

SCHEDA TECNICA

MASCHERINA FUTURA

MOD01



Dispositivo Medico di Classe I, Rep. n. 1943721
(T020601 Mascherine Chirurgiche Standard)

Produttore

IL PESCE PAZZO DI PETRINI DAVIDE & C. SNC

Sede legale Via Santa Caterina 46/6, 17019 Varazze (SV), Italy

Sede operativa Via Parasio 41/B, 17019 Varazze (Sv), Italy

Tel. 019 7702718 - Email: info@ilpescepazzosnc.it – PEC: pescepazzosnc@cgn.legalmail.it

Descrizione del prodotto

Mascherina chirurgica standard, classificata come DM di classe I non sterile secondo la norma UNI EN 14683

Struttura della mascherina

La mascherina è composta da:

- strato esterno in TNT prodotto con tecnologia spunbound, 35gr/mq. Questo strato ha la funzione di conferire resistenza meccanica alla mascherina;
- strato intermedio in TNT prodotto con tecnologia meltblown, 25gr/mq. Questo strato svolge funzione filtrante;
- strato interno in TNT prodotto con tecnologia spunbond, 35gr/mq. Questo strato ha funzione protettiva per il volto evitando il contatto diretto della cute con lo strato filtrante intermedio;
- elastici di tenuta tubolari latex free;
- nasello in plastica anallergica per consentire di modellare al meglio la mascherina facendola aderire in modo ottimale al viso

Specifiche tecniche

Il prodotto in oggetto è classificato come Dispositivo Medico di Classe I tipo I secondo la normativa EN 14683:2019.

Indagine eseguita	Risultato	Unità di misura	Metodo	Valori limite
BFE	99,4	%	BS EN 14683	>95
Bioburden	26	cfu/g	BS EN 14683	<30
Breathability	34	Pa/cm ²	BS EN 14683	<40

Inoltre, in ottemperanza della legge UNI EN ISO 10993, il dispositivo è stato sottoposto al test di citotossicità e di sensibilizzazione – irritazione in vitro

Descrizione caratteristiche

NOME COMMERCIALE	MISURE	COMPOSIZIONE	CODICE CND	CLASSE CE	N. RPROGRESSIVO BD/RDM
FUTURA	9cm x 17,5 cm	TNT SPUNBOND TNT MELTBLOWN TNT SPUNBOND	T020601 MASCHERINA CHIRURGICA STANDARD	CLASSE I NON STERILE	1943721

Etichetta del prodotto



DISPOSITIVO MEDICO DI CLASSE 1

Registrato nella banca dati dei DM
del M.d.S. al N° REP.N. 1943721
in conformità al

D.Lgs 24/02/97 n. 46 Attuazione della direttiva 93/42CEE

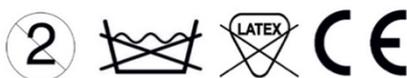
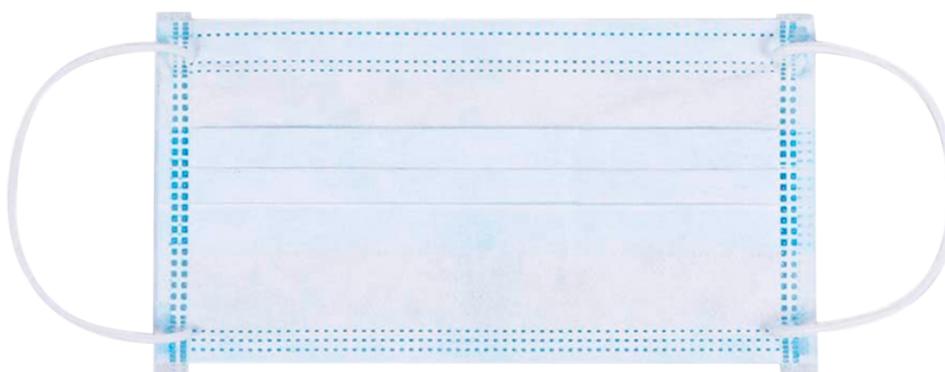


Immagine del prodotto



Riferimenti normativi

Il presente manuale è stato realizzato per rispondere alle seguenti leggi, direttive e regolamenti:

- **Decreto Legislativo 6 settembre 2005, n. 206** e successive modificazioni (detto anche Codice del Consumo e riporta le informazioni obbligatorie per la SCHEDA PRODOTTO, come da Titolo II, Capo II, artt. 6, 7 e 9) che recepisce varie direttive della Comunità Economica Europea;
- **Direttiva 2001/95/CE** sulla sicurezza generale dei prodotti;
- **Regolamenti 2017/745/UE e 2017/746/UE e direttive 93/42/CE e 2007/47/CE**, sui dispositivi medici;
- **UNI EN 14683**: Maschere facciali ad uso medici – requisiti e metodi di prova
- **UNI EN ISO 10993**: Valutazione biologica dei dispositivi medici.

Garanzia

Il fabbricante garantisce i dispositivi MASCHERINA FUTURA per eventuali difetti di materiale e di produzione che dovessero insorgere, per un periodo di 12 mesi dalla data di vendita.

Ogni tentativo di riparazione, ripristino, modifica o uso improprio che esuli da quanto contemplato all'interno del presente manuale e dal comune buon senso, farà decadere la garanzia.

Qualora fossero evidenziati malfunzionamenti e/o rotture e/o difetti, l'utilizzatore dovrà tempestivamente informare il rivenditore dettagliando i dati del prodotto e le problematiche insorte.

Il rivenditore si riserva di autorizzare il reso per procedere con l'analisi e l'eventuale riparazione o sostituzione del prodotto.

Destinazione d'uso

Da utilizzare per prevenire e/o attenuare la contaminazione propria e degli altri da agenti atmosferici e/o microbici.

Da indossare sul viso, ricoprendo bocca e naso. Le suddette mascherine sono realizzate in materiale sintetico e sono disponibili in vari colori.

Sono ad uso temporaneo, più precisamente monouso e debbono essere cambiate ogni 4 ore.

Istruzioni di manutenzione in etichetta

	Monouso
	Non lavabile

Avvertenze e norme di sicurezza

	<p>Manipolare sempre con mani lavate per non contaminare la mascherina.</p> <p>Lavare accuratamente le mani dopo avere manipolato la mascherina a fine utilizzo.</p>
---	--

Smaltimento da persone

	<p>Non disperdere nell'ambiente le mascherine per evitare che agenti microbici e virus si propaghino.</p>
---	---

Simboli utilizzati

	<p>Fabbricante (Rif. ISO 15223-1:2012(E))</p>
	<p>Data di fabbricazione (Rif. ISO 15223-1:2012(E))</p>
	<p>Il simbolo del cestino barrato indica che il prodotto, al termine della propria vita utile, dovendo essere trattato separatamente dai rifiuti domestici, deve essere conferito in un centro di raccolta differenziata. L'utente è responsabile del conferimento del prodotto a fine vita alle appropriate strutture di raccolta.</p> <p>L'adeguata raccolta differenziata per il successivo avvio del prodotto dismesso al riciclaggio, al trattamento ed allo smaltimento ambientale compatibile, contribuisce ad evitare possibili effetti negativi sull'ambiente e sulla salute e favorisce il riciclo dei materiali di cui è composto il prodotto. Per informazioni più dettagliate inerenti i sistemi di raccolta disponibili, rivolgersi al servizio locale di smaltimento rifiuti.</p>
	<p>Marchio CE</p>
	<p>Monouso</p>
	<p>Non lavabile</p>
	<p>Attenzione. Segnale di avvertimento per la sicurezza in caso di utilizzo/applicazione (Rif. ISO 7000-0434A)</p>



RAPPORTO DI PROVA N° 20_0128

Data emissione 14/04/2020

Spett.le
Il Pesce Pazzo SNC
Via Santa Caterina 46/6
17019 Barazze (SV)

Tipo campione Dispositivo Medico
Data ricevimento campione 30/03/2020
Descrizione campione Mascherine di colore verde con lacci bianchi
Luogo del prelievo Non Indicato
Campionatore Committente - Le informazioni relative al prelievo sono state fornite dal committente

Protocollo Campione 20_0107 del 30/03/20 **Data Inizio Prove:** 30/03/20 **Data fine prove** 10/04/20

Indagine eseguita	Risultato	U.M	Metodo	Limiti
Prove di efficienza di rimozione batterica (BFE) S. Aureus.			BS EN 14683	
Lotto	ND			
Dimensione del campione	64	cm ²		
Lato del campione investito dall'aerosol microbico	Lato interno			
Flusso	28,3	l/min		
Media dei conteggi dei controlli positivi	2737			
Media dei conteggi dei controllo negativi	0			
Efficienza di rimozione Batterica Test 1	99,7	%		≥ 95
Efficienza di rimozione Batterica Test 2	99,1	%		≥ 95
Efficienza di rimozione Batterica Test 3	99,6	%		≥ 95
Efficienza di rimozione Batterica Test 4	99,4	%		≥ 95
Efficienza di rimozione Batterica Test 5	99,4	%		≥ 95
Efficienza di rimozione Batterica Media	99,4	%		≥ 95
Microbiol cleanliness - Bioburden con determinazione CFU/g			BS EN 14683	
N° di microrganismi totali	26			
Bioburden	< 30	cfu/g		30
Prove di resistenza al flusso (Breathability or pressure drop)			BS EN 14683	
Resistenza al flusso test 1	31			≤ 40
Resistenza al flusso test 2	32			≤ 40



SEGUE RAPPORTO DI PROVA N° 20_0128

Data emissione 14/04/2020

Indagine eseguita	Risultato	U.M	Metodo	Limiti
Resistenza al flusso test 3	30			≤ 40
Resistenza al flusso test 4	35			≤ 40
Resistenza al flusso test 5	40			≤ 40
Valore medio dei campioni	34	Pa/cm ²		≤ 40
Flusso di prova	8	l/min		

Pareri ed Interpretazioni

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

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

Fine Rapporto di Prova

Il tecnico del Laboratorio
Dott. Mario Minichiello

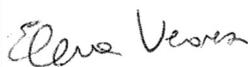
Il Responsabile del Laboratorio
Dott. Federico Reverberi

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

Report n°: MAB_2020_55

Edizione: 01

Pagina: 1 / 17

CLIENTE	Pesce Pazzo di Davide Petrini Via Maestri D'Ascia, 1 17019 Varazze (SV)		
LABORATORIO	<input checked="" type="checkbox"/> MaB – Microscopia applicata e biologia cellulare <input checked="" type="checkbox"/> ToP - Tossicologia e Proteomica <input type="checkbox"/> 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_55	14/04/2020	Prima Edizione

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

Report n°: **MAB_2020_55**

Edizione: **01**

Pagina: **2 / 17**

INDICE

1	RIFERIMENTI COMMESSA	3
2	SCOPO	3
3	STATO DELL'ARTE	3
4	MATERIALI	7
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
5	Metodi	9
5.1	Saggio di Citotossicità	9
o	Analisi dei dati	11
5.2	Saggi <i>in vitro</i> alternativi per valutare infiammazione e sensibilizzazione	11
5.2.1	Determinazione dei nitriti	12
5.2.2	Determinazione dell'IL-6	12
6	RISULTATI	14
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_55**

Edizione: **01**

Pagina: **3 / 17**

1 RIFERIMENTI COMMESSA

TPM_2020_182_PAZ

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

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

Report n°: MAB_2020_55

Edizione: 01

Pagina: 4 / 17

irritazione e sensibilizzazione dei 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_55

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

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

Report n°: MAB_2020_55

Edizione: 01

Pagina: 6 / 17

sensibilizzanti dalle non sensibilizzanti attraverso la quantificazione delle citochine IL-6 e IL-1 α 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-1 α 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*

Report n°: **MAB_2020_55**

Edizione: **01**

Pagina: **7 / 17**

4 MATERIALI

4.1 Identificazione del Campione

Campione: maschera facciale

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

Quantità di test: 1

Descrizione materiale: polietilene. ID campione attribuita internamente: **3103PE**

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
- 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 Griess Sigma-Aldrich cod. G4410-10g; lot SLCC6697
- LPS lipopolisaccaride da Escherichia coli O55:B5; Sigma-Aldrich cod. L2637-5mg; lot

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

Report n°: **MAB_2020_55**

Edizione: **01**

Pagina: **8 / 17**

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. 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 n°: MAB_2020_55

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 aggiungere 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_55

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 multiplastrata (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_55

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/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%

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

Report n°: MAB_2020_55

Edizione: 01

Pagina: 12 / 17

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%. 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_55

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.

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

Report n°: **MAB_2020_55**

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%
3103PE	0	0	4	0

Tabella 2. Valutazione qualitativa

- Valutazione quantitativa

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

Replicati	Blank	HDPE	Latex	3103PE			
				100%	46,41%	21,54%	10%
1	0,83	0,95	0,07	0,64	0,61	0,66	0,77
2	0,39	0,82	0,06	0,35	0,46	0,38	1,03
3	0,65	0,85	0,05	0,57	0,54	0,52	0,67
4	0,54	0,69	0,05	0,50	0,55	0,64	0,60
5	0,59	0,68	0,05	0,55	0,59	0,90	0,66
6	0,59	0,59	0,05	0,56	0,64	0,62	0,59

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

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

Report n°: **MAB_2020_55**

Edizione: **01**

Pagina: **15 / 17**

	Blank	HDPE	Latex	3103PE			
				100%	46,41%	21,54%	10%
Media della vitalità	100	127,42	8,78	88,13	94,43	103,37	120,2
Deviazione Standard	14,32	13,05	0,73	9,73	12,71	17,44	16,52

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 μM ± 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 $R^2 = 0,99$.

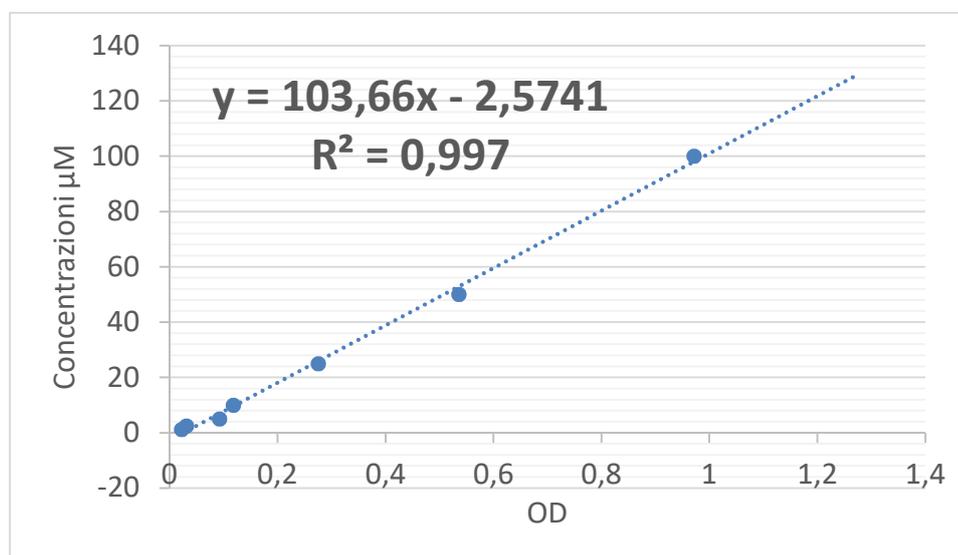


Figura 1. Curva Standard per Concentrazione dei nitriti

ID Campione	Concentrazione dei nitriti (μM)		Campione	Valutazione
	CTRL -	CTRL+		
3103PE	Non rilevato	59,98±4,18	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*

Report n°: **MAB_2020_55**

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 $R^2 > 0,99$.

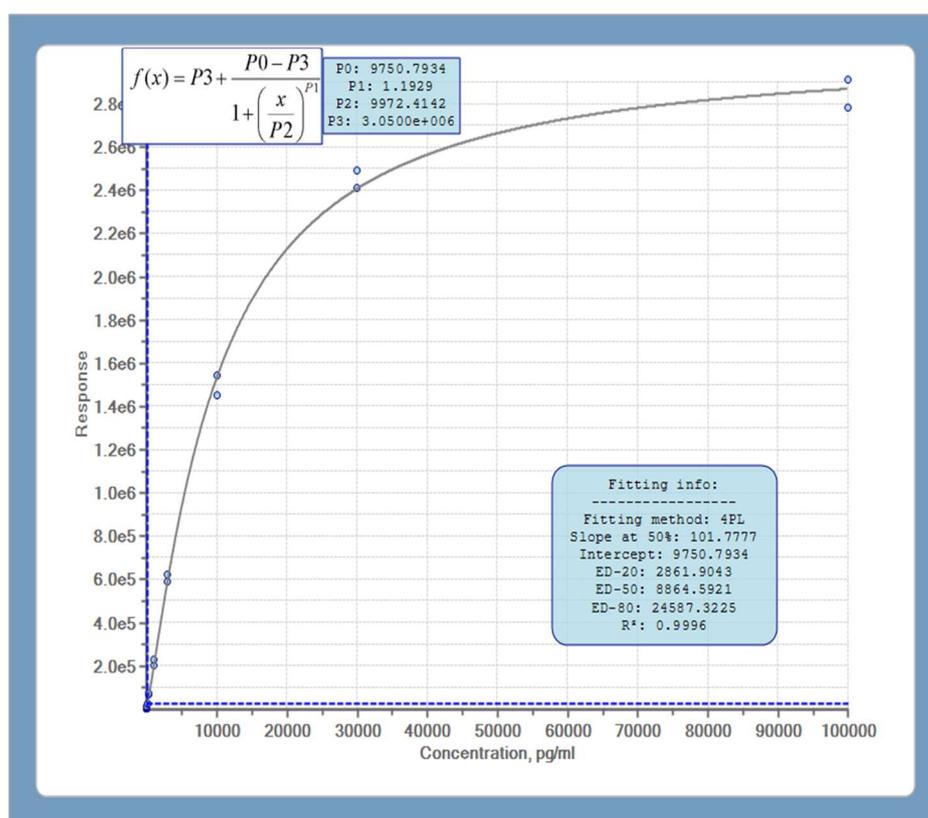


Figura 2. Curva Standard per Concentrazione della citochina IL-6

ID Campione	IL-6 pg / mL		Campione (RSD%)	Valutazione
	CTRL - (RSD%)	CTRL+ (RSD%)		
3103PE	104,6 (5,3%)	526,4 (3,5%)	59,9 (13,3%)	<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_55**

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-1 α 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.*

DICHIARAZIONE DI CONFORMITA' ALLA NORMATIVA 93/42/CEE

Il sottoscritto Davide Petrini, nato a Varazze il 29.03.1968, in qualità di legale rappresentante della società "Il Pesce Pazzo & C S.n.c." con sede legale in Via Santa Caterina 46/6 Varazze (17019) e sede operativa in Via Parasio 41B Varazze (17019), Savona Italia.

Tel. 019 770 27 18 - E-mail: info@ilpescepazzosnc.it - pec: pescepazzosnc@cg.legalmail.it
P.IVA: 01739130092 - REA SV 204215

DICHIARA

La conformità alla Direttiva Europea 93/42/CEE e s.m.i. per il dispositivo medico di classe I tipo I MASCHERINA FUTURA con numero di repertorio presso banca dati dei dispositivi medici 1943721

FABBRICANTE	DESCRIZIONE COMMERCIALE	NUMERO PROGRESSIVO DI ISCRIZIONE IN BD/RDM DEL MINISTERO DELLA SALUTE	DATA DI IMMISSIONE IN COMMERCIO	ADEMPIMENTO DI NOTIFICA AI SENSI DELL'ART. 13 DEL D. LGS. 46/97	CODICE CND	CLASSE CE
IL PESCE PAZZO DI PETRINI & C S.N.C.	MASCHERINA FUTURA	1943721	12/04/2020	SI	T020601-MASCHERINA CHIRURGICA STANDARD	CLASSE I NON STERILE SENZA FUNZIONE DI MISURA

IL PESCE PAZZO

di PETRINI & C S.n.c
Via S. Caterina 46/6 17019 Varazze (SV)
P.IVA: 01739130092



Si ricorda che l'elenco dei dispositivi medici e dei dispositivi medici impiantabili attivi notificati nel sistema "Banca dati dei dispositivi medici" è completamente disponibile e scaricabile sul sito del Ministero della Salute al seguente indirizzo: www.salute.gov.it