



**biochem**  
S.A.S.

ANALISI CHIMICO-FISICHE  
MICROBIOLOGICHE  
BIOCOMPATIBILITA'  
CONSULENZA TECNICA  
BIOTECNOLOGIE

## TEST DI CITOTOSSICITÀ PER ELUIZIONE

Campione

**ECORUB SAT/T 09B CRISTALLO**

**Rapporto di Prova N°0936-1/11**

Studio eseguito per

**SOVERE S.p.A.**  
Via della Metallurgia, 24  
37139 VERONA VR

da

**BIOCHEM S.A.S.**  
VIA MARZOCCHI 2/A  
40069 ZOLA PREDOSA BO

**Responsabile dello Studio**

Vice Responsabile del settore Biologico: Dr.ssa Lorena Bongiovanni

**Assicurazione Qualità**

Responsabile Assicurazione Qualità: Dr.ssa Cinzia Bernardi

**Responsabile del Laboratorio**

Ing. Giovanni Bassini

**Tempistica dello studio**

Lo studio è stato iniziato il 03/05/2011 ed è stato terminato il 06/05/2011.

Rif. Vs. ordine di aprile 2011

### Descrizione campione

Denominazione: ECORUB SAT/T 09B CRISTALLO

Codice: NA.01.07.01

Lotto: n.r.

Sterilizzazione: n.r.

Numero di ricevimento: 0936-1

Data di ricevimento: 28/04/2011

Campionamento effettuato da: SOVERE S.p.A.

### Metodo di prova

ISO 10993-5: 2009

**Sommario del metodo:** Le cellule sono fatte crescere in piastre fino ad ottenere un monostrato quasi confluyente. Per ciascun campione vengono preparate tre piastre di coltura cellulare. Inoltre vengono preparate tre piastre per il controllo negativo, tre per il controllo positivo e tre per il controllo liquido di estrazione. Nelle piastre da trattare con il campione, il terreno viene aspirato e sostituito con l'estratto del campione. Le colture cellulari vengono esaminate microscopicamente dopo 24 e 48 ore di incubazione con l'estratto e viene valutata l'eventuale presenza di effetti citotossici prodotti dall'estratto del campione.

**Cellule:** BSCL 56 / I 929 (tessuto connettivo di topo).

**Condizioni di estrazione:** 2 g del campione in esame sono stati sottoposti ad estrazione con 10,0 ml di terreno di coltura cellulare MEM a 37°C per 24 ore. L'estratto è stato filtrato. (Rif. ISO 10993-12)

**Reagenti:** MEM con sali di earle's addizionato di siero bovino fetale, l-glutamina e antibiotici.

**Controllo positivo:** soluzione fenolica 0,5% in fisiologica.

**Controllo negativo:** 4 g di policarbonato trattato come il campione.

**Incubazione:** le piastre trattate con l'estratto del campione in esame; quelle con i controlli positivi e negativi e quelle con il controllo liquido di estrazione vengono incubate per 48 ore a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  in atmosfera al 5% di  $\text{CO}_2$ .

### Apparecchiature

Termostato a  $\text{CO}_2$  (5%), mantenuto a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  
Microscopio ottico a fase inversa;  
Cappa a flusso laminare sterile;  
Materiali monouso sterili;  
Piastre per colture cellulari.

**Valutazione degli effetti e interpretazione dei risultati:** La citotossicità viene valutata per via qualitativa mediante esame microscopico delle cellule dopo 24 e 48 ore di incubazione. Vengono valutate la morfologia generale, la presenza di vacuolizzazione, distacchi, lisi cellulare, integrità delle membrane. Agli scostamenti rispetto alla morfologia normale evidenziata dal controllo negativo viene attribuito un punteggio da 0 a 4 (vedi sistema di punteggio). Inoltre per le piastre trattate con gli estratti del campione viene valutata la confluenza del monostrato e viene confrontata la colorazione del terreno di coltura con quella del terreno delle piastre del controllo negativo.

### Sistema di punteggio

Grado	Reattività	Descrizione reattività
0	nessuna	discrete granulazioni intracellulari; nessuna lisi cellulare
1	lieve	non più del 20% delle cellule sono rotondeggianti, approssimativamente attaccate e senza granulazioni intracellulari; occasionale presenza di lisi cellulare
2	leggera	non più del 50% delle cellule sono rotondeggianti e senza granulazioni intracellulari; non estesa presenza di lisi cellulare e aree vuote fra le cellule
3	moderata	non più del 70% dello strato cellulare contiene cellule rotondeggianti o lise
4	severa	quasi completa distruzione dello strato cellulare

**Risultati dopo 24 h di incubazione**
**Punteggio**

Controllo positivo	4
Controllo positivo	4
Controllo positivo	4
Controllo negativo	0
Controllo negativo	0
Controllo negativo	0
Controllo MEM	0
Controllo MEM	0
Controllo MEM	0
Estratto del campione	0
Estratto del campione	0
Estratto del campione	0
Confluenza del monostrato	Confluente
Colore del terreno di coltura	Comparabile al terreno del controllo negativo

**Risultati dopo 48 h di incubazione**
**Punteggio**

Controllo positivo	4
Controllo positivo	4
Controllo positivo	4
Controllo negativo	0
Controllo negativo	0
Controllo negativo	0
Controllo MEM	0
Controllo MEM	0
Controllo MEM	0
Estratto del campione	0
Estratto del campione	0
Estratto del campione	0
Confluenza del monostrato	Confluente
Colore del terreno di coltura	Comparabile al terreno del controllo negativo

**PARERI ED INTERPRETAZIONI – Non oggetto dell'accredimento ACCREDIA**

All'esame microscopico le cellule trattate con l'estratto del campione dopo 24 e 48 ore di incubazione non hanno mostrato scostamenti rispetto alla morfologia normale evidenziata dal controllo negativo. L'estratto del campione in esame non mostra nessuna reattività.

Il presente Rapporto di Prova è riferito esclusivamente al campione esaminato.

Il presente Rapporto di Prova non può essere riprodotto parzialmente, salvo approvazione scritta di Biochem.

Zola Predosa, 16/05/2011