche die Entwicklung und Modifikation des Biofilms beeinflussen (Folwaczny und Hickel 2003). George et al. legten dar, dass dabei sowohl das gewählte Nährmedium (nährstoffreich/nährstoffarm) als auch die Inkubationsform (aerob/anaerob) eine wichtige Rolle spielt. Pilzartige Mikrokolonien waren nur in einem nährstoffreichen Medium unter anaeroben Bedingungen entstanden (George et al. 2005). In der vorliegenden Untersuchung wurden die Bakterienkolonien unter aeroben Konditionen herangezüchtet, wie es bereits andere Autoren beschrieben (Baca et al. 2011; Tirali et al. 2009; Lima et al. 2001). Denn *E. faecalis* besitzt – als fakultativer Anaerobier – die Fähigkeit, sowohl in sauerstoffarmer als auch in sauerstoffreicher Umgebung heranzuwachsen.

Im Vergleich zu Distel et al. (2000fache Vergrößerung) wurde der Biofilm in der vorliegenden Studie mit 5000facher Vergrößerung betrachtet. Dadurch konnte die bakterielle Invasion der Tubuli angemessen bewertet werden (Distel et al. 2002).

Im Einklang mit der REM-Untersuchung bestätigte auch die Auswertung der Positivkontrollgruppe den Erfolg des Infektionsprozesses. Das reine Wachstum mit *E. faecalis* war derart ausgeprägt, dass eine Auszählung der CFU nur durch eine Verdünnung des Aliquots mit Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) und anschließender

Hochrechnung möglich war. Dies stimmt mit vergleichbaren Studien überein, welche ebenfalls die Proben für die mikrobiologische Analyse verdünnten (de Lucena et al. 2013; Foschi et al. 2007; Tandjung et al. 2007; Gulabivala et al. 2004).

### 6.2.3 Effektivität der Spülungen

Die Paarvergleiche zwischen der Positivkontrolle und den Testgruppen (NaOCl, CHX, Octenidol®) verdeutlichten, dass die ursprüngliche Bakterienpopulation durch alle Spüllösungen signifikant reduziert wurde.

#### **Natriumhypochlorit 1%**

Dass Natriumhypochlorit effektiv gegen Biofilme aus *E. faecalis* wirkt, zeigten bereits frühere Studien (Bhuva et al. 2010; Giardino et al. 2007). Von den in der vorliegenden Studie getesteten Spüllösungen wies NaOCl 1% die signifikant größte antimikrobielle Wirkung in Wurzelkanälen auf.

Andere Studien stimmen im Wesentlichen mit diesem Ergebnis überein: Chavez de Paz et al. untersuchten die Wirkung von Basen (pH 12), CHX 2,5%, NaOCl 1% und EDTA auf endodontische Biofilme und stellten fest, dass eine Spülung mit NaOCl 1% über 5 min die Membranintegrität von *E. faecalis* am stärksten beeinflusste und im Vergleich die meisten Mikroorganismen entfernte (Chavez de Paz et al. 2010). Auch Bryce et al. demonstrierten, dass alle getesteten Spüllösungen (NaOCl 1%, EDTA 17%, CHX 0,2%, Betadine® 10%) signifikant *E. faecalis* in Biofilmen reduziert. Unabhängig von der Behandlungsdauer (1, 5 oder 10 min) zeigte einzig die Desinfektion mit NaOCl 1% eine vollständige Abtötung an *E. faecalis* (Bryce et al. 2009). Estrela et al. analysierten die antimikrobielle Effektivität von NaOCl 1%, CHX 2%, Kalziumhydroxid (Ca(OH)<sub>2</sub>) 1% und einer Lösung aus Ca(OH)<sub>2</sub> mit einem Detergens in direktem Kontakt zu *E. faecalis*. NaOCl wirkte in geringer Konzentration vergleichsweise besser gegen *E. faecalis* als die anderen Lösungen (Estrela et al. 2003). NaOCl verfügt im Gegensatz zu den übrigen untersuchten Spüllösungen nicht nur über antibakterielles Potential, sondern auch über die Fähigkeit vitales und nekrotisches Gewebe aufzulösen.

Keine signifikanten Unterschiede wurden hingegen von Heling und Chandler beobachtet. So erwies sich eine zehnmündige Spülung von Dentinblöcken aus Rinderinzisiven CHX 0,2% und NaOCl 1% als gleichermaßen effektiv (Heling und

Chandler 1998). Eine ähnliche Effektivität von NaOCl zu CHX stellten auch weitere Studien fest (Wang et al. 2012; Mehrvarzfar et al. 2011).

Eine Vergleichbarkeit der Studien ist aufgrund des unterschiedlichen experimentellen Aufbaus und unterschiedlichen Konzentrationen der Spüllösungen jedoch nur eingeschränkt möglich.

### **Chlorhexidindigluconat 2%**

Obwohl Chlorhexidindigluconat (CHX) als ein effektives Medikament in der Endodontie angesehen wird (Delany et al. 1982), beurteilten bisherige Studien seine antimikrobielle Wirksamkeit gegen *E. faecalis* kontrovers. Die Angaben in der Literatur reichen von 30% (Ma et al. 2011), 50% (Chavez de Paz et al. 2010) bis hin zur vollständigen Elimination (Gomes et al. 2003).

In der vorliegenden Versuchsreihe reduzierte CHX 2% signifikant die Anzahl an *E. faecalis*. Im direkten Vergleich zu Octenidol® eliminierte es signifikant mehr Keime. Verglichen mit NaOCl erreichte es jedoch eine signifikant geringere Keimreduktion. Auch Vaziri et al. konnten einen signifikanten, aber im Vergleich zu NaOCl 2,5% geringeren antibakteriellen Effekt von CHX 2% gegenüber *E. faecalis* feststellen (Vaziri et al. 2012). Die begrenzte Penetrationsfähigkeit in tiefere Biofilmschichten (Chavez de Paz et al. 2010) könnte dazu beigetragen haben, dass CHX insgesamt weniger Bakterienzellen als NaOCl eliminierte.

Pavlovic und Zivkovic untersuchten sowohl die antimikrobielle Wirksamkeit als auch die Reinigungskraft von NaOCl 5,25%, NaOCl 2,5% und CHX 2% in Wurzelkanälen. CHX 2% hatte zwar wie NaOCl 2,5% gegenüber *E. faecalis* einen starken antibakteriellen Effekt, dennoch tötete NaOCl 5,25% am meisten Bakterien ab. Eine vollständige Reinigung des Wurzelkanals war nur mittels EDTA 15% möglich. (Pavlovic und Zivkovic 2010).

Menezes et al. dagegen zeigten mittels einer zweiten Inkubationsphase, dass eine 2%ige CHX-Lösung nach sieben Tagen effektiver gegen *E. faecalis* wirkte als NaOCl 2,5%. Dies wird mit der Depotwirkung von CHX begründet (Menezes et al. 2004).

### **Octenidol®**

Octenidol® zeigte eine signifikant schlechtere Wirksamkeit gegenüber NaOCl 1% und CHX 2%.

Das Ergebnis widerspricht bisherigen Studien, welche ebenfalls den Wirkstoff Octenidin gegen *E. faecalis* einsetzten. In den meisten dieser Untersuchungen wurde jedoch der Wirkstoff auf Basis von Octenisept® verwendet, welches zusätzlich Phenoxyethanol als Konservierungsstoff enthält.

In einem experimentellen Modell von Tirali et al. wurde CHX 2%, NaOCl 5,25% und Octenidindihydrochlorid 0,1% (auf Basis von Octenisept®) in infizierten Milchzähnen und bleibenden Zähnen getestet (Tirali et al. 2012). Nach einer Applikationszeit von 5 min war Octenidindihydrochlorid 0,1% die antimikrobiell signifikant wirksamste Spüllösung zur Eliminierung von *E. faecalis* aus den Dentintubuli. Eine Behandlung mit Natriumhypochlorit 5,25% hinterließ dagegen mehr kulturfähige Enterokokken. Auch bei de Lucena et al. waren nach der Desinfektion mit einem Octenidin-Phenoxyethanol-Gel (5%) nach zwölf Wochen keine lebensfähigen *E. faecalis*-Zellen mehr im Wurzelkanal vorhanden. Dagegen betrug der Anteil lebensfähiger Bakterien nach einer Behandlung mit einem CHX-Gel (5%) noch 15,4% (de Lucena et al. 2013). Eine andere Studie analysierte ebenfalls die Wirksamkeit eines Octenidin-Phenoxyethanol-Gels anhand eines Ex-vivo-Modells (Tandjung et al. 2007). Das Gel wurde in einem Verhältnis von 1:1 für 1 min, 7 min und 7 Tage und in einem Verhältnis von 1:3 für 10 min in infizierten Wurzelkanälen inkubiert. Bereits nach 10 min sank der Anteil lebensfähiger Bakterien von 57,2% auf 5,7%. Nur bei einer von zehn Proben zeigte die Auswertung an CFU nach 7 Tagen eine positive Kultur.

Tirali et al. verwendeten in einer aktuellen Studie erstmals Octenidinhydrochlorid 0,1% auf Basis der Mundspülung (Octenidol®) und untersuchten seine Effektivität gegenüber *E. faecalis* mithilfe eines Agardiffusionstests. Hierbei fielen die Hemmungszonen von Octenidindihydrochlorid signifikant größer aus als bei CHX 2%. Gegenüber NaOCl 5,25% konnte eine vergleichbare Wirksamkeit festgestellt werden (Tirali et al. 2013b). Das Ergebnis eines Agardiffusionstests ist jedoch vermutlich aufgrund der unterschiedlichen Diffusionsfähigkeiten der Spüllösungen in Agar nicht direkt auf den vorliegenden In-vitro-Versuch übertragbar.

Die in früheren Studien beobachtete gute antimikrobielle Wirksamkeit von Octenidindihydrochlorid könnte möglicherweise auf das verwendete Präparat zurückzuführen sein: Octenisept® beinhaltet – wie bereits erwähnt – Phenoxyethanol

2% als Konservierungsstoff. Dieser wirkt selbst bakterizid (Owen 2006) und könnte zu einer vermehrten Abtötung von *E. faecalis* beigetragen haben. Bei Octenidol® hingegen fehlt diese alkoholische Komponente, weshalb der Desinfektionserfolg in der vorliegenden Untersuchung möglicherweise schlechter ausfiel.

Zusammengefasst ergibt sich, dass keine der untersuchten Spüllösungen über eine ausreichende Effektivität verfügte, um *E. faecalis* vollständig zu eliminieren. Der Grund hierfür könnte in der anatomischen Komplexität des Wurzelkanalsystems liegen, welche einen direkten Kontakt der desinfizierenden Lösungen mit einigen Anteilen des Biofilms erschwerte (Spratt et al. 2001) und zu einer größeren Streuung der Ergebnisse in der statistischen Analyse führte (Gulabivala et al. 2004). Daraus resultierten vermutlich einzelne Ausreißer beziehungsweise Extremwerte in der Auszählung der Testgruppen. Um die natürliche Anatomie des Wurzelkanals als Einflussgröße dennoch möglichst gering zu halten, wurde für jede Gruppe eine ausreichende Anzahl Proben verwendet. In vergleichbaren Untersuchungen wurde ebenfalls eine Gruppengröße von zehn Zähnen ausgewählt (de Lucena et al. 2013; Gründling et al. 2011; Tandjung et al. 2007).

## 7 Zusammenfassung

**Ziel der Studie:** Das Mislingen primärer Wurzelkanalbehandlungen ist meist auf persistierende Bakterien zurückzuführen. Dabei handelt es sich hauptsächlich um den äußerst resistenten Keim *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), welcher trotz sorgfältiger Aufbereitung, Desinfektion und Obturation in unzugänglichen Bereichen des Endodonts verbleibt und zu rezidivierenden Infektionen führt. Ziel der vorliegenden Studie war die Analyse der antimikrobiellen Effektivität der Spüllösungen Natriumhypochlorit 1% (NaOCl), Chlorhexidindigluconat 2% (CHX) und Octenidol® gegenüber *E. faecalis* in Wurzelkanälen menschlicher Zähne. Zur Heranzüchtung und Desinfektion des intrakanalären Biofilms wurde ein bereits etabliertes In-vitro-Modell weiterentwickelt. Im Rahmen einer rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung erfolgte zusätzlich eine Bewertung der Schmier-schichtentfernung sowie der Nachweis des Biofilms.

**Material und Methode:** Für das In-vitro-Modell wurden 60 extrahierte menschliche einwurzelige Zähne verwendet. Nach Abtrennen der Krone und standardisierter Wurzelkanalaufbereitung mithilfe von FlexMaster-Instrumenten wurde die Schmier-schicht mit 5 ml EDTA 17% und 2 ml NaOCl 1% entfernt. Es erfolgte eine Zuordnung in insgesamt sieben experimentelle Gruppen: Zwei Gruppen (je n = 5) dienten der Kontrolle der Schmier-schichtentfernung (SL) und des gezüchteten Biofilms (BF) im Rasterelektronenmikroskop. Drei Gruppen (je n = 10) dienten der Untersuchung der Spüllösungen (NaOCl, CHX, Octenidol®). Daneben wurden eine Positiv- sowie Negativkontrolle (je n = 10) untersucht. Bis auf die Gruppe SL wurden alle Zähne initial autoklaviert. Ein Biofilm aus *E. faecalis* wurde für 72 Stunden in den Wurzelkanälen der Gruppen NaOCl, CHX, Octenidol®, Positivkontrolle und BF gezüchtet. Anschließend erfolgte die Desinfektion der Spülgruppen mit je 5 ml NaOCl 1%, CHX 2% und Octenidol® für je 3 min mittels konventioneller Handspülung. Mit Hedströmfeilen aufsteigender Größe wurden Dentinspäne entnommen, in einem mit Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) gefüllten Eppendorfgefäß gesammelt und durchmischt. Auf Agar-Nährböden wurden die Proben in dreifacher Ausführung plattiert und inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Auszählung an *colony forming units* (CFU) und statistische Auswertung.

**Ergebnisse:** Die Entfernung der Schmierschicht sowie Entstehung eines Biofilms wurden mithilfe der REM-Analyse bestätigt. Insgesamt reduzierten alle Spüllösungen signifikant die Anzahl an *E. faecalis* in den Wurzelkanälen ( $p < 0,0001$ ). NaOCl 1% eliminierte signifikant mehr Bakterien als CHX 2% ( $p = 0,0219$ ) und Octenidol® ( $p < 0,0001$ ). Octenidol® hinterließ dagegen mehr Bakterien im Wurzelkanal als CHX 2% ( $p = 0,0002$ ). Keine Desinfektionsmaßnahme führte zu einer vollständigen Elimination von *E. faecalis* aus dem Wurzelkanalsystem.

**Schlussfolgerung:** Es konnte nachgewiesen werden, dass eine konventionelle Spülung mit Octenidol® wie auch mit den bereits gängigen endodontischen Desinfizienten NaOCl 1% oder CHX 2% eine effektive Methode darstellt, eine Infektion mit *E. faecalis* in Wurzelkanälen zu behandeln. NaOCl 1% erzielte in der vorliegenden Untersuchung das signifikant beste Ergebnis und erwies sich erneut als Spülflüssigkeit der ersten Wahl. Ein alternativer Einsatz von CHX 2% oder Octenidol® zur Wurzelkanal desinfektion ist dennoch beispielsweise im seltenen Falle einer Sensibilisierung gegenüber NaOCl vorstellbar.



## 8 Literaturverzeichnis

Addy M, Moran JM (1997): Clinical indications for the use of chemical adjuncts to plaque control: chlorhexidine formulations. *Periodontol* 2000 15, 52-54

Akpata ES, Blechman H (1982): Bacterial invasion of pulpal dentin wall in vitro. *J Dent Res* 61 (2), 435-438

Albrecht LJ, Baumgartner JC, Marshall JG (2004): Evaluation of apical debris removal using various sizes and tapers of ProFile GT files. *J Endod* 30 (6), 425-428

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, Baca P (2009): Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod* 35 (5), 711-714

Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP, Valderrama MJ, Baca P (2010): Eradication of Enterococcus faecalis biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *J Endod* 36 (1), 87-90

Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ (2007): The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J* 52 (1 Suppl), 64-82

Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi MZ, Bodur H (1999): Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *Int Endod J* 32 (2), 99-102

Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM (2011): Residual effectiveness of final irrigation regimens on Enterococcus faecalis-infected root canals. *J Endod* 37 (8), 1121-1123

Barthel C, Hülsmann M, Petschelt A, Schäfer E, Weiger R, Flachsenberg S, Georgi M, Kockapan C, Neuber C (2006): Gemeinsame Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde (DGZMK) und der Deutschen

Gesellschaft für Zahnerhaltung (DGZ): Die Wurzelkanalspülung. Dtsch Zahnärztl Z. 10

Basrani B, Lemonie C (2005): Chlorhexidine gluconate. Aust Endod J 31 (2), 48-52

Basrani B, Tjaderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, Friedman S (2003): Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 96 (5), 618-624

Baumgartner JC, Falkler WA Jr. (1991): Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. J Endod 17 (8), 380-383

Beiswanger BB, Mallatt ME, Mau MS, Jackson RD, Hennon DK (1990): The clinical effects of a mouthrinse containing 0.1% octenidine. J Dent Res 69 (2), 454-457

Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P (2008): Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. Int Endod J 41 (3), 227-239

Bhuva B, Patel S, Wilson R, Niazi S, Beighton D, Mannocci F (2010): The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. Int Endod J 43 (3), 241-250

Bolanos OR, Jensen JR (1980): Scanning electron microscope comparisons of the efficacy of various methods of root canal preparation. J Endod 6 (11), 815-822

Brunner E, Domhof S, Langer F: Nonparametric analysis of longitudinal data in factorial experiments. Hrsg. v. Bloomfield P. John Wiley & Sons, New York 2001

Bryce G, O'Donnell D, Ready D, Ng YL, Pratten J, Gulabivala K (2009): Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single- and dual-species biofilms. J Endod 35 (9), 1243-1248

Busslinger A, Sener B, Barbakow F (1998): Effects of sodium hypochlorite on nickel-titanium Lightspeed instruments. *Int Endod J* 31 (4), 290-294

Byström A, Sundqvist G (1981): Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 89 (4), 321-328

Byström A, Sundqvist G (1985): The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 18 (1), 35-40

Calt S, Serper A (2000): Smear layer removal by EGTA. *J Endod* 26 (8), 459-461

Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC (2007): Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod* 33 (4), 422-426

Carvalho AS, Camargo CH, Valera MC, Camargo SE, Mancini MN (2008): Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study. *J Endod* 34 (11), 1396-1400

Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A (1999): The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 37 (6), 1771-1776

Chavez de Paz LE (2007): Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod* 33 (6), 652-662

Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G (2010): The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 36 (1), 70-77

Clark-Holke D, Drake D, Walton R, Rivera E, Guthmiller JM (2003): Bacterial penetration through canals of endodontically treated teeth in the presence or absence of the smear layer. *J Dent* 31 (4), 275-281

Cohenca N, Silva LA, Silva RA, Nelson-Filho P, Heilborn C, Watanabe E, Saraiva MC (2013): Microbiological evaluation of different irrigation protocols on root canal disinfection in teeth with apical periodontitis: an in vivo study. *Braz Dent J* 24 (5), 467-473

Corman ML (1983): Classic articles in colonic and rectal surgery. Henry Drysdale Dakin 1880-1952. On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. *Dis Colon Rectum* 26 (5), 354-358

Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G (1994): Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 176 (8), 2137-2142

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284 (5418), 1318-1322

Dakin HD (1915): On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. *BMJ* 2 (2852), 318-320

de Lucena JM, Decker EM, Walter C, Boeira LS, Lost C, Weiger R (2013): Antimicrobial effectiveness of intracanal medicaments on *Enterococcus faecalis*: chlorhexidine versus octenidine. *Int Endod J* 46 (1), 53-61

Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW (1982): The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 53 (5), 518-523

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ (2002): Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 28 (10), 689-693

Donlan RM, Costerton JW (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15 (2), 167-193

Drake DR, Wiemann AH, Rivera EM, Walton RE (1994): Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer. *J Endod* 20 (2), 78-82

Duggan JM, Sedgley CM (2007): Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 33 (7), 815-818

Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL (2006): Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 32 (6), 527-531

Emilson CG (1977): Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 85 (4), 255-265

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD (2002): Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 13 (2), 113-117

Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR (2009): A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *J Appl Oral Sci* 17 (2), 87-91

Estrela CR, Estrela C, Reis C, Bammann LL, Pecora JD (2003): Control of microorganisms in vitro by endodontic irrigants. *Braz Dent J* 14 (3), 187-192

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002): Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 35 (3), 221-228

Falk KW, Sedgley CM (2005): The influence of preparation size on the mechanical efficacy of root canal irrigation in vitro. *J Endod* 31 (10), 742-745

Farzaneh M, Abitbol S, Lawrence HP, Friedman S (2004): Treatment outcome in endodontics-the Toronto Study. Phase II: initial treatment. *J Endod* 30 (5), 302-309

Figdor D, Davies JK, Sundqvist G (2003): Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 18 (4), 234-239

Folwaczny M, Hickel R (2003): Biofilm - Problem oder Perspektive? *Dtsch Zahnärztl Z* 58 (12), 648-659

Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, Pagonis TC, Kent R, Stashenko PP, Soukos NS (2007): Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med* 39 (10), 782-787

Foulkes DM (1973): Some toxicological observations on chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl* 12, 55-60

Friedman S, Mor C (2004): The success of endodontic therapy-healing and functionality. *J Calif Dent Assoc* 32 (6), 493-503

Friedman S, Abitbol S, Lawrence HP (2003): Treatment outcome in endodontics: the Toronto Study. Phase 1: initial treatment. *J Endod* 29 (12), 787-793

George S, Kishen A, Song KP (2005): The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 31 (12), 867-872

Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA (2007): Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 33 (7), 852-855

Gilbert P, Das J, Foley I (1997): Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv Dent Res* 11 (1), 160-167

Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2001): In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 34 (6), 424-428

Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ (2003): Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 36 (4), 267-275

Grenier, D (1996): Effect of chlorhexidine on the adherence properties of *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* 23 (2), 140-142

Grenier D (1996): Effect of chlorhexidine on the adherence properties of *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol* 23 (2), 140-142

Gründling GL, Zechin JG, Jardim WM, de Oliveira SD, de Figueiredo JA (2011): Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J Endod* 37 (8), 1128-1133

Gulabivala K, Stock CJ, Lewsey JD, Ghori S, Ng YL, Spratt DA (2004): Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. *Int Endod J* 37 (9), 624-631

Gwinnett AJ (1984): Smear layer: morphological considerations. *Oper Dent Suppl* 3, 2-12

Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP (2000): Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 33 (2), 126-131

Haapasalo M, Ørstavik D (1987): In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 66 (8), 1375-1379

Haikel Y, Gorce F, Allemann C, Voegel JC (1994): In vitro efficiency of endodontic irrigation solutions on protein desorption. *Int Endod J* 27 (1), 16-20

Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J (2001): Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 91 (5), 579-586

Hartke A, Giard JC, Laplace JM, Auffray Y (1998): Survival of *Enterococcus faecalis* in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. *Appl Environ Microbiol* 64 (11), 4238-4245

Hata G, Uemura M, Kato AS, Imura N, Novo NF, Toda T (2002): A comparison of shaping ability using ProFile, GT file, and Flex-R endodontic instruments in simulated canals. *J Endod* 28 (4), 316-321

Heling I, Chandler NP (1998): Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* 31 (1), 8-14

Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA (2005): An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 38 (1), 22-29

Hennessey TS (1973): Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl* 12, 61-67

Hostynek JJ, Patrick E, Younger B, Maibach HI (1989): Hypochlorite sensitivity in man. *Contact Dermatitis* 20 (1), 32-37

Hülsmann M: Die Desinfektion des endodontischen Systems in: Checkliste der Zahnmedizin - Endodontie. Hrsg. v. Hülsmann M. Thieme Verlag, Stuttgart 2006, 147-168

Hülsmann M, Hahn W (2000): Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. *Int Endod J* 33 (3), 186-193

Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A (2003a): Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J* 36 (12), 810-830

Hülsmann M, Gressmann G, Schäfers F (2003b): A comparative study of root canal preparation using FlexMaster and HERO 642 rotary Ni-Ti instruments. *Int Endod J* 36 (5), 358-366

Hülsmann M, Peters OA, Dummer PMH (2005): Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means *Endodontic Topics* 10 (1), 30-76



Hülsmann M, Rödiger T, Nordmeyer S (2007): Complications during root canal irrigation. *Endodontic Topics* 16 (1), 27-63

Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, Welsch U, Miethke T, Brand K, Hickel R (2009): Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J* 42 (1), 3-13

Karale R, Thakore A, Shetty V (2011): An evaluation of antibacterial efficacy of 3% sodium hypochlorite, high-frequency alternating current and 2% chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *J Conserv Dent* 14 (1), 2-5

Kaufman AY, Keila S (1989): Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *J Endod* 15 (5), 224-226

Khademi A, Yazdizadeh M, Feizianfard M (2006): Determination of the minimum instrumentation size for penetration of irrigants to the apical third of root canal systems. *J Endod* 32 (5), 417-420

Kishen A, George S, Kumar R (2006): *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. *J Biomed Mater Res A* 77 (2), 406-415

Korstgens V, Flemming HC, Wingender J, Borchard W (2001): Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *J Microbiol Methods* 46 (1), 9-17

Lima KC, Fava LR, Siqueira JF Jr. (2001): Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod* 27 (10), 616-619

Lode H, Stahlmann R, Höffken G, Schoeller-Wiley R, Kresken M, Pretorius H (2005): Wichtige Erreger in Klinik und Praxis. *Zeitschrift für Chemotherapie* 3, 19

Loe H, Schiott CR (1970): The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man.

J Periodontal Res 5 (2), 79-83

Love RM (2001): Enterococcus faecalis - a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J 34 (5), 399-405

Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2011): A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. J Endod 37 (10), 1380-1385

Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD (1984): Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. J Endod 10 (10), 477-483

McComb D, Smith DC (1975): A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. J Endod 1 (7), 238-242

Mehrvarzfar P, Saghiri MA, Asatourian A, Fekrazad R, Karamifar K, Eslami G, Dadresanfar B (2011): Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against Enterococcus faecalis contaminating root canals: an in vitro study. J Oral Sci 53 (3), 355-360

Meire MA, De Prijck K, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJ (2009): Effectiveness of different laser systems to kill Enterococcus faecalis in aqueous suspension and in an infected tooth model. Int Endod J 42 (4), 351-359

Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN (2004): In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. Int Endod J 37 (5), 311-319

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T (1998): Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J 31 (1), 1-7

Mozayeni MA, Javaheri GH, Poorroosta P, Ashari MA, Javaheri HH (2009): Effect of 17% EDTA and MTAD on intracanal smear layer removal: a scanning electron microscopic study. *Aust Endod J* 35 (1), 13-17

Naenni N, Thoma K, Zehnder M (2004): Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod* 30 (11), 785-787

Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M (2004): Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod* 30 (11), 778-781

Nair PN (2006): On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 39 (4), 249-281

Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, Takahashi N (2006): Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol* 21 (5), 283-288

O'Connell MS, Morgan LA, Beeler WJ, Baumgartner JC (2000): A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. *J Endod* 26 (12), 739-743

Ørstavik D, Haapasalo M (1990): Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 6 (4), 142-149

Owen SC: Handbook of pharmaceutical excipients. Hrsg. v. Rowe RC. 5. Auflage; The Pharmaceutical Press, London 2006, 517-518

Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D (2010): Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study. *J Endod* 36 (5), 842-846

Paqué F, Balmer M, Attin T, Peters OA (2010): Preparation of oval-shaped root canals in mandibular molars using nickel-titanium rotary instruments: a micro-computed tomography study. *J Endod* 36 (4), 703-707

Parsons GJ, Patterson SS, Miller CH, Katz S, Kafrawy AH, Newton CW (1980): Uptake and release of chlorhexidine by bovine pulp and dentin specimens and their subsequent acquisition of antibacterial properties. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 49 (5), 455-459

Pavlovic V, Zivkovic S (2010): Chlorhexidine as a root canal irrigant--antimicrobial and scanning electron microscopic evaluation. *Srp Arh Celok Lek* 138 (9-10), 557-563

Peters OA (2004): Current challenges and concepts in the preparation of root canal systems: a review. *J Endod* 30 (8), 559-567

Peters OA, Schonenberger K, Laib A (2001): Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J* 34 (3), 221-230

Peters OA, Boessler C, Zehnder M (2005): Effect of liquid and paste-type lubricants on torque values during simulated rotary root canal instrumentation. *Int Endod J* 38 (4), 223-229

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2003): Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 36 (1), 1-11

Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M (2005): The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *J Endod* 31 (5), 380-386

Portenier I, Waltimo TM, Haapasalo M (2006): *Enterococcus faecalis*-the root canal survivor and "star" in post-treatment disease. *Endodontic Topics* 6 (1), 135-159

Ricucci D, Siqueira JF Jr. (2010): Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod* 36 (8), 1277-1288

Rocas IN, Siqueira JF Jr., Santos KR (2004): Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 30 (5), 315-320

Rödig T, Sedghi M, Konietschke F, Lange K, Ziebolz D, Hülsmann M (2010): Efficacy of syringe irrigation, RinsEndo and passive ultrasonic irrigation in removing debris from irregularities in root canals with different apical sizes. *Int Endod J* 43 (7), 581-589

Rolla G, Loe H, Schiott CR (1971): Retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Arch Oral Biol* 16 (9), 1109-1116

Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K (2004): Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98 (4), 488-492

Sandoe JA, Wysome J, West AP, Heritage J, Wilcox MH (2006): Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *J Antimicrob Chemother* 57 (4), 767-770

Sassone LM, Fidel RA, Murad CF, Fidel SR, Hirata R Jr. (2008): Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Aust Endod J* 34 (1), 19-24

Schäfer E, Zapke K (2000): A comparative scanning electron microscopic investigation of the efficacy of manual and automated instrumentation of root canals. *J Endod* 26 (11), 660-664

Schäfer E, Lohmann D (2002): Efficiency of rotary nickel-titanium FlexMaster instruments compared with stainless steel hand K-Flexofile--Part 1. Shaping ability in simulated curved canals. *Int Endod J* 35 (6), 505-513

Schäfer E, Hickel R, Geurtsen W, Heidemann D, Löst C, Petschelt A, Raab W (2000): Wissenschaftliche Stellungnahme der DGZMK und DGZ: Wurzelkanalaufbereitungen. Dtsch Zahnärztl Z. 55

Schäfer E, Schulz-Bongert U, Tulus G (2004): Comparison of hand stainless steel and nickel titanium rotary instrumentation: a clinical study. J Endod 30 (6), 432-435

Schilder H (1974): Cleaning and shaping the root canal. Dent Clin North Am 18 (2), 269-296

Sedlock DM, Bailey DM (1985): Microbicidal activity of octenidine hydrochloride, a new alkanediylbis[pyridine] germicidal agent. Antimicrob Agents Chemother 28 (6), 786-790

Shahravan A, Haghdoost AA, Adl A, Rahimi H, Shadifar F (2007): Effect of smear layer on sealing ability of canal obturation: a systematic review and meta-analysis. J Endod 33 (2), 96-105

Shuping GB, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M (2000): Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. J Endod 26 (12), 751-755

Siqueira JF Jr. (2002): Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 94 (3), 281-293

Siqueira JF Jr., de Uzeda M (1997): Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. J Endod 23 (3), 167-169

Siqueira JF Jr., Rocas IN (2005): Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 2--redefining the endodontic microbiota. J Endod 31 (7), 488-498

Siqueira JF Jr., Rocas IN (2008): Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. J Endod 34 (11), 1291-1301

Siqueira JF Jr., Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M (1998): Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 24 (6), 414-416

Siqueira JF Jr., Lima KC, Magalhaes FA, Lopes HP, de Uzeda M (1999): Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod* 25 (5), 332-335

Siqueira JF Jr., Rocas IN, Favieri A, Lima KC (2000): Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 26 (6), 331-334

Siqueira JF Jr., Rocas IN, Santos SR, Lima KC, Magalhaes FA, de Uzeda M (2002): Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 28 (3), 181-184

Siqueira JF Jr., Rocas IN, Paiva SS, Guimaraes-Pinto T, Magalhaes KM, Lima KC (2007): Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 104 (1), 122-130

Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997): Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 30 (5), 297-306

Soares JA, Pires Junior DR (2006): Influence of sodium hypochlorite-based irrigants on the susceptibility of intracanal microbiota to biomechanical preparation. *Braz Dent J* 17 (4), 310-316

Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM, Mendonca RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Junior M, Magalhaes PP, Santos MH, de Macedo Farias L (2010): Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 36 (5), 894-898

Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR (2006): Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 32 (10), 979-984

Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, Rocas IN, Siqueira JF Jr. (2010): Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 36 (2), 292-296

Spangberg L, Engstrom B, Langeland K (1973): Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 36 (6), 856-871

Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K (2001): An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 34 (4), 300-307

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002): Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56, 187-209

Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB (2006): *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 32 (2), 93-98

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U (1998): Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85 (1), 86-93

Taft J: A practical treatise on operative dentistry. Lindsay & Blakiston, Philadelphia 1859

Tandjung L, Waltimo T, Hauser I, Heide P, Decker EM, Weiger R (2007): Octenidine in root canal and dentine disinfection ex vivo. *Int Endod J* 40 (11), 845-851



Tirali RE, Turan Y, Akal N, Karahan ZC (2009): In vitro antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108 (5), 117-120

Tirali RE, Bodur H, Ece G (2012): In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorhexidine gluconate and octenidine dihydrochloride in elimination of microorganisms within dentinal tubules of primary and permanent teeth. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 17 (3), 517-522

Tirali RE, Gulsahi K, Cehreli SB, Karahan ZC, Uzunoglu E, Elhan A (2013a): Antimicrobial efficacy of octenidine hydrochloride, MTAD and chlorhexidine gluconate mixed with calcium hydroxide. *J Contemp Dent Pract* 14 (3), 456-460

Tirali RE, Bodur H, Sipahi B, Sungurtekin E (2013b): Evaluation of the antimicrobial activities of chlorhexidine gluconate, sodium hypochlorite and octenidine hydrochloride in vitro. *Aust Endod J* 39 (1), 15-18

Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK (2002): Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 94 (6), 658-666

Vaziri S, Kangarlou A, Shahbazi R, Nazari Nasab A, Naseri M (2012): Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an in vitro study. *Dent Res J* 9 (5), 613-618

Vertucci FJ (1984): Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 58 (5), 589-599

Vieira AR, Siqueira JF Jr., Ricucci D, Lopes WS (2012): Dentinal tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. *J Endod* 38 (2), 250-254

Violich DR, Chandler NP (2010): The smear layer in endodontics - a review.  
Int Endod J 43 (1), 2-15

Waltimo TM, Ørstavik D, Siren EK, Haapasalo MP (2000): In vitro yeast infection of human dentin. J Endod 26 (4), 207-209

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M (2012): Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals.  
J Endod 38 (10), 1376-1379

Yang SE, Cha JH, Kim ES, Kum KY, Lee CY, Jung IY (2006): Effect of smear layer and chlorhexidine treatment on the adhesion of *Enterococcus faecalis* to bovine dentin. J Endod 32 (7), 663-667

Zehnder M (2006): Root canal irrigants. J Endod 32 (5), 389-398

Zehnder M, Soderling E, Salonen J, Waltimo T (2004): Preliminary evaluation of bioactive glass S53P4 as an endodontic medication in vitro. J Endod 30 (4), 220-224

## 9 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

<b>Tabelle 1</b>	Präparation der Wurzelkanäle mit unterschiedlichen Instrumenten- größen unter Berücksichtigung der Arbeitslänge	17
<b>Tabelle 2</b>	Gruppeneinteilung für die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung	22
<b>Tabelle 3</b>	Zusammensetzung der Fixierlösung für den Biofilm	23
<b>Tabelle 4</b>	Hochrechnung der Mittelwerte der CFU und des Konfidenzintervalls	29
<b>Tabelle 5</b>	Paarvergleiche der Positivkontrolle mit den Spüllösungen	29
<b>Tabelle 6</b>	Paarvergleich der getesteten Spüllösungen	30
<b>Abbildung 1</b>	Studienübersicht	13
<b>Abbildung 2</b>	Auswahlkriterien zur Standardisierung der Versuchszähne	15
<b>Abbildung 3</b>	Abtrennen einer Prämolaren-Krone mithilfe einer diamantierten Trennscheibe	16
<b>Abbildung 4</b>	Eingebettete Zahnwurzel in einem Zylinder aus Paladur® (Prüfkörper)	18
<b>Abbildung 5</b>	Prüfkörper einer Gruppe gelagert in einer zwölfkammrigen Multischale	19
<b>Abbildung 6</b>	Inokulation der Bakteriensuspension aus <i>E. faecalis</i> in das Wurzelkanallumen	20

<b>Abbildung 7</b>	Verwendete Spüllösungen: Chlorhexidindigluconat 2%, Octenidol®, Natriumhypochlorit 1%	21
<b>Abbildung 8</b>	Dentinwandstruktur mit zahlreichen Tubuli nach Spülung mit EDTA 17% und NaOCl 1% (1000fache Vergrößerung)	25
<b>Abbildung 9</b>	Öffnungen der Tubuli nach Spülung mit EDTA 17% und NaOCl 1% (1000fache Vergrößerung)	26
<b>Abbildung 10</b>	Besiedelung der Dentinwand durch <i>E. faecalis</i> (5000fache Vergrößerung)	27
<b>Abbildung 11</b>	Hochgerechnete Anzahl der CFU auf den Nährböden aller Versuchsgruppen	28
<b>Abbildung 12</b>	Detaillierte Übersicht der Anzahl der CFU aller Spülgruppen unter Berücksichtigung von Ausreißern und Extremwerten	30

## 10 Materialliste

<b>Mat. 1</b>	Agarplatten, Columbia-Blut	Biomerieux GmbH, Nürtingen
<b>Mat. 2</b>	Aqua bidest	Sanismart GmbH, Waltrop
<b>Mat. 3</b>	Brain Heart Infusion (BHI)	Oxoid GmbH, Wesel
<b>Mat. 4</b>	Chlorhexidin 2% (CHX)	lege artis Pharma GmbH & Co.KG, Dettenhausen
<b>Mat. 5</b>	Computerprogramme Excel für Mac Version 14.0.0 Statistica Version 10	Microsoft, Redmond, WA, USA StatSoft GmbH, Hamburg
<b>Mat. 6</b>	Destilliertes Wasser	Walter Schmidt Chemie GmbH, Berlin
<b>Mat. 7</b>	Diamantwalze	Gebr. Brasseler GmbH & Co. KG, Lemgo
<b>Mat. 8</b>	Ethylendiamintetraacetat 17% (EDTA)	lege artis Pharma GmbH & Co.KG, Dettenhausen
<b>Mat. 9</b>	Endomotor "Endo IT professional"	VDW GmbH, München
<b>Mat. 10</b>	Enterococcus faecalis (ATCC 29212)	Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Göttingen
<b>Mat. 11</b>	Filzstift permanent	Faber Castell AG, Stein
<b>Mat. 12</b>	FlexMaster-Feilen	VDW GmbH, München
<b>Mat. 13</b>	Gates-Glidden-Bohrer	Henry Schein GmbH, Hamburg
<b>Mat. 14</b>	Glutaraldehyd 25%	Merck, Darmstadt
<b>Mat. 15</b>	Hedströmfeilen	VDW GmbH, München
<b>Mat. 16</b>	Impfeschlingen 10µl	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
<b>Mat. 17</b>	Küvetten 50 µl	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Mat. 18</b>	Multischale, zwölf Kammern	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden
<b>Mat. 19</b>	Natriumchlorid 0,9% (NaCl)	B. Braun AG, Melsungen
<b>Mat. 20</b>	Natriumhypochlorit 1% (NaOCl)	Hedinger GmbH & Co KG, Stuttgart
<b>Mat. 21</b>	Octenidol®	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
<b>Mat. 22</b>	Paladur®	Heraeus Kulzer GmbH, Hanau
<b>Mat. 23</b>	Paraformaldehyd 25%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>Mat. 24</b>	Phosphatpuffer 0,2M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<b>Mat. 25</b>	pH-Messgerät	WTW Mess- und Analysengeräte GmbH, Wien
<b>Mat. 26</b>	Photometer	Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg
<b>Mat. 27</b>	Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Mat. 28</b>	Rasterelektronenmikroskop	DSM 960, Carl Zeiss AG, Oberkochen
<b>Mat. 29</b>	Reamer	VDW GmbH, München
<b>Mat. 30</b>	Sekundenkleber UHU® plus schnellhärtend)	Uhu GmbH & Co. KG, Bühl
<b>Mat. 31</b>	Sichelscaler	Hu-Friedy Mfg.Co.LLC, Chicago, Illinois, USA
<b>Mat. 32</b>	Silaplast Futur®	Detax GmbH, Ettlingen
<b>Mat. 33</b>	Spritze, 5 ml	B. Braun AG, Melsungen
<b>Mat. 34</b>	Sputter	SEM Coating System, Fisons Instr., East Sussex, UK
<b>Mat. 35</b>	Spülkanülen	Vedefar, Dilbeek, Belgien
<b>Mat. 36</b>	Trennscheibe	Henry Schein vet GmbH, Hamburg
<b>Mat. 37</b>	Vortexer	Heidolph Elektro KG, Kelheim

## Danksagung

Frau Oberärztin Priv.-Doz. Dr. Tina Rödiger vom Zentrum Zahn-Mund-Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchführen zu können, für ihre engagierte und außerordentlich freundliche Betreuung bei der Planung und Durchführung der Versuche sowie für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens. Zusätzlich bedanke ich mich für die Erstellung des Erstgutachtens.

Herrn Oberarzt Prof. Dr. Michael Hülsmann vom Zentrum Zahn-Mund-Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen danke ich für die Unterstützung in studienrelevanten Fragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dipl. Biol. Ortrud Zimmermann für ihre freundliche Unterstützung bei dem Entwurf des Studiendesigns sowie der Umsetzung der Versuche im Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Universität Göttingen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Konietschke vom Institut für Medizinische Statistik der Universität Göttingen danke ich für die Begleitung während der Studienplanung und Auswertung der Daten sowie die fachliche Beratung.

Für die Betreuung bei der Erstellung der Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen danke ich Herrn Hans-Georg Sydow.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Frau Sarah Endres für die gute Zusammenarbeit bei der Umsetzung dieser Arbeit bedanken.