
Campionamento effettuato dal cliente. Il campione è stato testato così come pervenuto in laboratorio

Sampling performed by the customer. The sample was tested as it arrived in the laboratory

Il presente rapporto di prova non è modificabile. I risultati contenuti nel presente documento si riferiscono esclusivamente al campione testato e non implicano una approvazione di lotti o partite intere.

This test report cannot be modified. The results contained in this document refer exclusively to the tested sample and do not imply approval of lots or whole lots.

Il presente documento non può essere riprodotto parzialmente senza l'autorizzazione del Direttore tecnico del Laboratorio.

This document cannot be partially reproduced without the authorization of the Laboratory Technical Director.

Il campo dell'anagrafica campione sopra elencato, riporta i dati forniti dal Cliente di cui il laboratorio declina ogni responsabilità.

The sample master data field listed above are data supplied by the customer for which the laboratory declines all responsibility.

Documento firmato digitalmente da Marianna Benetello

Document digitally signed by Marianna Benetello

Il Direttore Tecnico

The Technical Director

direzione@comolab.it

La firma digitale ha valore legale ai sensi del D. Lgs. 82/2005

The digital signature has legal value according to italian D. Lgs. 82/2005

E-mail: qualita@comolab.it

Web: www.comolab.it

ISO 10993-12:2021 + ISO 10993-5:2009 Annex A

Test per la citotossicità in vitro

Test methods to assess the in vitro cytotoxicity

Procedura operativa Test eseguito sull'estratto

Operating Method - Test on extracts

Sotto cappa a flusso laminare in condizioni asettiche, il dispositivo (senza elastici) è stato immerso nella soluzione aspirante (DMEM+5% NBCS+Antibiotici). La quantità di soluzione estraente è stata scelta secondo il rapporto di 0,1 g/ml (soluzione campione/estrazione) richiesta dalla norma ISO 10993-12. Il campione è stato mantenuto in contatto con la soluzione estraente a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (24 ± 2) h e continuamente agitata richiesta dalla norma ISO 10993-12. Non è stato rilevato nulla di anomalo per quanto riguarda l'aspetto dell'estratto: nessun segno di particolato, intorbidamento, scolorimento o precipitazione di sostanze chimiche; l'estratto è stato diluito e centrifugato prima dell'uso. Nell'estratto non è stata effettuata alcuna regolazione del pH prima dell'uso. Prima del contatto con le cellule, l'estratto è stato sottoposto a filtrazione. L'estratto è stato utilizzato immediatamente dopo la preparazione.

0,1 ml dell'estratto sono state pipettate in ciascun portacampione con cellule (6 repliche).

Under laminar flow hood in aseptic conditions, the device (without elastic bands) was immersed in extracting solution (DMEM+5% NBCS+Antibiotics). The quantity of extracting solution was selected according to the ratio of 0.1 g/ml (sample/extracting solution) required by the standard ISO 10993-12. The sample has been maintained in contact with the extracting solution at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ for (24 ± 2) h and continuously stirred required by the standard ISO 10993-12.

Nothing abnormal was detected as regards the extract appearance: no signs of particle, clouding, discoloring or chemical precipitation were recorded; the extract was diluted and centrifuged before use. No pH adjustment was made in the extract before use. Before the contact with the cells, the extract was submitted to filtration. Extract was used immediately after preparation. 0,1 ml of the extract was pipetted in each well with cells (6 replicates).

Preparazione del controllo negativo

Negative control preparation

L'estratto del controllo negativo è stato preparato immergendo HDPE in soluzione estraente (DMEM+5% NBCS+Antibiotici), in per raggiungere un rapporto superficie/volume di 3 cm²/ml. Quindi il campione in esame è stato incubato a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (24 ± 2) h.

0,1 ml dell'estratto sono stati pipettati in ciascun portacampione con cellule (6 repliche).

The extract of the negative control was prepared by immersing HDPE in extracting solution (DMEM+5% NBCS+Antibiotics), in order to reach a surface/volume ratio of 3 cm²/ml. Then the test sample was incubated at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ for (24 ± 2) h. 0,1 ml of the extract was pipetted in each well with cells (6 replicates).

Preparazione del controllo positivo

Positive control preparatio

L'estratto del controllo positivo è stato preparato immergendo il lattice in una soluzione estraente (DMEM+5% NBCS+Antibiotici), per raggiungere un rapporto superficie/volume di 6 cm²/ml. Quindi il campione in esame è stato incubato a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (24 ± 2) h.

0,1 ml dell'estratto sono stati pipettati in ciascun portacampioni con cellule (6 repliche).

The extract of the positive control was prepared by immersing latex in extracting solution (DMEM+5% NBCS+Antibiotics), in order to reach a surface/volume ratio of 6 cm²/ml. Then the test sample was incubated at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ for (24 ± 2) h.

0,1 ml of the extract was pipetted in each well with cells (6 replicates).

Controllo del veicolo

Vehicle Control

La soluzione di estrazione (DMEM + 5% NBCS+Antibiotici) non contenente il campione in esame è stata incubata a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (24 ± 2) h.

0,1 ml dell'estratto sono stati pipettati in ciascun pozzetto con cellule (6 replicati nella colonna di sinistra e 6 replicati nella colonna di destra).

Extracting solution (DMEM + 5% NBCS+Antibiotics) not containing the test sample was incubated at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ for (24 ± 2) h.

0,1 ml of the extract was pipetted in each well with cells (6 replicates in the left column and 6 replicates in the right column).

ISO 10993-12:2021 + ISO 10993-5:2009 Annex A

Test per la citotossicità in vitro

Test methods to assess the in vitro cytotoxicity

Procedura operativa Test eseguito sull'estratto

Operating Method - Test on extracts

Bianco

Blank

La soluzione di estrazione (DMEM + 5% NBCS+Antibiotici) non contenente il campione in esame è stata incubata a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (24 ± 2) h. 0,1 ml dell'estratto sono stati pipettati lungo tutto il perimetro del portacampione senza cellule.

Extracting solution (DMEM + 5% NBCS+Antibiotics) not containing the test sample was incubated at $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ for (24 ± 2) h. 0,1 ml of the extract was pipetted along the entire perimeter of the well without cells.

Trattamento

Treatment

Il test è stato effettuato utilizzando la linea cellulare BALB 3T3 clone A31 (fibroblasti da embrione di topo) che ha un'elevata capacità proliferativa (come raccomandato nella ISO 10993-5:2009 Allegato A). Le colture cellulari sono state coltivate fino a ottenere un monostrato confluyente nella piastra di coltura. L'estratto del campione in 6 repliche ha sostituito il terreno in piastre contenenti colture cellulari ed è stato incubato a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore in atmosfera di CO_2 al 10%. Contemporaneamente sono stati preparati il controllo negativo, il controllo positivo e il controllo del veicolo e sottoposti allo stesso processo del campione. Al termine dell'incubazione le cellule sono state trattate per 3 ore con una soluzione contenente Rosso Neutro e al fotometro è stata misurata l'intensità della colorazione (proporzionale alla vitalità cellulare).

The test was carried out using the cellular line BALB 3T3 clone A31 (fibroblasts from mouse embryo) that has a high capacity to proliferate (as recommended in ISO 10993-5:2009 Annex A). Cell cultures were grown until a confluent monolayer in multi-well dishes. Sample extract in 6 replicates has replaced the medium in dishes containing cell cultures and it was incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 hours in at 10% CO_2 atmosphere. Negative control, Positive control and Vehicle Control were prepared at the same time and submitted to the same process of the sample. At the end of incubation the cells were treated for 3 hours with a solution containing Neutral Red and by photometer the colouring intensity (proportional to cellular vitality) was measured.

ISO 10993-12:2021 + ISO 10993-5:2009 Annex A

Test per la citotossicità in vitro

Test methods to assess the in vitro cytotoxicity

	Vitalità cellulare Cellular vitality	Incertezza stimata con fattore K=2 (95%) Uncertainty estimated with factor K=2 (95)%		C.V. %
Estratto del campione Sample extract	91,2	±	4,5	3,2
Controllo Negativo Negative control	102,9	±	5	4,3
Controllo Positivo Positive control	10,8	±	1,3	2,4
Controllo Veicolo Vehicle control	100	±	4,9	4

Valutazione di conformità

Conformity evaluation

Nelle condizioni di prova si considera l'estratto del campione

Under the assay conditions the extract of the sample is considered

Not cytotoxicIl campione è considerato non citotossico se la vitalità cellulare è $\geq 70\%$ Il campione è considerato citotossico se la vitalità cellulare è $< 70\%$ Sample is considered non cytotoxic if cellular vitality is $\geq 70\%$ Sample is considered cytotoxic if cellular vitality is $< 70\%$.**Prova eseguita in subappalto**

Test performed in subcontract

Fine del rapporto di prova

End of test report