

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
BILTHOVEN

Rapport nr. 319011008

Biocompatibiliteit van chirurgische handschoenen:
extraheerbare cytotoxische stoffen

M.F. van Geffen, J.C.A. Machielsen,
T.J.H. Orzechowski en J.A.A.M. van Asten

oktober 1994

Dit onderzoek werd verricht in het kader van project 319011 "Normalisatie medische hulpmiddelen", in opdracht van Directie Geneesmiddelenvoorziening (GMV)

VERZENDLIJST

- 1 Directeur van de Directie Geneesmiddelenvoorziening, Dr. C.M. de Vos, arts
- 2 Directeur-Generaal van de Volksgezondheid, Prof.Dr. B. Sangster
- 3 Plaatsvervangend Directeur-Generaal van de Volksgezondheid, Drs. A.H.C. Annink
- 4 Plaatsvervangend Directeur-Generaal van de Volksgezondheid, Drs. R.J. Samsom
- 5 Directie Geneesmiddelenvoorziening, Hoofdafdeling Kwaliteitsbeleid Geneesmiddelen en Medische Hulpmiddelen, Dhr. A. de Vries
- 6 Geneeskundig Hoofdinspecteur van de Volksgezondheid, G.H.A. Siemons, arts
- 7 Hoofdinspecteur van de Volksgezondheid voor de Geneesmiddelen, drs. P.H. Vree
- 8 Hoofdinspecteur van de Volksgezondheid voor de Gezondheidszorg, J. Verhoeff, psychiater
- 9 Secretariaat CEN/TC 206
- 10 Depôt Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie
- 11 Directie van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
- 12 Sectordirecteur van Sector VI (Stoffen en Risico's) van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
- 13 Hoofd van het Laboratorium voor Geneesmiddelen en Medische hulpmiddelen
- 14 Afdelingshoofd van de Afdeling Medische Hulpmiddelen van het Laboratorium voor Geneesmiddelen en Medische hulpmiddelen
- 15-17 Auteurs
- 18 Hoofd Bureau Voorlichting & Public Relations Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne
- 19/20 Bureau Projecten- en Rapportenregistratie
- 21 Bibliotheek RIVM
- 22-43 Reserve-exemplaren

	blz.
VERZENDLIJST	ii
INHOUDSOPGAVE	iii
SUMMARY	iv
SAMENVATTING	1
1 INLEIDING	2
1.1 Europese ontwikkeling van biocompatibiliteitstesten	2
1.2 Latex als medisch hulpmiddel	2
1.3 Cytotoxiciteit en allergeniciteit	3
1.4 Doel	4
1.5 Principe	4
1.5.1 Celgroeiremming	4
1.5.2 L(+)lactaatdehydrogenase lekkage	5
1.5.3 ATP depletie	6
1.5.4 Agar overlay	6
2 MATERIALEN & METHODEN	6
2.1 Materialen	6
2.1.1 Referentiematerialen	6
2.1.2 Onderzoeksmaterialen	7
2.2 Methoden	8
2.2.1 Extractie van materialen	8
2.2.2 Celgroeiremmingstest	8
2.2.3 L(+)lactaatdehydrogenase (LDH) test	9
2.2.4 ATP depletie test	10
2.2.5 Agar overlay test	11
3 RESULTATEN	13
3.1 Relatie met literatuurgegevens	16
4 DISCUSSIE	17
5 CONCLUSIE	19
6 REFERENTIES	20

SUMMARY

With a panel of four cytotoxicity tests, using parameters cell growth inhibition, LDH release for membrane permeation, ATP depletion for cellular metabolic intoxication and the direct contact test agar-overlay, a comparison was made in leachable cytotoxicity of a panel of twelve latex and non-latex gloves. Purpose of the investigation was to validate standards for cytotoxicity evaluation of medical gloves. Four cytotoxicity tests were used to evaluate 12 types of medical gloves. Tests used were LDH release for membrane permeation, cell growth inhibition, ATP depletion for metabolic interference and the agar overlay test, as an indirect contact test. The investigation resulted in the conclusion that latex gloves analyzed were predominantly cytotoxic. It appeared that for the results of strong cytotoxic gloves the four tests used were individually affirmative. The agar overlay is not appropriate for the mentioned application, as it appeared to give in 5 cases either a false positive or negative result compared to the other tests used. The ATP depletion test appeared to be the test most sensitive to migrating cytotoxic additives. This test appeared to give an indication of maximal cytotoxicity in cases where the tests cell-growth inhibition or LDH release gave half maximal cytotoxicity. As glove users report 25 to 41% of non allergic irritation in relation to glove use, it is clear that qualifications for cytotoxicity are desired. The tests as used for this analysis give the manufacturing industry a tool for a detailed product evaluation as stated in the standard released by CEN/TC 206. Some of the gloves tested show already low to intermediate cytotoxicity, indicating that reduction to an appropriate level of cytotoxicity is possible.

SAMENVATTING

Met een panel van vier cytotoxiciteitstesten met als parameters; celgroeiremming, LDH afgifte voor membraan permeatie, ATP depletie voor cellulaire metabole intoxicatie en de indirect contact test "agar-overlay" is een vergelijkend onderzoek uitgevoerd op een panel van 12 latex en niet latex handschoenen. Doel van het onderzoek was om cytotoxiciteits testen als standaarden voor medische handschoenen te evalueren. Uit het onderzoek is gebleken dat de onderzochte latex handschoenen overwegend cytotoxisch zijn. De resultaten van de vier testen zijn voor de groep sterk cytotoxische handschoenen onderling bevestigend. The "agar-overlay" is minder geschikt voor de onderzochte toepassing, aangezien deze test in vijf gevallen een vals positief of negatief resultaat gaf in vergelijking met de drie overige testen. De ATP-depletie test blijkt het meest gevoelig voor migrerende cytotoxische stoffen. Deze test scoort maximaal bij monsters waar de LDH afgifte of celgroeiremming halfmaximaal scoren. Aangezien van de handschoen gebruikers 25 tot 41% een niet allergene vorm van irritatie vertoont, is het duidelijk dat normstelling voor de handschoen gerelateerde cytotoxiciteit vereist is. Met de testen zoals gebruikt voor de analyse beschikt de industrie over een gedetailleerde evaluatie voor produkt controle aan de door CEN TC/206 opgestelde norm. Enkele geteste handschoenen vertonen reeds een matige tot zeer verlaagde toxiciteit wat aangeeft dat het niet onmogelijk is veilige (niet-irritante) latex produkten te maken.

1 INLEIDING

1.1 Europese ontwikkeling van biocompatibiliteitstesten

In een aantal Europese landen zijn testen voorgeschreven welke uitgevoerd dienen te worden om de veiligheid van een produkt aan te tonen, alvorens het in de handel mag worden gebracht in het betreffende land. In Europa wordt nu vanuit de EU deze regelgeving voor de lidstaten geharmoniseerd. Om de biocompatibiliteit van medische hulpmiddelen vast te stellen is er door ISO (International Standardization Organisation) en in het bijzonder wat betreft Europa door CEN (Comitee Europeen de Normalisation) een stelsel van standaarden (biocompatibiliteitstesten) ontwikkeld. Daarnaast is er een schema waaruit kan worden afgeleid welk medisch hulpmiddel, afhankelijk van de toepassing, met welke biocompatibiliteitstesten dient te worden onderzocht. Dit schema is de zogenaamde testmatrix. Uit de testmatrix kan worden afgeleid dat de in-vitro cytotoxiciteitstesten van toepassing zijn op alle medische hulpmiddelen (ISO 10993; Biological evaluation of Medical devices⁵).

Binnen het Laboratorium voor Geneesmiddelen en Medische hulpmiddelen is in 1989 het onderzoek: "Biocompatibiliteit" onderdeel van het project "Normalisatie van medische hulpmiddelen" (319011) gestart. Het doel van het onderzoek is het bepalen van de praktische waarde van bestaande biocompatibiliteitstesten voor medische hulpmiddelen, het ontwikkelen en valideren van nieuwe testen welke zonedig oude testen vervangen of als aanvulling dienen. Recent zijn in het kader van dit project twee in-vitro cytotoxiciteitstesten ontwikkeld en gevalideerd. De nieuwe testen zijn vergeleken en gevalideerd ten opzichte van de reeds bestaande standaard 'Agar-Overlay test'. Bij de validatie van deze testen 'Celgroei-remming' en 'LDH-release' is gelet op hun gevoeligheid, reproduceerbaarheid en toepasbaarheid. Voor de validatie¹⁻³ is gebruik gemaakt van positieve en negatieve referentiematerialen en relevante medische hulpmiddelen voor de analyse van cytotoxiciteit van biomaterialen. Een derde assay gebaseerd op intracellulaire ATP depletie⁴ wordt onderzocht op bovenstaande validatie criteria.

1.2 Latex als medisch hulpmiddel

De toepassing van latex in medische hulpmiddelen zoals chirurgische handschoenen en condooms blijkt controversieel, gezien de toenemende incidentie van eczeem, contact urticaria en acute allergische reacties¹ (zie literatuur referenties). Latex wordt in een groot aantal medische hulpmiddelen toegepast zoals catheters, beademingsballonnen, kinderspenen, chirurgische en onderzoeks-handschoenen en condooms. De meeste chirurgische handschoenen worden gemaakt van het uitgangsmateriaal verkregen van de rubberboom *Hevea Brasiliensis*. De oorspronkelijk uit het amazone

gebied afkomstige boom wordt gebruikt op rubberplantages in o.a. Maleisië, India, Thailand en Indonesië. De verse latex bevat een groot aantal organische stoffen waaronder het rubber polymeer 1,4 cis-polyisopreen (15%), eiwit, harsen vetzuren, koolhydraten elk in concentraties tussen 1 en 2% en een gering percentage anorganische zouten. Voor de verse rubber verwerkt is tot medisch hulpmiddel worden op het materiaal een aantal bewerkingen toegepast. Direct na winning wordt ter conservering aan het produkt ammoniak toegevoegd. Door centrifugatie wordt het polymeer geconcentreerd en het eiwitgehalte verlaagd. Tijdens een vulcanisatie stap worden de polymeren gebonden waardoor een netwerk ontstaat met de gewenste elastische eigenschappen. De uiteindelijke vorm van het produkt wordt verkregen via doping in een latexbad. Teneinde de genoemde processen gecontroleerd te laten verlopen of de materiaal eigenschappen te verbeteren worden versnellers, weekmakers, antioxidanten, bind- vul- kleur- en strek-middelen toegevoegd. Als acceleratoren en weekmakers worden thiurams, carbamaten, thioureas en benzathiazolen toegevoegd. Voor antioxidanten worden IPPD (Isopropyl-phenyl-phenylenediamine) en PBN (phenyl-beta-naphthylamine) toegepast^{2,3}. Synthetische polymere handschoenen, bijvoorbeeld vinyl, bevatten meestal niet de bovengenoemde stoffen echter wel weekmakers, stabilisatoren, smeermiddelen en kleurstoffen. De aanwezigheid en concentratie van de genoemde stoffen in zowel latex als synthetische handschoenen verschilt per producent en/of type handschoen.

1.3 Cytotoxiciteit en allergeniciteit

Van latex biomaterialen is bekend dat extracten een acuut toxisch effect bezitten⁴. Dit effect is zodanig dat latex wordt genoemd als positief referentie materiaal bij in vivo en cytotoxiciteitstesten ter bepaling van de biocompatibiliteit van medische hulpmiddelen⁵. De cytotoxiciteit wordt veroorzaakt door migratie van de chemische toevoegingen uit het materiaal. De stoffen veroorzaken een niet-allergische vorm van eczeem. De genoemde toevoegingen veroorzaken tevens een vorm van allergie (type IV)⁶. Dit type allergie geeft bij patiënten een reactie in de vorm van o.a. urticaria⁷, zeer incidenteel echter in toenemende mate wordt een type I acute vorm van allergie tegen deze stoffen gevonden. Verschil tussen eczeem gerelateerd aan cytotoxiciteit of allergeniciteit wordt geconstateerd met provocatie testen of in vitro serum diagnose met een rubber gerelateerde chemicaliën reeks⁸.

Van de carbamaten zoals toegevoegd in de latex is bekend dat deze zowel cytotoxisch zijn als verantwoordelijk voor een type IV allergische respons². Voordat een patiënt gesensibiliseerd wordt tegen latex chemicaliën kan een periode van 4 maanden tot 14 jaar verstrijken. Naast de door chemicaliën veroorzaakte reacties is in het eindprodukt resterend eiwit verantwoordelijk voor een acute vorm van allergie⁹. Deze vorm van allergie heeft geleid tot een door de FDA uitgegeven "medical alert" (maart 1991).

Steriele chirurgische handschoenen worden met gammastraling ofwel met ethylene oxide gesteriliseerd. Ethylene oxide is cytotoxisch, mutageen verdacht en kan bij hoge concentraties zelfs verbrandingsverschijnselen veroorzaken^{10,11}. Ethylene oxide kan tevens als hapteen allergische reacties

veroorzaken. Bij de onderzochte materialen wordt dan ook aangegeven hoe deze gesteriliseerd zijn. De incidentie van irritatie en de verschillende typen allergieën worden samengevat door Holzman². Uit een inventariserend onderzoek door Turjanmaa¹² op ziekenhuispersoneel werd geconcludeerd dat van 512 personen 3% type I allergie vertoonden. Voor het operatiekamer (OK) personeel was de incidentie verhoogd; 5.6% voor de verplegers en 7.4% voor de chirurgen. Van het ziekenhuis personeel klaagde 25% over irritatie zonder dat allergie kon worden aangetoond. In een ander onderzoek op 248 OK-verplegers was 10.6% natuurlijk latex serum positief, 41% rapporteerde handschoen irritatie¹³. Het vermoeden bestaat dat de cytotoxiciteit van de migrerende chemicaliën een adjuverend effect bezit voor zowel allergie tegen de toevoeging als de eiwit component¹². Naast de toepassing bij medische hulpmiddelen wordt latex ook veel in de niet medische sector toegepast. Bekend is het latex(kinder) ballonnetje, minder bekend is de toepassing als versteviging bij papier/non-wovens.

1.4 Doel

Doel van het onderzoek is een vergelijking te maken in cytotoxiciteit met een recent ontwikkeld panel van testen. De gevonden data zullen gerelateerd worden aan literatuurgegevens betreffende irritatie door handschoenen. Aangezien een aantal van in de handschoenen aanwezige stoffen tevens allergene eigenschappen bezit wordt de gevonden cytotoxiciteit tevens gerelateerd aan allergeniciteitsprevalentie voor de betreffende handschoenen. De gevonden resultaten zullen gebruikt worden bij de normstelling voor deze groep van medische hulpmiddelen. Resultaten van dit onderzoek zullen gepresenteerd worden aan CEN/TC 206 en CEN/TC 205 WG3 waar normen voor de biocompatibiliteit van chirurgische handschoenen worden opgesteld. De relevantie van de gevonden resultaten in het kader van failure prediction in relatie met literatuurgegevens zal bediscussieerd worden.

1.5 Principe van de cytotoxiciteitstesten

Bij de toegepaste testen worden de cellen in contact gebracht met extracten van medische hulpmiddelen. Na incubatie wordt de invloed van het extract op de parameters celgroei en LDH release onderzocht^{1,2}.

1.5.1 Celgroeiremmingstest

Bij de test wordt een extract van een medisch hulpmiddel in contact gebracht met cellen in een weefselkweek. De mate van optredende celgroeiremming wordt gemeten met een colorimetrische assay waarbij gebruik gemaakt wordt van de kleurstof methyleenblauw.

In essentie berust de test op het bestaan van een lineaire relatie tussen hoeveelheid celmateriaal en kleuropbrengst.

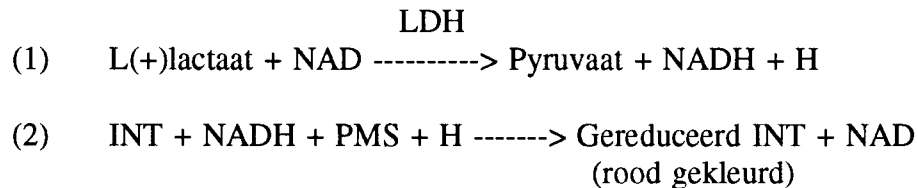
Basofiele stoffen zoals nucleïnezuren of eiwitten reageren met methyleenblauw. Na histologische fixatie van de cellen worden de cellen gekleurd bij pH 8.4. De overmaat kleurstof wordt weggewassen met een

buffer van dezelfde pH. De gefixeerde kleurstof wordt uit de cellen vrijgemaakt met behulp van HCl. De intensiteit van de zo verkregen gekleurde oplossing is evenredig met de hoeveelheid basofiele cellulaire componenten en hieruit kan een relatie met celgroei worden gelegd. De hoeveelheid basofiele componenten is per celtype verschillend. De absorptie van methyleenblauw wordt gemeten in een densitometer bij 650 nm.

1.5.2 Lactaatdehydrogenase lekkage test

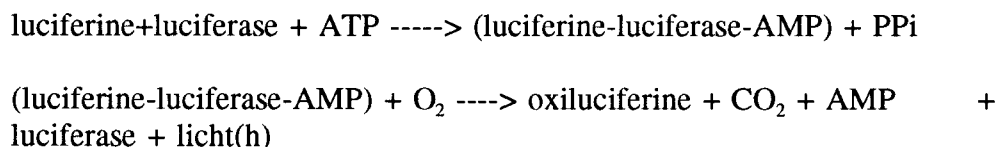
De methode is gebaseerd op het colorimetrisch meten van de lactaatdehydrogenase (LDH) activiteit in celsupernatant. Er kan celmembraanschade optreden als gevolg van blootstelling van de cellen aan testmaterialen of extracten daarvan. Het quotiënt van het vrijgekomen LDH in het supernatant (E) en de totale hoeveelheid LDH van gelyseerde cellen (M) gecorrigeerd voor de blanco lekkage van LDH (S) is een maat voor de LDH lekkage uit de cel en daarmee tevens een maat voor het cytotoxische effect van testmaterialen op cellen. Bij de omzetting van L(+)lactaat onder invloed van het vrijgekomen LDH wordt pyruvaat en NADH gevormd (zie reactie 1). De electronen van NADH worden kwantitatief met een electronen carrier: phenazinemethosulfaat overgedragen op INT (zie reactie 2). Het rood gekleurde produkt dat ontstaat uit reductie van INT (zie reactie 2) wordt gevormd middels een irreversibele reactie. De hoeveelheid gevormd produkt die ontstaat per tijdseenheid is een maat voor de enzymactiviteit en dus een maat voor de LDH lekkage. De meetwaarden worden uitgedrukt in een percentage van het op t=0 aanwezig intracellulair LDH.

Reacties:



1.5.3 ATP depletie

Als gevolg van blootstelling aan extracten kan via diffusie van cytotoxische componenten het cellulaire metabole enzym systeem ontregeld raken meetbaar in o.a. intracellulaire ATP depletie. Het ATP wordt gemeten middels bioluminescentie waarbij het luciferase/luciferine-enzym systeem het lichtproducerende systeem is. De hierbij horende reactievergelijking is:



Hier is luciferase het ATP-specifiek enzym en luciferine de betreffende

cofaktor. De te meten lichtintensiteit is lineair met de ATP concentratie. Het reactieoptimum wordt ca.300 msec. na additie van luciferine/luciferase bereikt. De intracellulaire ATP depletie wordt gevonden door de meetwaarden te relateren aan de ATP concentratie van de blanco controle op t=0. De ATP wordt tevens extracellulair bepaald om te controleren voor depletie door lekkage.

1.5.4 Agar Overlay

Een celcultuur laat men tot een confluyente monolaag uitgroeien op 6 wells-platen. Na 24 uur wordt het medium vervangen door een agar bevattend medium welke men daarna laat stollen. Het te testen medisch hulpmiddel en/of extract daarvan op filter en de controles worden op het agaroppervlak gebracht. Toxische componenten die aanwezig zijn in het medisch hulpmiddel diffunderen via de agar en oefenen cytotoxische effecten uit op de cellen (bv. membraanbeschadigingen). Na incubatie met het vast medisch hulpmiddel of extract worden de cellen gekleurd met neutraalrood. Neutraalrood wordt door gezonde cellen in het cytoplasma opgenomen terwijl beschadigde cellen deze kleurstof niet opnemen. Onder en rond het te testen materiaal wordt bij cytotoxiciteit een ont kleuringszône waargenomen. Tevens wordt binnen de ont kleuringszône gekeken naar de mate van celschade.

2 MATERIALEN & METHODEN

2.1 Materialen

2.1.1 Referentiematerialen

- Latex rubber, rubber B.V., Hilversum.
- U.H.M.W. polyethyleen, Goodfellow.

2.1.2 Onderzoeksmaterialen

In tabel 1 worden de onderzochte materialen beschreven. De overige gebruikte materialen/hulpmiddelen die nodig waren om de testen uit te kunnen voeren staan beschreven in de volgende R.I.V.M. rapporten (zie referenties); 319011003, 319011004, 319011005 en 319011006. De resultaten van materiaal 13-15 zijn uit bovenstaande rapporten overgenomen.

no	materiaal	bionum- mer	producer	type	steril. meth.	powder	sterile
1	glove	93001	A	vinyl	gamma	-	+
2	glove	93002	B	vinyl	gamma	-	+
3	glove	93003	C	vinyl	EtO	-	+
4	glove	93004	D	latex	gamma	+	+
5	glove	93005	E	latex	gamma	+	+
6	glove	93006	F	latex	gamma	+	+
7	glove	93007	G	latex	EtO	-	+
8	glove	93008	H	latex	gamma	+	+
9	glove	93024	I	latex	gamma	-	+
10	exam.glove	93025	I	latex	EtO	+	-
11	glove	93009 in	J	latex	gamma	-	-
12	glove	93009 out	J	latex	gamma	-	-
13	exam. glove	92001	K	vinyl	EtO	-	-
14	exam. glove	92002	E	latex	EtO	-	-
15	glove	92003	E	latex	gamma /EtO	-	+
	pos. ref.	91001	Rubber bv.	latex	EtO	-	
	neg. ref.	91005	Good Fellow	PE	EtO	-	
	pos. ref.	91002	BSI	PVC org.- tin	EtO	-	

Tabel 1

De onderzochte materialen

2.2 Methoden

De methoden zoals hieronder beschreven worden uitgevoerd conform LGM standaard operation procedures (SOP).

2.2.1 Extractie van materialen

Om extracten te verkrijgen, worden zowel de (bio)materialen als de referentie-materialen (positieve- en negatieve controle) allereerst gesneden of geknipt in reepjes van 1 cm x 5 cm. Volgens de normen (conform ISO/CEN TC 194, 10993-12) worden materialen geëxtraheerd op basis van oppervlakte/volume verhouding (max. 6 cm²/ml). Er worden 12 reepjes van elk materiaal in bruine borosilicaatflesjes (25 ml) gebracht. Vervolgens wordt 20 ml extractievloeistof: medium (Gibco) toegevoegd. De flesjes worden afgesloten door middel van een dop met Teflon inlayer. Gedurende de gehele procedure wordt een blanco controle (extractievloeistof) meegenomen. De referentie- en onderzoeksmaterialen worden gedurende 24 uur bij 37 °C in medium geëxtraheerd. Na koeling tot kamertemperatuur worden in verband met adsorptie van stoffen aan het glas de flesjes gezwenkt. De vloeistof wordt na filtratie over een 0.22 µm filter (verwijdering van onopgeloste vezels) in schone, steriele extractieflesjes overgebracht. Aan elk flesje wordt 0.2 ml penicilline/streptomycine (100 U/ml) toegevoegd. De flesjes worden bij kamertemperatuur gedurende maximaal 24 uur bewaard.

2.2.2 Celgroeiremmingstest

De muizen fibroblastcellen (L929) worden conform standaard procedures gekweekt en na trypsinisatie geënt op 96-well microtiterplaat à 100 µl/well (4000 cellen). De cellen worden 24 uur geïncubeerd in de stoof bij 37 °C. Na incubatie wordt 100 µl extract (referenties en overige materialen) 1:1 verdund met 2x BME Eagle medium) of blanco medium opgebracht. De microtiterplaten worden geïncubeerd in de stoof bij 37 °C. Daarnaast wordt het aantal cellen op t=0 bepaald om uiteindelijk het juiste percentage celgroeiremming te bepalen. Na fixatie van cellen worden ze gekleurd met methyleenblauw. De overmaat kleurstof wordt weggewassen en de gefixeerde kleurstof vrijgemaakt met behulp van HCl. De intensiteit van de gekleurde oplossing is evenredig met de hoeveelheid basofiele cellulaire componenten. De gemeten extinctie bij 650 nm is een maat voor de hoeveelheid basofiele cel onderdelen. Deze extinctie is gerelateerd aan het aantal aanwezige cellen. Met de verkregen extincties kan het percentage celgroeiremming berekend worden. Zie de volgende formule.

Formule:

$$\% \text{ Celgroeiremming} = \left(1 - \frac{(E_i - E_o)}{(E_b - E_o)} \right) \times 100\%$$

E_i = extinctie van cellen geïncubeerd met extract van biomateriaal/referentiemateriaal.

E_b = extinctie van blanco medium extract.

E_o = extinctie van cellen voordat extracten zijn opgebracht ($t=0$).

Voor verdere informatie over deze test zie R.I.V.M. rapport nr. 319011003¹⁶.

2.2.3 L(+)-lactaatdehydrogenase (LDH) lekkage test

De L929 cellen worden conform standaard procedures gekweekt. Na trypsinisatie wordt aan de cellen compleet testmedium: Dulbecco's medium w/o fenolred/FCS (10%)/pen-strept (100 U/ml) toegevoegd, waarna de celconcentratie wordt bepaald met de Coulter Counter. Compleet testmedium wordt toegevoegd tot de eindconcentratie: 200.000 cel/ml is. Met behulp van een multichannel wordt 100 µl/well celsuspensie in 96-wells-platen geënt. Een controle op mogelijke LDH afbraak door de geëxtraheerde stoffen wordt het "direct effect" genoemd. Op $t=0$ wordt 20 µl Triton X-100 (1%) toegevoegd. Controle op mogelijke effecten van extracten op L929 (LDH metabolisme wordt het "indirect effect" genoemd. Op $t=24$ wordt 20 µl Triton X-100 toegevoegd. Alle platen worden gedurende 24 uur bij 37 °C in een CO₂-incubator bebroed.

De extracten worden bereid zoals beschreven in 2.2.1. Na incubatie wordt het medium boven de cellen vervangen voor vers Dulbecco's medium + pen/strept (100 U/ml). De platen worden vervolgens terug gezet in de CO₂-incubator. Na 1 uur worden de extracten à 100 µl/well toegevoegd. Het medium boven de cellen wordt afgepipetteerd en 200 µl/well van de extracten opgebracht. Daarna wordt aan de controle: directe effect en 100% ($t=0$), 20 µl 1% (w/v) Triton X-100 toegevoegd. Vervolgens worden de platen 24 uur geïncubeerd bij 37 °C. Na incubatie worden de platen bekeken onder de microscoop en wordt 20 µl 1% (w/v) Triton X-100 toegevoegd aan de wellen om het indirect effect te kunnen bepalen. Na een homogenisatie en centrifugatie stap wordt 80 µl supernatant gepipetteerd in schone microtiter platen. Substraatmengsel (80 µl) wordt toegevoegd en de plaat wordt direct daarna gemeten bij 490 nm met de Biokinetics reader gedurende 15 minuten. Het percentage cytotoxiciteit (%C) ofwel LDH lekkage wordt berekend met de volgende formule:

Formule:

$$\% C = \frac{E - S}{M - S} \times 100\%$$

% C: Percentage cytotoxiciteit

E: Experimentele LDH lekkage (A/min) in aanwezigheid van extracten.

S: Spontane LDH lekkage (A/min) in aan aanwezigheid van de blanco controle.

M: Maximale (cytoplasmatisch LDH) LDH lekkage (A/min) na toevoeging van 0.1% (w/v) Triton X-100/well op t=0.

De resultaten van de controles geven aan of er geen LDH afgebroken wordt. Hiervoor worden de met Triton X-100 gelyseerde cellen op t=0 vergeleken met het direct effect van het betreffende extract op t=0.

Zie voor verdere informatie over materialen en methode R.I.V.M. rapport nr. 319011004¹⁵.

2.2.4 ATP depletie test

De L929 cellen worden gekweekt en getrypsiniseerd conform standaard procedures. De cellen worden verdund in BME medium tot de eindconcentratie: 75.000 cellen/ml. Celsuspensie (0.5 ml/well) wordt geënt op een 48 wells plaat. Nadat de cellen zijn gehecht (\pm 4 uur), wordt het medium afgezogen en vervolgens wordt 0.5 ml RPMI 1640 w/o fenolred + pen/strept (100 U/ml) per well opgebracht. De plaat wordt gedurende 12 uur geïncubeerd in de stoof. Na beoordeling van cellen onder de microscoop wordt 0.5 ml extract opgebracht per well, met uitzondering van de t=0 plaat. De platen worden gedurende 4 uur geïncubeerd in de CO₂-stoof.

Extracellulaire ATP meting

Bij deze meting wordt bepaald of er ATP uit de cel komt gedurende 4 uur incubatie met extracten van biomaterialen. Als de ATP lekkage van het biomateriaal na 4 uur meer dan 10 % release vertoont kan geen uitspraak over intracellulaire depletie gedaan worden. Een deel van het celsupernatant wordt gemeten op de Biocounter zowel op t=0 als op t=4. Formules die worden gebruikt voor de berekeningen:

t=0: ATP(pg)=.27 x D x QF x RLU ; t=4: ATP(pg)=.27 x QF x RLU
 D=verdunningsfactor van het extract ; 0.27=volume-omrekeningsfactor

$$\% \text{ ATP-release} = \frac{\text{ATP}_{\text{lek}}}{\text{ATP}_{\text{blanco}}} \times 100\%$$

ATP_{lek} = hoeveelheid extracellulair ATP t.g.v. biomateriaal na t=4 uur
 ATP_{blanco} = totale hoeveelheid intracellulair ATP op t=4 uur en op t=0
 De berekende ATP concentratie wordt gecorrigeerd voor spontane ATP lekkage gevonden bij een blanco incubatie.

Intracellulaire ATP meting

Bij deze meting wordt bepaald of het ATP-metabolisme in de cel wordt geremd gedurende 4 uur incubatie met extracten van biomaterialen. Het resterende ATP wordt door toevoeging van NRS (=Nucleotide Releasing Reagent) selectief uit de cellen verwijderd. Voor elk extract wordt ook het intracellulaire ATP gehalte gemeten op t=0 uur. Een deel van het mengsel wordt verdund in RPMI 1640 medium en doorgemeten op de Biocounter. Formules die worden gebruikt voor de berekeningen:

$$\text{ATP(pg)} = 1.14 \times \text{RLU} \quad (1.14 = \text{volume-omrekeningsfactor})$$

$$\% \text{ depletie} = \left(1 - \frac{\text{ATP}_{\text{biom}}}{\text{ATP}_{\text{blanco}}} \right) \times 100\%$$

ATP_{biom} = hoeveelheid intracellulair ATP bij biomateriaal op t=4 uur
 ATP_{blanco} = hoeveelheid intracellulair ATP bij de blanco op t=4 uur
 Verder worden er controles zoals: quenching-factor (uitdoving) en stabiliteit van ATP uitgevoerd. Zie voor aanvullende informatie R.I.V.M. rapport nr. 319011006¹⁸.

2.2.5 Agar Overlay test

De L929 cellen worden conform standaard procedures gekweekt. Na trypsinisatie wordt de celsuspensie wordt verdund met BME-medium tot een celconcentratie van 2.5×10^5 cellen/ml. Een 6-well-plaat wordt geënt à 3 ml celsuspensie per well. De platen worden gedurende 24 uur in de CO₂-incubator bebroed zodat een monolayer verkregen kan worden. Extracten worden bereid zoals beschreven in rapport nr. 319011005¹⁷. Na incubatie wordt in elke well 1.5 ml agar-medium gepipetteerd en verdeeld over de well. Na ± 30 minuten bij kamertemperatuur is de agar gestold en afgekoeld worden de vaste biomaterialen of filters met extracten op de agarlaag gebracht. De platen worden gedurende 24 uur in de CO₂-incubator bebroed.

Na incubatie wordt 1.5 ml neutraalroodoplossing toegevoegd en maximaal 30 minuten geïncubeerd in het donker bij kamertemperatuur. De neutraalroodoplossing wordt afgezogen en de platen bekeken onder de microscoop. De ont kleuringszône wordt gemeten en de lysis-index wordt bepaald teneinde de mate van cytotoxiciteit van een medisch hulpmiddel en/of extract daarvan te bepalen. Zowel zône-index als lysis-index worden op een schaal van 0-5 weergegeven. Hierbij is 0 geen ont kleuringszône en geen cellysis. Bij 5 wordt een maximale zône en lysis geïndiceerd. Zie voor aanvullende informatie omtrent de berekening van de respons-index R.I.V.M. rapport nr. 319011005¹⁷.

3 RESULTATEN

gloves no.	CellGr.Inh		LDH release		ATP depl.		ATP extra		Agar Over- lay zone lysis	
	x	M.D.	x	M.D.	x	M.D.	x	M.D.		
1	-3	1	2	2	10	2	5	4	0,0	0,0
2	3	2	2	2	8	1	1	1	0,0	0,0
3	39	13	77	2	95	3	9	2	0,0	0,0
4	177	0	46	12	97	0	1	0	0,0	0,0
5	177	0	56	9	97	0	1	0	4,4	5,5
6	178	1	43	4	97	1	2	1	4,4	5,5
7	176	1	28	6	97	0	1	0	4,4	5,5
8	41	11	2	2	-20	51	1	0	4,4	5,5
9	6	3	4	1	-32	18	1	0	0,0	0,0
10	53	30	25	1	89	7	2	1	4,4	5,5
11 outside	177	3	33	- ^a	96	1	1	0	4,4	5,5
12 inside	122	6	41	-	94	2	1	0	4,4	5,5
13	15	-	45	-	99	-	55	-	0	0
14	172	2	40	-	99	-	1	-	4	5
15	173		35		99	-	1	-		
LR	174	10	33	13	96	1	3	1	4,4	5,5
PE	-4	2.5	1	1	15	3	1	0	0,0	0,0
Bl	0	0	0	0	0	0	1	0	-	-
BSI	172	6	9	-	55	9	2	2	4,4	5,5

Tabel 2

Cytotoxiciteitsanalyse van een panel chirurgische handschoenen. Onderzocht met parameters celgroeiremming, LDH afgifte en ATP depletie en afgifte (extra). ^a: eenmalige analyse, x; gemiddelde, M.D.; mean Deviation.

In tabel 2 worden de resultaten gegeven van de cytotoxiciteitsanalyse van een panel chirurgische handschoenen zoals beschreven in materialen (tabel 1). De analyse is uitgevoerd met drie testen waarbij extracten gebruikt

werden om de analyse uit te voeren nl. celgroei remming, LDH afgifte en intracellulaire ATP depletie. De agar overlay test is een indirecte contact test waarbij de geponste materialen via een agarlaag in contact gebracht worden met cellen. De analyses zijn in duplo uitgevoerd. De resultaten zijn als gemiddelde met mean deviation weergegeven. De duplo's van de agar overlay test worden apart vermeld. Uit de resultaten blijkt dat de handschoenen betreffende cytotoxiciteit globaal in drie groepen kunnen worden ingedeeld; sterk, matig en niet cytotoxisch.

De resultaten van de "sterk cytotoxische" handschoenen zijn voor de verschillende testen bevestigend. Om de resultaten van de handschoenen te vergelijken kan een indeling gemaakt worden:

"Sterk cytotoxisch"; een uitslag in dezelfde orde als de positieve controles

"Niet cytotoxisch"; in dezelfde orde als de negatieve controle.

"mediaan cytotoxisch"; de tussenliggende resultaten

De "sterk cytotoxische" handschoenen vertonen zowel voor de celgroei remming, LDH afgifte, ATP depletie en de agar overlay onderling bevestigende responsen. De handschoenen uit de betreffende groep zijn allen van latex. Handschoen 4 geeft een discrepantie tussen de agar overlay (negatief) en de overige in-vitro testen (positief). Betreffende de resultaten van de "matig cytotoxische" handschoenen, met als criterium mediane cytotoxiciteit gerelateerd aan de latex controle, zijn de resultaten meer divers. Handschoen 3 (vinyl) geeft een celgroei remming van 1/3 van de latex controle, daarentegen een hoge LDH afgifte en ATP depletie. Handschoen 8 (latex) vertoont eveneens een matige celgroei remming en geen significante LDH afgifte, of ATP depletie. De "laag cytotoxische" handschoenen zijn merendeels kunststof handschoenen (1,2,13) van het type vinyl. Handschoen 9 vertoont voor een latex handschoen een opmerkelijk lage cytotoxiciteit. Dezelfde producent heeft ook een examination glove met hogere cytotoxische eigenschappen (mediaan).

Het ATP depletie resultaat vertoont voor handschoen 8 en 9 een negatieve depletie. Alhoewel negatieve ATP depletie duidt op een fenomeen als ophoping is gezien de hoge standaarddeviatie een herhaling van deze analyse geïndiceerd.

Poeder/coating

De aanwezigheid van poeder blijkt voor cytotoxiciteit van invloed te zijn. Eenzelfde merk handschoen (type "surgical" en "examination") is onderzocht zonder (9) en met poeder (10). Alle vier de analyse methoden geven voor de handschoen met poeder een verhoging van de cytotoxiciteit. Het handschoenpoeder (cornstarch, Ab-sorbo) is met dit doel op cytotoxiciteit onderzocht. Dit bleek niet verantwoordelijk voor de verhoging van de cytotoxiciteit zoals bij de handschoenen gesignaleerd. De verhoging van de cytotoxiciteit wordt dan ook naar alle waarschijnlijkheid niet veroorzaakt door het handschoenpoeder maar door kwaliteitsverschillen in het type handschoen (verschil "surgical" en "examination" handschoen). Van eiwitten uit latex is echter bekend dat ze aan cornstarch binden en zo als "drager" kunnen fungeren. Mogelijk treedt hetzelfde fenomeen op voor de toevoegingen in de latex.

Om sensibilisatie tegen migrerende eiwit componenten te voorkómen zijn typen handschoenen met een niet latex coating ontwikkeld. Van een dergelijke handschoen (no 11) is zowel de binnenkant als de buitenkant getest. De laag heeft geen effect in de zin van vermindering van de beschikbaarheid van migrerende cytotoxische stoffen, hoewel de cytotoxiciteit zoals gemeten in de test met parameter celgroei wat verlaagd is. Betreffende de bron van de migrerende stoffen is het niet onmogelijk dat migratie uit de latex matrix vermindert, echter dat de toegevoegde laag dit met een additionele intrinsieke cytotoxiciteit weer teniet doet.

Sterilisatie methode

De onderzochte steriele handschoenen zijn overwegend met gammastraling gesteriliseerd. Er is geen eenduidige relatie tussen gevonden cytotoxiciteit en de sterilisatie methode van de onderzochte handschoenen. Bij met ethyleenoxide gesteriliseerde handschoenen is van de onderzochte vinyl handschoenen nummer 3 met ethyleen oxide gesteriliseerd en vertoont een verhoging van de gemeten cytotoxiciteit in vergelijking met de overige vinyl handschoenen. Deze waarneming kan echter geen conclusie geven t.a.v. eventuele ethyleneoxide residuen aangezien de testen alleen uitsluitel geven betreffende de totale geextraheerde cytotoxiciteit.

3.1 Relatie met literatuurgegevens

glove no.	thiurams	carbamates	benzothiazol	thioureas	latex	Allergenicity ¹
1	-	-	-	-	-	1/10 ^c
2	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	
4	-	+	-	-	+	22/24 ^a 4/4 ^b
5		+/-	+/-	-	+	3/25 ^a
6					+	11/13 ^a
7						
8					+	22/22 ^a 4/4 ^b
9					+	
10					+	
11/12	-	+	-	-	+	2/4 ^b
13	-	-	-	-	-	
14	-	+	+	-	+	4/25 ^a

Tabel 3

Literatuurgegevens

¹: positieve reacties per getest aantal patiënten

a: Referentie 20

b: Referentie 21

c: Referentie 3

Indien de literatuurgegevens (tabel 3) betreffende allergeniciteit gerelateerd worden aan de toxiciteitsresultaten valt op dat handschoenen met een positieve allergeniciteits score (bijv. door provocatie testen) tevens positief zijn in dit onderzoek. Op basis van deze gegevens kan alleen geconcludeerd worden dat de onderzochte handschoenen die allergeen zijn tevens cytotoxisch zijn. De handschoen die niet cytotoxisch is no 1 (vinyl, tabel 2), geeft in het patiënten panel van Frosch² bij één patiënt een reactie. Deze patiënt (werkster) was positief tegen een groot aantal rubber chemicaliën. Turjanmaa et al. heeft een panel van 19 handschoenen middels patiënten provocatie testen op allergeniciteit onderzocht. Een relatie van de gegevens

betreffende allergeniciteit kon niet worden vastgesteld.

Betreffende de oorzaak van de cytotoxiciteit lijken vooral de aan de latex toegevoegde carbamaten een relatie met de gevonden cytotoxiciteit te hebben. Onduidelijk is of de carbamaten zelf deze cytotoxiciteit vertonen of bijvoorbeeld afbraakprodukten van deze groep zoals thioureas. Omzetting van bijvoorbeeld thiurams uit carbamaten schijnt ook in latex voor te komen. Bovenstaande motiveert ook dat uit chemische residu bepaling per migrerende component geen prognose geven kan worden betreffende de cytotoxiciteit van een complex van migrerende chemicaliën. De uitgevoerde biologische testen geven daarentegen wel een compleet cytotoxiciteitsprofiel gerelateerd aan de migratie van in de handschoenen aanwezige chemicaliën.

4 DISCUSSIE

Bij het fabriceren van zowel latex als niet latex handschoenen worden tijdens het productie proces een groot aantal additieven toegepast om het produkt houdbaar te maken en de gewenste eigenschappen te geven zowel tijdens de fabricage als tijdens gebruik. Er bestaat een testpanel met 22 mogelijke additieven voor het testen van o.a. contact allergie²². Een aantal van deze stoffen zoals carbamaten, mercaptobenzothiazolen, thioureas en thiurams en hun resp. afbraakprodukten zijn (matig) cytotoxisch en potentieel allergeen. Zinkethylenedithiocarbamate is cytotoxisch met een 50% inhiberende concentratie (IC₅₀) variërend tussen 0.5 en 2 ug/ml afhankelijk van het type gebruikte assay²³. Van de accelerator zinkethylenebisdithiocarbamate is gerapporteerd dat enkele stoffen uit deze groep hoewel laag cytotoxisch teratogeen zijn. Ze vormen nitrosamines in-vivo en vitro bij verhoogde temperaturen. Deze groep van stoffen breekt af tot ethylenethiourem (ETU) in-vivo, in het produkt en tijdens verhitting. ETU is carcinogeen, mutageen en teratogeen. Daarnaast heeft de stof een antithyroïde effect (IARC 1974b, 1976). LD₅₀ waarden van dit afbraakprodukt geven een duidelijke verhoging in toxiciteit (1.8-3.0 mg/kg²⁴) in vergelijking met de uitgangsstof carbamaat (>200 mg/kg).

Veiligheid

De producenten trachten medische hulpmiddelen/handschoenen te maken die zowel niet-cytotoxisch als hypo-allergeen zijn. Een eerste vereiste voor de kwalificatie niet toxisch en niet allergeen is een geschikte bepalingsmethode met een hieraan gekoppelde norm. De Europese normcommissie CEN/TC205 wg3; "biological safety of medical gloves", stelt in samenwerking met de CEN/TC 206 "biological evaluation of medical devices" een norm op waarin testen zullen worden beschreven. De gepresenteerde analyse van een panel latex en niet latex handschoenen is parallel uitgevoerd met vier in-vitro testen voor cytotoxiciteit.

Agar overlay test.

De agar-overlay test is hiervoor de "grandfather" test met nadelen als "lage gevoeligheid" en "slechte kwantificering" van resultaten. De conclusie betreffende de gevoeligheid blijkt niet op te gaan voor het testen van geponste handschoenen. De opmerking betreffende kwantificering blijkt wel relevant te zijn daar alleen positieve of negatieve cytotoxiciteit werd

gevonden en geen intermediair waarden zoals bij de overige in-vitro testen. De agar overlay is in het testpanel echter de enige test die gebruik maakt van een indirecte vorm van contact nl. agar. In voorgaande R.I.V.M rapporten¹⁵⁻¹⁸ zijn vraagtekens gezet bij de geschiktheid van een agarlaag als huid imiterend model. Gebleken is onder meer dat de agar overlay minder gevoelig was voor een aantal afzonderlijk geteste chemicaliën, zoals glutaaraldehyde, in vergelijking met de LDH afgifte, celgroeiremming en ATP depletie test. waarschijnlijk is de diffusie van deze stoffen laag vanwege binding aan de agar matrix. Deze kwalificatie wordt bevestigd door resultaten zoals voor handschoen 4 (tabel 2), waarbij voor alle testen een positieve respons wordt gevonden echter niet voor de agar overlay test.

ATP depletie

De gevoeligheid van de ATP depletie test wordt bevestigd, de negatieve controle polyethylene geeft zelfs een matige doch reproduceerbare ATP depletie als gevolg van extraheerbare cytotoxiciteit. Matig cytotoxische handschoenen voor zowel celgroeiremming als LDH afgifte vertonen vaak een maximale ATP depletie. Deze resultaten zijn conform de parallele kinetische LDH afgifte en ATP depletie onderzoeksresultaten van Somani et. al.¹⁹. Bij dit onderzoek bleek dat hoewel de respons na verloop van tijd even hoog kan zijn, LDH afgifte als gevolg van verschillende toxische stoffen pas gebeurt na cellulaire ATP depletie. ATP depletie als cytotoxiciteits-indicator is niet alleen relevant gezien de hoge gevoeligheid doch ook gezien de aanvullende informatie die de test betreffende metabole intoxicatie van migrerende stoffen. Ontkoppelaars van de oxidatieve fosforylering zoals arseen en andere stoffen die cellulaire hypoxia tot gevolg hebben worden bij lage concentraties gedetecteerd. Ook kan ATP depletie het gevolg zijn van verlies van membraanpotentiaal via membraanschade veroorzaakt door zuurstof radicalen. Zuurstof radicalen kunnen opgewekt worden door exogene chemicaliën zoals CCl_3 of via ijzer of koper ionen in een zgn. Fenton of Haber-Weiss reactie.

De ATP test geeft in twee gevallen een negatieve depletie. Praktisch impliceert het resultaat dat bij analyse de blanco minder ATP intracellulair ATP bevat dan de cellen die in contact gebracht zijn met het extract. Aangezien de negatieve ATP waarden niet correleren met celgroeiremming (8 matig, 9 laag) of LDH release (beide laag) is de verwachting dat cellulaire ATP toename geen incompatibiliteit consequentie heeft.

Sterilisatie en cytotoxiciteit

De relatie van cytotoxiciteit met de gevolgde sterilisatie methode is, hoewel met name de LDH afgifte test zeer gevoelig is voor ethylene oxide (IC50; 22 ppm), niet overtuigend. Een verhoging van de cytotoxiciteit kan alleen gemeten worden bij een lage achtergrond cytotoxiciteit. Bij een merendeel van de handschoenen is echter sprake van maximale cytotoxiciteit voor de in-vitro testen. Bij de "hypo-allergene" handschoenen die geen thiurams, carbamaten, thioureas of latex bevatten waarbij no 8 met gamma en no 14 met ethyleenoxide is gesteriliseerd wordt voor de LDH release test een verhoging van de respons gevonden (tabel 2,3). De genoemde handschoen is tevens de enige handschoen met extracellulaire ATP afgifte.

Normering

Om van gevonden cytotoxiciteits resultaten de voorspellende waarde bij gebruik van de handschoenen vast te stellen dient van de gebruikte in vitro testen de relatie met in-vivo testen gelegd te worden. Door de testen te evalueren met "bekende" cytotoxische verbindingen met bijbehorende in-vivo gegevens kan een relatie naar in-vivo gegevens gelegd worden.

Bijvoorbeeld indien voor een latex handschoen een halfmaximale respons wordt gevonden kan dit resultaat gerelateerd worden aan een IC_{50a} waarde in ppm's van bijvoorbeeld ethyleen oxide, glutaraldehyde, formaldehyde¹⁵⁻¹⁸. Een halfmaximale respons is voor bijvoorbeeld celgroeiremming gerelateerd aan 2 ppm glutaraldehyde of 9 ppm formaldehyde voor de LDH afgifte. De relevantie van deze gegevens wordt gegeven met in-vivo LD_{50} (rat, oraal) gegevens nl. glutaraldehyde 24 ppm en formaldehyde 87 ppm. Met een veiligheidsfactor van bijvoorbeeld 10 (afhankelijk van de toepassing) voor de in-vivo gegevens zouden de gepresenteerde testen een overschrijding van de toegestane cytotoxiciteit bij 50% van de maximale respons geven. De genoemde voorbeelden gelden bijvoorbeeld voor chirurgische handschoenen en op epithelia toegepaste catheters (urine-weg). Voor onderzoekshandschoenen kan gerelateerd worden aan LD_{50} waarden van epicutaan toegediende stoffen.

Door de analyse uit te voeren met een panel van testen zoals in dit rapport beschreven wordt voorkomen dat verschillen in gevoeligheid per test voor cytotoxische stoffen een verkeerde irritatie prognose geven.

^a; De IC_{50} is gedefinieerd als de waarde op 50 % van de maximale (100 %) respons bij analyse van een volledige reeks verdunningen.

5 CONCLUSIE

Uit een vergelijkend onderzoek met vier cytotoxiciteitstesten van 11 steriele handschoenen is gebleken dat extracten van latex handschoenen overwegend cytotoxisch zijn. De cytotoxiciteit wordt veroorzaakt door tijdens waterige extractie migrerende stoffen. Deze stoffen worden tijdens productie van de handschoenen toegevoegd of gevormd. Uit het onderzoek volgt tevens dat de agar overlay niet geschikt is als cytotoxiciteitsstandaard vanwege zowel vals negatieve als vals positieve resultaten. Met behulp van het testpanel is het mogelijk in preclinische fasen van produkt ontwikkeling het medisch hulpmiddel te analyseren op migrerende cytotoxische stoffen, veroorzaakte cytotoxiciteit tot gevolg heeft. Niet elke stof wordt, zoals uit de resultaten blijkt in één type test gedetecteerd. De resultaten uit een evaluatie zoals hierboven zullen eerder aanvullend dan als bevestigend geïnterpreteerd moeten worden. Anderzijds biedt het type testparameter een aanknopingspunt voor het type migrerende gedetecteerde stof. Enkele van de onderzochte handschoenen zijn volgens de uitgevoerde testen matig tot niet toxisch. Dit kwaliteitsverschil geeft aan dat het wel mogelijk is om veilige latex produkten te produceren. In de literatuur wordt niet vermeld welke handschoenen irritatie vertonen. Resultaten van cohortstudies

beschrijven niet allergene irritatie incidenties van 25 tot 41%. Voor een correcte normering is het echter gewenst dat een risico evaluatie wordt uitgevoerd met de gerapporteerde resultaten en "case reports" van patiënten irritatie.

Een deel van de allergeniciteit van latex handschoenen wordt veroorzaakt door aan de latex polymeer adherende eiwitten. De maatregelen die fabrikanten nemen om het eiwitniveau te verlagen zoals spoelen met water heeft ook een effect op de hoeveelheid "leachable" cytotoxische stoffen. Om deze relatie vast te stellen zullen we de in dit onderzoek verkregen resultaten relateren aan de te ontwikkelen test voor latex afkomstige (eiwit) allergenen.

6 REFERENTIES

1. Holzman, R.S., Latex allergy an emerging operating room problem, 1993, *Anesth. Analg.*; 76, 635-41.
2. Heese, A., Hinzenstern, J., Peters, K.-P., Koch, H.U.: Typ IV-allergien gegen gummihandschuhe, inzidenz, allergene, diagnostik und therapie. *Z. Hautk.* 1991, 66, 25-32.
3. Frosch, P.J., Born, C.M., Schutz, R.: Kontaktallergien auf gummi-, operations- und vinyl handschuhe. *Hautartz*, 1987, 38, 210-17.
4. Nakamura, A., Ikarashi, Y., Tsuchiya, T., et al. correlations among chemical constituents, cytotoxicities and tissue responses: in the case of natural rubber latex materials. *Biomat.*, 1990, 11, 92-94.
5. The International Organisation for standardisation: Biological evaluation of medical devices: ISO 10993-1 , biological evaluation of medical devices: part 1: Guidance on selection of tests, Geneva; Switzerland.
6. Nutter, A.F. Contact urticaria to rubber. *Brit. J. Derm.*, 1979, 101, 597-598.
7. Fisher, A.A., Ed. Contact dermatitis. 3rd edn. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986; 619-22.
8. Knudsen, B.D., Larsen, E., Egsgaard, H., Menne, T.,; Release of thiurams and carbamates from rubber gloves. *contact dermatitis* 1992, 27, 1-8.
9. Slater, J.E. Rubber anaphylaxis. *N. Engl. J. Med.* 1989, 320, 1126-30.
10. Fisher, A.A.; Burns on the hands due to ethylene oxide used to sterilize gloves. *Cutis*, 1988, 42, 267-268.
11. Moneret-Vautrin, D.A., laxenaire, M.C., Bavoux, E.: Allergic shock to latex and ethylene oxide during surgery for spina bifida. *Anesth.*, 1990, 73, 556-8.
12. Turjanmaa, K. Incidence of immediate allergy to latex gloves in hospital personnel. *Contact. Derm.* 1987; 17:270-5
13. Lagier, F., Vervloet, D., Lhermet, I., Lanteaume, A., Charpin, D. Prevalence of latex allergy in operating room nurses. *J. Allergy Clin Immunol.* 1992, 90, 319-22.
14. Korzeniewski, C., Callewaert, D.M., An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J.Immunol.Meth.* 1983; 64, 313-320.
15. Machielsen J.C.A., Orzechowski T.J.H., van Geffen M.F., Lactaatdehydrogenase lekkage als parameter voor de bepaling van de biocompatibiliteit

- van medische hulpmiddelen. RIVM rapport nr. 319011004, 1993.
16. Orzechowski T.J.H., Machielsen J.C.A., van Geffen M.F., Celgroeiremmingstest voor de bepaling van de biocompatibiliteit van medische hulpmiddelen. RIVM rapport nr. 319011003, 1993.
 17. Orzechowski T.J.H., Machielsen J.C.A., van Geffen M.F., Tissue Culture Agar Overlay test. Een in vitro cytotoxiciteitstest ter bepaling van biocompatibiliteit van medische hulpmiddelen. RIVM rapport nr. 319011005, 1993.
 18. Orzechowski T.J.H., Machielsen J.C.A., van Geffen M.F., Cellulaire ATP-depletie als parameter voor de indicatie van medische hulpmiddelen. RIVM rapport nr. 319011006, 1993.
 19. Somani, S.M., Kutty, S.R., Krishna, G., Eseroline, a metabolite of Physotigmine, induces neuronal cell death. 1990, *Tox. Appl. Pharm.*, 106, 28-37.
 20. Turjanmaa, K., Laurila, K., MÄäkinen-Kiljunen, S., Reunala, T. Rubber contact urticaria; Allergenic properties of 19 brands of latex. *Contact Derm.* 1988, 19, 362-67.
 21. Cormio, L. turjanmma, K., Talja, M., Andersson, L.C., Ruutu, M. Toxicity and immediate allergenicity of latex gloves. *Clin. Exp. All.*, 1993, 23, 618-623.
 22. Heese, A., Hinzenstern, J., Peters, K.-P., Koch, H.U.: Typ IV-allergien gegen gummihandschuhe, inzidenz, allergene, diagnostik und therapie. *Z. Hautk.* 1991, 66, 25-32.
 23. Tsuchiya, T., Ikarashi, Y., Hata, H., Toyoda, K., Takahashi, M., Uchimo, T., tanaka, N., Sasaki, T., Nakamura, A. Comparative studies of the toxicity of standard referencde materials in various cytotoxicity tests and in-vivo implantation tests. *J. Appl. Biom.*, 1993, 4, 153-156
 24. Toxicology and carcinogenesis of ethylene thiourea in F334/N rats and B6C3F₁ mice. National toxicology program, NTP TR 388, NIH publication no. 92-2843.