





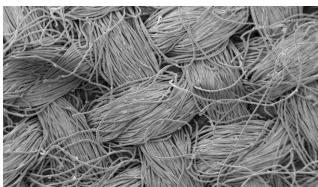




Como 18/04/2020

TECHNICAL INFORMATION





Articolo: Tessuto Antibatterico Bestetti

Tipologia: Tinto pezza colore bianco

Altezza / Width (cm) Altezza: 160,00 cm /164,00 cm

Peso / Weight (g/m): **180,00 g/m - 112,50 g/mtq**

Total composition: 96% CO-4% EL

Fiber composition front / back: 90% CO- 10% EL

Codice dogana / Custom code: 52083100

UNI EN ISO 3758











CONDIZIONI DI LAVAGGIO:

Tessuto riutilizzabile fino a 20 volte a seguito di lavaggio per immersione di 1 litro d'acqua con 5 grammi di ipoclorito di sodio (es: candeggina), sciacquare sotto acqua corrente, quindi lasciare asciugare completamente all'aria, per poi stirare a massima temperatura su ambo i lati del prodotto

Questo ha un duplice scopo:

- Ripristinare il trattamento antigoccia
- Sterilizzare a caldo













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.

Indagine eseguita	Risultato	U.M	Metodo	Limiti	
Prove di efficienza di rimozione			BS EN 14683		
batterica (BFE) S. Aureus.					
Lotto	ND				
Dimensione del campione	64	cm ²			
Lato del campione investito dall'aerosol microbico	Lato interno				
Flusso	28,3	I/min			
Media dei conteggi dei controlli positivi	2846				
Media dei conteggi dei controllo negativi	0				
Efficienza di rimozione Batterica Test 1	95,5	%		≥ 95	
Efficienza di rimozione Batterica Test 2	95,0	%		≥ 95	
Efficienza di rimozione Batterica Test 3	95,4	%		≥ 95	
Efficienza di rimozione Batterica Test 4	95,2	%		≥ 95	
Efficienza di rimozione Batterica Test 5	95,0	%		≥ 95	
Efficienza di rimozione Batterica Media	95,2	%		≥ 95	
Prove di resistenza al flusso (Breathability or pressure drop)			BS EN 14683		
Resistenza al flusso test 1	28	Pa/cm²		≤ 40	
Resistenza al flusso test 2	36	Pa/cm²		≤ 40	
Resistenza al flusso test 3	29	Pa/cm²		≤ 40	
Resistenza al flusso test 4		Pa/cm²		≤ 40	
Resistenza al flusso test 5	37	Pa/cm²		≤ 40 ≤ 40	
resistenza al liusso test s	33	Fardir		> 40	
Indagine eseguita	Risultato	U.M	Metodo	Limiti	
Valore medio dei campioni	33	Pa/cm²		≤ 40	

Indagine eseguita	Risultato	U.M	Metodo	Limiti	
Valore medio dei campioni	33	Pa/cm²		≤ 40	
Flusso di prova	8	l/min			

I test indicati, effettuati sui soli campioni consegnati al laboratorio risultano Conformi alle specifiche tecniche per Mascherine di tipo I secondo normativa BS EN 14683:2019

Commento

Il test è stato condotto su tessuto in cotone di forma rettangolare in misura di 170mm x 90mm (5 prove) utilizzato per la produzione della mascherina in tessuto di cotone codice PMS 702.

Il materiale è stato lavato per 20 volte in accordo alla seguente procedura:

- Immergere in 1 Litro di acqua addittivata di 5 g/L di ipoclorito di sodio, sciacquare sotto acqua corrente e lasciare asciugare completamente all'aria
- Successiva stiratura con ferro caldo da ambo le parti

I risultati sono riferiti solo al campione analizzato.

L'incertezza di misura è ottenuta come incertezza estesa con un fattore di copertura K=2, pari ad una confidenza del 95%.

Il presente report non può essere riprodotto parzialmente senza l'autorizzazione esplicita della direzione del laboratorio.

Un'aliquota del campione è conservato in laboratorio per 15 giorni dalla data di emissione del Rapporto di Prova.

U.M. = Unità di misura





TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione *in vitro* Report no: MAB_2020_49

Edizione: 01

Pagina: 1 / 17

CLIENTE	NTE SOLIANI EMC SRL					
	VIA VARESINA 12	2,				
	22100 COMO (CO)				
	CF 02375250137					
LABORATORIO	✓ MaB – Microscopi✓ ToP - Tossicologi	ia applicata e biologia c a e Proteomica	ellulare			
	☐ Ms² – Materiali, s	ensori e sistemi				
Report svolto da:		Firma	Data			
Tiziana Petrachi		Tizione Petrael	14/04/2020			
Responsabile di la	boratorio:	Firma	Data			
Elena Veronesi		Eleva Verres	14/04/2020			
Approvato da:		Firma	Data			
Massimo Dominici		Maria	14/04/2020			

Ed.	Report n°	Data	Descrizione
01	MAB_2020_49	14/04/2020	Prima Edizione





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

Report no: MAB_2020_49

Edizione: 01

Pagina: 2 / 17

II	NE	OIC	E		
1		RIF	FERI	MENTI COMMESSA	3
2		SC	ОРО		3
3		ST	ATO [DELL'ARTE	3
4		MA	TERI	ALI	6
	4.	.1	Ider	ntificazione del Campione	6
	4.	.2	Star	ndard	7
	4.	.3	Line	e Cellulari	7
	4.	.4	Rea	genti	7
	4.	.5	Con	sumabili	8
	4.	.6	Stru	imenti	8
5		Me	todi		9
	5.	.1	Sag	gio di Citotossicità	9
	О	P	Analis	i dei dati	11
	5.	.2	Sag	gi 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		RIS	SULT	ATI	13
	6.	.1	Valu	itazione della citotossicità	14
		•	Valu	itazione qualitativa	14
		•	Valu	itazione quantitativa	14
	6.	.2	Valu	itazione dell'irritazione e sensibilizzazione mediante misura dei nitriti e dell'IL-6	15
7		СО	NCLU	SIONI	17
8		BIE	BLIO	GRAFIA	17





Report no: MAB_2020_49

Edizione: 01

Pagina: 3 / 17

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

1 RIFERIMENTI COMMESSA

TPM_2020_145_SOL

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_49

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. Poichè l'ON ha una emivita molto limitata, viene convertito istantaneamente e storato 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





Report no: MAB_2020_49

Edizione: 01

Pagina: 5 / 17

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

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- 1α





MAB_2020_49

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

Edizione: 01

Report no:

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-1a 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 Report nº: MAB_2020_49 ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Edizione: 01

Irritazione *in vitro*Pagina: 7 / 17

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

Quantità di test: 1

Descrizione materiale: 80.10056-00. ID campione attribuita internamente: 0304SOL_A

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/Streptomicina (P/S) Gibco cod. 15140-122; lot 2145453; scadenza 30/08/2020
- Glutammina 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 Griess 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 no: MAB_2020_49

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 Burker (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 no: MAB_2020_49

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 $5\%CO_2$. 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 CO_2 . 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 / 100μ l, 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 CO_2 , 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 no: MAB_2020_49

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

Tabella 1. 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 multipiastra (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_49

Edizione: 01

Pagina: 11 / 17

o 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 \pm 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 no: MAB_2020_49

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/100 μ l 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 μ g/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 diidrocloruro] 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 μ M-1,25 μ M. 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 μ L), 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 μ L 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 no: MAB_2020_49

Edizione: 01

Pagina: 13 / 17

a temperatura ambiente con 20 μ L di una soluzione composta da "Acceptor Beads" e dall' anticorpo anti-analita. Successivamente, 25 μ L 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 λ = 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 μ g/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





TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione in vitro Report no: MAB_2020_49

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_A	0	0	4	0

Tabella 2. Valutazione qualitativa

Valutazione quantitativa

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

Donliesti	Blank	HDPE	Latov				
Replicati	DIAIIK	пирс	Latex	100%	46,41%	21,54%	10%
1	0,63	0,54	0,06	0,59	0,58	0,65	0,43
2	0,40	0,61	0,07	0,31	0,46	0,67	0,55
3	0,48	0,53	0,06	0,50	0,58	0,63	0,57
4	0,59	0,45	0,05	0,41	0,53	0,64	0,62
5	0,63	0,39	0,05	0,52	0,60	0,66	0,54
6	0,63	0,41	0,05	0,56	0,54	0,63	0,44

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

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





TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione-Irritazione in vitro Report no: MAB_2020_49

Edizione: 01

Pagina: 15 / 17

Media della vitalità	100	86,83	9,84	86,32	97,47	115,17	93,64
Deviazione Standard	9,68	8,6	0,69	10,34	10,4	1,51	7,42

Tabella 4. Vitalità media ± 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 $\mu M \pm$ deviazione standard.

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

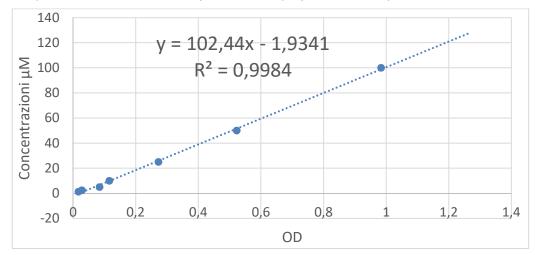


Figura 1. Curva Standard per Concentrazione dei nitriti

	Concentrazione dei nitriti (µM)							
ID Campione	CTRL -	CTRL+	Campione	Valutazione				
0304SOL_A	Non rilevato	59,63±4,13	Non rilevato	Negativo				

Tabella 5. Concentrazione dei nitriti riportata come media ± 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 no: MAB_2020_49

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 $R^2 > 0.99$.

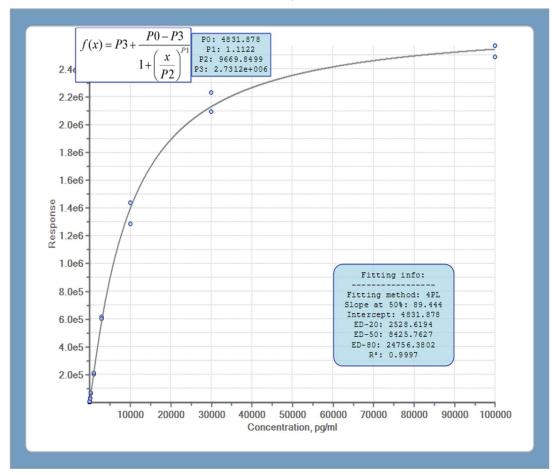


Figura 2. Curva Standard per Concentrazione della citochina IL-6

ID Campione CTRL - (RSD%)		CTRL+ (RSD%)	Campione (RSD%)	Valutazione
0304SOL_A	105,8 (6,9%)	2296,4 (0,3%)	110,6 (13,2%)	=CTRL -

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





TITOLO: Test Citotossicità in accordo a Report nº: MAB_2020_49
ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Edizione 01

ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Edizione: 01

Irritazione in vitro 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-1a 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*.







Rapporto di prova nº: 20LA05277 del 21/04/2020

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

Dati di accettazione

Oggetto 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 - E coli

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 nº 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







Rannorto	di nr	ova n°∙	201 405277	del 21/04/2020
Kappono	ai pri	ovan.	ZULAUSZII	uei 2 1/04/2020

Parametro - Specifiche Metodo - Note	U.M.	Risultato Note	LoQ LoD	Inizio prova Fine prova
* Determinazione dell'attività antibatterica (R) - R=(Ut-Uo)-(At-Uo) ISO 22196:2011		> 6.1	0,3	15/04/2020 17/04/2020
* Determinazione dell'attività antibatterica (R) ISO 22196:2011	%	>99.999	50	15/04/2020 17/04/2020
Dimensioni della superficie dei provini (H x L)	mm	50x50		15/04/2020 17/04/2020
Spessore dei provini		1,0		15/04/2020 17/04/2020
Polimero del film di copertura		Polipropilene		15/04/2020 17/04/2020
Dimensioni della superficie del film di copertura (H x L)		40x40		15/04/2020 17/04/2020
Spessore del film di copertura		0,10		15/04/2020 17/04/2020
Ceppo Gram-negativo		Escherichia coli ATCC 8739		15/04/2020 17/04/2020
Modalità di condizionamento		Radiazione UV-C (30 min per lato)		15/04/2020 17/04/2020
Riferimento utilizzato		Materiale inerte interno (polipropilene)		15/04/2020 17/04/2020
Volume dell'inoculo	ml	0,4		15/04/2020 17/04/2020
Numero batteri disponibili nell'inoculo		360000		15/04/2020 17/04/2020
Uo - Conta batteri recuperati dai provini NON trattati dopo l'inoculo		4,3	0,4	15/04/2020 17/04/2020
Ut - Conta batteri recuperati dai provini NON trattati dopo 24 ore dall'inoculo		6,1	0,4	15/04/2020 17/04/2020
At - Conta batteri recuperati dai provini trattati dopo 24 ore dall'inoculo	log	NQ	0,4	15/04/2020 17/04/2020

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 nº 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 nº: 20LA05277 del 21/04/2020

20LA05277/01 Tessuto antibatterico S	SOLIA	NI EMC Nome commerciale SOLEM	II Bestetti Antibat	terico	,
Parametro - Specifiche Metodo - Note	U.M.	Risultato Note	LoQ	LoD	Inizio prova Fine prova
Determinazione dell'attività antibatterica (R) - R=(Ut-Uo)-(At- Uo) ISO 22196:2011		3,5	0,3		15/04/2020 17/04/2020
Determinazione dell'attività antibatterica (R) ISO 22196:2011		99,968	50		15/04/2020 20/04/2020
Dimensioni della superficie dei provini (H x L)		50x50			15/04/2020 17/04/2020
Spessore dei provini		1,0			15/04/2020 17/04/2020
Polimero del film di copertura		Polipropilene			15/04/2020 17/04/2020
Dimensioni della superficie del film di copertura (H x L)		40x40			15/04/2020 17/04/2020
Spessore del film di copertura		0,10			15/04/2020 17/04/2020
Ceppo Gram-positivo		Staphylococcus aureus - ATCC 6538			15/04/2020 17/04/2020
Modalità di condizionamento		Radiazione UV-C (30 min per lato)			15/04/2020 17/04/2020
Riferimento utilizzato		Campione non trattato			15/04/2020 17/04/2020
Volume dell'inoculo	ml	0,4			15/04/2020 17/04/2020
Numero batteri disponibili nell'inoculo	n°	400000			15/04/2020 17/04/2020
Uo - Conta batteri recuperati dai provini NON trattati dopo l'inoculo	log	4,4	0,4		15/04/2020 17/04/2020
Ut - Conta batteri recuperati dai provini NON trattati dopo 24 ore dall'inoculo		4,5	0,4		15/04/2020 20/04/2020
At - Conta batteri recuperati dai provini trattati dopo 24 ore dall'inoculo		1,0	0,4		15/04/2020 20/04/2020

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

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

(§): Indica una modifica rispetto alla versione precedente del 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 nº 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 nº: 20LA05277 del 21/04/2020

(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

Direttore Tecnico
Dr. Giovanni Mitaritonna Chimico Ordine Interprov. Chimici del Veneto - Padova nº 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 nº 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