

NOTA IMPORTANTE:

La entidad sólo puede hacer uso de esta norma para si misma, por lo que este documento NO puede ser reproducido, ni almacenado, ni transmitido, en forma electrónica, fotocopia, grabación o cualquier otra tecnología, fuera de su propio marco.

ININ/ Oficina Nacional de Normalización

EVALUACION BIOLOGICA DE EQUIPOS MEDICOS PARTE 5: ENSAYOS PARA LA CITOTOXICIDAD IN VITRO (ISO 10993-5:1999, IDT)

Biological evaluation of medical devices
Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity

**Oficina Nacional de Normalización (NC) Calle E No. 261 Vedado, Ciudad de La Habana.
Teléf.: 830-0835 Fax: (537) 33-8048 E-mail: nc@ncnorma.cu**

Prefacio

La Oficina Nacional de Normalización (NC), es el Organismo Nacional de Normalización de la República de Cuba que representa al país ante las Organizaciones Internacionales y Regionales de Normalización.

La preparación de las Normas Cubanas se realiza generalmente a través de los Comités Técnicos de Normalización. La aprobación de las Normas Cubanas es competencia de la Oficina Nacional de Normalización y se basa en evidencias de consenso.

La versión en inglés de la ISO 10993: 1999 “*Biological Evaluation of medical devices*”, consta de las siguientes partes:

Part 1: Evaluation and testing

Part 2: Animal welfare requirements.

Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity.

Part 4: Selection of tests for interactions with blood.

Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity

Part 6: Tests for local effects after implantation

Part 7: Ethylene oxide sterilization residuals

Part 8: Guidance for reference materials.

Part 9: Framework for the identification and quantification of potential degradation products

Part 10: Tests for irritation and sensitization.

Part 11: Tests for systemic toxicity.

Part 12: Sample preparation and reference materials.

Part 13: Identification and quantification of degradation products from polymers.

Part 14: Identification and quantification of degradation products from ceramics.

Part 15: Identification and quantification of degradation products from metals and alloys.

Part 16: Toxicokinetic study design for degradation products and leachables.

Part 17: Methods for establishment of allowable limits for leachabe substances using health-based risk assessment.

Part 18: Chemical characterization.

- Su Parte 5 ha sido elaborada, por el NC/CTN 11 de Equipos Médicos, integrado por las siguientes Instituciones:
 - Centro de Control Estatal de Equipos Médicos (MINSAP)
 - Instituto Nacional de Ontología y Radiología (MINSAP)
 - Centro Nacional de Toxicología (MINSAP)
 - Centro Nacional de Electromedicinma (MINSAP)
 - CCOI “ Frank Pais” (MINSAP)
 - Instituto de Investigaciones en Metrología (INIMET)
 - Instituto de Investigaciones en Normalización (ININ-ONN)
 - Oficina Nacional de Normalización (ONN)
- Es una adopción idéntica por el método de traducción de la versión en inglés de la ISO 10993-5: 1999 *Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.*

© NC, 2002

Todos los derechos reservados. A menos que se especifique, ninguna parte de esta publicación podrá ser reproducida o utilizada por alguna forma o medios electrónicos o mecánicos, incluyendo las fotocopias o microfilmes, sin el permiso previo escrito de:

Oficina Nacional de Normalización (NC).

Calle E No. 261 Ciudad de La Habana, Habana 3. Cuba.

Impreso en Cuba

Indice

1 Objeto.....	1
2 Referencias normativas.....	1
3 Términos y definiciones.....	1
4 Preparación de las muestras de ensayo	2
5 Líneas celulares	5
6 Medios de cultivo.....	5
7 Preparación del cultivo de células de reserva.....	6
8 Procedimientos de ensayo	6
9 Informe del ensayo.....	10
10 Evaluación de los resultados.....	11

Introducción

Como resultado de la aplicación generalizada de los ensayos de la citotoxicidad *"in vitro"* y de su amplio uso en la evaluación de un gran número de productos y materiales, el propósito de esta parte de la Norma ISO 10993 no es de especificar un tipo de ensayo sino definir un plan de ensayos que requiere de la toma de decisiones de una serie de pasos. Dicho plan deberá facilitar la selección del ensayo más apropiado.

Se mencionan tres categorías de ensayos: ensayos del extracto, ensayo por contacto directo y ensayo por contacto indirecto.

La selección de una o más de estas categorías depende de la naturaleza de la muestra a evaluar, el lugar potencial de uso y naturaleza del uso.

Por esa razón, la selección de las categorías determina los detalles de la preparación de las muestras a ensayar, la preparación de los cultivos de células y la forma en que las células se exponen a las muestras o a sus extractos.

Una vez finalizado el tiempo de exposición, se evalúa la presencia y la magnitud del efecto citotóxico. Esta parte de la Norma ISO 10993 deja a consideración del usuario la selección del tipo de evaluación. Esta estrategia hace que se disponga de un número de ensayos que refleje el enfoque de muchos grupos defensores de los ensayos biológicos *"in vitro"*.

Los numerosos métodos existentes y los aspectos que se miden en los ensayos de citotoxicidad se pueden agrupar en cuatro categorías de tipo de evaluación:

- a) evaluación de los daños celulares causados por medios morfológicos;
- b) medidas de los daños celulares;
- c) medidas del crecimiento celular;
- d) medidas de los aspectos específicos del metabolismo celular.

Por consiguiente, existen varios métodos alternativos para la obtención de resultados en cada uno de estas cuatro categorías. El investigador deberá tener pleno conocimiento de las categorías de ensayo y deberá saber en cual de ellas encaja una técnica particular con objeto de que los resultados de un producto se puedan comparar con los de otro material o producto similar, y para que se puedan realizar ensayos entre laboratorios diferentes.

EVALUACION BIOLOGICA DE EQUIPOS MEDICOS PARTE 5: ENSAYOS PARA LA CITOTOXICIDAD IN VITRO

1 Objeto

Esta Norma Cubana describe los métodos de ensayo destinados a evaluar la citotoxicidad *in vitro* de los equipos médicos.

Estos métodos especifican la incubación directa o por difusión de las células de cultivo.

a) con extractos de producto, y/o

b) en contacto con un producto

Estos métodos están diseñados para determinar la respuesta biológica de las células de mamíferos *in vitro* utilizando los parámetros biológicos apropiados.

2 Referencias normativas

Las siguientes normas contienen disposiciones que, al ser citadas en este texto, constituyen disposiciones de esta Norma Cubana. Las ediciones indicadas estaban en vigencia en el momento de esta publicación. Como toda norma está sujeta a revisión, se recomienda a aquellos que realicen acuerdos sobre la base de ellas que analicen la conveniencia de usar las ediciones más recientes de las normas citadas seguidamente. La Oficina Nacional de Normalización posee en todo momento la información sobre las normas internacionales, regionales y cubanas en vigencia.

ISO 10993-1. *Biological Evaluation of Medical Devices- Part 1: Evaluation and testing.*

ISO 10993-12:1996 *Biological Evaluation of Medical Devices- Part 12 Sample preparation and reference materials.*

3 Términos y definiciones

Para el propósito de esta parte de la norma, son aplicables las definiciones de la Norma ISO 10993-1 y las siguientes:

3.1 Material de control negativo: Material que cuando se somete a ensayo, de acuerdo con esta parte, no origina una respuesta citotóxica.

NOTA: El propósito del control negativo es demostrar la respuesta básica de las células. Por ejemplo, los polímeros sintéticos de poliestireno de alta densidad ⁽¹⁾ y las varillas cerámicas de óxido de aluminio para materiales dentales se han usado como controles negativos.

⁽¹⁾ El polietileno de alta densidad se puede obtener a partir de la Farmacopea de los Estados Unidos (Rokville-Maryland - Estados Unidos). esta información se facilita para conveniencia del usuario de esta parte de la Norma ISO 10993 y no constituye una aprobación del producto por parte de la ISO

3.2 Material de control positivo

Material que cuando se somete a ensayo, de acuerdo con esta parte de la Norma ISO 10993, origina una respuesta citotóxica reproducible.

NOTA: El propósito del control positivo es demostrar la respuesta del sistema de ensayo apropiado. Por ejemplo, se ha usado un cloruro de polipolivinilo ⁽²⁾ estabilizado por estado orgánico como control para los materiales sólidos y los extractos. También se han usado diluciones de fenol como control positivo para los extractos.

3.3 Control del reactivo

Vehículo de extracción sin material de ensayo que se somete a las condiciones de extracción y a los procedimientos de ensayo.

3.4 Recipientes de cultivo

Para el cultivo de células los recipientes apropiados son, placas Petri de vidrio, placas plásticas de cultivo, frascos plásticos de cultivo o placas plásticas de microvaloración y placas multipozos.

NOTA: En estos métodos pueden intercambiarse los recipientes, siempre que se cumplan los requisitos sobre el grado de cultivo y sean idóneos para usarse con células de mamíferos.

3.5 Subconfluencia

Aproximadamente el 80% de confluencia, por ejemplo el final de la fase logarítmica de crecimiento.

4 Preparación de las muestras de ensayo

4.1 Generalidades

El ensayo se realizará sobre

- a) un extracto del material; y/o
- b) el propio material.

La preparación de la muestra debe estar de acuerdo con la norma ISO 10993-12.

⁽²⁾ El polietileno de alta densidad se puede obtener a partir de la Farmacopea de los Estados Unidos (Rockville - Maryland, Estados Unidos). Esta información se facilita para conveniencia del usuario de esta parte de la Norma ISO 10993 y no constituye una aprobación del producto por parte de la ISO.

4.2 Preparación de los extractos líquidos del material

4.2.1 Principios de extracción

Las condiciones de extracción tratarán de exagerar las condiciones propias del uso clínico con el objeto de definir los riesgos toxicológicos potenciales sin causar cambios significativos como la fusión o el derretimiento de las piezas del material o la alteración de la estructura química.

NOTA: La concentración de cualquier sustancia endógena o externa al extracto y, por lo tanto, la cantidad que se exponga a las células de ensayo depende de factores tales como el área de interfase, el volumen de extracción, el pH, la solubilidad química, la osmolaridad, la agitación, la temperatura y otros factores.

4.2.2 Vehículo de extracción

En los ensayos con células de mamíferos, se usará uno o más de los solventes siguientes:

- a) medio de cultivo con suero;
- b) medio de cultivo sin suero;
- c) solución salina fisiológica;
- d) cualquier otro solvente apropiado.

NOTA: La lista anterior está hecha en orden de prioridad. Otros solventes apropiados incluyen el agua, el aceite vegetal y el sulfóxido de metilo (DMSO). Está demostrado que el DMSO es citotóxico para algunos sistemas de ensayo cuando se utilizan concentraciones superiores al 0,5% (V/V).

4.2.3 Condiciones de extracción

4.2.3.1 La extracción se realizará en envases cerrados estériles y químicamente inertes, con la ayuda de técnicas asépticas, de acuerdo a las ISO 10993-12.

4.2.3.2 Las condiciones de extracción recomendadas son:

- a) no menos de 24 h a $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- b) (72 ± 2) h a $(50 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- c) (24 ± 2) h a $(70 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- d) $(1 \pm 0,2)$ h a $(121 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Las condiciones recomendadas se pueden aplicar de acuerdo con las características del producto y las condiciones específicas de uso.

Los procedimientos de extracción que utilizan únicamente el medio de cultivo con suero se pueden usar en las condiciones que se especifican en el apartado 4.2.3.2. a).

4.2.3.3 Si el extracto es filtrado, centrifugado o procesado por otros métodos antes de ser aplicado a las células, se deberá incluir en el reporte final (ver cláusula 9). Cualquier ajuste de pH en el extracto debe ser reportado. Las manipulaciones del extracto, como los debidos a ajustes de pH, pudieran influir sobre el resultado.

4.3 Preparación del material para los ensayos por contacto directo.

4.3.1 Los materiales que tienen formas, tamaños o estados físicos diferentes (es decir, líquido o sólido) se pueden someter al ensayo de citotoxicidad sin modificación.

La muestra preferida para el estado sólido deberá tener, al menos, una superficie plana. Otras formas y estados físicos deberán modificarse.

4.3.2 La esterilidad del objeto de ensayo debe aparecer en el informe.

4.3.2.1 Durante el procedimiento de extracción y ensayo, los materiales de ensayo de los productos esterilizados se manipularán con las técnicas asépticas apropiadas.

4.3.2.2 Los materiales de ensayo de los equipos que normalmente se suministran no estériles pero que se esterilizan antes de su uso, se esterilizarán de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y, se manipularán con técnicas asépticas durante el procedimiento de extracción y ensayo.

Se deberá tener en consideración el efecto que los métodos o agentes de esterilización ejercen sobre el producto cuando se defina la preparación del material de ensayo antes de su uso en el sistema de ensayo.

4.3.2.3 Los materiales de ensayo de los productos que se pueden utilizar sin esterilizar se usarán tal y como se suministran y, durante el procedimiento de extracción y ensayo, se manipularán con las técnicas asépticas apropiadas.

4.3.3 Los líquidos se someterán a ensayo

- a) por deposición directa, o
- b) por deposición en una matriz absorbente biológicamente inerte.

NOTA: Se ha demostrado que los discos de filtro son apropiados.

4.3.4 Si fuera apropiado, los materiales super-absorbentes se humedecerán con el medio de cultivo antes del ensayo.

5 Líneas celulares

5.1 Las líneas celulares son recomendables y cuando se utilicen deberán obtenerse de depósitos reconocidos⁽³⁾

5.2 En caso de que se precise una sensibilidad específica, los cultivos celulares primarios y las líneas celulares obtenidas directamente de tejidos vivos se usarán únicamente si se pudiera demostrar la reproducibilidad y precisión de la respuesta.

5.3 Si se almacena una muestra del cultivo de una línea celular, deberá guardarse a una temperatura de -80 °C o menor; en el medio de cultivo se le agregará un crioprotector como, por ejemplo, dimetilsulfóxido o glicerol. Si se conservara por un largo período de tiempo (algunos meses o años) será solo posible a temperatura de -130 °C o menor.

5.4 En el ensayo se usarán únicamente células que no tengan micoplasma. Para comprobar la ausencia de micoplasma, los cultivos de células se someterán a ensayo antes de su uso, utilizando un método establecido.

6 Medios de cultivo

6.1 El medio de cultivo será estéril.

6.2 El medio de cultivo con o sin suero cumplirá los requisitos sobre el crecimiento de la línea celular seleccionada.

NOTA: A los medios de cultivo se les puede agregar antibióticos, siempre que éstos no ejerzan efectos adversos sobre los ensayos.

La estabilidad del medio de cultivo varía en función de su composición y las condiciones de almacenamiento. Los medios de cultivo que contienen suero y glutamina pueden almacenarse hasta una semana a temperaturas de entre 2 °C y 8 °C. Los medios de cultivo sin suero que contienen glutamina se pueden almacenar no más de 2 semanas.

6.3 El pH del medio de cultivo se mantendrá entre 7,2 y 7,4.

⁽³⁾ Por ejemplo, las líneas celulares recomendadas con la Colección de Cultivo Tipo Norteamericano CCL, (clon NCTC 929), la CCL 163 (clon Balb/3T3 clon A31), la CCL 171 (MRC-5) y la CCL 75 (WI-38), la CCL 81 (vero), la CCL 10 [BHK-21 (C-13)] y la V-79 379 A. Esta información se ofrece para conveniencia del usuario de esta parte de la Norma ISO 10993 y no constituye una aprobación por parte de la ISO de los productos mencionados. Se pueden usar otras líneas celulares si se demuestra que conducen a los mismos resultados

7 Preparación del cultivo de células de reserva

7.1 Usando la línea celular y el medio de cultivo seleccionados, se prepara una cantidad de células suficiente para todo el ensayo. Si las células han de desarrollarse a partir de los cultivos almacenados, se retira el agente crioprotector, si estuviera presente. Las células se subcultivan, al menos, una vez antes de su uso.

7.2 Se retiran las células y se vuelven a suspender por disgregación enzimática y/o mecánica, utilizando el método apropiado para la línea celular.

8 Procedimientos de ensayo

8.1 Número de réplicas

Se usarán un mínimo de 3 réplicas para las muestras de ensayo y los controles.

8.2 Ensayo sobre los extractos

8.2.1 Este ensayo permite evaluar la citotoxicidad de forma cuantitativa y cualitativa.

8.2.2 Se le transfiere una parte alícuota de la suspensión celular, constantemente agitada, a cada uno de los recipientes necesarios para la exposición de los extractos. Las células se distribuyen uniformemente por toda la superficie de cada recipiente mediante una ligera rotación.

8.2.3 Se incuban los cultivos a $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ al aire libre con o sin dióxido de carbono al 5 % (V/V) según sea apropiado para el sistema amortiguador seleccionado para el medio de cultivo.

El ensayo se puede realizar sobre una capa monomolecular subconfluente o sobre una suspensión de células recientemente preparadas (resuspendidas).

En el caso de que se realice un ensayo en el que se formen colonias, se usará una densidad celular baja.

8.2.4 Se debe verificar la subconfluencia y la morfología de los cultivos con un microscopio antes de comenzar el ensayo.

8.2.5 El ensayo se realiza con

- a) extracto original; o
- b) una serie de diluciones del extracto, utilizando el medio de cultivo como solvente.

Si en el ensayo se utilizaran capas monocelulares, a los cultivos se les retira el medio de cultivo y se añade una parte alícuota del extracto o su solución en cada uno de los recipientes.

Si en el ensayo se utilizaran células en suspensión, a cada réplica se le añade el extracto o solución inmediatamente después de preparada la suspensión celular.

8.2.6 Cuando se usa un extracto no fisiológico como, por ejemplo, el agua, el extracto se ensayará a la mayor concentración fisiológicamente compatible después de su disolución en el medio de cultivo.

NOTA: Se recomienda que durante la disolución de los extractos acuosos se usen medios de cultivo concentrados como, por ejemplo, 2x, 5x.

8.2.7 Se toman las réplicas adicionales de los recipientes y se les adiciona alícuotas conocidas del reactivo en blanco y de los controles negativo y positivo.

NOTA: Si fuera apropiado, también se puede someter a ensayo un medio de cultivo fresco.

8.2.8 Se incuban los recipientes usando las mismas condiciones que se describen en el apartado 8.2.3 durante un período de tiempo que sea apropiado para el ensayo específico seleccionado

8.2.9 Después de un período de incubación no menor de 24 h, determine los efectos citotóxicos de acuerdo con el acápite 8.5.

8.3 Ensayo por contacto directo

Este ensayo permite la evaluación cuantitativa y cualitativa de la citotoxicidad.

8.3.2 Se transfiere una parte alícuota de la suspensión celular constantemente agitada a cada uno de los recipientes necesarios para el ensayo de exposición directa. Las células se distribuyen uniformemente por toda la superficie de los recipientes mediante una ligera rotación horizontal.

8.3.3 Se incuban los cultivos a $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ al aire libre con o sin dióxido de carbono al 5% (V/V) según sea apropiado para el sistema amortiguador seleccionado para el medio de cultivo, hasta que los cultivos hayan crecido hasta la subconfluencia.

8.3.4 Verificar la subconfluencia y la morfología de los cultivos con un microscopio antes de comenzar el ensayo.

8.3.5 A cada uno de los recipientes se les retira el medio de cultivo, tras lo cual se le añade medio de cultivo fresco.

8.3.6 Se colocan con cuidado los artículos de ensayo sobre la capa celular del centro de cada uno de los recipientes. Deberá asegurarse que el objeto de ensayo cubre alrededor de 1/10 de la superficie de la capa celular.

Se evitará todo movimiento innecesario de los artículos de ensayo ya que podrían causarse daños físicos a las células, los cuales se ponen en evidencia por paquetes de células desprendidas.

NOTA: En algunos casos, los artículos de ensayo se pueden colocar en los recipientes de cultivo antes de la adición de las células.

8.3.7 Se preparan recipientes réplicas para los materiales de control negativo y de control positivo.

8.3.8 Se incuban los recipientes utilizando las mismas condiciones que se describen en el apartado 8.3.3. durante un período de tiempo que sea apropiado (mínimo de 24 h) para el ensayo específico seleccionado.

8.3.9 Se elimina el medio de cultivo flotante y se determina la citotoxicidad de acuerdo con el apartado 8.5.

8.4 Ensayo por contacto indirecto

8.4.1 Difusión a través del agar

8.4.1.1 Este ensayo permite una evaluación cualitativa de la citotoxicidad. Este ensayo no es apropiado para migrables que no difundan a través de la capa de agar, o que puedan reaccionar con el agar.

8.4.1.2 Se transfiere una parte alícuota de la suspensión celular constantemente agitada a cada una de las réplicas necesarias para el ensayo. Las células se distribuyen uniformemente por toda la superficie de cada uno de los recipientes mediante una ligera rotación horizontal.

8.4.1.3 Se incuban los cultivos a $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ al aire libre con o sin dióxido de carbono al 5% (V/V) según sea apropiado para el sistema amortiguador seleccionado para el medio de cultivo, hasta que los cultivos hayan crecido hasta casi coincidir con la confluencia y el final de la fase logarítmica de la curva de crecimiento.

8.4.1.4 Verificar la subconfluencia y la morfología de los cultivos con un microscopio antes de comenzar el ensayo.

8.4.1.5 Se retira y elimina el medio de cultivo de los recipientes. Posteriormente, se mezcla un medio de cultivo fresco que contenga suero con agar derretido, de manera que a concentración de agar en la solución resultante sea de 0,5 % a 2 % y se le transfiere un volumen apropiado de esta mezcla a cada recipiente. Únicamente deberá utilizarse el agar apropiado para el desarrollo de las células de mamíferos en cultivo. La mezcla del medio de cultivo con agar deberá estar en estado líquido y su temperatura no deberá afectar a las células de mamíferos.

NOTA: El agar de puede adquirir con diferentes pesos moleculares y niveles de pureza.

8.4.1.6 Se colocan con cuidado las réplicas de los artículos de ensayo sobre la capa de agar solidificada de cada recipiente. Deberá asegurarse que el objeto de ensayo cubre alrededor de 1/10 de la superficie de la capa celular.

Antes de colocar los materiales absorbentes sobre el agar, éstos se humedecerán previamente con el medio de cultivo a fin de evitar la deshidratación del agar.

8.4.1.7 Se preparan réplicas con los artículos de ensayo de control negativo y de control positivo.

8.4.1.8 Se incuban los recipientes utilizando las mismas condiciones que se describen en el apartado 8.4.1.3. entre 24 h y 72 h.

8.4.1.9 Se verifica la citotoxicidad de las células antes y después de retirar cuidadosamente los artículos de ensayo del agar.

El uso de un tinte como, por ejemplo, el rojo neutro, puede ayudar en la detección de la citotoxicidad. Dicho tinte se puede agregar antes o después del proceso de incubación de los artículos de ensayo. Si se añade el tinte con anterioridad a la incubación, se protegerán los cultivos con objeto de evitar que la fotoactivación del tinte dañe las células.

8.4.2 Difusión por filtro

8.4.2.1 Este ensayo permite la evaluación cualitativa de la citotoxicidad.

8.4.2.2 A cada recipiente se le coloca un filtro libre de aditivos, con poros de $0,45\mu\text{m}$ y se le agrega una parte alícuota conocida de la suspensión celular constantemente agitada. Las células se distribuyen uniformemente por toda la superficie de cada filtro mediante un giro suave de dichos recipientes,

8.4.2.3 Se incuban los cultivos a $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ al aire libre con o sin dióxido de carbono al 5% (V/V) según sea apropiado para el sistema amortiguador seleccionado para el medio de cultivo, hasta que los cultivos hayan crecido hasta casi coincidir con la confluencia y el final de la fase logarítmica de la curva de crecimiento.

8.4.2.4 Verificar la subconfluencia y la morfología de los cultivos con un microscopio antes de comenzar el ensayo.

8.4.2.5 Se retira y elimina el medio de cultivo de los recipientes. Posteriormente se transfieren los filtros hacia una capa de agar solidificado (véase el apartado 8.4.1.6), poniendo la cara que contiene las células hacia abajo.

8.4.2.6 Se coloca con cuidado, las réplicas de los artículos de ensayo sobre la cara superior o acelular del filtro. Los extractos líquidos y los compuestos recientemente mezclado se retienen en anillos no reactivos colocados sobre el filtro.

8.4.2.7 Se preparan réplicas de los filtros con los artículos de ensayo de control negativo y control positivo.

8.4.2.8 Se incuban los recipientes utilizando las mismas condiciones que se describen en el apartado 8.4.2.3, por un tiempo $2\text{ h} \pm 10\text{ min}$.

8.4.2.9 Se retiran con cuidado artículos de ensayo que se colocaron sobre el filtro y posteriormente se retira el filtro de su posición sobre el agar.

8.4.2.10 Se determina la citotoxicidad usando un procedimiento de tinte apropiado.

8.5 Determinación de la citotoxicidad

8.5.1 La citotoxicidad se determina cualitativa o cuantitativamente.

- a) **Evaluación cualitativa:** Se observan las células con un microscopio con el objeto de evaluar los cambios en, por ejemplo, la morfología general, la vacuolización, los desprendimientos, la lisis y la membrana celular. En el informe del ensayo se pueden registrar los cambios morfológicos de una manera descriptiva o numéricamente.

Escala de citotoxicidad	Interpretación
0	No citotóxico
1	Ligeramente citotóxico
2	Moderadamente citotóxico
3	Severamente citotóxico

El método de evaluación y los resultados de la evaluación deben ser incluidos en el informe de ensayo.

- b) **Evaluación cuantitativa:**

Se mide la muerte celular, la inhibición del crecimiento celular y la proliferación o formación de colonias de células. Se podrá contar objetivamente el número de células, la cantidad de proteínas, la liberación de enzimas y tintes y la reducción del tinte entre otros parámetros. Las medidas objetivas y la respuesta celular se registrarán en el informe del ensayo.

NOTA: Para algunos métodos de determinación de la citotoxicidad, puede resultar necesario un período de tiempo cero y un control del cultivo celular básico.

8.5.2 La selección de los métodos de evaluación se realizará con mucho cuidado ya que los resultados del ensayo pueden invalidarse si los artículos de ensayo liberan sustancias que interfieran los sistemas de ensayos o las medidas.

NOTA: Los materiales que liberan formaldehidos únicamente se pueden someter a ensayos fiables si la medida del ensayo evalúa la viabilidad de las células.

8.5.3 Si los resultados entre las réplicas de los recipientes de cultivo son muy diferentes, entonces el ensayo es inapropiado.

8.5.4 Si los controles negativos, positivos o de otro tipo (patrón, medio, testigo, reactivo, etc.) no ofrecen las respuestas previstas para los sistemas de ensayo, se repite(n) el (los) ensayo(s).

9 Informe del ensayo

El informe del ensayo incluirá una información detallada sobre los aspectos siguientes:

- a) descripción de la muestra;
- b) línea celular y justificación de la selección;
- c) medio de cultivo;
- d) método de ensayo;

- e) procedimiento de extracción (si fuera apropiado) y, si es posible la naturaleza y la concentración de la(s) sustancia(s) migrable(s);
- f) los controles negativos, positivos y de otro tipo;
- g) respuesta celular y otras observaciones; y
- h) cualquier otro dato necesario para la evaluación de los resultados.

10 Evaluación de los resultados

La evaluación general de los resultados del ensayo estará a cargo de un personal competente y entrenado, que sea capaz de tomar decisiones sobre la base de los datos del ensayo. Si los resultados no son concluyentes o válidos se repetirá el ensayo.