

Dr. Müller-Lierheim GmbH
Krautstr. 2
87700 Memmingen
Tel. (08331) 9552-22
Fax (08331) 4 74 78

PRÜFBERICHT

Projekt #	95052201
Auftraggeber	Dr. Ihde Dental AG Lindenstr. 68 CH-8738 Uetliburg
Prüfauftrag	Zytotoxizitätsprüfung (Agar - Überschichtungstest)
Prüfgegenstand	Primabond
Eingang der Prüfgegenstände	22.05.1995
Prüfleiter	C. Platte
Prüfort	Biologisches Laboratorium, Memmingen
Beginn der Untersuchung	29.05.1995
Abschluß der Untersuchung	31.05.1995
Archivierung	Rohdaten und eine Kopie dieses Prüfberichtes werden im Archiv der Dr. Müller-Lierheim GmbH aufbewahrt.

Dieser Prüfbericht darf nur vollständig, oder nach vorheriger schriftlicher Zustimmung des Prüflaboratoriums auszugsweise vervielfältigt werden.

Die Prüfergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die vom Auftraggeber zur Verfügung gestellten Prüfgegenstände.

1. Zusammenfassung

Der Zweck dieser Untersuchung war, zu prüfen, ob sich aus der Zahnfüllmasse Primabond toxische Substanzen herauslösen lassen.

Der Agar-Überschichtungstest wurde gewählt, da hierbei die „unsterilen“ Muster original verwendet werden können und nicht zwingend steril sein müssen wie für den Wachstumsinhibitionstest. Ein Autoklavieren oder Waschen der Prüfmuster mit Alkohol kann einen eventuell vorhandenen toxischen Effekt vermindern oder zerstören.

Die Probe wurde sowohl original, als auch gewaschen mit 70 %igem Alkohol im Test verwendet. Dabei stellte sich heraus, daß die Alkoholbehandlung die vorhandene mäßig toxische Reaktion abgeschwächt, aber nicht völlig verhindert hat. Eine Alkoholprobe zeigte keine toxische Reaktion.

2. Materialien, Probenpräparation und Prüfsystem

2.1. Material

Negativ-Kontrolle

Als Negativ-Kontrolle dienten die Zellen ohne Proben.

Positiv-Kontrolle

Als Positiv-Kontrolle dienten ca. 2 mm dicke Scheiben von Silastic Foley Katheter (Dow Corning, Cat.Nr. 334-16, Lot-Nr. WM 050049).

Alkohol-Kontrolle

Als Kontrolle, ob minimale Alkoholrückstände der Waschprozedur einen Einfluß auf das Testergebnis haben können, wurden in einen Glasring auf dem Agar zwei Tropfen des 70 %igen Alkohols gegeben.

Zellkulturmedium (DMEM)

Dulbecco's modified Eagle Medium (Sigma D-5546) mit Zusatz von:

10 % v/v	fötalem Kälberserum (Seromed S 0115)
370 mg / ml	Natrium hydrogen carbonat (Merck 6329)
30 mg/100ml	L-Glutamin (Seromed K 0281)
5 mg/100ml	L(+) Ascorbinsäure (Merck 1.00127)
14 mg/100ml	Streptomycin (Sigma P-3539)

PBS

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung

8,1 mM	di-Natrium hydrogen phosphat, Dihydrat
1,5 mM	Kalium dihydrogen phosphat
2,7 mM	Kaliumchlorid
137 mM	Natriumchlorid

pH auf 7,2 eingestellt und autoklaviert

Trypsin / EDTA

0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA in Ca^{2+} / Mg^{2+} - freiem PBS (Fa. Seromed, Nr. L-2153)

Ethanol, 70 %

Absoluter Alkohol, z.A. (Merck # 1.00983), verdünnt mit destilliertem Wasser

Agar - Lösung

3% Agar (Sigma A-9915), gelöst in sterilem H_2O .

DMEM, doppelt konzentriert

Normales Zellkulturmedium, aber doppelt konzentriert angesetzt aus Pulvermedium (Sigma D-5523).

Agar / DMEM

- 1 Teil Agar-Lösung, 3%
- 1 Teil DMEM, *doppelt* konzentriert.

Neutralrot-Vitalfärbung:

- Stocklösung: 0,1% (g/v) Neutralrot (Sigma N-7005), gelöst unter Rühren in H₂O dest., filtriert durch Whatman No. 1 Filter, autoklaviert und bei 4°C vor Licht geschützt aufbewahrt.
- Färbelösung: (Frisch vor Gebrauch angesetzt !): Stocklösung 1/10 mit PBS verdünnt und steril filtriert durch 0,2 µm Filter (Schleicher & Schüll, FP 030/3). Vor Licht geschützt bis zum Gebrauch aufbewahrt.

Zellkulturschalen

- 100 mm - Zellkulturschalen (Costar # 3100)

Mikroskop zur optischen Begutachtung

- Olympus IMT 2 mit Vergrößerungen 40- und 100-fach.

2.2. Probe

Das Prüfmuster Primabond (Ch.B.: BJ M01) sowie eine Polymerisationslampe zum Aushärten (arcus1, LITEMA, Ref. No.: ABL-1) wurden vom Auftraggeber zur Verfügung gestellt.

2.3. Probenpräparation

Das Prüfmuster war eine hochviskose braungelbe Flüssigkeit. Auf einer aseptischen Unterlage wurden Glasringe mit einem Innendurchmesser von 1,1 cm plziert und jeweils 5 Tropfen der Flüssigkeit eingetropt. Mit der Lampe wurde 40 Sekunden lang gehärtet und anschließend die gehärteten Scheiben mit einer stumpfen Pinzette herausgedrückt.

Ein Teil der so erhaltenen Prüfstücke wurde original auf den Agar plziert. Der andere vorher 5 Minuten lang in 70 %igem Ethanol gewaschen (in einer Petrischale

unter leichtem Schwenken) und anschließend in der sterilen Werkbank an der Luft getrocknet.

2.3. Prüfsystem

L929 Zellen (ATCC Nr. CCL1, NCTC Klon 929, Bindegewebe der Maus, Klon des Stammes L), im folgenden L929-Mausfibroblasten genannt.

Eine Zellbank mit L929-Zellen wird bei -196°C gehalten. Einige Zellen werden ständig mit Standard-Zellkulturtechniken in Kultur gehalten (37°C , 95% Luftfeuchte, 5% CO_2).

3. Prüfmethode

Agar-Überschichtungstest in Anlehnung an ISO/TR 7405-1984 und ISO 9363-1-1994.

Die L929-Zellen / Passage 592 befanden sich in proliferierendem, nicht ganz konfluentem Zustand. Durch Trypsinieren wurden sie in Suspension gebracht, in normalem DMEM aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Pro Schale wurden $1,8 \times 10^6$ Zellen in 10 ml normalem DMEM ausgesät.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden (5% CO_2 , 37°C , 95 % Luftfeuchte) wurde das überstehende Medium entfernt und durch 10 ml ca. 42°C -warme Agar / DMEM - Mischung ersetzt. Nach 30 Minuten Inkubation (5% CO_2 , 37°C) war der Agar fest.

Die Zellen wurden mit 10 ml frisch angesetzter Neutralrot-Gebrauchslösung angefärbt (30 min, 5% CO_2 , 37°C , 95 % Luftfeuchte). Die überschüssige Färbelösung wurde mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette sehr sorgfältig aus der schräg gestellten Petrischale abgesaugt, ohne den Agar zu beschädigen.

Auf die Oberfläche wurden nun die Proben gegeben. Es wurde eine Fläche von ca. 1 cm^2 bedeckt.

Pro Zellkulturschale wurden 1 Probe bzw. 1 Positiv-Kontrolle plaziert. Als Negativprobe diente eine Schale ohne Proben. Als Kontrolle, ob minimale Alkoholrückstände der Waschprozedur einen Einfluß auf das Testergebnis haben können, wurden in einen Glasring auf dem Agar zwei Tropfen des 70 %igen Alkohols gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden alle Proben gegen einen hellen Hintergrund und unter dem Mikroskop bei 40- und 100-facher Vergrößerung beobachtet. Die Befunde wurden gemäß nachfolgenden Tabellen klassifiziert:

Zonen Index	Beschreibung der Zone
0	keine erkennbare Zone um die Probe herum oder unter dieser
1	Zone begrenzt auf die Fläche unter der Probe
2	Zone nicht weiter als 5 mm um die Probe herum ausgedehnt
3	Zone nicht weiter als 10 mm um die Probe herum ausgedehnt
4	Zone weiter als 10 mm um die Probe herum ausgedehnt, aber nicht über die gesamte Platte
5	Zone über die ganze Platte ausgebreitet

aus: ISO/TR 7405-1984

Lysis Index	Beschreibung der Zone
0	keine Lyse zu beobachten
1	bis zu 20 % der Zellen in Lyse
2	20 % bis 40 % der Zellen in der Zone in Lyse
3	40 % bis 60 % der Zellen in der Zone in Lyse
4	60 % bis 80 % der Zellen in der Zone in Lyse
5	über 80 % der Zellen in der Zone in Lyse

aus: ISO/TR 7405-1984

Response - Index = Zonenindex / Lysis-Index

Beurteilung	Interpretation	Response Index (Mittelwert aus zwei Proben)
0	nicht zytotoxisch	0/0 bis 0,5/0,5* oder 1/0
1	schwach zytotoxisch	1/1 bis 1,5/1,5
2	mäßig zytotoxisch	2/2 bis 3/3
3	stark zytotoxisch	4/4 bis 5/5

* If a response index 0,5/0,5 is obtained from the average of 2 tests with results 1/1 and 0/0 the test shall be repeated.
aus: ISO 9363-1-1994

4. Ergebnis

Die Begutachtung nach 24 Std. Inkubation zeigte folgendes Ergebnis:

Zonen-Index: 2

Lysis-Index: 3

Response-Index: 2/3

Bewertung: das Muster wurde als mäßig zytotoxisch eingestuft

Memmingen, 01.06.1995



C. Platte
Leiterin Biologische Laboratorien
Dr. Müller-Lierheim GmbH



J. Peeters
Leiter Physikal. - Chem. Laboratorien
Dr. Müller-Lierheim GmbH

5. Bibliographie und Normen

- | | |
|-------------------|--|
| ISO/TR 7405: 1984 | Biological evaluation of dental materials |
| ISO 9363-1: 1994 | Optics and optical instruments-Contact lenses-Determination of cytotoxicity of contact lens material- Part 1: Agar overlay test and growth inhibition test |
| EN 30993-5: 1994 | Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for cytotoxicity: <i>in vitro</i> methods |