

NORME
INTERNATIONALE

ISO
10993-5

Première édition
1992-12-15

**Évaluation biologique des dispositifs
médicaux —**

Partie 5:

Essais de cytotoxicité: méthodes in vitro

iTeh STANDARD PREVIEW

Biological evaluation of medical devices —

Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods

ISO 10993-5:1992

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4209574d-84d9-4dea-ab5a-96859c347e1/iso-10993-5-1992>



Numéro de référence
ISO 10993-5:1992(F)

Sommaire

1	Domaine d'application	1
2	Référence normative	1
3	Définitions	1
4	Préparation des échantillons	2
4.1	Généralités	2
4.2	Préparation des liquides d'extraction du matériau	2
4.3	Préparation du matériau pour les essais en contact direct.....	2
5	Lignées cellulaires	3
6	Milieu de culture.....	3
7	Préparation de la culture-stock cellulaire	4
8	Modes opératoires	4
8.1	Nombre d'exemplaires.....	4
8.2	Essais à partir d'extraits.....	4
8.3	Essais en contact direct.....	4
8.4	Essais en contact indirect.....	5
8.5	Détermination de la cytotoxicité.....	6
9	Rapport d'essai.....	6
10	Interprétation des résultats.....	6
standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4209574d-64d9-4dea-ab5a-96859cb347e1/iso-10993-5-1992		
Annexe		
A	Bibliographie	7

© ISO 1992

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case postale 56 ● CH-1211 Genève 20 ● Suisse

Version française tirée en 1994

Imprimé en Suisse

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 10993-5 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 194, *Évaluation biologique des dispositifs médicaux*.

L'ISO 10993 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Évaluation biologique des dispositifs médicaux*:

- *Partie 1: Lignes directrices pour le choix des essais*
- *Partie 2: Exigences concernant la protection des animaux*
- *Partie 3: Essais concernant la génotoxicité, la cancérogénécité et la toxicité sur la reproduction*
- *Partie 4: Choix des essais concernant les interactions avec le sang*
- *Partie 5: Essais de cytotoxicité: méthodes in vitro*
- *Partie 6: Essais concernant les effets locaux après implantation*
- *Partie 7: Résidus de stérilisation à l'oxyde d'éthylène*
- *Partie 9: Dégradation des matériaux relative à l'évaluation biologique*
- *Partie 10: Essais d'irritation et de sensibilisation*
- *Partie 11: Essais de toxicité générale*
- *Partie 12: Préparation des échantillons et matériaux de référence*

Des parties ultérieures concerneront d'autres aspects des essais biologiques.

L'annexe A de la présente partie de l'ISO 10993 est donnée uniquement à titre d'information.

Introduction

En raison de l'application généralisée des essais de cytotoxicité in vitro et de leur utilisation étendue pour l'évaluation d'une large gamme de dispositifs et matériaux implantables, l'objectif de la présente partie de l'ISO 10993 est de définir un schéma d'essai plutôt que de prescrire un seul essai, ce qui implique de réaliser des choix à des étapes successives. Il convient que cette approche permette de sélectionner l'essai le plus approprié.

Trois catégories d'essai sont présentées: les essais à partir d'extraits, les essais en contact direct, les essais en contact indirect.

Le choix d'une ou plusieurs de ces catégories dépend de la nature de l'échantillon à essayer, du site d'utilisation et du mode d'utilisation futurs.

Ce choix détermine alors les détails de la préparation des échantillons à essayer, la préparation des cultures cellulaires et la manière dont les cellules vont être exposées aux échantillons ou à leurs extraits.

À la fin de la période d'exposition est réalisée l'évaluation de la présence et de l'étendue d'un effet cytotoxique. C'est l'objectif de la présente partie de l'ISO 10993 de laisser ouvert le choix du mode d'évaluation. Une telle stratégie permet de disposer d'une batterie d'essais, représentant l'approche de nombreux groupes qui préconisent des essais biologiques in vitro.

Les nombreuses méthodes utilisées ainsi que les paramètres mesurés pour la détermination de la cytotoxicité peuvent être groupés en catégories de mode d'évaluation:

- a) évaluation morphologique de l'atteinte cellulaire;
- b) mesure de l'atteinte cellulaire;
- c) mesure de la croissance cellulaire;
- d) mesure des aspects spécifiques du métabolisme cellulaire.

Il existe par conséquent plusieurs moyens différents pour obtenir des résultats dans chacune de ces quatre catégories. Il convient que le chercheur connaisse les catégories d'essai et la technique particulière la plus adaptée à chaque catégorie, afin que des comparaisons puissent être réalisées avec les résultats obtenus sur des dispositifs ou des matériaux semblables, et que des essais interlaboratoires puissent être effectués.

Évaluation biologique des dispositifs médicaux —

Partie 5:

Essais de cytotoxicité: méthodes in vitro

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 10993 décrit des méthodes d'essais pour mesurer la cytotoxicité in vitro des dispositifs médicaux.

NOTE 1 Le terme dispositifs médicaux correspond à la définition donnée dans l'ISO 10993-1 et couvre les matériaux à usage médical ainsi que les matériaux et dispositifs à usage dentaire. La définition est en conformité avec le document CEN normalisé.

Ces méthodes prescrivent l'incubation de cellules en culture soit directement, soit par diffusion

- avec des extraits du dispositif, et/ou
- en contact direct avec le dispositif.

Ces méthodes sont destinées à déterminer la réponse biologique de cellules de mammifères in vitro, à l'aide de paramètres biologiques appropriés.

2 Référence normative

La norme suivante contient des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 10993. Au moment de la publication, l'édition indiquée était en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente partie de l'ISO 10993 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer l'édition la plus récente de la norme indiquée ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 10993-1:1992, *Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 1: Lignes directrices pour le choix des essais.*

3 Définitions

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 10993, les définitions données dans l'ISO 10993-1 ainsi que les définitions suivantes s'appliquent.

3.1 matériau contrôle négatif: Matériau qui, essayé conformément à la présente partie de l'ISO 10993, ne produit pas de réponse cytotoxique.

NOTE 2 L'objet du contrôle négatif est de mettre en évidence la réponse basale des cellules. Par exemple, le polyéthylène haute densité (voir ci-après) dans le cas des polymères synthétiques, et les batonnets d'alumine en céramique dans le cas des matériaux dentaires, ont été utilisés comme contrôles négatifs.

Le polyéthylène haute densité peut être obtenu auprès de la Pharmacopée des États-Unis (Rockville — Maryland — USA). Cette information est donnée pour aider l'utilisateur de la présente partie de l'ISO 10993, mais elle ne constitue aucunement une validation par l'ISO du produit.

3.2 matériau contrôle positif: Matériau qui, essayé conformément à la présente partie de l'ISO 10993, induit une réponse cytotoxique reproductible.

NOTE 3 L'objet du contrôle positif est de mettre en évidence une réponse adaptée à l'essai choisi. Par exemple, un chlorure de polyvinyle stabilisé par l'étain a été utilisé comme contrôle positif pour les matériaux solides et les extraits. Des dilutions de phénol, par exemple, ont été utilisées comme contrôles positifs pour les extraits.

3.3 réactif contrôle: Véhicule d'extraction soumis aux conditions d'extraction et au protocole d'essai, mais sans le matériau d'essai.

3.4 récipients de culture: Terme englobant les boîtes de Petri en verre, les boîtes de culture en plastique, les flacons de culture en plastique ou les plaques multipuits ou pour microtitration en plastique.

NOTE 4 Les récipients de culture peuvent être utilisés de manière interchangeable dans le cadre de ces méthodes, à condition qu'ils soient conformes aux prescriptions de la classe de culture cellulaire et appropriés à la culture de cellules de mammifères.

4 Préparation des échantillons

4.1 Généralités

L'essai doit être réalisé avec

- a) un extrait du matériau, et/ou
- b) le matériau lui-même.

Pour les deux méthodes, le matériau d'essai doit être représentatif

- c) soit du produit final
- d) soit d'un composant du produit final qui doit être soumis à l'essai.

4.2 Préparation des liquides d'extraction du matériau

4.2.1 Principe d'extraction

Les conditions d'extraction doivent avoir tendance à exagérer les conditions d'utilisation clinique du matériau, afin de définir une probabilité potentielle de toxicité, sans induire de modifications significatives telles que la fusion ou le ramollissement des pièces du matériau, et sans altérer sa structure chimique.

NOTES

5 Les résultats obtenus à partir d'essais où les conditions d'extraction ont été exagérées doivent être interprétés à la lumière de ces exagérations. On doit juger utile, dans l'interprétation des résultats, leur adéquation aux conditions réelles d'utilisation et à la toxicité potentielle du dispositif/matériau.

6 La concentration de toute substance endogène ou exogène dans l'extrait, et donc le taux de ces substances mis au contact des cellules utilisées dans l'essai, dépendent de la surface de contact, du volume d'extraction, du pH, de la solubilité chimique, de l'osmolarité, de l'agitation, de la température et d'autres facteurs.

4.2.2 Véhicule d'extraction

Pour les essais avec cellules de mammifères, les solvants suivants doivent être utilisés:

- a) milieu de culture avec sérum;
- b) milieu de culture sans sérum;
- c) chlorure de sodium à 9 g/l dans de l'eau déionisée;
- d) tout autre solvant approprié.

NOTE 7 La liste est présentée par ordre préférentiel d'utilisation. D'autres solvants sont appropriés, tels que l'eau, l'huile végétale, le diméthylsulfoxyde (DMSO). Le

DMSO est connu pour être cytotoxique dans le cadre d'essais sélectionnés à des concentrations supérieures à 0,5 % (V/V).

4.2.3 Conditions d'extraction

4.2.3.1 L'extraction doit être réalisée dans des récipients fermés, stériles, chimiquement inertes et en conditions d'asepsie.

4.2.3.2 La durée et la température d'extraction dépendent des caractéristiques physico-chimiques du matériau et du véhicule d'extraction. Les conditions recommandées sont les suivantes:

- a) pas moins de 24 h à 37 °C;
- b) 72 h à 50 °C;
- c) 24 h à 70 °C;
- b) 1 h à 121 °C.

Il convient que les conditions d'extraction simulent le plus possible les conditions dans lesquelles le dispositif sera couramment utilisé. En conséquence, les conditions d'extraction à utiliser en priorité sont celles données en a).

Les conditions d'extraction recommandées peuvent être mises en pratique selon les caractéristiques du matériel et ses conditions spécifiques d'utilisation.

Le protocole d'extraction utilisant le milieu de culture avec sérum ne peut être utilisé que dans les conditions prescrites en 4.2.3.2 a).

4.2.3.3 Quand l'agitation est considérée comme étant appropriée, il convient que la méthode soit prescrite et consignée dans un rapport.

4.2.3.4 Si nécessaire, couper le matériau en petits morceaux, avant extraction. Pour les polymères, des morceaux de 10 mm x 50 mm ont été utilisés. Les fermetures en élastomère moulé sont essayées intactes.

4.2.3.5 Le rapport entre la surface du matériau et le volume du véhicule d'extraction ne doit pas être supérieur à 6 cm²/ml et ne doit pas être inférieur à 0,5 cm²/ml. La surface doit être calculée sur la base des dimensions globales de l'échantillon, en ne tenant compte ni des irrégularités superficielles, ni de la porosité. Il convient cependant de considérer les caractéristiques réelles de la surface, lors de l'interprétation des résultats d'essai. Si la surface n'est pas déterminée, 0,1 g/ml à 0,2 g/ml doivent être utilisés.

4.2.3.6 Les extraits liquides doivent être, si possible, utilisés immédiatement après leur préparation.

Si l'extrait est stocké, il est bon que la stabilité de l'extrait dans les conditions de stockage utilisées soit vérifiée par des méthodes appropriées.

Si l'extrait est filtré, centrifugé ou traité par d'autres méthodes avant d'être appliqué aux cellules, le rapport final doit le signaler (voir article 9).

4.3 Préparation du matériau pour les essais en contact direct

4.3.1 Les matériaux qui ont des formes, des tailles ou des états physiques (c'est-à-dire liquide ou solide) variés, peuvent être essayés sans modification pour les essais de cytotoxicité.

Il convient que l'échantillon préférentiel soit un échantillon solide présentant au moins une surface plane. Des ajustements doivent être réalisés pour les autres formes et états physiques.

4.3.2 La stérilité de l'échantillon d'essai doit être conforme aux prescriptions décrites de 4.3.2.1 à 4.3.2.3.

4.3.2.1 Les matériaux d'essai obtenus à partir de dispositifs stériles doivent être manipulés aseptiquement au cours de l'extraction et de la procédure d'essai.

4.3.2.2 Les matériaux d'essai obtenus à partir de dispositifs qui sont normalement fournis non stériles, mais stérilisés avant utilisation, doivent être stérilisés selon la méthode recommandée par le fabricant et manipulés aseptiquement au cours de l'extraction et de la procédure d'essai.

Il convient de considérer l'effet sur le dispositif des méthodes ou des agents de stérilisation, pour définir la préparation du matériau d'essai avant son utilisation dans le système d'essai choisi.

4.3.2.3 Les matériaux d'essai obtenus à partir de dispositifs n'ayant pas besoin d'être stériles pour être utilisés, doivent être utilisés tels que fournis et manipulés aseptiquement au cours de l'extraction et de la procédure d'essai.

4.3.3 Les liquides doivent être essayés

- a) par apposition directe, ou
- b) par apposition sur une matrice biologiquement inerte et absorbante.

NOTE 8 Les disques pour filtration ont été reconnus comme adaptés.

4.3.4 Si nécessaire, les matériaux classés super-absorbants doivent être inhibés avec le milieu de culture, avant l'essai.

5 Lignées cellulaires

5.1 Les lignées cellulaires établies sont préférables et, lorsqu'elles sont utilisées, doivent être obtenues à partir de sources reconnues.

NOTE 9 Par exemple, les lignées cellulaires recommandées sont les CCL1 (NCTC clone 929), CCL 163 (Balb/3T3 clone A31), CCL 171 (MRC-5) et CCL 75 (WI-38), CCL 81 (Vero) et CCL10 [BHK-21 (C-13)] de l'«American Type Culture Collection» et la V-79 379A.

Cette information est donnée pour la commodité de l'utilisateur de la présente partie de l'ISO 10993 et ne constitue pas une validation par l'ISO des produits cités. D'autres lignées cellulaires peuvent être utilisées s'il peut être montré qu'elles permettent d'obtenir les mêmes résultats.

5.2 Lorsqu'une sensibilité spécifique est nécessaire, des cultures primaires et des lignées cellulaires obtenues directement à partir de tissus vivants doivent être utilisées, seulement si la reproductibilité et la précision de la réponse peuvent être démontrées.

5.3 Si une culture-stock d'une lignée cellulaire est conservée, le stockage doit se faire à $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou au-dessous dans le milieu de culture correspondant, en présence d'un cryoprotecteur, par exemple de diméthylsulfoxyde ou de glycérol.

5.4 Il convient que seules les cellules dépourvues de mycoplasmes soient utilisées pour l'essai. Avant utilisation, il convient que les cultures-stock soient essayées pour déterminer l'absence de mycoplasme par une méthode reconnue.

6 Milieu de culture

6.1 Le milieu de culture doit être stérile.

6.2 Le milieu de culture avec ou sans sérum doit être conforme aux prescriptions de croissance de la lignée cellulaire choisie.

Des antibiotiques peuvent être ajoutés dans les milieux, à condition qu'ils n'affectent pas les essais de manière contraire.

La stabilité du milieu de culture varie avec sa composition et les conditions de sa conservation. Les milieux contenant du sérum ou de la glutamine ne peuvent pas être stockés plus d'une semaine entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Les milieux sans sérum contenant de la glutamine ne peuvent pas être stockés plus d'un mois entre $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.3 Le milieu de culture doit être maintenu à un pH situé entre 7,2 et 7,4.

7 Préparation de la culture-stock cellulaire

7.1 En utilisant la lignée cellulaire et le milieu de culture choisis, préparer suffisamment de cellules pour réaliser l'essai. Si les cellules à faire croître proviennent de cultures qui étaient stockées, éliminer le cryoprotecteur s'il est présent. Repiquer les cellules au moins une fois avant de les utiliser.

7.2 Les cellules sont détachées et mises en suspension par dissociation enzymatique et/ou mécanique, à l'aide d'une méthode appropriée à la lignée cellulaire.

8 Modes opératoires

8.1 Nombre d'exemplaires

Un minimum de trois exemplaires doit être utilisé pour les échantillons d'essai et les contrôles.

8.2 Essais à partir d'extraits

8.2.1 À partir de la suspension cellulaire continuellement agitée, pipeter une quantité aliquote connue dans un nombre suffisant de récipients, pour réaliser l'exposition aux extraits. Distribuer les cellules uniformément sur la surface de chaque récipient, par rotation horizontale douce.

8.2.2 Mettre les cultures à incuber à (37 ± 2) °C dans l'air supplémenté ou non avec du dioxyde de carbone à 5 % (V/V) selon le système tampon utilisé pour le milieu de culture.

L'essai peut être réalisé sur une monocouche à sous-confluence ou sur des cellules venant d'être mises en suspension.

Pour un essai de formation de colonies seulement, une densité cellulaire faible, appropriée, doit être utilisée.

8.2.3 Examiner les cultures au microscope.

8.2.4 Réaliser l'essai avec

- a) l'extrait original, ou
- b) une série de dilutions de l'extrait, en utilisant le milieu de culture comme diluant.

Si des monocouches sont utilisées pour l'essai, enlever et jeter le milieu de culture et ajouter un aliquot de l'extrait ou de la dilution dans chaque récipient.

Si l'essai est réalisé sur des cellules en suspension, ajouter l'extrait ou les dilutions dans tous les récipients, immédiatement après la préparation de la suspension cellulaire.

8.2.5 Les extraits non physiologiques, tels que l'eau, doivent être essayés à la concentration la plus élevée, physiologiquement compatible, après dilution avec le milieu de culture.

NOTE 10 Un milieu de culture concentré, par exemple 2 x, 5 x, est recommandé pour diluer les extraits aqueux.

8.2.6 Ajouter des aliquots connus du blanc réactif, et des contrôles négatifs et positifs dans des récipients additionnels.

NOTE 11 Un contrôle constitué du milieu de culture frais peut aussi être essayé, si nécessaire.

8.2.7 Mettre les récipients à incuber dans des conditions similaires à celles décrites en 8.2.1, pendant une durée appropriée correspondant à l'essai spécifique choisi.

8.2.8 Déterminer la cytotoxicité conformément à 8.5.

8.3 Essais en contact direct

8.3.1 À partir de la suspension cellulaire continuellement agitée, pipeter une quantité aliquote connue dans un nombre suffisant de récipients, pour réaliser l'exposition directe aux échantillons d'essai. Distribuer les cellules uniformément sur la surface de chaque récipient, par rotation horizontale douce.

8.3.2 Mettre la culture à incuber à (37 ± 2) °C dans l'air supplémenté ou non avec du dioxyde de carbone à 5 % (V/V) selon le système tampon utilisé pour le milieu de culture, jusqu'à ce que les cellules aient atteint une confluence approximative à la fin de la phase logarithmique de la courbe de croissance.

8.3.3 Examiner les cultures au microscope.

8.3.4 Jeter le milieu de culture. Ajouter du milieu de culture neuf dans chaque récipient.

8.3.5 Déposer soigneusement chaque échantillon du matériau d'essai sur la couche cellulaire, au centre de chaque récipient. Vérifier que l'échantillon couvre approximativement un dixième de la surface de la couche cellulaire.

Un soin particulier doit être pris pour éviter des mouvements inutiles de l'échantillon, qui pourraient induire un traumatisme physique des cellules qui serait mis en évidence par des paquets de cellules décollées.

NOTE 12 Si nécessaire, l'échantillon peut être placé dans le récipient de culture avant l'addition des cellules.

8.3.6 Préparer des récipients en plusieurs exemplaires avec le matériau contrôle négatif et le matériau contrôle positif.

8.3.7 Mettre les récipients à incuber dans des conditions similaires à celles décrites en 8.3.2, pendant une durée appropriée correspondant à l'essai spécifique choisi.

8.3.8 Enlever et jeter le milieu de culture, et déterminer la cytotoxicité conformément à 8.5.

8.4 Essais en contact indirect

8.4.1 Diffusion à travers l'agar

8.4.1.1 À partir de la suspension cellulaire continuellement agitée, pipeter une quantité aliquote connue dans un nombre suffisant de récipients pour réaliser l'essai. Distribuer les cellules uniformément sur la surface de chaque récipient, par rotation horizontale douce.

8.4.1.2 Mettre la culture à incuber à (37 ± 2) °C dans l'air supplémenté ou non avec du dioxyde de carbone à 5 % (V/V) selon le système tampon utilisé pour le milieu de culture, jusqu'à ce que les cellules aient atteint une confluence approximative à la fin de la phase logarithmique de la courbe de croissance.

8.4.1.3 Examiner les cultures au microscope.

8.4.1.4 Enlever et jeter le milieu de culture du récipient. Mélanger alors le milieu de culture neuf supplémenté en sérum avec de l'agar fondu, afin d'obtenir une concentration finale en agar de 0,5 g/l à 2 g/l et en pipeter un volume approprié dans chaque récipient. Utiliser uniquement l'agar compatible avec la croissance des cellules de mammifère en culture. Il convient que le mélange milieu de culture/agar soit dans un état liquide et à une température compatible avec la survie des cellules de mammifère.

NOTE 13 L'agar est fourni selon une échelle de poids moléculaire variée et différentes puretés.

8.4.1.5 Déposer soigneusement chaque échantillon d'essai sur la couche d'agar solidifiée dans chaque récipient. S'assurer que l'échantillon couvre environ un dixième de la surface de la couche cellulaire.

Humidifier préalablement tout matériau absorbant avec le milieu de culture avant de le placer sur l'agar, afin d'éviter la déshydratation de l'agar.

8.4.1.6 Préparer des récipients avec les échantillons contrôles négatifs et positifs.

8.4.1.7 Mettre les récipients à incuber dans des conditions similaires à celles décrites en 8.4.1.2, entre 24 h et 72 h.

8.4.1.8 Examiner les cellules pour la cytotoxicité avant et après avoir retiré soigneusement les échantillons posés sur l'agar. L'utilisation d'un colorant vital, par exemple le rouge neutre, peut aider à détecter la cytotoxicité. Le colorant vital peut être ajouté avant ou après l'incubation avec l'échantillon. Si le colorant est ajouté avant l'incubation, protéger les cultures de la lumière pour éviter les dommages cellulaires induits par la photoactivation du colorant.

8.4.2 Diffusion à travers un filtre

8.4.2.1 Déposer un filtre sans additif avec des pores de 0,45 µm dans chaque récipient et ajouter un aliquot connu d'une suspension cellulaire continuellement agitée, dans un nombre de récipients suffisant pour réaliser l'essai. Distribuer les cellules uniformément sur la surface de chaque filtre, par rotation horizontale douce.

8.4.2.2 Mettre la culture à incuber à (37 ± 2) °C dans l'air supplémenté ou non avec du dioxyde de carbone à 5 % (V/V) selon le système tampon utilisé pour le milieu de culture, jusqu'à ce que les cellules aient atteint une confluence approximative à la fin de la phase logarithmique de la courbe de croissance.

8.4.2.3 Examiner les cultures au microscope.

8.4.2.4 Enlever et jeter le milieu de culture des récipients. Transférer alors les filtres, côté cellule vers le bas, sur une couche d'agar solidifiée (voir 8.4.1.5).

8.4.2.5 Déposer soigneusement les échantillons identiques du matériau d'essai sur le côté sans cellule (haut) du filtre. Retenir les extraits liquides et les matériaux fraîchement mélangés dans des bagues inertes placées sur le filtre.

8.4.2.6 Préparer des filtres avec les échantillons contrôle négatif et contrôle positif.

8.4.2.7 Mettre les récipients à incuber dans des conditions similaires à celles décrites en 8.4.2.2, entre 2 h ± 10 min.

8.4.2.8 Enlever soigneusement les échantillons déposés sur le filtre et séparer soigneusement le filtre de la surface de l'agar.

8.4.2.9 Déterminer la cytotoxicité en utilisant une technique de coloration appropriée.