

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

**Vergleich der antibakteriellen Effektivität vier unterschiedlicher
Techniken zur Aktivierung der Wurzelkanalspülung
(Hand, Ultraschall, RinsEndo®, EndoVac®)
auf *Enterococcus faecalis* anhand eines Wurzelkanal-Biofilm-
Modells**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Monika Diana Eberl (geb. Zach)
aus
Schrobenhausen

Göttingen 2017

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent/in: PD Dr. med. dent. T. Rödiger
Ko-Referent/in: PD Dr. med. dent. S. Sennhenn-Kirchner
Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 20.02.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Vergleich der antibakteriellen Effektivität vier unterschiedlicher Techniken zur Aktivierung der Wurzelkanalspülung (Hand, Ultraschall, RinsEndo®, EndoVac®) auf *Enterococcus faecalis* anhand eines Wurzelkanal-Biofilm-Modells" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 04.09.2017

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	II
Herstellerverzeichnis / Materialliste	III
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Ätiologie pulpaler und periapikaler Infektionen	3
2.2 Enterococcus faecalis	4
2.3 Biofilme	4
2.4 Wurzelkanalbehandlung.....	5
2.5 Schmierschichtentfernung	6
2.6 Wurzelkanalspülung	6
2.6.1 Spülflüssigkeiten.....	6
2.6.2 Spültechniken	9
2.6.3 Einflussfaktoren auf die Effektivität der Wurzelkanalspülung.....	13
2.7 Kultivierung als Nachweismethode	16
2.8 Ziel der Studie	16
3 Material und Methoden.....	17
3.1 Auswahl und Vorbereitung der Zähne	17
3.2 Präparation der Wurzelkanäle und Herstellung der Prüfkörper	18
3.3 Gruppeneinteilung und Autoklavierung der Prüfkörper	19
3.4 Vorbereitung des Bakterienstamms.....	20
3.5 Infektion der Wurzelkanäle	20
3.6 Desinfektion der Wurzelkanäle	21
3.7 Probengewinnung und Kultivierung.....	24
3.8 Statistische Auswertung	26
4 Ergebnisse	27
4.1 Kultivierung.....	27
4.2 Rasterelektronenmikroskopie	31
5 Diskussion.....	33
5.1 Diskussion von Material und Methode	33
5.2 Diskussion der Ergebnisse	36
5.3 Schlussfolgerungen.....	40
6 Zusammenfassung.....	41
7 Literaturverzeichnis.....	42

Abkürzungsverzeichnis

AL	Arbeitslänge
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CFU	<i>Colony Forming Units</i>
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscopy</i>
CPD	<i>Critical Point Drying</i>
CUI	<i>Continuous Ultrasonic Irrigation</i>
E. faecalis	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alii</i>
MDT	<i>Master Delivery Tip</i>
MRS	<i>Microbiological Root Canal Sampling</i> = Kultivierung
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalzlösung
NaOCl	Natriumhypochlorit
NiTi	Nickel-Titan
PCR	Polymerasekettenreaktion
PUI	<i>Passive Ultrasonic Irrigation</i>
REM	Rasterelektronenmikroskopie

Herstellerverzeichnis / Materialliste

Agarnährboden, Columbia und 5% Schafsblut	bioMérieux, Nürtingen
Aqua bidest	Sanismart GmbH, Waltrop
Brain Heart Infusion (BHI)	OXOID Deutschland GmbH, Wesel
Bioclav	KSG, Olching
Brutschrank Thermo Scientific	Heraeus Instruments, Hanau
CALCINASE 17% (EDTA)	lege artis Pharma GmbH + Co. KG, Dettenhausen
Diamantwalze Ø 2,5 mm	Gebr. Brasseler GmbH & Co.KG, Lemgo
Endo-Eze® Tip Ø 0,3 mm	Ultradent, München
EndoVac®-System	SybronEndo, Anaheim, CA, USA
Enterococcus faecalis (AT CC 29212)	Institut für Medizinische Mikrobiologie der UMG
Eppendorf-Cup 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Excel®-Tabelle	Microsoft Excel®; WA, USA
FlexMaster®-NiTi-Instrumente	VDW, München
Flow A3	Dentsply, Konstanz
Glutaraldehyd 25%	Merck, Darmstadt
Hedström-Feilen	VDW, München
Impfeschlinge	Sarstedt, Nümbrecht
IRRI K- Feile 25/15	VDW, München
Kochsalzlösung 0,9%	Braun, Melsungen
Magnetrührer	IKAMAG® REO, Staufen
Natriumhypochlorit 1% (NaOCl)	Hedinger, Stuttgart
Paladur®	Heraeus Kulzer GmbH, Hanau
Paraformaldehyd 25%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phosphatpuffer 0,2M	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pipette 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Plattierungsspatel	Sarstedt, Nümbrecht
Rasterelektronenmikroskop	DSM 960; Carl Zeiss AG, Oberkochen
Reamer	VDW, München
RinsEndo®-System	Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen
SAS® Macro	SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
Spektrophotometer	BioPhotometer plus; Eppendorf, Hamburg
Spritze 5 ml	B.Braun, AG, Melsungen
Sputter SEM Coating System	Fisons Instruments, East Sussex, UK

Statistica Version 10	StatSoft GmbH, Hamburg
Sterilbank ThermoScientific	Heraeus Instruments, Hanau
S-U-SuperCut-Trimmer	Schuler Dental, Ulm
Trennscheibe Ø 0,3 mm	Horico, Berlin
Ultraschallansatz	KaVo Dental, Biberach
Ultraschallgerät VDW.ULTRA	VDW, München
Vortex-Mischgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries; Bohemia, USA

1 Einleitung

Der Begriff „Endodontologie“ bezeichnet im zahnärztlichen Alltag die Therapie von Zähnen mit pulpalen und periapikalen Erkrankungen mit dem Ziel, einen langfristigen Zahnerhalt zu gewährleisten. Da Bakterien bei der Entstehung von pulpalen und periapikalen Infektionen eine zentrale Rolle spielen, zielt die endodontische Therapie auf deren größtmögliche Elimination aus dem Wurzelkanal ab (Bhuva et al. 2010, Figdor 2002, Sathorn et al. 2007, Siqueira et al. 2007). Angestrebt wird dabei optimalerweise die vollständige Entfernung aller Bakterien, zumindest aber eine Verringerung der Bakterienkonzentration auf ein Niveau, das eine periradikuläre Gewebeheilung zulässt (Siqueira und Rocas 2008).

Aufgrund der komplexen Anatomie des Wurzelkanalsystems (de Gregorio et al. 2010, Vertucci 1984) werden bei der mechanischen Präparation mehr als 35 Prozent der Wurzelkanalwand nicht erreicht (Peters OA et al. 2001; Wu et al. 2003). Aus diesem Grund verbleibt im Wurzelkanal eine Vielzahl von Mikroorganismen an für die mechanische Reinigung unzugänglichen Stellen wie Isthmen und Ramifikationen (Hülsmann et al. 2003a; Matsuo et al. 2003). Deshalb ist die Verwendung desinfizierender Spülflüssigkeiten zur Entfernung dieses bakteriellen Biofilms und zur Entfernung von Debris und infiziertem Gewebe notwendig (Bhuva et al. 2010; Peters OA et al. 2001). Für die Applikation und Aktivierung der Spülflüssigkeiten stehen unterschiedliche manuelle und maschinelle Techniken zur Verfügung (Gu et al. 2009). Zugrunde liegt die Annahme, dass jede Form der Aktivierung einer Spüllösung zu einer Steigerung der Wurzelkanal-desinfektion und -reinigung führt (Caron et al. 2010). Obwohl aktuelle chemomechanische Techniken eine Reduktion der Bakterienbelastung bewirken, wird eine vollständige Desinfektion des gesamten Kanalsystems dennoch nicht erreicht (Card et al. 2002; Dalton et al. 1998; Hülsmann et al. 2003a; Miller und Baumgartner 2010; Pataky et al. 2002; Siqueira et al. 2007; Siqueira et al. 1999). Im Kanalsystem verbleibende Mikroorganismen erhöhen nachweislich das Risiko eines Behandlungsmisserfolges (Bergenholtz und Spangberg 2004, Fabricius et al. 2006, Nair 2006, Siqueira 2001, Waltimo et al. 2005). Deswegen zielen aktuelle Forschungsansätze und Spülmethoden auf eine stetige Verbesserung der Desinfektionswirkung im Rahmen der endodontischen Behandlung ab (Brito et al. 2009, Ng et al. 2011, Siqueira und Rocas 2008). Zu diesen gehören auch die vier in dieser Studie untersuchten Systeme, die konventionelle statische Handspülung, die Ultraschallaktivierung, das EndoVac®- und das RinsEndo®-System. Diese Techniken basieren auf vier unterschiedlichen Prinzipien. Die Handspülung basiert allein auf der mechanischen Wirkung des Flüssigkeitsstroms. Die Ultraschallaktivierung induziert zusätzlich über Ultraschallwellen eine akustische Strömung in der Spülflüssigkeit. Das EndoVac®-System saugt die Spülflüssigkeit mit negativem Druck auf Arbeitslänge. Das RinsEndo®-System aktiviert die Spülflüssigkeit mittels einer Druck-Saug-Technologie.

Das Ziel der vorliegenden *In-vitro*-Studie war der Vergleich der antimikrobiellen Wirksamkeit dieser vier Wurzelkanalspültechniken auf einen intrakanalären *Enterococcus faecalis*-Biofilm.

2 Literaturübersicht

2.1 Ätiologie pulpaler und periapikaler Infektionen

Bakterien haben einen wesentlichen Einfluss bei der Entstehung pulpaler und periapikaler Erkrankungen (Kakehashi et al. 1965; Nair 1987; Rôças et al. 2008; Siqueira und Rôças 2009). Sie dringen bei tiefen kariösen Läsionen, dentalen Traumen, parodontalen Erkrankungen oder insuffizienten koronalen Restaurationen über freiliegende Dentintubuli oder laterale Kanäle von der Mundhöhle aus in das Wurzelkanalsystem ein und führen so zu pulpalen und periapikalen Infektionen (Kakehashi et al. 1965; Torabinejad et al. 1990; Walker 1996). Der Infektion der Pulpa geht normalerweise eine Entzündungsreaktion mit anschließender Gewebenekrose voraus (Thoden van Velzen et al. 1988). Die nekrotische Pulpa verliert ihre Abwehrreaktion und wird in der Folge bakteriell besiedelt. Wenn diese Infektion des Wurzelkanalsystems nicht rechtzeitig therapiert wird, können bakterielle Stoffwechselprodukte eine periapikale Entzündung (Parodontitis apicalis) der umliegenden Gewebe verursachen (Thoden van Velzen et al. 1988). Grundsätzlich finden sich drei verschiedene Arten von pulpalen und periapikalen Infektionen. Sie werden nach ihrer Ursache in primäre, sekundäre und persistierende Infektionen eingeteilt. Primäre Infektionen entstehen in der nekrotischen Pulpa eines endodontisch bislang unbehandelten Zahnes (Siqueira und Rôças 2009). Sekundäre Infektionen werden durch die nachträgliche Zuwanderung von Mikroorganismen in einen endodontisch bereits behandelten Zahn ausgelöst (Nair et al. 1990; Sundqvist et al. 1998). Persistierende Infektionen entwickeln sich aus Bakterien, die trotz einer endodontischen Behandlung im Wurzelkanal verbleiben (Nair et al. 1990; Sundqvist et al. 1998). Letzteres kann dabei entweder auf einer unzureichenden Desinfektion oder auf einer unvollständigen Instrumentierung nicht zugänglicher Kanalregionen beruhen (Nair et al. 2005).

Endodontische Infektionen sind in der Regel bakterielle Mischinfektionen (Rôças et al. 2008). Bei primären Infektionen dominieren grampositive und gramnegative Anaerobier (Siqueira und Rôças 2009). Die Mikroflora sekundärer und persistierender Infektionen unterscheidet sich im Vergleich dazu stark (Molander et al. 1998). Dort überwiegen grampositive, fakultative Anaerobier, wie beispielsweise Streptokokken oder *Enterococcus faecalis*, aber auch Pilze wie *Candida albicans* (Siqueira und Rôças 2009). Diese Mikroorganismen sind zumeist schwierig zu eliminieren (Siqueira et al. 2002), da sie typischerweise in einem sehr resistenten Biofilm an der Wurzelkanalwand organisiert sind (Nair 1987; Siqueira et al. 2002). Darüber hinaus dringen diese Mikroorganismen bis zu mehrere Hundert Mikrometer tief in die Dentintubuli ein (Siqueira et al. 2002), wodurch eine effektive Desinfektion zusätzlich erschwert wird.

2.2 Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis gehört zu den grampositiven Kokken und fakultativen Anaerobiern (Siqueira und Rôças 2009). Er bildet im Wurzelkanal Biofilme (Distel et al. 2002) und ist sehr resistent gegenüber äußeren Einflüssen (Jett et al. 1994). Die Biofilmbildung ist für das Überleben von *E. faecalis* unbedingt erforderlich, da er in planktonischer Form bereits mit einer im Verhältnis zur Bakterienzahl sehr kleinen Menge NaOCl vollständig eliminiert wird (Gomes et al. 2001). *E. faecalis* wird häufig (28% bis 77,8%) in Wurzelkanälen mit sekundären und persistierenden endodontischen Infektionen nachgewiesen (Gomes et al. 2001; Hancock et al. 2001; Pinheiro et al. 2003; Rôças et al. 2004; Sundqvist et al. 1998; Murad et al. 2014, 2014; Pirani et al. 2008). In einigen Fällen mit periradikulären Läsionen wurde *E. faecalis* sogar als einziges anwesendes Bakterium aus dem Wurzelkanal isoliert (Pinheiro et al. 2003; Sundqvist et al. 1998). Waltimo et al. (2000) führten das häufige Verbleiben von *E. faecalis* im Wurzelkanal auf seine geringe Größe zurück, die eine tiefe Penetration in die Dentintubuli ermöglicht und so die chemo-mechanische Reinigung erschwert. Dass *E. faecalis* in der Studie von Stuart et al. (2006) bei Behandlungsmisserfolgen mit einer Häufigkeit von 24% - 77% auftrat, wurde auf verschiedene pathogene Eigenschaften und Virulenzfaktoren zurückgeführt (Jett et al. 1994). Diese Virulenzfaktoren ermöglichen dem Bakterium zum Beispiel die Anheftung an Wirtszellen, eine Modulation der Wirtsantwort und ein kompetitives Verhalten gegenüber anderen Bakterienspezies durch die Produktion von eigenen Proteinen (Jett et al. 1994; Rôças et al. 2004). *E. faecalis* ist weiterhin in der Lage, über in der Zellmembran lokalisierte Protonenpumpen einen Ionenaustausch zwischen der Umgebung und dem Zellinneren vorzunehmen, so dass der intrazelluläre pH-Wert konstant bleibt (Stuart et al. 2006). Daraus resultiert eine große Resistenz gegenüber Säuren und Laugen (Evans et al. 2002).

E. faecalis wird in mikrobiologischen Studien also häufig als Testkeim verwendet (Bago Jurič et al. 2014; Cachovan et al. 2013; Guerreiro-Tanomaru et al. 2015; Koçak et al. 2014; Bhuvu et al. 2010; Brito et al. 2009; Hockett et al. 2008; Miller und Baumgartner 2010; Pasqualini et al. 2010; Siqueira et al. 1997; Townsend und Maki 2009), da er oft im Zusammenhang mit persistierenden Infektionen auftritt, einfach anzuzüchten ist, stets Biofilme bildet und sich sehr resistent gegenüber äußeren Einflüssen verhält.

2.3 Biofilme

Die erste Hypothese zur Existenz von Biofilmen stammt von Costerton et al. (1978). Das von ihm entwickelte Konzept ging davon aus, dass Mikroorganismen in einem feuchten Milieu bevorzugt auf Oberflächen haften, anstatt in planktonischer Form zu verbleiben. Außerdem nahm er an, dass sich in Biofilmen organisierte Bakterien von planktonischen Bakterien im Hinblick auf ihren Phänotyp unterscheiden und dass sie daher auch unterschiedlich auf antimikrobielle Therapieansätze reagieren. Die Richtigkeit dieser Hypothesen hat sich

inzwischen bestätigt (Donlan und Costerton 2002). Während der Ausbildung eines Biofilms aggregieren Mikroorganismen auf einer Oberfläche in einer selbst gebildeten wasserhaltigen und polymeren Matrix (Costerton et al. 1999). Das erhöht ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber antimikrobiellen Therapien deutlich (Distel et al. 2002; Siqueira und Rôças 2008). Dafür verantwortlich ist die extrazelluläre Matrix, die als Diffusionsbarriere zu einer hohen mechanischen und damit antimikrobiellen Resistenz führt (Körstgens et al. 2001). Außerdem weisen Bakterien in Biofilmen einen langsameren Stoffwechsel als planktonische Mikroorganismen auf, woraus eine geringere Effektivität antimikrobieller Maßnahmen resultiert (Donlan und Costerton 2002). Bestimmte Bakterien können sogar nach längeren Hungerphasen durch die Zufuhr entsprechender Substrate wieder kultivierbar werden (Shen et al. 2010). Das Bakterienspektrum der menschlichen Mundhöhle ist interindividuell sehr verschieden und besteht aus ungefähr 100 bis 200 von bislang mehr als 700 nachgewiesenen Bakterienarten (Paster et al. 2006). Da innerhalb eines Wurzelkanalsystems sehr individuelle physikalisch-chemische Bedingungen und Nährstoffangebote herrschen, finden sich bei pulpalen und periapikalen Infektionen von Patient zu Patient und innerhalb der unterschiedlichen Wurzelkanalabschnitte sehr unterschiedliche Bakterienzusammensetzungen (Alves et al. 2009), woraus unterschiedlich resistente Biofilme resultieren. Für eine erfolgreiche endodontische Therapie ist deshalb ein umfassendes antimikrobielles Behandlungskonzept unerlässlich.

2.4 Wurzelkanalbehandlung

Die endodontische Behandlung von Zähnen mit pulpalen und periapikalen Erkrankungen dient dazu, einen langfristigen Zahnerhalt zu gewährleisten. Da Bakterien bei der Entstehung von pulpalen und periapikalen Infektionen eine zentrale Rolle spielen, zielt diese Therapie auf deren größtmögliche Elimination aus dem Wurzelkanal ab (Bhuva et al. 2010; Figdor 2002; Sathorn et al. 2007; Siqueira et al. 2007). Dabei wird optimalerweise die vollständige Entfernung aller Bakterien angestrebt, zumindest aber eine Verringerung der Bakterienkonzentration auf ein Niveau, das eine periradikuläre Gewebeheilung zulässt (Siqueira und Rôças 2008). Eine Reduktion von Bakterien im Wurzelkanalsystem um den Faktor 100 bis 1000 (Byström und Sundqvist 1981) wird grundsätzlich durch die mechanische Präparation des Kanals mit Hand- oder rotierenden Instrumenten herbeigeführt (Dalton et al. 1998). Die komplexen anatomischen Verhältnisse in einem Wurzelkanal (de Gregorio et al. 2010; Vertucci 1984) führen allerdings dazu, dass ungefähr ein Drittel der Wurzelkanalwand unpräpariert bleibt, wodurch große Mengen an Biofilm im Kanal verbleiben (Hülsmann et al. 2003a; Matsuo et al. 2003; Peters OA et al. 2001; Siqueira et al. 2007; Wu et al. 2003). Da dieser Biofilm bis in die Dentintubuli reicht (Buck et al. 2001; Matsuo et al. 2003; Torabinejad et al. 2002), ist ein rein mechanischer Zugang zu allen Mikroorganismen nicht möglich. Aus diesem Grund ist zur Auflösung des Biofilms und zur

Entfernung von Debris und infiziertem Material die Verwendung entsprechender Spülflüssigkeiten - zusätzlich zur mechanischen Präparation des Wurzelkanals - notwendig (Bhuva et al. 2010; Peters OA et al. 2001).

2.5 Schmierschichtentfernung

Bei der mechanischen Präparation entsteht auf der Wurzelkanaloberfläche eine Schmierschicht, die neben Dentinspänen und Geweberesten auch Bakterien sowie deren Stoffwechselprodukte enthalten kann (Torabinejad et al. 2002). Diese Schmierschicht besteht laut Mader et al. (1984) aus einer oberflächlichen Ablagerung auf der Kanalwand, die ungefähr 1 bis 2 μm dick ist und einer darunter liegenden Schicht, die bis zu 40 μm tief in die Dentintubuli hineinreicht. Die Schmierschicht wirkt als Diffusionsbarriere und verhindert ein Eindringen der Spülflüssigkeiten ins Dentin (Baumgartner und Cuenin 1992; Torabinejad et al. 2002). Auch dadurch kann der Wirkungseintritt einer Desinfektionslösung nachweislich verzögert bis gänzlich verhindert werden (Ørstavik und Haapasalo 1990). Damit eine effiziente Penetration der Spülflüssigkeiten in die Dentintubuli möglich ist, muss die Schmierschicht entfernt werden.

2.6 Wurzelkanalspülung

2.6.1 Spülflüssigkeiten

Torabinejad et al. (2002) und Zehnder (2006) legten einige Anforderungen an eine endodontische Spülflüssigkeit fest. So benötigt eine ideale Spüllösung ein breites antimikrobielles Wirkspektrum auch gegenüber fakultativen und obligaten Anaerobiern und sollte in der Lage sein, Endotoxine bis tief in die Dentintubuli hinein zu neutralisieren. Außerdem sollte sie die bei der Wurzelkanalpräparation entstehende Schmierschicht sowie vitale und nekrotische Gewebereste und Debris vollständig auflösen und entfernen. Dabei sollten möglichst keine unerwünschten Nebenwirkungen, wie allergische, kanzerogene oder toxische Effekte, auf periapikales und orales Gewebe sowie auf die Zahnhartsubstanzen auftreten.

2.6.1.1 Natriumhypochlorit

Natriumhypochlorit (NaOCl) ist weitläufig gebräuchlich und nach wie vor das Spülmittel erster Wahl (Bergenholtz und Spangberg 2004; Rios et al. 2011). Es erfüllt die Mehrzahl der Anforderungen an endodontische Spülflüssigkeiten und besitzt eine gute antimikrobielle Effektivität bereits bei einer kurzen Anwendungsdauer von einer Minute gegenüber planktonischen Bakterien (Dumani et al. 2007; Zand et al. 2012) und bei einer Anwendungszeit von zwei Minuten gegenüber in einem Monospezies-Biofilm organisierten Bakterien (Bhuva et al. 2010). Laut Siqueira et al. (2000) bildet NaOCl , sobald es in ein wasserhaltiges Milieu gegeben wird, hypochlorige Säure. Diese enthält Hypochlorit (ClO^-) als

starkes Oxidationsmittel, das die Sulfhydryl-Gruppen essentieller Bakterienenzyme oxidiert und somit den bakteriellen Metabolismus unterbricht. NaOCl hat zudem die Fähigkeit, sowohl nekrotisches als auch vitales Gewebe unter Bildung kleiner Blasen aus Ammoniak und CO₂ aufzulösen (Andersen et al. 1992). Am häufigsten wird NaOCl in Konzentrationen zwischen 0,5% und 6% verwendet (Carson et al. 2005; Clegg et al. 2006; Pasqualini et al. 2010; Pawar et al. 2012; Zand et al. 2012). Der Einfluss der Konzentration von NaOCl auf die Effektivität einer Wurzelkanal desinfektion ist bis heute umstritten. Die Häufigkeit der Anwendung, die Einwirkzeit, das Gesamtvolumen und ein kontinuierlicher Austausch der Spülflüssigkeit während des Spülvorganges beeinflussen die Effektivität der Wurzelkanal desinfektion mehr als die Konzentration (Baumgartner und Cuenin 1992; Brito et al. 2009; Siqueira et al. 2000; Zehnder 2006). Zu beachten ist dabei, dass höher konzentriertes NaOCl (5,25%) anders als niedriger konzentriertes NaOCl (0,5%) den Elastizitätsmodul und die Biegefestigkeit des Dentins verringert (Sim et al. 2001). Im Vergleich dazu zeigte hochkonzentriertes NaOCl in *In-vivo*-Studien jedoch keine verbesserte antimikrobielle Wirkung (Byström und Sundqvist 1985; Cvek et al. 1976). Dies haben im Vergleich der antimikrobiellen Wirkung von NaOCl auf *E. faecalis* auch die *In-vitro*-Studien von Dumani et al. (2007) mit 1% und 5% NaOCl, Dunavant et al. (2006) mit 1% und 6% NaOCl und Siqueira et al. (2000) mit 1%, 2,5% und 5,25% NaOCl festgestellt. Andere *In-vitro*-Studien stellten dagegen fest, dass mit NaOCl (6%) deutlich mehr Bakterien aus einem *E. faecalis*-Biofilm eliminiert wurden als mit NaOCl (2%) (Du et al. 2014; Wang et al. 2012). Ein kontinuierlicher Flüssigkeitsaustausch mit einem großen Spülvolumen erhält die antibakterielle Wirksamkeit von niedrigkonzentriertem NaOCl während des gesamten Spülvorganges aufrecht (Moorer und Wesselink 1982). Eine längere Einwirkzeit gleicht die möglicherweise geringere Effektivität niedriger Konzentrationen aus (Baumgartner und Cuenin 1992; Gomes et al. 2001).

Die Desinfektionswirkung von NaOCl hat jedoch auch Limitationen. Die bei der Wurzelkanalpräparation entstandene Schmierschicht muss zusammen mit EDTA beseitigt werden, da NaOCl nur die organischen Bestandteile der Schmierschicht auflösen kann (Ahmetoglu et al. 2014; Baumgartner und Cuenin 1992; Garberoglio und Becce 1994). Peters LB et al. (2001) konnten zudem in den Tubuli von Zähnen mit apikalen Läsionen Mikroorganismen bis zu einer Tiefe von 375 µm nachweisen. Nach Berutti et al. (1997) ist die Eindringtiefe von NaOCl auch unter Zusatz von Tensiden auf 130 µm begrenzt. Außerdem entsteht bei der Gewebeauflösung ein apikaler Gaseinschluss (vapor lock) aus Ammoniak und CO₂, der ein Eindringen von NaOCl bis auf Arbeitslänge verhindern kann (Gu et al. 2009; Schoeffel 2008; Tay et al. 2010). Die Bildung eines solchen ist möglich, weil die Wurzeln von Parodontium umgeben sind und sich in Richtung Wurzelspitze folglich wie ein geschlossenes System verhalten (de Gregorio et al. 2009). Je näher die Spülkanüle an das apikale Foramen reicht, desto kleiner ist der durch einen Gaseinschluss nicht desinfizierbare Bereich des Wurzelkanals. Mit zunehmender Eindringtiefe der Spülkanüle (Malentacca et al. 2012) und

zunehmender Konzentration der Spüllösung (Estrela et al. 2002; Spangberg et al. 1973) steigt allerdings auch die Gefahr von Gewebeerirritationen im Rahmen eines Spülunfalls. Ein solcher tritt verstärkt dann auf, wenn das apikale Foramen iatrogen erweitert oder physiologisch weit offen ist (Bosch-Aranda et al. 2012), wenn der Wurzelkanal bei der Präparation lateral perforiert wurde oder wenn der Spül Druck zu hoch ist (Hülsmann und Hahn 2000). Die Einhaltung eines Sicherheitsabstandes zum apikalen Foramen kann wiederum zu einem unzureichenden Austausch von NaOCl im apikalen Wurzelkanaldrittel führen (Hockett et al. 2008; Nielsen und Baumgartner 2007).

2.6.1.2 Ethylendiamintetraacetat

Ethylendiamintetraacetat (EDTA) ist als effektiver Chelator in der Endodontie bekannt und weit verbreitet (Calt und Serper 2002). EDTA ist ein Komplexbildner und bindet positiv geladene Kationen wie das Kalzium des Dentins (Beyer und Walter 2004). Obwohl EDTA die anorganischen Bestandteile der Schmierschicht komplexieren kann (Hülsmann et al. 2003b), besitzt es weder eine gewebeauflösende noch eine antibakterielle Wirksamkeit (Ørstavik und Haapasalo 1990). Die sequenzielle Anwendung von EDTA und NaOCl entfernt die Schmierschicht jedoch auch nach einer nur einminütigen Einwirkzeit vollständig (Calt und Serper 2000, 2002; Cehreli et al. 2013; Dotto et al. 2007; Garberoglio und Becce 1994). Bei längerer Einwirkdauer führt die Anwendung von EDTA zu Erosionen im Dentin (Calt und Serper 2000, 2002; Cehreli et al. 2013; Dotto et al. 2007; Garberoglio und Becce 1994). EDTA wird seit seiner Einführung durch Nygaard-Østby (1957) meist in 17 bis 20%iger Konzentration verwendet (Dua und Dua 2015; Gade et al. 2013; Haapasalo et al. 2010; Schmidt et al. 2015).

2.6.2 Spültechniken

Für die Applikation der Flüssigkeiten existieren dabei unterschiedliche Methoden, die in manuelle und maschinell-assistierte unterteilt werden (Gu et al. 2009). Zugrunde liegt bei deren Anwendung die Annahme, dass jede Form der Aktivierung einer Spüllösung zu einer effektiveren Reinigung des Wurzelkanalsystems führt (Caron et al. 2010).

2.6.2.1 Konventionelle statische Handspülung



Abb. 2.1 Einwegspritze mit Endo-Eze® Tip zur Handspülung

Bei der Handspülung wird die Spülflüssigkeit mit einer Einwegspritze aus Kunststoff und einer daran befestigten Spülkanüle in die Wurzelkanäle eingebracht. Der Durchmesser der Spülkanüle sollte dabei kleiner sein als der Durchmesser der apikalen Aufbereitung, damit eine Insertion auf Arbeitslänge minus 1-2 mm möglich ist (Chow 1983; Hsieh et al. 2007). Eine Längenkontrolle der Eindringtiefe ist mithilfe eines adjustierten Gummistoppers an der Spülkanüle möglich. Bei der statischen Handspülung wird während der Flüssigkeitszufuhr auf vertikale Bewegungen der Applikationskanüle verzichtet. Bei dieser Spültechnik entsteht im Kanal ein positiver Druck (de Gregorio et al. 2010).

Ein Vorteil dieser Methode ist die gute Kontrolle der Eindringtiefe und des Spülvolumens (van der Sluis et al. 2006). Nachteilig an der Handspülung ist, dass die rein mechanische Reinigungswirkung relativ gering ist und dass das Spülvolumen durch die manuelle Handhabung limitiert ist (Wu und Wesselink 2001). Die verwendete Spülnadel dringt abhängig von ihrem Durchmesser und der jeweiligen Kanalmorphologie unterschiedlich tief in den Kanal ein (Mitchell et al. 2010). Bei zu wenig Druck und/oder einer zu geringen Eindringtiefe erreicht die Spülflüssigkeit die Arbeitslänge nicht (Castelo-Baz et al. 2012; de Gregorio et al. 2010), zu viel Druck und/oder eine zu tiefe Insertion kann in einer Überpressung der Spülflüssigkeit über den Apex resultieren. Überpresstes NaOCl kann zu Gewebeschäden, Schmerzen und Schwellungen führen (Gernhardt et al. 2004; Hülsmann und Hahn 2000; Pashley et al. 1985).

2.6.2.2 Passive Ultraschallspülung mit der *Intermittent-Flush-Methode*



Abb. 2.2 Ultraschallgerät VDW.ULTRA (VDW)



Abb. 2.3 Nicht-schneidende Feile (IRRI K 25/15, VDW)

Grundsätzlich arbeitet die Ultraschallaktivierung mit der Umwandlung von elektrischer Energie in Ultraschallwellen in einem Frequenzbereich von 25–30 kHz (van der Sluis et al. 2007). Diese induzieren eine akustische Strömung in der Spülflüssigkeit, die um die oszillierende Feile herum in schnelle Bewegungen versetzt wird (Ahmad et al. 1987). Zudem tritt in der Spülflüssigkeit der physikalische Effekt der Kavitation (Bildung und Auflösung von Dampfblasen) auf (Macedo et al. 2014). Bei der passiven Ultraschallaktivierung werden nicht-schneidende Feilen im Wurzelkanal in Oszillation versetzt, um eine zusätzliche Aktivierung der Spülflüssigkeit zu gewährleisten. Passiv bedeutet hierbei, dass während der Aktivierung kein Wandkontakt zwischen Instrument und Wurzelkanalwand besteht. Dies soll eine Bearbeitung des Dentins und eine daraus resultierende Stufen- bzw. Schmierschichtbildung verhindern sowie eine Dämpfung der oszillierenden Feile vermeiden (Caron et al. 2010). Derzeit gibt es zwei Arten der passiven Ultraschallspülung (*passive ultrasonic irrigation* = PUI). Bei der *Continuous-Flush-Methode* wird der Wurzelkanal während der Ultraschallaktivierung gleichzeitig kontinuierlich gespült. Bei der *Intermittent-Flush-Methode* nach van der Sluis et al. (2009) wird die Spüllösung zunächst wie bei der Handspülung mit einer Einwegspritze eingebracht und danach mit einem Ultraschallansatz aktiviert. Aktivierung und Spülung des Wurzelkanals wechseln sich dabei ab. Die passive Ultraschallaktivierung wurde in der vorliegenden Studie mithilfe der *Intermittent-Flush-Methode* angewendet.

2.6.2.3 EndoVac®-System

Das EndoVac®-System (SybronEndo, Anaheim, Kalifornien, USA) besteht aus drei, an eine zahnärztliche Einheit gekoppelten Komponenten (Schoeffel 2007; SybronEndo 2012).

1) Der "Master Delivery Tip" (MDT) wird mit einer Einwegspritze und der Absauganlage gekoppelt und in der Zugangskavität platziert. Sie transportiert die Spülflüssigkeit in das Kavum und ermöglicht eine simultane Absaugung aus dem Wurzelkanal.

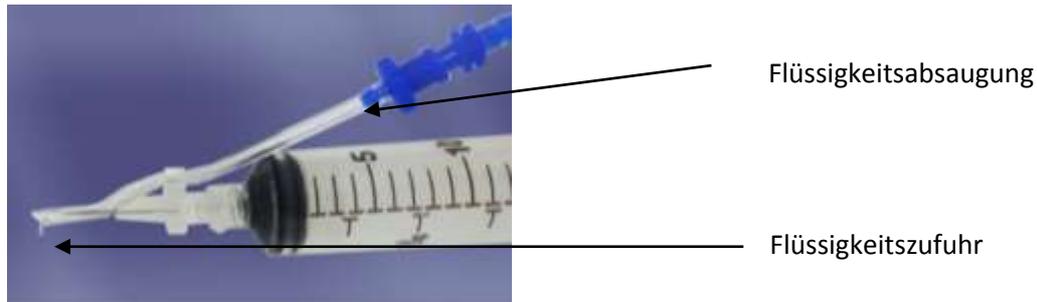


Abb. 2.4 Master Delivery Tip (MDT)

2) Die Makrokanüle besteht aus Kunststoff mit einem Durchmesser von 0,55 mm und einer Konizität von 2%. Sie wird hauptsächlich während der Wurzelkanalpräparation genutzt und saugt aufgrund ihres größeren Durchmessers mit der Spülflüssigkeit Debris und Gewebereste bis ins mittlere Kanaldrittel ab.



Abb. 2.5 Makrokanüle (SybronEndo 2012) (Foto mit freundlicher Genehmigung der Firma SybronEndo)

3) Die Mikrokanüle aus rostfreiem Stahl mit einem Durchmesser von 0,32 mm weist im apikalen Millimeter der geschlossenen und kugelförmig abgerundeten Kanüle zwölf in vier Reihen angeordnete mikroskopisch sichtbare Perforationen ($< 100 \mu\text{m}$) auf. Sie ist in der Lage, die Flüssigkeit im Rahmen der Abschlusspülung bis auf Arbeitslänge zu saugen.



Abb. 2.6 Mikrokanüle (SybronEndo 2012) (Foto mit freundlicher Genehmigung der Firma SybronEndo)

Das Negativ-Druck-System aus den Veröffentlichungen von Schoeffel (2007, 2008) verbessert die Reinigung der apikalen Region. Es ermöglicht die Einbringung der Spülkanüle auf Arbeitslänge, weil kein Sicherheitsabstand zum apikalen Foramen eingehalten werden muss und verhindert zugleich die Entstehung eines apikalen Lufteinschlusses (Chow 1983; Mitchell et al. 2010; Nielsen und Baumgartner 2007). Das EndoVac®-System erzeugt apikal einen negativen Druck (Unterdruck), indem die Spüllösung mithilfe der Mikrokanüle von koronal in Richtung apikal gesaugt wird. Damit wird ein kontinuierlicher Flüssigkeitsaustausch auf Arbeitslänge sichergestellt und durch die drucklose Applikation eine Extrusion von Spülflüssigkeit in das umliegende periapikale Gewebe vermieden (de Gregorio et al. 2012; Desai und Himel 2009; Fukumoto et al. 2006; Gu et al. 2009; Jiang et al. 2012; Mitchell et al. 2010). Der wesentliche Unterschied zu konventionellen Positiv-Druck-Systemen liegt darin, dass die Spülnadel nicht zum Einbringen, sondern zum Absaugen der Spülflüssigkeit dient (Schoeffel 2007). Das am häufigsten verwendete Spülprotokoll dieses Systems stammt von Nielsen und Baumgartner (2007) und besteht aus drei Zyklen. Ein Zyklus beinhaltet dabei drei Mikrozyklen der Aktivierung à 30 Sekunden und dazu intermittierend drei Einwirkzyklen à 30 Sekunden.

Nachteilig am EndoVac®-System ist die verminderte Spüleffektivität, sobald die Löcher der Mikrokanüle mit Debris verstopfen (Brito et al. 2009). Weiterhin muss das System an die Absauganlage einer zahnärztlichen Einheit angeschlossen werden (Miller und Baumgartner 2010), wodurch sich je nach Einheit und Zustand der Absaugung das Flüssigkeitsvolumen und somit auch die Effektivität der Wurzelkanal-desinfektion ändern können (Jiang et al. 2012). Das Flüssigkeitsvolumen, das tatsächlich bis zur Wurzelspitze vordringt, beträgt nur ungefähr 50% der eingebrachten Menge, da die MDT den Rest bereits koronal abgesaugt hat (Desai und Himel 2009).

2.6.2.4 RinsEndo®-System

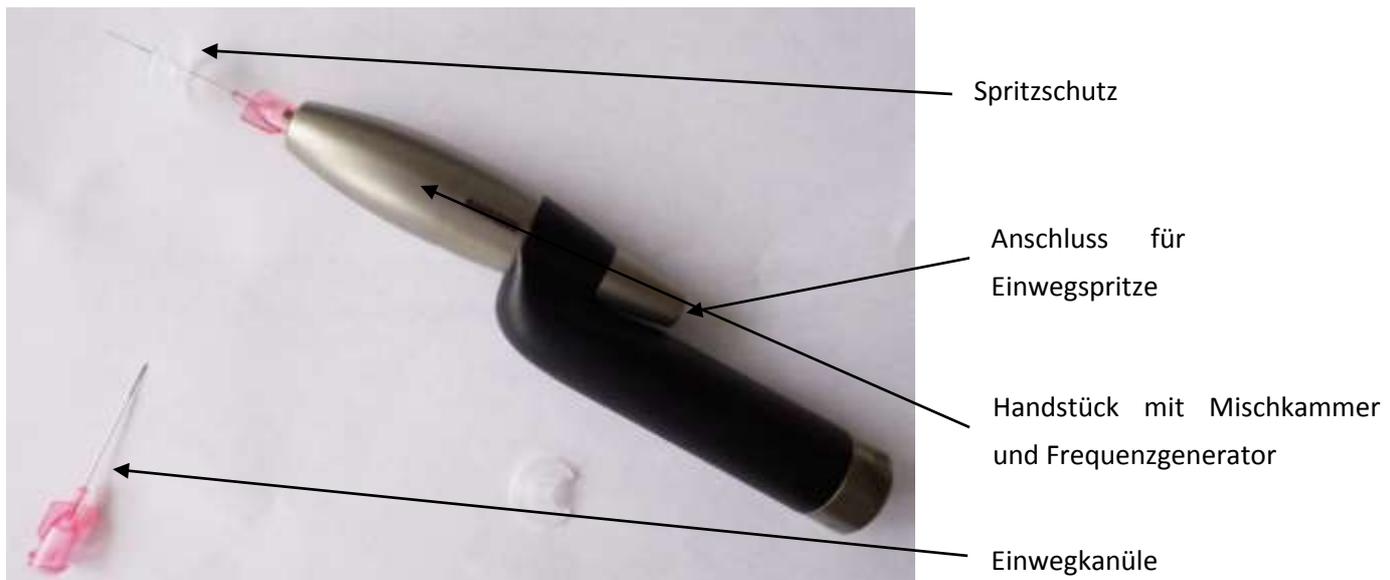


Abb. 2.7 RinsEndo®-System

Das RinsEndo®-System (Dürr Dental, Bietigheim-Bissingen) besteht aus einer Einwegkanüle, einem Handstück und einer am System befestigten Einwegspritze mit Luer-Lock-Ansatz. Eine Verschlusskappe aus Kunststoff, die gleichzeitig die Arbeitslänge markiert und Platz für einen kleinen Saugschlauch lässt, deckt während der Spülung den Zahn ab und ermöglicht so ein sauberes, auf den Wurzelkanal beschränktes Arbeiten. Das System arbeitet mit einer Druck-Saug-Technologie, d. h. mit der stoßweisen Zu- und Abfuhr von Spülflüssigkeit in den Wurzelkanal (Hauser et al. 2007; McGill et al. 2008). Nach der Montage- und Gebrauchsanweisung wird die Stoßfrequenz im turbinengetriebenen Handstück generiert, das aus einem Titangehäuse, einer Mischkammer und einem Frequenzgenerator besteht. In der Phase des Druckaufbaus wird Flüssigkeit aus der Einwegspritze gesaugt, in der Mischkammer mit Luft versetzt und über die Einwegkanüle mit Druck in den Wurzelkanal befördert. In der Saugphase wird ein Teil der Spülflüssigkeit aus dem Wurzelkanal zurück in die Mischkammer gesaugt. Dort wird frische Spüllösung aus der Einwegspritze hinzugefügt, bevor die nächste stoßartige Flüssigkeitszufuhr erfolgt. Nach Herstellerangaben werden durch das System bei einer Stoßfrequenz von 1,6 Hz ungefähr 6,2 ml Spülflüssigkeit pro Minute in den Kanal eingebracht (Hauser et al. 2007).

2.6.3 Einflussfaktoren auf die Effektivität der Wurzelkanalspülung

Bei der Wurzelkanalspülung gibt es wie bei der Wurzelkanalpräparation Limitationen, die die Effektivität der Wurzelkanaldesinfektion einschränken. Die komplexe Wurzelkanalanatomie verhindert, dass die Spülflüssigkeit in schwer zugängliche Bereiche eindringt (Miller und Baumgartner 2010). Des Weiteren führen Gewebsreste und Bakterien zu einer zunehmenden Inaktivierung der Spüllösung (Buck et al. 2001). Faktoren wie das Spülvolumen, die Einwirkzeit und ein kontinuierlicher Austausch der Spülflüssigkeit auf

Arbeitslänge während des Spülvorganges beeinflussen die Effektivität der Wurzelkanal-desinfektion (Baumgartner und Cuenin 1992; Brito et al. 2009; Siqueira et al. 2000; Zehnder 2006).

2.6.3.1 Spülvolumen

Das Spülvolumen hat einen direkten mechanischen Einfluss auf die Bakterienbeseitigung (Sedgley et al. 2005). Ein kontinuierlicher Flüssigkeitsaustausch mit einem großen Spülvolumen erhält die antibakterielle Wirksamkeit auch von niedrigkonzentriertem NaOCl während des gesamten Spülvorganges aufrecht (Moorer und Wesselink 1982). Es wird jedoch vermutet, dass sich ab einem gewissen Sättigungspunkt auch durch eine weitere Volumensteigerung keine Wirkungsunterschiede mehr erzielen lassen (Brito et al. 2009). Das optimale Volumen einer Wurzelkanalspülung ist bislang allerdings nicht bekannt, da das Spülvolumen in den meisten antimikrobiellen Studien nicht berücksichtigt und/oder nicht standardisiert wurde (Brito et al. 2009; Clegg et al. 2006; Dumani et al. 2007; Hockett et al. 2008; Miller und Baumgartner 2010; Townsend und Maki 2009). Studien, die das Volumen der Spülflüssigkeit berücksichtigten, verwendeten oft ein Volumen von fünf (Guerreiro-Tanomaru et al. 2015; Koçak et al. 2014) oder sechs Millilitern NaOCl (Bhuva et al. 2010; Sedgley et al. 2005). Gelegentlich wurde auch ein sehr hohes Gesamtvolumen von 20 ml beziehungsweise 43 ml verwendet (Brito et al. 2009). Darüber hinaus wird auch der Einfluss der Spülgeschwindigkeit diskutiert. Eine höhere Spülgeschwindigkeit führte demnach zu einer größeren Biofilmreduktion (Layton et al. 2015). In dieser *In-vitro*-Studie wurde bei der Handspülung eine höhere Spülgeschwindigkeit und ein höheres Volumen erreicht als bei der passiven Ultraschallaktivierung mit Hilfe der *Intermittent-Flush*-Methode (siehe Kapitel 2.6.2.2).

2.6.3.2 Einwirkzeit

Die Einwirkzeit der Spülflüssigkeit ist ein wichtiger Einflussfaktor auf die Effektivität der Wurzelkanalspülung, wobei die Applikation der Spülflüssigkeit, d. h. die Spülzeit, ein Teil der Einwirkzeit ist. Wenn es um das Erreichen von Bakterien in schwer zugänglichen Kanalbereichen geht, ist die Einwirkzeit einer Spülflüssigkeit im Kanal wichtiger als das während der Wurzelkanalspülung durchfließende Spülvolumen (Brito et al. 2009). Dies mag auch am vermuteten Sättigungspunkt des Spülvolumens liegen (Brito et al. 2009). Spülzeiten sind nur insofern relevant, als immer genügend antimikrobiell wirksame Spülflüssigkeit im Wurzelkanal vorhanden sein muss (Estrela et al. 2002). Voraussetzung für eine durchgehend effektive antimikrobielle Wirkung der Spülflüssigkeit ist demnach ein ausreichender, kontinuierlicher Flüssigkeitsaustausch im gesamten Wurzelkanal (Haapasalo et al. 2010; Moorer und Wesselink 1982). In zehn Minuten werden mit NaOCl (2% und 6%) signifikant mehr Bakterien eines *E. faecalis*-Biofilm eliminiert als in drei Minuten (Du et al. 2014). Eine

dreiminütige Einwirkzeit eliminiert deutlich mehr Bakterien als eine einminütige (Wang et al. 2012). Mit einer längeren Einwirkzeit lassen sich auch niedrige Konzentrationen bezüglich der antibakteriellen Wirksamkeit ausgleichen (Baumgartner und Cuenin 1992; Gomes et al. 2001). In den meisten *In-vitro*-Studien liegt die Dauer der Abschlussspülung zwischen einer und drei Minuten (Gu et al. 2009; Guerreiro-Tanomaru et al. 2015; Saber und Hashem 2011; Townsend und Maki 2009). Die von Baumgartner und Cuenin (1992) verwendete zwölfminütige Abschlussspülung ist im klinischen Alltag laut dieser Autoren allerdings nicht durchführbar. Nach Archer et al. (1992) stellt eine dreiminütige Abschlussspülung mit NaOCl die obere Grenze der klinischen Praktikierbarkeit dar. Innerhalb der ersten drei Minuten wurde ein *E.faecalis*-Biofilm mit NaOCl (2% und 6%) sehr schnell eliminiert, danach deutlich langsamer und nach zehn Minuten kaum noch (Du et al. 2014).

2.6.3.3 Flüssigkeitsaustausch bis auf Arbeitslänge

Ziel der Wurzelkanalpräparation ist es, zusätzlich zur mechanischen Entfernung von Bakterien und Geweben die Zufuhr von Spülmitteln bis in das apikale Wurzelkanaldrittel zu ermöglichen (Clegg et al. 2006; Dunavant et al. 2006). Die Eindringtiefe der Spülnadel ist ausschlaggebend für die Effektivität der Wurzelkanaldesinfektion. Je weiter die Nadel nach apikal vordringt, desto größer ist auch die Reinigungs- und Desinfektionswirkung. Ausschließlich bei Insertion der Spülkanüle auf 1-2 mm vor Arbeitslänge ist ein Flüssigkeitsaustausch im apikalen Wurzelkanaldrittel sichergestellt (Boutsioukis et al. 2010; Bronnec et al. 2010; Brown et al. 1995; Chow 1983; de Gregorio et al. 2010; Hsieh et al. 2007; Sedgley et al. 2005). Grund dafür ist eine nur geringe Ausdehnung des Flüssigkeitsaustausches über die Nadelspitze hinaus (Boutsioukis et al. 2009; Chow 1983; Sedgley et al. 2005). Bei seitlich offenen Spülnadeln reichte der Flüssigkeitsaustausch 1 bis 1,5 mm über die Nadelspitze hinaus, bei apikal offenen Kanülen 2 mm (Boutsioukis et al. 2009). Die Eindringtiefe der Spülkanüle hängt grundsätzlich von verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise vom Durchmesser der verwendeten Spülkanüle sowie der Größe der apikalen Präparation. Damit die Spülkanüle auf kurz vor Arbeitslänge in den Wurzelkanal eingebracht werden kann, muss sie kleiner als der Durchmesser der apikalen Präparation sein (Chow 1983; Hsieh et al. 2007). Für die meisten Spülkanülen muss ein Wurzelkanal dazu mindestens auf Größe 35-40 präpariert werden (Hsieh et al. 2007; Miller und Baumgartner 2010; Munoz und Camacho-Cuadra 2012; Ram 1977). Mit zunehmender apikaler Größe der Präparation steigt die Effektivität des Volumenaustauschs der Wurzelkanalspülung und damit die Desinfektionswirkung (Albrecht et al. 2004; Bronnec et al. 2010; Card et al. 2002; Hsieh et al. 2007; Usman et al. 2004; van der Sluis et al. 2005; 2007). Die Benutzung von dünnen Spülnadeln führt generell zu einem effizienteren Flüssigkeitsaustausch und damit zu einer besseren Reinigung, weil sie aufgrund ihrer größeren Flexibilität auch in gekrümmte Kanäle ausreichend weit apikal inseriert werden können, der rückfließenden Flüssigkeit wenig

Widerstand entgegensetzen und somit ein Abfluss nach koronal gewährleistet ist (Chow 1983; Sedgley et al. 2005).

2.7 Kultivierung als Nachweismethode

Die Methodik der Bakterienkultivierung entspricht dem sogenannten *microbiological root canal sampling* (MRS). Prinzipiell werden bei dieser Methode Bakterien auf Blutagnährböden ausgestrichen, kultiviert und nach einem bestimmten Zeitraum die bis dahin gebildeten Bakterienkolonien ausgewertet. Diese Nachweismethode ist in *In-vivo*-Studien allgemein anerkannt und verbreitet, um die Effektivität einer endodontologischen Maßnahme in der Behandlung infizierter Wurzelkanäle zu ermitteln (Dalton et al. 1998; Molander et al. 1998; Pinheiro et al. 2003; Sundqvist et al. 1998). Ihre Aussagekraft wird dennoch durch eine geringe Sensitivität limitiert (Siqueira und Rôças 2009; Siqueira et al. 2007). Falsch-negative Kultivierungsergebnissen entstehen, wenn die Bakterien zum Zeitpunkt der Probenentnahme gerade nicht kultivierbar waren (Inhibition durch Desinfektionsmittel, Füllungsmaterial oder Nahrungskarenz) beziehungsweise in zu geringer Menge vorlagen (Rolph et al. 2001; Siqueira et al. 2007).

Wie zuerst von Möller (1966) beschrieben, ist die Kultivierung von Mikroorganismen unter möglichst aseptischen Bedingungen durchzuführen. Dazu gehören die gründliche Reinigung aller Zähne vor der Prüfkörperherstellung und eine möglichst kurze und sterile Aufbewahrung der autoklavierten Prüfkörper bis zur Versuchsdurchführung. Außerdem muss das Operationsgebiet vor Versuchsbeginn möglichst effektiv desinfiziert werden, da auf diese Weise falsch-positive Ergebnisse vermieden werden.

2.8 Ziel der Studie

Obwohl aktuelle chemo-mechanische Techniken eine deutliche Reduktion der Bakterienbelastung im Endodont bewirken, wird dennoch keine vollständige Desinfektion des gesamten Kanalsystems erzielt (Card et al. 2002; Dalton et al. 1998; Hülsmann et al. 2003a; Miller und Baumgartner 2010; Pataky et al. 2002; Siqueira et al. 2007; 1999). Im Wurzelkanal verbleibende Mikroorganismen erhöhen jedoch nachweislich das Risiko eines Behandlungsmisserfolges (Bergenholtz und Spangberg 2004; Fabricius et al. 2006; Nair 2006; Siqueira 2001; Waltimo et al. 2005). Deswegen zielen aktuelle Forschungsansätze und Spülmethode auf eine stetige Verbesserung der Desinfektionswirkung im Rahmen der endodontischen Behandlung ab (Brito et al. 2009; Ng et al. 2011; Siqueira und Rôças 2008).

Das Ziel der vorliegenden *In-vitro*-Studie ist der Vergleich der antimikrobiellen Wirksamkeit von vier verschiedenen Wurzelkanalspültechniken (konventionelle statische Handspülung, passive Ultraschallspülung (PUI) in der *Intermittent-Flush*-Methode, EndoVac®-System, RinsEndo®-System) auf einen intrakanalären *Enterococcus faecalis*-Biofilm.

3 Material und Methoden

Dem Versuchsaufbau dieser Studie lag der Versuchsaufbau zur Herstellung infizierter Wurzelkanäle von Haapasalo und Ørstavik (1987) zugrunde, der den Anforderungen der vorliegenden Studie entsprechend modifiziert wurde .

3.1 Auswahl und Vorbereitung der Zähne

Für diese *In-vitro*-Studie wurden 70 einwurzelige, menschliche Prämolaren und Inzisiven der bleibenden Dentition verwendet, die keine endodontische Behandlung aufwiesen. Die frisch extrahierten Zähne wurden bis zur Probenherstellung in einer Mischung aus Leitungswasser und Thymol aufbewahrt.

Eine Lagerung in Wasser erfolgte während der gesamten Studie, um ein Austrocknen der Prüfkörper zu verhindern. Alle Zähne, die den Einschlusskriterien aus Tabelle 3.1 nicht entsprachen, wurden verworfen und durch neue ersetzt.

- Einwurzelig
- Gerade Wurzel
- Ein Wurzelkanal
- Intakter Apex mit abgeschlossenem Wurzelwachstum
- Keine endodontische Vorbehandlung
- Wurzellänge ≥ 15 mm
- Initialer Querschnitt des Wurzelkanallumens $< \text{ISO } 20$

Tab. 3.1 Einschlusskriterien für die Auswahl der Versuchszähne

Vor der Probenherstellung wurden die Zähne eine Stunde in NaOCl 1% (Hedinger, Stuttgart) eingelegt, um Gewebereste und Debris von der Wurzeloberfläche zu entfernen. Anschließend erfolgte eine gründliche Reinigung der Wurzeloberfläche mithilfe eines Ultraschallansatzes (KaVo Dental, Biberach).

Die gesäuberten Zähne wurden unter Wasserkühlung an einem S-U-SuperCut-Trimmer (Schuler Dental, Ulm) mit einer Schleifscheibe für Schliffpräparate von koronal auf eine Wurzellänge von 15 mm gekürzt. Unter Zuhilfenahme eines Reamers der ISO-Größe 10 (VDW, München) wurde währenddessen die apikale Gängigkeit der Wurzelkanäle bis zur festgelegten Arbeitslänge von 14 mm überprüft.

Als nächstes wurde der koronale Anteil des Wurzelkanals mit einem Diamantschleifer erweitert, um eine standardisierte, zylindrische Zugangskavität mit einer Tiefe von 3 mm und einem Durchmesser von 2,5 mm zu schaffen. Dies sollte einen vereinfachten Zugang zum

Wurzelkanal ermöglichen und ein Reservoir für einen effektiveren Volumenaustausch der Spülflüssigkeit während der Aktivierung gewährleisten.

3.2 Präparation der Wurzelkanäle und Herstellung der Prüfkörper

Im Anschluss erfolgte eine standardisierte maschinelle Präparation der Wurzelkanäle mit FlexMaster®-NiTi-Instrumenten (VDW) unter Anwendung der Crown-down-Technik bis zu einer apikalen Größe von 40/.02. Dieser Präparationsquerschnitt wurde gewählt, damit ein ungehindertes Eindringen aller Spülkanülen auf Arbeitslänge ohne Friktion möglich war. Das Präparationsprotokoll ist in Tabelle 3.2 dargestellt.

Instrument	Eindringtiefe der Instrumente
FM 30/.06	AL – 6 mm
FM 25/.06	AL – 4 mm
FM 20/.06	AL – 2 mm
FM 30/.04	AL
FM 35/.02	AL
FM 40/.02	AL

Tab. 3.2 Präparationsprotokoll mit FlexMaster®-NiTi-Instrumenten (FM);
AL = Arbeitslänge 14 mm

Um eine Verblockung der Wurzelkanäle zu verhindern, wurden sie zwischen jedem Instrumentenwechsel mit Endo-Eze® Tips mit einem Außendurchmesser von 0,3 mm (Ultradent, München) und je 2 ml NaOCl (1%) gespült. Mit einem Reamer der ISO-Größe 10 wurde außerdem überprüft, ob die Arbeitslänge noch erreicht wurde.

Im Anschluss an die Wurzelkanalpräparation erfolgte eine Abschlusspülung mit 5 ml 17%igem EDTA (Calcinase; lege artis, Dettenhausen) und 5 ml 1%igem NaOCl (Hedinger) für je zwei Minuten pro Zahn. Damit wurden sowohl organische Gewebereste als auch die während der Präparation entstandene Schmierschicht beseitigt. Abschließend erfolgte zur Verbesserung der Schmierschichtentfernung ein Einlegen der Zähne in ultraschallaktiviertem EDTA (17%) für insgesamt zwei Minuten.

Zehn der 70 vorbereiteten Wurzeln wurden randomisiert ausgewählt und unabhängig von den restlichen Prüfkörpern weiteren Vorbereitungsmaßnahmen zur Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop (REM) unterzogen. Nach der Aufteilung in zwei REM-Gruppen bestanden diese aus je fünf Zähnen, die nach der Dekoronation, Präparation und Entfernung der Schmierschicht autoklaviert und steril aufbewahrt wurden. Im weiteren Verlauf erfolgten in der ersten Gruppe dieselben Vorbereitungsmaßnahmen wie in der Negativkontrollgruppe, in der zweiten REM-Gruppe dieselben wie in der Positivkontrollgruppe. Allerdings wurden die beiden Gruppen nicht in Kunststoff eingebettet

und statt der Kultivierung auf Blutagar-nährböden einer Längsspaltung der Wurzelhälften und einer anschließenden Fixierung in einer Fixationslösung aus Glutaraldehyd 25%, Paraformaldehyd 25%, 0,2 M Phosphatpuffer und Aqua bidest zugeführt.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des koronalen, mittleren und apikalen Wurzelmittels dienten dem Nachweis einer effektiven Schmierschichtentfernung sowie des bakteriellen Biofilms bei 1000- und 5000-Facher Vergrößerung.

Die übrigen 60 Wurzeln wurden apikal mit einem Tropfen fließfähigen Komposits (Flow A3, Dentsply, Konstanz) verschlossen, um ein späteres Einfließen des Kunststoffes und somit eine Verblockung des Wurzelkanals zu verhindern. Im Anschluss wurden die Wurzeln in selbst hergestellten, zylindrischen Aluminiumformen in den zähflüssig angerührten Prothesenkunststoff Paladur (Heraeus Kulzer GmbH, Hanau) eingebettet, um eine einfache Handhabung, ausreichende Dichtigkeit und Kontaminationsfreiheit der Proben nach der Autoklavierung sicherzustellen.

Nach der vollständigen Aushärtung des Kunststoffes war die Herstellung der Prüfkörper, die der Kultivierung zugeführt werden sollten, abgeschlossen.

3.3 Gruppeneinteilung und Autoklavierung der Prüfkörper

Die Verteilung auf die einzelnen Versuchs- und Kontrollgruppen erfolgte randomisiert. Eine Übersicht über die Gruppeneinteilung zeigt Tabelle 3.3. Für ein übersichtliches und sauberes Arbeiten wurden alle Zähne einer Gruppe in ein autoklavierbares, verschließbares Döschen gegeben und letzteres entsprechend der Gruppenzugehörigkeit beschriftet.

	Anzahl der Prüfkörper (n = 70)
Versuchsgruppen	
• <i>Handspülung</i> (Endo-Eze® Tips)	10
• <i>Ultraschall</i> (VDW.ULTRA)	10
• <i>EndoVac</i> ® (SybronEndo)	10
• <i>RinsEndo</i> ® (Dürr Dental)	10
Kontrollgruppen	
• <i>Positiv</i>	10
• <i>Negativ</i>	10
REM-Gruppen	
• <i>Biofilmnachweis nach 72 h Inkubation</i>	5
• <i>Kontrolle der Schmierschichtentfernung</i>	5

Tab. 3.3 Gruppeneinteilung der Prüfkörper

Jede Versuchsgruppe wurde während des Desinfektionsvorgangs mit einem der vier untersuchten Spülsysteme nach einem festgelegten Spülprotokoll (siehe Tabelle 3.4) behandelt. Die Negativkontrollgruppe wurde weder infiziert noch desinfiziert; die Positivkontrollgruppe wurde mit *E. faecalis* infiziert, jedoch nicht desinfiziert. Zusätzlich zu den beiden Kontrollgruppen, die mikrobiologisch untersucht wurden, wurden zehn weitere Prüfkörper für die REM-Untersuchung verwendet. Entweder wurde damit die Schmierschichtentfernung nach der fertigen Wurzelkanalpräparation nachgewiesen oder der *E. faecalis*-Biofilm nach einer Inkubationszeit von 72 h.

Vor der Impfung mit *E. faecalis* wurden die von der Lagerung in Wasser noch feuchten, aber nicht mehr mit Wasser gefüllten Prüfkörper der Versuchsgruppen 20 Minuten bei 121 °C im Bioclav (KSG, Olching) autoklaviert. Um die Sterilität der Proben bis zur Infektion mit *E. faecalis* sicherzustellen, wurden diese steril verpackt und unmittelbar der weiteren Behandlung unterzogen.

3.4 Vorbereitung des Bakterienstamms

Enterococcus faecalis (AT CC 29212) wurde als Reinkultur mit einer 10- μ l-Impfschlinge (Sarstedt, Nümbrecht) in 10 ml BHI (Hirn-Herz-Glucose-Bouillon, OXOID Deutschland GmbH, Wesel) inokuliert und 24 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Durch eine 24-stündige, aerobe Kultivierung bei 37 °C auf einem Agarnährboden mit Columbia und 5% Schafsblut (bioMérieux, Nürtingen) und die anschließende morphologische Überprüfung der Bakterienkolonien wurde die Reinheit der Suspension sichergestellt.

Vor der Infektion der Prüfkörper wurde die *E. faecalis*-Suspension mit einem Spektrophotometer (BioPhotometer plus; Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm auf eine Extinktion von 0,3 verdünnt. Dies stellte eine vergleichbare Bakterienmenge in allen Infektionslösungen sicher. Die Verdünnung wurde mit einer 1000- μ l-Pipette (Eppendorf) und reiner BHI vorgenommen. Von Beginn der Verdünnung bis einschließlich der Impfung der Proben wurde die Lösung durchgehend in einem sterilen Becherglas mit einem Magnetrührer (IKAMAG® REO, Staufen) gerührt. Damit lag jederzeit ein homogenes Mischungsverhältnis vor.

3.5 Infektion der Wurzelkanäle

Die Infektion der Wurzelkanäle aller Versuchsgruppen einschließlich der Positivkontrollgruppe erfolgte unter aseptischen Bedingungen an einer Sterilbank ThermoScientific (Heraeus Instruments, Hanau). Diese und alle sonstigen nicht-autoklavierbaren Gegenstände wurden vor ihrer Verwendung mit 70%igem Ethylalkohol

gereinigt. Alle Arbeitsschritte wurden unter dem Tragen von Sicherheitskleidung (Laborkittel, Mundschutz, Schutzbrille, Latexhandschuhe) durchgeführt.

Mit Ausnahme der Negativkontrollgruppe, deren Wurzelkanäle nur mit reiner BHI gefüllt wurden, wurden alle anderen Versuchsgruppen mit *Enterococcus faecalis* beimpft.

Die Impfung der Prüfkörper erfolgte mit der zuvor mittels Spektrophotometer eingestellten Suspension über sterile Spülnadeln (Endo-Eze® Tips; Ultradent) auf Arbeitslänge und bis zum oberen Rand der zylindrischen Zugangskavität. Die anschließende Inkubation der Wurzelkanäle wurde im Brutschrank bei 37 °C über 72 Stunden durchgeführt, wobei nach 24 und 48 Stunden die nach dem oben beschriebenen Prinzip erstellte Impfflüssigkeit in gleicher Weise im Wurzelkanal erneuert wurde.

3.6 Desinfektion der Wurzelkanäle

Nach der dreitägigen Inkubationszeit wurden die desinfizierenden Maßnahmen nach festgelegten Spülprotokollen durchgeführt (siehe Tabelle 3.4). Bei allen Versuchsgruppen wurde als Spülflüssigkeit 1%iges NaOCl mit einer standardisierten Einwirkdauer von drei Minuten verwendet. Die Positivkontrollgruppe wurde mit *E. faecalis* infiziert, jedoch ausschließlich mit steriler Kochsalzlösung mithilfe einer Endo-Eze® Tip (Ultradent) an einer Einwegspritze gespült. Die Eindringtiefe der Spülnadel und das verwendete Spülvolumen wurden, soweit möglich, standardisiert, wobei die Spülvolumina beim EndoVac®- und RinsEndo®-System herstellerbedingt vorgegeben und nicht veränderbar waren.

Am Ende des jeweiligen Spülprotokolls erfolgte eine abschließende Spülung des entsprechenden Wurzelkanals mit 2 ml steriler Kochsalzlösung (0,9%; Braun, Melsungen), um die Einwirkzeit von NaOCl (1%) auf drei Minuten zu begrenzen.

Die Prüfkörper der Negativkontrollgruppe (n = 10) wurden weder infiziert noch desinfiziert.

	Eindringtiefe (mm)	Spülzyklus (je 3 mal)	Spülflüssigkeit	Zeit (min)	Volumen (ml)
Hand (n = 10)	AL - 1 mm	30 s spülen 30 s einwirken	NaOCl (1%)	3	6
Ultraschall (n = 10)	AL - 1 mm	30 s aktivieren 30 s spülen	NaOCl (1%)	3	6
EndoVac® (n = 10)	AL	Mikrozyklus à 30 s 30 s einwirken	NaOCl (1%)	3	6
RinsEndo® (n = 10)	AL - 3 mm	30 s aktivieren 30 s einwirken	NaOCl (1%)	3	18
Positiv (n = 10)	AL - 1 mm	30 s spülen 30 s einwirken	NaCl (0,9%)	3	6

Tab. 3.4 Spülprotokolle der Versuchsgruppen; AL = Arbeitslänge 14 mm, NaOCl (Natriumhypochlorit)

Handspülung

Für die Handspülung (n = 10) wurde eine Endo-Eze® Tip (Ultradent) an einer Einwegspritze verwendet. Jeder Wurzelkanal wurde drei Minuten lang statisch mit insgesamt 6 ml NaOCl (1%) gespült, wobei die Spülkanüle auf AL - 1 mm inseriert war.

Bei jeder Spülung wurden drei Spülzyklen angewendet, wobei ein Spülzyklus aus jeweils 30 Sekunden Spülzeit und 30 Sekunden Einwirkzeit bestand.

Ultraschallspülung

Die Ultraschallspülgruppe (n = 10) wurde mit dem Ultraschallgerät VDW.ULTRA (VDW) und einer nicht-schneidenden Feile (IRRI K Länge 25, ISO-Größe 15) entsprechend der Herstellerangaben für eine Wurzelkanalspülung auf 30% der maximalen Geräteintensität behandelt.

Auch hier wurde die Gesamtspülzeit auf drei Minuten und das Gesamtvolumen auf 6 ml NaOCl (1%) standardisiert.

Bei der *Intermittent-Flush*-Methode erfolgte nach jeder Aktivierungsphase eine Spülung des Wurzelkanals mit einer Endo-Eze® Tip (Ultradent) und einer Einwegspritze auf AL - 1 mm.

Ein Zyklus bestand aus je 30 Sekunden Aktivierung, gefolgt von 30 Sekunden Spülung.

EndoVac®

Dem Protokoll einer Abschlusspülung folgend wurden in dieser Studie nur die Master Delivery Tip (MDT) und die Mikrokanüle des EndoVac®-Systems (SybronEndo) verwendet.

Das Spülprotokoll bestand aus drei Zyklen. Ein Zyklus beinhaltete dabei drei Mikrozyklen à 30 Sekunden und dazu intermittierend drei Einwirkzyklen à 30 Sekunden. Die detaillierte Durchführung eines Mikrozyklus ist in Tabelle 3.5 beschrieben.

Aufteilung des Mikrozyklus	Eindringtiefe der Mikrokanüle
6 s auf AL	14 mm
6 s auf AL – 2 mm	12 mm
6 s auf AL	14 mm
6 s auf AL – 2 mm	12 mm
6 s auf AL	14 mm

Tab. 3.5 Mikrozyklus des EndoVac®-Systems (Nielsen und Baumgartner 2007);
AL = Arbeitslänge 14mm

Bei einer in dieser Studie standardisierten Gesamtspülzeit von 3 Minuten betrug das Volumen 6 ml.

RinsEndo®

Um den Druck während des Spülvorgangs konstant zu halten, wurde dem System ein Druckregulator vorgeschaltet, der einen konstanten Druck von 3,5 bar während der gesamten Spülzeit gewährleistete.

Da die Spülzeit pro Wurzelkanal in der gesamten Studie auf 3 Minuten standardisiert war und das RinsEndo®-System einen sich bei diesem Druck ergebenden Flüssigkeitsdurchsatz von etwa 6 ml pro Minute hat, wurde für jeden Prüfkörper dieser Gruppe eine 20 ml Spritze mit NaOCl (1%) gefüllt und angeschlossen. Der Außendurchmesser der Spülnadel betrug 0,45 mm. Die Eindringtiefe der Spülnadel wurde auf AL - 3 mm festgelegt.

Das Gesamtpülvolumen pro Wurzelkanal verteilte sich gleichmäßig auf je drei Zyklen. 30 Sekunden Aktivierung wurden von 30 Sekunden Einwirkzeit abgelöst.

Positivkontrollgruppe

Um die rein mechanische Wirkung der Wurzelkanalspülung auf den Biofilm zu vernachlässigen, wurden die zehn Prüfkörper der Positivkontrollgruppe nach dem gleichen Spülprotokoll wie die Handspülgruppe drei Minuten lang mit 6 ml steriler Kochsalzlösung (0,9%) gespült. 30 Sekunden Spülzeit wechselten sich mit 30 Sekunden Einwirkzeit ab.

Zusätzlich zu der im nächsten Kapitel beschriebenen Kultivierung der zehn Positivkontrollprüfkörper erfolgte die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung fünf weiterer Prüfkörper dieser Gruppe, um einen Nachweis des *E. faecalis*-Biofilms nach 72 h Inkubation zu erbringen.

Negativkontrollgruppe

Die Negativkontrollgruppe diente einerseits zum Nachweis der Effektivität des Reinigungs- und Sterilisationsprozesses und andererseits sollte sie eine kontaminationsfreie Vorgehensweise während der gesamten Studie belegen.

Rasterelektronenmikroskopie zum Biofilmnachweis

Die Proben für den rasterelektronenmikroskopischen Nachweis des bakteriellen Biofilms (n = 5) wurden gemäß Kapitel 3.5 mit *Enterococcus faecalis* infiziert und insgesamt 72 Stunden bei 37 °C aerob inkubiert. Anschließend wurden an den fünf Wurzeln zum Nachweis des Biofilms mit einem Stift vertikale Hilfslinien angebracht und ein farbiger Guttaperchastift der ISO-Größe 30 in den Wurzelkanal inseriert. Dieses Vorgehen ermöglichte eine symmetrische Halbierung der Zähne mit einer rotierenden diamantierten Trennscheibe (Dicke 0,3 mm; Horico, Berlin). An den vertikalen Markierungen wurden die Wurzeln nur so tief getrennt, bis der farbige Guttaperchastift durch die Dentinwand erkennbar war. Die Längsspaltung der Wurzeln in zwei Hälften erfolgte mit einem sterilen Hebel nach Bein. Die Wurzelhälften wurden anschließend mit einer sterilen Pinzette in drei Gläsern mit jeweils 50 ml

physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) geschwenkt und unter einem Abzug 24 Stunden lang bei 4 °C in eine Fixationslösung aus in Phosphat-gepuffertem 1,5%igem Glutaraldehyd (pH7,3) eingelegt. Die Menge der Fixationslösung entsprach dabei dem 40-Fachen des Probenvolumens.

Die darauffolgende Entwässerung und Trocknung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur in einer aufsteigenden Alkoholreihe um 10% je Schritt, beginnend bei 70% bis 100%. Die angewandte Methode war die sogenannte *criticle point drying*-Methode (CPD). Nach der Trocknung wurden die Wurzelhälften auf Metallpins geklebt.

Die Leitfähigkeit wurde in einem Sputter (SEM Coating System, Fisons Instruments, East Sussex, UK) durch ein halbstündiges Bedampfen der Proben mit Gold-Palladium in einer Argon-Atmosphäre hergestellt. Die Schichtdicke betrug etwa 40-48 nm.

Anschließend wurden die derart vorbereiteten Wurzelkanäle im Rasterelektronenmikroskop (DSM 960; Carl Zeiss AG, Oberkochen) betrachtet. Zur Dokumentation wurden bei 500-facher Vergrößerung Fotografien der Wurzelhälften erstellt.

Rasterelektronenmikroskopie zum Nachweis der Schmierschichtentfernung

Nach der Präparation und Autoklavierung der Prüfkörper erfolgte die Längsspaltung der Proben (n = 5) bei diesen Wurzeln wie zuvor beschrieben. Danach wurden alle Wurzelhälften dieser Gruppe mit der Außenseite auf dafür vorgesehene Metallpins geklebt. Anschließend trockneten die Proben 24 Stunden lang im Brutschrank bei 37 °C und wurden dann in ein steriles Transportbehältnis verpackt. Die Aufnahme der REM-Fotografien erfolgte wie bereits im letzten Absatz beschrieben allerdings in 5000-facher Vergrößerung.

3.7 Probengewinnung und Kultivierung

Nach der Desinfektion erfolgte die Trocknung der Wurzelkanäle mit sterilen Papierspitzen der ISO-Größe 40 und die anschließende Probenentnahme im leicht feuchten Wurzelkanal mittels zirkumferenter Instrumentierung der Kanalwand mit drei sterilen Hedström-Feilen der ISO-Größen 40, 45 und 50 (VDW). Die auf diese Weise gewonnenen Dentinspäne wurden durch Übertragung der drei Instrumente in ein für jede Wurzel eigenes Eppendorf-Cup der Größe 2 ml (Eppendorf AG) mit 500 µl steriler Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gesammelt. Die anfänglich zur Trocknung des jeweiligen Wurzelkanals verwendete Papierspitze wurde ebenfalls in das zugehörige Eppendorf-Cup gegeben.

Anschließend wurde das Eppendorf- Gefäß verschlossen und der Inhalt 20 Sekunden lang auf einem Vortexmischgerät (Vortex-Genie 2, Scientific Industries; Bohemia, USA) geschüttelt. Die Hedström-Feilen wurden mit einer keimfreien Pinzette aus dem Eppendorf-Cup entnommen und die Proben direkt vor der Impfung der Platten erneut 5 Sekunden lang mit dem Vortex-Gerät durchmischt.

Um das anschließende Auszählen der Kolonien auf den Blutagnährböden zu vereinfachen, wurden die Proben der Positivkontrollgruppe mit sterilem NaCl (0,9%) im Verhältnis 1:200 verdünnt. Die restlichen Proben blieben unverdünnt.

Von jeder Probe wurden je 25 µl Aliquot mit einer geeichten Eppendorf-Pipette (Eppendorf) auf drei vorher beschriftete Blutagarplatten mit Columbia und 5% Schafsblut (bioMérieux, Nürtingen) geimpft und mit einem Plattierungsspatel (Sarstedt, Nümbrecht) verstrichen. Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung plattiert.

Die Nährböden wurden anschließend bei 37 °C 24 Stunden lang kultiviert und die Anzahl sichtbarer *colony forming units* (CFU) ausgezählt.

Das Flussdiagramm aus Abbildung 3.1 zeigt einen Überblick über den Versuchsaufbau.

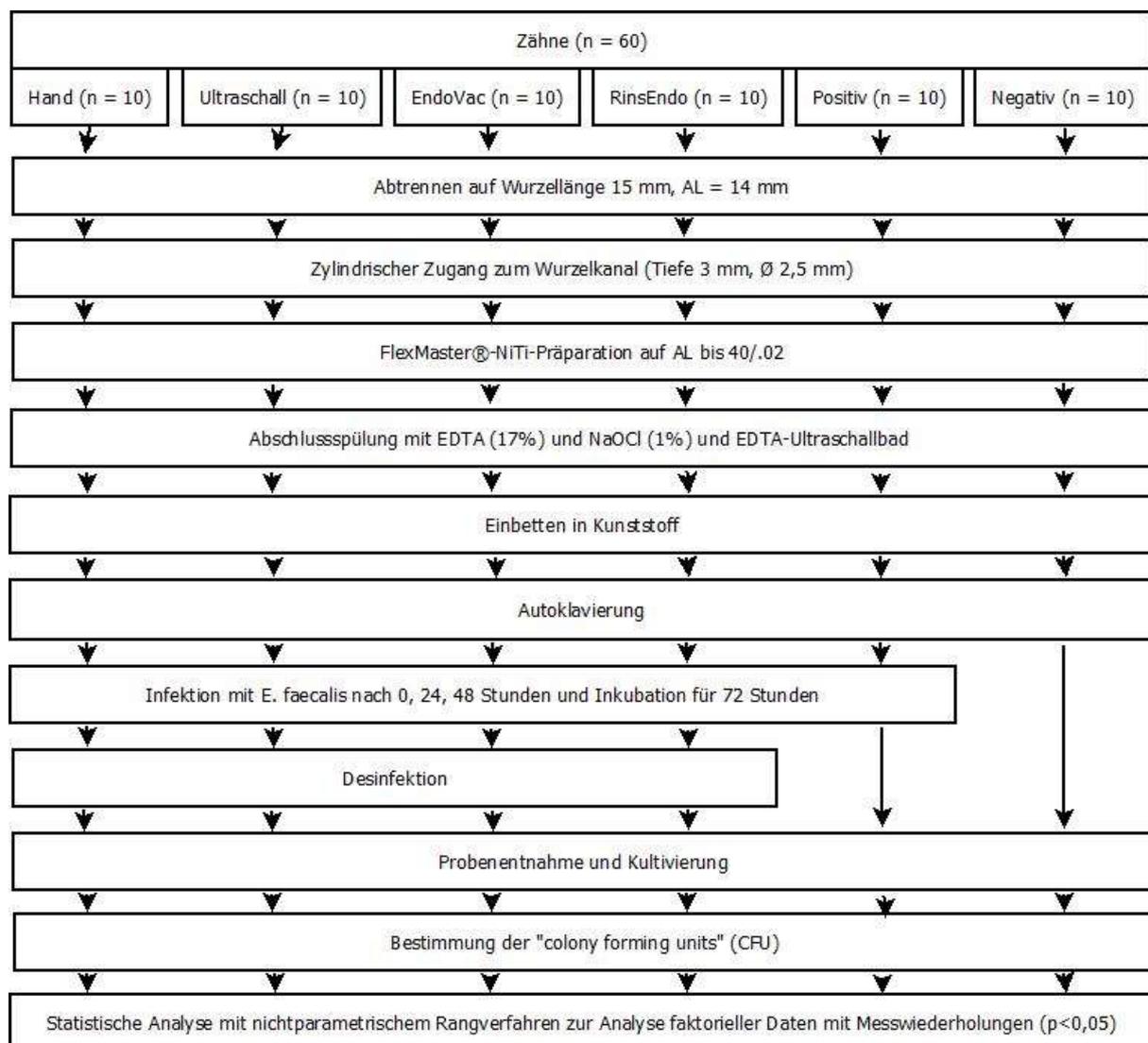


Abb. 3.1 Flussdiagramm des Versuchsaufbaus

3.8 Statistische Auswertung

In den sechs Versuchsgruppen erfolgte die Auswertung von jeweils 30 Proben. Je drei Proben stammten dabei aus demselben Prüfkörper. Eine Probe bestand aus der Zahl der nach 24 Stunden Inkubation auf einer Blutagarplatte sichtbaren CFU. Die auf diesem Weg ermittelten Daten wurden für die elektronische Auswertung in eine Excel®-Tabelle (Microsoft Excel® für Windows 7, Version 10; Washington, USA) übertragen. Die Ergebnisse der Positivkontrollgruppe, die zum Auszählungszeitpunkt im Verhältnis 1:200 verdünnt waren, wurden zuvor hochgerechnet. Bei den vier experimentellen Gruppen wurde keine Verdünnung vorgenommen. Die statistische Analyse erfolgte mit SAS® Macro (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), das Erstellen der Graphen und Tabellen mit Microsoft Excel® und Statistica Version 10 (StatSoft GmbH, Hamburg).

Da den Daten ein einfaktorieller Versuchsaufbau zugrunde lag, wobei jeder Zahn dreifach unter jeder Bedingung gemessen wurde und weil diese Triplets nicht notwendigerweise unabhängig waren, wurde zur statistischen Analyse ein nichtparametrisches Rangverfahren zur Analyse faktorieller Daten mit Messwiederholungen (Brunner et al. 2002) herangezogen. Die Signifikanzwerte wurden durch multiple Paarvergleiche unter Adjustierung des Niveaus nach Tukey bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

Es galt im Rahmen der statistischen Analyse die folgenden zwei Fragestellungen zu beantworten:

- 1) Waren die vier Spülprotokolle im Vergleich zur Positivkontrollgruppe in der Lage, eine signifikante Bakterienreduktion zu bewirken?
- 2) Gab es zwischen den vier Spülmethoden signifikante Unterschiede in der antibakteriellen Wirksamkeit?

4 Ergebnisse

4.1 Kultivierung

Die Nährböden aller infizierten Versuchsgruppen - sowohl der Positivkontrollgruppe als auch der vier Spülmethoden - waren zum Zeitpunkt der Auszählung ausnahmslos mit *E. faecalis*-Stämmen besiedelt und enthielten pro Agarplatte mindestens eine CFU. Demnach eliminierte keine der vier untersuchten Desinfektionsgruppen *E. faecalis* vollständig aus den Wurzelkanälen.

Alle Stichproben der Negativkontrollgruppe verzeichneten kein bakterielles Wachstum. Die in der Positivkontrolle durchgeführte Verdünnung wurde im Vorfeld durch Hochrechnung bereinigt.

Absolute Keimzahlen

In Tabelle 4.1 sind Mittelwerte, Medianwerte, Minima und Maxima der jeweiligen Versuchsgruppe in *colony forming units* (CFU) dargestellt. Die Spalte "Positivkontrolle" enthält die CFU-Werte derjenigen Gruppe, bei der die Wurzelkanäle infiziert, jedoch nicht desinfiziert wurden. Diese Gruppe diente als Vergleichsgruppe, da anzunehmen ist, dass die Bakterienzahl der übrigen experimentellen Gruppen vor Beginn der desinfizierenden Maßnahmen in einem mit der Positivkontrolle vergleichbaren Bereich lagen. Der Bereich der CFU in der Positivkontrolle liegt insgesamt deutlich höher als derjenige der vier Spülmethoden, siehe dazu den Boxplot in Abbildung 4.1.

In [CFU]	Handspülung	Ultraschall	EndoVac®	RinsEndo®	Positivkontrolle	Negativkontrolle
Mittelwert	545	1081	1457	628	116360	0
Medianwert	207	147	740	155	120500	0
Maxima	2046	4310	4301	2783	198600	0
Minima	4	1	4	5	53000	0
n	30	30	30	30	30	30

Tab. 4.1 Mittelwerte, Medianwerte, Maxima und Minima der CFU pro Versuchsgruppe; n= Gruppenstärke, CFU= *colony forming units*

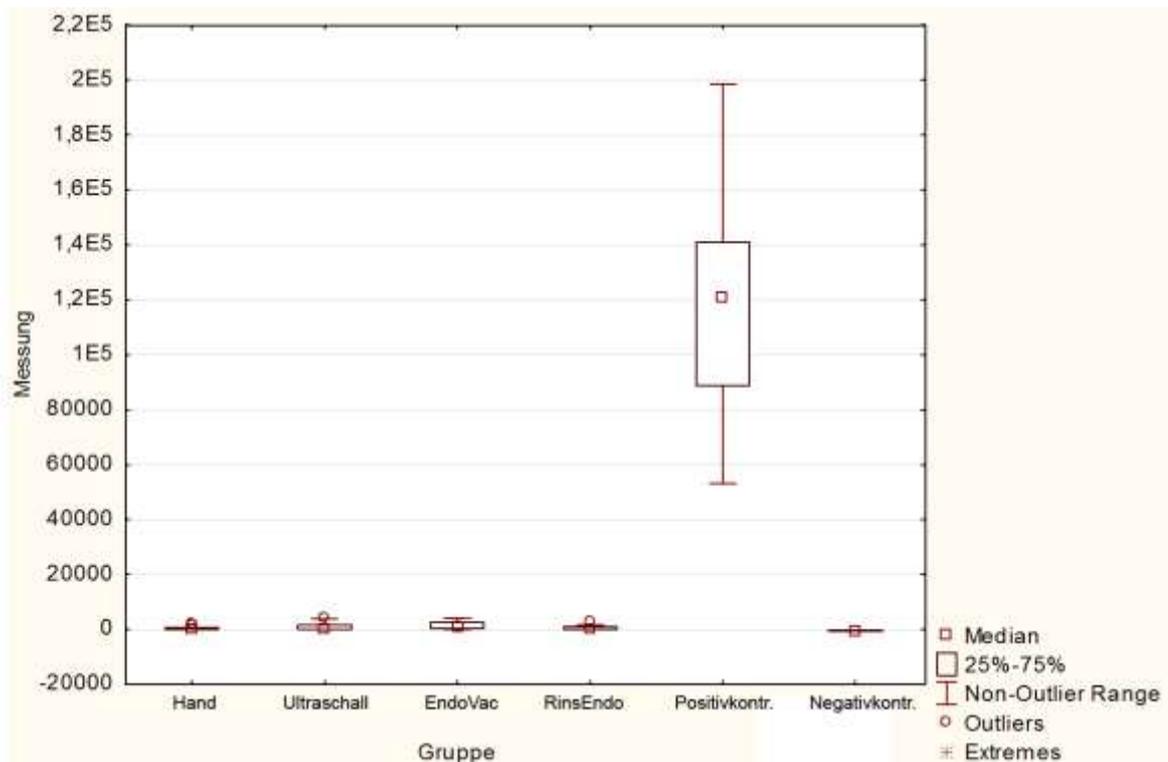


Abb. 4.1 Boxplot der hochgerechneten Anzahl der *colony forming units* (CFU) auf die Nährböden aller Versuchsgruppen

Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit einem nichtparametrischen Rangverfahren ausgewertet. Die unterliegenden Behandlungseffekte sind sogenannte relative Effekte (RTE). Sie beschreiben die Wahrscheinlichkeit, dass eine beliebig ausgewählte Beobachtung einer Gruppe i zu einem größeren Wert als eine beliebig ausgewählte Messung aus der gesamten Studie tendiert. Falls $RTE_i < RTE_j$ gilt, sind die Daten in Gruppe i tendenziell kleiner als die Daten in Gruppe j . Falls $RTE_i = RTE_j$ gilt, so sind die Messungen in den Gruppen i und j tendenziell gleich groß.

	Rangmittelwert	n	RTE
Handspülung	54,367	10	0,3591111
Ultraschall	58,350	10	0,3856667
EndoVac®	75,450	10	0,4996667
RinsEndo®	53,833	10	0,3555556
Positivkontrolle	135,50	10	0,9

Tab. 4.2 Betrachtung der relativen Effekte; RTE= relative Effekte, n=Nobs= total number of observations

Aus Tabelle 4.2 wird ersichtlich, dass die Messungen der Gruppe "RinsEndo[®]" tendenziell am kleinsten sind und diejenigen der Gruppe "Positivkontrolle" tendenziell am größten. Des Weiteren sind die Messungen der Gruppe "RinsEndo[®]" < Gruppe "Handspülung" < Gruppe "Ultraschall" < Gruppe "EndoVac[®]" < Gruppe "Positivkontrolle".

Die Hypothese, dass die Verteilung der Messwerte in den vier Spülgruppen und in der Positivkontrollgruppe gleich ist, wurde mit einer ANOVA-Typ-Statistik für faktorielle Longitudinaldaten überprüft und ergab einen p-Wert von 0,00001. Das bedeutet, dass bezogen auf die Verteilung der Messwerte ein signifikanter Unterschied zwischen den fünf Gruppen besteht.

Effektivität der vier Wurzelkanalspülmethoden im Vergleich zur Positivkontrollgruppe

Die Durchführung von multiplen Paarvergleichen unter Adjustierung des Niveaus nach Tukey ergab die p-Werte in Tabelle 4.3 und 4.4.

Paarvergleich	p-Wert
<i>Positivkontrolle versus Handspülung</i>	< 0,0001
<i>Positivkontrolle versus EndoVac[®]</i>	<0,0001
<i>Positivkontrolle versus RinsEndo[®]</i>	< 0,0001
<i>Positivkontrolle versus Ultraschall</i>	< 0,0001

Tab. 4.3 Paarvergleiche der Positivkontrollgruppe mit den vier Spülgruppen

Damit die Ergebnisse mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit als richtig akzeptiert werden können, darf die Fehlerwahrscheinlichkeit höchstens 5% betragen. Das bedeutet, dass im Paarvergleich nur p-Werte kleiner als 0,05 statistisch signifikante Unterschiede liefern. Aus Tabelle 4.3 lässt sich demnach ablesen, dass alle vier Spülsysteme einen statistisch signifikanten Unterschied zur Positivkontrollgruppe aufweisen. "Fragestellung 1" aus Kapitel 3.8 ist damit beantwortet. Die Kombination aus der desinfizierenden Spüllösung NaOCl und der jeweiligen Spülmethode war in allen vier Fällen in der Lage, die Bakterienmenge im Vergleich zur Positivkontrollgruppe statistisch signifikant zu reduzieren.

Vergleich der antimikrobiellen Effektivität der vier Wurzelkanalspülmethoden

Bezogen auf die vier Spülsysteme ergaben sich unter Berücksichtigung aller Kombinationsmöglichkeiten sechs Paarvergleiche. Deren p-Werte sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

Paarvergleich	p-Wert
<i>Handspülung versus EndoVac®</i>	0,1608
<i>Handspülung versus RinsEndo®</i>	0,9712
<i>Handspülung versus Ultraschall</i>	0,8078
<i>EndoVac® versus RinsEndo®</i>	0,1524
<i>EndoVac® versus Ultraschall</i>	0,3047
<i>RinsEndo® versus Ultraschall</i>	0,7835

Tab. 4.4 Paarvergleiche der verschiedenen Spülprotokolle

Hinsichtlich der antimikrobiellen Effektivität bestand zwischen den vier verschiedenen Spülprotokollen kein statistisch signifikanter Unterschied.

4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Nachweis der Schmierschichtentfernung vor der Inkubation mit *E. faecalis*

Abb. 4.2 zeigt die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der 500-Fach vergrößerten Wurzelkanaloberfläche eines Prüfkörpers nach der Wurzelkanalpräparation und Spülung mit EDTA (17%) und NaOCl (1%). Mithilfe dieser Spülflüssigkeiten wurde die bei der Präparation entstandene Schmierschicht größtenteils von der Wurzelkanaloberfläche und aus den Dentintubuli entfernt. An manchen Stellen verblieben vereinzelte Reste der Schmierschicht.

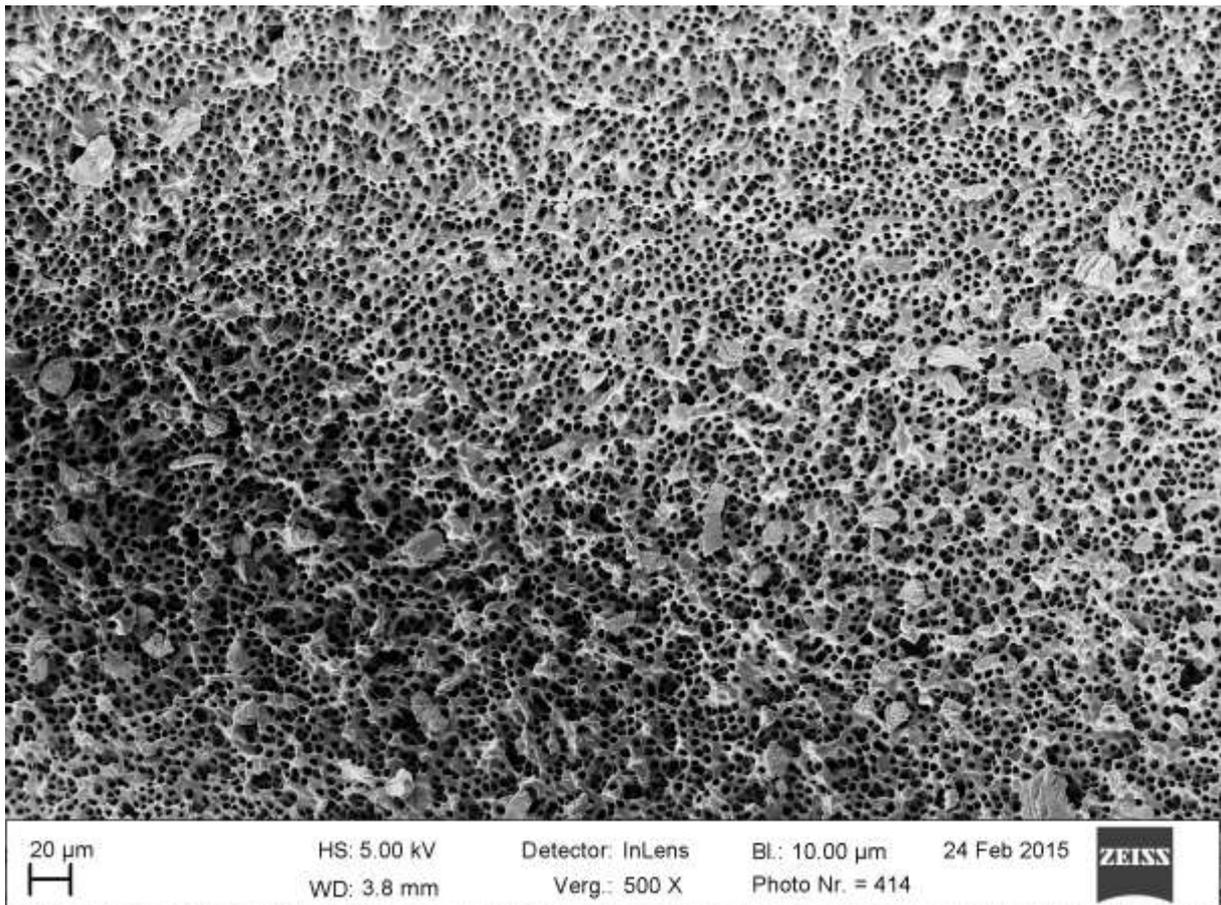


Abb. 4.2 REM-Bild zum Nachweis der Schmierschichtentfernung vor der Inkubation mit *E. faecalis*

Nachweis des *E. faecalis*-Biofilms nach 72-stündiger Inkubation

Abb. 4.3 zeigt die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der 5000-Fach vergrößerten Wurzelkanaloberfläche eines Prüfkörpers nach 72-stündiger Inkubation mit *E. faecalis*. Es hat sich ein dichter *E. faecalis*-Biofilm auch im tiefer gelegenen Dentin gebildet.

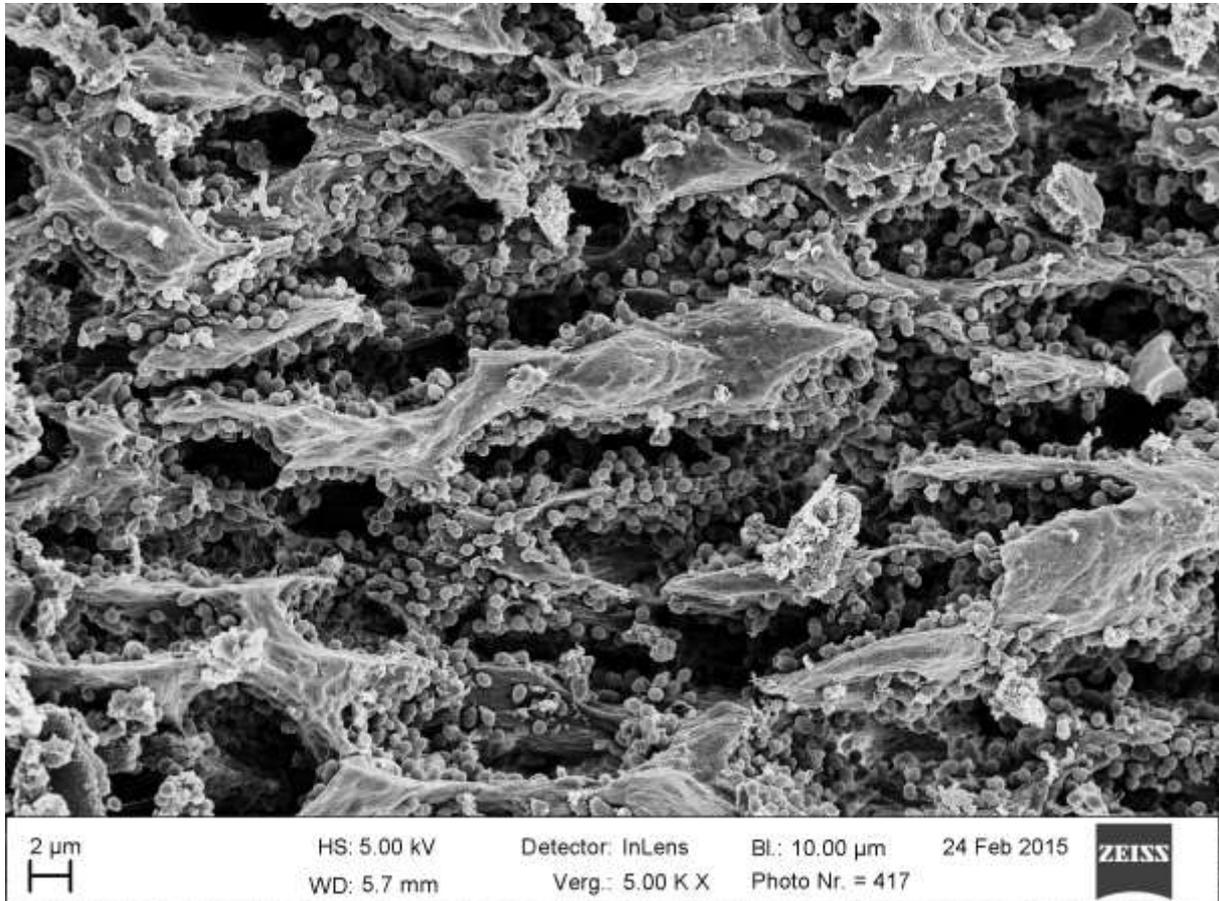


Abb. 4.3 REM-Bild zum Nachweis des *E. faecalis*-Biofilms nach 72-stündiger Inkubation

5 Diskussion

5.1 Diskussion von Material und Methode

Auswahl und Vorbereitung der Prüfkörper

Die Verwendung von echten Zähnen ermöglichte trotz einer schwierigen Standardisierung eine gute Nachahmung der *In-vivo*-Situation. In einigen anderen Studien wurden künstliche Wurzelkanäle aus Kunststoff verwendet (Dumani et al. 2007, Townsend und Maki 2009, Zand et al. 2012), wobei jedoch die komplexe Anatomie des Wurzelkanalsystems unberücksichtigt blieb.

Für eine möglichst optimale Standardisierung der Zahnproben wurden einwurzelige Zähne mit geraden Wurzelkanälen, eine initiale Gängigkeit des Foramen apicale kleiner als ISO-Größe 20 und das anschließende Abtrennen der Zahnkronen auf eine standardisierte Länge von 15 mm durchgeführt. Die koronal angelegte Zugangskavität sollte einerseits einen vereinfachten Zugang zum Wurzelkanal ermöglichen und andererseits ein Reservoir für einen effektiveren Volumenaustausch der Spülflüssigkeit während der Aktivierung gewährleisten.

Die Wurzelkanäle wurden entsprechend einem standardisierten Protokoll bis zu einer apikalen Größe von 40/.02 präpariert. Im Rahmen der Versuchsvorbereitungen hatte sich herausgestellt, dass mit dieser Größe und Konizität die Mikrokanüle des EndoVac® (Außendurchmesser 0,32 mm) ohne Friktion auf Arbeitslänge und die Endo-Eze® Tip (Außendurchmesser 0,30 mm) ohne Friktion auf Arbeitslänge minus einen Millimeter eingebracht werden konnten. Auch die Insertion des RinsEndo®-Systems (Außendurchmesser 0,45 mm) auf Arbeitslänge minus drei Millimeter war ohne Verklemmen möglich. Spülkanülen müssen auf 1-2 mm vor die Arbeitslänge in den Wurzelkanal ohne Friktion inseriert werden, um einen Flüssigkeitsaustausch im apikalen Wurzelkanaldrittel sicherzustellen (Boutsioukis et al. 2010, Bronnec et al. 2010, Brown et al. 1995, Chow 1983, de Gregorio et al. 2010, Hsieh et al. 2007, Sedgley et al. 2005). Die Größe der Apikalpräparation ist demnach ein wichtiger Faktor für eine effektive Wurzelkanal desinfektion.

Auswahl des Versuchskeims und der Inkubationszeit

Zur Kultivierung des Biofilms wurde eine Monokultur von *E. faecalis* verwendet, da aktuelle Untersuchungen zur Desinfektion des Wurzelkanalsystems ebenfalls diesen Keim verwendeten und dadurch eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse erzielt wurde (Bago Jurič et al. 2014, Bhuva et al. 2010, Brito et al. 2009, Cachovan et al. 2013, Guerreiro-Tanomaru et al. 2015, Hockett et al. 2008, Koçak et al. 2014, Miller und Baumgartner 2010, Pasqualini et al. 2010, Siqueira et al. 1997, Townsend und Maki 2009). Außerdem ist dieser Keim einfach zu kultivieren und kann auch in einem schwierigen, nährstoffarmen Umfeld Biofilme bilden (Distel et al. 2002, Jett et al. 1994). Diese Tatsache machten sich bereits viele

ähnliche Studien zunutze, wobei das Alter des Biofilms in den Prüfkörpern oft variierte. Es reichte von zwei Stunden (Pasqualini et al. 2010), einem Tag (Siqueira et al. 2000, Siqueira et al. 1997), drei Tagen (Bhuva et al. 2010), sieben Tagen (Brito et al. 2009, Townsend und Maki 2009) und zehn Tagen (Bago Jurič et al. 2014) bis hin zu drei Wochen (Guerreiro-Tanomaru et al. 2015, Koçak et al. 2014), einem Monat (Hockett et al. 2008) oder sogar sechs Wochen (Miller und Baumgartner 2010).

Ein Biofilm wird mit zunehmendem Alter resistenter gegenüber chemomechanischen Desinfektionsmaßnahmen (Brändle et al. 2008, Wang et al. 2012). In einem drei Wochen alten Biofilm lassen sich beispielsweise mit demselben Spülprotokoll 7-21% weniger Bakterien abtöten als in einem einen Tag alten Biofilm (Wang et al. 2012). Seine verstärkte Widerstandskraft resultiert aus der mit einer steigenden Bakterienmenge einhergehenden dickeren extrazellulären Matrix, die als Diffusionsbarriere vor Desinfektionsmitteln und Medikamenten schützt (Brändle et al. 2008, Haapasalo und Ørstavik 1987). Ebenso haben Bakterien in Biofilmen einen langsameren Stoffwechsel und nehmen Desinfektionsmittel dementsprechend langsamer auf (Donlan und Costerton 2002).

Die Entscheidung für eine relativ kurze Inkubationszeit von 72 Stunden fiel in der vorliegenden Studie aufgrund der Untersuchungen von Bhuva et al. (2010), Haapasalo und Ørstavik (1987) und Ørstavik und Haapasalo (1990). Haapasalo und Ørstavik (1987) stellten nämlich nach nur einem Tag Infektionstiefen des *E. faecalis* von 300-400 µm der von ihnen maximal erreichten 800-1000 µm fest. Dabei vergrößerte eine längere Infektionsdauer hauptsächlich die Anzahl infizierter Dentintubuli und weniger die durchschnittliche Tiefe der Infektion. In einer späteren Studie von Ørstavik und Haapasalo (1990) benötigte *E. faecalis* nur zwei Tage, um das gesamte zirkumpulpale Dentin auf maximale Tiefe zu infizieren. Bhuva et al. (2010) stellten mit rasterelektronenmikroskopischen Bildern nach nur 72 Stunden Inkubation einen einheitlichen Biofilm auf der gesamten Wurzelkanaloberfläche fest. Der vergleichsweise junge Biofilm schien in der vorliegenden Studie durchaus für den *In-vitro*-Vergleich von chemomechanischen Desinfektionsmaßnahmen geeignet zu sein. Das zeigte sich an den hohen CFU-Werten in der Positivkontrollgruppe (53000 - 198600 CFU/Blutagarplatte) und der Tatsache, dass aus allen Proben der vier Spülgruppen Bakterienkolonien kultiviert wurden. Innerhalb von drei Tagen kann demnach ein für eine *In-vitro*-Studie ausreichend resistenter Biofilm erzeugt werden. Eine im Rahmen der Vorversuche verwendete einmalige Impfung der Wurzelkanäle mit der Inkubationslösung stellte sich anders als die im Hauptversuch erfolgte dreimalige Impfung nach 0, 24 und 48 Stunden als unzureichend heraus.

Kultivierung und Probenentnahme

Die Kultivierung auf Blutagar-Nährböden als Methode zum Nachweis von Mikroorganismen hat verschiedene Vor- und Nachteile. Grundsätzliche Limitationen liegen in der technischen Durchführung, in der geringen Sensitivität und in der Unfähigkeit Bakterien zu erfassen, die im Moment der Kontrolle nicht kultivierbar sind (Siqueira und Rocas 2009, Siqueira et al. 2007).

Ein technisches Problem stellt die Probenentnahme aus dem Wurzelkanal dar. Abhängig von der jeweiligen Technik variiert auch die Genauigkeit der Kultivierungsergebnisse. In einigen Studien wurden Proben mittels Papierspitzen aus dem Wurzelkanal entnommen, ohne zu berücksichtigen, dass damit nur planktonische Bakterien erfasst wurden (Brito et al. 2009, Card et al. 2002, Pasqualini et al. 2010, Pawar et al. 2012). Mikroorganismen des tiefer in den Dentintubuli gelegenen Biofilms wurden nicht berücksichtigt. Andere Studien erfassten auch diese Bakterien durch die Probenentnahme anhand von Dentinspänen (Hockett et al. 2008, Rios et al. 2011) oder durch Pulverisierung der Prüfkörper (Tran et al. 2013). In der vorliegenden Studie wurden die Dentinspäne durch zirkumferente Instrumentierung des leicht feuchten Kanals mit Hedström-Feilen gewonnen. Obwohl so eine weitgehend standardisierte Probenmenge erreicht werden konnte, war dennoch keine exakt gleiche Probenmenge sichergestellt. Da alle Blutagar-Nährböden nach der Inkubation Bakterienkulturen aufwiesen, ist von einem ausreichenden Abtrag des Wurzelkanaldentins auszugehen. Dennoch könnte eine unterschiedlich große Probenmenge neben den variierenden anatomischen Verhältnissen zu den Schwankungen innerhalb der Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen beigetragen haben. Die Differenzierung zwischen diesen beiden Faktoren ist jedoch nicht möglich.

Ein weiteres Problem der Kultivierung ergibt sich aus der vorübergehenden Inhibition von *E. faecalis* durch das Desinfektionsmittel NaOCl oder einer zum Zeitpunkt der Probenentnahme zu geringen Bakterienmenge (Rolph et al. 2001, Siqueira et al. 2007).

Aufgrund der Fehleranfälligkeit ist es schwierig, mit einer Kultivierung den Bakterienstatus im Kanal exakt wiederzugeben. Ein gründliches und steriles Arbeiten sind absolute Voraussetzungen für akzeptable Ergebnisse (Möller 1966). Um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu gewährleisten, wurde das verwendete Vorgehen anderen Nachweismethoden, wie beispielsweise der Rasterelektronenmikroskopie der Polymerasekettenreaktion oder der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie, vorgezogen. Denn auch letztere weisen Limitationen auf, die ihre Eignung einschränken. Rasterelektronenmikroskopische Studien betrachten nur oberflächlich auf der Wurzelkanalwand verbliebene Bakterien und die Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (PCR) differenzieren nicht zwischen der DNA lebender und toter Zellen (Sundqvist und Figdor 2003). Obwohl die PCR eine höhere Komplexität des endodontischen Milieus wiedergibt, da sie auch nicht kultivierbare Spezies erfassen, ist eine Aussage über die tatsächlich lebende und potentiell pathogene Flora des Wurzelkanals zum Untersuchungszeitpunkt nicht möglich

(Siqueira und Rocas 2005). Obwohl die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) zwischen lebenden und toten Mikroorganismen unterscheidet und anders als die Raster-elektronenmikroskopie die Bakterien sogar bis zu einer Eindringtiefe von 10 µm ins infizierte Dentin darstellt, bleibt auch hier der Hauptteil der Bakterien in tieferen Ebenen unberücksichtigt (Ma et al. 2011).

Auswahl des Spülprotokolls

In der vorliegenden Studie wurde NaOCl in einer Konzentration von 1% verwendet, da höher konzentriertes NaOCl zu einer Verringerung des Elastizitätsmoduls und der Biegefestigkeit des Dentins führt (Sim et al. 2001) und das Risiko der periapikalen Gewebeschädigung beim Überpressen von Spülflüssigkeit zunimmt (Estrela et al. 2002, Spangberg et al. 1973). Die eventuell geringere antibakterielle Wirksamkeit lässt sich allerdings durch einen kontinuierlichen Flüssigkeitsaustausch mit einem entsprechend hohen Volumen (Moorer und Wesselink 1982) und durch eine längere Einwirkzeit ausgleichen (Baumgartner und Cuenin 1992, Gomes et al. 2001). Mit 1%igem NaOCl lässt sich als mit einem geringeren Risiko der gleiche Nutzen erzielen. Da die Spülzeit in den meisten Studien, die diesen Versuchsparameter standardisierten, bei einer (Bago Jurič et al. 2014), zwei (Bhuva et al. 2010, Guerreiro-Tanomaru et al. 2015, Koçak et al. 2014) oder drei Minuten liegt (Miller und Baumgartner 2010) und zudem auf klinische Praktikabilität geachtet wurde (Archer et al. 1992), wurde eine Spülzeit von drei Minuten gewählt.

Weiterhin wurde ein standardisiertes Spülvolumen von sechs Millilitern verwendet (Bhuva et al. 2010; Sedgley et al. 2005; Townsend und Maki 2009). Eine Ausnahme bildete das RinsEndo®-System, da dessen Spülvolumen herstellerbedingt nicht modifizierbar war (18 ml). Die Eindringtiefe der Spülnadel wurde bei der manuellen Applikation des NaOCl auf Arbeitslänge minus einen Millimeter festgelegt, da ein effektiver Austausch der Flüssigkeit bei apikal offenen Spülkanülen lediglich 1-2 mm nach Austritt aus der Kanüle möglich ist (Boutsioukis et al. 2009). Die Mikrokanüle des EndoVac®-Systems wurde nach Herstellerangaben auf Arbeitslänge verwendet. Beim RinsEndo®-System wurde entgegen der Herstellerangaben, die eine Insertion der Kanüle in das koronale Drittel empfehlen, ein Abstand von drei Millimetern zur Arbeitslänge gewählt, da eine erhöhte Eindringtiefe auch eine verbesserte Effektivität des RinsEndo®-Systems bedingt (McGill et al. 2008).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Moderne endodontische Spülsysteme werden verwendet, um durch die zusätzliche Aktivierung der Spülflüssigkeit eine verbesserte Reinigung und Desinfektion des Wurzelkanalsystems zu erzielen. Das Ziel der vorliegenden Studie war der Vergleich der antibakteriellen Effektivität der manuellen Spültechnik im Vergleich zu drei unterschiedlichen

Techniken zur Aktivierung der Wurzelkanalspülung gegenüber *Enterococcus faecalis* anhand eines Wurzelkanal-Biofilm-Modells. Die Aktivierung der Wurzelkanalspülung erfolgte dabei passiv mit Ultraschall (PUI), mit dem EndoVac®- oder dem RinsEndo®-System.

Im Vergleich zur Positivkontrollgruppe führten alle untersuchten Spülmethoden zu einer statistisch signifikanten Bakterienreduktion. Dieses Ergebnis kann durch die Verwendung von NaOCl erklärt werden, welches ein effektives Desinfektionsmittel darstellt (Bergenholtz und Spangberg 2004; Rios et al. 2011; Dumani et al. 2007; Zand et al. 2012). Die Wurzelkanäle der Positivkontrollgruppe wurden manuell mit 0,9%iger Kochsalzlösung auf Arbeitslänge minus einen Millimeter gespült. Dabei wurden zwischen 53000 - 198600 CFU je Blutagarplatte gezählt. Die mechanische Wirkung des Flüssigkeitsstroms im Wurzelkanal, wie sie bei der Handspülung auftritt, ist für eine effektive antimikrobielle Therapie folglich nicht ausreichend.

Hinsichtlich der antimikrobiellen Effektivität ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der manuellen Spültechnik und den drei verschiedenen Techniken für die Aktivierung der Wurzelkanalspülung. Alle Techniken führten im Vergleich zur Positivkontrolle zu einer signifikanten Reduktion der Bakterien im Wurzelkanal. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten der meisten anderen Studien, welche die antimikrobielle Wirksamkeit von verschiedenen Spülsystemen gegenüber unterschiedlich alten *E. faecalis*-Biofilmen verglichen (Bhuva et al. 2010; Guerreiro-Tanomaru et al. 2015; Siqueira et al. 1997; Brito et al. 2009; Koçak et al. 2014; Miller und Baumgartner 2010; Townsend und Maki 2009; Bago Jurič et al. 2014; Pawar et al. 2012). Einige *In-vitro*-Studien zeigten keinen signifikanten Unterschied bezüglich der antimikrobiellen Effektivität zwischen der Handspülung und der passiven Ultraschallaktivierung (Bhuva et al. 2010, Guerreiro-Tanomaru et al. 2015, Siqueira et al. 1997). Auch das EndoVac®-System erzielte *in vitro* keine effektivere Bakterienreduktion als die konventionelle Handspülung (Brilo et al. 2009, Koçak et al. 2014, Miller und Baumgartner 2010, Townsend und Maki 2009). In einer prospektiven klinischen Studie wurde ebenfalls keine verbesserte antimikrobielle Wirksamkeit des EndoVac®-Systems im Vergleich zur manuellen Spültechnik ermittelt (Pawar et al. 2012). Ebenso lieferte der *In-vitro*-Vergleich der passiven Ultraschallaktivierung mit dem RinsEndo®-System bezüglich der antimikrobiellen Effektivität keine Unterschiede zwischen den beiden Spülsystemen (Bago Jurič et al. 2014).

In allen oben aufgeführten Studien konnte keine verbesserte antimikrobielle Wirksamkeit durch die verschiedenen Spülmethoden zur Aktivierung des NaOCl ermittelt werden und zwar unabhängig davon, ob der Bakteriennachweis mittels Kultivierung (Brilo et al. 2009, Guerreiro-Tanomaru et al. 2015, Koçak et al. 2014, Miller und Baumgartner 2010, Siqueira et al. 1997), Polymerasekettenreaktion (Bago Jurič et al. 2014), rasterelektronenmikroskopischen Bildern (Bhuva et al. 2010) oder Spektrophotometrie (Townsend und Maki 2009) erfolgte.

Im Gegensatz dazu wurde in wenigen *In-vitro*-Studien beim Vergleich der hier verwendeten Techniken zur Aktivierung der Wurzelkanalspülung signifikante Unterschiede in der antimikrobiellen Effektivität zwischen den einzelnen Spülsystemen ermittelt (Townsend und Maki 2009; Joy et al. 2015). Bei genauer Betrachtung dieser Studien sind Unterschiede in den Versuchsbedingungen feststellbar, die die von der vorliegenden Studie abweichenden Ergebnisse erklären könnten.

So zeigte die passive Ultraschallaktivierung gegenüber der Handspülung und dem EndoVac®-System eine signifikant bessere Bakterienreduktion (Townsend und Maki 2009). Allerdings wurde diese Studie an Kunststoffkanälen mit glatten Wänden durchgeführt. Da diese anders als echte Zähne keine Dentintubuli besitzen, können auch keine Bakterien in die Wurzelkanalwand eindringen. In der Folge entsteht kein schwer zugängliches, infiziertes Wanddentin. Die zusätzliche Aktivierung durch Ultraschall eliminierte den auf dem Kunststoff oberflächlich aufgelagerten Biofilm somit effektiver als der alleinige mechanische Flüssigkeitsstrom. Mit der klinischen Situation ist diese Studie ebenfalls nicht vergleichbar. Ebenso ergab sich in einer anderen Untersuchung durch die passive Ultraschallaktivierung eine signifikant höhere Bakterienreduktion als durch die Handspülung (Joy et al. 2015). Die Mikroorganismen wurden in dieser Studie aber nachträglich und nur oberflächlich in Form von infizierten Dentinspänen in die Prüfkörper eingebracht und dann umgehend desinfiziert, ohne dass sich ein Biofilm hätte bilden können. Bei nur locker aufgelagerten infizierten Dentinspänen ist es naheliegend, dass jede zusätzliche mechanische Aktivierung zu einer besseren Reinigungswirkung führt. Die Aussagekraft dieser Studie hinsichtlich der Desinfektionswirkung der untersuchten Spülsysteme bleibt gering, da sich unter diesen Versuchsbedingungen eigentlich nur die mechanische Reinigungswirkung beurteilen lässt. Sie bestätigt dennoch andere *In-vitro*-Studien, die eine signifikant bessere Reinigungswirkung der passiven Ultraschallaktivierung feststellten. Diese zeigten, dass die PUI im Vergleich zur statischen Handspülung (de Gregorio et al. 2009; Khaord et al. 2015), zum RinsEndo®-System (Rödig et al. 2010) und zum EndoVac®-System (de Gregorio et al. 2010) insgesamt eine bessere Penetration der jeweiligen Spülflüssigkeit in laterale Kanäle und schwer zugängliche Wurzelkanalbereiche und somit eine wirkungsvollere Gewebe-, Debris- und Schmierschichtentfernung bewirkte. Im Resümee lässt sich bei genauer Betrachtung des Versuchsaufbaus dieser Studien in der klinische Situation zwar eine bessere Reinigungswirkung durch die zusätzliche mechanische Ultraschallaktivierung vermuten, aber keine bessere Desinfektionswirkung. Eine einzelne *In-vitro*-Studie wies im Vergleich zur Handspülung eine signifikant effektivere Bakterienreduktion mit dem EndoVac®-System nach (Hockett et al. 2008). Im dortigen Versuchsaufbau wurde ein 30 Tage alter *E. faecalis*-Biofilm in echten Zähnen einem standardisierten Volumen NaOCl (6 ml) und einer standardisierten Einwirkzeit (3 Minuten) ausgesetzt und der Erfolg der Desinfektionswirkung durch die Abschabung und Inkubation von Wanddentin überprüft. Die Überlegenheit des EndoVac®-Systems könnte durch einen kontinuierlichen Flüssigkeitsaustausch auf Arbeitslänge erklärt

werden (Munoz und Camacho-Cuadra 2012, Nielsen und Baumgartner 2007). Bei der Handspülung mit einer seitlich offenen Nadel wurde ein Abstand von eineinhalb Millimetern zum Apex gehalten (Hockett et al. 2008). Der Bereich von der Nadelspitze bis zum apikalen Foramen wurde dabei vermutlich nicht ausreichend mit frischer Spülflüssigkeit versorgt.

In einer *In-vitro*-Studie, in der das RinsEndo®-System mit der passiven Ultraschallaktivierung verglichen wurde, reduzierte RinsEndo® abhängig von der Spülflüssigkeit, Mikroorganismen signifikant schlechter (NaCl) oder besser (NaOCl) als die PUI (Cachovan et al. 2013). Das liegt möglicherweise daran, dass Kochsalzlösung (NaCl) selbst keine desinfizierende Wirkung besitzt und bei dieser Spülflüssigkeit die mechanische Aktivierung durch die PUI für die bessere Desinfektionswirkung sorgte. Die antibakterielle Wirkung des Flüssigkeitsstroms scheint bei Betrachtung des im Vergleich erheblich größeren Spülvolumens des RinsEndo®-System vernachlässigbar zu sein. Bei der Verwendung des nachweislich effektiven Desinfektionsmittel NaOCl fand mit dem RinsEndo®-System ein stetiger Volumenaustausch im gesamten Kanal statt. Bei der passiven Ultraschallaktivierung wurde die Spüllösung hingegen nicht ausgetauscht und verlor ihre antibakterielle Wirkung dadurch relativ schnell (Haapasalo et al. 2000). Ein regelmäßiger Flüssigkeitsaustausch auf Arbeitslänge, wie er auch in der vorliegenden Studie in allen Systemen verwendet wurde, erhält die antibakterielle Wirkung von NaOCl während des gesamten Spülvorgangs (Moorer und Wesselink 1982) und hätte die Unterschiede in der antibakteriellen Effektivität bei Cachovan et al. (2013) möglicherweise beseitigt.

Interessant ist an dieser Stelle, dass das RinsEndo®-System in der vorliegenden Studie im Vergleich zu den anderen Spülmethode mit dem dreifachen Volumen an NaOCl verwendet wurde und dass sich dennoch bezüglich der antimikrobiellen Wirksamkeit keine signifikanten Unterschiede ergaben. Es scheint bei der Spülung mit NaOCl (1%) also nach den Vermutungen von Brito et al. (2009) einen Sättigungspunkt (≤ 6 ml) zu geben, ab dem sich innerhalb derselben Einwirkzeit (3 Minuten) auch durch eine Volumensteigerung keine Verbesserung der antimikrobiellen Effektivität mehr erzielen lässt. Für eine vollständige Bakterienelimination war das Spülvolumen von sechs Millilitern in drei Minuten trotzdem nicht ausreichend. Dafür hätte entweder die Spülzeit verlängert oder die NaOCl-Konzentration erhöht werden müssen.

Obwohl sich innerhalb der vier Spülgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der antimikrobiellen Effektivität ergaben, variierte die CFU-Zahl und damit die Menge der abgetöteten Bakterien pro Zahn. Das liegt vermutlich daran, dass NaOCl abhängig von der Wurzelkanalanatomie unterschiedlich tief in Lateralkanäle und Isthmen eindringt (Miller und Baumgartner 2010). Ein Flüssigkeitsstrom, wie er in den vier untersuchten Spülmethode auftrat, scheint keine Auswirkung auf die Eindringtiefe zu haben. Wie bei Guerreiro-

Tanomaru et al. (2015) und Ahmad et al. (1987) liegt in dieser Studie die Vermutung nahe, dass für eine statistisch signifikante Bakterienreduktion hauptsächlich die ausreichende Zufuhr von NaOCl verantwortlich war. Eine Verstärkung der antibakteriellen Wirkung durch die Verwendung eines speziellen Spülsystems konnte nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise liegt das daran, dass in dieser Studie der Vorteil des EndoVac-Systems, die Einbringung der Spülkanüle auf Arbeitslänge, dadurch verloren ging, dass auch mit den anderen Spülsystemen ein ausreichender Volumenaustausch im gesamten Kanal stattfand. Außerdem ist es möglich, dass das mit dem RinsEndo-System applizierte höhere Volumen an Spülflüssigkeit gegenüber den anderen Systemen nach der Erreichung des Sättigungspunktes nicht mehr zum Tragen kam. Zudem kann es sein, dass bei der passiven Ultraschallaktivierung durch die *Intermittent-Flush*-Methode die Spülflüssigkeit während der Aktivierung zeitweilig inaktiv war, da kein ständiger Austausch mit frischem NaOCl erfolgte und dass so auch die eventuell tiefere Penetration in das umliegende Dentin keinen Vorteil mit sich brachte.

5.3 Schlussfolgerungen

Unter den Bedingungen der vorliegenden *In-vitro*-Studie führten die untersuchten Systeme für die Aktivierung der Spülflüssigkeit im Vergleich zur manuellen Spültechnik zu keiner gesteigerten antimikrobiellen Wirksamkeit gegenüber eines intrakanalären *E. faecalis*-Biofilms. Ebenso führte keine der untersuchten Methoden zu einer völligen Keimfreiheit in den Wurzelkanälen, was vermutlich auf die anatomische Komplexität der Wurzelkanäle zurückzuführen ist.

Der in der vorliegenden Studie verwendete, 72 h alte Monospezies-Biofilms schränkt die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Situation mit einem reifen Polyspezies-Biofilm ein. Daher sind weiterführende klinische Untersuchungen mit standardisierten Versuchsparametern (z. B. Spülzeit, Spülvolumen, Konzentration der Desinfektionslösung) wünschenswert.

6 Zusammenfassung

Ziel der Studie: Das Ziel der vorliegenden *In-vitro*-Studie war der Vergleich der antibakteriellen Effektivität vier unterschiedlicher Techniken zur Aktivierung der Wurzelkanalspülung gegenüber *Enterococcus faecalis* anhand eines Wurzelkanal-Biofilm-Modells.

Material und Methode: 70 Versuchszähne wurden nach bestimmten Kriterien ausgewählt, auf eine einheitliche Wurzellänge von 15 mm gekürzt und ein 3 mm tiefes und 2,5 mm breites Spülkavum angelegt. Unter Spülung mit 1%igem NaOCl erfolgte die Aufbereitung mit dem FlexMaster®-NiTi-System bis ISO-Größe 40/.02. Eine Abschlusspülung mit NaOCl und 17%igem EDTA und ein Einlegen der Prüfkörper in ein EDTA-Ultraschallbad schloss die Aufbereitung ab. Nach der Einbettung der Prüfkörper in Kunststoff und der Autoklavierung erfolgte die Versuchsgruppenzuordnung. Jede Gruppe bestand aus zehn Prüfkörpern mit Ausnahme der zwei REM-Gruppen, die aus jeweils fünf bestanden. Benannt wurden die Gruppen nach den vier untersuchten Spülsystemen beziehungsweise nach der Positiv- und Negativkontrollfunktion.

Die Prüfkörper der Spülgruppen und der Positivkontrollgruppe wurden mit der standardisierten Impflösung einer Monospezies des *E. faecalis* an drei aufeinanderfolgenden Tagen beimpft. Nach 72 Stunden Inkubation erfolgte die Desinfektion der Spülgruppenprüfkörper mit den vier zu untersuchenden Spülsystemen. Diese waren die konventionelle statische Handspülung, die passive Ultraschallaktivierung ohne gleichzeitige Wurzelkanalspülung mit dem Gerät VDW.ULTRA (VDW), das EndoVac®-System (SybronEndo) und das RinsEndo®-System (Dürr Dental). Anschließend wurden aus allen Prüfkörpern Proben mittels Hedström-Feilen entnommen, in Kochsalzlösung aufgefangen und auf Blutagarplatten ausgestrichen. 24 Stunden später wurden die auf den Nährböden gewachsenen *colony forming units* ausgezählt und der statistischen Auswertung zugeführt. Diese erfolgte mit einem nichtparametrischen Rangverfahren zur Analyse faktorieller Daten mit Messwiederholungen (Brunner et al. 2002) unter Adjustierung des Niveaus nach Tukey ($p < 0,05$). Parallel erfolgte die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung einer weiteren Positiv- und Negativkontrollgruppe, um die Kanalreinheit vor der Infektion und den Biofilm nach dreitägiger Inkubation nachzuweisen.

Ergebnisse: Im Vergleich der vier Spülprotokolle ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der antibakteriellen Effektivität. Alle vier Systeme waren allerdings in der Lage, im Vergleich zur Positivkontrollgruppe eine statistisch signifikante Bakterienreduktion zu bewirken.

Schlussfolgerungen: Eine ausschlaggebende Bakterienreduktion findet durch die Anwendung eines geeigneten Desinfektionsmittels (NaOCl) statt, nicht durch die Anwendung eines speziellen Spülsystems.

7 Literaturverzeichnis

- Ahmad M, Pitt Ford TR, Crum LA (1987): Ultrasonic debridement of root canals: an insight into the mechanisms involved. *J Endod* 13, 93–101
- Ahmetoglu F, Keles A, Yalcin M, Simsek N (2014): Effectiveness of different irrigation systems on smear layer removal: A scanning electron microscopic study. *Eur J Dent* 8, 53–57
- Albrecht LJ, Baumgartner JC, Marshall JG (2004): Evaluation of apical debris removal using various sizes and tapers of ProFile GT files. *J Endod* 30, 425–428
- Alves FR, Siqueira JF Jr., Carmo FL, Santos AL, Peixoto RS, Rôças IN, Rosado AS (2009): Bacterial community profiling of cryogenically ground samples from the apical and coronal root segments of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 35, 486–492
- Andersen M, Lund A, Andreasen JO, Andreasen FM (1992): In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Endod Dent Traumatol* 8, 104–108
- Archer R, Reader A, Nist R, Beck M, Meyers WJ (1992): An in vivo evaluation of the efficacy of ultrasound after step-back preparation in mandibular molars. *J Endod* 18, 549–552
- Bago Jurič I, Plečko V, Anić I (2014): Antimicrobial efficacy of Er,Cr: YSGG laser-activated irrigation compared with passive ultrasonic irrigation and RinsEndo((R)) against intracanal *Enterococcus faecalis*. *Photomed Laser Surg* 32, 600–605
- Baumgartner JC, Cuenin PR (1992): Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod* 18, 605–612
- Bergenholtz G, Spangberg L (2004): Controversies in Endodontics. *Crit Rev Oral Biol Med* 15, 99–114
- Berutti E, Marini R, Angeretti A (1997): Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod* 23, 725–727
- Beyer H, Walter W: Lehrbuch der organischen Chemie. 24. Auflage. S. Hirzel Verlag, Stuttgart 2004
- 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, 241–250
- Bosch-Aranda ML, Canalda-Sahli C, Figueiredo R, Gay-Escoda C (2012): Complications following an accidental sodium hypochlorite extrusion: A report of two cases. *J Clin Exp Dent* 4, 8
- Boutsioukis C, Lambrianidis T, Kastrinakis E (2009): Irrigant flow within a prepared root canal using various flow rates: a Computational Fluid Dynamics study. *Int Endod J* 42, 144–155
- Boutsioukis C, Lambrianidis T, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, Wesselink PR, van der Sluis LW (2010): The effect of needle-insertion depth on the irrigant flow in the root canal: evaluation using an unsteady computational fluid dynamics model. *J Endod* 36, 1664–1668
- Brito PR, Souza LC, Machado de Oliveira, J. C., Alves FR, De-Deus G, Lopes HP, Siqueira JF Jr. (2009): Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an in vitro study. *J Endod* 35, 1422–1427
- Bronnec F, Bouillaguet S, Machtou P (2010): Ex vivo assessment of irrigant penetration and renewal during the final irrigation regimen. *Int Endod J* 43, 663–672
- Brown DC, Moore BK, Brown CE JR., Newton CW (1995): An in vitro study of apical extrusion of sodium hypochlorite during endodontic canal preparation. *J Endod* 21, 587–591
- Brunner E, Domhof S, Langer F: Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments. John Wiley & Sons, New York 2002

- Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP (2001): Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. *J Endod* 27, 206–208
- Byström A, Sundqvist G (1981): Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 89, 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, 35–40
- Cachovan G, Schiffner U, Altenhof S, Guentsch A, Pfister W, Eick S (2013): Comparative antibacterial efficacies of hydrodynamic and ultrasonic irrigation systems in vitro. *J Endod* 39, 1171–1175
- Calt S, Serper A (2000): Smear layer removal by EGTA. *J Endod* 26, 459–461
- Calt S, Serper A (2002): Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 28, 17–19
- Card SJ, Sigurdsson A, Ørstavik D, Trope M (2002): The effectiveness of increased apical enlargement in reducing intracanal bacteria. *J Endod* 28, 779–783
- Caron G, Nham K, Bronnec F, Machtou P (2010): Effectiveness of different final irrigant activation protocols on smear layer removal in curved canals. *J Endod* 36, 1361–1366
- Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB (2005): Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. *J Endod* 31, 471–473
- Castelo-Baz P, Martin-Biedma B, Cantatore G, Ruiz-Pinon M, Bahillo J, Rivas-Mundina B, Varela-Patino P (2012): In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in simulated lateral canals of extracted teeth. *J Endod* 38, 688–691
- Cehreli ZC, Uyanik MO, Nagas E, Tuncel B, Er N, Comert FD (2013): A comparison of residual smear layer and erosion following different endodontic irrigation protocols tested under clinical and laboratory conditions. *Acta Odontol Scand* 71, 1261–1266
- Chow TW (1983): Mechanical effectiveness of root canal irrigation. *J Endod* 9, 475–479
- Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR (2006): The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod* 32, 434–437
- Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ (1978): How bacteria stick. *Sci Am* 238, 86–95
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322
- Cvek M, Nord CE, Hollender L (1976): Antimicrobial effect of root canal debridement in teeth with immature root. A clinical and microbiologic study. *Odontol Revy* 27, 1–10
- Dalton BC, Ørstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M (1998): Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod* 24, 763–767
- de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Heilborn C, Cohenca N (2009): Effect of EDTA, sonic, and ultrasonic activation on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals: an in vitro study. *J Endod* 35, 891–895
- de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Paranjpe A, Cohenca N (2010): Efficacy of different irrigation and activation systems on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals and up to working length: an in vitro study. *J Endod* 36, 1216–1221
- de Gregorio C, Paranjpe A, Garcia A, Navarrete N, Estevez R, Esplugues EO, Cohenca N (2012): Efficacy of irrigation systems on penetration of sodium hypochlorite to working length and to simulated uninstrumented areas in oval shaped root canals. *Int Endod J* 45, 475–481
- Desai P, Himel V (2009): Comparative safety of various intracanal irrigation systems. *J Endod* 35, 545–549

- Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ (2002): Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 28, 689–693
- Donlan RM, Costerton JW (2002): Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167–193
- Dotto SR, Travassos RM, Oliveira EP de, Machado ME, Martins JL (2007): Evaluation of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution and gel for smear layer removal. *Aust Endod J* 33, 62–65
- Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M (2014): Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod* 40, 509–514
- Dua A, Dua D (2015): Comparative evaluation of efficacy of EndoVac irrigation system to Max-I probe in removing smear layer in apical 1 mm and 3 mm of root canal: An in vitro scanning electron microscope study. *Dent Res J* 12, 38–43
- Dumani A, Yoldas O, Isci AS, Koksal F, Kayar B, Polat E (2007): Disinfection of artificially contaminated Resilon cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite at different time exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 103, 5
- Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL (2006): Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 32, 527–531
- Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD (2002): Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 13, 113–117
- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002): Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 35, 221–228
- Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP, Moller AJ (2006): Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci* 114, 278–285
- Figdor D (2002): Apical periodontitis: a very prevalent problem. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 94, 651–652
- Fukumoto Y, Kikuchi I, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H (2006): An ex vivo evaluation of a new root canal irrigation technique with intracanal aspiration. *Int Endod J* 39, 93–99
- Gade VJ, Sedani SK, Lokade JS, Belsare LD, Gade JR (2013): Comparative evaluation of debris removal from root canal wall by using EndoVac and conventional needle irrigation: An in vitro study. *Contemp Clin Dent* 4, 432–436
- Garberoglio R, Becce C (1994): Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78, 359–367
- Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M (2004): Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int Endod J* 37, 272–280
- 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, 424–428
- Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR (2009): Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod* 35, 791–804
- Guerreiro-Tanomaru JM, Chavez-Andrade GM, Faria-Junior NB, Watanabe E, Tanomaru-Filho M (2015): Effect of Passive Ultrasonic Irrigation on *Enterococcus faecalis* from Root Canals: An Ex Vivo Study. *Braz Dent J* 26, 342–346

- Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y (2010): Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 54, 291–312
- Hancock HH3, 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, 579–586
- Hauser V, Braun A, Frentzen M (2007): Penetration depth of a dye marker into dentine using a novel hydrodynamic system (RinsEndo). *Int Endod J* 40, 644–652
- Hockett JL, Dommisch JK, Johnson JD, Cohenca N (2008): Antimicrobial efficacy of two irrigation techniques in tapered and nontapered canal preparations: an in vitro study. *J Endod* 34, 1374–1377
- Hsieh YD, Gau CH, Kung Wu SF, Shen EC, Hsu PW, Fu E (2007): Dynamic recording of irrigating fluid distribution in root canals using thermal image analysis. *Int Endod J* 40, 11–17
- Hülsmann M, Hahn W (2000): Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. *Int Endod J* 33, 186–193
- Hülsmann M, Gressmann G, Schafers F (2003a): A comparative study of root canal preparation using FlexMaster and HERO 642 rotary Ni-Ti instruments. *Int Endod J* 36, 358–366
- Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A (2003b): Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J* 36, 810–830
- Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS (1994): Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 7, 462–478
- Jiang LM, Lak B, Eijsvogels LM, Wesselink P, van der Sluis LW (2012): Comparison of the cleaning efficacy of different final irrigation techniques. *J Endod* 38, 838–841
- Joy J, Mathias J, Sagir VM, Babu BP, Chirayath KJ, Hameed H (2015): Bacterial Biofilm Removal Using Static and Passive Ultrasonic Irrigation. *J Int Oral Health* 7, 42–47
- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965): The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20, 340–349
- Khaord P, Amin A, Shah MB, Uthappa R, Raj N, Kachalia T, Kharod H (2015): Effectiveness of different irrigation techniques on smear layer removal in apical thirds of mesial root canals of permanent mandibular first molar: A scanning electron microscopic study. *J Conserv Dent* 18, 321–326
- Koçak S, Koçak MM, Saglam BC, Aktas E (2014): Efficacy of three irrigation agitation techniques on bacterial elimination: a microbiologic and microscopic evaluation. *Scanning* 36, 512–516
- Körstgens V, Flemming HC, Wingender J, Borchard W (2001): Uniaxial compression measurement device for investigation of the mechanical stability of biofilms. *J Microbiol Methods* 46, 9–17
- Layton G, Wu WI, Selvaganapathy PR, Friedman S, Kishen A (2015): Fluid Dynamics and Biofilm Removal Generated by Syringe-delivered and 2 Ultrasonic-assisted Irrigation Methods: A Novel Experimental Approach. *J Endod* 41, 884–889
- 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, 1380–1385
- Macedo R, Verhaagen B, Rivas DF, Versluis M, Wesselink P, van der Sluis L (2014): Cavitation measurement during sonic and ultrasonic activated irrigation. *J Endod* 40, 580–583
- Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD (1984): Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. *J Endod* 10, 477–483
- Malentacca A, Uccioli U, Zangari D, Lajolo C, Fabiani C (2012): Efficacy and safety of various active irrigation devices when used with either positive or negative pressure: an in vitro study. *J Endod* 38, 1622–1626

- Matsuo T, Shirakami T, Ozaki K, Nakanishi T, Yumoto H, Ebisu S (2003): An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. *J Endod* 29, 194–200
- McGill S, Gulabivala K, Mordan N, Ng YL (2008): The efficacy of dynamic irrigation using a commercially available system (RinsEndo) determined by removal of a collagen 'bio-molecular film' from an ex vivo model. *Int Endod J* 41, 602–608
- Miller TA, Baumgartner JC (2010): Comparison of the antimicrobial efficacy of irrigation using the EndoVac to endodontic needle delivery. *J Endod* 36, 509–511
- Mitchell RP, Yang SE, Baumgartner JC (2010): Comparison of apical extrusion of NaOCl using the EndoVac or needle irrigation of root canals. *J Endod* 36, 338–341
- Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T (1998): Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 31, 1–7
- Möller AJ (1966): Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr* 74, 1–380
- Moorer WR, Wesselink PR (1982): Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 15, 187–196
- Munoz HR, Camacho-Cuadra K (2012): In vivo efficacy of three different endodontic irrigation systems for irrigant delivery to working length of mesial canals of mandibular molars. *J Endod* 38, 445–448
- Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R, Figueiredo L, Feres M (2014): Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Endod* 40, 899–906
- Nair PN (1987): Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 13, 29–39
- Nair PN (2006): On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 39, 249–281
- Nair PN, Sjogren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G (1990): Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 16, 580–588
- Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J (2005): Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 99, 231–252
- Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, Patel N, Klepac-Ceraj V, Fontana CR, Kent R et al. (2011): Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod* 37, 217–222
- Nielsen BA, Baumgartner JC (2007): Comparison of the EndoVac system to needle irrigation of root canals. *J Endod* 33, 611–615
- Nygaard-Østby B (1957): Chelation in root canal therapy: ethy- lenediaminetetraacetic acid for cleansing and widening of root canals. *Odontol Tidskr* 64, 3–11
- Ørstavik D, Haapasalo M (1990): Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 6, 142–149
- Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH (1985): Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod* 11, 525–528
- Pasqualini D, Cuffini AM, Scotti N, Mandras N, Scalas D, Pera F, Berutti E (2010): Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of a 5% sodium hypochlorite subsonic-activated solution. *J Endod* 36, 1358–1360

- Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE (2006): The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol* 2000 42, 80–87
- Pataky L, Ivanyi I, Grigar A, Fazekas A (2002): Antimicrobial efficacy of various root canal preparation techniques: an in vitro comparative study. *J Endod* 28, 603–605
- Pawar R, Alqaied A, Safavi K, Boyko J, Kaufman B (2012): Influence of an apical negative pressure irrigation system on bacterial elimination during endodontic therapy: a prospective randomized clinical study. *J Endod* 38, 1177–1181
- Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ (2001): Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 27, 76–81
- 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, 221–230
- 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, 1–11
- Pirani C, Bertacci A, Cavrini F, Foschi F, Acquaviva GL, Prati C, Sambri V (2008): Recovery of *Enterococcus faecalis* in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. *New Microbiol* 31, 235–240
- Ram Z (1977): Effectiveness of root canal irrigation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 44, 306–312
- Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL (2011): Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod* 37, 856–859
- Rôças IN, Siqueira JF Jr., Santos KR (2004): Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 30, 315–320
- Rôças IN, Hulsmann M, Siqueira JF Jr. (2008): Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod* 34, 926–931
- 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, 581–589
- Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J (2001): Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol* 39, 3282–3289
- Saber D, Hashem AA (2011): Efficacy of different final irrigation activation techniques on smear layer removal. *J Endod* 37, 1272–1275
- Sathorn C, Parashos P, Messer HH (2007): How useful is root canal culturing in predicting treatment outcome? *J Endod* 33, 220–225
- Schmidt TF, Teixeira CS, Felipe MC, Felipe WT, Pashley DH, Bortoluzzi EA (2015): Effect of Ultrasonic Activation of Irrigants on Smear Layer Removal. *J Endod* 41, 1359–1363
- Schoeffel GJ (2007): The EndoVac method of endodontic irrigation: safety first. *Dent Today* 26, 92
- Schoeffel GJ (2008): The EndoVac method of endodontic irrigation, part 2--efficacy. *Dent Today* 27, 82, 84, 86-7
- Sedgley CM, Nagel AC, Hall D, Applegate B (2005): Influence of irrigant needle depth in removing bioluminescent bacteria inoculated into instrumented root canals using real-time imaging in vitro. *Int Endod J* 38, 97–104
- Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M (2010): Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *J Endod* 36, 1820–1823

- Sim TP, Knowles JC, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K (2001): Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J* 34, 120–132
- Siqueira JF Jr. (2001): Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 34, 1–10
- Siqueira JF Jr., Rôças IN (2008): Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 34, 1291
- Siqueira JF Jr., Rôças IN (2009): Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *J Oral Microbiol* 1
- Siqueira JF Jr., Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, Uzeda M de (1997): Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *Int Endod J* 30, 279–282
- Siqueira JF Jr., Lima KC, Magalhaes FA, Lopes HP, Uzeda M de (1999): Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod* 25, 332–335
- Siqueira JF Jr., Rôças 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, 331–334
- Siqueira JF Jr., Rôças IN, Lopes HP (2002): Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 93, 174–178
- Siqueira JF Jr., Magalhaes KM, Rôças IN (2007): Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *J Endod* 33, 667–672
- 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, 856–871
- 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, 93–98
- Sundqvist G, Figdor D (2003): Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Top 2003* 6, 3–28
- Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren 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, 86–93
- SybronEndo (2012): EndoVac Product Brochure. Anaheim, Kalifornien
- Tay FR, Gu LS, Schoeffel GJ, Wimmer C, Susin L, Zhang K, Arun SN, Kim J, Looney SW, Pashley DH (2010): Effect of vapor lock on root canal debridement by using a side-vented needle for positive-pressure irrigant delivery. *J Endod* 36, 745–750
- Thoden van Velzen SK, Genet JM, Kersten HW, Moorer WR, Wesselink PR: *Endodontie*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 1988
- Torabinejad M, Ung B, Kettering JD (1990): In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endod* 16, 566–569
- 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, 658–666
- Townsend C, Maki J (2009): An in vitro comparison of new irrigation and agitation techniques to ultrasonic agitation in removing bacteria from a simulated root canal. *J Endod* 35, 1040–1043

- Tran KT, Torabinejad M, Shabahang S, Retamozo B, Aprecio RM, Chen JW (2013): Comparison of efficacy of pulverization and sterile paper point techniques for sampling root canals. *J Endod* 39, 1057–1059
- Usman N, Baumgartner JC, Marshall JG (2004): Influence of instrument size on root canal debridement. *J Endod* 30, 110–112
- van der Sluis LW, Wu MK, Wesselink PR (2005): The efficacy of ultrasonic irrigation to remove artificially placed dentine debris from human root canals prepared using instruments of varying taper. *Int Endod J* 38, 764–768
- van der Sluis LW, Gambarini G, Wu MK, Wesselink PR (2006): The influence of volume, type of irrigant and flushing method on removing artificially placed dentine debris from the apical root canal during passive ultrasonic irrigation. *Int Endod J* 39, 472–476
- van der Sluis LW, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR (2007): Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J* 40, 415–426
- van der Sluis LW, Wu MK, Wesselink P (2009): Comparison of 2 flushing methods used during passive ultrasonic irrigation of the root canal. *Quintessence Int* 40, 875–879
- Vertucci FJ (1984): Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 58, 589–599
- Walker RT (1996): Endodontic disease: development and treatment. *Prim Dent Care* 3, 53–56
- Waltimo TM, Ørstavik D, Siren EK, Haapasalo MP (2000): In vitro yeast infection of human dentin. *J Endod* 26, 207–209
- Waltimo TM, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D (2005): Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* 31, 863–866
- 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, 1376–1379
- Wu MK, Wesselink PR (2001): A primary observation on the preparation and obturation of oval canals. *Int Endod J* 34, 137–141
- Wu MK, van der Sluis LW, Wesselink PR (2003): The capability of two hand instrumentation techniques to remove the inner layer of dentine in oval canals. *Int Endod J* 36, 218–224
- Zand V, Salem-Milani A, Shahi S, Akhi MT, Vazifekhah S (2012): Efficacy of different concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine in disinfection of contaminated Resilon cones. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 17, 5
- Zehnder M (2006): Root canal irrigants. *J Endod* 32, 389–398

Danksagung

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

Frau Monika Hoch danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Umsetzung der Versuche im Labor der Poliklinik für Präventive Zahnmedizin, Parodontologie und Kariologie der Universität Göttingen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Frank Konietschke vom Institut für Medizinische Statistik der Universität Göttingen danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Auswertung der Daten.

Herrn Hans-Georg Sydow danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung der rasterelektronischen Aufnahmen.