

Bakterietætheden af temporære endodontiske fyldningsmaterialer

En klinisk og mikrobiologisk undersøgelse

Merete Hjorth Laustsen, Tove Larsen, Claes Reit og Lars Bjørndal

De nyeste principper for rodbehandling af tænder tilstræber behandlingsforløb med så få behandlinger som muligt. På trods af dette er der flere grunde til at endodontiske behandlinger som regel strækker sig over flere patientbesøg.

Ved den endodontiske behandling af en tand med vital pulpa eller en nekrotisk inficeret rodkanal søger man hhv. at forebygge eller behandle en infektion i rodkanalen. I det væsentligste kan der være to grunde til at de endodontiske behandlinger strækker sig over flere patientbesøg. Enten som led i den mikrobiologiske behandling af den inficerede rodkanal (1), eller hvis behandlingen afbrydes pga. manglende tid. Selvom trenden i dag peger mod behandlingsforløb hvor så få behandlingssekvenser som muligt benyttes (2), vil anvendelsen af en temporær forsegling ved endodontiske behandlinger fortsat være en nødvendig sekvens. Det er af afgørende betydning for behandlingens forløb at de temporære fyldninger der anvendes i mellemseancen, er bakterietætte. Ellers opstår der sekundær infektion af rodkanalerne, og risikoen for at den endodontiske behandling mislykkes er stærkt forøget.

I undersøgelsen blev bakterietætheden af to temporære fyldningsmaterialer testet *in vivo*, Coltosol® F (Coltène/Whaledent Inc.) og zinkilte-eugenol. Der beskrives i artiklen hvordan lagtykkelse og kavitetudformning har indvirkning på bakterietætheden af de temporære endodontiske fyldninger.

Der er foretaget en række laboratorieforsøg mhp. at teste tætheden af temporære endodontiske fyldningsmaterialer (3-12). I de fleste undersøgelser bedømmes risikoen for lækage ved at undersøge penetrationsgrad og tidsforløb af farvestoffer eller andre væsker, men den egentlige tæthed over for bakterier bedømmes ikke (3, 4, 7, 8, 10, 12).

Eksisterende undersøgelser, såvel *in vivo* som *in vitro*, evaluerer de temporære materials forseglingssevne i intakte tænder (3-8, 10-13, 25). Litteraturen er mangelfuld når det drejer sig om forseglingssevnen i relation til tænder med større destruktioner og permanente fyldninger. Ofte testede endodontiske temporære fyldningsmaterialer kan inddeles i følgende grupper: zinkiltecement med og uden eugenol, glasionomercement samt komposit plast (1). De eksisterende undersøgelser bygger på forskellige metoder, og resultaterne er ikke entydige i relation til hvilket materiale der har den bedste forseglingssevne. I otte undersøgelser var Cavit førstevalg (1, 3, 4, 7, 10, 25), i ét studie var IRM bedste materialevalg (12), og GIC samt komposit plast blev fremhævet i tre studier (3-5). Heraf ses at der langt fra er enighed om hvilket materiale som har den bedste forseglingssevne.

Evidensen i form af dokumenteret klinisk holdbarhed der i dag ligger til grund for valg af temporært fyldningsmateriale inden for endodonti, synes derfor at være overraskende lille.

Formålet med nærværende forsøg var at undersøge bakterietætheden af to temporære fyldningsmaterialer under kliniske forhold. I undersøgelsen sammenholdtes den færdigblandede, eugenolfrie zinkiltecement, Coltosol® F (Coltène/Whaledent Inc.) med standardmaterialet zinkilte-eugenol, sv.t. to lagtykkelser (3 mm og 6 mm). Der eksisterer kun få undersøgelser med Coltosol® F, der ikke tidligere har været testet *in vivo* som temporært endodontisk fyldningsmateriale (1).

Materiale og metode

Undersøgelsen blev godkendt af Videnskabetisk Komite, (KF) 03-002/03. Femten patienter deltog i undersøgelsen. Alle patienter gav skriftligt samtykke til deltagelse. Patienterne havde afsluttet endodontisk behandling af en molar hos studerende ved Tandlægeskolen i København. Patienterne blev udvalgt på baggrund af fire kriterier:

- 1) at rodfyldningen var optimal, dvs. tæt og homogen uden over-/underskud,
- 2) at tanden var uden subjektive symptomer,
- 3) at oplukningskaviteten, herunder en tidligere fyldningskavitet maksimalt involverede tanden sv.t. en dobbelt-kombineret fyldning, og at

4) involverede approximalflader > 5 mm faciolingvalt blev opbygget i plast.

Inden forsøget blev rodfyldningerne forsejlet med et lag af Dycal® og oplukningskaviteten fyldt med Cavit™ W (3M ESPE).

Coltosol® F blev anvendt efter forskrifterne. Kemiske indholdsstoffer er zinkoxid, zinksulfat, EVA resin, natriumfluorid samt 40% calciumsulfat-hemihydrat. Materialet hærdet ved optagelsen af vand.

Zinkilte-eugenol er en blanding af zinkoxidpulver og eugenol, der udrøres med steril spatel på steril glasplade efter fast målestok: én dråbe eugenol (0,3 g) til én måleske zinkoxid (0,14 g). Denne afmåling blev foretaget for at opnå fyldninger med samme mekaniske egenskaber samt optimal trykstyrke (14). I Fig. 1 ses en principskitse af en testtand.

Kliniske procedurer og mikrobiologisk prøvetagning

Undersøgelsen af bakterietætheden af Coltosol® F og zinkilte-eugenol skete over en 2-4 ugers observationsperiode. Samme testtand benyttedes til undersøgelse af begge materialer, og rækkefølgen af fyldningsmaterialerne valgtes ved lodtrækning. Der blev anvendt to lagtykkelser af de temporære materialer på hhv. 3 og 6 mm. Lagtykkelsen blev tilfældigt udvalgt. I Fig. 2 ses et rutediagram over forsøgsdesignet.

Etablering af aseptisk arbejdsfelt – Ved første konsultation sikredes det at tanden var tilstrækkeligt aflastet. Der blev boret hhv. 3 eller 6 mm af Cavityfyldningen, pudset med pimpsten, taget aftryk af den aktuelle oplukningskaviteten, og fremstillet en gips-

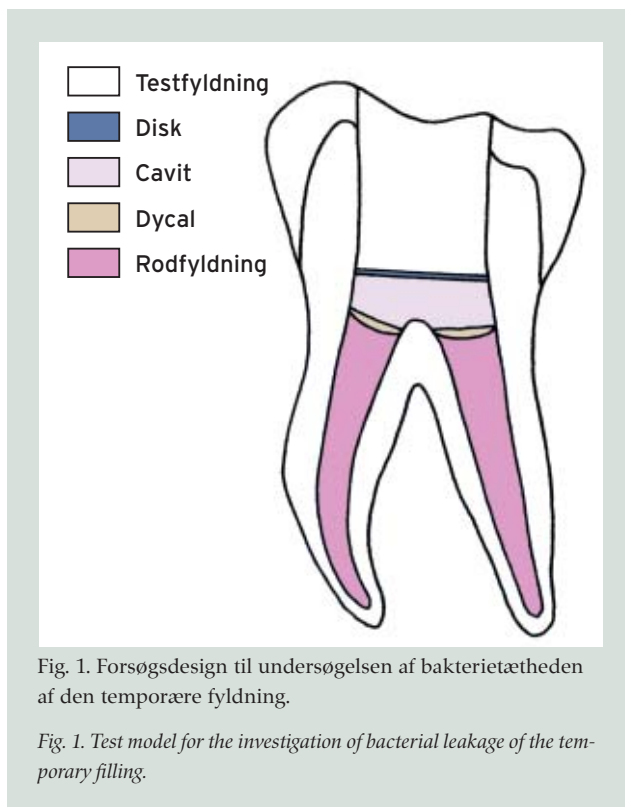


Fig. 1. Forsøgsdesign til undersøgelsen af bakterietætheden af den temporære fyldning.

Fig. 1. Test model for the investigation of bacterial leakage of the temporary filling.

model. For at etablere et aseptisk arbejdsfelt og undgå ekstern kontaminering, blev der monteret kofterdam (15). Der blev afvasket med 30% hydrogenperoxid, 5% jodopløsning (16, 17) (Fig. 3). Herefter foregik alt med sterile instrumenter.

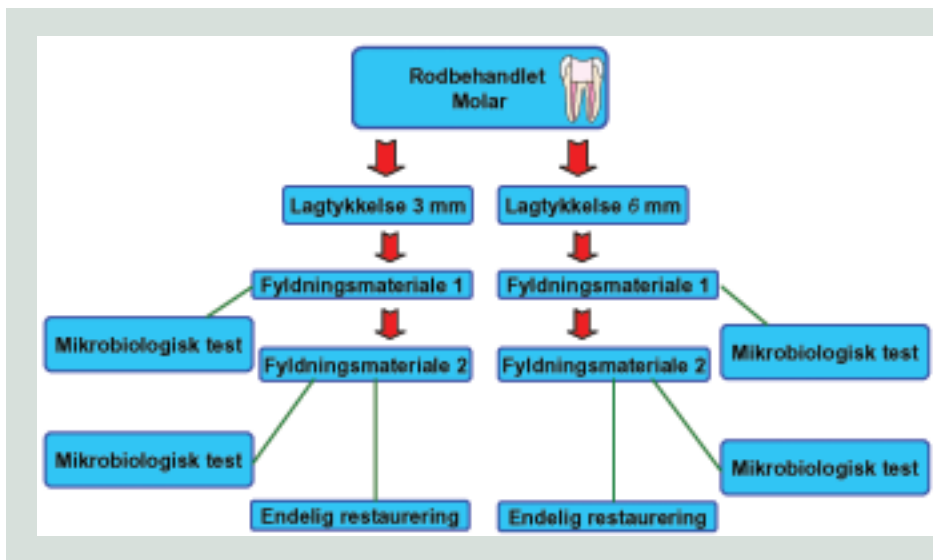


Fig. 2. Rutediagram over undersøgelsens forsøgsdesign. ↓ viser tilfældig udvælgelse af henholdsvis lagtykkelse og fyldningsmateriale.

Fig. 2. Flow-chart with the setup of the investigation. ↓ shows a randomized choice of thickness and filling material.

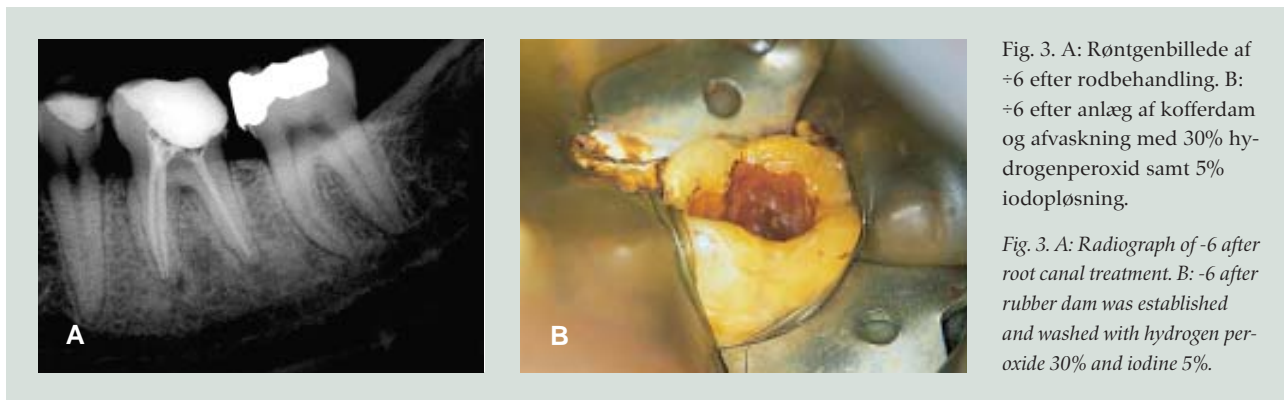


Fig. 3. A: Røntgenbillede af +6 efter rodbehandling. B: +6 efter anlæg af kofferdam og afvaskning med 30% hydrogenperoxid samt 5% iodopløsning.

Fig. 3. A: Radiograph of -6 after root canal treatment. B: -6 after rubber dam was established and washed with hydrogen peroxide 30% and iodine 5%.

Kontrol af arbejdsfelt – For at kontrollere for eventuel ekstern kontaminering, blev der taget en arbejdsfeltsprøve. Der afvaskedes med 5% thiosulfatopløsning, og en del af den overskydende væske opsamledes med imprægnerede trækulsvatpelleter (16), der blev overført til vækstmediet *peptone yeast* (PY) og bragt til laboratoriet inden for én time.

Design til test af bakterietæthed – Til undersøgelse for mikrobiel nedvækst anvendtes en steril disk udklippet af kofferdam (18). Den sterile disk blev placeret på kavitetens bunden (Fig. 4A), hvorefter kontrolprøve fra arbejdsfeltet blev gentaget, inden den temporære testfyldning blev lagt (Fig. 4B).

Efter 2-4 uger indkaldtes patienten til anden konsultation. Testtanden undersøgtes i operationsmikroskop (Zeiss OPMI® pico, i forstørrelse X 25), hvor mulig diskblottelse kunne observeres, og fyldningens konsistens samt overflade blev beskrevet (Fig. 4C). Efter kofferdamanlæg blev fyldningsperiferien forsejlet med lak (Scotchbond 3 adhæsiv blandet med resin) for at undgå at desinfektionen af arbejdsfeltet skulle påvirke det mikrobiologiske resultat. Den temporære fyldning blev fjernet med sterile instrumenter (Fig. 4D) og disken overført (Fig. 5) direkte til det anaerobe transportmedie *reduced transport fluid* (RTF)(19) og bragt til laboratoriet inden for én time.

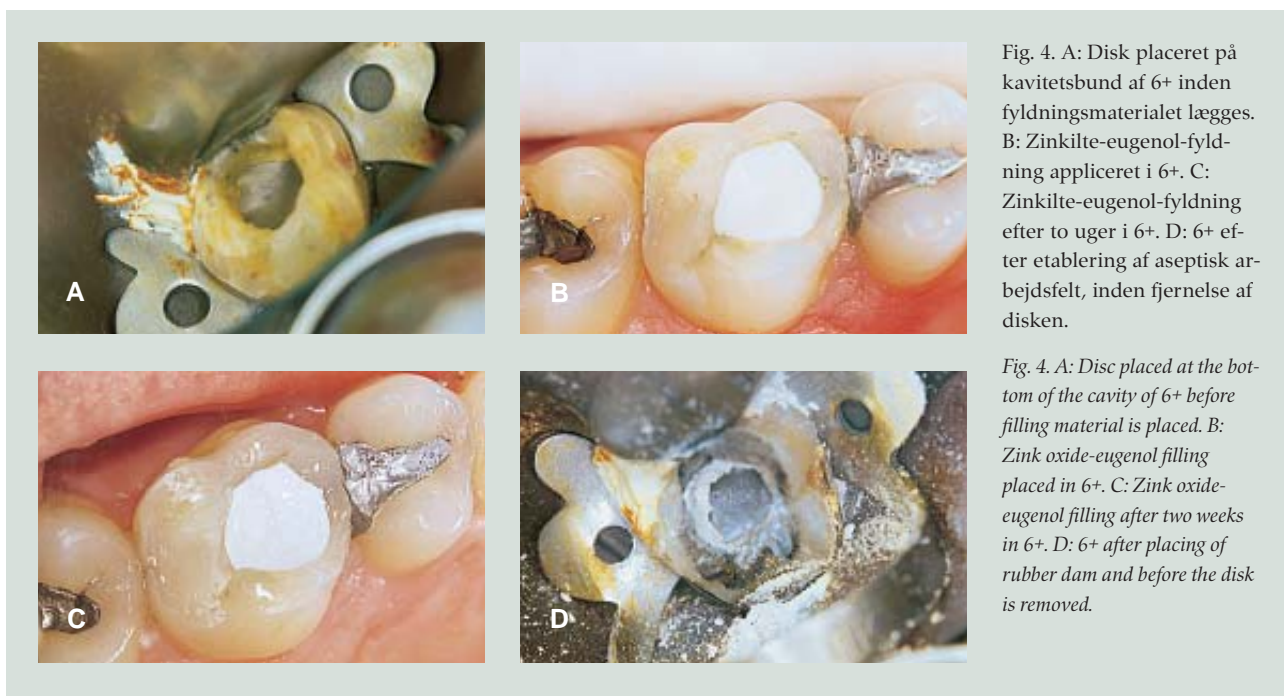


Fig. 4. A: Disk placeret på kavitetens bund af 6+ inden fyldningsmaterialet lægges. B: Zinkilte-eugenol-fyldning appliceret i 6+. C: Zinkilte-eugenol-fyldning efter to uger i 6+. D: 6+ efter etablering af aseptisk arbejdsfelt, inden fjernelse af disken.

Fig. 4. A: Disc placed at the bottom of the cavity of 6+ before filling material is placed. B: Zinc oxide-eugenol filling placed in 6+. C: Zinc oxide-eugenol filling after two weeks in 6+. D: 6+ after placing of rubber dam and before the disk is removed.



Fig. 5. Næroptagelse af diskoverførsel til anaerobt transportmedie.

Fig. 5. Closeup of the disc transfer to the anaerobic transport media.

Umiddelbart efter fjernelsen af disken under fyldningsmateriale 1, blev procedurerne fra første konsultation gentaget, blot med det alternative fyldningsmateriale. Var testfyldningen helt eller delvist fraktureret, blev afvaskning af evt. eksponerede diskområder undladt.

Efter afslutning med sidste fyldningsmateriale blev tanden forsynet med en permanent fyldning.

Mikrobiologiske procedurer – Arbejdsfeltsprøverne blev inkuberet anaerobt ved 37 °C i tre dage. Såfremt der var vækst, blev der fremstillet tifold fortyndingsrække i RTF (20, 21) til 10^{-4} , som ved diskprøven.

Diskprøverne blev vortexmikset i 60 sek., og der blev fremstillet en tifold fortyndingsrække i RTF til 10^{-4} . 0,1 ml fra hver fortynding blev udsæt på følgende medier: 1) beriget Tryptic Soy Agar (TSA), der er nonselektivt og anvendtes til tælling af total dyrkbar flora, 2) Mitis Salivarius (MS), der er selektivt for orale streptokokker (22, 23), 3) Rogosa SL (RSL), der er selektivt for laktobaciller, og 4) telluritplader, til isolering af enterokokker (24). Efter anaerob inkubering i syv dage ved 37 °C taltes totalt antal kolonier (cfu) på en passende fortynding (50-300 kolonier) på hver substrattypen. De forskellige kolonier blev analyseret kolonimorfologisk og mikroskopisk ved gramfarvning, katalaseaktivitet samt ved dyrkning såvel anaerobt som aerobt. Ved fund af grampositive stave på TSA blev der forsøgt dyrkning på RSL. Den procentvise andel af hhv. orale streptokokker, laktobaciller og enterokokker beregnedes.

Der opstod fraktur af tre tænder med Coltosolfyldninger, hvorfor Coltosol® F blev ekskluderet inden de sidste tre patienter havde gennemført det samlede testforløb. Disse tænder

fyldtes i stedet med glasionomercement (Ketac™ Molar A1 (3M ESPE)). Det blev besluttet at de mikrobiologiske prøver også blev gennemført på de tre glasionomertilfælde, hvorfor de indgår i resultatafsnittet.

Resultater

Efter observationstiden var lagtykkelsen af Coltosolfyldningerne generelt reduceret 0,5-1 mm, og der kunne trækkes spor i overfladen og kanten af fyldningerne med sonden. For zinkilte-eugenol-fyldningerne var overfladen generelt intakt, og der var ingen tendens til reduceret lagtykkelse (Fig. 4C).

I Tabel 1 ses at tre af 15 zinkilte-eugenol-fyldninger havde synlig disk efter testperioden, mens fire af 12 Coltosolfyldninger havde synlig disk efter testperioden, og ingen af de tre Ketac-Molar-fyldninger gav anledning til diskblottelse.

Af de syv diskblottelser var fem relateret til fyldninger med 3 mm lagtykkelse, og diskblottelserne opstod på baggrund af brud i fyldningerne og ikke som resultat af direkte slid.

Tabel 2 viser vækst under 10 af 16 fyldninger på 3 mm (63%), hvorimod der kun er registreret vækst under 3 af 14 på 6 mm (21%).

I Tabel 3 sammenlignes den mikrobiologiske vækst under de enkelte fyldninger. Når disken under fyldningen var synlig ved prøvetagningen, blev der registreret vækst af et stort antal bakterier. Der var én af 90 kontrolprøver af arbejdsfeltet der viste vækst. Her blev der registreret vækst inden placering af fyldning, men der var ingen vækst efter endt testperiode. I alle tilfælde hvor den totalt dyrkbare flora var $> 2,0 \times 10^2$ cfu,

Tabel 1. Relationen mellem fyldningsmateriale, lagtykkelse og antallet af fyldninger med synligt diskområde efter testperioden.

| Materiale | Lagtykkelse | | Antal |
|--------------------|-------------|------|-------|
| | 3 mm | 6 mm | |
| ZnO-E | | | |
| Ikke synlig disk | 6 | 6 | 12 |
| Synlig disk | 2 | 1 | 3 |
| I alt | 8 | 7 | 15 |
| Coltosol | | | |
| Ikke synlig disk | 3 | 5 | 8 |
| Synlig disk | 3 | 1 | 4 |
| I alt | 6 | 6 | 12 |
| Ketac Molar | | | |
| Ikke synlig disk | 2 | 1 | 3 |
| Synlig disk | 0 | 0 | 0 |
| I alt | 2 | 1 | 3 |

Tabel 2. Fordelingen af fyldninger med og uden vækst i relation til lagtykkelse og materialevalg

| Fyldning | ÷ vækst | + vækst | Antal |
|---------------|---------|---------|-------|
| ZnO-E 3 mm | 4 | 4 | 8 |
| ZnO-E 6 mm | 6 | 1 | 7 |
| Coltosol 3 mm | 1 | 5 | 6 |
| Coltosol 6 mm | 4 | 2 | 6 |
| Ketac M 3 mm | 1 | 1 | 2 |
| Ketac M 6 mm | 1 | 0 | 1 |
| I alt | 17 | 13 | 30 |

Tabel 3. Mikrobiologisk vækst under de undersøgte fyldningsmaterialer.

| Patient nr. | Materiale | | |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------|
| | ZnO-E | Coltosol | Ketac Molar |
| 1 | 10 | 3×10^3 | |
| 2 | 2×10^3 * | 10^5 ** | |
| 3 | 10^5 *** | 2×10^3 * | |
| 4 | 0 | 4×10^2 | |
| 5 | 10^5 ** | 3×10^5 * | |
| 6 | 0 | 5×10^5 * | |
| 7 | 0 | 0 | |
| 8 | 0 | 0 | |
| 9 | 0 | 0 | |
| 10 | 0 | 0 | |
| 11 | 0 | 10^5 *** | |
| 12 | 0 | 0 *** + | |
| 13 | 0 | | 0 |
| 14 | 10^2 | | 0 |
| 15 | 0 | | 10^2 |

* Synlig disk

** Testfyldning mistet

*** Tandens fraktureret

+ Fraktur førte ikke til synlig disk.

så vækst på samtlige selektive substrater. Orale streptokokker udgjorde en meget varierende andel af den totale dyrkbare flora (3-88%), mens laktobaciller typisk udgjorde en mindre andel (3-34%). Dog sås $> 2/3$ laktobaciller i de to tilfælde hvor den totale dyrkbare flora var $> 10^5$ cfu. Enterobakterier udgjorde den mindste andel, $< 0,1-9\%$ af floraen, dog med en enkelt undtagelse, hvor disse var den dominerende bakteriegruppe (Pt. nr. 1, zinkilte-eugenol). I de 13 tilfælde med vækst var enterokokkerne til stede i de 11 (85%).

Tabel 4. Relationen mellem kliniske karakteristika og mikrobiologisk vækst uafhængigt af fyldningsmaterialet.

| Karakteristika | Mikrobiologisk vækst | Antal |
|---|----------------------|-------|
| Lagtykkelse 6 mm. Oplukningskavitet kun okklusal. Ingen brudlinjer. | ÷ | 11 |
| Lagtykkelse 3 mm. Oplukningskavitet kun okklusal. Ingen brudlinjer. | ÷ | 4 |
| Lagtykkelse 3 mm. Disk ej synlig. Evt. mikroskopisk synlige brudlinjer i overfladen. Såvel okklusale som kombinerede oplukningskaviteter. | ÷ | 2 |
| | + | 2 |
| | ++ | 3 |
| Synlig disk. Mistet fyldning eller fraktur af tand. Såvel okklusale som kombinerede oplukningskaviteter. | ++ | 2 |
| | +++ | 4 |
| | ++++ | 2 |

÷ = 0

+ = $0 - \leq 10^2$ ++ = $> 10^2 - \leq 10^4$ +++ = $> 10^4 - \leq 10^5$ ++++ = $> 10^5$

Tabel 4 viser en sammenligning af de kliniske data og de mikrobiologiske data. I undersøgelsen blev der hyppigere observeret vækst under fyldninger med lagtykkelsen 3 mm end under fyldninger med tykkelsen 6 mm. I ni (64%) af de fyldninger hvor oplukningskaviteten involverede både en okklusal og en approximal flade, blev der registreret vækst. Dette var kun tilfældet i fire af 16 fyldninger (25%) hvor oplukningskaviteten kun involverede okklusalfladen. Eksposering af disken skete oftere i kombinerede oplukningskaviteter end i de rent okklusale oplukningskaviteter.

Der opstod tre tandfrakturer og én fraktur af en midlertidig plastfyldning approximalt. På baggrund af gipsmodeller af oplukningskaviteterne kunne det konstateres at de frakturerede tænder havde oplukningskaviteter med underskæring af enten den faciale eller lingvale væg. Tre af frakturerne skete i første testperiode med Coltosolfyldninger, efter hhv. to og 10 dage, i tænder med 6 mm fyldninger, samt efter 20 dage med en 3 mm fyldning. En fraktur blev registreret i anden testperiode på tolvtedagen med zinkilte-eugenol-fyldning.

Diskussion

Resultaterne viste at der er større risiko for vækst under fyldninger med lille lagtykkelse end for vækst under fyldninger med stor lagtykkelse (Tabel 4). I standardiserede *in vitro*-forsøg er det vist at en lagtykkelse af den temporære fyldning på 3,5-4 mm er tilstrækkelig for at opnå en tæt fyldning (3-5). Resultaterne i denne undersøgelse viste imidlertid at det er optimalt at tilstræbe så stor lagtykkelse af fyldningen som muligt, i størrelsesordenen 6 mm. Som en direkte klinisk konsekvens af dette kan brugen af vatpellets under temporære fyldninger anfægtes og bør undlades hvis det medfører en lagtykkelse under 6 mm.

Efter fyldning af 12 tænder med Coltosol® F blev der registreret tre tandfrakturer og fraktur af én plastfyldning. Dette kan hænge sammen med den af fabrikanten oplyste volumetriske ekspansion af Coltosol® F på 17-20%. I de tilfælde hvor Coltosolfyldningerne havde en lagtykkelse på 6 mm, var perioden for registrering af fraktur kortere, end hvor Coltosolfyldningen var 3 mm tyk.

Der er foretaget enkelte *in vivo*-studier som har testet bakterietætheden af temporære endodontiske fyldningsmaterialer (13,25). I begge disse ældre undersøgelser var testperioden minimum én uge, men ikke yderligere specificeret. Endvidere var de metodemæssige aspekter ikke optimale, idet der ikke anvendtes et sterilt arbejdsfelt (25), og undersøgelsen foregik på anteriore tænder (13). I nærværende undersøgelse blev arbejdsfeltet desinficeret med hydrogenperoxid og jod, der derefter blev inaktiveret med thiosulfat (16,17).

Det var relevant med en 2-4 uger lang testperiode for hvert fyldningsmateriale, fordi Ca(OH)₂-indlæg i praksis ligger i kanalerne i én uge eller mere (26), og det er ikke ualmindeligt at der går længere tid. Såvel det første fyldningsmateriale som lagtykkelsen blev tilfældigt udvalgt. En klinisk sammenligning af de temporære fyldninger blev sikret ved at anvende de samme testkaviteter for begge materialer.

Ved mikrobiologiske prøver i forbindelse med revisionsbehandling af persisterende apikal parodontitis ses ofte en overvægt af enterokokker (24, 27-34). Derfor var det særligt interessant at også enterokokgruppen blev dyrket i alle de prøver hvor den totalt dyrkbare flora var $>2,0 \times 10^2$ cfu (11 af 13 tilfælde). Ved anvendelsen af for tynde lagtykkelser af en temporær cement, måske ved brug af vatpellet, er der således risiko for at introducere en enterokokflora under et behandlingsforløb.

Der observeredes flere tandfrakturer ved brug af fyldninger med Coltosol® F end med zinkilte-eugenol. Dette kunne associeres til den relativt store volumetriske ekspansion af Coltosol® F, og der stilles spørgsmålstegn ved anvendelsen af materialet i disse situationer pga. risikoen for fraktur.

Konklusion

Resultaterne viste at det ikke var arten af temporært fyldningsmateriale der var udslagsgivende for bakterietætheden, men derimod lagtykkelsen og den aktuelle oplukningskavitets udformning. Disse to faktorer havde stor betydning for bakterietætheden af de temporære endodontiske fyldninger. Jo tyndere fyldningerne er, og jo flere og større flader oplukningskaviteterne involverer, desto større risiko er der for at der opstår reinfektion med bl.a. enterokokker. Flere kliniske studier er imidlertid nødvendige for at afdække bakterietætheden af fyldningsmaterialer på tænder med større substansstab.

Undersøgelsen er udført med økonomisk støtte fra Statens Sundhedsvidenskabelige Forskningsråd, bevillings nr. 22-03-0104.

DTF's FUT-/Calcin-fonde samt Amtsrådsforeningen (midler til fælles foranstaltninger på tandlægeområdet) takkes for økonomisk bistand.

English summary

Bacterial leakage of temporary endodontic filling materials. A clinical and microbiological investigation

The present investigation tested the bacterial leakage of two temporary endodontic filling materials in a clinical and microbiological setup. Fifteen patients who had ended endodontic treatment of a molar participated. The materials Coltosol® F (Coltène/Whaledent Inc.) and zink oxide-eugenol, where tested in the same cavity with a randomized thickness at 3 or 6 mm.

More fractures were observed in relation to Coltosol fillings than in relation to Zinkoxid Eugenol fillings. This may be connected to the large volumetric expansion (17-20%) of Coltosol® F, and on this account Ketac™ Molar A1 (3M ESPE) replaced Coltosol® F in three cases.

The results showed that there was a connection between bacterial leakage and the thickness of the fillings. There was a greater risk of reinfection with e.g. Enterococcus species, when the filling had a thickness of 3 mm as opposed to 6 mm.

Litteratur

1. Naoum HJ, Chandler NP. Temporisation for endodontics. *Int Endod J* 2002; 35: 964-78.
2. Peters LB, Wesselink PR. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int J Endod* 2002; 35: 660-7.
3. Bobotis HG, Anderson RW, Pashley DH, Pantera EA. A microleakage study of temporary restorative materials used in endodontics. *J Endod* 1989; 15: 569-72.

4. Mayer P, Eickholz P. Microleakage of temporary restorations after thermocycling and mechanical loading. *J Endod* 1997; 23: 320-2.
5. Barthel CR, Strobach A, Briedigkeit H, Göbel UB, Roulet J-F. Leakage in roots coronally sealed with different temporary fillings. *J Endod* 1999; 25: 731-4.
6. Wolanek GA, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough F, Volkman K.R. In vitro bacterial penetration of endodontically treated teeth coronally sealed with dentin bonding agent. *J Endod* 2001; 27: 354-7.
7. Anderson RW, Powll BJ, Pashley DH. Microleakage of three temporary endodontic restorations. *J Endod* 1988; 14: 497-501.
8. Sheng-Fang P, Shue-Fen Y, Wen-Li S, Ling-Huey C, Rivera EM. Mikroleakage between endodontic temporary restorative materials placed at different times. *J Endod* 1999; 25: 453-6.
9. Orahod JP, Cochran MA, Swartz M, Newton CW. In vitro study of marginal leakage between temporary sealing materials and recently placed restorative materials. *J Endod* 1986; 12: 523-7.
10. Chohayeb AA, Bassiouny MA. Sealing ability of intermediate restoratives used in endodontics. *J Endod* 1985; 11: 241-4.
11. Blaney TD, Peters DD, Setterstrom J, Bernier WE. Marginal sealing quality of IRM and Cavita as assessed by microbial penetration. *J Endod* 1981; 7: 453-7.
12. Zaia AA, Nakagawa R, Quadros ID, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. An in vitro evaluation of four materials as barriers to coronal microleakage in root-filled teeth. *Int Endod J* 2002; 35: 729-34.
13. Krakov AA, Destoppelaar JD, Grøn P. In vivo study of temporary filling materials used in endodontics in anterior teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977; 43: 615-20.
14. Asmussen E, Peutzfeldt A, Munksgaard EC. Retentionscementer. København: Odontologisk boghandels forlag; 1997.
15. Bjørndal L. Anvendelsen af kofferdam i den endodontiske procedure hos voksne. *Tandlægebladet* 2002; 106: 784-92.
16. Möller ÅJR. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontol Tidskr* 1966; 74: 1-380.
17. Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller ÅJR. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbial Immunol* 1993; 8: 375-82.
18. Apinhasmit W, Limsombutanon S, Swasdison S, Suppipat N. Effects of autoclave on rubber dam. *J Periodontal Res* 2003; 38: 538-42.
19. Syed SA, Loesche WJ. Survival of human dental plaqueflora in various transportmedia. *Appl Microbiol.* 1972; 24: 638-44.
20. Bjørndal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res* 2000; 34: 502-8.
21. Bjørndal L, Larsen T, Thylstrup A. A microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. *Caries Res* 1997; 31: 411-7.
22. Kilian M, Mikkelsen L, Henriksen J. Taxonomic study of viridans streptococci: Description of *Streptococcus gordonii* sp. nov. and emended description of *Streptococcus sanguis* (White and Niven 1946) *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982) and *Streptococcus mitis* (Andrews and Horder 1906). *Int J Syst Bacteriol* 1989; 37: 471-84.
23. Beighton D, Russell RRB, Whaley RA. A simple biochemical scheme for the differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Caries Res* 1991; 25: 174-8.
24. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31: 1-7.
25. Beach CW, Calhoun JC, Bramwell JD, Hutter JW, Miller GA. Clinical evaluation of bacterial leakage of endodontic temporary filling materials. *J Endod* 1996; 22: 459-62.
26. Trope M, Bergenholtz G. Microbiological basis for endodontic treatment: can a maximal outcome be achieved in one visit. *Endo topics* 2002; 1: 40-53.
27. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Drucker DB. Identification of *Enterococci* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions and their antimicrobial susceptibility to different antibiotics. *Int Endod J* 2004; 37: 346-7.
28. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers *in vitro*. *Int Endod J* 2004; 37: 193-8.
29. Sedgley CM, Wagner R. Orthograde retreatment and apexification after unsuccessful endodontic treatment, retreatment and apicectomy. *Int Endod J* 2003; 36: 780-6.
30. Chávez de Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller Å, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J* 2003; 36: 500-8.
31. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36: 1-11.
32. Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34: 399-405.
33. Siqueira JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001; 34: 1-10.
34. Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997; 30: 91-5.

Forfattere

Merete Hjorth Laustsen¹, skolarstipendiat, stud.odont.

Tove Larsen², lektor, ph.d., og Lars Bjørndal³, lektor, ph.d.

Afdeling for Tandsygdomslære og Endodonti^{1,3} og Afdeling for Oral Mikrobiologi², Odontologisk Institut, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet

Claes Reit, professor, odont.dr.

Avdelning för Endodonti, Odontologiska Fakultetet, Göteborg Universitet, Sverige