



ClarionMask

**CLASS I MEDICAL DEVICE
TYPE II SURGICAL MASK**

*Piazza Martiri della Libertà n. 4
28100 NOVARA
ITALIA*

ClarionMask

TECHNICAL SHEET

CLASS I MEDICAL DEVICE TYPE II SURGICAL MASK

COMPLIES WITH UNI EN 14683: 2014 AND UNI EN ISO 10993 STANDARDS (part 5 and part 10)

Medical Device Directory Number: 1965271

CLARIONMASK is a Class I and TYPE II Surgical Mask.

Like all TYPE II masks, it has a high filtering power in compliance with the reference standard EN 14683.

The traditional mask allows the deposit of viruses on the surface layers of the same, without eliminating them.

The superficial tissues of ClarionMask, on the other hand, are treated with LIVINGUARD Technology, the exclusive self-disinfecting formulation that mechanically inhibits the activity of bacteria and viruses and prevents their proliferation (eliminating them from the surface), guaranteed prolonged and effective protection from the risk of contamination.

ClarionMask is the mask that "inactivates" viruses,
including 99.9% of the SARS-CoV-2 which causes Coronavirus.

Technically, this technology applies a positive charge at the molecular level to the surfaces of tissues. When the microbes come into contact with these positive charges, the microbial cells, which have a negative charge, are eliminated, thus leading to the permanent destruction of the microorganisms.



PRODUCT DESCRIPTION

CLARIONMASK, 5-layer surgical mask with high filtering power by Clarion Living s.r.l. made in Italy, with exclusively Italian products and with a high sartorial quality, it consists of:

- an outer layer of colored cotton (100% poplin) fabric;
- 3 intermediate layers of polypropylene fabric according to an exclusive process called 3VR;
- an internal layer of colored cotton fabric (100% Jersey).

Each layer is structured differently for the specific function it is intended for: protective on the outside, filtering in the intermediate layers, protective and comfortable on the inside.

Inside the outer layer, in the upper central part, a nose shaping underwire is sewn, called "nose", in order to better adapt the closure of the mask in correspondence with the nose.

In the lower part, the adaptation to the face has been entrusted to an elastic webbing (cotton-based) inside which an elastic is sewn, the length of which allows it to pass behind the ear and return to be sewn in the upper side of the mask, in order to allow the perfect adherence of the mask to the face.

The elastics have a regulating ring for greater or lesser traction of the mask to the face, with two final rings that allow a further pull of the elastics behind the neck.

A fabric label is sewn inside the mask, which can be cut, showing the certifications of the same and its storage and washing methods.

On the outside and laterally on the left side, a cotton ribbon is sewn with the indications of the percentages of the products used for the realization of the CLARIONMASK and the logo of the Clarion Living manufacturer.

On the left side, the logo of the company that supplies the technology used for the antiviral treatment of fabrics (both external and internal), LIVINGUARD (Suisse), is hot stamped.



FABRIC TREATMENT

For the realization of CLARIONMASK, the highest quality Italian cotton fabrics were used. The same have been treated in Switzerland with Livinguard Technology.

Thanks to the use of these high quality fabrics, CLARIONMASK is extremely light, while at the same time ensuring a great filtration capacity for bacteria and viruses, together with a low resistance to respiratory flows.

All this makes the use of CLARIONMASK comfortable, while ensuring a high degree of safety, brought about by the permanent destruction of microorganisms.

CERTIFICATIONS – FABRIC TEST

The LIVINGUARD technology, applied to fabrics, renders ineffective up to 99.9% the viruses exhaled by humans, such as SARS-COV-2, known as CORONAVIRUS.

Freie Universität of Berlin (FUB), *RWTH Institute of Textile Technology* of Aachen and *University of Arizona* of Tucson with the tests carried out by them have unanimously certified that this disinfectant applied to fabrics is capable of definitively inactivating the Coronavirus that deposits on it.

REFERENCES

It is possible to consult on the LIVINGUARD or Clarion Living website the results of the official tests performed on:

- *Freie Universität* – Berlin
- Report test 30.07.2020 - Prof. Dr. Uwe Rösler and Dr. Anika Friese -
- *University of Arizona* – Tucson
- Report test 04.05.2020 - Luisa A. Ikner Ph.D. and Charles P. Gerba Ph.D. -

CERTIFICATIONS - CLARIONMASK

CLARIONMASK is a: **Class I Medical Device, Type II Surgical Mask**, according to the requirements of the UNI EN 14683: 2014 standard.

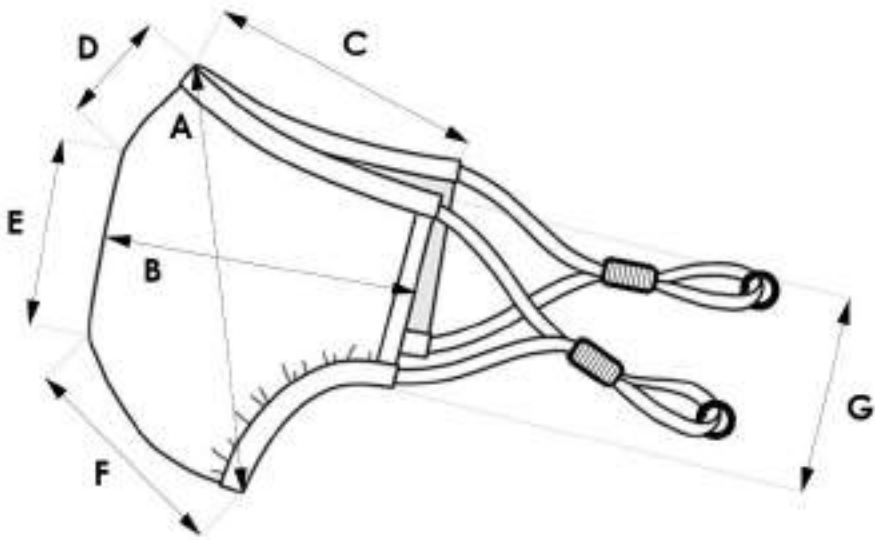
CLARIONMASK is registered with the Italian Ministry of Health, as a Medical Device (DM) at n ° 1965271, in the name of Clarion Living s.r.l.

USES

CLARIONMASK, is a reusable protective mask.

The outer fabric layer and the inner fabric layer are treated with the Swiss LIVINGUARD technology, whose technical characteristics are visible on the official website.

TECHNICAL FEATURES AND VALUES of ClarionMask

TECHNICAL FEATURES	VALUES																																
Sizes																																	
	Measurements in mm																																
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">SIZE</th> <th style="width: 10%;">A</th> <th style="width: 10%;">B</th> <th style="width: 10%;">C</th> <th style="width: 10%;">D</th> <th style="width: 10%;">E</th> <th style="width: 10%;">F</th> <th style="width: 10%;">G</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">L</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">M</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	SIZE	A	B	C	D	E	F	G	L								M								S							
	SIZE	A	B	C	D	E	F	G																									
	L																																
M																																	
S																																	
Measurements in gr																																	
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td style="width: 10%; text-align: center;">L</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">M</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	L		M		S																												
L																																	
M																																	
S																																	
Peso																																	

TECHNICAL FEATURES	VALUES	
1° colored outer layer	100% cotton POPLIN type fabric (Supima Cotton) - made in Italy -	
2°/3°/4° intermediate filter layer	3 superimposed layers of polypropylene fibrils - made in Italy -	
5° inner layer (in contact with the face)	100% cotton YERSEY type fabric - made in Italy -	
Edges	HIGHER	Tape sewn in 100% cotton - 20 mm
	INFERIOR	Tape sewn in cotton / elastane
Nose clip	Width 5 mm - iron rod Ø 0.5 mm - central plate 0.3 mm - covered with black polyethylene, conformable	
Nose clip length	mm 110	
Ear elastics	Empty tubular Ø 5 mm 83% Nylon and 17% Spandex - black hypoallergenic - elasticity 340% (± 5%) Length adjusters and final rings in Nylon and Silicon	
Tensile strength of the ties	Fm > N 35 = Kgf 3.57	
Sewing	Handcrafted in cotton	
Filtering efficiency (B.F.E.)	> 98%	Norm UNI EN 14683:2019+AC:2019 Lab. Techno Analisis – test report n. 2000579
Resistance to breath	< 18 Pa/cm2	Norm UNI EN 14683:2019+AC:2019 Lab. Techno Analisis – test report n. 2000579
Bioburden	< 11 UFC/g	Norm UNI EN 14683:2019+AC:2019 Lab. Techno Analisis – test report n. 2000579
Odours	Odourless totally	

TECHNICAL FEATURES	VALUES	
Other characteristics	<ul style="list-style-type: none"> • USE • FREQUENCY OF WASHING • MAXIMUM N° WASHING • EFFECTIVINESS • SHELF LIFE 	<p>> 8 hours a day 1 every 7 days 30 times 210 days 1 year from production date</p>
Substances which are not present	<ul style="list-style-type: none"> • Does not contain glass fibres • Does not contain latex • Does not contain PVC • Does not contain Phthalates • Does not contain Methylchloroisothiazolinone & Methylisothiazolinone • Does not contain dimethyl fumarate • Does not contain formaldehyde • Does not contain allergens • Does not contain heavy metals as: Antimony, Arsenic, Cadmium, Mercury and Lead • Nickel detected with method of artificial sweat: under limit fixed by Reach 	
Biocompatibility assessment	<ul style="list-style-type: none"> • Not irritant for skin - Norm UNI EN ISO 10993-10 – <i>Lab. Bio Basic Europe S.r.l.</i> • Does not show any contact dermatitis allergic potential - Norm UNI EN ISO 10993-10 – <i>Lab. Bio Basic Europe S.r.l.</i> 	
Cleanliness and Linting	<p>Cleanliness: 2,2 IPM Linting: 2,3 Log10</p>	
Sterility	<p>Not sterile</p>	

TECHNICAL FEATURES	VALUES
Primary packaging - Bag -	<ul style="list-style-type: none"> • Transparent bag • First protection of the mask • Bag made with 100% non-toxic and anti-suffocation polypropylene • Main technical data printed in two languages (ITA / EN) • Printing of the batch of origin, the production date and the expiry date • Adhesive closure
Secondary packaging - Case -	<ul style="list-style-type: none"> • Cardboard box with cream-colored background and Clarion Living green writing (for single sale) • Complete opening of the case so as not to damage the mask during collection • Man / woman model image print for better identification • Colored sticker for the identification of the color variant, to the main one • Printing of the batch of origin, the production date and the expiry date
Package leaflet	<ul style="list-style-type: none"> • Paper leaflet • Detailed information leaflet with technical characteristics and storage methods in two languages • Main technical data printed in six languages, of which two main (ITA / EN) and four secondary (SP / PT - FR / DE)
Characteristics of the production area	<p>CLARIONMASKs are produced in a laboratory that has obtained the certifications referred to in the ISO 9001: 2015 and ISO 13485: 2016 Standards</p>
Check on the final product	<p>During each production step</p>
Respect for the environment	<p>CLARIONMASK is produced with respect for the environment. The 58% of the mask is in natural fiber (100% cotton), while the remaining 42% is completely recyclable. In a year, each person uses at least 365 conventional masks. With the use of ClarionMask you need only 2.</p>
Standard of reference	<p>Class I - EU Regulation 2017/745 - Type II - UNI EN 14683: 2014 standard -</p>
Storage conditions	<p>Store in a healthy, cool and dry environment, away from heat sources, in odor-free environments with low humidity.</p>

Product validity	1 year from packaging
Washing method	<ul style="list-style-type: none">• by hand in running water• without any type of detergent• without wringing• do not dry in direct sunlight• do not use a dryer• do not iron

PACKING

Pieces in each	Case Carton Pallet	1 piece 180 pieces 4.320 pezzi	- 1 pcs x 24 cases 180 pcs x 24cartons
External dimensions	Case Carton Pallet	mm 120 x 18 x 120 mm 400 x 400 x 400 mm 800 x 1200 x 2000 (h)	
Grams of the carton	Case Carton	Cardboar Corrugated cardboard	GC1 - 325 g/mq KMFMT 24242 EB

TABLE OF THE CODES AND COLOURS IN WHICH CLARIONMASK IS AVAILABLE

REORDER CODE	COLOUR	PRIMARY PACKING (bag)	SECONDARY PACKING (case)
3CLG.M1188/3VR/clg32	BLUE	1 pcs	1 pcs
3CLG.M30363/3VR/clg32	BORDEAUX	1 pcs	1 pcs
3CLG.M500768/3VR/clg32	GREEN	1 pcs	1 pcs
3CLG.M4490/3VR/clg32	BLACK	1 pcs	1 pcs
3CLG.M700107/3VR/clg32	ORANGE	1 pcs	1 pcs

PRODUCTION PLACE

CLARIONMASK is made by Clarion Living and produced exclusively in the production laboratory which has obtained the following certifications for the DESIGN, PRODUCTION AND PACKAGING OF SURGICAL MASKS AND ...:

- QUALITY MANAGEMENT SYSTEM
Certificate N. :: IT52921A - ISO 9001: 2015;
- MEDICAL DEVICES - QUALITY MANAGEMENT SYSTEM
Certificate N. :: IT52921H - ISO 13485: 2016.

CUSTOMER CARE SERVICE

A customer assistance service is active and can be contacted for any information at the following address: info@clarion-living.com .

Comparison between **DPI FFP2** e **D.M CLASSE I TIPO II** masks (CLARIONMASK)

TEST	<u>FFP2</u> masks are devices for protection from solid particles	<u>D.M</u> medical devices are devices for protection against viruses and bacteria
-------------	---	--

	FFP2 MASK performance by legislation	CLARIONMASK tested performance
Filtering efficiency (B.F.E.)	≥ 95%	> 98%
Resistance to breath	≤ 60 PA/cm2	< 18 PA/cm2
Bioburden	-	Sì
Flow of exhalation air	95 L/MIN	> 180 L/MIN
Carbon dioxide evacuation	Sì	Sì

REFERENCES

- *Freie Universität – Berlin*
- Report test 30.07.2020 - Prof. Dr. Uwe Rösler and Dr. Anika Friese -
- *University of Arizona – Tucson*
- Report test 04.05.2020 - Luisa A. Ikner Ph.D. and Charles P. Gerba Ph.D. -
- *ANSA*
- Article 03 October 2020 -

Freie Universität Berlin, FB Veterinärmedizin,
Inst. f. Tier- u. Umwelthygiene, Robert-von-Ostertag-Str. 7-13, 14163 Berlin

Livinguard AG
Bahnhofstrasse 12
6300 Zug
Switzerland

Fachbereich Veterinärmedizin
Zentrum für Infektionsmedizin

Institut für
Tier- und Umwelthygiene

gf. Direktor
Univ.-Professor Dr. Uwe Rösler
Robert-von-Ostertag-Str. 7-13
14163 Berlin

Telefon +49 30 838 51845
Fax +49 30 838 4 51863
E-Mail tierhygiene@vetmed.fu-berlin.de
Internet www.vetmed.fu-berlin.de

Bearbeiter/in ur

30. Juli 2020

Report - Antiviral Activity of textile product HEFM47.CO.01

Tested by: Prof. Uwe Rösler and Dr. Anika Friese

Freie Universität Berlin, Institute for Animal Hygiene and Environmental
Health, Robert-von-Ostertag-Straße 7-13, 14163 Berlin

Tested textile product

- reference textile: Cotton (Co), untreated, 11.04.2020, lab number: C1
- antiviral textile: HEFM47.CO.01, 13.05.2020, LIVINGUARD, lab number: C2-neu

Method

- modified according to ISO 18184 (First edition 2014-09-01)
 - washing of all tested textiles with deionized water 10 times at 40°C, drying
 - cutting pieces of approximately 20x20mm and making up a mass of 0.4g with several pieces
 - sterilization at 121°C for 15 min, drying
 - before starting the test conditioning the textiles overnight in a humid environment (incubator 37°C)
 - controls: verification of cytotoxic effect and cell sensitivity to virus/inactivation of antiviral activity

- **test:** inoculation of 0,4g textile with 1ml (or 2ml) virus suspension (at least 10^7 TCID₅₀/ml)
 - washing out using 19 ml (or 18 ml) cell culture medium (MEM Eagle EBSS + 10% fetal calf serum + 1% non-essential amino acids, +1 % penicillin (10.000 U/ml) / streptomycin (10 mg/ml)) after specific time points
 - titration of washing solution in 96-well plate and titer calculation with method of Spearman and Karber in TCID₅₀/ml
- comparison of titer from untreated textile (reference) and treated textile for the specific time points

Results

Code ITU	C1	C2-neu	C1	C2-neu	C1	C2-neu	C1	C2-neu	C1	C2-neu	C1	C2-neu	C1	C2-neu
sequential nr.	1	1	2	2	3	3	4	4	5*	5*	6*	6*	6*	6*
textile after 30 min in log ₁₀ TCID ₅₀ /ml	7,6	6,35	7,6	6,6	7,35	6,35	7,35	6,475	7,35	7,1	7,475	6,975		
Antiviral Activity after 30min in log ₁₀		1,25		1		1		0,875		0,25		0,5		
Reduction after 30min in %		94,38		90,00		90,00		86,66		43,77		68,38		
textile after 1h in log ₁₀ TCID ₅₀ /ml	7,1	5,975	7,1	6,1	7,35	5,475	7,35	5,85	-	-	-	-		
Antiviral Activity after 1h in log ₁₀		1,125		1		1,875		1,5	-	-	-	-		
reduction after 1h in %		92,50		90,00		98,67		96,84	-	-	-	-		
textile after 2h in log ₁₀ TCID ₅₀ /ml	7,1	5,225	7,1	5,225	6,6	5,35	6,975	5,35	7,725	6,475	7,35	5,6		
Antiviral Activity after 2h in log ₁₀		1,875		1,875		1,25		1,625		1,25		1,75		
reduction after 2h in %		98,67		98,67		94,38		97,63		94,38		98,22		
textile after 6h in log ₁₀ TCID ₅₀ /ml	6,975	3,85	6,85	4,475	6,475	4,1	6,725	4,35	6,85	4,1	7,1	3,975		
Antiviral Activity after 6h in log ₁₀		3,125		2,375		2,375		2,375		2,75		3,125		
reduction after 6h in %		99,93		99,58		99,58		99,58		99,82		99,93		
textile after 12h in log ₁₀ TCID ₅₀ /ml	6,475	< 3,1	6,225	3,35	6,475	3,35	5,975	3,1	-	-	-	-		
Antiviral Activity after 12h in log ₁₀		>3,375		2,875		3,125		2,875	-	-	-	-		
reduction after 12h in %		>99,9		99,87		99,93		99,87	-	-	-	-		

*Inoculation with 2ml virus suspension instead of 1ml

Conclusion

The treated textile sample "C2-neu" can efficiently inactivate SARS-CoV-2. The results show a reduction of infectious SARS-CoV-2 within 6 hours from 2.3 to 3.1 log-ranges in comparison to the untreated textile. This means a reduction rate up to 99.9% after 6 hours. As a result of the inoculation of 0.4 g textile with 1 ml virus suspension the whole textile was moistened. This allows the textile sample having the largest disinfectant effect, we assume. Therefore, especially the handling with moist masks seems to be safer in comparison to the untreated textile.

Berlin, 30.07.2020



Prof. Dr. Uwe Rösler

Uwe
Roesler

Digital unterschrieben von
Uwe Roesler
E-Mail: uros@fu-berlin.de
An-Heil-Universität Berlin
am 30.07.2020
11:07:50
Berlin



RESEARCH, DISCOVERY & INNOVATION

Water & Energy Sustainable Technology Center

Modified ISO 18184: Determination of Antiviral Activity of Textile Products to Evaluate Three Treated Fabrics against Human Coronavirus 229E

Company: Livinguard

Study Personnel:

Luisa A. Ikner, Ph.D.
Charles P. Gerba, Ph.D.

Test Date: 16 April 2020
Report Delivery Date: 04 May 2020



RESEARCH, DISCOVERY & INNOVATION

Water & Energy Sustainable Technology Center

Study Data

Table 1. Modified ISO 18184 Evaluation of Three Treated Fabrics against Human Coronavirus 229E at One Contact Time^{AM}

Test Virus	Contact Time	Sample ID	Virus Titer (TCID ₅₀ per Carrier)	Mean Virus Titer (TCID ₅₀ per Carrier)	Mean Log ₁₀ Virus Titer (TCID ₅₀ per Carrier)	Log ₁₀ Reduction	Percent Reduction
Human Coronavirus 229E (ATCC VR-740)	Time Zero	Control Fabric	2.25E+06	3.54E+06	6.55	N/A	N/A
			7.12E+06				
			1.26E+06				
	2 Hours	Control Fabric	7.12E+05	4.46E+05	5.65	0.90	87%
			4.00E+05				
			2.25E+05				
	2 Hours	FM-7 (Test Fabric)	2.25E+03	2.25E+03	3.35	2.30	99.5%
			2.25E+03				
			2.25E+03				
		FM-14 (Test Fabric)	4.00E+05	3.84E+05	5.58	0.08	13.8%
			4.00E+04				
			7.12E+05				
FM-26 (Test Fabric)		1.26E+04	7.34E+03	3.87	1.78	98.4%	
		7.12E+03					
		2.25E+03					

^{AM}TCID₅₀: Tissue Culture Infectivity Dose at the 50% Endpoint

^BLog₁₀ and Percent Reductions for Control Fabric at 2 hours calculated relative to Control Fabric immediately upon inoculation (Time Zero).

^CLog₁₀ and Percent Reductions for the three Test Fabrics at 2 hours calculated relative to Control Fabric mean viral titer of 2 hours.



RESEARCH, DISCOVERY & INNOVATION

Water & Energy Sustainable Technology Center

Table 2. ISO 18184 Evaluation of Three Treated Fabrics against Human Coronavirus 229E: Cytotoxicity Controls^{a,b,c}

Test Virus	Sample ID	Contact Time	Toxicity Titer (CCD ₅₀ per Replicate)	Mean Toxicity Titer (CCD ₅₀ per Replicate)	Mean Log ₁₀ Toxicity Titer (CCD ₅₀ per Carrier)
Human Coronavirus 229E (ATCC VR-740)	Control Fabric	2 Hours	1.26E+02	1.26E+02	2.10
			1.26E+02		
			1.26E+02		
	FM-7 (Test Fabric)	2 Hours	1.26E+02	1.26E+02	2.10
			1.26E+02		
			1.26E+02		
	FM-14 (Test Fabric)	2 Hours	1.26E+03	1.26E+03	3.10
			1.26E+03		
			1.26E+03		
	FM-26 (Test Fabric)	2 Hours	1.26E+02	1.26E+02	2.10
			1.26E+02		
			1.26E+02		

^aCCD₅₀: Cell Cytotoxicity Dose at the 50% Endpoint.

^bControl Fabric, FM-7 and FM-26 Test Fabrics: cytotoxicity observed for MRC-5 cells in the 10³ dilution.

^cFM-14 Test Fabric: cytotoxicity observed for MRC-5 cells in the 10⁵ and 10⁷ dilutions.



RESEARCH, DISCOVERY & INNOVATION

Water & Energy Sustainable Technology Center

Table 3. ISO 18184 Evaluation of Three Treated Fabrics against Human Coronavirus 229E: Neutralization Validation (NV) Controls^{a,b}

Test Virus	Sample ID	Contact Time	NV Ctrl Titer (TCID ₅₀ per Carrier)	Mean NV Ctrl Titer (TCID ₅₀ per Carrier)	Mean Log ₁₀ Virus Titer (TCID ₅₀ per Carrier)	Neutralization Validated?
Human Coronavirus 229E (ATCC VR-740)	Control Fabric	2 Hours	2.25E+03	2.72E+03	3.44	N.A.
			2.25E+03			
			4.00E+03			
	FM-7 (Test Fabric)	2 Hours	4.00E+03	3.30E+03	3.52	Yes
			2.25E+03			
			4.00E+03			
	FM-14 (Test Fabric)	2 Hours	4.00E+03	2.72E+03	3.44	Yes
			2.25E+03			
			2.25E+03			
	FM-26 (Test Fabric)	2 Hours	2.25E+03	2.25E+03	3.35	Yes
			2.25E+03			
			2.25E+03			

^aTCID₅₀: Tissue Culture Infectivity Dose at the 50% Endpoint.

^bNeutralization considered valid when mean viral titer on neutralized test fabrics differs by $\leq 0.5 \log_{10}$ relative to control fabric.



RESEARCH, DISCOVERY & INNOVATION

Water & Energy Sustainable Technology Center

Study Methods

Preparation of Control Fabric

1. An untreated, washed Control Fabric was provided by the Study Sponsor.
2. Pieces of the Control Fabric were cut to dimensions measuring 20 mm by 20 mm.
3. The Control Fabric cuttings were loaded into a glass beaker, covered with foil, and autoclaved for 20 minutes at 121 °C (103 kPa).

Preparation of Test Fabric

1. The treated Test Fabrics (FM-7, FM-14, and FM-26) were provided by the Study Sponsor.
2. Pieces of the Test Fabric were cut to dimensions measuring 20 mm by 20 mm.
3. The Test Fabric pieces were loaded into a separate glass beaker, covered with foil, and autoclaved for 20 minutes at 121 °C (103 kPa).

Test Procedure

1. On the day of testing, five to six 20 mm x 20 mm pieces each of the Control and Test Fabrics were aseptically transferred to and stacked within sterile Petri dishes. The final mass per container for the six swatches (Control or Test) was 0.40 ± 0.05 g. Nine Petri containers were prepared for the Control Fabrics, and six were prepared for each of the Test Fabric.
2. Six Control Fabric stacks and three Test Fabric stacks (per formulation) were each inoculated drop-by-drop with 0.2 mL of Human Coronavirus 229E viral stock (no soil load). A sterile pipette tip was used to press each stack and ensure that the inoculum was evenly spread through each piece of fabric.
3. Three Control Fabric and three Test Fabric stacks were parafilm and incubated at 20 °C in a humidified chamber for the 2-hour study contact time.
4. Three Control Fabric stacks were immediately neutralized to assess the viral titer upon inoculation (i.e. Time Zero) by transfer into conical tubes containing 4 mL of Lethen Broth. The tubes were then vortexed five times for five seconds each to wash out the viruses from the fabric pieces.
5. At the close of the 2-hour contact time, the triplicate Control and Test Fabric stacks were neutralized by transfer into conical tubes containing 4 mL of Lethen Broth. The tubes were vortexed five times for five seconds each to wash out the viruses from the fabric pieces.
6. The additional triplicate Control and Test Fabric stacks (containing no viral inoculum) were incubated concurrently for 2-hours and harvested in Lethen Broth as previously described to assess cytotoxicity and to validate neutralization as described in ISO 18184.



RESEARCH, DISCOVERY & INNOVATION

Water & Energy Sustainable Technology Center

Cell Culture Infectivity Assay

1. Control and test suspensions were diluted ten-fold in 0% FBS MEM.
2. Each dilution was plated in quadruplicate (0.1 mL per well) onto MRC-5 host cell monolayers in 24-well trays prepared to a confluency range of 70% to 80%.
3. Following an adsorption period of 30 minutes to facilitate virus-host cell interaction, 1 mL of 2% FBS MEM was added to each well.
4. The 24-well trays were incubated at 35 °C in a humidified chamber with an atmosphere of 5% CO₂ for 10 days. Assay trays were monitored regularly for changes to host cell monolayers indicative of cytotoxicity or viral cytopathogenic effects (CPE).
5. Assay trays were formally scored on Day 10 of incubation. Log₁₀ and percent reductions of the mean viral inoculum on the Test Fabrics at 2 hours were calculated relative to the mean viral titer of the Control Fabric at 2 hours using the Spearman-Kärber TCID₅₀ Method.
6. Log₁₀ and percent reductions were also determined for the Control Fabric at 2 hours relative to the titer yielded from Control Fabrics at Time Zero to ascertain stability of the viral inoculum over the course of testing.

Study Conclusions

The FM-7 Test Fabric was the most efficacious against Human Coronavirus 229E, achieving a reduction of 99.5% (2.30 log₁₀) given two hours of exposure relative to the Control Fabric (Table 1). Test Fabric FM-26 reduced levels of the test virus by 98.4%, while reductions were minimal for Test Fabric FM-14 at 13.8%.

With regard to cytotoxicity effects on the MRC-5 cell line, toxicity was observed in the 10⁰ dilution of washes for the Control Fabric, FM-7, and FM-26 (Table 2). Toxic effects on host cell monolayers were greater by an order of magnitude for FM-14 (10⁰ and 10⁻¹ dilutions). Neutralization was validated for each of the Control and Test Fabrics beyond the level of cytotoxicity, with < 0.5 log₁₀ difference in viral titer observed between the Control and Test fabrics (Table 3).

ANSA.it - Salute&Benessere

Coronavirus: arriva la mascherina che "mangia" il virus

Realizzata con tessuto autodisinfettante, disattiva 99% dei virus

Francesco Bongarrà ROMA 03 ottobre 2020 14:35



Arrivano mascherine e guanti che, grazie ad una tecnologia autodisinfettante, riescono a distruggere i virus espirati dall'uomo, compreso il 99,9% del SARS-CoV-2 che causa il Coronavirus. Merito del materiale inventato da Sanjeev Swamy, il 59/enne di origine indiana fondatore e presidente dall'azienda d'igiene svizzera Livinguard, con cui vengono realizzate mascherine che possono essere riutilizzate per ben 210 volte senza perdere in efficacia ed in sicurezza.

Tecnicamente, questa tecnologia applica una carica positiva a livello molecolare sulle superfici dei tessuti. Quando i microbi entrano in contatto con queste cariche positive, le cellule microbiche, che hanno carica negativa, vengono eliminate, portando così alla distruzione permanente dei microorganismi.

Nel nostro Paese questa tecnologia è utilizzata per la produzione di mascherine e guanti interamente 'made in Italy' dalla Clarion Living. La Freie Universitaet di Berlino e ITA RWTH Aachen hanno confermato con i loro test l'efficacia di questa nuova tecnologia auto disinfettante che, una volta

applicata su tessuti o superfici è capace di distruggere definitivamente il coronavirus che vi si deposita.

"Nel 2010 - spiega Sanjeev Swamy- un generale di brigata dell'Esercito britannico mi chiese se fosse possibile realizzare un tessuto per le uniformi da combattimento delle forze speciali, che potesse disinfettarsi da solo e resistere a macchie ed odori. Abbiamo realizzato una t-shirt con queste caratteristiche. Da lì siamo arrivati ai risultati attuali".

Risultati che, oltre dalle istituzioni scientifiche tedesche già citate sono stati certificati dall'Università dell'Arizona a Tucson. "Questa tecnologia risulta efficace per la protezione della popolazione dal coronavirus nello svolgimento di normali attività quotidiane come i viaggi in aereo o sui mezzi pubblici". Oltre che su mascherine e guanti, questa tecnologia è applicabile su qualsiasi tessuto e su altre superfici.

"Pensiamo, ad esempio, ai sedili o ai vassoi degli aerei o dei treni, ma anche alla biancheria degli alberghi fino ai vestiti e, in generale, a qualsiasi cosa che debba essere toccata dalle persone", conclude Swamy.

RIPRODUZIONE RISERVATA © Copyright ANSA



TI POTREBBERO INTERESSARE ANCHE:

TEST

- *Techno Analysys* – San Felice s/P (MO)
- Report test 09.10.2020 – Report n. 2000579 -

- *Bio Basic Europe S.r.l.* – Milano
In vitro skin irritation test
- Report test 21.10.2020 – Report n. 2018 | 11V3-1 -

- *Bio Basic Europe S.r.l.* – Milano
In vitro evaluation of the pro-sensitizing potential of a medical device
- Report test 22.10.2020

CLARION LIVING Srl

**TEST SU MASCHERINE IN ACCORDO ALLA UNI
EN 14683:2019+AC:2019**

Ottobre 2020

Rev. 01 del 09/10/2020

Spett.le
Clarion Living Srl
Piazza Martiri della Libertà, 4
28100 Novara (NO)

San Felice s/P (MO), 07 Ottobre 2020 Rev. 01 del 09/10/2020

Report n° 2000579

DATI ACCETTAZIONE

Test report N°: 2000579
Data ricezione campioni: 01/10/2020
Data inizio test: 01/10/2020
Data fine test: 07/10/2020
Operatore: Roberto Tomasini
Approvazione: Antonio Vignali

RIFERIMENTI NORMATIVI

- UNI EN ISO 14683:2019+AC:2019.

DATI RELATIVI AL CAMPIONE

Supplier	Code
Clarion Living srl	ClarionMask

FOTO CAMPIONE



Figura 1: Vista frontale.

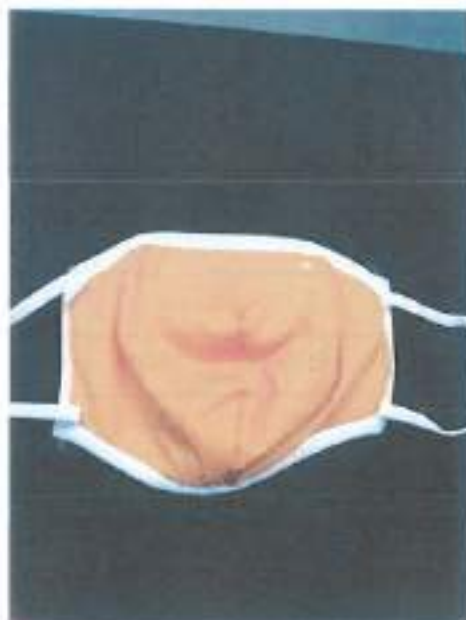


Figura 2: Vista posteriore.

ATTREZZATURE E MATERIALI

- Apparato per testare la BFE.
- Apparato per la misura della pressione differenziale.
- Peptone.
- Cloruro di sodio.
- Acqua iniettabile.
- Piastre Agar.
- Culture of Staphylococcus aureus ATCC 6538.

RISULTATI

5.2.3 Respirabilità

Lo standard specifica i requisiti di fabbricazione, progettazione e prestazione e i metodi di prova per le maschere facciali ad uso sanitario destinate a limitare la trasmissione di agenti infettivi tra pazienti e personale sanitario, e viceversa, durante gli interventi chirurgici e altri contesti medici con requisiti simili.

Denominazione del prodotto	Dispositivo Medico				
Azienda Produttrice	Clarion Living srl				
Descrizione	ClarionMask				
Numero di lotto (batch code)	01				
Portata	8 l/min				
Posizione nella mascherina	Campioni prelevati in modo casuale sul lato frontale di 5 mascherine diverse				
Campione	1	2	3	4	5
Area 1 (Centro della mascherina)	18,2	18,3	18,1	18,0	17,4
Area 2 (In alto a destra)	17,9	17,7	17,4	17,7	17,8
Area 3 (In alto a sinistra)	18,5	18,2	18,2	17,1	18,6
Area 4 (In basso a destra)	17,6	17,5	17,5	17,3	17,5
Area 5 (In basso a sinistra)	18,0	18,6	18,3	18,4	18,7
$\Delta P_{4.9}$ (Pa/cm ²)	18,0	18,1	17,9	17,7	18,0

Per tutto quanto prima riportato, a seguito delle prove effettuate come indicato dallo standard EN 14683:2019+AC:2019, è risultato che il prodotto sottoposto a test RISPETTA i requisiti di respirabilità dello standard stesso (paragrafo 5.2.3 e Appendice C) per il Tipo II.

5.2.2 BFE (Efficacia di filtrazione batterica)

A seguito delle prove effettuate secondo lo standard UNI EN 14683:2019+AC:2019 sui campioni di mascherine, si dichiara che il prodotto sottoposto a test HA SUPERATO le prove di traspirabilità e di filtrazione batterica, BFE (paragrafo 5.2.2). Su tutti i vostri campioni abbiamo misurato un valore di BFE superiore o uguale al 98% previsto dalla normativa.

Dimensione dell'area di test					50.3 cm ²
Lato del campione esposto all'aerosol					Interno
Portata					28.3 ± 0.2 l/min
Valore medio della conta totale delle piastre dei due controlli positivi					328 CFU
Valore medio della conta totale delle piastre del controllo negativo					2 CFU
Campione	1	2	3	4	5
BFE (%)	98	98	99	98	98

5.2.5 Pulizia microbica (Bioburden)

A seguito delle prove effettuate secondo lo standard UNI EN 14683:2019+AC:2019 sui campioni di mascherine, si dichiara che il prodotto sottoposto a test HA SUPERATO le prove di pulizia microbica (paragrafo 5.2.5). Su tutti i vostri campioni abbiamo rilevato un bioburden inferiore a 30 CFU/g.

Campione	1	2	3	4	5
Peso mascherina (g)	10.6	10.5	10.4	10.6	10.6
Total Bioburden (TSA+SDA)	112	97	85	109	92
Bioburden (UFC/g)	11	10	8	11	9

CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti dal report 2000579, è possibile affermare che le mascherine chirurgiche testate sono conformi alla UNI EN 14683:2019+AC:2019. Per cui, possono essere classificate come:

- dispositivo medico di classe I.
- mascherine chirurgiche di tipo II.

TECHNO ANALISYS S.r.l. con socio unico

Antonio Vignali

San Felice sul Panaro (MO), 09/10/2020



TECHNO ANALISYS S.r.l.

Results are referred only to samples received in the laboratory.

This test report shall not be reproduced partially without written consent of the laboratory manager.

5 di 6

Certificate

CLARION LIVING S.R.L.
Piazza Martiri della Libertà n. 4
28100 Novara
Italy

CLARIONMASK

may be qualified as:

CLASS I MEDICAL DEVICE

TYPE II SURGICAL MASK

BASED UPON THE TESTS CARRIED OUT IN COMPLIANCE WITH
UNI EN 14683:2019+AC:2019

Test Report n. 2000579

TECHNO ANALISYS S.r.l. con socio unico

Antonio Vignali
TECHNO ANALISYS S.r.l.

San Felice s/P (MC), 09/10/2020



Registrazione
San Biagio (Sesto S.S.)
Via. Via Agazzi 10/12 - 20143 Milano
Phone +39 02 4700077 - Fax +39 02 4700078
www.bio-basic.com - info@bio-basic.com

Italy - Germany
Bio Basic Ltd
Frankfurt am Main, Germany
Ludwigstr. 24 - 60327 Frankfurt
Phone +49 69 233347

USA - Mexico - Brazil - Chile - Peru
Frankfurt am Main, Germany
Phone +49 69 233347

**TEST DI IRRITAZIONE CUTANEA IN VITRO
(ISO 10993-10, Metodo di prova ISO/TC 194 WG 8)**

***IN VITRO SKIN IRRITATION TEST
(ISO 10993-10, ISO/TC 194 WG 8 protocol)***

CLARION LIVING SRL

ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S

Protocollo n° / Report no. 2018111V3-1

Luogo e data di emissione MILANO – 21 Ottobre 2020
Place and date of issue MILAN – 21st October 2020

Comitato Tecnico Scientifico <i>Scientific Technical Committee</i> Bio Basic Europe S.r.l. Claudio ANGELINETTA, Ornella PASTORIS, Umberto PIANCA Eliana REGOLA, Riccardo VICINI	INDICE INDEX
Responsabile Scientifico – Monitor e Controllo Qualità <i>Scientific Person in Charge and Quality Control</i> Dr. Claudio ANGELINETTA Laurea in Chimica (Università degli Studi di Milano); Specializzato in Scienza e Tecnologia Cosmetiche (Università degli Studi di Milano) Direttore Tecnico BIO BASIC EUROPE S.r.l.	Riassunto <i>Abstract</i> pag. 3
Responsabile della Progettazione Bio Basic Lab <i>Project Responsible Bio Basic Lab</i> Dr.ssa Eliana REGOLA Laurea in Scienze Biologiche (Università degli Studi di Genova); Dottorato di Ricerca in Medicina e Biologia Sperimentale - indirizzo Biochimica (Università degli Studi di Genova); Specializzata in Microbiologia e Virologia - indirizzo Tecnico (Università degli Studi di Genova)	Introduzione <i>Introduction</i> pag. 4
Responsabile Laboratorio Test in vitro Bio Basic Europe <i>In vitro Tests Responsible Bio Basic Europe</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia)	Scopo <i>Aim</i> pag. 6
Sperimentatore Bio Basic Lab e Responsabile della Relazione <i>Bio Basic Lab Experimenter and Person responsible for the report</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia)	Materiali e metodi <i>Materials and methods</i> pag. 7
	Risultati <i>Results</i> pag. 10
	Conclusioni <i>Conclusions</i> pag. 11
	Bibliografia <i>References</i> pag. 12

Tutti i diritti sono riservati. Trattasi di documento tecnico scientifico protetto da Copyright.
Nessuna parte di esso può essere riprodotta in alcun modo senza la preventiva autorizzazione scritta di Bio Basic Europe S.r.l.
In base alla nostra esperienza si consiglia di verificarne ogni 3 anni l'armonizzazione con eventuali aggiornamenti normativi.

*All rights are reserved, being it a scientific and technical document protected by Copyright.
No part of this document may be reproduced in any form without the prior written authorization of Bio Basic Europe S.r.l.
Based on our experience, we suggest to check every 3 years its compliance with the guidelines in force.*

RIASSUNTO

Per studiare la potenziale irritazione cutanea del prodotto testato, il campione è stato sottoposto ad un processo di estrazione sia in solvente polare che apolare e gli estratti sono stati quindi applicati su epidermide umana ricostruita (RHE) di cui è stata successivamente valutata la vitalità cellulare mediante test MTT. Ciascun estratto è stato testato su 3 differenti tessuti RHE. Il campione testato viene considerato irritante per la pelle se la vitalità cellulare dei tessuti in seguito a trattamento è $\leq 50\%$.

Dai risultati del test MTT è emerso che la vitalità dei tessuti trattati con il campione testato è pari a **100.7%** per l'estratto in solvente polare e a **111.8%** per l'estratto in solvente apolare, dimostrando che il **prodotto testato non è irritante per la cute.**

ABSTRACT

To assess the potential skin irritation of the tested product, the sample underwent a process of extraction both in polar and non-polar solvent vehicles and the extracts were applied on reconstructed human epidermis (RHE) and then cell viability was assessed through a MTT test. The reduction of the viability of tissues exposed to the sample in comparison to negative controls is used to predict the skin irritation potential. Each extract was tested on 3 different RHE tissues. The test sample is considered to be irritant to skin if the tissue viability after exposure is $\leq 50\%$.

*The MTT assay showed that the viability of the tissues treated with the tested product is equal to **100.7%** for the extract in polar vehicle and **111.8%** for the extract in non-polar vehicle, showing that **tested product is not irritant for the skin.***

INTRODUZIONE

I modelli in vitro per lo studio della pelle umana sono strumenti fondamentali per la ricerca e lo sviluppo sia in ambito farmaceutico che cosmetico. La pelle umana è ovviamente il miglior modello possibile per tali studi in vitro, sebbene il suo uso sia vincolato da numerosi limiti morali e legali. La pelle di animali rappresenta una possibile alternativa, ma vi sono numerosi dubbi sulla possibilità di estendere i risultati così ottenuti alla pelle umana. Inoltre il Regolamento Europeo 1223/2009 vieta la sperimentazione su animali sia dei prodotti cosmetici finiti che degli ingredienti (o combinazioni di ingredienti) destinati ad essere contenuti nei prodotti cosmetici. Per questi motivi negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi modelli di pelle umana: tali modelli sono stati sottoposti a diversi test per valutare la possibilità del loro impiego in sostituzione dei tessuti animali. A questo scopo devono ovviamente avere delle caratteristiche il più simili possibile a quelle principali della pelle umana.

Il modello di epidermide umana ricostruita (RHE) è costituito da cheratinociti umani normali coltivati su un filtro inerte di policarbonato all'interfaccia aria-liquido. Esso rappresenta un modello di epidermide altamente differenziata e stratificata, comprendente lo strato basale, spinoso, granulare e corneo. Il modello RHE presenta una composizione e delle caratteristiche morfologiche, istologiche e biochimiche paragonabili a quelle dei tessuti umani in vivo, ed è pertanto particolarmente utile in numerosi studi di tossicità e di permeabilità. Il suo impiego nei test di irritazione cutanea prevede l'applicazione topica del prodotto da testare sulla superficie dell'epidermide e la successiva valutazione dei suoi effetti sulla vitalità cellulare.

L'irritazione cutanea indotta da sostanze chimiche, che si manifesta principalmente con eritema ed edema, è il risultato di una cascata di eventi che inizia con la penetrazione delle sostanze stesse attraverso lo strato corneo e successivo danno agli strati di cheratinociti e di altre cellule cutanee sottostanti. Le cellule danneggiate possono inoltre rilasciare mediatori del processi infiammatori ed attivare una cascata infiammatoria che può coinvolgere anche le cellule del derma, in particolare le cellule dello stroma e dell'endotelio vasale. Sono proprio la dilatazione e l'aumentata permeabilità dei vasi sanguigni i principali responsabili di eritema ed edema. Il modello RHE, pur in assenza di un sistema di vascolarizzazione, permette di studiare gli eventi iniziali di questa cascata, come ad esempio il danno a cellule e tessuti, mediante analisi della vitalità cellulare.

La vitalità cellulare viene misurata mediante la conversione enzimatica del colorante MTT [3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, Tiazollil blue tetrazolio bromuro] in un sale di formazano viola che viene quantificato spettrofotometricamente dopo estrazione dai tessuti. Le sostanze irritanti sono riconosciute grazie alla loro capacità di ridurre la vitalità cellulare al di sotto di valori soglia ben definiti.

INTRODUCTION

In vitro models to study human skin are important tools for research and development in the pharmaceutical and cosmetic industries. Human skin is the best possible model for such *in vitro* studies however, there are a number of legal and ethical issues concerning the use of human tissues. Animal skin is an alternative, but the relevance of conclusions drawn from animal data for human skin has always been questionable and moreover the EU regulation 1223/2009 prohibits use of animals for gathering toxicological data for cosmetic ingredients. In recent years several artificial human skin models have been developed: these models have undergone various testing in order to evaluate the possibility of using them to replace animal testing. For this purpose, they must mimic the relevant properties of human skin as closely as possible.

The RHE model consists of normal human keratinocytes cultured on an inert polycarbonate filter at the air-liquid interface. It represents a highly differentiated and stratified epidermis model comprising the main basal, supra basal, spinous and granular layers and a functional stratum corneum. The RHE model presents a histological morphology, composition and aspects of biochemistry comparable to the *in vivo* human tissue, so it is useful in several toxicity and permeability tests. Its use for skin irritation testing involves topical application of the product to the surface of the epidermis, and the subsequent assessment of its effects on cell viability.

Chemical-induced skin irritation, manifested mainly by erythema and oedema, is the result of a cascade of events beginning with penetration of the chemicals through the stratum corneum where they may damage the underlying layers of keratinocytes and other skin cells. The damaged cells may either release inflammatory mediators or induce an inflammatory cascade which also acts on the cells in the dermis, particularly the stromal and endothelial cells of the blood vessels. It is the dilation and increased permeability of the endothelial cells that produce the observed erythema and oedema. Notably, the RHE-based test methods, in the absence of any vascularisation in the *in vitro* test system, measure the initiating events in the cascade, e.g. cell / tissue damage, using cell viability as readout.

Cell viability is measured by enzymatic conversion of the vital dye MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Thiazolyl blue tetrazolium bromide], into a purple formazan salt that is quantitatively measured after extraction from tissues. Irritant chemicals are identified by their ability to decrease cell viability below defined threshold levels.

SCOPO

Lo scopo del test è stato quello di valutare la potenziale azione irritante del prodotto testato su epidermide umana ricostruita (RHE).

Il test è stato effettuato sul liquido di estrazione ottenuto incubando il prodotto in soluzione salina (NaCl 0.9%) e in olio di sesamo per 72 ore a 37°C.

AIM

The aim of the test was to evaluate the barrier effect of the tested product on reconstructed human epidermis (RHE).

The test was carried out on the liquid of maceration obtained incubating the product in saline (NaCl 0.9%) and sesam oil for 72 hours at 37°C.

MATERIALI E METODI

MATERIALS AND METHODS

Tessuti

L'epidermide umana ricostruita è formata da cheratinociti umani normali coltivati su un filtro inerte di polycarbonato all'interfaccia aria-liquido in un mezzo di crescita chimicamente ben definito.

Tissues

Reconstructed Human Epidermis consists of normal human keratinocytes cultured on an inert polycarbonate filter at the air-liquid interface, in a chemically defined medium.

Trattamenti eseguiti / Treatments performed

NC	Controllo Negativo (D-PBS) / <i>Negative control (D-PBS)</i>
PC1	Controllo Positivo (SDS 1%) in solvente polare / <i>Positive Control (SDS 1%) in polar vehicle</i>
PC2	Controllo Positivo (SDS 1%) in solvente apolare <i>Positive Control (SDS 1%) in non-polar vehicle</i>
TS1	Estratto del campione in solvente polare <i>Extract of the sample in polar vehicle</i>
TS2	Estratto del campione in solvente apolare <i>Extract of the sample in non-polar vehicle</i>
V1	Solvente polare <i>Polar vehicle</i>
V1	Solvente apolare <i>Non-polar vehicle</i>

Campione / Sample

ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S

Determinazione della vitalità cellulare tramite test MTT

La vitalità cellulare è stata misurata tramite il saggio MTT. La base chimica del test è la riduzione dell'MTT, una sostanza gialla in soluzione, a formare cristalli di formazano color viola. Tale processo di riduzione ha luogo prevalentemente nel citoplasma e in minor misura nei mitocondri e sulla membrana cellulare, ed è altamente dipendente dalle concentrazioni intracellulari di NADH e NADPH. Come conseguenza di questi processi metabolici, nel giro di alcune ore appaiono cristalli viola di formazano che possono essere sciolti in isopropanolo. L'assorbimento dei cristalli solubilizzati può essere misurato alla lunghezza d'onda di 540 nm ed è proporzionale al numero di cellule vive in un range lineare molto ampio.

Determination of cell viability by MTT assay

Cell viability was assessed by MTT assay. The chemical basis of the assay is the reduction of the MTT, a slightly yellow substance, which forms a purple formazan upon reduction. The process primarily takes place in the cytoplasm, and to a lesser extent in the mitochondria and cell membrane, and it is highly dependent on the concentration of intracellular NADH and NADPH. As a consequence of these metabolic processes, dark purple needle-like formazan crystals appear, radiating from the cells in a few hours. Formazan crystals can be solubilized in isopropanol. The absorption of the solubilized crystals can be measured at 540 nm wavelength and it is proportional to the viable cell number in an exceptionally wide linear range.

Protocollo sperimentale

Preparazione degli estratti

Gli estratti sono stati preparati attenendosi alle linee guida ISO 10993-12. Come solvente polare è stata utilizzata una soluzione salina di NaCl allo 0.9%, come solvente apolare è stato utilizzato olio di sesamo. L'estrazione è stata condotta a 37°C per 72 ore sotto continua agitazione.

Pre-incubazione

I tessuti RHE sono stati lasciati in terreno di crescita per almeno 2 ore (37°C, 5% CO₂) prima del trattamento.

Trattamento

Su ciascun tessuto sono stati applicati 100 µl di estratti o dei controlli. I tessuti sono stati quindi incubati in condizioni standard per 18 ore. Ciascun esperimento è stato condotto in triplicato.

Lavaggi

I tessuti RHE sono stati ripetutamente lavati con D-PBS, allo scopo di eliminare ogni traccia delle sostanze utilizzate per i trattamenti

Saggio MTT

I tessuti RHE sono stati trattati con MTT (1 mg/ml) per 3 ore e quindi i cristalli di formazano sono stati estratti in isopropanolo per 2 ore. La lettura della densità ottica è stata effettuata a 540 nm

Experimental protocol

Preparation of the extracts

The extracts were prepared according to ISO 10993-12 guidelines. We used as polar vehicle a saline solution of 0.9% NaCl, while as non-polar vehicle we used sesam oil. The extraction was performed at 37°C for 72 hours with continuous shaking.

Pre-incubation

RHE tissues were left in growth medium for at least 2 hours (37 °C, 5% CO₂) before treatment

Treatment

Each RHE tissue was treated with 100 µl of the extracts or of the controls. The tissues were then incubated at standard conditions for 18 hours. Each experiment was conducted in triplicate.

Rinsing

RHE tissues were repeatedly rinsed in D-PBS in order to remove all traces of the substances used for the treatments

MTT assay

RHE tissues were treated with MTT (1 mg/ml) for 3 hours and then the formazan crystals were extracted in isopropanol for 2 hours. Optical density read at 540 nm.

RISULTATI / RESULTS

La vitalità relativa di ciascun tessuto è stata calcolata in base ai valori di densità ottica (OD) misurata secondo la seguente formula

The relative viability of each tissue was calculated on the basis of measured optical density (OD) values according to the following formula

$$\text{Vitalità / Viability \%} = [\text{OD}_x / \text{OD}_{NC}] \times 100$$

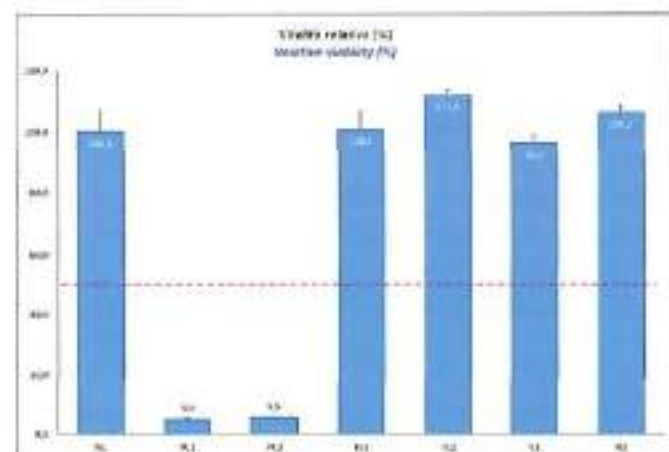
OD_x Densità ottica media dei tessuti trattati / Mean optical density of treated tissues

OD_{NC} Densità ottica media dei controlli negativi / Mean optical density of not treated tissues

Un estratto viene considerato potenzialmente irritante se la vitalità relativa dei tessuti è ≤ 50% di NC

The irritation potential is predicted if the relative viability of the tissues is ≤ 50% of NC

Trattamento <i>Treatment</i>	OD	Vitalità dei tessuti (%) <i>Tissue Viability (%)</i>
NC	1.329 ± 0.097	100.0 ± 7.32
PC1	0.065 ± 0.002	4.9 ± 0.18
PC2	0.073 ± 0.002	5.5 ± 0.15
TS1	1.338 ± 0.077	100.7 ± 5.77
TS2	1.486 ± 0.023	111.8 ± 1.70
V1	1.279 ± 0.036	96.2 ± 2.72
V2	1.412 ± 0.029	106.2 ± 2.17



I valori sono espressi come medie ± deviazione standard derivati dai risultati del trattamento di almeno 3 tessuti. NC = Controllo Negativo (SDS 1%); PC1 = Controllo Positivo (SDS 1%) in solvente polare; PC2 = Controllo Positivo (SDS 1%) in solvente apolare; TS1 = Estratto del campione in solvente polare; TS2 = Estratto del campione in solvente apolare; V1 = Solvente polare; V2 = Solvente apolare.

The values are expressed as means ± standard deviation deriving from the treatment of at least 3 tissues. NC = Negative control (SDS 1%); PC1 = Positive Control (SDS 1%) in polar vehicle; PC2 = Positive Control (SDS 1%) in non polar vehicle; TS1 = Extract of the sample in polar vehicle; TS2 = Extract of the sample in non polar vehicle; V1 = Polar vehicle; V2 = Non polar vehicle.

CONCLUSIONI

Il campione denominato

ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S

Non ha azione irritante per la cute

La vitalità relativa dei tessuti trattati con l'estratto in solvente polare è 100.7% del controllo negativo
La vitalità relativa dei tessuti trattati con l'estratto in solvente apolare è 111.8% del controllo negativo

CONCLUSIONS

The sample called

ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S

Is not skin irritant

The relative viability of the tissues treated with the extract in polar vehicle is 100.7% of negative control
The relative viability of the tissues treated with the extract in non-polar vehicle is 111.8% of negative control



Il presente Rapporto di Prova è firmato digitalmente ai sensi della normativa vigente
This test report is digitally signed according to current legislation

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

De Jong WH, Hoffmann S, Lee M, Kandarová H, Pellevoisin C, Haishima Y, Rollins B, Zdawczyk A, Willoughby J, Bachelor M, Schatz T, Skoog S, Parker S, Sawyer A, Pescio P, Fant K, Kim KM, Kwon JS, Gehrke H, Hofman-Hüther H, Meloni M, Julius C, Briotet D, Letasiova S, Kato R, Miyajima A, De La Fonteyne LJ, Videau C, Tornier C, Turley AP, Cristiano N, Rollins TS, Coleman KP. Round robin study to evaluate the reconstructed human epidermis (RHE) model as an in vitro skin irritation test for detection of irritant activity in medical device extracts. *Toxicol In Vitro*. 2018 Aug;50:439-449

Kandarova H, Willoughby JA, De Jong WH, Letasiova S, Milasova T, Bachelor MA, Breyfogle B, Henda Y, De la Fonteyne L, Coleman KP. Pre-validation of an in vitro skin irritation test for medical devices using the reconstructed human tissue model EpiDerm™. *Toxicol In Vitro*. 2018 Aug;50:407-417.

Kandarová H. Dissertation: Evaluation and validation of reconstructed human skin models as alternatives to animal tests in regulatory toxicology. Free University of Berlin, 2006

Kandarová H, Liebsch M, Spielmann H, Genshow E, Schmidt E, Traue D, Guest R, Whittingham A, Warren N, Gamer AO, Remmele M, Kaufmann T, Wittmer E, De Wever B, Rosdy M. Assessment of the human epidermis model SkinEthic RHE for in vitro skin corrosion testing of chemical according to new OECD TG431. *Toxicology In Vitro*. 2006; 20: 547-59

ISO (2009) ISO/TC 194 10993-5 - Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO (2010) ISO/TC 194 10993-10 - Biological evaluation of medical devices – Part 10: Tests for irritation and skin sensitization. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

ISO (2012) ISO/TC 194 10993-12 - Biological evaluation of medical devices – Part 12: Sample preparation and reference materials. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Kandarová H., Hayden, P., Klausner, M., Kubilus, J., Kearney, P. and Sheasgreen, J. (2009): In Vitro Skin Irritation Test: Improving the Sensitivity of the EpiDerm Skin Irritation Test Protocol. *ATLA* 37 (6), pp. 671 – 669.

Kandarová H., Willoughby, J.A., de Jong, W.H., Bachelor, M., Letasiova, S., Milasová, T., Breyfogle, B., de la Fonteyne, L., Coleman, K.P. (2015). Development, Optimization, and Standardization of an In Vitro Skin Irritation Test for Medical Devices Using the Reconstructed Human Tissue Model EpiDerm. *The Toxicologist*, Supplement to Toxicological Sciences 144, Abstract 2017, 2015.

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunological Methods* 65, 55-62.

OECD (2015): OECD guideline for the testing of chemicals No 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.



DEF
Bio Basic Europe
Via G. Galvani, 10 - 20135 Milano
Tel. +39 02 57491111 - Fax +39 02 57491112
www.def.it

Bio Basic Europe
Via G. Galvani, 10 - 20135 Milano
Tel. +39 02 57491111 - Fax +39 02 57491112
www.bio-basic.com

Bio Basic Europe
Via G. Galvani, 10 - 20135 Milano
Tel. +39 02 57491111 - Fax +39 02 57491112
www.bio-basic.com

**Valutazione *in vitro* del potenziale pro-sensibilizzante
di un dispositivo medico**

Linee Guida OECD 442E

*In vitro analysis of the pro-sensitising potential
of a medical device*

OECD Test Guideline 442E

CLARION LIVING SRL

ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S

Protocollo n° / *Report no.* 2018I11V2-1

Comitato Tecnico Scientifico <i>Scientific Technical Committee</i> Bio Basic Europe S.r.l. Claudio ANGELINETTA, Ornella PASTORIS, Umberto PIANCA Eliana REGOLA, Riccardo VICINI	INDICE INDEX
Responsabile Scientifico – Monitor e Controllo Qualità <i>Scientific Person in Charge and Quality Control</i> Dr. Claudio ANGELINETTA Laurea in Chimica (Università degli Studi di Milano); Specializzato in Scienza e Tecnologia Cosmetiche (Università degli Studi di Milano); Direttore Tecnico BIO BASIC EUROPE S.r.l.	Riassunto <i>Abstract</i> pag. 3
Responsabile della Progettazione Bio Basic Lab <i>Project Responsible Bio Basic Lab</i> Dr.ssa Eliana REGOLA Laurea in Scienze Biologiche (Università degli Studi di Genova); Dottorato di Ricerca in Medicina e Biologia Sperimentale - indirizzo Biochimica (Università degli Studi di Genova); Specializzata in Microbiologia e Virologia - indirizzo Tecnico (Università degli Studi di Genova)	Introduzione <i>Introduction</i> pag. 4
Responsabile Laboratorio Test in vitro Bio Basic Europe e Responsabile della Relazione <i>In vitro Tests Responsible Bio Basic Europe and Person responsible for the report</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia)	Scopo <i>Aim</i> pag. 6
Sperimentatore Bio Basic Lab <i>Bio Basic Lab Experimenter</i> Dr. Riccardo VICINI Laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche (Università degli Studi di Pavia); Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche - indirizzo Farmacologia (Università degli Studi di Pavia)	Materiali e metodi <i>Materials and methods</i> pag. 7
	Risultati <i>Results</i> pag. 10
	Conclusioni <i>Conclusions</i> pag. 12
	Bibliografia <i>References</i> pag. 13

Tutti i diritti sono riservati. Trattasi di documento tecnico scientifico protetto da Copyright.
Nessuna parte di esso può essere riprodotta in alcun modo senza la preventiva autorizzazione scritta di Bio Basic Europe S.r.l.
In base alla nostra esperienza si consiglia di verificare ogni 3 anni l'armonizzazione con eventuali aggiornamenti normativi.

*All rights are reserved, being it a scientific and technical document protected by Copyright.
No part of this document may be reproduced in any form without the prior written authorization of Bio Basic Europe S.r.l.
Based on our experience, we suggest to check every 3 years its compliance with the guidelines in force.*

RIASSUNTO

Il test pro-sensibilizzante è stato eseguito su colture di monociti trattati con una concentrazione del prodotto da testare di cui è stata precedentemente dimostrata la totale assenza di citotossicità. Come controllo positivo è stato utilizzato il 2,4-dinitroclorobenzene (DNCB), una sostanza dalla nota azione sensibilizzante, mentre il controllo negativo è rappresentato da cellule non trattate e mantenute in terreno di coltura. Si è valutata la variazione di espressione di due marker di membrana, CD86 e CD54: un aumento significativo dell'espressione di queste molecole nelle cellule indica l'attivazione di una risposta immunitaria e quindi la potenziale azione sensibilizzante della sostanza in esame.

I risultati ottenuti hanno mostrato che nelle cellule trattate con il campione testato **l'espressione di CD86 e CD54 non varia significativamente rispetto alle cellule non trattate**. La mancanza di co-espressione dei due marker indica che **il prodotto testato non ha attività pro-sensibilizzante**.

ABSTRACT

The pro-sensitising test was performed on cultures of monocytes treated with non cytotoxic concentration of the tested product. As positive control we used 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB), a well known sensitizing substance, while the negative control is represented by untreated cells maintained in culture medium. We evaluated the variation in the expression of two membrane marker, CD86 and CD54: a significant increase in the expression of these molecules on cells surface is indicative of the activation of an immune response and therefore the potential sensitizing action of the test substance.

In the cells treated with the tested sample we didn't observe a significant change in the expression of CD86 and CD54 compared to not treated cells. The lack of co-expression of the two markers means that the tested product has no pro-sensitising activity.

INTRODUZIONE

La sensibilizzazione cutanea rappresenta l'endpoint tossicologico associato all'impiego di sostanze chimiche che hanno la capacità intrinseca di causare nell'uomo allergie cutanee che possono sfociare in una patologia chiamata Dermatite Allergica da contatto (ACD), una risposta immunitaria cellulo-mediata di ipersensibilità di tipo ritardato innescata da prodotti chimici a basso peso molecolare chiamati apteni. La determinazione del potenziale sensibilizzante cutaneo è un elemento fondamentale nella valutazione della sicurezza di sostanze chimiche, soprattutto quelle utilizzate nei prodotti destinati ai consumatori (come cosmetici e detersivi) e nell'Unione Europea rappresenta un'informazione standard richiesta dalla legge sui prodotti chimici. Tradizionalmente, la valutazione del rischio associato alla sensibilizzazione cutanea prevedeva l'utilizzo di animali da laboratorio. Oggi però nell'Unione Europea è vietato testare sugli animali prodotti cosmetici o ingredienti in essi contenuti al fine di valutarne la sicurezza. Inoltre è vietato commercializzare prodotti cosmetici testati su animali. A causa di queste nuove leggi e della sempre maggiore sensibilità dell'opinione pubblica circa il benessere degli animali, l'industria cosmetica ha sviluppato test alternativi alla sperimentazione animale per valutare l'efficacia e la tossicità degli ingredienti dei cosmetici e di altri prodotti.

Gli eventi biologici alla base dei processi di sensibilizzazione cutanea sono ben noti: l'attivazione delle cellule dendritiche (CD), con la caratteristica espressione di markers di membrana ed il rilascio di chemochine e citochine, è considerato in questo contesto un evento chiave. Le cellule dendritiche sono in grado di riconoscere e di internalizzare gli antigeni, come le proteine legate agli apteni, di trasportarli lungo il sistema linfatico fino a raggiungere i linfonodi e di presentarli attraverso le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) ai linfociti T naive per indurre il loro differenziamento e successiva proliferazione in cellule T della memoria. A livello dei linfonodi, le cellule dendritiche vanno incontro a un processo di maturazione caratterizzato da un cambiamento fenotipico e funzionale: perdono la capacità di processare gli antigeni ma acquisiscono quella di presentare l'antigene. Questo processo di maturazione prevede anche la diminuzione dell'attività fagocitaria, l'aumento dell'espressione delle molecole MHC sulla superficie cellulare, un cambiamento nella secrezione di citochine e chemochine, un aumento nell'espressione di diverse molecole stimolatorie (ad esempio CD80, CD86 e CD40) e di molecole che mediano l'adesione intercellulare (come CD54).

Nel test pro-sensibilizzante proposto, viene misurata la variazione nell'espressione dei marcatori di superficie CD86 e CD54 nelle cellule THP-1, una linea di cellule di leucemia monocitica umana utilizzata come modello di cellule dendritiche. Tale espressione viene misurata mediante citofluorimetria di flusso dopo 24 ore di esposizione delle cellule al campione da testare. Una variazione significativa nell'espressione dei due marcatori rispetto alle cellule non trattate indica che il campione testato possiede un potenziale pro-sensibilizzante.

INTRODUCTION

Skin sensitisation is the toxicological endpoint associated with chemicals that have the intrinsic ability to cause skin allergy in humans, resulting in a disease called Allergic Contact Dermatitis (ACD), a cell-mediated delayed-type hypersensitivity immune response induced by low-molecular-weight chemical compounds called haptens. The assessment of the skin sensitisation potential represents an important component in the safety evaluation of substances, especially those used in consumer products - e.g. cosmetics and detergents and represents a standard information requirement of legislation on chemicals in the EU. Traditionally, skin sensitisation hazard assessment has involved the use of laboratory animals. Within the European Union there is a prohibition of testing of cosmetic ingredients for the purposes of safety evaluation and the marketing of cosmetic products tested on animals is prohibited. Because of this regulation, and of the increasing social concern about animal welfare, the cosmetic industry has been developing alternatives to animal experimentation to test the efficacy or toxicity of cosmetic ingredients and other products.

The key biological events underlying the skin sensitisation process are well established: the activation of dendritic cells (DC), typically assessed by expression of cell surface markers, chemokines and cytokines, is considered to be a key event. DC can recognise and internalise antigens such as haptenated proteins, transport them via the lymphatic system to the regional lymph nodes and present them via major histocompatibility complex (MHC) molecules to naïve T lymphocytes to induce differentiation and proliferation of specific memory T-cells. In the lymph nodes, DC undergo a process of maturation characterised by phenotypic and functional changes resulting in the loss of their capability to process antigens and in the acquisition of the functionality of antigen presentation. The maturation process involves the decrease of phagocytic activity, increased expression of MHC molecules on the cell surface, changes in cytokines and chemokines secretion and up-regulation of several co-stimulatory (e.g. CD80, CD86, CD40) and intercellular adhesion molecules (e.g. CD54).

In the pro-sensitising test here proposed, the modulation of the CD86 and CD54 membrane markers in THP-1 cells, a human monocytic leukemia cell line used as a surrogate model for DC, is measured by flow cytometry following 24 hours of exposure to test sample. Significant variations in co-expression of these two markers with respect to not treated cells means that the tested sample has a pro-sensitising potential.

SCOPO

Lo scopo del test è quello di valutare l'assenza di effetti pro-sensibilizzanti da parte di un dispositivo medico. Il test è stato eseguito secondo le linee guida OECD 442E.

AIM

*The aim of the test is to evaluate if the tested medical device does not cause pro-sensitising effects.
The test has been performed according to OECD Test Guidelines 442E.*

MATERIALI E METODI

MATERIALS AND METHODS

Colture cellulari

Il test è stato condotto su monociti umani THP-1, utilizzati come modello di cellule dendritiche. È noto che le cellule THP-1 mostrano un aumento dell'espressione dei marcatori CD86 e/o CD54 quando trattate con prodotti sensibilizzanti. Le cellule THP-1 sono state coltivate in terreno RPMI-1640 supplementato con 10% di siero fetale bovino, 0.05 mM di 2-mercaptoetanol e 1% di antibiotici e incubate in condizioni di coltura standard (37°C, 5% CO₂). Sono state applicate le buone pratiche per la coltivazione di cellule.

Cell line and culture conditions

The test was carried out on human monocytes THP-1, used as surrogates for dendritic cells. It is known that THP-1 cells show enhanced CD86 and/or CD54 expression when treated with sensitizers. THP-1 cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with fetal bovine serum (10%), 2-mercaptoethanol (0.05 mM) and antibiotics (1%). Cells were incubated at standard culture conditions (37°C, 5% CO₂). Good cell culture practices were used.

Campione testato / *Tested sample*

ClarionMask 2 CLG M 1188/15/CLG-32 taglia s

Concentrazione testata / *Tested concentration*

Liquido di estrazione 50% e successive diluizioni 1:2

Extraction fluid 50% and subsequent 1:2 dilutions

Preparazione dei campioni

Il prodotto da testare è stato incubato overnight in terreno di coltura completo; le cellule sono state trattate con il mezzo di macerazione così ottenuto (filtrato con filtri da 0,22 µm) e le successive diluizioni 1:2. Come controllo positivo è stato usato il 2,4-dinitroclorobenzene (DNCB) alla concentrazione di 4 µg/ml.

Samples preparation

The tested product was incubated overnight in complete culture; the cells were treated with the liquid of maceration (filtered through a 0.22 µm) obtained in this way and subsequent dilutions 1:2. As positive control we used 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) at the concentration of 4 µg/ml.

Determinazione preliminare della vitalità cellulare

Il prodotto è stato sottoposto ad uno screening preliminare di citotossicità condotto sulle cellule THP-1 per scegliere la concentrazione non citotossica da utilizzare nel test pro-sensibilizzante. La vitalità cellulare è stata valutata attraverso il test MTS. Il composto tetrazolico MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] viene ridotto dalle cellule in formazano colorato solubile nel terreno di coltura. Questa conversione è causata dal NADPH o dal NADH prodotto dalle deidrogenasi presenti nelle cellule metabolicamente attive. Questi test sono stati condotti dopo un periodo di trattamento di 24 ore aggiungendo una piccola quantità di soluzione MTS direttamente nei pozzetti con le cellule. Al termine del periodo di incubazione (1-4 ore) è stata letta l'assorbanza (densità ottica, OD) a 450 nm utilizzando un lettore di piastre da 96 pozzetti. La quantità di formazano prodotta è direttamente proporzionale al numero di cellule vive presenti in coltura.

Preliminary determination of cell viability

The product underwent a preliminary cytotoxicity screening on the THP-1 cells in order to choose a non-cytotoxic concentration to use in the pro-sensitising assay. The cell viability was evaluated through a MTS test. The MTS tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt] is bioreduced by cells into a colored formazan product that is soluble in tissue culture medium. This conversion is presumably accomplished by NADPH or NADH produced by dehydrogenase enzymes in metabolically active cells. The assay was performed after a 24 hours-treatment period by adding a small amount of the MTS solution directly to culture wells, incubating for 1-4 hours and then recording the absorbance (optical density, OD) at 450 nm with a 96-well plate reader. The quantity of formazan product as measured by absorbance at 450 nm is directly proportional to the number of living cells in culture.

Valutazione del potenziale pro-sensibilizzante

Un adeguato numero di cellule THP-1 è stato pre-cultivato per 48 ore, seminato in piastre da 24 pozzetti e trattato per 24 ore con il campione da testare e con il controllo positivo. Cellule non trattate e mantenute in terreno di coltura rappresentano i controlli negativi. Trascorse le 24 ore di esposizione, le cellule sono state trasferite in provette e centrifugate. Il surnatante è stato eliminato e le cellule lavate due volte con 600 µl di buffer FACS (PBS contenente BSA allo 0.1%). Le cellule sono state quindi divise in due aliquote, centrifugate, risospese nella soluzione bloccante (buffer FACS contenente globuline allo 0.01%) ed incubate per 15 minuti a 4°C. Dopo un'ulteriore centrifugazione, le cellule sono state incubate con gli anticorpi coniugati FITC anti-CD86 o anti-CD54 per 30 minuti a 4°C. I livelli di espressione di CD86 e CD54 sono stati analizzati mediante citofluorimetria di flusso.

Evaluation of the pro-sensitising potential

A suitable number of THP-1 cells was pre-cultured for 48 hours, seeded into a 24 well flat-bottom plate and treated for 24 hours with test sample and with the positive control. Not treated cells maintained in culture medium are negative controls. After 24 hours of exposure, cells were transferred into sample tubes and collected by centrifugation, supernatants were discarded and the remaining cells were washed twice with 600 µl of FACS buffer (PBS containing 0.1% BSA). Cells were split in two aliquots, centrifugated and resuspended in blocking solution (FACS buffer containing 0.01% globulin) and incubated at 4°C for 15 min. After centrifugation, cells were stained with FITC-labelled anti-CD86 or anti-CD54 at 4°C for 30 min. The expression levels of CD86 and CD54 were analysed using flow cytometry.

RISULTATI

RESULTS

Interpretazione dei risultati e modello previsionale

L'espressione di CD86 e CD54 è stata analizzata con citometria a flusso. Sulla base dell'intensità media di fluorescenza (MFI), sono stati calcolati i valori di intensità relativa di fluorescenza (RFI) di CD86 e CD54 per le cellule del controllo positivo e per le cellule trattate chimicamente secondo la seguente equazione:

$$RFI = \frac{MFI \text{ cellule trattate} - MFI \text{ cellule trattate marcate con IgG1}}{MFI \text{ cellule di controllo} - MFI \text{ cellule di controllo trattate con IgG1}} \cdot 100$$

Per la misura dell'espressione di CD86/CD54, ogni sostanza viene testata in almeno due prove indipendenti per derivare una singola previsione (POSITIVA o NEGATIVA). La previsione è considerata POSITIVA se almeno una delle seguenti condizioni è soddisfatta in 2 di 2 o in almeno 2 di 3 prove indipendenti, altrimenti la previsione è considerata NEGATIVA:

- RFI di CD86 è uguale o superiore al 150% a qualsiasi concentrazione testata (con vitalità cellulare \geq 50%);
- RFI di CD54 è uguale o superiore al 200% a qualsiasi concentrazione testata (con vitalità cellulare \geq 50%)

Interpretation of results and prediction model

The expression of CD86 and CD54 is analysed with flow cytometry. Based on the geometric mean fluorescence intensity (MFI), the relative fluorescence intensity (RFI) of CD86 and CD54 for positive control (CTRL) cells and chemical-treated cells are calculated according to the following equation:

$$RFI = \frac{MFI \text{ of chemical-treated cells} - MFI \text{ of chemical-treated IgG1 cells}}{MFI \text{ of CTRL cells} - MFI \text{ of treated IgG1 CTRL cells}} \cdot 100$$

For CD86/CD54 expression measurement, each test chemical is tested in at least two independent runs to derive a single prediction (POSITIVE or NEGATIVE). The prediction is considered POSITIVE if at least one of the following conditions is met in 2 of 2 or in at least 2 of 3 independent runs, otherwise the prediction is considered NEGATIVE:

- *The RFI of CD86 is equal to or greater than 150% at any tested concentration (with cell viability \geq 50%);*
- *The RFI of CD54 is equal to or greater than 200% at any tested concentration (with cell viability \geq 50%).*

Analisi dell'espressione di CD86 e CD54

Evaluation of CD86 and CD54 expression

In tabella sono riportati i valori di RFI calcolati per il controllo positivo (DNCB) e le 8 concentrazioni testate del prodotto in esame

The table shows the values for positive control (DNCB) and the 8 concentrations of the tested product

	DNCB	Concentrazione del campione / Sample concentration (%)							
		50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,7813	0,3906
CD86	152,16	111,64	107,33	112,50	103,02	105,60	106,47	101,72	106,03
CD54	204,76	107,14	109,52	111,90	107,94	109,52	112,70	115,87	118,25

I valori di RFI calcolati non superano i limiti previsti dal modello previsionale. Non si osserva quindi co-espressione di CD86/CD54

The calculated RFI values don't exceed the limits of the prediction model. We didn't observe co-expression of CD86/CD54

CONCLUSIONI

Il campione denominato
ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S
non mostra attività pro-sensibilizzante

CONCLUSIONS

The sample called
ClarionMask 2 CLG M 1188/1S/clg-32 – taglia S
has proved not to have pro-sensitising potential



Il presente Rapporto di Prova è firmato digitalmente ai sensi della normativa vigente.
This test report is digitally signed according to current legislation

BIBLIOGRAFIA / REFERENCES

- Ainscough JS, Frank Gerberick G, Dearman RJ, Kimber I. Danger, intracellular signaling, and the orchestration of dendritic cell function in skin sensitization. *J Immunotoxicol* 2013; 10: 223-34
- An S, Kim S, Huh Y, Lee TR, Kim HK, Park KL, Eun HC. Expression of surface markers on the human monocytic leukaemia cell line, THP-1, as indicators for the sensitizing potential of chemicals. *Contact Dermatitis* 2009; 60(4): 185-92
- Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines: the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). I. Optimization of the h-CLAT protocol. *Toxicol In Vitro* 2006; 20(5): 767-73
- Berridge MV, Tan AS. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys* 1983; 303, 474-82
- Cory AH, Owen TC, Bartrop JA, Cory JG. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 1991; 3, 207-12
- Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol* 2012; 13: 114-24
- Kimber I, Basketter DA, Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ. Chemical allergy: translating biology into hazard characterization. *Toxicol Sci* 2011; 1: 238-68
- Quah BJ, O'Neill HC. Maturation of function in dendritic cells for tolerance and immunity. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 643-54
- Riss TL, Moravec RA. Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol Biol Cell* 1992 (Suppl.) 3, 184a
- Sakaguchi H, Ashikaga T, Miyazawa M, Kosaka N, Ito Y, Yoneyama K, Sono S, Itagaki H, Toyoda H, Suzuki H. The relationship between CD86/CD54 expression and THP-1 cell viability in an in vitro skin sensitization test--human cell line activation test (h-CLAT). *Cell Biol Toxicol.* 2009; 25(2): 109-26
- Sakaguchi H, Ashikaga T, Miyazawa M, Yoshida Y, Ito Y, Yoneyama K, Hirota M, Itagaki H, Toyoda H, Suzuki H. Development of an in vitro skin sensitization test using human cell lines; human Cell Line Activation Test (h-CLAT). II. An inter-laboratory study of the h-CLAT. *Toxicol In Vitro* 2006; 20(5): 774-84
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; 26: 171-176
- Van Helden SF, van Leeuwen FN, Figdor CG. Human and murine model cell lines for dendritic cell biology evaluated. *Immunol Lett* 2008; 117: 191-197
- Vicini R, Mazzini G, Angolinotta C, Pintacuda V, Pastoris O. Forward scatter as a sensitive parameter to perform routine analysis of potential sensitizing compounds. XXXIII Conferenza Nazionale di Citometria, Lucca 22-25/09/2015
- Vocanson M, Hennino A, Rozières A, Poyet G, Nicolas JF. Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis. *Allergy* 2009; 64: 1699-714