



Instituto Valenciano de Microbiología

Masía El Romeral
Ctra. Bétera – San Antonio de Benagéber, Km 0,3
46117 Bétera (Valencia)
Tel. 96 169 17 02
Fax 96 169 16 37
e-mail: ivami@ivami.com
www.ivami.com
CIF B-96337217

Prueba de reversión de mutaciones bacterianas (Bacterial Reverse Mutation Test) – Normas ISO 10993-3: 2014 (Biological Evaluation of Medical Devices, Part 3: Test for Genotoxicity, Carcinogenicity and Reproductive Toxicity) y OECD 471: 1997 (Bacterial Reverse Mutation Test)

Informe

Nº de registro TX/17/17.

1. **Laboratorio de ensayo:** Instituto Valenciano de Microbiología, S.L.

2. **Cliente** Graphenano S.L.
Dirección C/ 2ª, 1 Polígono Táctica
46980 Paterna.

3. Identificación de la muestra

- Tipo de producto..... Disco Acrílico.
- Nombre del producto..... Disco Acrílico.
- Número de lote..... No indicado.
- Fabricante / Remitente de la muestra..... Graphenano, S.L.
- Fecha de recepción del producto.. 14/08/2017.
- Fecha de recepción de petición con condiciones de prueba..... 18/08/2017.
- Condiciones de conservación..... No indicado.
- Tipo de muestra (líquida, sólida).. Sólida.
- Aspecto del producto..... Disco acrílico transparente.
- Fecha de caducidad (si corresponde)..... No indicado.

4. Método de ensayo y su validación

Esta prueba se realiza según las directrices de la norma UNE-EN-ISO 10993-3: 2014 y OECD 471: 1997 (Procedimiento interno TOXICOL/EVADISP-0930).

Procedimiento por exposición a extracto del dispositivo. Norma UNE-EN ISO 10993-12:2012. Evaluación biológica de productos sanitarios: Preparación de muestras y materiales de referencia. (Procedimiento interno TOXICOL/EVADISP-0050).

5. Condiciones experimentales

- Periodo del análisis..... De 04/09/2017 a 22/09/17.
- Dispositivo estéril / esterilizado en el laboratorio..... Estéril.
- Microorganismos utilizados:.....
 - Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-880.
 - Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-881.
 - Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-882.
 - Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-883.
 - Escherichia coli* CECT-7326.
- Tipo de recipiente para el ensayo... Placas de Petri de 90 mm.
- Controles positivos utilizados.....
 1. 2-Nitrofluorene.
 2. Cumene hydrogen peroxide.
 3. Mitomicina C.
 4. 2-Aminoantraceno.
 5. Azida de sodio.
- Controles negativos utilizados.....
 1. Dimetilsulfóxido (DMSO).
 2. Agua destilada estéril.
 3. Solución de cloruro sódico 9g/L.
- Número de réplicas realizadas con el producto..... 3 (triplicado).
- Número de réplicas de los controles positivos..... 3 (triplicado).
- Número de réplicas de los controles negativos..... 3 (triplicado)
- Tiempo de incubación previa de los microorganismos..... 24 horas.
- Periodos de observación tras la exposición..... 48 horas.
- Medio de extracción..... Solución de cloruro sódico 9g/L.
- Método de extracción..... Producto de ensayo en agitación en solución salina a + 37°C ± 1°C durante 72 horas.
- Proporción producto/volumen de medio de extracción 0,2 g/mL.

6. Seguimiento cualitativo de los cultivos bacterianos durante el periodo de ensayo

- Observación microscópica.

7. Métodos cuantitativos para la evaluación de la genotoxicidad

- Tasa de mutagenicidad (RM) =
$$\frac{\text{Revertantes inducidos}}{\text{Revertantes espontáneos}}$$
- Para que una muestra se considere mutagénica, la tasa de mutagenicidad debe ser ≥ 3 .

8. Observaciones especiales relevantes durante la prueba

- Para realizar el ensayo no ha sido necesario fraccionar el producto recibido.

9. Tabla de resultados. Método de incorporación en placa.

Bacteria: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-880

Ensayos	R1	R2	R3	Media
Producto con activador	19	23	19	20
Producto sin activador	12	17	13	14
Solución de cloruro sódico 9 g/L con activador	17	27	23	22
Solución de cloruro sódico 9 g/L sin activador	10	13	18	14
Control positivo (2-aminoantraceno) con activador	68	69	71	69
Solvente de control positivo (DMSO) con activador	25	18	26	23
Control positivo (2-nitrofluorene) sin activador	51	49	48	49
Solvente de control positivo (agua destilada estéril) sin activador	13	17	19	16

Bacteria: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-881

Ensayos	R1	R2	R3	Media
Producto con activador	98	88	92	93
Producto sin activador	83	76	86	82
Solución de cloruro sódico 9 g/L con activador	92	110	103	102
Solución de cloruro sódico 9 g/L sin activador	73	101	88	87
Control positivo (2-aminoantraceno) con activador	286	297	294	292
Solvente de control positivo (DMSO) con activador	92	86	94	91
Control positivo (azida de sodio) sin activador	227	238	266	244
Solvente de control positivo (agua destilada estéril) sin activador	70	81	87	79

Bacteria: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-882

Ensayos	R1	R2	R3	Media
Producto con activador	19	18	15	17
Producto sin activador	6	6	7	6
Solución de cloruro sódico 9 g/L con activador	19	17	19	18
Solución de cloruro sódico 9 g/L sin activador	6	7	6	6
Control positivo (2-aminoantraceno) con activador	44	58	52	51
Solvente de control positivo (DMSO) con activador	21	15	13	16
Control positivo (azida de sodio) sin activador	45	48	32	42
Solvente de control positivo (agua destilada estéril) sin activador	4	5	4	4

Bacteria: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-883

Ensayos	R1	R2	R3	Media
Producto con activador	21	22	27	23
Producto sin activador	15	16	17	16
Solución de cloruro sódico 9 g/L con activador	23	22	27	24
Solución de cloruro sódico 9 g/L sin activador	16	19	17	17
Control positivo (2-aminoantraceno) con activador	123	118	127	123
Solvente de control positivo (DMSO) con activador	28	37	32	32
Control positivo (cumene hydrogen peroxide) sin activador	50	47	58	52
Solvente de control positivo (agua destilada estéril) sin activador	13	19	17	16

Bacteria: *Escherichia coli* CECT-7326

Ensayos	R1	R2	R3	Media
Producto con activador	10	8	12	10
Producto sin activador	6	8	12	9
Solución de cloruro sódico 9 g/L con activador	12	11	9	11
Solución de cloruro sódico 9 g/L sin activador	7	13	15	12
Control positivo (2-aminoantraceno) con activador	23	25	18	22
Solvente de control positivo (DMSO) con activador	5	7	6	6
Control positivo (mitomicina C) sin activador	30	38	36	35
Solvente de control positivo (agua destilada estéril) sin activador	9	11	13	11

10. Tabla de resultados. Método de preincubación.

Bacteria: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-880

Ensayos	R1	R2	R3	Media
Producto con activador	18	21	23	21
Producto sin activador	13	18	15	15
Solución de cloruro sódico 9 g/L con activador	16	25	24	22
Solución de cloruro sódico 9 g/L sin activador	12	11	10	11
Control positivo (2-aminoantraceno) con activador	72	69	73	71
Solvente de control positivo (DMSO) con activador	23	20	26	23
Control positivo (2-nitrofluorene) sin activador	53	51	56	53
Solvente de control positivo (agua destilada estéril) sin activador	15	16	18	16

Bacteria: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-881

Ensayos	R1	R2	R3	Media
Producto con activador	93	84	95	91
Producto sin activador	85	79	73	79
Solución de cloruro sódico 9 g/L con activador	90	99	95	95
Solución de cloruro sódico 9 g/L sin activador	84	93	88	88
Control positivo (2-aminoantraceno) con activador	276	284	291	284
Solvente de control positivo (DMSO) con activador	85	91	89	88
Control positivo (azida de sodio) sin activador	235	228	254	239
Solvente de control positivo (agua destilada estéril) sin activador	68	72	84	72

Bacteria: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-882

Ensayos	R1	R2	R3	Media
Producto con activador	17	19	15	17
Producto sin activador	12	13	15	13
Solución de cloruro sódico 9 g/L con activador	19	15	17	17
Solución de cloruro sódico 9 g/L sin activador	16	10	12	13
Control positivo (2-aminoantraceno) con activador	43	53	55	50
Solvente de control positivo (DMSO) con activador	20	17	12	16
Control positivo (azida de sodio) sin activador	43	51	40	45
Solvente de control positivo (agua destilada estéril) sin activador	14	15	13	14

Bacteria: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* CECT-883

Ensayos	R1	R2	R3	Media
Producto con activador	20	21	25	22
Producto sin activador	18	17	19	18
Solución de cloruro sódico 9 g/L con activador	21	25	27	24
Solución de cloruro sódico 9 g/L sin activador	15	18	19	17
Control positivo (2-aminoantraceno) con activador	121	117	126	121
Solvente de control positivo (DMSO) con activador	31	33	28	31
Control positivo (cumene hydrogen peroxide) sin activador	52	59	53	51
Solvente de control positivo (agua destilada estéril) sin activador	18	12	16	15

Bacteria: *Escherichia coli* CECT-7326

Ensayos	R1	R2	R3	Media
Producto con activador	12	18	13	14
Producto sin activador	12	15	16	14
Solución de cloruro sódico 9 g/L con activador	13	14	13	13
Solución de cloruro sódico 9 g/L sin activador	12	15	16	14
Control positivo (2-aminoantraceno) con activador	35	27	31	31
Solvente de control positivo (DMSO) con activador	9	8	10	9
Control positivo (mitomicina C) sin activador	38	35	39	37
Solvente de control positivo (agua destilada estéril) sin activador	13	12	10	12

11. Evaluación cuantitativa

$$\text{Tasa de mutagenicidad (RM)} = \frac{\text{RI (Revertantes inducidos)}}{\text{RE (Revertantes espontáneos)}}$$

Tasa de mutagenicidad (RM)	<i>S. enterica</i> CECT-880	<i>S. enterica</i> CECT-881	<i>S. enterica</i> CECT-882	<i>S. enterica</i> CECT-883	<i>E. coli</i> CECT-7326
Con activador incorporado en placa	0,91	0,91	0,95	0,97	0,94
Sin activador incorporado en placa	1,02	0,94	1,00	0,92	0,74
Con activador y preincubación	0,95	0,96	1,00	0,90	1,08
Sin activador y preincubación	1,39	0,89	1,05	1,04	1,00

RI: resultados del producto con y sin activador; RE: resultados del solvente del producto con y sin activador.

12. Interpretación de los resultados:

No se observa mayor crecimiento en los cultivos de la muestra a las 48 horas, en comparación con los controles. El número de colonias viables no varía respecto a los controles de cepas. No se observa un aumento del crecimiento durante el tiempo de incubación en presencia del dispositivo. La tasa de mutagenicidad (RM) del producto recibido es inferior a 3.

13. Conclusiones:

La exposición de las cepas bacterianas al producto sanitario **Disco Acrílico**, lote no indicado, no posee efecto genotóxico cuando se ensaya según las condiciones citadas.

Bétera (Valencia), a 26 de Septiembre de 2017.

Fdo. Alma Ballester
Responsable de área
(Director de estudio)

Fdo. Noelia Ros
Técnico responsable
(Investigador)

Fdo. Encarnación Esteban
Director Técnico
(Director Garante de Calidad)

Referencias:

- UNE-EN ISO 10993-3: 2014. Biological evaluation of medical devices — Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity.
- OECD 471: 1997. Guideline for testing of chemicals. Bacterial Reverse Mutation Test.
- UNE-EN ISO 10993-12:2012. Evaluación biológica de productos sanitarios. Parte 12: Preparación de muestras y materiales de referencia.