



**Università degli Studi di Ferrara**  
*Microbiologia*  
Via Luigi Borsari, 46 – 44121 FERRARA  
Referente scientifico: Prof. P.G. BALBONI

## **REPORT METODO UNI EN ISO 10993-10: 2010**

---

**Valutazione biologica “in vitro” in base al metodo  
UNI EN ISO 10993-10: 2010.**  
*PARTE 10: PROVA DI IRRITAZIONE E SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA*

*According the Method UNI EN ISO 10993-10: 2010  
biological evaluation “in vitro”  
PART 10: SKIN TEST FOR IRRITATION AND SENSITIZATION.*

**PRODOTTO / PRODUCT:**

**ECO BAGNETTO BIMBI MESI 0-12**

**COMMITTENTE / CUSTOMER:**

**KROLL S.p.A. - TECNOLOGIE COSMETICHE**  
Via L. Mazzon,21  
30020 QUARTO D'ALTINO (VE) - ITALY

Data report: 15/12/2013 / *Date: December 15<sup>th</sup> 2013*

**INDICE: /CONTENTS:**

1	INTRODUZIONE/ <i>FOREWORD</i>	3
2	TERMINI E DEFINIZIONI/ <i>TERMS AND DEFINITIONS</i>	4
3	CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE IN ESAME / <i>PRODUCT IDENTITY</i>	5
4	METODO DI PROVA A CONTATTO DIRETTO / <i>METHOD TEST A DIRECT CONTACT</i>	6
4.1	MATERIALI E REAGENTI / <i>MATERIALS AND REAGENTS</i>	7
5	PROCEDURA “ <i>in vitro</i> ”/ “ <i>in vitro</i> ” <i>PROCEDURE</i>	8
6	RISULTATI E INTERPRETAZIONE / <i>RESULTS AND INTERPRETATION</i>	8
7	RISULTATI/ <i>RESULTS</i>	10
8	CONCLUSIONI/ <i>CONCLUSIONS</i>	11

## **INTRODUZIONE/ FOREWORD**

---

NORMA           UNI EN ISO 10993-10  
EUROPEA        Valutazione biologica “*in vitro*”.

---

UNI EN ISO 10993-10  
*Biological evaluation. Test for “in vitro” biocompatibility.*

**EUROPEAN  
STANDARD**     *The international standard's by the international biocompatibility standard  
ISO 10993-10, "Guidance on the Selection of Tests, specific tests that can be  
used to satisfy these requirements are then provided in ISO 10993-10, both  
sensitization and irritation.*

---

Effettuata “*in vitro*”, il metodo epidermide ricostruita RHE EPISKIN ® (Fornitore SkinEthic) permette di valutare il potenziale irritante di prodotti chimici, senza l'utilizzo di test sugli animali.

Episkin è l'epidermide umana ricostituita “*in vitro*” formata da cellule epidermiche e fibroblasti umani normali posti in coltura su una matrice di collagene all'interfaccia aria-liquido. Questo modello è istologicamente simile alla pelle umana in vivo.

EpiSkin è prodotto in conformità con la qualità di riferimento norma ISO 9001, garantendo tracciabilità e riproducibilità dei tessuti epidermici.

La riproducibilità della risposta di ogni lotto EpiSkin™ è testato contro un irritante riferimento: SDS. La IC50 del tensioattivo viene misurata mediante il saggio MTT dopo 18 ore di contatto.

*Carried out “in vitro”, the RHE EpiSkin™ (SkinEthic) reconstructed Epidermis method makes it possible to evaluate the irritant potential of chemical products, without using animal testing.*

*Episkin is an in vitro reconstructed human epidermal membrane from normal human epidermal cell and fibroblastes cultured on a collagen matrix at the air-liquid interface. This model is histologically similar to the in vivo human epidermis.*

*EpiSkin is produced in accordance with the quality reference norm ISO 9001, ensuring traceability and reproducibility of the epidermal tissues. The reproducibility of the response of each EpiSkin batch is tested against a reference irritant: SDS. The IC50 of the surfactant is measured by the MTT assay after 18 hours of contact.*

## 2 **TERMINI E DEFINIZIONI / TERMS AND DEFINITIONS**

- 2.1 Irritazione  
risposta infiammatoria non specifica localizzato a singola, ripetuta o continua di una sostanza / materiale. L'irritazione cutanea è una reazione reversibile ed è principalmente caratterizzata da eritema locale (arrossamento) della pelle.
- Irritation*  
*localized non-specific inflammatory response to single, repeated or continuous application of a substance/material. Skin irritation is a reversible reaction and is mainly characterized by local erythema (redness) of the skin.*
- 2.2 Sensibilizzazione della pelle\_ dermatite allergica da contatto  
immunologicamente mediata reazione cutanea a una sostanza. “*In vivo*” le risposte possono essere caratterizzata da prurito, eritema, edema, papule, vescicole, bolle o una combinazione di questi.
- skin sensitization\_ allergic contact dermatitis*  
*immunologically mediated cutaneous reaction to a substance. In the human, the responses can be characterized by pruritis, erythema, oedema, papules, vesicles, bullae or a combination of these.*
- 2.3 Controllo positivo: campione che sottoposto a prova in conformità alla presente parte della ISO 10993 produce una risposta irritativa e non è biocompatibile, quale SDS, sodio dodecil solfato un detergente che causa la denaturazione delle proteine molto irritante.  
*Positive control: sample tested in accordance with this part of ISO 10993 which produces an answer irritative and is not biocompatible, which SDS, Sodium Dodecyl Sulfate, a detergent that causes protein denaturation and is very irritating.*
- 2.4 Controllo negativo: campione che, quando sottoposto a prova in conformità alla presente parte della ISO 10993 produce una risposta riproducibile non irritante, ma biocompatibile, quale terreno di coltura.  
*Negative control: sample when tested in accordance this part of ISO 10993 produces a response reproducible non-irritating, but biocompatible, which culture medium.*
- 2.5 Contenitori per colture cellulari : contenitori appropriati per le colture cellulari che comprendono piastre in plastica multi pozzetti , fiaschette T25 (flasks per colture cellulari), ecc.  
*Containers for cell cultures: plastic multi-well plates, T25 flasks (for cell culture flasks, etc.).*
- 2.6 Biocompatibilità: nessuna alterazione morfologica delle cellule e/o nessun danno e o una loro ridotta sensibilità causata dal prodotto in esame. /  
*Biocompatibility: none morphological alteration of cells and/or no damage or their reduced sensitivity caused by the product test.*

## **CARATTERIZZAZIONE DEL CAMPIONE IN ESAME** ***IDENTIFICATION OF THE TEST SAMPLE***

Denominazione della formulazione in esame: **ECO BAGNETTO BIMBI MESI 0-12**

Prodotto: Detergente a base di tensioattivi destinato ai bambini con età inferiore ai 3 anni.  
Condizioni di stoccaggio: Temperatura ambiente.

*Description of the sample:* **ECO BATH KIDS 0-12 MONTHS**

Product: Detergent-based surfactants for children under the age of 3 years.  
*Storage conditions: Room temperature.*

DITTA PRODUTTRICE: /  
MANUFACTURING COMPANY:

**KROLL S.p.A. - TECNOLOGIE COSMETICHE**  
Via L. Mazzon,21  
30020 QUARTO D'ALTINO (VE) - ITALY

Data ricevimento campione: 18/11/2013

Data ricevimento / *Reception date* EpiSkin™ (SKINETHIC): 28/11/2013

-Modello cellulare utilizzato /Cell system used:

**RHE EpiSkin™ (SKINETHIC).**

*The in vitro Reconstructed Human Epidermis consists of normal human keratinocytes cultured on an inert polycarbonate filter at the air-liquid interface, in a chemically defined medium.*

High Throughput Screening THS Plate: 24 – well

Modello di epidermide ricostituita “*in vitro*” di cheratinociti umani adesi ad una matrice di collagene e cresciuti per 15 giorni. /

*Reconstructed epidermis of normal human keratinocytes.*

*Cells are grown on a collagen matrix, for 15 days.*

Batch number / LOTTO: 13-EKIN-084L

Quality control: IC50 Determination:  $\geq 1.5$  mg/ml

Results: 2.4 mg/ml

Periodo di Analisi:

Data inizio del test: 09-12-2013 ÷ Data fine test 15-12-2013.

*Period of analysis: 2013-12-09 to 2013-12-15.*

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

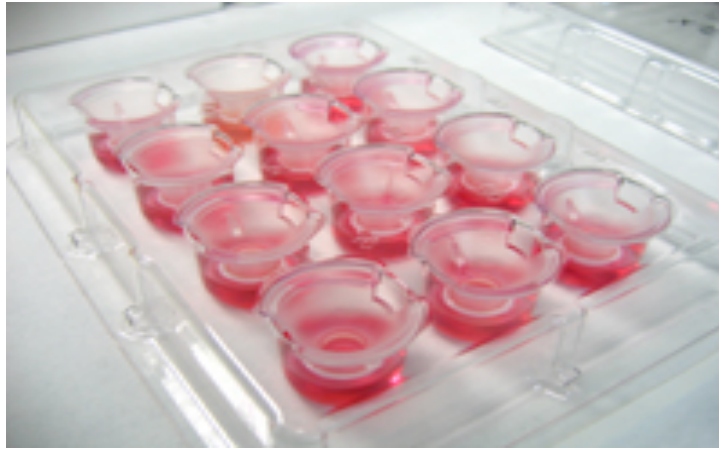
Il metodo di prova della norma ISO 10993-10: 2010 riguarda la valutazione della biocompatibilità "in vitro" di un prodotto su un provino di tessuto epiteliale umano ricostruito "in vitro", EpiSkin™ (SkinEthic) in specifici pozzetti come in *Figura 1*.

Il potenziale irritativo del prodotto da sottoporre al test di biocompatibilità è stato posto a contatto diretto.

La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio MTT.

L'MTT è un sale di tetrazolio dal colore giallo, che ridotto dall'enzima succinato deidrogenasi forma un precipitato blue di formazano nei mitocondri delle cellule vitali.

Il formazano precipitato è un indicatore della vitalità cellulare.



*Figura 1*  
(Fonte web FORNITORE SKINETHIC)

*The test method of the standard ISO 10993-10: 2010 is the "in vitro" evaluation of the biocompatibility assay of a product on a specimen of epithelial tissue of the skin in vitro reconstructed human in specific wells as described in Figure 1.*

*The irritative potential of the product to be tested for biocompatibility was placed in direct contact. Cell viability was assessed by MTT assay.*

*The MTT is a tetrazolium salt by the color yellow, which reduced by the enzyme succinate dehydrogenase form a precipitate of blue formazan in the mitochondria of viable cells. The formazan precipitate is an indicator of cell viability.*

#### 4.1 **MATERIALI E REAGENTI / MATERIALS AND REAGENTS**

- 4.1.1 In base alla norma ISO 10993-10 è stato utilizzato la seguente piastra a pozzetti EpiSkin™ (SkinEthic):

*For Skin Membrane Irritation Tests “in vitro” EpiSkin™ (SkinEthic) represented as follows:*

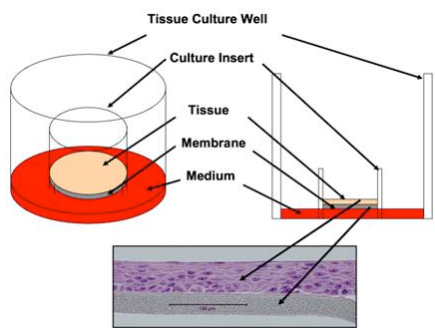


Figura 2 (Fonte web)

#### 4.1.2 **TERRENI DI COLTURA E REAGENTI / CULTURE MEDIA AND REAGENTS**

Terreno di coltura / *Culture medium*

Minimum Essential Medium (D-MEM) (BioWithaker Europe) addizionate con il 10% di siero fetale bovino (SFB), l'1% di L - glutamina e l'1% di penicillina - streptomicina (pen - strep). /

*Minimum Essential Medium (MEM-BioWithaker Europe) supplemented with appropriate concentration of inactivated and mycoplasma-free foetal calf serum (FCS) 10%, L - glutamyn 1% and antibiotics penicillin - streptomycin (pen - strep) 1%.*

Soluzione di lavaggio :/ *Phosphate Buffered Saline:*

Soluzione PBS salina Tris-buffer (TBS) (25 mM Tris): si sciolgono 8 g di NaCl, 0,2 g di KCl, 3 g di Tris base in 800 ml di H<sub>2</sub>O distillata. Si porta a pH 7,4 ± 0,2 aggiungendo HCl. Si aggiunge H<sub>2</sub>O distillata fino ad 1 litro. La soluzione viene suddivisa in aliquote e sterilizzata in autoclave a 121°C per 20 - 30 min. La soluzione deve essere conservata a temperatura ambiente. /

*The Phosphate Buffered Saline PBS is Tris-buffer (TBS) (25 mM Tris): dissolve 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris in water and dilute to 1000 ml. After adjustment, the pH of the solution shall be 7,4 ± 0,2 before use. The PBS is kept in small volumes and sterilise by autoclave at 121°C for 20 – 30 min. The solution shall be stored at room temperature for a maximum holding time of one month.*

5 **PROCEDURA / PRODECURE**

La procedura è schematizzata nella seguente Figura 3: / *The procedure is illustrated in the following Figure 3:*

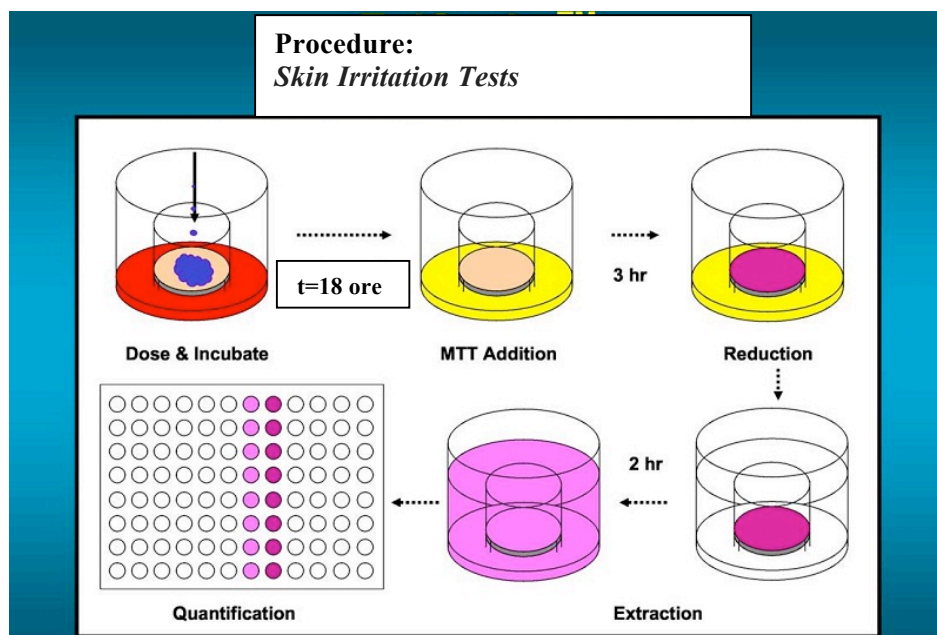


Figura 3 (Fonte web)

- 1) Il prodotto di prova è posto a diretto contatto per un tempo di almeno 18 ore.
- 2) Al termine si aggiunge MTT e dopo 3 ore si aggiunge il terreno D-MEM.
- 3) Si effettua dopo 2 ore l'estrazione e si distribuisce in una piastra da 96 wells per la lettura fotometrica e quantificare la vitalità cellulare.

6 **RISULTATI E INTERPRETAZIONE / RESULTS AND INTERPRETATION**

I valori della densità ottica (OD) ottenuti per ciascun campione di prova possono essere utilizzati per calcolare la percentuale di vitalità rispetto al controllo negativo, che è impostato al 100%.

*The optical density (OD) values obtained with each test sample can be used to calculate the percentage of viability compared with the negative control, which is set at 100 %.*

Il risultato è espresso in tabella come IC50 della formula seguente:

*The result is expressed as IC50 of the following formula:*

% inibizione vitalità cellulare = 1  
Cell viability inhibition (%)

$$\left[ \frac{\text{OD}_{570} \text{ Cellule trattate/} \text{treated cells}}{\text{OD}_{570} \text{ Cellule non trattate/} \text{untreated cells}} \right] \times 100$$

OD = densità ottica / optical density



La sostanza di prova è considerata irritante per la epidermide, se nel modello RHE EPISKIN™ il tessuto presenta una vitalità dopo l'esposizione e post-incubazione pari a  $\leq 50\%$ .

Sebbene IL-1 $\alpha$  potrebbe essere utile per acquisire ulteriori informazioni sul potenziale irritante di sostanze chimiche, solo i risultati del saggio MTT sono attualmente utilizzati per considerare un campione di prova non irritante.

Nel modello EPISKIN™ le sostanze che mostrano una vitalità cellulare  $> 50\%$ , la quantità di IL-1 $\alpha$  rilasciata nel mezzo di coltura tissutale a fine periodo post incubazione è superiore a 9 UI / ml.

La sostanza di prova è considerata non irritante per la pelle se la vitalità dopo il tempo di incubazione è superiore al 50%, e la quantità di IL-1 $\alpha$  rilascio è  $> 9$  UI / ml.

*The test substance is considered to be irritant to skin if in the EPISKIN™ model the tissue viability after exposure and post incubation is  $\leq 50\%$ .*

*Although IL-1 $\alpha$  might be useful to acquire additional information on the irritant potential of chemicals, only results from the MTT assay are currently used for considering a test sample an irritant.*

*In the EPISKIN™ model for tissues showing a cell viability  $> 50\%$ , the amount of IL-1 $\alpha$  released into the tissue culture medium at the end of the post incubation period [post-incubation] is measured in the medium is more than 9 IU/ml.*

*The test substance is considered to be non-irritant to skin if the viability after time of exposure is more than 50 %, and the amount of IL-1 $\alpha$  release is  $> 9$  IU/ml.*

<b><i>In vitro</i> results</b>	<b><i>In vivo</i> classification</b>
Mean tissue cell viability $\leq 50\%$	R38, Irritant (I)
Mean tissue cell viability $> 50\%$	Non-irritant (NI)

**7 RISULTATI / RESULTS: TEST MTT**

TABELLA 1 / TABLE 1: RHE EpiSkin™ (SkinEthic):

Fotometro: *MULTISKAN MS PRIMARY EIA*

Concentrazione / <i>concentration</i> mg/ml	% inibizione della vitalità cellulare / <i>Cell viability inhibition (%)</i>	IC <sub>50</sub>	RISULTATO / <i>RESULT</i> MTT TEST
<b>ECO BAGNETTO BIMBI MESI 0-12 (KROLL S.R.L.)</b>			
Controllo positivo/ <i>Positive control: SDS 1 mg/ml EPISKINTM (18 h SLS)</i>	79,80*	≤50%	Irritante / <i>Irritation</i>  <i>Non accettabile / Unacceptable</i>
Controllo / <i>control:</i> Colture cellulare / <i>cell culture D-MEM</i>	>50%	>50%	Non irritante / <i>no irritation</i>
C1 0,5 mg/ml	R1: 29,90 R2: 30,80 R3: 32,76	>50%	Non irritante / <i>no irritation</i>
C2 1 mg/ml	R1: 34,03 R2: 34,00 R3: 33,50		Non irritante / <i>no irritation</i>
C3 2 mg/ml	R1: 36,75 R2: 37,99 R3: 37,85		Non irritante / <i>no irritation</i>

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

\* Valore medio / *Mean*

R:replica. Ogni concentrazione di prova è stata svolta in triplicato.

*R: Replication. Each test concentration was carried out in triplicate.***ESITO:**

Il campione in esame si presenta NON IRRITANTE “*in vitro*”, in quanto non è stato osservato nessuna percentuale di inibizione cellulare: il risultato ottenuto è ACCETTABILE.

## 8 CONCLUSIONI/CONCLUSIONS

In base ai risultati ottenuti, il prodotto in esame denominato / *According to the obtained results, the test product called*

---

**KROLL S.p.A. - TECNOLOGIE COSMETICHE**

**ECO BAGNETTO BIMBI MESI 0-12**

---

risulta "in vitro" NON IRRITANTE, poichè non ha presentato effetti irritanti sulla epidermide umana ricostituita secondo quanto previsto dalla norma UNI EN ISO 10993-10:2010. /

*accordance with the UNI EN ISO 10993-10:2010 the test product is "in vitro" NON IRRITATING. It's as not presented irritant effects on the human skin reconstituted.*

Data: 15/12/2013 / *Date: December 15<sup>th</sup> 2013*



---

(Responsabile scientifico Firma / *Signature*  
Prof Pier Giorgio Balboni)  
UNIVERSITY OF FERRARA DPT. MEDICINE  
*Prof. cultore della materia "Microbiologia"*

## RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICO / REFERENCES

*Statement on the validity of in vitro tests for skin irritation. ESAC, ECVAM. November, 5th, 2008*