

REPORT METODO ISO 10993-5:2009 BIOLOGICAL EVALUATION
***“in vitro”*: cytotoxicity test**

Valutazione biologica “in vitro”: prova di citotossicità in base al metodo
UNI EN ISO 10993-5

*Cytotoxicity test: biological evaluation “in vitro” according to
the method UNI EN ISO 10993--5*

PRODOTTO / PRODUCT: Trattamento urea per le micosi

LOTTO:

**COMMITTENTE/
CUSTOMER:**

**DITTA DO-TOBELL SRL- VIA DELL'ARTIGIANATO 32-36030 SARCEDO
(VI)**

Data / Date: 22/03/2021



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

NORMA
EUROPEA

UNI EN ISO 10993-5: 2009 Valutazione biologica dei dispositivi medici: test per la citotossicità in "vitro" in base al metodo descritto dalla norma UNI EN ISO 11993-5.

*EUROPEAN
STANDARD*

UNI EN ISO 10993-5: 2009 According the Method UNI EN ISO 11993-5 biological evaluation of medical devices: tests for in "vitro" cytotoxicity. The international standards for all materials and product by the international biocompatibility standard ISO 10993-5, "Guidance on the Selection of Tests, specific tests that can be used to satisfy these requirement are then provided in ISO 10993-5, both sensitization and irritation.

PRODOTTO /
PRODUCT:

Trattamento urea per micosi

COMMITTENTE /
CUSTOMER:

**DITTA DO-TOBELL SRL- VIA
DELL'ARTIGIANATO 32-36030 SARCEDO (VI)**



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

INDICE / CONTENTS:

1.	INTRODUZIONE / <i>FOREWORD</i>	4
2.	TERMINI E DEFINIZIONI / <i>TERMS AND DEFINITIONS</i>	5
3.	CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE IN ESAME / <i>TEST SAMPLE IDENTIFICATION</i>	6
4.	METODO DI PROVA A CONTATTO DIRETTO / <i>DIRECT CONTACT TEST METHOD</i>	7
4.1.	MATERIALI E REAGENTI / <i>MATERIALS AND REAGENTS</i>	8
4.2.	APPARECCHIATURA / <i>MICROBIOLOGICAL LABORATORY EQUIPMENT</i>	9
5.	DETERMINAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ / <i>CYTOTOXICITY EVALUATION</i>	10
5.1.	VALUTAZIONE QUALITATIVA / <i>QUALITATIVE EVALUATION</i>	10
5.2.	VALUTAZIONE QUANTITATIVA / <i>QUANTITATIVE EVALUATION</i>	10
5.3.	ESPRESSIONE DEI RISULTATI / <i>RESULTS EXPRESSION</i>	12
5.4.	METODO: PROVA PER CONTATTO DIRETTO / <i>DIRECT CONTACT TEST METHOD</i>	13
6.	RISULTATI / <i>RESULTS</i>	14
6.1.	VALUTAZIONE QUALITATIVA / <i>QUALITATIVE EVALUATION</i>	14
6.2.	VALUTAZIONE QUANTITATIVA - TEST MTT / <i>QUANTITATIVE EVALUATION - MTT TEST</i>	16
7.	CONCLUSIONI / <i>CONCLUSIONS</i>	18



Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

1. INTRODUZIONE / FOREWORD

UNI EN ISO 10993-5 2009.

La presente parte della ISO 10993-5 descrive i metodi di prova per valutare la citotossicità “in vitro” dei prodotti che vengono a contatto con la cute umana oppure che devono essere applicati sulla cute o mucosa umana, consente di determinare l’eventuale effetto citotossico del prodotto in esame, impiegando specifiche colture cellulari coltivate in vitro.

Questo metodo specifica che il prodotto è posto a diretto contatto con le cellule in coltura o tramite una tecnica di diffusione del prodotto in esame.

Il protocollo di analisi è stato studiato per determinare la risposta biologica “in vitro” di colture di cellule di mammifero, utilizzando appropriati parametri biologici.

La determinazione della citotossicità può essere suddivisa in categorie a seconda del tipo di valutazione:

- a) valutazione del danno cellulare tramite mezzi morfologici;
- b) misurazioni del danno cellulare;
- c) misurazioni della crescita cellulare;
- d) misurazioni di aspetti specifici del metabolismo cellulare.

This European standard ISO 10993--5 specifies test method and minimum requirements to evaluate the cytotoxicity of chemical substance for different applications in various fields (medical, cosmetic, etc..). Under this standard, test product is tested using in vitro cell culture under defined test conditions, including temperature and contact time, to demonstrate the possible cytotoxic effect and to determine the biological response of mammalian cells in vitro using appropriate biological parameters.

The determination of cytotoxicity depending on the type of evaluation:

- a) *assessments of cell damage by morphological means;*
- b) *measurements of cellular damage;*
- c) *measurements of cell growth;*
- d) *measurements of specific aspects of cellular metabolism.*



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

2. TERMINI E DEFINIZIONI / TERMS AND DEFINITIONS

Controllo negativo: campione che sottoposto a prova in conformità alla presente parte della ISO 10993 non produce una risposta citotossica.

Negative control: sample tested in accordance with this part of ISO 10993 that does not produce a cytotoxic response.

Controllo positivo: campione che sottoposto a prova in conformità alla presente parte della ISO 10993 produce una risposta citotossica riproducibile.

Positive control: sample tested in accordance with this part of ISO 10993 that produce a cytotoxic response.

Contenitori per colture cellulari: contenitori appropriati per le colture cellulari che comprendono piastre in plastica multi-pozzetti, fiasche T25 (flasks per colture cellulari), ecc.

Containers for cell culture: plastic multi--well plates, T25 flasks (for cell culture flasks, etc.).

Citotossicità: alterazione morfologica delle cellule e/o la loro distruzione o una loro ridotta sensibilità causata dal prodotto in esame.

Cytotoxicity: morphological alteration of cells and/or their destruction or their reduced sensitivity caused by the test sample.



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

3. CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE IN ESAME / TEST SAMPLE IDENTIFICATION

Denominazione della formula in esame: dispositivo medico.

Condizioni di stoccaggio: temperatura ambiente.

Sample description: medical device.

Storage conditions: room temperature.



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

4. METODO DI PROVA A CONTATTO DIRETTO / *DIRECT CONTACT TEST METHOD*

Il metodo di prova della norma ISO 10993-5 2009 riguarda la valutazione del potenziale irritante in vitro di un dispositivo medico solido su cellule di derivazione cutanea.

Il potenziale citotossico del prodotto da sottoporre a test a contatto diretto è stato valutato su linee cellulari di derivazione cutanea: fibroblasti umani.

La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Il saggio MTT è un test colorimetrico usato per valutare l'attività metabolica cellulare. E' basato sull'abilità dell'enzima cellulare succinato deidrogenasi, di ridurre l'MTT a formazano, conferendo alla sostanza un colore blu/violaceo.

The test method of ISO 10993--5 2009 is an irritation potential assay of a medical device in vitro on cells derived from skin. The cytotoxic potential of the product to be tested was assessed on cell lines derived from skin: human fibroblasts. Cell viability was assessed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The MTT assay is a colorimetric test for measuring cell metabolic activity. It is based on the ability of Succinate Dehydrogenase to reduce the MTT to insoluble formazan, which has a purple color.



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

4.1 MATERIALI E REAGENTI / MATERIALS AND REAGENTS

COLTURE CELLULARI / CELL CULTURES:

Le linee cellulari indicate dalla norma ISO 10993-5 utilizzate sono le seguenti:
cellule MRC 5 *

* linee cellulari American Type Culture Collection.

The cell lines indicated in ISO 10993-5 are as follows:

*MRC 5 cells **

** American Type Culture Collection cell lines.*

TERRENI DI COLTURA E REAGENTI / CULTURE MEDIA AND REAGENTS

Di seguito riportiamo l'elenco del terreno e i reagenti utilizzati / *hereafter we report the list of the utilized medium and reagents:*

- Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) low Glucose
- Pennicillina-Streptomicina / *Penicillin-Streptomycin 0,1mg/ml*
- Gentamicina/ *Gentamycin 10mg/ml*
- Glutamina/ *Glutamine 4mM. Fetal Bovin serum (FBS)*
- Tampone fostato salino (PBS) / *Phosphate buffered saline (PBS)*
- Tripsina-EDTA / *Trypsin-EDTA*



Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

4.2 APPARECCHIATURE /
MICROBIOLOGICAL LABORATORY EQUIPMENT

1. Autoclave / *Autoclave*
2. Microscopio invertito / *Inverted microscope*
3. Cronometro / *Stopwatch*
4. Piaccametro / *pH--meter*
5. Agitatore Vortex / *Electromechanical shaker: vortex mixer*
6. Centrifuga / *Centrifuge*
7. Incubatore CO₂ (5%), aria 95% e temperatura a 37°C ± 1°C / *Incubator (95% air, 5% CO₂) 37°C ± 1°C*
8. Fabbricatore ghiaccio / *Ice producing machine*
9. Agitatore a bascula / *Mechanical shaker*
10. Cappa a flusso laminare verticale “Biohazard” classe II / *Biological safety cabinet with Air Clean Systems Vertical Laminar Flow “Biohazard” class II*
11. Bagno termostatico / *Thermostatic water bath*
12. Frigorifero a 4°C ± 8°C; congelatore a --70° / *Refrigerator at 4°C±8°C; freezer at 70°C± 1°C*
13. Lettore di micropiastre / *Microtiter plate reader*



Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

5. DETERMINAZIONE DELLA CITOTOSSICITÀ / *CYTOTOXICITY EVALUATION*

5.1 VALUTAZIONE QUALITATIVA / *QUALITATIVE EVALUATION*

La valutazione qualitativa consiste nell'esaminare le cellule al microscopio, utilizzando un colorante citochimico / vitale per osservare le eventuali alterazioni, quali morfologia, vacuolizzazione, distacco o lisi cellulare e integrità della membrana. I risultati valutati sono stati interpretati in base alla scala di citotossicità seguente:

- 0 = Non citotossico
- 1 = Lievemente citotossico
- 2 = Moderatamente citotossico
- 3 = Gravemente citotossico

Qualitative evaluation involves examining the cells under a microscope using a dye cytochemical vital to observe the morphology, the vacuolation, or cell lysis and membrane integrity. The evaluated results were interpreted according to the scale of cytotoxicity following:

- 0 = Not cytotoxic*
- 1 = Mildly cytotoxic*
- 2 = Moderately cytotoxic*
- 3 = Severely cytotoxic*

5.2 VALUTAZIONE QUANTITATIVA / *QUANTITATIVE EVALUATION*

La valutazione quantitativa consiste nel misurare la morte cellulare, l'inibizione della crescita cellulare, la proliferazione delle cellule, il rilascio di enzimi o la riduzione di colorante vitale.

La metodica utilizzata è quella dell'MTT, semplice e riproducibile, sviluppata originariamente da Mossman. Il reagente chiave è il 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide o MTT, sostanza che dà un colore giallo in soluzione acquosa. La deidrogenasi mitocondriale delle cellule vitali taglia l'anello tetrazolico, portando alla formazione di cristalli di formazano color viola porpora insolubili in acqua. I cristalli vengono sciolti in isopropanolo e la soluzione viola risultante viene misurata spettrofotometricamente. Un aumento o diminuzione delle cellule vitali ha per risultato un cambiamento concomitante nella quantità di formazano che si forma e che può essere considerato come un indicatore del grado di citotossicità causato dall'esposizione alle sostanze in esame.

The quantitative evaluation involves evaluating the cell death, the inhibition of cell growth, the cell proliferation, the release of enzymes or the reduction of vital dye..



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

The MTT assay is simple, accurate and yields reproducible results. This method has been developed originally by Mossman. The key component is (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) or MTT. This product is of yellowish colour in solution. Mitochondrial dehydrogenases of viable cells cleave the tetrazolium ring, leading to the formation of purple crystals which are insoluble in aqueous solutions. The crystals are re-dissolved in isopropanol and the resulting purple solution is measured spectrophotometrically. An increase or decrease in cell number results in a concomitant change in the amount of formazan formed, indicating the degree of cytotoxicity caused by the test material.



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

5.3 ESPRESSIONE DEI RISULTATI / RESULTS EXPRESSION

Il risultato è espresso in tabella come IC50 della formula seguente:
The result is expressed as IC50 of the following formula:

$$\% \text{ vitalità cellulare: } \frac{OD \text{ cellule trattate}}{OD \text{ cellule non trattate}} \times 100$$

$$\% \text{ cell viability: } \frac{\text{treated cells OD}}{\text{non-treated cells OD}} \times 100$$

OD = densità ottica / *optical density*

Il valore IC50 indica la concentrazione di prodotto necessaria per inibire la crescita cellulare del 50%.
IC50 è un parametro che consente di valutare il potenziale irritante di un composto, come segue:
IC50 < 0,5 indica un forte effetto citotossico/irritante.
IC50 tra 0,5 e 1,5 indica un moderato effetto citotossico/irritante.
IC50 > 1,5 indica assenza di qualsiasi effetto citotossico/irritante.

The IC50 value, shown in table, indicates the concentration of product required to inhibit cell growth by 50%.

IC50 is a parameter for assessing the irritation potential of a compound, in the following:

IC50 < 0.5 indicates a strong cytotoxic / irritating effect.

IC50 between 0.5 and 1.5 indicates a moderate cytotoxic / irritating effect.

IC50 > 1.5 indicates the absence of cytotoxic / irritating.



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

5.4 METODO: PROVA PER CONTATTO DIRETTO / *DIRECT CONTACT TEST*

METHOD

Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla densità di 30.000 cell/well e incubate fino al raggiungimento dell'80% della confluenza. Quindi è stato aggiunto terreno di coltura fresco contenente la sostanza da testare a diverse diluizioni. Il prodotto è stato sottoposto ad estrazione in PBS (Phosphate buffered saline): 1 gr di prodotto in 5 ml per 24 ore e a partire da questo sono state preparate diverse diluizioni. Ogni diluizione è stata messa a contatto con le cellule (3 pozzetti per ogni diluizione) per 24 ore alla temperatura di $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e il 5% di CO_2 .

Al termine del tempo di esposizione ogni pozzetto è stato sottoposto a un lavaggio in PBS, sono stati aggiunti 200 ul del terreno-MTT/well e dopo incubazione per 4 h alla temperatura di $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e il 5% di CO_2 , è stato eliminato il terreno-MTT e sono stati aggiunti 200 ul di soluzione solubilizzante MTT (10% Triton X-100 plus 0.1 N HCl in anhydrous isopropanol) /well. Le piastre sono state incubate in agitatore a bascula a 37°C , per dissolvere tutti i cristalli di formazano e ottenere una soluzione omogenea nei pozzetti. Dopo 30 minuti è stata effettuata la lettura dell'assorbanza a 570 nm.

Cellule non trattate sono state utilizzate come controllo negativo, e cellule trattate con un tensioattivo di tossicità nota (Sodio dodecyl Solfato, SDS) disciolto nel terreno di coltura a concentrazioni da 2 mg/ml a 0,03 mg/ml è stato utilizzato come controllo positivo.

Cells were seeded in 96 well plates at density of 30.000 cell / well and incubated up to 80% confluence. Fresh medium is added with scalar dilutions of tested product. The product was extracted in PBS (Phosphate buffered saline): 1gr /5 ml for 24 hours and several dilutions have been prepared. Each dilution was put in contact with the cells (3 wells for each dilution) for 24 hours at $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 5% CO_2 . At the end of the exposure time each well was washed in PBS, 200 ul of the MTT/well medium was added and the plates were incubated for 4 h at $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 5% CO_2 , MTT medium was eliminated and 200 ul of MTT solubilizing solution (10% Triton X-100 plus 0.1 N HCl in anhydrous isopropanol)/well were added. The plates were incubated in a 37°C shaker to dissolve all the formazan crystals and to obtain a homogeneous solution in the wells. After 30 minutes the absorbance reading was taken at 570 nm.

Untreated cells were used as a negative control, and cells treated with a surfactant of known toxicity (sodium dodecyl sulphate, SDS) dissolved in the culture medium at concentrations from 2 mg / ml to 0.03 mg / ml was used as a control positive.



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

6. RISULTATI / RESULTS

6.1 VALUTAZIONE QUALITATIVA / *QUALITATIVE EVALUATION*

Risultati a diretto contatto con cellule MRC-5 alle 24 ore dopo il contatto con il prodotto: /

Results evaluation qualitative MRC-5 cells 24 hours after the direct contact:

Concentrazione / <i>concentration mg/ml</i>	Osservazione M.O. / <i>Observation M.O.</i>	Valore / <i>Value</i>	Interpretazione del risultato / <i>Interpretation of results</i>
Controllo positivo / <i>Positive control:</i> SDS	Alterazione del monostrato cellulare: distacco cellulare, presenza cellule morte / <i>Alteration of the cell monolayer: cellular detachment, presence cell death</i>	3,0	Gravemente citotossico / <i>Severely cytotoxic</i>
Controllo negativo/ <i>Negative control:</i> DMEM	Nessuna alterazione / <i>No alteration in cell</i>	0	Non citotossico / <i>Not cytotoxic</i>
5 mg/ml	Nessuna alterazione / <i>No alteration in cell</i>	0	Non citotossico / <i>Not cytotoxic</i>
2,5 ml/ml	Nessuna alterazione / <i>No alteration in cell</i>	0	Non citotossico / <i>Not cytotoxic</i>
1,25 mg/ml	Nessuna alterazione / <i>No alteration in cell</i>	0	Non citotossico / <i>Not cytotoxic</i>
0,625 mg/ml	Nessuna alterazione / <i>No alteration in cell</i>	0	Non citotossico / <i>Not cytotoxic</i>
0,312 mg/ml	Nessuna alterazione / <i>No alteration in cell</i>	0	Non citotossico / <i>Not cytotoxic</i>



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

ESITO: Per il campione in esame, **Trattamento urea per micosi**, posto a diretto contatto con le cellule “in vitro”, non è stato osservato nessuna alterazione cellulare e quindi il risultato ottenuto è **ACCETTABILE**.

RESULTS: *For the test sample, **Trattamento urea per micosi**, in direct contact with cells, was not observed any cell alteration and therefore the result is **ACCEPTABLE**.*



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

6.2 VALUTAZIONE QUANTITATIVA - TEST MTT / *QUANTITATIVE EVALUATION - MTT TEST*

Risultati della % di inibizione della vitalità cellulare / *Cell viability inhibition (%)*:

Campione / Sample	% della vitalità cellulare / Cell viability (%)			Media / Average
Controllo Positivo / <i>Positive control:</i> SDS	0%	0%	0%	0%
Controllo negativo / <i>Negative control:</i> DMEM	100%	100%	100%	100%
5 mg/ml	100%	100%	100%	100%
2,5 mg/ml	100%	100%	100%	100%
1,25 mg/ml	100%	100%	100%	100%
0,625 mg/ml	100%	100%	100%	100%
0,312 mg ml	100%	100%	100%	100%

Il valore di IC50 viene calcolato sulla base dei dati ottenuti di vitalità cellulare, rapportati alla concentrazione in mg/ml del prodotto testato.

The IC50 value is calculated on the data obtained of cell viability, in relation to the concentration in mg / ml of the tested product.



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

Un valore di $IC_{50} > 1$ mg/ml indica un prodotto senza un potenziale di irritazione;
Un valore di $IC_{50} < 1$ mg/ml indica un prodotto con un potenziale di irritazione.

*A value of $IC_{50} > 1$ mg / ml indicates a product without an irritant potential;
A value of $IC_{50} < 1$ mg / ml indicates a product with an irritant potential.*

ESITO: Il campione in esame si presenta **NON CITOTOSSICO** “in vitro”, in quanto non è stata osservata nessuna percentuale di inibizione cellulare dei fibroblasti MRC-5, il risultato ottenuto è **ACCETTABILE**.

RESULTS: *the sample test is **NOT CITOTOXIC** “in vitro”, as no percentage of cellular inhibition of MRC-5 fibroblasts was observed, therefore obtained result is acceptable.*



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

7. CONCLUSIONI / CONCLUSIONS

In base ai risultati ottenuti, il prodotto in esame denominato **Trattamento urea per micosi**

*According to the obtained results, the test product called **Trattamento urea per micosi***

Risulta **NON CITOTOSSICO** “in vitro” e non ha presentato effetti irritanti su colture cellulari, secondo quanto previsto dalla norma UNI EN ISO 10993-5:2009.

*According to UNI EN ISO 10993--5:2009 the test product was **NOT CYTOTOXIC** “in vitro” and don't have an irritant effect in cell cultures.*



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche

Data / *date*: 22/03/2021

(Responsabile scientifico: Prof. Pier Luigi Fiori)

Firma / *Signature*



A.D. MDLXII

Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche