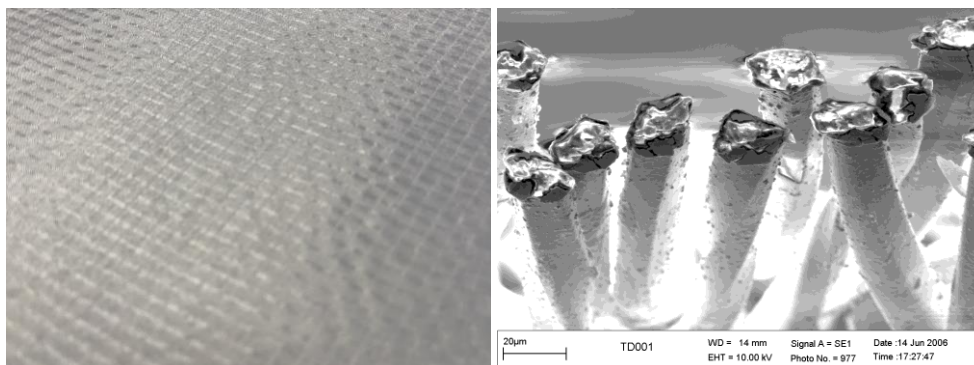


TECHNICAL INFORMATION



Articolo: **Tessuto Antibatterico in argento puro**

Tipologia: **Metallizzato argento puro 99%**

Altezza / Width (cm) Altezza: **135,00 cm**

Peso / Weight (g/m): **43 g/m² ± 10 %**

Total composition: **Poliammide/polyamide**

Codice dogana / Custom code: **52083100**

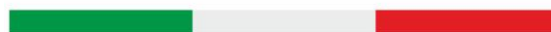
UNI EN ISO 3758



Technical caratheristics

CONDIZIONI DI LAVAGGIO:

E' possibile lavare o igienizzare il tessuto con soluzione idroalcoliche.



M A D E I N I T A L Y

ALLEGATI TEST EFFETTUATI SECONDO LA NORMATIVA:

BS EN 14683 - ISO 10993

NOTA BENE: i risultati sono riferiti solo al campione analizzato

A SECONDA DELLA TIPOLOGIA DEL PRODOTTO REALIZZATO E' NECESSARIO
SOTTOPORLO ALLA VERIFICA DELLE NORMATIVE VIGENTI IN OTTEMPERANZA
ALLE REGOLE DI OGNI SINGOLO PAESE

E' responsabilità dell'acquirente testare il tessuto prima dell'utilizzo

**Certificata azione dell' argento contro i virus grazie agli studi del CNR del 2005 contro la
(SARS) fatto con scomparsa del virus tra i 5 e 20 minuti**

*“Efficient and Quick inactivation of SARS Coronavirus and other Microbes Exposed to the
surface of Some Metal Catalyst” del Institute for Viral Control and Prevention , China Center
for Disease control and prevention Yingxin Rd 100 Bijing 100052 China*

Rapporto di prova n°: **20LA05278** del **15/04/2020**

Spett.
SOLIANI EMC
Via Varesina 122
22100 Como (CO)

Dati di accettazioneOggetto della prova: **Tessili**Trasporto: **Cliente**Data arrivo: **06/04/2020**Ora arrivo: **10.15**Data accettazione: **06/04/2020****Dati relativi al campione**Descrizione: **Tessuto antibatterico SOLIANI EMC Nome commerciale SOLEMI Bestetti Antibatterico Argento****Dati relativi al campionamento**Campionamento a cura di: **Cliente**Luogo: **Sede del Cliente**

I risultati analitici si riferiscono esclusivamente all'oggetto sottoposto a prova.

Rappresentazione di un Rapporto di Prova firmato elettronicamente, ai sensi della normativa vigente.

Il presente documento non può essere riprodotto parzialmente senza l'autorizzazione scritta del laboratorio.

Laboratorio con sistema gestionale certificato UNI EN ISO 9001:2015 da CSQA con il n° 14270. Consigliato da AIC per l'analisi di quantificazione del glutine in matrici alimentari. Registrato per le analisi su prodotti alimentari o materiali a contatto destinati all'esportazione verso il Giappone.

Laboratorio iscritto all'Elenco regionale dei laboratori che effettuano analisi nell'ambito delle procedure di autocontrollo per le Industrie Alimentari n°52. E' responsabilità dell'OSA dare comunicazione delle allerte agli organi preposti

Mod.PT01.01 Rev.9

Rapporto di prova n°: 20LA05278 del 15/04/2020

Parametro - Specifiche <i>Metodo - Note</i>	U.M.	Risultato Note	LoQ	LoD	Inizio prova Fine prova
Attività antibatterica A = (lgCt - lg C0) - (lgTt - lgT0) ISO 20743:2013 (escluso p.to 8.2 - 8.3)		> 7.1	0,3		09/04/2020 14/04/2020
Ceppo Gram negativo ISO 20743:2013 (escluso p.to 8.2 - 8.3)		Klebsiella pneumoniae - ATCC 4352			09/04/2020 14/04/2020
Metodo di inoculo ISO 20743:2013 (escluso p.to 8.2 - 8.3)		Assorbimento			09/04/2020 14/04/2020
Concentrazione inoculo ISO 20743:2013 (escluso p.to 8.2 - 8.3)	UFC/ml	290900			09/04/2020 14/04/2020
Metodo di misurazione quantitativa ISO 20743:2013 (escluso p.to 8.2 - 8.3)		Metodo di conta in piastra			09/04/2020 14/04/2020

20LA05278/01 Tessuto antibatterico SOLIANI EMC Nome commerciale SOLEMI Bestetti Antibatterico Argent

Parametro - Specifiche <i>Metodo - Note</i>	U.M.	Risultato Note	LoQ	LoD	Inizio prova Fine prova
Attività antibatterica A = (lgCt - lg C0) - (lgTt - lgT0) ISO 20743:2013 (escluso p.to 8.2 - 8.3)		> 6.7	0,3		09/04/2020 14/04/2020
Ceppo Gram positivo ISO 20743:2013 (escluso p.to 8.2 - 8.3)		Staphylococcus aureus - ATCC 6538			09/04/2020 14/04/2020
Metodo di inoculo ISO 20743:2013 (escluso p.to 8.2 - 8.3)		Assorbimento			09/04/2020 14/04/2020
Concentrazione inoculo ISO 20743:2013 (escluso p.to 8.2 - 8.3)	UFC/ml	300000			09/04/2020 14/04/2020
Metodo di misurazione quantitativa ISO 20743:2013 (escluso p.to 8.2 - 8.3)		Metodo di conta in piastra			09/04/2020 14/04/2020

Qualora il campionamento non sia a carico della 3ALaboratori srl, quest'ultima declina ogni responsabilità in merito alle informazioni relative al campionamento in quanto fornite dal Cliente/Committente; i risultati delle prove si riferiscono esclusivamente al campione così ricevuto. Quando questi dati comprendono misurazioni che impattano sull'unità di misura, i risultati espressi sono ottenuti dall'elaborazione degli stessi. I Dati di accettazione sono di responsabilità del Laboratorio mentre i dati relativi al campione sono di responsabilità del Cliente/Committente

Qualora il campione sia non idoneo ma il Cliente/Committente scegliesse di proseguire ugualmente, il laboratorio declina ogni responsabilità sui risultati che potrebbero essere influenzati dallo scostamento

LEGENDA: **U.M.** = unità di misura; (**sup**) = Limite superiore; (**inf**) = Limite Inferiore; **LoQ** = limite di quantificazione, è il limite inferiore di concentrazione sopra al quale è possibile ottenere strumentalmente una misura di tipo quantitativo; in microbiologia il LoQ è di natura teorica; **LoD** = limite di rilevabilità, è il limite inferiore di concentrazione sotto il quale il campione non può essere rilevato; nelle analisi qualitative rappresenta la minima concentrazione alla quale è possibile determinare o meno la presenza di un analita; **NQ** = non quantificabile, indica un valore inferiore a LoQ; **NR** = non rilevabile, indica un valore inferiore a LoD; "<x" o ">x" indicano rispettivamente un valore inferiore o superiore all'intervallo di misura della prova, dove x è il risultato

(S): Indica una modifica rispetto alla versione precedente del Rapporto di prova.

(le): Indica che la prova/attività è stata eseguita in subappalto.

SE NON DIVERSAMENTE SPECIFICATO: le prove microbiologiche quantitative sono eseguite su singola replica e due diluizioni consecutive in conformità alla UNI EN ISO 7218:2013 (ad esclusione delle analisi su acque ed MPN); i risultati del presente Rapporto di prova non risultano corretti per i fattori di recupero (R) in quanto i valori del recupero rientrano nella tolleranza indicata nel metodo di prova; le sommatorie sono calcolate mediante il criterio del lower bound (L.B.)

(*): Prova/attività non accreditata da ACCREDIA

I risultati analitici si riferiscono esclusivamente all'oggetto sottoposto a prova.

Rappresentazione di un Rapporto di Prova firmato elettronicamente, ai sensi della normativa vigente.

Il presente documento non può essere riprodotto parzialmente senza l'autorizzazione scritta del laboratorio.

Laboratorio con sistema gestionale certificato UNI EN ISO 9001:2015 da CSQA con il n° 14270. Consigliato da AIC per l'analisi di quantificazione del glutine in matrici alimentari. Registrato per le analisi su prodotti alimentari o materiali a contatto destinati all'esportazione verso il Giappone.

Laboratorio iscritto all'Elenco regionale dei laboratori che effettuano analisi nell'ambito delle procedure di autocontrollo per le Industrie Alimentari n°52. E' responsabilità dell'OSA dare comunicazione delle allerte agli organi preposti

Mod.PT01.01 Rev.9

Rapporto di prova n°: **20LA05278** del **15/04/2020**

Direttore Tecnico

Dr. Giovanni Mitaritonna

Chimico

Ordine Interprov. Chimici del Veneto - Padova n° 910 SEZ. A

----- Fine Rapporto di Prova -----

I risultati analitici si riferiscono esclusivamente all'oggetto sottoposto a prova.

Rappresentazione di un Rapporto di Prova firmato elettronicamente, ai sensi della normativa vigente.

Il presente documento non può essere riprodotto parzialmente senza l'autorizzazione scritta del laboratorio.

Laboratorio con sistema gestionale certificato UNI EN ISO 9001:2015 da CSQA con il n° 14270. Consigliato da AIC per l'analisi di quantificazione del glutine in matrici alimentari. Registrato per le analisi su prodotti alimentari o materiali a contatto destinati all'esportazione verso il Giappone.

Laboratorio iscritto all'Elenco regionale dei laboratori che effettuano analisi nell'ambito delle procedure di autocontrollo per le Industrie Alimentari n°52. E' responsabilità dell'OSA dare comunicazione delle allerte agli organi preposti

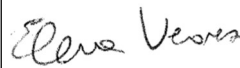
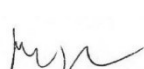
Mod.PT01.01 Rev.9

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_57

Edizione: 01

Pagina: 1 / 17

CLIENTE	SOLIANI EMC SRL VIA VARESINA 122, 22100 COMO (CO) CF 02375250137		
LABORATORIO	☒ MaB – Microscopia applicata e biologia cellulare ☒ ToP - Tossicologia e Proteomica ☐ Ms² – Materiali, sensori e sistemi		
Report svolto da: Tiziana Petrachi		Firma 	Data 14/04/2020
Responsabile di laboratorio: Elena Veronesi		Firma 	Data 14/04/2020
Approvato da: Massimo Dominici		Firma 	Data 14/04/2020

Ed.	Report n°	Data	Descrizione
01	MAB_2020_57	14/04/2020	Prima Edizione

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: **MAB_2020_57**

Edizione: **01**

Pagina: **2 / 17**

INDICE

1	RIFERIMENTI COMMESSA	3
2	SCOPO	3
3	STATO DELL'ARTE	3
4	MATERIALI	6
4.1	Identificazione del Campione	6
4.2	Standard	7
4.3	Linee Cellulari	7
4.4	Reagenti	7
4.5	Consumabili	8
4.6	Strumenti	8
5	Metodi	9
5.1	Saggio di Citotossicità	9
o	Analisi dei dati	11
5.2	Saggi in vitro alternativi per valutare infiammazione e sensibilizzazione	11
5.2.1	Determinazione dei nitriti	12
5.2.2	Determinazione dell'IL-6	12
6	RISULTATI	13
6.1	Valutazione della citotossicità	14
▪	Valutazione qualitativa	14
▪	Valutazione quantitativa	14
6.2	Valutazione dell'irritazione e sensibilizzazione mediante misura dei nitriti e dell'IL-6	15
7	CONCLUSIONI	17
8	BIBLIOGRAFIA	17

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_57

Edizione: 01

Pagina: 3 / 17

1 RIFERIMENTI COMMESSA

TPM_2020_232_SOL2

Data di inizio dell'esperimento: 08/04/2020

Data di fine dell'esperimento: 10/04/2020

2 SCOPO

Il presente studio ha un duplice obiettivo: a) la valutazione della citotossicità della maschera facciale in oggetto e b) la valutazione dell'eventuale potere irritante/sensibilizzante attraverso la quantificazione di IL-6 e nitriti.

3 STATO DELL'ARTE

Per dispositivi a contatto con cute integra per un tempo inferiore a 24 ore, la valutazione della biocompatibilità secondo ISO10993-1:2018 si effettua attraverso il test di citotossicità, il test di irritazione e il test di sensibilizzazione cutanea.

Tra gli approcci per studiare la citotossicità descritti nella ISO10993-5:2009, vi è il saggio di vitalità cellulare MTT, basato sulla capacità del sistema mitocondriale di trasporto di elettroni, ed in particolare della succinato deidrogenasi, di ridurre e quindi convertire un sale tetrazolico solubile MTT [3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5- difenil-2H tetrazolio bromide] di colore giallo, in un prodotto insolubile quale i sali di formazano, di colore viola, in quantità direttamente proporzionale alla vitalità cellulare. Il numero delle cellule vitali è correlato all'intensità del colore, che viene valutato sotto forma di assorbanza, mediante l'utilizzo dello spettrofotometro, dopo aver dissolto il formazano in alcool.

L'irritazione e la sensibilizzazione sono reazioni cutanee provocate dal contatto con particolari tipi di sostanze. Possono essere studiate rispettivamente mediante saggi in vivo come il "Primary Skin Irritation" e il "Guinea pig Maximization test" secondo quanto riportato nelle linee guida ISO10993-10. Tuttavia, si tratta di test che possono richiedere fino a 6 settimane per l'esecuzione. Per rispondere alle disposizioni del Decreto-legge del 17 marzo 2020 n.18 (art. 15) in riferimento alla produzione in deroga di maschere facciali ad uso medico, si è proceduto a sviluppare un modello alternativo per studiare il potenziale di irritazione e sensibilizzazione dei

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_57

Edizione: 01

Pagina: 4 / 17

materiali. Si tratta di un modello accurato, specifico, semplice e di rapida esecuzione in condizioni di emergenza.

In letteratura sono riportati numerosi studi basati sull'utilizzo di cellule di origine umana con l'obiettivo di limitare la sperimentazione animale in accordo con il principio delle "3R – Refine, Reduce, Replacement" e nel contempo di ridurre la variabilità tra specie (Pupovac A et al. 2018; Vijayavenkataraman S et al. 2016). Numerosi sono i modelli di cute umana *in vitro* previsti al fine di sviluppare e standardizzare approcci alternativi per studiare l'irritazione e la sensibilizzazione. Essi sono ottenuti ad esempio, mediante tecniche di tissue engineering che prevedono l'associazione di cellule e biomateriali o più recentemente mediante tecnologia di bioprinting (Pupovac A et al 2018; Vijayavenkataraman S et al. 2016). Disponibili in commercio e ampiamente utilizzati vi sono gli skin equivalent come EPISKIN® o EpiDerm® inclusi nella ISO10993-10:2013 annex D come modello alternativo per lo studio di irritazione per i composti chimici – ma non applicabile per i dispositivi. Nell'ottica delle disposizioni del Decreto-Legge del 17 marzo 2020 n.18 (art. 15), abbiamo selezionato modelli di studio semplificati basati su colture 2D di cellule umane. Questo approccio consente di ottenere risultati in tempi ridotti (5 giorni) grazie alla velocità di esecuzione dei test.

Un esempio di tale modello è fornito dalla pubblicazione di Sipahi H et al. avente il fine di studiare la biocompatibilità delle maschere chirurgiche disponibili in commercio valutando la citotossicità con saggio MTT e l'irritazione mediante la determinazione della concentrazione dei nitriti in seguito all'esposizione dell'estratto a popolazioni cellulari di fibroblasti murini (Sipahi et al. 2018). L'ossido nitrico (ON), metabolizzato da tre principali isoforme dell'enzima ossido nitrico sintetasi (NOS), è coinvolto in numerosi processi fisiologici e patologici, come l'infiammazione. Poiché l'ON ha una emivita molto limitata, viene convertito istantaneamente e sturato sotto forma di nitriti (Shiva et al 2013).

I nitriti infatti sono il risultato di reazioni di ossido-riduzione della molecola di ON quando risulta essere in elevate concentrazioni.

L'irritazione è un processo di natura infiammatoria. Pertanto è importante, nella cute, la valutazione dell'espressione di NOS e la produzione di ON. E' riportato in letteratura che le principali popolazioni cellulari presenti nella cute, quali cheratinociti, fibroblasti, melanociti e cellule endoteliali esprimono NOS e sono capaci di rilasciare ON. (Grierson et al. 2004). In particolare, i fibroblasti producono spontaneamente NOS e NO, che risultano incrementati in

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_57

Edizione: 01

Pagina: 5 / 17

presenza di opportuni stimoli come ad esempio LPS, un lipopolisaccaride o agenti irritanti come il tritonX che sono in grado di stimolare cellule della cute come i fibroblasti e cellule del sistema immunitario, come macrofagi, a produrre citochine coinvolte (direttamente o indirettamente) nell'attivazione e richiamo di altri elementi cellulari del sistema immunitario (Wang R. et al. 1996; Kent et al. 1998).

Lo stato infiammatorio e di sensibilizzazione è il risultato di un processo complesso e ancora non del tutto noto di citochine e di cross-talk tra diversi tipi cellulari che compongono un tessuto come la cute. Le citochine sono prodotte da cellule del sistema immunitarie e non con il ruolo di mediare reazioni metaboliche di interazione tra diverse cellule al fine di generare un complesso stato infiammatorio (Juranova et al 2019).

L'IL-6 è una glicoproteina, prodotta e secreta da un ampio spettro di popolazioni cellulari, tra le quali ritroviamo cellule deputate alla risposta immunitaria innata e cellule B, ma anche cellule non appartenenti alla classe leucocitaria come cellule endoteliali, fibroblasti, astrociti e cellule epiteliali. Gli stimoli in grado di indurre il rilascio di IL-6 sono rappresentati da danno tissutale o stress cellulare e da altre citochine ad attività pro-infiammatoria. Poiché elevati livelli di concentrazione di IL-6 sono associati a diverse patologie infiammatorie, l'IL-6 è ritenuta essere un prodotto della risposta infiammatoria e un marker dell'infiammazione (Rincon 2012).

Alla luce delle considerazioni sopra riportate, in letteratura è possibile trovare studi che propongono la quantificazione di determinate citochine (tra le quali IL-6) per l'identificazione di sostanze sensibilizzanti e irritanti, in alternativa ai test *in vivo* richiesti dalla norma ISO 10993-10, al fine di ridurre l'utilizzo del modello animale.

In uno studio condotto da Gomes-Filho e colleghi, viene testata la biocompatibilità di un materiale endodontico attraverso studi citotossicità e determinazione dei livelli di citochine IL-6 (come mediatore del processo infiammatorio) e IL-1 β (come mediatore della proliferazione osteoblastica) rilasciate da fibroblasti di topo L929, attraverso saggio ELISA. In base ai risultati, il materiale testato ha indotto un rilascio di IL-6 non statisticamente maggiore rispetto al controllo, portando alla conclusione che tale materiale non inducesse il processo infiammatorio, risultando quindi sicuro dal punto di vista della biocompatibilità (Gomes-Filho et al. 2009).

Jung e collaboratori propongono invece un saggio di screening per differenziare le sostanze sensibilizzanti dalle non sensibilizzanti attraverso la quantificazione delle citochine IL-6 e IL-1 α

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_57

Edizione: 01

Pagina: 6 / 17

rilasciate da cheratinociti umani (HaCaT), come valida alternativa ai test *in vivo*. Nel caso dell'IL-6, il saggio ha mostrato una sensibilità del 69%, una specificità del 83% e un'accuratezza del 73%. Tali risultati suggeriscono quindi che la determinazione dei livelli extracellulari delle citochine pro-infiammatorie IL-1α e IL-6 possono, potenzialmente, identificare sostanze sensibilizzanti per la pelle (Jung et al. 2016).

La norma ISO TR 15499:2016 (§6.3 Device Testing Consideration) raccomanda di adottare un approccio graduale per la valutazione biologica eseguendo quindi test *in vitro* al fine di ridurre, per quanto possibile, test su animali. Inoltre, come dichiarato dalla norma ISO 14971:2020, bassi rischi, sulla base di evidenze scientifiche, possono essere identificati e classificati come non richiedenti ulteriori misure di mitigazione. Tale approccio permette un minore spreco di risorse sulla ripetizione di test non necessari per materiali consolidati e valutati come sicuri per la specifica applicazione. Considerato che la ISO TR 15499:2016 è stata recepita completamente dalla ISO 10993-1:2018, si è deciso di procedere quindi con un approccio graduale, ritenendo una negatività nel test di quantificazione dei livelli di IL-6 e dei nitriti come verosimilmente indicativo del fatto che i campioni testati non diano origine a fenomeni di irritazione cutanea o reattività intracutanea; alla luce di queste considerazioni i test *in vivo* potrebbero essere considerati preliminari per stabilire la biocompatibilità del dispositivo testato.

Sulla base di quanto detto, lo studio proposto prevede la valutazione della citotossicità del campione tramite quanto previsto dalle linee guida UNI EN ISO 10993-5, in associazione alla valutazione della sua capacità irritante/sensibilizzante secondo la quantificazione di IL-6 e nitriti. Questa associazione di test, supportata da numerose evidenze presenti nella letteratura scientifica internazionale (Makene and Pool 2015; Advagic et al 2013; Piva et al 2013) consentirà di avere una indicazione globale degli effetti che la mascherina testata potrebbe avere a contatto con la cute integra al fine di prevedere effetti avversi tossici, irritanti, sensibilizzanti all'utilizzatore finale.

4 MATERIALI

4.1 Identificazione del Campione

Campione: maschera facciale

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_57

Edizione: 01

Pagina: 7 / 17

Parte del device che viene testata: porzione in contatto con la cute integra

Quantità di test: 1

Descrizione materiale: **80.10052-00**. ID campione attribuita internamente: **0304SOL_B**

Sterile: il device non viene utilizzato in modo sterile

4.2 Standard

Controllo Positivo: Lattice ottenuto da "powder free surgical gloves "Adventa Health lotto 062681360 (scadenza 2020-12)

Controllo Negativo: Polietilene alta densità (HDPE), USP Reference Standard, cod. 1546707; lotto K0M357

4.3 Linee Cellulari

Fibroblasti murini L929 acquistati da Sigma-Aldrich cod. 85011425

Fibroblasti umani da prepuzio acquistati da ATCC cod. ATCC-SCRC-10-41; lot 63229645

4.4 Reagenti

- Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) Gibco cod. 31885023; lot 2131859; scadenza 31/12/2020
- Siero Bovino Fetale (SBF) HyClone; lot AC10240545; scadenza 03/2022
- Penicillina/Streptomycin (P/S) Gibco cod. 15140-122; lot 2145453; scadenza 30/08/2020
- Glutamina Gibco cod. 25030-024; lot 20995B7; scadenza 05/2021
- Buffer fosfato (PBS) Dominique Dutscher cod. MS00AP100B; lot MS00AP; scadenza 22/07/2023
- Tripsina-EDTA Gibco cod. 15400-054; lot 2085657; scadenza 07/2021
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) Sigma-Aldrich M5655; lot MKCL1832
- Reagent di Greiss Sigma-Aldrich cod. G4410-10g; lot SLCC6697
- LPS lipopolisaccaride da Escherichia coli O55:B5; Sigma-Aldrich cod. L2637-5mg; lot 068M4068V
- Triton X Sigma-Aldrich cod. T8787-50mL; lot MKBR5267V
- Trypan Blue Sigma-Aldrich cod. T8154-100ml; lot RNBH7515

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_57

Edizione: 01

Pagina: 8 / 17

- Isopropanolo Carlo Erba cod. P9A772079B; scadenza 02/2022
- Alpha-Lisa Human Interleukin 6 (IL-6) Kit, Perkin Elmer (Cod. AL223C); lot 2628936; Scadenza Ottobre 2020.

4.5 Consumabili

- Fiasche per Colture Cellulari T75 and MW96 (Greiner)
- Pipette da 2,5,10, 25mL (Clearline)
- Puntali sterili da 10, 200 e 1000uL (Clearline)
- Provette per centrifuga da 1mL (Eppendorf), a 15 e 50mL (Nunc)
- Filtri da siringa da 0,22 µm (Clearline)
- Siringhe da 5, 10 e 30mL (BBraun)
- Aghi per siringa 18G (Nipro)
- Forbici ad uso chirurgico (Histoline)
- Camera Burkner (Biosigma)
- Reservoir 25mL sterili (Biosigma)

4.6 Strumenti

- Microscopio Ottico Invertito Observer Z1(Zeiss) certificato di calibrazione valido fino a febbraio 2021.
- Lettore multipiastra Enspire (PerkinElmer)
- Pipette da 10, 200 e 1000µL (Eppendorf)
- Pipetta multicanale da 200µL (Eppendorf)
- Cappe a Flusso Laminare (Faster)
- Centrifuga (Thermo Scientific)
- Bagno termostato a temperatura controllata (memmert)
- Incubatori per colture cellulari 37°C, 5% CO₂ (Thermo Scientific)
- Agitatore Orbitale - Incushaker A 37°C (Benchmark)

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_57

Edizione: 01

Pagina: 9 / 17

5 Metodi

Le mascherine chirurgiche sono classificate, secondo l'Allegato A della norma ISO 10993-1:2018 (tabella 1) come dispositivo medico superficiale a contatto con la pelle integra per una durata <24 ore fino a 30 giorni considerando un'esposizione cumulativa. Pertanto, i test da effettuare sono citotossicità, irritazione cutanea e sensibilizzazione.

Per rispondere alle disposizioni del Decreto Legge del 17 marzo 2020 n.18 (art. 15) per la produzione in deroga di maschere facciali ad uso medico si è proceduto alla valutazione biologica dei dispositivi in oggetto attraverso saggio di citotossicità secondo norma ISO 10993-5:2009 e alla valutazione della sensibilizzazione cutanea (ISO 10993-10:2010) *in vitro* attraverso la determinazione dell'IL-6 su fibroblasti umani e attraverso la determinazione dei livelli dei nitriti tramite saggio di Griess.

5.1 Saggio di Citotossicità

Le cellule L929 sono state scongelate e seminate secondo le istruzioni indicate dal fornitore a 15.000 cellule/cm² in piastre T75 per colture cellulari con DMEM + 10%FBS + 1% P/S + 1% glutammina e lasciate in atmosfera controllata a 37° C con 5%CO₂. Tre giorni dopo la semina, le colture sono state trattate per 5 minuti con una soluzione di 0,05% di tripsina-EDTA 0,02% a 37°C con 5% di CO₂. L'azione enzimatica è stata successivamente inibita con DMEM addizionato con 10% FBS, e la sospensione cellulare centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato scartato e il pellet cellulare risospeso nel terreno di coltura per la conta delle cellule mediante colorazione con Trypan Blue 0,4%. Le cellule L929 sono state poi seminate ad una concentrazione di 10.000 / 100µl, per ciascun pozzetto della piastra MW96, secondo normativa ISO10993-5:2009. Le piastre MW96 ottenute sono state e lasciate in atmosfera controllata per 24 ore a 37°C con 5% di CO₂, prima di addizionare l'estratto.

L'estratto è stato preparato con terreno di coltura composto da DMEM e addizionato del 10% FBS e 1% di antibiotico secondo una procedura interna validata presso il tecnopolo, considerando il materiale/i materiali che entrano in contatto con la pelle intatta, esclusi gli elastici e/o fascette che passano per le orecchie.

Lattice e HDPE sono stati utilizzati come materiali di riferimento, rispettivamente come controllo positivo e negativo, in accordo alla ISO10993-12:2012 e ISO10993-5:2009.

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_57

Edizione: 01

Pagina: 10 / 17

L'estrazione è stata eseguita con contenitori chimicamente inerti in agitazione a 37°C per 24 ore. Successivamente gli estratti sono stati filtrati con filtro da 0,22µm ed aggiunti alle colture cellulari con le seguenti diluizioni: 100%, 46,41%, 21,54% e 10%. Le cellule mantenute con il solo terreno di coltura sono di seguito definite blank. I controlli e le diluizioni dell'estratto sono stati somministrati alle colture cellulari e lasciate in incubatore per 24 ore a 37°C con 5% di CO₂. Il saggio è stato condotto in sestuplicato.

Dopo 24 ore, la valutazione qualitativa delle cellule è stata eseguita mediante osservazione al microscopio, secondo i parametri della tabella 1, paragrafo 8.5.1, ISO10993-5:2009 riportata di seguito. Il conseguimento di un grado numerico maggiore di 2 è considerato un effetto di citotossicità.

Grado	Reattività	Condizioni della coltura
0	Nessuna	Granuli intracitoplasmatici discreti, nessuna lisi cellulare, nessuna riduzione della crescita cellulare.
1	Leggera	Non più del 20% delle cellule con morfologia arrotondata vagamente attaccate e senza granuli intracitoplasmatici. Oppure nessuna alterazione della morfologia o presenza alcune cellule lisate. Osservazione di una leggera inibizione della crescita.
2	Media	Non più del 50% delle cellule con morfologia arrotondata e senza granuli intracitoplasmatici, nessuna lisi cellulare estesa; non è osservabile più del 50% di inibizione della crescita cellulare.
3	Moderata	Non più del 70% di cellule ha un aspetto morfologico arrotondato e gli strati cellulari contengono cellule lisate. Gli strati cellulari non sono completamente distrutti, ma vi è un'inibizione della crescita superiore al 50%.
4	Severa	Quasi completa distruzione degli strati cellulari

Tabella1. Classificazione morfologica qualitative della citotossicità degli estratti

La valutazione quantitativa è stata determinata tramite saggio MTT. Sono stati aggiunti 50µl di soluzione MTT per ogni pozzetto per 2 ore a 37°C. La misura della vitalità cellulare è stata eseguita utilizzando uno spettrofotometro a lettore multiplastr (Enspire, Perkin Elmer), dopo la rimozione della soluzione MTT e la successiva sospensione delle cellule in 100µl di isopropanolo. Il formazano è stato misurato con lo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 570nm.

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: **MAB_2020_57**

Edizione: **01**

Pagina: **11 / 17**

○ Analisi dei dati

Per calcolare la riduzione della vitalità rispetto al blank, è stata utilizzata la seguente formula:

$$Viability (100\%) = \frac{100 * OD450e}{OD450b}$$

dove

OD450e è il valore medio della densità ottica misurata degli estratti al 100% del campione di prova;

OD450b è il valore medio della densità ottica misurata del blank.

Se la vitalità è <70% rispetto al blank, il campione analizzato ha un potenziale citotossico.

La vitalità è riportata come media ± deviazione standard.

Criteri di accettabilità

- Valutazione qualitativa

Controllo negativo ≤ 1

Controllo positivo ≥ 3

- Valutazione quantitativa

Il saggio è ritenuto affidabile se l'estratto del 50% del campione in esame ha una vitalità uguale o maggiore a quella dell'estratto al 100%.

La deviazione standard di ogni Gruppo deve essere ≤ 18%.

La percentuale della vitalità cellulare del controllo positivo deve essere < 70%.

5.2 Saggi in vitro alternativi per valutare infiammazione e sensibilizzazione

La determinazione dei nitriti e della citochina IL-6 sono stati eseguiti utilizzando fibroblasti umani.

Le cellule sono stati scongelate e seminate secondo le istruzioni riportate dal fornitore a 8.000 cellule/cm² in piastre T75 per colture cellulari con DMEM + 10%FBS + 1% P/S + 1% glutammina e lasciate in atmosfera controllata a 37° C con 5%CO₂. Tre giorni dopo la semina, le colture sono state trattate per 5 minuti con una soluzione di 0,05% di tripsina-EDTA 0,02% a 37°C con 5% di CO₂. L'azione enzimatica è stata successivamente inibita con DMEM + 10% FBS, e la

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_57

Edizione: 01

Pagina: 12 / 17

sospensione cellulare centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato scartato e il pellet cellulare risospeso nel terreno di coltura per la conta delle cellule mediante colorazione con Trypan Blue 0,4%. I fibroblasti umani sono stati poi seminati ad una concentrazione di 5000 cellule/100µl per ciascun pozzetto della MW96 e posti in incubatore per colture cellulari a 37°C, 5%CO₂ per 24 ore. Successivamente il terreno è stato sostituito con il 100% di estratto del campione, con il terreno di coltura rappresentato dal controllo negativo (CTRL-) e da 8 µg/mL di LPS per il saggio AlphaLISA e da 1,5% Triton X100 per il test dei nitriti come controlli positivi (CTRL+).

Dopo 4 e 24 ore di incubazione i surnatanti sono stati raccolti per la determinazione rispettivamente della concentrazione dei nitriti e della citochina IL-6. Al fine di ottenere determinazioni più accurate delle molecole entrambi i saggi sono stati eseguiti in replicato.

5.2.1 Determinazione dei nitriti

I surnatanti sono stati incubati con reagente Greiss [1% sulfanilamide e 0,1% N- (1-naftil) etilendiammina diidrocloreuro] per 10 minuti a temperatura ambiente in accordo a Sipahi et al 2018.

La quantità di nitriti nei surnatanti è stata determinata in assorbanza a 570 nm usando uno spettrofotometro (Enspire, Perkin Elmer) e quindi calcolata usando una curva standard di nitrito di sodio generata con il range 100 µM-1,25 µM. Il controllo positivo utilizzato è il Triton X 100 1,5% (Juranova J et al. 2019). il controllo negativo è costituito da cellule coltivate con solo terreno di coltura.

I valori sono riportati come media ± deviazione standard.

5.2.2 Determinazione dell'IL-6

L'analisi e la quantificazione della citochina è stata effettuata utilizzando la tecnica Alpha-Lisa. Questa metodologia, sviluppata dall'azienda Perkin Elmer, offre il vantaggio di utilizzare piccoli volumi di materiale (5 µL), di avere un range dinamico molto ampio tale da poter evitare la diluizione del campione. Inoltre, non prevedere lavaggi e viene eseguito in tempi molto ridotti rispetto ad un classico ELISA. Un volume pari a 5 µL di terreno di coltura di ciascun campione è stato distribuito nei pozzetti delle piastre multi-well "White ½ Area Plate" - 96 e incubati per 1h

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_57

Edizione: 01

Pagina: 13 / 17

a temperatura ambiente con 20 µL di una soluzione composta da "Acceptor Beads" e dall' anticorpo anti-analita. Successivamente, 25 µL di una soluzione composta da "Donor Beads" in Alpha-Lisa Buffer sono stati aggiunti in ogni pozzetto lasciando nuovamente incubare per 30 minuti al buio. Terminato questo periodo, la piastra è stata analizzata dallo strumento EnSpire Plate Reader (Perkin Elmer) con un protocollo dedicato ai saggi Alpha-Lisa e impostando una $\lambda = 615$ nm. Per ottenere una quantificazione più accurata delle molecole in oggetto, ogni test è stato condotto in replicato.

Il controllo positivo utilizzato è LPS (8 µg/mL). Il controllo negativo è costituito da cellule coltivate con il solo terreno di coltura. I valori sono riportati come media dei livelli di espressione della citochina IL-6 (pg/mL) con la deviazione standard relativa espressa in percentuale.

6 RISULTATI

Fondazione Democenter-Sipe

via P. Vivarelli 2, 41125 – Modena • P.I. e C.F. 01989190366 • Tel. +39 059 2058146 - Fax +39 059 2058161
info@fondazionedemocenter.it • democentersipe@pcert.it • www.democentersipe.it

Tecnopolo di Mirandola

via 29 Maggio 6, 41037 Mirandola (Mo) • www.tpm.bio • Tel +39 0535 613801

FormTPM 010 Rev04 del 12.04.2018

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_57**

Edizione: **01**

Pagina: **14 / 17**

6.1 Valutazione della citotossicità

▪ Valutazione qualitativa

Dopo 24 ore di incubazione con l'estratto, è stata eseguita una valutazione qualitativa sulla coltura cellulare di L929 e riportata nella tabella 2. Nel controllo negativo le L929 hanno conservato la loro morfologia fisiologica e non è stata osservata nessuna lisi cellulare, riduzione della crescita cellulare, presenza di granuli intracitoplasmatici. Al contrario, nel controllo positivo si è osservata la distruzione degli strati cellulari. I criteri di accettabilità sono stati soddisfatti.

ID Campione	Blank	HDPE	Lattice	Estratto 100%
0304SOL_B	0	0	4	0

Tabella 2. Valutazione qualitativa

▪ Valutazione quantitativa

Nella tabella 3 abbiamo riportato la densità ottica (OD) 570nm.

Replicati	Blank	HDPE	Latex	0304SOL_B			
				100%	46,41%	21,54%	10%
1	0,57	0,54	0,07	0,49	0,62	0,66	0,89
2	0,46	0,61	0,06	0,45	0,52	0,48	0,56
3	0,50	0,53	0,05	0,54	0,51	0,54	0,49
4	0,57	0,45	0,05	0,53	0,57	0,58	0,52
5	0,65	0,39	0,05	0,78	0,67	0,73	0,62
6	0,71	0,41	0,05	0,67	0,61	0,69	0,81

Tabella 3. Densità ottiche rilevate con lo spettrofotometro a 570nm

	Blank	HDPE	Latex	0304SOL_B			
				100%	46,41%	21,54%	10%

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_57**

Edizione: **01**

Pagina: **15 / 17**

Media della vitalità	100	84,49	9,11	100,14	100,69	106,28	112,47
Deviazione Standard	9,3	8,6	0,73	12,48	12,05	9,46	16,57

Tabella 4. Vitalità media $\pm$ deviazione standard espresse in percentuale

I criteri di accettabilità sono stati soddisfatti.

6.2 Valutazione dell'irritazione e sensibilizzazione mediante misura dei nitriti e dell'IL-6

La tabella 5 riassume la media dei livelli di concentrazione dei nitriti espressa in μM $\pm$ deviazione standard.

Le concentrazioni sono state ottenute interpolando i valori di densità ottica con una curva standard con 8 punti di concentrazione (100 – 1,25 μM). Lo scarto quadratico medio $R^2 = 0,99$.

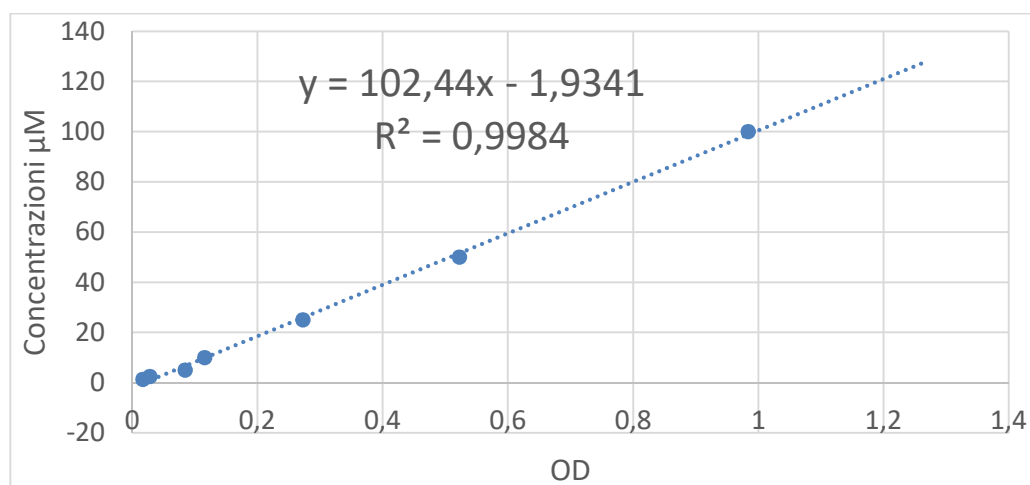


Figura 1. Curva Standard per Concentrazione dei nitriti

ID Campione	Concentrazione dei nitriti (μM)		Campione	Valutazione
	CTRL -	CTRL+		
0304SOL_B	Non rilevato	59,63 $\pm$ 4,13	Non rilevato	Negativo

Tabella 5. Concentrazione dei nitriti riportata come media $\pm$ deviazione standard

La tabella 6 riassume la media dei livelli di espressione della citochina IL-6 (pg/ml) con il valore di deviazione standard relativa espressa in percentuale (RSD%).

TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro*

Report n°: **MAB_2020_57**

Edizione: **01**

Pagina: **16 / 17**

Le concentrazioni sono state ottenute interpolando i valori di densità ottica con una curva standard come indicato dal datasheet. Lo scarto quadratico medio $R^2 > 0,99$.

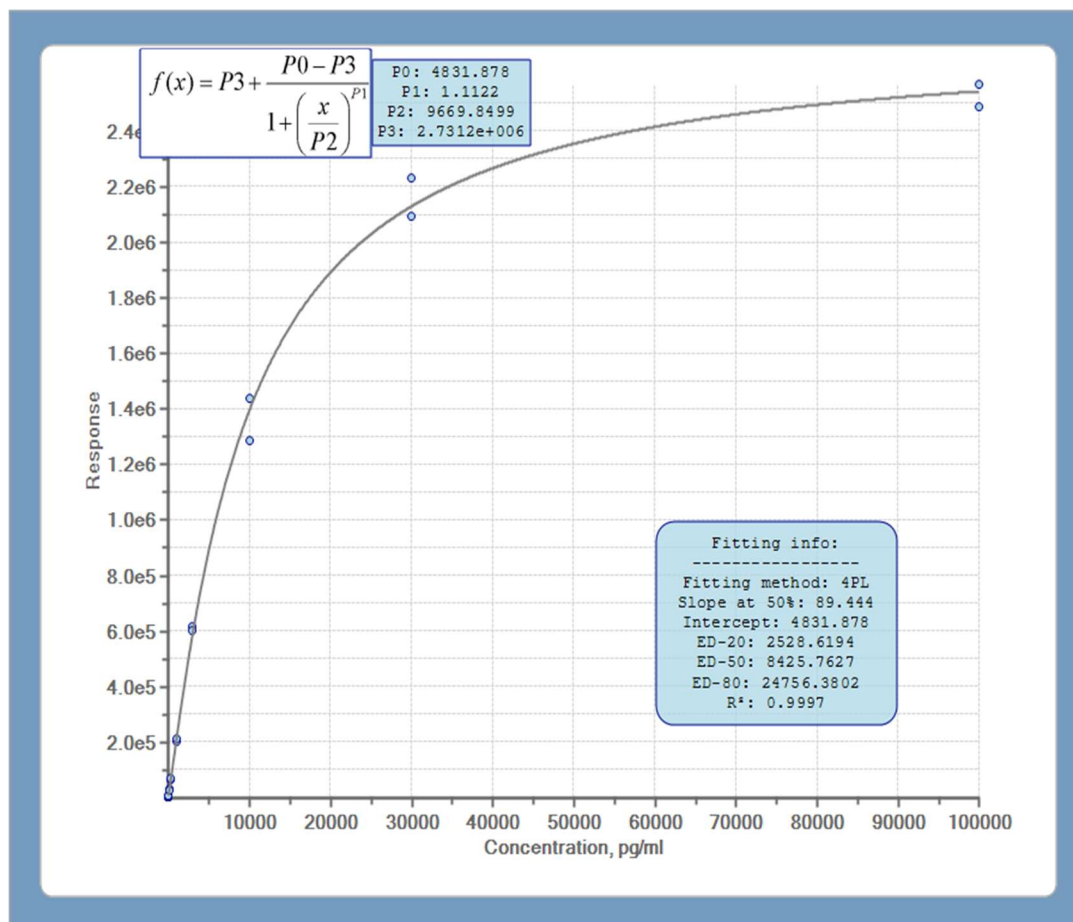


Figura 2. Curva Standard per Concentrazione della citochina IL-6

ID Campione	IL-6 pg / mL			Valutazione
	CTRL - (RSD%)	CTRL+ (RSD%)	Campione (RSD%)	
0304SOL_B	105,8 (6,9%)	2296,4 (0,3%)	113,0 (3,5%)	=CTRL -

Tabella 6. Concentrazione della citochina IL-6 riportata come media e deviazione standard relativa espressa in percentuale.

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a
ISO10993 e Test di sensibilizzazione-
Irritazione *in vitro***

Report n°: MAB_2020_57

Edizione: 01

Pagina: 17 / 17

7 CONCLUSIONI

Il campione risulta non citotossico in accordo con le linee guida ISO10993-5:2009.

Dai risultati ottenuti *in vitro* il campione non risulta irritante/sensibilizzante.

8 BIBLIOGRAFIA

- Avdagić et al 2013. "Nitric oxide as a potential biomarker in inflammatory bowel disease". *Bosn. J. Basic Med. Sci.*
- Cals-Grierson M.M. and Ormerod A.D. 2004. "Nitric oxide function in the skin." *Nitric Oxide*.
- Gomes-Filho, João Eduardo et al. 2009. "Evaluation of the Effects of Endodontic Materials on Fibroblast Viability and Cytokine Production." *Journal of Endodontics*.
- Jung, Daun et al. 2016. "Discrimination of Skin Sensitizers from Non-Sensitizers by Interleukin-1α and Interleukin-6 Production on Cultured Human Keratinocytes." *Journal of Applied Toxicology*.
- Juranova J et al. 2019. "Modulation of Skin Inflammatory Response by Active Components of Silymarin" *molecules*.
- Kent et al. 1998. "Effect of Lipopolysaccharide and Inflammatory Cytokines on Interleukin-6 Production by Healthy Human Gingival Fibroblasts". *Infect Immun*.
- Makene and Pool 2015. "The assessment of inflammatory activity and toxicity of treated sewage using RAW264.7 cells". *Water Environ J*.
- Piva et al 2013. "Assessment of inflammatory and oxidative biomarkers in obesity and their associations with body mass index". *Inflammation*.
- Pupovac A. et al. 2018. "Toward Immunocompetent 3D Skin Models." *Advanced Healthcare Materials*.
- Rincon, Mercedes. 2012. "Interleukin-6: From an Inflammatory Marker to a Target for Inflammatory Diseases." *Trends in Immunology*.
- Sipahi H et al. 2018. "Investigation of the biocompatibility of Surgical Masks." *Pteridines*.
- Vijayavenkataraman S et al. 2016. "3D bioprinting of skin: a state-of-the-art review on modelling, materials, and processes." *Biofabrication*.
- Wang R. et al. 1996. "Human dermal Fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms." *J. Invest. Dermatol*.

CERTIFICATE

17.8.9.0021

According to the report no. 17.8.3.0055 dated on 23 June 2017, we confirm that the below mentioned item was tested at the Hohenstein Laboratories GmbH & Co. KG according to DIN EN ISO 20743:2013-12 "Textiles - Determination of the antibacterial activity of antibacterial finished products". The item shows

ANTIBACTERIAL ACTIVITY

The tests were carried out with the test strains *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352. The evaluation of the antimicrobial activity is based on the Hohenstein evaluation scheme (Rev. 2 · January 2015).

Sample: 80.10013-00 Silver

Company: Soliani EMC
via varesina 122
Como (22100)
Italy

Schloss Hohenstein · D-74357 Boennigheim, 24 July 2017

Chief Executive Officer



Dr. Timo Hammer

