



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 SU TESSUTO CORNEALE DI IRRITAZIONE E
SENSIBILIZZAZIONE*

*According the Method UNI EN ISO 10993-10: 2010
biological evaluation “in vitro”.*
*PART 10: CORNEAL EPITHELIAL TESSUE 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 15th 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 mucosa ricostruita HCE EPISKIN® (Fornitore SkinEthic) permette di valutare il potenziale irritante di prodotti chimici, senza l'utilizzo di test sugli animali.

EpiSkin è mucosa umana ricostituita “*in vitro*” formata da cellule dell’epitelio corneale e fibroblasti umani normali posti in coltura su una matrice di collagene all'interfaccia aria-liquido. Questo modello è istologicamente simile al tessuto corneale epiteliale umano 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 HCE 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 corneal epithelial tissue (mucosa), devoided of stratum corneum, ultra-structurally (tissue morphology and thickness) similar to the corneal mucosa of the human eye 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.

3

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:

HCE EpiSkin™ (SKINETHIC).

Human corneal epithelial immortalized cells cultivated in vitro on a polycarbonate filter at the air liquid interface in chemically defined medium.

The cell line HCE reconstruct a corneal epithelial tissue (mucosa), devoided of stratum corneum, ultra-structurally (tissue morphology and thickness) similar to the corneal mucosa of the human eye.

High Throughput Screening THS Plate: 24 – well

Modello di mucosa corneale ricostituita “*in vitro*” di cellule modificate e rese immortali dell’epitelio corneale adese ad una matrice di collagene e cresciute per 15 giorni. /

Reconstructed a corneal epithelial tissue (mucosa).

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

Batch number / LOTTO: 13-EKIN-085L

Quality control: IC50 Determination: ≥ 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 di mucosa corneale ricostruita "in vitro", HCE 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.

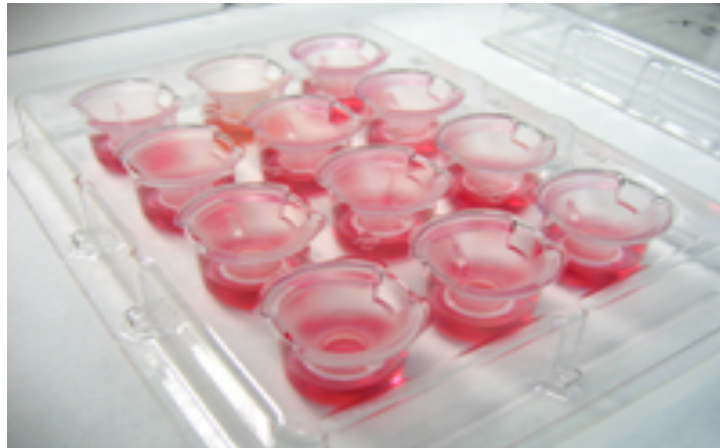


Figura 1
(Fonte web FORNITORE SKINETHIC)

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 mucosa 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 HCE EpiSkin™ (SkinEthic):

For a corneal epithelial tissue (mucosa) Membrane Irritation Tests “in vitro” HCE EpiSkin™ (SkinEthic) represented as follows:

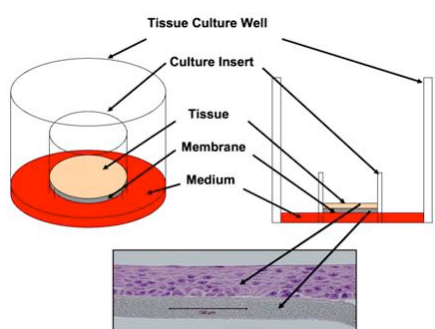


Figura 2 (Fonte web)

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 - glutammina 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 - glutammin 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 H₂O distillata. Si porta a pH 7,4 ± 0,2 aggiungendo HCl. Si aggiunge H₂O 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:

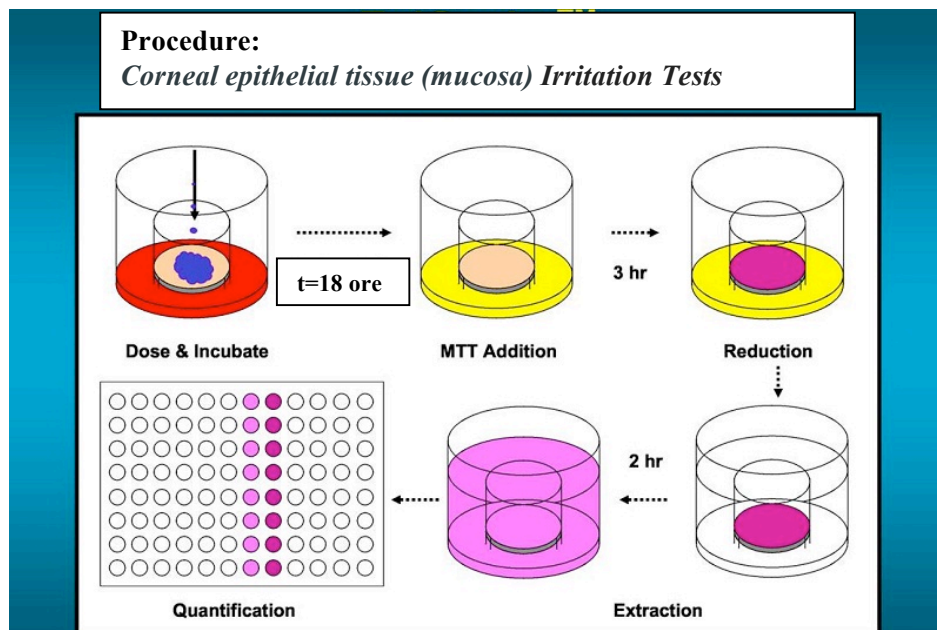


Figura 3 (Fonte web)

- 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 l'epitelio corneale, se nel modello HCE EPISKIN™ il tessuto presenta una vitalità dopo l'esposizione e post-incubazione pari a $\leq 50\%$.

Sebbene IL-1 α 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 HCE EPISKIN™ le sostanze che mostrano una vitalità cellulare $> 50\%$, la quantità di IL-1 α 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 se la vitalità dopo il tempo di incubazione è superiore al 50%, e la quantità di IL-1 α rilascio è > 9 UI / ml..

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

Although IL-1 α 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 HCE EPISKIN™ model for tissues showing a cell viability $> 50\%$, the amount of IL-1 α 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 α release is > 9 IU/ml.

<i>In vitro</i> results	<i>In vivo</i> classification
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: HCE EpiSkin™ (SkinEthic):

Fotometro: MULTISKAN MS PRIMARY EIA

Concentrazione / <i>concentration</i> mg/ml ECO BAGNETTO BIMBI MESI 0-12 (KROLL S.R.L.)	% inibizione della vitalità cellulare / <i>Cell viability inhibition (%)</i>	IC ₅₀	RISULTATO / <i>RESULT</i> MTT TEST
Controllo positivo/ <i>Positive control</i> : SDS 1 mg/ml HCE EPISKIN™ (18 h SLS)	83,69*	≤50%	Irritante / <i>Irritation</i> <i>Non accettabile / Unacceptable</i>
Controllo / <i>control</i> : Colture cellulare / <i>cell culture</i> D-MEM	>50%	>50%	Non irritante / <i>no irritation</i>
C1 0,5 mg/ml	R1: 37,40 R2: 37,35 R3: 35,28	>50%	Non irritante / <i>no irritation</i>
C2 1 mg/ml	R1: 34,10 R2: 35,05 R3: 34,26		Non irritante / <i>no irritation</i>
C3 2 mg/ml	R1: 39,80 R2: 38,86 R3: 40,74		Non irritante / <i>no irritation</i>

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

* Valore medio / *Mean*

R:replica. Ogni concentrazione di prova è stato 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 sull'epitelio corneale umano (tessuto della mucosa) ricostituito 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 corneal epithelial tissue (mucosa) reconstituted.

Data: 15/12/2013 / *Date: December 15th 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