



TEST DI IRRITAZIONE CUTANEA IN VITRO (OECD 439:2019)

Relazione Tecnica

RT 190879

del 16/12/2019

Campione in prova

RIFIUTO 3.211

(ID campione: 201914635)

Committente

C.B.A. ANALISI s.r.l.

Via G.B. Vico, 22

55042 Forte dei Marmi (LU)

STATO DELLE REVISIONI DEL DOCUMENTO

REV.	DATA	OGGETTO DELLA REVISIONE
00	16/12/2019	EMISSIONE DOCUMENTO

PROCEDIMENTO DI APPROVAZIONE

ESECUTORE PROVE		REDATTO		APPROVATO	
FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA	FUNZIONE	FIRMA
TECNICO DI LABORATORIO MICROBIOLOGICO	Tagliati Chiara	Vice DIRETTORE TECNICO	Zecchini Fulvio	DIRETTORE TECNICO	Pasi Manuela

Sommario

1	Riassunto	3
2	Obiettivo dello studio	3
3	Campione oggetto dello studio	3
4	Sperimentazione.....	3
4.1	Principio del metodo	3
4.2	Sostanza di riferimento	3
4.3	Riferimenti.....	3
4.4	Apparecchiatura utilizzata.....	4
4.5	Reagenti.....	4
4.6	Preparazione.....	5
4.7	Metodo di prova.....	5
5	Dati grezzi	6
6	Calcoli	9
7	Risultati.....	9
8	Valutazione e discussione dei risultati	10
9	Archivi.....	10
10	Bibliografia.....	10

1 Riassunto

La presente relazione tecnica riassume in modo completo tutti i dati raccolti nel corso del test, indicato come le condizioni di esposizione dei tessuti epidermici e i risultati calcolati.

Questo test in vitro è in grado di discriminare in maniera affidabile le sostanze che sono irritanti per la pelle da quelle che non lo sono e può essere inoltre utilizzato per la classificazione di rischio di irritazione cutanea.

2 Obiettivo dello studio

Lo scopo del presente test è stato quello di determinare se il campione può avere effetti irritanti per l'epidermide umana.

3 Campione oggetto dello studio

Il committente ha provveduto a spedire un campione, denominato RIFIUTO 3.211, al laboratorio di prova Lab-Control s.r.l., dove è stato accettato e identificato con l'ID 201914635.

Il campione è stato conservato sigillato, a temperatura refrigerata e al riparo dalla luce solare prima dell'esecuzione delle prove e verrà conservato nell'archivio campioni in tali condizioni per 1 mese dopo la fine dello studio.

4 Sperimentazione

4.1 Principio del metodo

I tessuti cutanei vengono condizionati tramite pre-incubazione (1 ora a 37 °C, 5% CO₂) per il rilascio di composti correlati allo stress da trasporto e detriti. Dopo la fase di pre-incubazione, i tessuti vengono trasferiti in un medium di mantenimento fresco ed esposti in maniera topica con il campione da testare per 1 ora. I test vengono condotti in triplicato per ogni trattamento, per il controllo negativo (C-) e per il controllo positivo (C+). Dopo l'esposizione i tessuti vengono sciacquati e asciugati e si sostituisce il medium di saggio con del medium fresco. Successivamente, i tessuti vengono messi ad incubare a 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂. Dopo 24 h il medium viene sostituito con del medium fresco. Dopo 18 ore, i tessuti vengono trasferiti in MTT medium e rimessi ad incubare alle stesse condizioni. Trascorse 3 ore, si lavano i tessuti con del DPBS e si asciugano, quindi si estraggono i sali di blu formazano con isopropanolo. La densità ottica (D.O.) dell'estratto di formazano si determina spettrofotometricamente a 570 nm e la vitalità cellulare si calcola per ogni tessuto come percentuale della media dei tessuti rispetto a quella ottenuta nel controllo negativo. L'irritazione cutanea potenziale del materiale testato è stata classificata in accordo con la vitalità cellulare rimanente, ottenuta dopo l'esposizione a 1 ora con il campione testato.

4.2 Sostanza di riferimento

Il sodio dodecil solfato (SDS) 5% è la sostanza di riferimento che viene testata come controllo positivo (C+) per assicurare che il lotto di pelle umana ricostruita utilizzato sia affidabile. Dopo 1 ora di esposizione al C+ si deve ottenere una vitalità media dei tessuti ≤20%.

4.3 Riferimenti

Il seguente test fa riferimento al metodo *OECD/OCDE 439:2019. "Test Guideline No. 439 In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method"*, al Regolamento CE 440/2008 - Allegato Parte B, metodo B.40 "Irritazione cutanea in vitro: test su un modello di epidermide umana ricostituita" (testo consolidato 2017) e al protocollo del fornitore dei tessuti epidermici MatTek Corporation "In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT)" (del 07/11/2014).

4.4 Apparecchiatura utilizzata

- Pinze sterili
- Incubatore a CO₂
- Tamponi sterili
- Pipettatore con pipette sterili monouso
- Cappa a flusso laminare
- Micropipette
- Navicelle in vetro
- Bilancia
- Microplate reader (spettrofotometro)
- Agitatore
- Timer

4.5 Reagenti

Modello di pelle umana utilizzato

Per effettuare il test è stato utilizzato il modello EpiDerm™, fornito da MatTek Corporation. Si è deciso di utilizzare tale modello poiché viene citato sia dal metodo *OECD/OCDE 439:2019– “Test Guideline No. 439 In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method”*, che dal Reg. CE 440/2008 All. III B.46 – GUCE L142 31/05/2008 “Irritazione cutanea in vitro: test su un modello di epidermide umana ricostituita” (testo consolidato 2017). Inoltre, il test proposto da MatTek è stato validato nel 2007 in uno studio di validazione internazionale che coinvolgeva BASF SE (Ludwigshafen, Germania), IIVS Inc. (Gaithersburg, USA) ZEBET al BfR (Berlino, Germania) e Zet-LSL (Linz, Austria). Lo studio è stato condotto in linea con i requisiti del documento OCSE GD 34 e del documento ECVAM Performance Standard per l'applicazione di modelli di pelle umana a test di irritazione cutanea in vitro. L'ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) ha formalmente approvato la validità scientifica del modello EpiDerm™ durante una riunione del novembre 2008. L'ESAC ha concluso che il modello EpiDerm™ ha una precisione e un'affidabilità sufficienti per la previsione di sostanze di prova irritanti e non irritanti per la pelle e che dovrebbe essere considerato un metodo in vitro convalidato in sostituzione del test di irritazione cutanea sugli animali.

Il lotto utilizzato per il test era il 30839, derivante dal ceppo di keratinociti 00267. Nel certificato inviato dal fornitore viene dichiarato che nel lotto non sono stati riscontrati virus HIV-1, dell'epatite B e dell'epatite C. Non sono stati inoltre riscontrati batteri, lieviti o altri funghi. Il lotto non presenta quindi alcun tipo di contaminazione. Il fornitore ha inoltre dichiarato nel certificato di qualità che la funzionalità della barriera cellulare del lotto in esame ha superato tutti i controlli previsti. La vitalità tissutale ottenuta dal fornitore è risultata essere corrispondente a D.O. @ 540-570 nm = $1,895 \pm 0,072$ (il lotto viene considerato accettabile dal fornitore se la D.O. è compresa tra 1,0 e 3,0).

MTT medium

Questo medium è stato preparato di fresco il giorno del test ad una concentrazione di 1 mg/mL. È stato diluito 1 mL del MTT concentrato a 5 mg/mL, conservato in freezer, con 4 mL di medium fresco.

Dulbecco PBS (DPBS)

È stata utilizzata una soluzione sterile già pronta, alla concentrazione 10x.

Sodio dodecil solfato (SDS) 5%

Controllo positivo (C+) presente all'interno del kit acquistato.

Acqua distillata

Controllo negativo (C-).

Isopropanolo

Soluzione estraente.

4.6 Preparazione

Il campione, ove necessario, subisce una frantumazione fino a ridurlo in polvere sottile.

Si sono poi pesati, su di una navicella in vetro, 25 mg dello stesso. Il contenuto della navicella viene versato direttamente sopra il tessuto, evitando di fare compattare il materiale in un unico punto, e si aggiungono 25 μ L di acqua distillata sterile al fine di bagnare il materiale per aumentare la superficie di contatto.

4.7 Metodo di prova**Modello predittivo**

Un irritante viene identificato come tale se la vitalità relativa media delle tre repliche dei tessuti è ridotta a meno del 50% di quella dei controlli negativi.

Controlli di qualità del test**Controllo negativo (C-)**

La densità ottica nel test MTT dei tessuti del C-, trattati con acqua, è un indicatore della vitalità ottenuta dopo il trasporto, la conservazione e le specifiche condizioni del test. La vitalità dei tessuti supera i criteri di accettabilità quando la media della densità ottica dei tessuti del C- risulta $\geq 0,8$ e $\leq 2,8$.

Controllo positivo (C+)

Viene utilizzato come controllo positivo il SDS 5%. Dopo 1 ora di esposizione al C+ si deve ottenere una vitalità media dei tessuti ≤ 20 %.

Deviazione standard (DS)

La DS calcolata dalla vitalità percentuale di ogni tessuto trattato alla stessa maniera deve essere $< 18\%$.

Procedura sperimentale**Condizionamento dei tessuti (pre-incubazione)**

Una volta che il medium ha raggiunto la temperatura ambiente (20-25°C), è stata preparata una piastra a 6 pozzetti per il campione da testare, per il controllo negativo ed una per il controllo positivo, pipettando 0,9 mL di medium in ogni pozzetto.

La confezione contenente i tessuti è stata aperta all'interno in condizioni di sterilità in cappa a flusso laminare, è stata rimossa la garza sterile e sono stati prelevati con cura tutti gli inserti contenenti il tessuto epidermico, rimuovendo rapidamente ogni residuo di gel di agarosio che può rimanere adeso alla superficie esterna del supporto, facendolo assorbire gentilmente alla garza sterile e posizionando l'inserto immediatamente in un pozzetto delle piastre preparate. Questa operazione viene fatta velocemente, assicurandosi che non vi sia la formazione di bolle d'aria al di sotto dell'inserto; infatti, le culture cutanee possono seccarsi velocemente quando non sono in contatto con il medium.

Prima dell'incubazione a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ per 1 ora, il coperchio delle piastre è stato segnato con le posizioni del C-, del campione da testare e del C+ su entrambe le piastre.

Esposizione alle sostanze

Tenendo le piastre all'interno della cappa a flusso laminare, sono stati dosati tutti i tessuti rispettivamente con 25 mg del campione, del C- e del C+. Il dosaggio tra un tessuto e l'altro è distanziato da un intervallo di circa 1 minuto. Dopodiché le piastre sono state trasferite in incubatore (37°C, 5% CO₂) per 35 ± 1 minuti.

Trascorsi 35 minuti, le piastre sono state rimosse dall'incubatore e posizionate all'interno della cappa a flusso laminare finché non si sono raggiunti 60 minuti di esposizione per il primo tessuto.

Dopo 60 ± 1 minuti di esposizione, i tessuti sono stati risciacquati con DPBS sterile, riempiendo e svuotando gli inserti del tessuto 15 volte per rimuovere qualsiasi residuo del materiale testato. Una volta finito questo passaggio, sono stati immersi completamente per 3 volte gli inserti nel DPBS.

Una volta sciacquato l'inserto dentro e fuori, è stato rimosso l'eccesso di PBS scuotendo delicatamente l'inserto e asciugando il fondo su carta assorbente. Gli inserti così tamponati sono stati poi trasferiti in piastre contenenti nei pozzetti 0,9 mL di medium fresco e incubati per 24 ± 2 ore (37°C , 5% CO_2).

Cambio del medium

Alla fine delle 24 ± 2 ore di incubazione, i tessuti sono stati trasferiti in nuove piastre contenenti 0,9 mL di medium fresco e incubati per altre 18 ± 2 ore (37°C , 5% CO_2).

Test con MTT e lettura

Finita l'incubazione, dopo averli asciugati, i tessuti sono stati trasferiti in una piastra i cui pozzetti sono stati riempiti con 300 μL di MTT medium. Quest'ultima è stata poi posizionata in incubatore per 3 ore \pm 5 minuti (37°C , 5% CO_2).

Dopo le 3 ore di incubazione con MTT, sono stati aspirati tutti i pozzetti delicatamente dall'MTT e riempiti e svuotati con DPBS. Una volta ripetuto questo risciacquo un paio di volte ed essersi assicurati che i tessuti fossero asciutti dopo l'ultima aspirazione, gli inserti sono stati trasferiti in una nuova piastra.

Gli inserti sono stati poi immersi in isopropanolo pipettando delicatamente 2 mL di soluzione estraente, assicurandosi che il livello fosse sopra il bordo superiore dell'inserto, in maniera da coprire completamente il tessuto da entrambi i lati.

Dopo aver sigillato la piastra con più fogli di parafilm per evitare l'evaporazione della soluzione estraente, è stata eseguita l'estrazione mediante agitazione per 2 ore a circa 120 rpm, a temperatura ambiente.

Completata l'estrazione, sono stati forati gli inserti con un ago da siringa e prelevato l'estratto dal pozzetto di ciascun inserto. Dopodiché gli inserti sono stati smaltiti.

Per ogni tessuto sono stati trasferiti in triplicato 200 μL della soluzione di blu di formazano in una micropiastra a 96 pozzetti a fondo piatto, ovvero per ogni tessuto sono state effettuate 3 letture di densità ottica. Come bianco è stata utilizzata la soluzione estraente di isopropanolo. Infine, è stata letta la densità ottica allo spettrofotometro a 570 nm.

5 Dati grezzi

1° GIORNO DELLA PROVA – DATA: 11/12/2019

Quantità di campione sottoposta a prova per ognuna delle 3 repliche:

1. 26,91 mg
2. 25,80 mg
3. 24,95 mg

Prima dell'inizio della fase di esposizione i tessuti sono stati condizionati.

Volume di medium per pozzetto: 0,9 mL

Ora inizio condizionamento: 09:30 del 11/12/2019

Temperatura: $37,0^{\circ}\text{C}$

Concentrazione CO_2 : 5 %

Ora fine condizionamento: 10:20 del 11/12/2019

Fase di esposizione

Tessuto	Campione	Aggiunta acqua	Ora inizio esposizione
Tessuto 1	Acqua (C-)	--	10:25
Tessuto 2	Acqua (C-)	--	10:26
Tessuto 3	Acqua (C-)	--	10:27
Tessuto 4	SDS 5% (C+)	--	10:28
Tessuto 5	SDS 5% (C+)	--	10:29
Tessuto 6	SDS 5% (C+)	--	10:30
Tessuto 7	201914635	25 µL	10:31
Tessuto 8	201914635	25 µL	10:32
Tessuto 9	201914635	25 µL	10:33

C- = controllo negativo; C+ = controllo positivo

Volume medium per pozzetto: 0,9 mL

Ora inizio incubazione: 10:35

Temperatura: 37,0 °C

Concentrazione CO₂: 5%

Ora fine incubazione: 11:00 (25 minuti)

Ora fine esposizione: 11:35 (35 minuti a temperatura ambiente)

Finita la fase di esposizione tutti i tessuti sono stati lavati con DPBS e posti in medium fresco.

Fase di incubazione

Una volta finita la fase di esposizione, i tessuti sono stati incubati a 37°C in atmosfera di CO₂ 5% per 24 ore.

Volume medium per pozzetto: 0,9 mL

Ora inizio incubazione: 11:40

Temperatura: 37,0°C

Concentrazione CO₂: 5%

Prove di interferenza del campione con MTT

Fase 1

Pesata del campione: 25,15 mg

Volume acqua deionizzata: 0,3 mL

Ora inizio incubazione: 09:10

Ora fine incubazione: 10:10

Presenza di una forte colorazione: NO

Necessaria la fase 2: NO

Fase 3

Pesata del campione: 25,3 mg

Volume di medium MTT utilizzato: 1 mL

Controllo utilizzato: Medium MTT non trattato

Ora inizio incubazione: 09:15

Ora fine incubazione: 10:15

Presenza di colorazione blu/viola: NO

Necessaria la fase 4: NO

Il campione testato non interferisce con MTT.

2° GIORNO DELLA PROVA – DATA: 12/12/2019

Cambio del medium

Ora del cambio: 11:30

Volume medium per pozzetto: 0,9 mL

Ora inizio incubazione: 11:35

Temperatura: 37,0°C

Concentrazione CO₂: 5%

3° GIORNO DELLA PROVA – DATA: 13/12/2019

Preparazione soluzione MTT

Volume utilizzato di MTT concentrato a 5 mg/L: 1 mL

Volume utilizzato di medium fresco: 4 mL

Concentrazione finale MTT: 1 mg/L

Fine tempo di incubazione

Ora fine incubazione: 9:15

Fase di contatto con MTT

Volume di MTT per pozzetto: 0,3 mL

Ora inizio incubazione: 9:20

Temperatura: 37,0°C

Concentrazione CO₂: 5%

Ora fine incubazione: 12:20

Fase di estrazione:

Volume di isopropanolo per tessuto: 2 mL

Ora inizio estrazione: 12:30

Rpm: 120

Ora fine estrazione: 14:30

Fase di lettura allo spettrofotometro

Lunghezza d'onda utilizzata: 570 nm.

Schema di carico piastra:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	B	C- tessuto 1	C- tessuto 2	C- tessuto 3	C+ tessuto 1	C+ tessuto 2	C+ tessuto 3	201914635 tessuto 1	201914635 tessuto 2	201914635 tessuto 3
B	B	C- tessuto 1	C- tessuto 2	C- tessuto 3	C+ tessuto 1	C+ tessuto 2	C+ tessuto 3	201914635 tessuto 1	201914635 tessuto 2	201914635 tessuto 3
C	B	C- tessuto 1	C- tessuto 2	C- tessuto 3	C+ tessuto 1	C+ tessuto 2	C+ tessuto 3	201914635 tessuto 1	201914635 tessuto 2	201914635 tessuto 3
D	B									
E	B									
F	B									

B = bianco (isopropanolo); C- = controllo negativo; C+ = controllo positivo; volume per pozzetto: 200 µL

6 Calcoli

Di seguito sono riportati i valori di densità ottica (D.O. a 570 nm) letti dallo spettrofotometro, con i valori di media e deviazione standard percentuale delle tre letture. I dati sono stati corretti sottraendo il valore medio delle letture del bianco.

Valori misurati Campione ID 201914635									
D.O. Misurata	Controlli negativi			Controlli positivi			Campione		
	Controllo negativo - Tessuto 1	Controllo negativo - Tessuto 2	Controllo negativo - Tessuto 3	Controllo positivo - Tessuto 1	Controllo positivo - Tessuto 2	Controllo positivo - Tessuto 3	Tessuto 1 trattato con la sostanza	Tessuto 2 trattato con la sostanza	Tessuto 3 trattato con la sostanza
	1.132	1.142	1.140	0.224	0.150	0.182	0.782	0.760	0.827
	1.137	1.151	1.142	0.230	0.172	0.184	0.796	0.761	0.932
	1.280	1.163	1.145	0.204	0.217	0.176	0.758	0.779	0.932
Media	1.183	1.152	1.142	0.219	0.180	0.181	0.779	0.767	0.897
Dev St. %	8.40	1.05	0.25	1.36	3.42	0.42	1.92	1.07	6.06

7 Risultati

La D.O. media per i tessuti di controllo negativo (C-) è risultata essere pari a 1,159; tale valore corrisponde al 100% della vitalità dei tessuti. Inoltre, il controllo negativo (C-) risulta essere conforme a quanto previsto dal metodo ($0,8 \leq \text{D.O.} \leq 2,8$).

È stata poi calcolata la vitalità percentuale per ogni singolo tessuto esposto al controllo positivo (C+):

Tessuto 1 = 18,9%

Tessuto 2 = 15,5%

Tessuto 3 = 15,6%

La vitalità media di tali tessuti risulta quindi essere pari al 16,7%, valore conforme a quanto previsto dal metodo (vitalità % C+ $\leq 20\%$).

Si può quindi concludere che dai valori di D.O. trovati nei controlli negativi e dai valori di vitalità percentuale ottenuti nei controlli positivi, il lotto utilizzato risulta conforme alle specifiche dettate dal metodo.

Si è infine calcolata la vitalità percentuale di ogni singolo tessuto esposto al campione oggetto del test.

Tessuto 1 = 67,2%

Tessuto 2 = 66,1%

Tessuto 3 = 77,4%

La vitalità percentuale media risulta quindi essere pari al 70,2%.

Inoltre, le deviazioni standard percentuali dei singoli tessuti esposti al campione sono risultate conformi a quanto previsto dal metodo (Dev. Std. % $< 18\%$):

Tessuto 1 = 1,92%

Tessuto 2 = 1,07%

Tessuto 3 = 6,06%

8 Valutazione e discussione dei risultati

Il Reg. CE 440/2008 Allegato B, B.46 "Irritazione cutanea in vitro: test su un modello di epidermide umana ricostituita", al § 28 scrive:

Il campione in esame è considerato irritante per la pelle conformemente alla categoria 2 del sistema GHS se:

- la vitalità del tessuto dopo l'esposizione e l'incubazione post-trattamento è inferiore o uguale al 50%.

Il campione in esame è considerato come privo di categoria se:

- la vitalità del tessuto dopo l'esposizione e l'incubazione post-trattamento è superiore al 50%.

Poiché la vitalità percentuale media ottenuta dai tessuti dopo l'esposizione è del 70,2%, si può affermare che il campione in prova non è irritante per la cute umana.

9 Archivi

La presente Relazione Tecnica e tutti i dati grezzi prodotti durante lo studio sono archiviati presso Lab-Control s.r.l.

10 Bibliografia

1. OECD/OCDE 439:2019. "Test Guideline No. 439 In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method"
2. MatTek protocollo "In Vitro EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT)" (del 03/01/2018)
3. REGOLAMENTO (CE) N. 440/2008 DELLA COMMISSIONE del 30 maggio 2008 (testo consolidato 2017) che istituisce dei metodi di prova ai sensi del regolamento (CE) n. 1907/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH) - Allegato Parte B, metodo B.46 "Irritazione cutanea in vitro: test su un modello di epidermide umana ricostituita"