

biolab	Centro di Saggio	Rapporto N°: SAM2034 Versione: Italiano Pagina: 1 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	-------------------------	--

RAPPORTO FINALE SAM2034

VALUTAZIONE BIOCOMPATIBILITÀ

Programma di Studio n.: SAM2034

Contratto n.: M04/0537.1MI

Committente: Incel S.r.l.
Via Boccaccio, 4
20123 Milano

Sostanza in esame: SNORE OFF

Direttore dello studio: Data emissione:
(Dr.ssa P. Consonni)

Il presente rapporto non può essere riprodotto parzialmente, salvo approvazione scritta del laboratorio

INDICE

SOMMARIO.....	3
INTRODUZIONE.....	6
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	7
ARCHIVIAZIONE.....	7
PROCEDURE.....	7
SOSTANZA IN ESAME.....	8
CAMPIONE ANALIZZATO.....	8
IRRITAZIONE CUTANEA.....	9
PROCEDURA SPERIMENTALE.....	10
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.....	13
RISULTATI.....	14
CONCLUSIONI.....	14
APPENDICI.....	15
CITOTOSSICITÀ PER ELUIZIONE.....	17
PROCEDURA SPERIMENTALE.....	18
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.....	20
RISULTATI.....	21
CONCLUSIONI.....	21
APPENDICI.....	22
SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA.....	24
PROCEDURA SPERIMENTALE.....	25
OSSERVAZIONI.....	28
INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.....	29
RISULTATI.....	29
CONCLUSIONI.....	29
APPENDICI.....	30

biolab	Centro di Saggio	Rapporto N°: SAM2034 Versione: Italiano Pagina: 3 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	-------------------------	--

SOMMARIO

Sulla sostanza in esame SNORE OFF è stato condotto uno studio tossicologico finalizzato ad acquisire i dati per valutare la biocompatibilità mediante i seguenti saggi:

- irritazione cutanea
- citotossicità per eluato
- sensibilizzazione cutanea

Durante l'esecuzione del saggio di **irritazione cutanea**, effettuato mediante applicazione semi-occlusiva, 0.5 ml della sostanza in esame sono stati applicati in due siti sulla cute integra di 3 conigli albini per un periodo di 4 ore.

Una zona cutanea sita caudalmente alla zona trattata, nella stessa parte del dorso, non è stata sottoposta al trattamento ed è stata utilizzata come controllo.

1 ora dopo la rimozione delle garze, e nelle successive 24, 48 e 72 ore, gli animali sono stati osservati per rilevare eventuali manifestazioni eritematose e/o edematose.

In tutti gli animali trattati, 60 minuti dopo la sfasciatura, è stato rilevato un eritema ben definito non accompagnato da edema. Tale anomalia è parzialmente regredita in tutti gli animali 24 ore dopo la sfasciatura, per regredire completamente 72 ore dopo la sfasciatura.

Sulla base dei risultati ottenuti, interpretati secondo quanto previsto dalla UNI EN ISO 10993 parte 10, Dicembre 1996, la sostanza in esame SNORE OFF deve essere considerata **leggermente IRRITANTE**.

La procedura dettagliata è riportata nel Rapporto di Sperimentazione SAM2034.A1.

Nel saggio di **citotossicità** è stata utilizzata una coltura a confluenza di cellule NCTC L929 in fase esponenziale di crescita. A tale scopo è stato preparato un eluato utilizzando il Medium di coltura.

L'estratto è stato ottenuto in condizioni statiche, immergendo 4.0 g della sostanza in esame in 20 ml di Medium di coltura, in modo da ottenere un rapporto peso/volume pari a 0.2 g/ml.

Il campione di saggio è stato quindi incubato a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 72 ore.

2 ml di estratto sono stati messi a contatto con la coltura cellulare di NCTC L929 per un periodo di 48 ore in termostato a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con atmosfera di CO_2 in aria.

Dopo 24 e 48 ore di incubazione la coltura cellulare è stata osservata al microscopio invertito per valutare le reattività biologiche.

Dopo 24 e 48 ore di contatto, nelle colture cellulari trattate non sono stati rilevati fenomeni di sofferenza cellulare (grado di reattività 0.00).

Sulla base dei risultati ottenuti, interpretati secondo quanto previsto dalla UNI EN ISO 10993 parte 5, Settembre 2000, la sostanza in esame SNORE OFF può essere considerata **NON CITOTOSSICA**.

La procedura dettagliata è riportata nel Rapporto di Sperimentazione SAM2034.A2.

Durante il saggio di **sensibilizzazione cutanea** sono state utilizzate 15 cavie di cui 10 trattate con la sostanza in esame e 5 utilizzate come controllo. Il saggio di sensibilizzazione cutanea è costituito da una fase induttiva e da una fase scatenante.

Fase induttiva

Durante la fase induttiva il gruppo di 10 cavie trattate è stato inoculato con 3 coppie (da 0,1 ml ciascuna) di iniezioni intradermiche così suddivise:

1^a campione di saggio

2^a campione di saggio + Adjuvante Completo di Freund (FCA) in rapporto 1:1

3^a FCA in acqua PPI (rapporto 1:1).

I 5 animali di controllo hanno ricevuto le medesime copie di iniezioni, utilizzando nella 2^a iniezione solo acqua PPI e nella 3^a iniezione acqua PPI + FCA (1:1).

Dopo 6 giorni dall'esecuzione delle iniezioni intradermiche su tutti gli animali, trattati e di controllo, è stata eseguita un'applicazione topica di 0,5 ml di Sodio Lauril Solfato al 10%, mediante massaggio.

Dopo 7 giorni dall'esecuzione delle iniezioni intradermiche, sulla cute dei 10 animali trattati è stato applicato il campione di saggio nel volume di 0,5 ml/animale per un periodo di 48 ore.

Lo stesso trattamento è stato eseguito nel gruppo di controllo utilizzando acqua PPI.

Fase scatenante

Dopo 21 giorni dall'inizio del trattamento su tutti gli animali, trattati e di controllo, è stata effettuata la fase scatenante applicando sul lato destro del dorso 0,5 ml del campione di saggio e sul lato sinistro 0,5 ml di acqua PPI.

Le fasciature sono state lasciate in sito per 24 ore.

Dopo 48 e 72 ore dall'inizio della fase scatenante sono state valutate le reazioni degli animali trattati e di controllo.

In 4 dei 10 degli animali trattati è stato rilevato un eritema ben evidente non accompagnato da edema.

In nessuno degli animali di controllo sono stati rilevati fenomeni di eritema né di edema.

Sulla base dei risultati ottenuti, interpretati secondo quanto previsto dalla norma UNI EN 10993 parte 10 Dicembre 1996, la sostanza in esame SNORE OFF deve essere definita **SENSIBILIZZANTE**.

La procedura dettagliata è riportata nel Rapporto di Sperimentazione SAM2034.A3.

biolab	Centro di Saggio	Rapporto N°: SAM2034 Versione: Italiano Pagina: 6 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	-------------------------	--

INTRODUZIONE

Per incarico della Società Incel S.r.l. è stato condotto uno studio tossicologico, secondo quanto previsto dalle norme UNI EN ISO 10993pr acquisire i dati necessari alla valutazione della biocompatibilità. A tale scopo sono state effettuate le seguenti sperimentazioni:

- irritazione cutanea.
- citotossicità per eluato
- sensibilizzazione cutanea

Lo studio è stato eseguito presso il Centro di Saggio Biolab S.p.A. di Vimodrone (MI), via Bruno Buozzi n.2.

Il saggio di **irritazione cutanea** è iniziato in data 18/05/2004 e le ultime osservazioni sono state effettuate in data 21/05/2004 per un periodo complessivo di 72 ore.

Il saggio di **citotossicità per eluato** è iniziato il 07/05/2004 e le ultime osservazioni sono state effettuate il giorno 12/05/2004.

Il saggio di **sensibilizzazione cutanea** è iniziato il 03/05/2004 e le ultime osservazioni sono state effettuate il giorno 29/05/2004.

biolab	Centro di Saggio	Rapporto N°: SAM2034 Versione: Italiano Pagina: 7 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	-------------------------	--

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Valutazione biologica dei dispositivi medici – Prove di irritazione e sensibilizzazione UNI EN ISO 10993 parte 10, dicembre 1996.
2. Valutazione Biologica dei dispositivi medici. Prove di citotossicità. Metodi in Vitro UNI EN ISO 10993 parte 5, Settembre 2000.

ARCHIVIAZIONE

I dati grezzi sono stati archiviati e verranno conservati negli archivi Biolab S.p.A. per un periodo di 10 anni dalla conclusione dello studio.

Il controcampione della sostanza esaminata non è stato archiviato.

Il Committente potrà richiedere, stipulando uno specifico contratto, un'estensione del periodo di archiviazione dei materiali (o di parti di essi), o la loro restituzione.

PROCEDURE

Le procedure utilizzate nello studio sono documentate nel manuale di procedure di Biolab S.p.A.

SOSTANZA IN ESAME

Denominazione: SNORE OFF
Composizione: non pervenuta
Stabilità: non pervenuta
Certificato di analisi: non pervenuto

CAMPIONE ANALIZZATO

Il campione rappresentativo della sostanza in esame è un liquido lattescente di colore giallo chiaro contenuto in una bottiglia di plastica semitrasparente.

Lotto n.: 302
Data di preparazione: non pervenuta
N. di identificazione: 04.9298
Ricevimento n.: R01879
Data di ricevimento: 30/04/2004

Rapporto di Sperimentazione SAM2034.A1

IRRITAZIONE CUTANEA

RICERCATORE PRINCIPALE: P. CONSONNI

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°: SAM2034.A1 Versione: Italiano Pagina: 10 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	----------------------------------	--

PROCEDURA SPERIMENTALE

1. SISTEMA DI SAGGIO

1.1 Caratterizzazione

Specie: Conigli albini
Razza: New Zealand
N°: 3
Sesso: maschi
Gamma peso: 3150-3180 g all'inizio del saggio
Fornitore: Allevamento Conelli - Arona (NO)

1.2 Alloggiamento

Ogni coniglio è stato sistemato individualmente in gabbia NORYL (polifenilenossido) delle dimensioni (cm) 48.2 x 63 x 37 h (area cm² 3037). I locali di stabulazione sono illuminati con lampade fluorescenti e mantenuti con cicli di 12 ore di luce e 12 ore di buio. La temperatura e l'umidità, regolate dall'impianto di condizionamento, sono registrate in continuo. Le registrazioni sono conservate negli archivi Biolab S.p.A.

1.3 Pulizia e disinfezione

Le gabbie e il locale di stabulazione sono stati puliti prima dell'alloggiamento degli animali e disinfettati periodicamente. Le lettiere sono state cambiate a giorni alterni.

1.4 Alimentazione

Gli animali sono stati alimentati con dieta pellettizzata standard della ditta Harlan Italy.

1.5 Abbeverazione

Gli animali sono stati abbeverati con acqua purificata disponibile ad libitum e distribuita mediante sistema di abbeverazione automatico.

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°: SAM2034.A1 Versione: Italiano Pagina: 11 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	----------------------------------	--

1.6 Identificazione degli animali

Gli animali selezionati per lo studio sono stati identificati da un contrassegno numerato di plastica applicato all'orecchio destro.
Le gabbie sono state identificate con un cartellino.

1.7 Quarantena

Gli animali acquistati, prima di essere utilizzati per questo studio, sono stati tenuti in quarantena per una settimana. Durante il periodo di quarantena essi sono stati osservati giornalmente.
Al termine del periodo di quarantena essi hanno subito un accurato esame per verificare la loro idoneità allo studio.

1.8 Selezione degli animali

Gli animali utilizzati nello studio sono stati selezionati a caso tra quelli idonei disponibili al momento dello studio.

2. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI SAGGIO

La sostanza in esame è stata utilizzata tal quale.

3. DISEGNO SPERIMENTALE

Sono stati utilizzati 3 conigli albini maschi.
Ogni animale dello studio ha avuto la zona destra e la zona sinistra craniale del dorso trattata in due siti con la sostanza in esame.
La zona caudale del dorso, non trattata è servita da controllo.
Le reazioni eventualmente presenti nella zona trattata sono state confrontate con quelle della zona di controllo.

4. TRATTAMENTO

4.1 Preparazione della cute

24 ore prima dell'inizio del test il dorso e i fianchi degli animali sono stati rasati in un'area di circa 240 cm².
Un'area di circa 6 cm² del dorso è stata utilizzata per l'applicazione del campione di saggio.

4.2 Applicazione

0.5 ml del campione di saggio è stato applicato mediante una garza sulla cute dell'animale, quindi l'intero tronco dell'animale è stato protetto da una fasciatura elastica semi-occlusiva.

4.3 Rimozione

4 ore dopo l'applicazione, le fasciature e gli adesivi sono stati rimossi.

5. OSSERVAZIONI

Lo stato generale di tutti gli animali è stato osservato giornalmente. Le reazioni cutanee sono state valutate un'ora dopo la rimozione delle garze. La valutazione è stata quindi ripetuta 24, 48, 72 ore dopo l'applicazione. La reazione sull'area di applicazione è stata valutata in base ai dati della tabella seguente:

Scala di valutazione delle reazioni cutanee

Eritema e formazione di escare

Assenza di Eritema	0
Eritema leggero (appena visibile)	1
Eritema ben visibile	2
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso barbabietola) o formazione di escara (danni in profondità)	4

Formazione di Edema

Assenza di Edema	0
Edema molto leggero (appena visibile)	1
Edema leggero (contorni ben definiti della tumefazione)	2
Edema moderato (bordi sollevati di circa 1 mm)	3
Edema forte (bordi sollevati più di 1 mm, tumefazione estesa oltre l'area di applicazione)	4

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

È stato determinato l'indice di irritazione primaria nel seguente modo:
Per ogni animale, fare la somma dei Punteggi di Irritazione Primari per il materiale di prova, sia per eritema sia per edema, in ogni periodo di tempo specificato e dividere per il numero totale di osservazioni (sei: due per ogni periodo di tempo specificato). Quando si usano veicoli di controllo, calcolare il Punteggio di Irritazione Primario per i veicoli di controllo e sottrarre tale punteggio dal punteggio del materiale di prova per ottenere il Punteggio di Irritazione Primario.

Per i calcoli, usare solo le osservazioni a 24 ore, 48 ore e 72 ore. Le osservazioni fatte prima del dosaggio o dopo 72 ore, per controllare la ripresa degli animali, non vengono usate per questa determinazione.

Sommare i punteggi per ciascun animale e dividere il totale per il numero di animali. Il valore così ottenuto è l'indice di Irritazione Primario.

La categoria di irritazione della sostanza in esame è stata assegnata in base alla seguente tabella:

Punteggio medio**Categoria di risposta**

da 0 a 0.4

Trascurabile

da 0.5 a 1.9

Leggera

da 2 a 4.9

Moderata

da 5 a 8

Forte

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°: SAM2034.A1 Versione: Italiano Pagina: 14 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	----------------------------------	--

RISULTATI

In tutti gli animali trattati, 60 minuti dopo la sfasciatura, è stato rilevato un eritema ben definito non accompagnato da edema. Tale anomalia è parzialmente regredita in tutti gli animali 24 ore dopo la sfasciatura, per regredire completamente 72 ore dopo la sfasciatura.

I valori delle reazioni cutanee ai diversi tempi di osservazione per i singoli conigli sono riportati nell'appendice n. 1.

Indice di Irritazione primaria: 0.66.

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti, interpretati secondo quanto previsto dalla UNI EN ISO 10993 parte 10, Dicembre 1996, la sostanza in esame SNORE OFF deve essere considerata **leggermente IRRITANTE**.

IRRITAZIONE CUTANEA

APPENDICI

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°:	SAM2034.A1
		Versione:	Italiano
		Pagina:	16 di 32
		Data stampa:	03/06/2004

APPENDICE N.1: Reazioni cutanee negli animali trattati

SITI TRATTATI CON IL CAMPIONE DI SAGGIO							
REAZIONE	TEMPO DOPO LA SFASCIATURA	CONIGLIO N.					
		002		003		004	
		Parte trattata					
		SX	DX	SX	DX	SX	DX
Eritema	60 minuti	2	2	2	2	2	2
	24 ore	1	1	1	1	1	1
	48 ore	1	1	1	1	1	1
	72 ore	0	0	0	0	0	0
Edema	60 minuti	0	0	0	0	0	0
	24 ore	0	0	0	0	0	0
	48 ore	0	0	0	0	0	0
	72 ore	0	0	0	0	0	0

ERITEMA

Assenza di Eritema	0
Eritema leggero (appena visibile)	1
Eritema ben visibile	2
Eritema da moderato a grave	3
Eritema grave (rosso barbabietola) o formazione di escara (danni in profondità)	4

EDEMA

Assenza di Edema	0
Edema molto leggero (appena visibile)	1
Edema leggero (contorni ben definiti della tumefazione)	2
Edema moderato (bordi sollevati di circa 1 mm)	3
Edema forte (bordi sollevati più di 1 mm, tumefazione estesa oltre l'area di applicazione)	4

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°: SAM2034.A2 Versione: Italiano Pagina: 17 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	----------------------------------	--

Rapporto di Sperimentazione SAM2034.A2

CITOTOSSICITÀ PER ELUIZIONE

RICERCATORE PRINCIPALE: P. Consonni

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°: SAM2034.A2 Versione: Italiano Pagina: 18 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	----------------------------------	--

PROCEDURA SPERIMENTALE

1. SISTEMA DI SAGGIO

1.1 Caratterizzazione

Fibroblasti Murini ATCC CCL1 NCTC Clone L929.

1.2 Materiali e reagenti

Medium di coltura L929

- 500 ml di Minimum essential Medium Eagle con sali di Earle (EMEM) con glutammina (BioWhittaker)
- 50 ml di siero fetale bovino (BioWhittaker)
- 5 ml di amminoacidi non essenziali (BioWhittaker)
- Materiale di plastica per colture (PBI)
- Microscopio invertito Diavert (Lux octica)
- Cappa a flusso laminare (Flow)
- Termostato a CO₂ (Flow)
- USP Reference Standard negative control plastic (filaments) lotto G (controllo negativo) (Nova Chimica)
- Lattice lotto 902819370 scad. 01-2004 (Artsana)
- tratto da guanto SECURFEEL (controllo positivo)

2. DISEGNO SPERIMENTALE

Il disegno sperimentale comprende 9 piastre contenenti un monostrato cellulare a confluenza, suddivise come riportato in tabella:

GRUPPO	PIASTRA N. 1	PIASTRA N. 2	PIASTRA N. 3
1 CONTROLLO +	2 ml di estratto di controllo positivo	2 ml di estratto di controllo positivo	2 ml di estratto di controllo positivo
2 CONTROLLO -	2 ml di estratto di controllo negativo	2 ml di estratto di controllo negativo	2 ml di estratto di controllo negativo
3 TRATTATO	2 ml di estratto del campione di saggio	2 ml di estratto del campione di saggio	2 ml di estratto del campione di saggio

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°: SAM2034.A2 Versione: Italiano Pagina: 19 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	----------------------------------	--

2.1 Preparazione del campione di saggio

L'estratto è stato ottenuto in condizioni statiche, immergendo 4.0 g della sostanza in esame in 20 ml di Medium di coltura in modo da ottenere un rapporto peso/volume pari a 0.2 g/ml.

Il campione di saggio è stato quindi incubato a 37°C ±1°C per 72 ore.

2.2 Preparazione del controllo negativo

Il controllo negativo è stato ottenuto ponendo 4 g di plastica USP reference standard negative control in 20 ml di Medium di coltura e incubandoli a 37°C ±1°C per 72 ore.

2.3 Preparazione del controllo positivo

Il controllo positivo è stato ottenuto ponendo 4 g di gomma naturale in 20 ml di Medium di coltura e incubandoli a 37°C ± 1°C per 72 ore.

3. TRATTAMENTO

Dopo aver preparato un monostrato cellulare in piastre Petri da 35 mm di diametro il surnatante è stato aspirato e sostituito con 2 ml dell'estratto della sostanza in esame.

Le piastre sono state incubate in termostato a CO₂ e a 37°C ± 1°C per 48 ore.

Il medesimo procedimento è stato utilizzato per il controllo positivo e negativo.

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°:	SAM2034.A2
		Versione:	Italiano
		Pagina:	20 di 32
		Data stampa:	03/06/2004

4. OSSERVAZIONI

Il monostrato cellulare è stato osservato al microscopio invertito, dopo 24 e 48 ore di incubazione.

Le reattività biologiche (degenerazione cellulare e malformazioni) sono state valutate dopo 48 ore di incubazione con una scala da 0 a 4 come riportato nella seguente tabella:

Grado	Reattività	Descrizione della reattività
0	Nessuna	Discrete granulazioni intracitoplasmatiche, nessuna lisi cellulare
1	Bassa	Non più del 20% delle cellule sono rotondeggianti e senza granulazioni intracitoplasmatiche
2	Media	Non più del 50% delle cellule sono rotondeggianti e mancano di granulazione intracellulari, lisi cellulare estesa e aree vuote tra le cellule
3	Moderata	Non più del 70% dello strato cellulare contiene cellule rotondeggianti e/o lisate
4	Forte	Chiara e completa distruzione dello strato cellulare

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Quando le colture cellulari trattate con la sostanza in esame mostrano più di un grado zero di risposta, il test deve essere ripetuto con diverse diluizioni quantitative dell'estratto.

La sostanza in esame è stata classificata secondo la seguente scala:

- 0 Non citotossica
- 1 Lievemente citotossica
- 2 Moderatamente citotossica
- 3 Gravemente citotossica

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°: SAM2034.A2 Versione: Italiano Pagina: 21 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	----------------------------------	--

RISULTATI

Dopo 24 e 48 ore di contatto, nelle colture cellulari trattate non sono stati rilevati fenomeni di sofferenza cellulare (grado di reattività 0.00).

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti, interpretati secondo quanto previsto dalla UNI EN ISO 10993 parte 5, Settembre 2000, la sostanza in esame SNORE OFF può essere considerata **NON CITOTOSSICA**.

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°: SAM2034.A2 Versione: Italiano Pagina: 22 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	----------------------------------	--

CITOTOSSICITÀ PER ELUIZIONE

APPENDICI

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°:	SAM2034.A2
		Versione:	Italiano
		Pagina:	23 di 32
		Data stampa:	03/06/2004

APPENDICE N. 1: grado di reattività nelle colture cellulari trattate con la sostanza in esame

TEMPO DI LETTURA	PIASTRA N. 1			PIASTRA N. 2			PIASTRA N. 3		
	CAMP.	CONT. NEG.	CONT. POS.	CAMP.	CONT. NEG.	CONT. POS.	CAMP.	CONT. NEG.	CONT. POS.
24 ore	0	0	3	0	0	3	0	0	3
48 ore	0	0	4	0	0	4	0	0	4

Grado	Reattività	Descrizione della reattività
0	Nessuna	Discrete granulazioni intracitoplasmatiche, nessuna lisi cellulare
1	Bassa	Non più del 20% delle cellule sono rotondeggianti e senza granulazioni intracitoplasmatiche
2	Media	Non più del 50% delle cellule sono rotondeggianti e mancano di granulazione intracellulare, lisi cellulare estesa e aree vuote tra le cellule
3	Moderata	Non più del 70% dello strato cellulare contiene cellule rotondeggianti e/o lisate
4	Forte	Chiara e completa distruzione dello strato cellulare

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°: SAM2034.A3 Versione: Italiano Pagina: 24 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	----------------------------------	--

Rapporto di Sperimentazione SAM2034.A3

SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA

RICERCATORE PRINCIPALE: P. Consonni

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°: SAM2034.A3 Versione: Italiano Pagina: 25 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	----------------------------------	--

PROCEDURA SPERIMENTALE

1. SISTEMA DI SAGGIO

1.1 Caratterizzazione

Specie: Cavie albine
Razza: Hartley
N°: 15
Gamma peso: 300 - 400 g all'arrivo al Centro di Saggio
Sesso: femmine
Fornitore: All. Bettinardi - Momo (NO)

1.2 Sistemazione

All'arrivo al Centro di Saggio gli animali sono stati sistemati in gruppi di 10 in gabbie di polycarbonato trasparente delle dimensioni di mm 590x385x200 h. I locali di stabulazione sono stati illuminati con lampade fluorescenti e mantenuti con cicli di 12 ore di luce e 12 ore di buio. La temperatura e l'umidità, regolate dall'impianto di condizionamento, sono state registrate in continuo; le registrazioni sono conservate negli archivi Biolab S.p.A.

1.3 Pulizia e disinfezione

Le gabbie e il locale di stabulazione sono stati puliti e disinfettati prima dell'alloggiamento degli animali e periodicamente.

1.4 Alimentazione

Gli animali sono stati alimentati con dieta completa pellettizzata fornita dalla ditta Harlan Italy.

1.5 Abbeverazione

Gli animali sono stati abbeverati con acqua purificata disponibile ad libitum e distribuita mediante sistema di abbeverazione automatico.

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°:	SAM2034.A3
		Versione:	Italiano
		Pagina:	26 di 32
		Data stampa:	03/06/2004

1.6 Quarantena

Gli animali acquistati, prima di essere utilizzati per questo studio, sono stati tenuti in quarantena per una settimana.

Durante il periodo di quarantena essi sono stati osservati giornalmente.

Al termine del periodo di quarantena essi hanno subito un accurato esame per verificare la loro idoneità allo studio.

2. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI SAGGIO

Iniezione intradermica

La sostanza in esame è stata utilizzata tal quale.

Applicazione topica

La sostanza in esame è stata diluita 1:2 in acqua PPI per evitare gravi fenomeni irritativi.

3. DISEGNO SPERIMENTALE

Il disegno sperimentale ha compreso un gruppo di 10 animali trattati (gruppo 1) e un gruppo di 5 animali di controllo (gruppo 2).

Gli animali sono stati assegnati ai gruppi di trattamento come segue:

GRUPPO	INDUZIONE		REAZIONE SCATENANTE
	Iniezione intradermica	Applicazione topica	Challenge
1	1 ^a campione di saggio 2 ^a campione di saggio + FCA (rapporto 1:1) 3 ^a FCA in acqua PPI (rapporto 1:1)	campione di saggio	campione di saggio
2	1 ^a acqua PPI 2 ^a acqua PPI + FCA (rapporto 1:1) 3 ^a FCA in acqua PPI (rapporto 1:1)	acqua PPI	campione di saggio

Gli animali utilizzati nello studio sono stati selezionati a caso tra quelli idonei disponibili al momento dello studio. Gli animali sono stati sistemati in gruppi di un massimo di 10 animali per gabbia; ogni gabbia è stata identificata con un cartellino.

4. TRATTAMENTO

4.1 Preparazione della cute

24 ore prima di ogni trattamento è stata rasata un'area di circa 50 cm² sul dorso degli animali.

4.2 Somministrazione

La prova è costituita da una fase induttiva e da una fase scatenante (challenge).

Fase induttiva

Giorno 0 - gruppo trattato

Sono state praticate ai due lati della linea mediana, nelle zone intrascapolari, tre coppie di iniezioni intradermiche, ciascuna di 0,1 ml dei seguenti preparati:

- 1) Campione di saggio
- 2) Campione di saggio + FCA (rapporto 1:1)
- 3) FCA in acqua PPI (rapporto 1:1)

Giorno 0 - gruppo controllo

Sono state praticate ai due lati della linea mediana, nelle zone intrascapolari, tre coppie di iniezioni intradermiche, ciascuna di 0,1 ml dei seguenti preparati:

- 1) Acqua PPI
- 2) Acqua PPI + FCA (rapporto 1:1)
- 3) FCA in acqua PPI (rapporto 1:1)

Giorno 6 - gruppo trattato e di controllo

6 giorni dopo le iniezioni intradermiche è stata eseguita su tutti gli animali un'applicazione topica di 0,5 ml di Sodio Lauril Solfato al 10%, mediante leggero massaggio.

Giorno 7 - gruppo trattato

7 giorni dopo le iniezioni intradermiche è stata eseguita su tutti gli animali, un'applicazione topica di 0.5 ml del campione di saggio mediante una fasciatura occlusiva.

La fasciatura è stata lasciata in sito per 48 ore.

Giorno 7 - gruppo di controllo

Lo stesso trattamento è stato eseguito sul gruppo di controllo utilizzando acqua PPI anziché la sostanza in esame.

Fase scatenante (Challenge)*Giorno 21 - gruppo trattato e di controllo*

Tutte e 15 le cavie sono state trattate topicamente sul fianco destro, con 0.5 ml del campione di saggio mentre sul fianco sinistro sono state trattate con 0,5 ml di acqua PPI mediante una fasciatura occlusiva. La fasciatura è stata lasciata in sito per 24 ore.

OSSERVAZIONI

Al 23° giorno (24 ore dalla rimozione delle fasciature) e al 24° giorno (48 ore dalla rimozione delle fasciature) e al 25° giorno (72 ore dalla rimozione delle fasciature) in tutti gli animali trattati e di controllo sono state valutate le reazioni cutanee.

L'intensità dell'eritema e dell'edema sono state valutate secondo la seguente scala:

Reazione**Scala numerica****Eritema**

Nessun eritema	0
Leggero eritema	1
Eritema ben definito	2
Eritema moderato	3
Eritema grave fino alla formazione di escare	4

Edema

Nessun edema	0
Leggero edema	1
Edema ben definito	2
Edema moderato	3
Edema grave	4

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°: SAM2034.A3 Versione: Italiano Pagina: 29 di 32 Data stampa: 03/06/2004
---------------	----------------------------------	--

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Sono state valutate la frequenza e l'intensità della risposta.
In caso di comparsa di una reazione positiva solo sulle cavie trattate è stata valutata la percentuale di animali sensibilizzati senza tenere conto dell'intensità della risposta.

RISULTATI

In 4 dei 10 degli animali trattati è stato rilevato un eritema ben evidente non accompagnato da edema.
In nessuno degli animali di controllo sono stati rilevati fenomeni di eritema né di edema.

% cavie sensibilizzate: 40

I risultati analitici dei singoli animali sono riportati nelle appendici n° 1 e n° 2.

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti, interpretati secondo quanto previsto dalla norma UNI EN 10993 parte 10 Dicembre 1996, la sostanza in esame SNORE OFF deve essere definita **SENSIBILIZZANTE**.

SENSIBILIZZAZIONE CUTANEA

APPENDICI

APPENDICE N.1: Reazioni cutanee negli animali trattati

ANIMALE N.	TEMPO DOPO IL CHALLENGE					
	48 ore		72 ore		96 ore	
	Eritema	Edema	Eritema	Edema	Eritema	Edema
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	2	0	2	0	2	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	2	0	2	0	2	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	2	0	2	0	2	0
10	2	0	2	0	2	0

LEGENDA:Eritema

Nessun eritema	0
Leggero eritema	1
Eritema ben definito	2
Eritema moderato	3
Eritema grave fino alla formazione di escare	4

Edema

Nessun edema	0
Leggero edema	1
Edema ben definito	2
Edema moderato	3
Edema grave	4

biolab	Laboratorio tossicologico	Rapporto N°:	SAM2034.A3
		Versione:	Italiano
		Pagina:	32 di 32
		Data stampa:	03/06/2004

APPENDICE N.2: Reazioni cutanee negli animali di controllo

ANIMALE N.	TEMPO DOPO IL CHALLENGE					
	48 ore		72 ore		96 ore	
	Eritema	Edema	Eritema	Edema	Eritema	Edema
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0

LEGENDA

Eritema

Nessun eritema	0
Leggero eritema	1
Eritema ben definito	2
Eritema moderato	3
Eritema grave fino alla formazione di escare	4

Edema

Nessun edema	0
Leggero edema	1
Edema ben definito	2
Edema moderato	3
Edema grave	4