

## Rapporto di prova n°: 4001014

Il presente RdP annulla e sostituisce integralmente il precedente di pari numero emesso in data 06/05/2020

Pagina 1 di 2

Data di emissione: **19/06/2020**  
Accettazione: **4000613**  
Tipo di campione: **Tessuto**

**Spettabile:**  
**COBAS Srl**  
**Strada Statale 150, n.53**  
**64026 ROSETO DEGLI ABRUZZI (TE)**

Descrizione campione: **DICHIARATO: TESSUTO per maschera facciale denominata M-MASK, 3 strati di tessuto Spunbonded/Meltblown/Spunbonded in busta trasparente**

Descrizione richiesta: **Vs. ordine del 21/04/2020**

Provenienza: /

Punto di prelievo: /

Prelievo effettuato da: **a cura del cliente**

Data accettazione: **04/05/2020**

Esecuzione prove: **04/05/2020 - 06/05/2020**

Prova:	Metodo:	u.m:	Risultato:	Limiti di Legge:	
				min	max

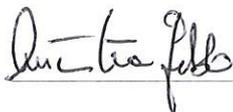
Caratteristiche campione:

- Colore	-		<b>bianco</b>	
- Dimensioni	cm		<b>10 X 10</b>	
- Area di prova	cm <sup>2</sup>		<b>50</b>	
- Lato di prova			<b>non app.le</b>	
- Portata di prova	l/min		<b>28,3</b>	
- Media controlli positivi	ufc		<b>3143</b>	
- Media controlli negativi	ufc		<b>2</b>	

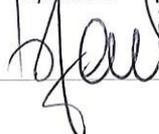
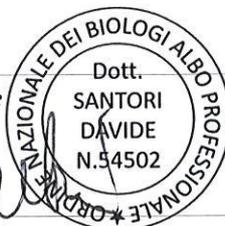
EFFICIENZA FILTRAZ. BATTERICA (BFE):

1° prova	UNI EN 14683:2019 Appendice B	%	<b>99,3</b>	
2° prova	UNI EN 14683:2019 Appendice B	%	<b>99,4</b>	
3° prova	UNI EN 14683:2019 Appendice B	%	<b>99,5</b>	
4° prova	UNI EN 14683:2019 Appendice B	%	<b>99,6</b>	
5° prova	UNI EN 14683:2019 Appendice B	%	<b>99,3</b>	

I tecnici / analisti



La Direzione Operativa

**Timbro del laboratorio**  
**LACI s.r.l.**



## Rapporto di prova n°: 4001014

Pagina 2 di 2

Prova:	Metodo:	u.m:	Risultato:	Limiti di Legge:	
				min	max
BFE media	UNI EN 14683:2019 Appendice B	%	99,4 ± 0,6	95	

### Note:

I limiti di legge indicati sono riferiti alla Norma UNI EN 14683:2019.

Le prove sono state condotte con aerosol contenente *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (NCTC 10788).

Dimensione media particelle aerosol di prova: 2,7 µm.

Per le prove chimiche, i dati riportati nella colonna "Risultato" possono includere l'espressione dell'incertezza di misura estesa e del recupero nella forma: "risultato ± incertezza estesa [recupero %]". L'incertezza estesa è sempre calcolata ad un livello di confidenza del 95% e un fattore di copertura k=2.

I risultati si riferiscono al campione così come ricevuto.

- Fine Rapporto di Prova -

I tecnici / analisti



La Direzione  
Operativa



Dott.  
SANTORI  
DAVIDE  
N.54502

Timbro del  
laboratorio  
LACI s.r.l.



**Rapporto di prova n°: 4001172**

*Il presente RdP annulla e sostituisce integralmente il precedente di pari numero emesso in data 26/05/2020*

Pagina 1 di 2

Data di emissione: **26/05/2020** Spettabile:  
 Accettazione: **4000710** **COBAS Srl**  
 Tipo di campione: **Maschera facciale** **Strada Statale 150, n.53**  
**64026 ROSETO DEGLI ABRUZZI (TE)**

Descrizione campione: **Dichiarato : PROTOTIPO MASCHERA FACCIALE denominata M-MASK, 3 strati di tessuto Spunbonded/Meltblown/Spunbonded, confezionata singolarmente in busta sigillata,**

Descrizione richiesta: **Vs. ordine del 21/04/2020**

Provenienza: /

Punto di prelievo: /

Prelievo effettuato da: **a cura del cliente**

Data accettazione: **19/05/2020** Esecuzione prove: **19/05/2020 - 26/05/2020**

Prova:	Metodo:	u.m:	Risultato:	Limiti di Legge:	
				min	max
Mascherina n.1:		-			
Pulizia microbica (Bioburden)	UNI EN ISO 11737-1:2018	ufc/g	<2		30
Pulizia microbica (Bioburden)	UNI EN ISO 11737-1:2018	ufc/prodotto	<6		
Mascherina n.2:		-			
Pulizia microbica (Bioburden)	UNI EN ISO 11737-1:2018	ufc/g	4		30
Pulizia microbica (Bioburden)	UNI EN ISO 11737-1:2018	ufc/prodotto	12		
Mascherina n.3:		-			
Pulizia microbica (Bioburden)	UNI EN ISO 11737-1:2018	ufc/g	<2		30
Pulizia microbica (Bioburden)	UNI EN ISO 11737-1:2018	ufc/prodotto	<6		
Mascherina n.4:		-			
Pulizia microbica (Bioburden)	UNI EN ISO 11737-1:2018	ufc/g	3		30
Pulizia microbica (Bioburden)	UNI EN ISO 11737-1:2018	ufc/prodotto	9		
Mascherina n.5:		-			
Pulizia microbica (Bioburden)	UNI EN ISO 11737-1:2018	ufc/g	2		30
Pulizia microbica (Bioburden)	UNI EN ISO 11737-1:2018	ufc/prodotto	6		

I tecnici / analisti



La Direzione Operativa



Timbro del laboratorio  
**LACI s.r.l.**



## Rapporto di prova n°: 4001172

Pagina 2 di 2

Prova:	Metodo:	u.m:	Risultato:	Limiti di Legge:	
				min	max

### Note:

I limiti di legge indicati sono riferiti alla Norma UNI EN 14683:2019.

Condizionamento mascherine prima della prova in camera a microclima controllato: (21±5 ) °C e (85±5 %) UR per 4 h.

I risultati si riferiscono al campione così come ricevuto.

- Fine Rapporto di Prova -

I tecnici / analisti



La Direzione Operativa

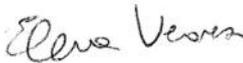


Timbro del laboratorio  
**LACI s.r.l.**



**TITOLO:** Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro*  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 1 / 17

<b>CLIENTE</b>	Spett.le Cobas s.r.l. Strada Statale 150, n 53 64026 Roseto degli Abruzzi (TE)- Fraz Santa Lucia c.a. Divinangelo Collevocchio		
<b>LABORATORIO</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>MaB – Microscopia applicata e biologia cellulare</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>ToP - Tossicologia e Proteomica</b> <input type="checkbox"/> <b>Ms<sup>2</sup> – Materiali, sensori e sistemi</b>		
<b>Report svolto da:</b> Tiziana Petrachi	<b>Firma</b> 	<b>Data</b> 24/06/2020	
<b>Responsabile di laboratorio:</b> Elena Veronesi	<b>Firma</b> 	<b>Data</b> 24/06/2020	
<b>Approvato da:</b> Massimo Dominici	<b>Firma</b> 	<b>Data</b> 24/06/2020	

Ed.	Report n°	Data	Descrizione
01	MAB_2020_358	24/06/2020	Prima Edizione

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 2 / 17

## INDICE

<b>1</b>	<b>RIFERIMENTI COMMESSA</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>SCOPO</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>STATO DELL'ARTE</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>MATERIALI</b>	<b>7</b>
4.1	Identificazione del Campione	7
4.2	Standard	7
4.3	Linee Cellulari	7
4.4	Reagenti	7
4.5	Consumabili	8
4.6	Strumenti	8
<b>5</b>	<b>Metodi</b>	<b>9</b>
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
<b>6</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>14</b>
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
<b>7</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>17</b>
<b>8</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>17</b>

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 3 / 17

## 1 RIFERIMENTI COMMESSA

TPM\_2020\_874

Data di inizio dell'esperimento: 22/06/2020

Data di fine dell'esperimento: 24/06/2020

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

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 4 / 17

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 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

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 5 / 17

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 $\beta$  (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 $\alpha$  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

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 6 / 17

citochine pro-infiammatorie IL-1 $\alpha$  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.

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 7 / 17

## 4 MATERIALI

### 4.1 Identificazione del Campione

Campione: maschera facciale

Parte del device che viene testata: tessuto a contatto con la cute integra, esclusi elastici/fascette per orecchie.

Quantità di test: 1

Descrizione materiale: codice mascherian: M-MASK, composta da tre strati: strati esterni tnt spunbonded 30gr ref. SP30-001 IDR, strato intermedio meltblown 25gr - ref. MBS-25. Il tessuto analizzato è quello a contatto con la cute e quindi il POLIPROPILENE, TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR. ID campione attribuita internamente: **1006COB**

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/Streptomina (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

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 8 / 17

- 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
- Isopropanolo Carlo Erba cod. P9A772079B; scadenza 02/2022
- Alpha-Lisa Human Interleukin 6 (IL-6) Kit, Perkin Elmer (Cod. AL223S); lot 2674263; Scadenza gennaio 2021.

#### **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 multiplastrata Enspire (PerkinElmer) cod.MAB-072
- 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 (Mettler)

---

#### **Fondazione Democenter-Sipe**

via P.Vivarelli 2, 41125 – Modena • P.I. e C.F. 01989190366 • Tel. +39 059 2058146 - Fax +39 059 2058161  
info@fondazioneemocenter.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***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 9 / 17

- Incubatori per colture cellulari 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific)
- Agitatore Orbitale - Incushaker A 37°C (Benchmark)

## 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/cm<sup>2</sup> 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<sub>2</sub>. 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<sub>2</sub>. 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 CO<sub>2</sub>, 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.

---

#### Fondazione Democenter-Sipe

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

#### Tecnopolo di Mirandola

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

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 10 / 17

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.

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 CO<sub>2</sub>. 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 multiplastrato (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***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**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.

Criteria 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/cm<sup>2</sup> 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<sub>2</sub>. 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<sub>2</sub>. L'azione enzimatica è stata successivamente inibita con DMEM + 10% FBS, e la sospensione cellulare centrifugata a 1200 rpm per 10 minuti. Il surnatante è stato scartato e il

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 12 / 17

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%CO<sub>2</sub> 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 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

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

**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358

**Edizione:** 01

**Pagina:** 13 / 17

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  $\mu\text{g/mL}$ ). 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. Le misure del campione sono confrontati con il controllo negativo mediante analisi statistica T-test, valori di  $p\text{-value} < 0,05$  vengono ritenuti statisticamente significativi.

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 14 / 17

## 6 RISULTATI

### 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%
<b>3006COB</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	3006COB			
				100%	46,41%	21,54%	10%
1	1,54	1,25	0,07	1,16	1,61	1,27	1,39
2	1,18	1,42	0,07	1,12	1,31	1,31	1,32
3	1,26	1,13	0,07	1,11	1,20	1,24	1,26
4	1,15	1,14	0,07	1,11	1,25	1,31	1,27
5	1,18	1,11	0,06	0,92	1,25	1,30	1,22
6	1,04	1,11	0,07	1,02	1,17	1,26	1,21

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

**TITOLO:** Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro*  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 15 / 17

	Blank	HDPE	Latex	3006COB			
				100%	46,41%	21,54%	10%
Media della vitalità	100,00	97,16	5,52	87,54	105,90	104,31	104,12
Deviazione Standard	16,80	12,10	0,54	8,66	16,02	2,96	6,93

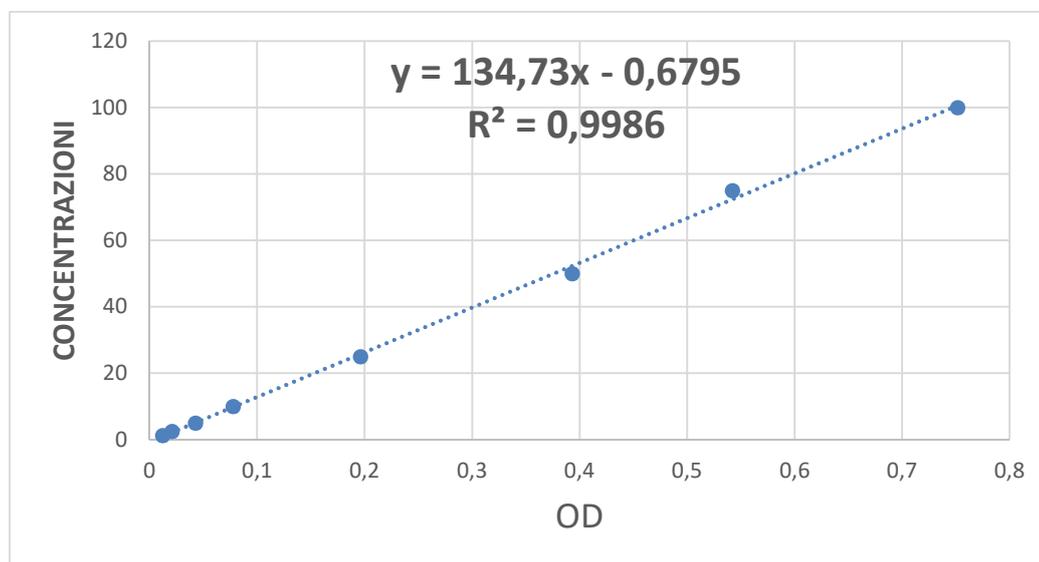
**Tabella 4. Vitalità media ± deviazione standard espresse in percentuale**

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  $\mu\text{M}$  ± 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  $\mu\text{M}$ ). Lo scarto quadratico medio  $R^2 = 0,99$ .



**Figura 1. Curva Standard per Concentrazione dei nitriti**

ID Campione	Concentrazione dei nitriti ( $\mu\text{M}$ )		Campione	Valutazione
	CTRL -	CTRL+		
1006COB	Non rilevato	4,72±0,14	Non rilevato	Negativo

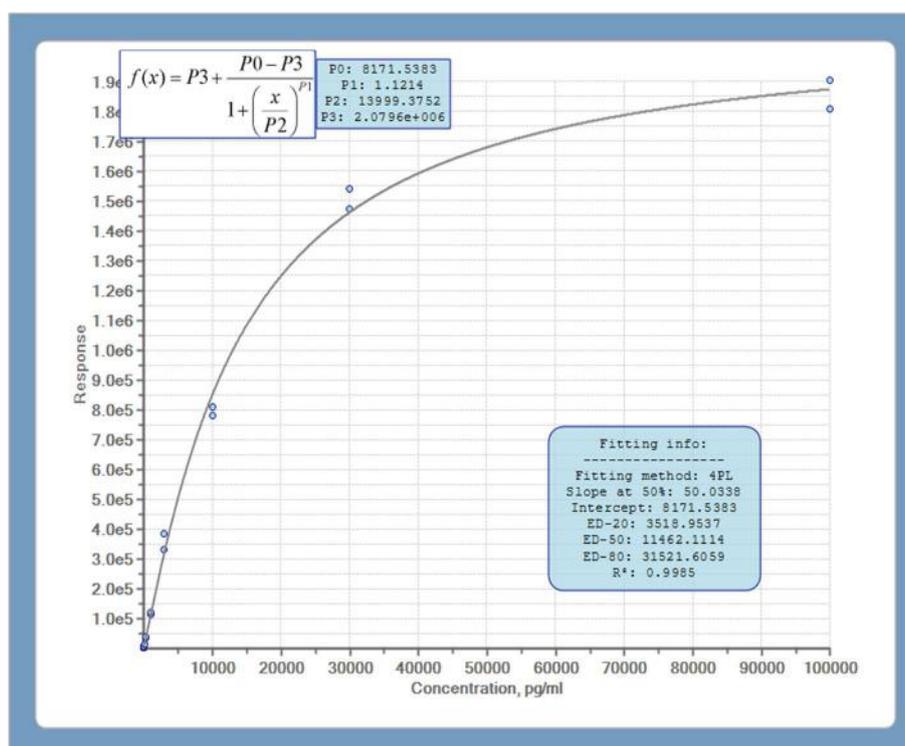
**Tabella 5. Concentrazione dei nitriti riportata come media ± deviazione standard**

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 16 / 17

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%).

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%)	
<b>3006COB</b>	295,92 (10,50%)	3868,59 (3,70%)	350,14 (1,50%)	>CTRL - T-test >0,05

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

La differenza di espressione di IL-6 tra il campione e il controllo negativo non risulta statisticamente significativa  $P\text{-value} > 0,05$ , pertanto il campione è confrontabile con il controllo negativo.

**TITOLO: Test Citotossicità in accordo a ISO10993 e Test di sensibilizzazione- Irritazione *in vitro***  
**Materiale:** POLIPROPILENE. TESSUTO TNT PP SPUNBONDED 30g/mq, ref. SP30-001 IDR

**Report n°:** MAB\_2020\_358  
**Edizione:** 01  
**Pagina:** 17 / 17

## 7 CONCLUSIONI

Il campione non risulta 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.*

**Rapporto di prova n°: 4001004**

*Il presente RdP annulla e sostituisce integralmente il precedente di pari numero emesso in data 30/04/2020*

Pagina 1 di 2

Data di emissione: **19/06/2020**  
 Accettazione: **4000603**  
 Tipo di campione: **Maschera facciale**

**Spettabile:**  
**COBAS Srl**  
**Strada Statale 150, n.53**  
**64026 ROSETO DEGLI ABRUZZI (TE)**

Descrizione campione: **DICHIARATO: TESSUTO per maschera facciale denominata M-MASK, 3 strati di tessuto Spunbonded/Meltblown/Spunbonded in busta trasparente contrassegnata " Prova 1 SP+MB+SP "**

Descrizione richiesta: **Vs. ordine del 21/04/2020**

Provenienza: **/**

Punto di prelievo: **/**

Prelievo effettuato da: **a cura del cliente**

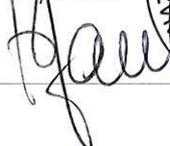
Data accettazione: **30/04/2020** Esecuzione prove: **30/04/2020**

Prova:	Metodo:	u.m:	Risultato:	Limiti di Legge:	
				min	max
RESPIRABILITA':		-			
- Pressione differenziale (1° campione)	UNI EN 14683:2019 Appendice C	Pa/cm2	23,3		
- Pressione differenziale (2° campione)	UNI EN 14683:2019 Appendice C	Pa/cm2	24,5		
- Pressione differenziale (3° campione)	UNI EN 14683:2019 Appendice C	Pa/cm2	23,1		
- Pressione differenziale (4° campione)	UNI EN 14683:2019 Appendice C	Pa/cm2	20,2		
- Pressione differenziale (5° campione)	UNI EN 14683:2019 Appendice C	Pa/cm2	20,4		
- Pressione differenziale (media)	UNI EN 14683:2019 Appendice C	Pa/cm2	22,3		40

I tecnici / analisti  
 Il Perito Chimico



La Direzione  
 Operativa




Timbro del  
 laboratorio  
 LACI s.r.l.



## Rapporto di prova n°: 4001004

Pagina 2 di 2

Prova:	Metodo:	u.m.:	Risultato:	Limiti di Legge:	
				min	max

### Note:

I limiti di legge indicati sono riferiti alla Norma UNI EN 14683:2019

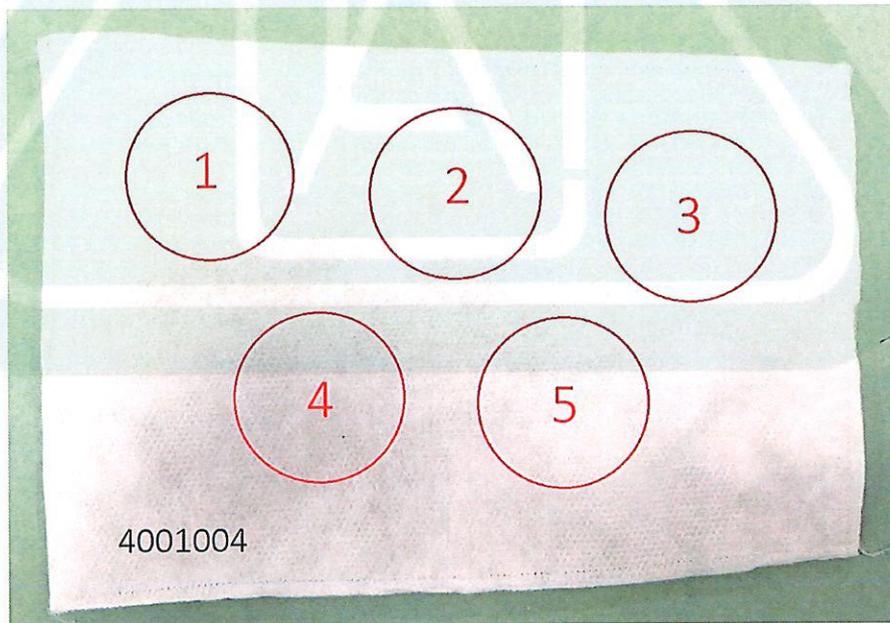
Misure effettuate a portata di 8 l/min.

I risultati si riferiscono al campione così come ricevuto.

- Fine Rapporto di Prova -

Le determinazioni sono state effettuate su provini ricavati da n. 5 campioni di mascherine

Nell'immagine seguente numero e posizioni generali delle aree dei n. 5 campioni di mascherine dove sono state effettuate le misurazioni differenziali.



I tecnici / analisti  
Il Perito Chimico

*Dea e Cecere*

La Direzione  
Operativa

*[Signature]*



Timbro del  
laboratorio  
LACI s.r.l.

