

DIN EN ISO 10993-5

ICS 11.100.20

Ersatz für
DIN EN ISO 10993-5:1999-11**Biologische Beurteilung von Medizinprodukten –
Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität (ISO 10993-5:2009);
Deutsche Fassung EN ISO 10993-5:2009**

Biological evaluation of medical devices –
Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO 10993-5:2009);
German version EN ISO 10993-5:2009

Évaluation biologique des dispositifs médicaux –
Partie 5: Essais concernant la cytotoxicité in vitro (ISO 10993-5:2009);
Version allemande EN ISO 10993-5:2009

Gesamtumfang 46 Seiten

Normenausschuss Feinmechanik und Optik (NAFuO) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 10993-5:2009) wurde vom ISO/TC 194 „Biological evaluation of medical devices“ in Zusammenarbeit mit dem CEN/TC 206 „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN (Niederlande) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 027-02-12 AA „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ im Normenausschuss Feinmechanik und Optik (NAFuO).

ISO 10993 besteht unter dem allgemeinen Titel „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ aus folgenden Teilen:

- *Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines Risikomanagementsystems*
- *Teil 2: Tierschutzbestimmungen*
- *Teil 3: Prüfungen auf Genotoxizität, Karzinogenität und Reproduktionstoxizität*
- *Teil 4: Auswahl von Prüfungen zur Wechselwirkung mit Blut*
- *Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität*
- *Teil 6: Prüfungen auf lokale Effekte nach Implantation*
- *Teil 7: Ethylenoxid-Sterilisationsrückstände*
- *Teil 9: Rahmen zur Identifizierung und Quantifizierung von möglichen Abbauprodukten*
- *Teil 10: Prüfungen auf Irritation und Allergien vom verzögerten Typ*
- *Teil 11: Prüfungen auf systemische Toxizität*
- *Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien*
- *Teil 13: Qualitativer und quantitativer Nachweis von Abbauprodukten in Medizinprodukten aus Polymeren*
- *Teil 14: Qualitativer und quantitativer Nachweis von keramischen Abbauprodukten*
- *Teil 15: Qualitativer und quantitativer Nachweis von Abbauprodukten aus Metallen und Legierungen*
- *Teil 16: Entwurf und Auslegung toxikokinetischer Untersuchungen hinsichtlich Abbauprodukten und Extrakten*
- *Teil 17: Nachweis zulässiger Grenzwerte für herauslösbare Bestandteile*
- *Teil 18: Chemische Charakterisierung von Werkstoffen*
- *Teil 19: Physikalisch/chemische, mechanische und morphologische Charakterisierung [Technische Spezifikation]*
- *Teil 20: Prinzipien und Verfahren für die Immuntoxikologische Prüfung von Medizinprodukten [Technische Spezifikation]*

Für die im Abschnitt 2 zitierten Internationalen und Europäischen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 10993-1	siehe	DIN EN ISO 10993-1
ISO 10993-12	siehe	DIN EN ISO 10993-12

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 10993-5:1999-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Norm redaktionell überarbeitet;
- b) Aufnahme von Kontrollproben in Abschnitt 4;
- c) Anpassung der Extraktionszeiten in 4.2.3.2;
- d) Aufnahme von Tabelle 1 und 2 in Abschnitt 8.5 zur qualitativen Bewertung der Zytotoxizität;
- e) Aufnahme des Anhang A „Zytotoxizitätsprüfung durch Aufnahme von Neutralrot“;
- f) Aufnahme des Anhang B „Zytotoxizitätsprüfung mittels Zellkoloniebildung“;
- g) Aufnahme des Anhang C „Zytotoxizitätsprüfung mit MTT“;
- h) Aufnahme des Anhang D „Zytotoxizitätsprüfung mit XTT“;
- i) Aufnahme des Anhang ZA „Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 93/42/EWG“;
- j) Aufnahme des Anhang ZB „Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 90/385/EWG“.

Frühere Ausgaben

DIN EN 30993-5: 1994-08

DIN EN ISO 10993-5: 1999-11

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

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

DIN EN ISO 10993-12, *Biologische Beurteilung von Medizinprodukten — Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien*

Deutsche Fassung

Biologische Beurteilung von Medizinprodukten —
Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität
(ISO 10993-5:2009)

Biological evaluation of medical devices —
Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
(ISO 10993-5:2009)

Évaluation biologique des dispositifs médicaux —
Partie 5: Essais concernant la cytotoxicité in vitro
(ISO 10993-5:2009)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 17. April 2009 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
Einleitung.....	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen.....	6
3 Begriffe	6
4 Vorbereitung von Proben und Kontrollen	7
4.1 Allgemeines	7
4.2 Herstellung flüssiger Extrakte des Materials	7
4.2.1 Grundsätze der Extraktion	7
4.2.2 Extraktionsmedium.....	8
4.2.3 Extraktionsbedingungen.....	8
4.3 Materialvorbereitung für Prüfungen mit direktem Kontakt	9
4.3.1 Form der Prüfmuster	9
4.3.2 Sterilität von Prüfmustern.....	9
4.3.3 Flüssige Prüfmuster	9
4.3.4 Absorbierende Prüfmuster	10
4.4 Vorbereitung von Kontrollen	10
5 Zelllinien	10
6 Kulturmedium.....	10
7 Vorbereitung der Zellstammkultur	11
8 Prüfverfahren	11
8.1 Anzahl der Parallelproben	11
8.2 Prüfung an Extrakten	11
8.3 Prüfung durch direkten Kontakt.....	12
8.4 Prüfung durch indirekten Kontakt	13
8.4.1 Agardiffusion.....	13
8.4.2 Filterdiffusion	14
8.5 Bestimmung der Zytotoxizität	14
9 Prüfbericht.....	16
10 Beurteilung der Ergebnisse	16
Anhang A (informativ) Zytotoxizitätsprüfung durch Aufnahme von Neutralrot	18
A.1 Allgemeines	18
A.2 Versuchsdurchführung	18
A.2.1 Grundlegendes Verfahren.....	18
A.2.2 Material	18
A.2.3 Verfahren	21
A.2.4 Datenanalyse.....	24
Anhang B (informativ) Zytotoxizitätsprüfung mittels Zellkoloniebildung	25
B.1 Allgemeines	25
B.2 Versuchsdurchführung	25
B.2.1 Grundlegendes Verfahren.....	25
B.2.2 Material	25
B.2.3 Verfahren	27
B.2.4 Prüfbericht.....	29

Anhang C (informativ) Zytotoxizitätsprüfung mit MTT	30
C.1 Allgemeines	30
C.2 Versuchsdurchführung.....	30
C.2.1 Grundlegendes Verfahren	30
C.2.2 Material	30
C.2.3 Verfahren	32
C.2.4 Datenaufzeichnung	34
C.2.5 Datenanalyse	34
Anhang D (informativ) Zytotoxizitätsprüfung mit XTT	35
D.1 Allgemeines	35
D.2 Versuchsdurchführung.....	35
D.2.1 Grundlegendes Verfahren	35
D.2.2 Material	35
D.2.3 Verfahren	37
D.2.4 Datenaufzeichnung	39
D.2.5 Datenanalyse	39
Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 93/42/EWG	40
Anhang ZB (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 90/385/EWG	41
Literaturhinweise	42

Vorwort

Dieses Dokument (EN ISO 10993-5:2009) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 194 „Biological evaluation of medical devices“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 206 „Biologische Beurteilung von Medizinprodukten“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom NEN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Dezember 2009, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Dezember 2009 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder] CENELEC sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN ISO 10993-5:1999.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EG-Richtlinien.

Zum Zusammenhang mit EG-Richtlinien siehe informative Anhänge ZA und ZB, die Bestandteile dieses Dokuments sind.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 10993-5:2009 wurde vom CEN als EN ISO 10993-5:2009 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Einleitung

Wegen der generellen Anwendbarkeit von *In-vitro*-Zytotoxizitätsprüfungen und deren weitverbreiteter Anwendung zur Beurteilung eines großen Spektrums von Medizinprodukten und Materialien dient dieser Teil der ISO 10993 eher der Festlegung eines Prüfschemas, das schrittweise Entscheidungen erfordert, als der Festlegung eines einzelnen Prüfverfahrens. Das Prüfschema sollte zur Auswahl des am besten geeigneten Prüfverfahrens führen.

Drei Kategorien von Prüfverfahren werden aufgeführt: Prüfung von Extrakten, Prüfung mit direktem Kontakt und Prüfung ohne direktem Kontakt zwischen Zellen und Material.

Die Auswahl einer oder mehrerer dieser Kategorien hängt von der Art der zu beurteilenden Probe, der möglichen Applikationsstelle und der Art der Anwendung ab.

Diese Auswahl bestimmt dann die Einzelheiten der Vorbereitung der zu prüfenden Proben, die Vorbereitung der Kulturzellen und die Art, wie die Zellen den Proben oder deren Extrakten ausgesetzt werden.

Am Ende der Expositionszeit erfolgt eine Beurteilung hinsichtlich des Vorliegens und Grades der zytotoxischen Wirkung. Die Wahl der Art der Beurteilung wird in diesem Teil der ISO 10993 absichtlich offen gelassen. Ein derartiges Vorgehen führt zur Bereitstellung einer Testreihe, was die Herangehensweise vieler Gruppen widerspiegelt, die biologische *In-vitro*-Prüfungen befürworten.

Die Vielzahl der zur Bestimmung der Zytotoxizität angewendeten Verfahren und gemessenen Endpunkte kann hinsichtlich der Beurteilung in folgende Kategorien eingeteilt werden:

- Beurteilung der Zellschädigung aufgrund morphologischer Veränderungen;
- Messungen der Zellschädigung;
- Messungen des Zellwachstums;
- Messungen spezifischer Aspekte des Zellstoffwechsels.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, in jeder dieser vier Kategorien Ergebnisse zu erzielen. Der Prüfer sollte auf die Prüfkategorien und darauf achten, zu welcher Kategorie ein spezielles Prüfverfahren gehört, damit die Ergebnisse für ähnliche Produkte oder Materialien sowohl innerhalb eines Laboratoriums als auch zwischen Laboratorien verglichen werden können. Beispiele von Vorschriften für quantitative Prüfungen sind in den Anhängen angeführt. Ein Leitfaden zur Auswertung der Ergebnisse wird in diesem Teil der ISO 10993 gegeben.

1 Anwendungsbereich

Dieser Teil der ISO 10993 beschreibt Prüfverfahren zur Beurteilung der In-vitro-Zytotoxizität von Medizinprodukten.

Diese Verfahren legen die Kultivierung von Zellen fest, entweder in direktem Kontakt mit einem Medizinprodukt und/oder Extrakten eines Medizinprodukts oder durch Diffusion.

Diese Verfahren sind dafür ausgelegt, die biologische Reaktion von Säugetierzellen *in-vitro* unter Anwendung geeigneter biologischer Parameter zu bestimmen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

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

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach ISO 10993-1 und die folgenden Begriffe.

3.1

Kulturgefäße

für Zellkulturen geeignete Gefäße, einschließlich Petrischalen aus Glas, Kulturflaschen aus Kunststoff oder Multiwell- und Mikrotiterplatten aus Kunststoff

ANMERKUNG Diese Kulturgefäße sind hinsichtlich ihrer Verwendung in diesen Verfahren wechselseitig austauschbar, vorausgesetzt, sie erfüllen die Anforderungen an die Gewebekulturqualität und sind für die Verwendung mit Säugetierzellen geeignet.

3.2

positives Kontrollmaterial

Material, das bei der Prüfung nach diesem Teil der ISO 10993 eine reproduzierbare zytotoxische Reaktion hervorruft

ANMERKUNG Der Zweck der Positivkontrolle ist es, eine angemessene Reaktion des Prüfsystems anzuzeigen. Zum Beispiel wurde ein mit organischem Zinn stabilisiertes Polyurethan¹⁾ als Positivkontrolle für feste Materialien und Extrakte verwendet. Verdünnungen von Phenol werden zum Beispiel als Positivkontrolle für Extrakte verwendet. Zusätzlich zu einem Material können auch reine Chemikalien zum Nachweis der Leistung des Prüfsystems verwendet werden.

3.3

Blindprobe

Extraktionsmedium ohne Prüfmuster, das in einem Gefäß aufbewahrt wird, das mit dem Gefäß identisch ist, in dem sich das Prüfmuster befindet, und das den gleichen Bedingungen ausgesetzt ist wie das Prüfmuster während der Extraktion

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

ANMERKUNG Die Blindprobe dient der Bewertung möglicher verfälschender Effekte durch das Extraktionsgefäß, das Extraktionsmedium und den Extraktionsprozess.

3.4

negatives Kontrollmaterial

Material, das bei der Prüfung nach der vorliegenden Internationalen Norm keine zytotoxische Reaktion hervorruft

ANMERKUNG Der Zweck der Negativkontrolle ist es, eine Hintergrundreaktion der Zellen anzuzeigen. Zum Beispiel wurden als Negativkontrollen Polyethylen hoher Dichte²⁾ für synthetische Polymere und Stäbe aus keramischem Aluminiumoxid für Dentalwerkstoffe verwendet.

3.5

Prüfmuster

Material, Produkt, Anteil oder Bestandteil eines Produkts, Extrakt oder Anteil davon, das/der der biologischen oder chemischen Prüfung oder Beurteilung unterzogen wird

3.6

Subkonfluenz

etwa 80 % Konfluenz, d. h. das Ende der logarithmischen Phase der Wachstumskurve

4 Vorbereitung von Proben und Kontrollen

4.1 Allgemeines

Die Prüfung ist entweder

a) an einem Extrakt des Prüfmusters

und/oder

b) dem Prüfmuster selbst

vorzunehmen.

Die Probenvorbereitung muss in Übereinstimmung mit ISO 10993-12 erfolgen.

In jeden Versuch sind Negativ- und Positivkontrollen einzubeziehen.

4.2 Herstellung flüssiger Extrakte des Materials

4.2.1 Grundsätze der Extraktion

Die Extraktionsbedingungen sollten die Bedingungen der klinischen Anwendung möglichst simulieren oder übertreffen, damit das toxikologische Gefährdungspotenzial ermittelt werden kann, ohne dass wesentliche Veränderungen des Prüfmusters, wie z. B. Fusion, Schmelzen oder irgendeine Veränderungen der chemischen Struktur, hervorgerufen werden, es sei denn, das wird bei der klinischen Anwendung erwartet. Aufgrund der Beschaffenheit bestimmter Materialien (z. B. biologisch abbaubare Materialien) können während des Extraktionsverfahrens Veränderungen der chemischen Struktur auftreten.

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

Die Angaben in 1) und 2) dienen nur zur Unterrichtung der Anwender über diesen Teil der ISO10993 und bedeuten keine Anerkennung der genannten Produkte durch ISO. Gleichwertige Produkte dürfen benutzt werden, wenn aufgezeigt werden kann, dass diese zum selben Ergebnis führen.

ANMERKUNG Die Konzentration von endogenen Substanzen oder Fremdstoffen im Extrakt und damit die Menge, der die zu prüfenden Zellen ausgesetzt sind, hängt von der Kontaktfläche, dem Extraktionsvolumen, dem pH-Wert, der chemischen Löslichkeit, der Diffusionsrate, der Osmolarität, der Flüssigkeitsbewegung, der Temperatur, der Zeitdauer und anderen Faktoren ab.

Bei Produkten, die das Mischen von zwei oder mehr Bestandteilen im Patienten zum Erhalt des Endprodukts (z. B. Knochenzement) einschließen, sollte das Endprodukt vor der Extraktion nicht gewaschen werden. Das Waschen des Prüfmusters kann auf dem Produkt vorhandene Rückstände verringern oder entfernen. Wenn das Prüfmuster in steriler Umgebung eingesetzt wird, sollte für die Extraktion chemischer Bestandteile ein sterilisiertes Prüfmuster verwendet werden.

4.2.2 Extraktionsmedium

Die Wahl des (der) Extraktionsmediums (Extraktionsmedien) ist unter Berücksichtigung der chemischen Eigenschaften des Materials zu begründen und zu dokumentieren. Bei Versuchen mit Säugetierzellen sind ein oder mehrere der folgenden Extraktionsmedien einzusetzen:

- a) Kulturmedium mit Serum;
- b) physiologische Salzlösung;
- c) andere geeignete Medien.

Die Wahl des Extraktionsmediums sollte vom Ziel der Extraktion bestimmt werden. Es ist die Verwendung sowohl einer polaren als auch einer nichtpolaren Trägersubstanz in Betracht zu ziehen. Das bevorzugte Extraktionsmedium ist Kulturmedium mit Serum. Die Verwendung von Kulturmedium mit Serum wird für die Extraktion bevorzugt, weil dieses Medium in der Lage ist, sowohl das Zellwachstum zu fördern als auch polare und nichtpolare Substanzen zu extrahieren. Zusätzlich zum Kulturmedium mit Serum sollte die Verwendung von Medium ohne Serum in Betracht gezogen werden, um speziell polare Substanzen (z. B. Ionenverbindungen) zu extrahieren. Weitere geeignete Extraktionsmedien sind gereinigtes Wasser und Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO ist in ausgewählten Prüfsystemen bei Konzentrationen von mehr als 0,5 % (Volumenanteil) zytotoxisch. Die zelluläre Expositionskonzentration extrahierbarer Substanzen in DMSO ist im Vergleich zur Extraktion im Kulturmedium mit Serum aufgrund der stärkeren Verdünnung geringer.

ANMERKUNG 1 Es können verschiedene Arten von Serum (z. B. fetales, Rinder-/Kälber-Serum, Serum neugeborener Kälber) verwendet werden; die Wahl des Serums hängt vom Zelltyp ab.

ANMERKUNG 2 Es ist wichtig zu berücksichtigen, dass Serum/Proteine bekanntermaßen einen bestimmten Anteil der extrahierbaren Substanzen binden.

4.2.3 Extraktionsbedingungen

4.2.3.1 Die Extraktion muss in sterilen, chemisch inerten, geschlossenen Behältern unter Anwendung aseptischer Techniken, in Übereinstimmung mit ISO 10993-12, erfolgen.

4.2.3.2 Mit Ausnahme der nachstehend angeführten Fälle ist die Extraktion unter einer der folgenden Bedingungen durchzuführen, die entsprechend den Produkteigenschaften und speziellen Einsatzbedingungen anzuwenden sind:

- a) (24 ± 2) h bei (37 ± 1) °C;
- b) (72 ± 2) h bei (50 ± 2) °C;
- c) (24 ± 2) h bei (70 ± 2) °C;
- d) $(1 \pm 0,2)$ h bei (121 ± 2) °C.

Die vorstehend beschriebenen Extraktionsbedingungen, die verwendet wurden, um ein Maß für das Gefährdungspotenzial zur Risikobewertung des Produktes oder Materials zu liefern, beruhen auf einem früheren

Präzedenzfall. Es dürfen andere Bedingungen, z. B. längere oder kürzere Extraktionszeiten bei 37 °C, angewendet werden, die die während der klinischen Anwendung auftretende Extraktion simulieren oder ein angemessenes Maß für das Gefährdungspotenzial liefern; diese sind jedoch zu begründen und zu dokumentieren. Bei Medizinprodukten, die sich in kurzzeitigem Kontakt (nicht länger als 4 h kumulierter Kontaktdauer) mit intakter Haut oder Schleimhaut befinden und nicht implantiert werden kann das Extraktionszeiten von weniger als 24 h, jedoch nicht weniger als 4 h, wie in a) bis c) angeführt, einschließen.

Ein Zellkulturmedium mit Serum sollte nur nach a) verwendet werden, weil Extraktionstemperaturen von mehr als $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ die chemischen Eigenschaften und/oder Stabilität des Serums und weiterer Bestandteile im Kulturmedium negativ beeinflussen können.

Bei polymeren Prüfmustern sollte die Extraktionstemperatur die Glasübergangstemperatur nicht überschreiten, da eine höhere Temperatur die Zusammensetzung des Extraktionsmittels verändern kann.

4.2.3.3 Wenn der Extrakt vor der Einwirkung auf die Zellen filtriert, zentrifugiert oder auf andere Weise behandelt wird, müssen diese Einzelheiten zusammen mit einer Begründung für die zusätzlichen Schritte im Abschlussbericht (siehe Abschnitt 9) angegeben werden. Sämtliche Einstellungen des pH-Wertes des Extrakts müssen im Prüfbericht angegeben werden. Beeinflussungen des Extrakts, wie z. B. durch Einstellung des pH-Wertes, sollten vermieden werden, da sie das Ergebnis beeinflussen können.

4.3 Materialvorbereitung für Prüfungen mit direktem Kontakt

4.3.1 Form der Prüfmuster

Materialien, die verschiedene Formen, Größen oder physikalische Zustände (z. B. flüssig, gelförmig, fest usw.) haben, dürfen ohne Modifikation in den Zytotoxizitätsversuchen geprüft werden.

Das bevorzugte Prüfmuster eines festen Materials sollte mindestens eine ebene Oberfläche aufweisen. Wenn das nicht der Fall ist, müssen Anpassungen erfolgen, um ebene Oberflächen zu erreichen.

4.3.2 Sterilität von Prüfmustern

4.3.2.1 Die Sterilität der Prüfmuster muss berücksichtigt werden.

4.3.2.2 Prüfmuster von sterilisierten Produkten sind während des gesamten Prüfverfahrens aseptisch zu handhaben.

4.3.2.3 Die Prüfmuster von Produkten, die üblicherweise nicht steril geliefert, aber vor der Anwendung sterilisiert werden, sind nach dem vom Hersteller empfohlenen Verfahren zu sterilisieren und während des gesamten Prüfverfahrens aseptisch zu behandeln.

Die Auswirkung der Sterilisationsverfahren oder -mitteln auf das Produkt sollte bei der Festlegung der Vorbereitung des Prüfmusters vor der Anwendung im Prüfsystem berücksichtigt werden.

4.3.2.4 Die Prüfmuster von Produkten, die zur Anwendung nicht steril sein müssen, sind wie geliefert zu verwenden und sind während des gesamten Prüfverfahrens aseptisch zu handhaben. Es kann gerechtfertigt sein, das Prüfmaterial zu sterilisieren, um eine mikrobielle Kontamination der Zellkultur zu verhindern; jedoch darf der Sterilisationsprozess die Eigenschaften des Prüfmaterials nicht verändern.

Wenn nicht sterile Prüfmuster verwendet werden, sollten sie auf bakterielle Kontamination geprüft werden, weil eine Kontamination zu einer falschen Bewertung der Zytotoxizität führen kann.

4.3.3 Flüssige Prüfmuster

Flüssige Prüfmuster sind entweder durch

a) direkte Zugabe;

oder

b) nach Applikation auf einen biologisch inerten saugfähigen Träger zu prüfen.

Filterscheiben haben sich für die Verwendung als inerte saugfähige Träger als geeignet erwiesen.

4.3.4 Absorbierende Prüfmuster

Sofern zutreffend, müssen absorbierende Materialien vor der Prüfung mit dem Kulturmedium getränkt werden, um eine Adsorption des Kulturmediums aus dem Prüfgefäß zu verhindern.

4.4 Vorbereitung von Kontrollen

Kontrollen sollten so ausgewählt werden, dass diese mit demselben Verfahren wie das Prüfmuster vorbereitet werden können.

5 Zelllinien

Etablierte Zelllinien sind vorzuziehen und sind, wenn sie verwendet werden, von anerkannten Bezugsquellen³⁾ zu beziehen.

Falls eine spezifische Empfindlichkeit gefordert wird, dürfen primäre Zellkulturen, Zelllinien und organotypische Kulturen, die direkt aus lebendem Gewebe entnommen wurden, nur dann verwendet werden, wenn die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Reaktion nachgewiesen werden können.

Wenn eine Stammkultur einer Zelllinie aufbewahrt wird, muss die Aufbewahrung bei –80 °C oder darunter im entsprechenden Kulturmedium, das jedoch ein Kälteschutzmittel, z. B. Dimethylsulfoxid oder Glycerin, enthält, erfolgen. Eine Langzeitaufbewahrung (mehrere Monate bis viele Jahre) ist nur bei –130 °C oder darunter möglich.

Es dürfen nur Zellen, die frei von Mycoplasmen sind, für die Prüfung verwendet werden. Vor der Anwendung sollten die Stammkulturen auf das Nichtvorhandensein von Mycoplasmen überprüft werden.

Es ist wichtig, die Zellen regelmäßig zu überprüfen (z. B. Morphologie, Verdopplungszeit, modale Chromosomenzahl), da sich die Empfindlichkeit in den Prüfungen mit der Passagezahl ändern kann.

Die Gute Zellkulturpraxis sollte angewendet werden. Siehe Literaturhinweis [5].

6 Kulturmedium

Das Kulturmedium muss steril sein.

Das Kulturmedium mit oder ohne Serum muss den Wachstumsanforderungen der gewählten Zelllinie entsprechen.

Antibiotika dürfen dem Medium beigegeben werden, vorausgesetzt, dass sie die Versuche nicht nachteilig beeinflussen.

3) Zum Beispiel werden die Zelllinien American Type Culture Collection CCL 1 (NCTC Klon 929), CCL 163 (Balb/3T3 Klon A31), CCL 171 (MRC-5) und CCL 75 (WI-38), CCL 81 (Vero) und CCL 10 [(BHK-21(C-13))] und V-79 379A von Experten der ISO als geeignet angesehen.

Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender von diesem Teil der ISO10993 und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch ISO. Andere Zelllinien dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen oder aussagekräftigeren Ergebnissen führen.