

Prof. Dott. MASSIMO GOLA
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZEPROFESSORE A CONTRATTO DI DERMATOLOGIA ALLERGOLOGICA
SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN DERMATOLOGIA E VENEREOLOGIA
DIRETTORE S.A.S DI DERMATOLOGIA ALLERGOLOGICA E PEDIATRICA
CLINICA DERMATOLOGICA
DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA E MEDICINA TRASLAZIONALE
AZIENDA USL TOSCANA CENTRO**VALUTAZIONE DERMATOLOGICA****PATCH TEST****PER LO STUDIO DI TOLLERABILITÀ CUTANEA DI UN COSMETICO
SU VOLONTARI SANI CON PELLE SENSIBILE**

Customer ID	0029918	Messrs /Spett.le
Codice intestatario		D-LIZE SRL
		CALLE MERLATO, 4
		34073 GRADO (GO)
		IT

Sample information
Dati campione

Acceptance number	20.503439.0002
Numero di accettazione	
Delivered by	SDA Express Courier il 04/02/2020 / SDA Express Courier on 04/02/2020
Consegnato da	
Place of origin	D-LIZE SRL CALLE MERLATO, 4 34073 GRADO (GO) IT
Proveniente da	
Sample Description	BLUE SOAP RIF. B9.846
Descrizione campione	

Sampling information
Dati campionamento

Sampled by	Cliente / Customer
Campionato da	

ANALYTICAL RESULTS
RISULTATI ANALITICI SINGLE APPLICATION OCCLUSIVE PATCH EPICUTANEOUS TEST
TEST EPICUTANEO OCCLUSIVO - APPLICAZIONE SINGOLA

SAFETY CONFIRMATORY TEST	Value / Valore	Measure / Misura	Unit / Unità di	TEST METHOD / METODO DI PROVA
SINGLE APPLICATION OCCLUSIVE PATCH EPICUTANEOUS TEST				MP 1299 rev 4 2019
The test was performed by using the product: <i>Il test è stato eseguito utilizzando il prodotto:</i>	DILUTED 1:10			
		<i>DILUITO 1:10</i>		
Duration of treatment: <i>Durata del trattamento:</i>	24		Hours / Ore	
Time of assessment / tempo di valutazione:			Mean Index of Irritation / <i>Indice Medio di Irritazione</i>	
○ 30 minutes after patch removal (24 hours after product application) / dopo 30 minuti dalla rimozione del patch (dopo 24 ore dall'applicazione del prodotto)	0,00			
○ 24 hours after patch removal (48 hours after product application) / dopo 24 ore dalla rimozione del patch (dopo 48 ore dall'applicazione del prodotto)	0,00			

1. INDEX / INDICE

1. INDEX / INDICE.....	2
2. METHOD DESCRIPTION / DESCRIZIONE DEL METODO	3
2.1. AIM OF THE TEST / SCOPO DEL TEST	3
2.2. STUDY INVESTIGATORS / RICERCATORI	3
2.3. VOLUNTEERS / VOLONTARI.....	3
2.4. SAMPLES AND ENVIROMENT CONDITIONS/ CAMPIONI DI PROVA E CONDIZIONI AMBIENTALI .	4
3. PRINCIPLES OF MEASURE / PRINCIPI DI MISURA.....	5
3.1. EVALUATION PARAMETERS / PARAMETRI DI VALUTAZIONE	5
3.2. PRODUCT CLASSIFICATION / CLASSIFICAZIONE DEL PRODOTTO	6
4. DERMATOLOGICAL EVALUATIONS RESULTS / RISULTATI VALUTAZIONI DERMATOLOGICHE	7
4.1. TABLE DATA / TAVOLA DI SINTESI DEI RISULTATI	7
5. CONCLUSIONS / CONCLUSIONI DELLO STUDIO	8
6. REFERENCES/ BIBLIOGRAFIA.....	9

2. METHOD DESCRIPTION / DESCRIZIONE DEL METODO**2.1. AIM OF THE TEST / SCOPO DEL TEST**

The **human occlusive patch test** is a standardised application of cosmetic products applied in single dose on the intact skin which exaggerate exposure compared to actual use.

The objective is to assess the compatibility of the product with the human skin, defined as absence of skin irritation after the first application but not to define the intrinsic irritating potential of the material to be tested.

Il Patch test occlusivo è una applicazione standardizzata di un prodotto cosmetico applicato in dose singola sulla cute umana intatta, che esagera l'esposizione rispetto all'uso reale.

L'obiettivo è quello di valutare la compatibilità cutanea definita come assenza di irritazione in seguito alla prima applicazione del prodotto, non quello di definire il potenziale intrinseco di irritazione del prodotto sottoposto a test.

2.2. STUDY INVESTIGATORS / RICERCATORI

The application of the product is made by technically qualified and trained persons. Skin evaluations are made by a dermatologist-allergist.

L'applicazione del prodotto viene eseguita da personale tecnicamente qualificato ed addestrato. Le valutazioni cutanee vengono effettuate da un medico dermatologo-allergologo.

2.3. VOLUNTEERS / VOLONTARI

The test is run on 20 healthy volunteers of both sexes with sensitive skin, selected after application of inclusion/non-inclusion criteria. Subjects excluded are:

- Children and persons below the age of consent;
- Pregnant or lactating women;
- Subjects affected by dermatitis;
- Subjects with history of allergic skin reaction;
- Subjects under anti-inflammatory drug therapy (either steroidal or non-steroidal);
- Subjects who participated in analogue tests in the last two months;

Before the test starts, all participants are made aware of the purpose and nature of the study and of any foreseeable risks involved in participation in the study and give written informed consent to the experimentation.

A form registering the date and the product(s) tested is completed for each volunteer.

Il test viene condotto su 20 volontari adulti ambo sessi con pelle sensibile, selezionati dopo l'applicazione dei criteri di inclusione/non-inclusione.

Vengono esclusi dal test:

- *Bambini e minorenni,*
- *Donne in stato di gravidanza o in fase di allattamento;*
- *Portatori di dermatiti;*
- *Soggetti con anamnesi positiva per reazioni cutanee di tipo allergico;*
- *Soggetti in trattamento con antinfiammatori steroidei o non steroidei;*
- *Soggetti che abbiano partecipato a prove analoghe nei due mesi precedenti;*

CHELAB S.R.L.

Prima dell'inizio del test ai partecipanti viene reso noto, tramite scheda informativa, lo scopo e la natura dello studio e i possibili rischi derivanti dalla partecipazione allo studio.

Ai partecipanti viene altresì richiesto di firmare un consenso informato scritto alla sperimentazione.

Per ciascun volontario viene compilata una scheda che registra la data del test e i prodotti testati.

2.4. SAMPLES AND ENVIROMENT CONDITIONS/ CAMPIONI DI PROVA E CONDIZIONI AMBIENTALI

The test is performed in an air-conditioned room, with the room temperature maintained at 23 ± 2 °C.

Il test viene svolto in ambiente condizionato dove la temperatura viene mantenuta a 23 ± 2 °C.

The sample is posed into absorbent test disk of Curatest F (Lohmann Rauscher) with 8 mm inner diameter provides a 50 mm² area and about 20 microlitre volume, and then applied to the skin of the back.

The application procedure for the sample in analysis has been defined by the referrer dermatologist.

Below are some of the possible ways to apply the samples:

- Detergents and rinse off product are water diluted (1:10) and then left to absorb to the disk.
- Aqueous samples are left to absorb to the disk.
- Creams and lotions are directly applied AS IT IS into the disk using an insulin syringe.

The product is left in contact with the skin surface for 24 hours.

Il campione viene deposto negli appositi dischetti dei cerotti Curatest F (Lohmann Rauscher), aventi un diametro di 8 mm, area di 50 mm², ed un volume di circa 20 microlitri. Il cerotto viene, quindi, applicato sulla schiena del volontario.

Le modalità di applicazione, per i campioni in analisi, vengono indicate dal dermatologo referente.

Di seguito, si riportano, alcune tra le possibili modalità di applicazione dei campioni:

- *Detergenti e prodotti da risciacquo vengono diluiti in acqua (1:10) e quindi fatti assorbire sul dischetto.*
- *Campioni liquidi vengono fatti assorbire direttamente sul dischetto.*
- *Creme e lozioni sono applicate direttamente sul dischetto con una siringa monouso da insulina*

Il prodotto viene lasciato in situ per 24 ore.

3. PRINCIPLES OF MEASURE / PRINCIPI DI MISURA
3.1. EVALUATION PARAMETERS / PARAMETRI DI VALUTAZIONE

The visual assessment of skin irritation is made 30 minutes and 24 hours after removal of the patch (24 and 48 hours after product application), according to the following scoring scale:

La valutazione delle reazioni viene fatta 30 minuti e 24 ore dopo la rimozione del cerotto (24 e 48 ore dopo l'applicazione del prodotto), seguendo la seguente scala di valutazione:

TAB. 1: evaluation parameters and grading of skin reactions / parametri di valutazione e score clinico		
<i>evaluation parameters / parametri di valutazione</i>	<i>Grading of skin reactions / score clinico</i>	
ERYTHEMA / ERITEMA	no evidence of erythema / <i>nessuna evidenza di eritema</i>	0
	minimal or doubtful erythema / <i>eritema minimo o incerto</i>	0.5
	slight redness, spotty and diffuse / <i>leggero rossore a macchie e diffuso</i>	1
	moderate, uniform redness / <i>rossore moderato, uniforme</i>	2
	strong uniform redness / <i>forte rossore uniforme</i>	3
	Fiery redness / <i>rossore bruciante</i>	4
EDEMA	no edema / <i>assente</i>	0
	light edema (hardly visible) / <i>leggero (appena visibile)</i>	1
	light edema (clearly visibile) / <i>leggero (ben visibile)</i>	2
	moderate edema / <i>moderato</i>	3
	strong edema (extended beyond the application area) / <i>grave (esteso oltre l'area di applicazione)</i>	4

The sum of erythema and edema score is defined "irritation index". Irritation index value at 30 minutes and 24 hours after patch removal (24 and 48 hours after product application) are recorded on the volunteer's form.

Si definisce "indice di irritazione" la somma del punteggio di valutazione dell'eritema con quella dell'edema. I valori di indice di irritazione a 30 minuti e a 24 ore dalla rimozione del patch (24 e 48 ore dall'applicazione del prodotto) sono riportati nella scheda relativa al volontario.

CHELAB S.R.L.**3.2. PRODUCT CLASSIFICATION / CLASSIFICAZIONE DEL PRODOTTO**

The average irritation index of the 20 tests is calculated. The product is then classified according to the following table:

Si esegue la media matematica degli indici di irritazione ottenuti nei 20 volontari. Il prodotto viene, quindi, classificato secondo la seguente tabella:

TAB. 2: Product classification / Classificazione del prodotto	
<i>average irritation index / indice medio di irritazione</i>	<i>class / classe</i>
<i>average irritation index < 0.5</i>	<i>not irritating / non irritante</i>
<i>0.5 ≤ average irritation index ≤ 1.0</i>	<i>slightly irritating / leggermente irritante</i>
<i>1.0 < average irritation index < 3.0</i>	<i>moderately irritating / moderatamente irritante</i>
<i>average irritation index ≥ 3</i>	<i>highly irritating / fortemente irritante</i>

4. DERMATOLOGICAL EVALUATIONS RESULTS / RISULTATI VALUTAZIONI DERMATOLOGICHE
4.1. TABLE DATA / TAVOLA DI SINTESI DEI RISULTATI
TAB. 3: Table data / Tavola di sintesi dei risultati

n°	Age	Sex	ERITHEMA		EDEMA		Adverse sensation noted by participants
			30' after patch removal	24h after patch removal	30' after patch removal	24h after patch removal	
			24h after product application	48h after product application	24h after product application	48h after product application	
1	50	F	0	0	0	0	
2	21	F	0	0	0	0	
3	18	M	0	0	0	0	
4	47	F	0	0	0	0	
5	44	F	0	0	0	0	
6	50	F	0	0	0	0	
7	40	F	0	0	0	0	
8	39	M	0	0	0	0	
9	52	F	0	0	0	0	
10	21	F	0	0	0	0	
11	52	F	0	0	0	0	
12	53	F	0	0	0	0	
13	50	F	0	0	0	0	
14	53	F	0	0	0	0	
15	60	F	0	0	0	0	
16	38	M	0	0	0	0	
17	60	M	0	0	0	0	
18	21	F	0	0	0	0	
19	19	F	0	0	0	0	
20	50	F	0	0	0	0	

5. CONCLUSIONS / CONCLUSIONI DELLO STUDIO

The tested product, applied DILUTED 1:10 under occlusive condition on the healthy skin of 20 volunteers, resulted in a mean index of irritation of :

0,00: 30 minutes after patch removal (24 hours after product application)

0,00: 24 hours after patch removal (48 hours after product application)

Il prodotto in esame, applicato DILUITO 1:10 in condizioni occlusive alla cute sana di 20 volontari, ha ottenuto un indice medio di irritazione pari a

0,00: dopo 30 minuti dalla rimozione del patch (24 ore dopo l'applicazione del prodotto)

0,00: dopo 24 ore dalla rimozione del patch (48 ore dopo l'applicazione del prodotto)

According to the evaluation scale used (Tab. 2) the product

BLUE SOAP RIF. B9.846

can be classified as

NOT IRRITATING

(if applied to intact human skin)

In base alla scala utilizzata (Tab. 2), il prodotto

BLUE SOAP RIF. B9.846

può essere classificato come

NON IRRITANTE

(se applicato su cute umana intatta)

CHELAB S.R.L.

6. REFERENCES/ BIBLIOGRAFIA

- World Medical Doctors Association (1997): Declaration of Helsinki (ALL Revisions).
- Colipa guidelines: Cosmetic product test guidelines for the assessment of human skin compatibility.
- "Notes of guidance for testing of cosmetic ingredients for their safety evaluation", SCCNFP/0321/00 Final.
- SCCS "Memorandum on use of Human Data in risk assessment of skin sensitization", SCCS/1567/15, 15 December 2015.
- Linee Guida SIDAPA su Dermatite da Contatto, annali italiani di dermatologia allergologica 63, (2), 2009

Unità operativa

Via Marradi 41 Prato PO

Study responsible
Dott. Massimo Gola Specialista in Dermatologia e Venereologia Allergologia e Immunologia clinica e Cosmetologia dermatologica. Iscr. Albo OMCEO di Firenze n. 7376 del 31 gennaio 1983
Num. certificato 20585854 emesso dall'ente certificatore ArubaPEC S.p.A. NG CA 3, ArubaPEC S.p.A., IT

Chemical responsible
Dott. Emiliano Castellano Chimico Ordine dei Chimici e dei Fisici della Toscana. N. 1631 - Sez. A
Num. certificato 20956661 emesso dall'ente certificatore ArubaPEC S.p.A. NG CA 3, ArubaPEC S.p.A., IT

Information provided by the client

Campionato da \ Sampled by: Cliente

Luogo Prelievo \ Pick Address: D-LIZE SRL CALLE MERLATO, 4 34073 GRADO (GO) IT

Descrizione \ Description: BLUE SOAP RIF. B9.846

Selfmonitoring

In caso di alterazione del campione il laboratorio declina ogni responsabilità sui risultati che possono essere influenzati dallo scostamento nel caso il cliente chieda comunque l'esecuzione dell'analisi. Nel caso il campionamento non sia effettuato dal personale del laboratorio i risultati ottenuti si considerano riferiti al campione così come ricevuto. Qualora sia presente una specifica (limiti di legge o specifiche cliente) con cui sono stati confrontati i risultati analitici, i valori esposti in grassetto indicano un risultato fuori da tale specifica. Se non diversamente specificato i giudizi di conformità/non conformità eventualmente riportati si riferiscono ai parametri analizzati e si basano sul confronto del valore con i valori di riferimento senza considerare l'intervallo di confidenza della misura.

In case of alteration of the sample the laboratory declines any responsibility on the results that can be influenced by the deviation in case the customer asks for the execution of the test anyway. If the sampling is not carried out by the laboratory staff, the results obtained are considered referring to the sample as received. If there is a specification(customer specifications, law limits) which has been compared to the analytical results, the values shown in bold indicate a result which is out of the specification. If not differently specified the judgments of compliance /noncompliance eventually reported are referred to analysed parameters and are based on the comparison of the value with the reference values without considering the confidence interval of measure.

TEST REPORT N. 20/000101901

date of issue 11/03/2020

Customer ID 0029918

Messrs
D-LIZE SRL
CALLE MERLATO, 4
34073 GRADO (GO)
IT

Sample information

Acceptance number 20.503439.0001
Delivered by SDA Express Courier on 04/02/2020
Receiving Date 04/02/2020
Place of origin D-LIZE SRL CALLE MERLATO, 4 34073 GRADO (GO) IT
Sample Description BLUE SOAP RIF. B9.846

Sampling information

Sampled by Customer

ANALYTICAL RESULTS

	Value/ Uncertainty	Unit of measure	LoQ	LoD	Start/end date of analysis	Op. units	Row
ON SAMPLE AS IT IS							1
CHALLENGE TEST Met.: ISO 11930:2019	view attached report				04/02/2020- -10/03/2020	11	2

Operative units

Unit 11 : Via Marradi 41 Prato PO

Information provided by the client

Sampled by: Customer
Pick Address: D-LIZE SRL CALLE MERLATO, 4 34073 GRADO (GO) IT
Description: BLUE SOAP RIF. B9.846

Biologist responsible
Dott. Matteo Giacomelli Ordine nazionale dei biologi Albo professionale n.AA_079105
Num. certificato 17960154 emesso dall'ente certificatore ArubaPEC S.p.A. NG CA 3, ArubaPEC S.p.A., IT

- If not otherwise specified, the uncertainty is extended and has been calculated with a coverage factor k=2 corresponding to a probability interval of about 95%. - LoD is the detection limit and identifies a confidence interval of zero with a probability interval of about 99%. - LoQ is the limit of quantification. "n.d" is not detected and indicates a value inferior to the LoD. "traces (X)" means a value between LoD and LoQ, this value is indicative. "<x" or ">x" indicate inferior or superior to the measurement field of the test. - If not differently specified, the sums are calculated by lower bound criteria (L.B.). - In case of alteration of the sample the laboratory declines any responsibility on the results that can be influenced by the deviation in case the customer asks for the execution of the test anyway. - If the sampling is not carried out by the laboratory staff, the results obtained are considered referring to the sample as received and the laboratory declines its responsibility for the results calculated considering the sampling data provided by the Customer. The name and contact information of the Customer are always provided by the Customer. - If not differently specified the quantitative microbiological tests (excluded MPN) are performed on single repetition and two consecutive dilutions in accordance to ISO 7218:2007/Amd1:2013. - If there is a specification (customer specifications, law limits) which has been compared to the analytical results, the values shown in bold indicate a result which is out of the specification. - If not differently specified the judgments of compliance /non-compliance eventually reported are referred to analysed parameters and are based on the comparison of the value with the reference values without considering the confidence interval of measure.

TEST METHOD: ISO 11930:2019 (EXCLUDED PAR. 6)

NEUTRALIZER COMPOSITION:	PANCREATIC DIGEST OF CASEIN (15 G/L); PAPAIC DIGEST OF SOYBEAN MEAL (5 G/L); SODIUM CHLORIDE (4 G/L); L-CYSTINE (0,7 G/L); SODIUM SULPHITE (0,2 G/L); GLUCOSE (5,5 G/L); LECITHIN (1 G/L); POLYSORBATE 80 (5 G/L); OCTOXYNOL 9 (1 G/L)	
MICROORGANISMS	CULTURE MEDIA	CONDITIONS OF INCUBATION
<i>ESCHERICHIA COLI</i> ATCC 8739	TRYPTIC SOY AGAR (TSA)	32,5 °C ± 2,5 °C FOR 48-72 HOURS
<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ATCC 6538	TRYPTIC SOY AGAR (TSA)	32,5 °C ± 2,5 °C FOR 48-72 HOURS
<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> ATCC 9027	TRYPTIC SOY AGAR (TSA)	32,5 °C ± 2,5 °C FOR 48-72 HOURS
<i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC 10231	SABOURAUD DEXTROSE AGAR (SDA)	32,5 °C ± 2,5 °C FOR 48-72 HOURS
<i>ASPERGILLUS BRASILIENSIS</i> ATCC 16404	POTATO DEXTROSE AGAR (PDA)	22,5 °C ± 2,5 °C FOR 3-5 DAYS
ALL MICROORGANISMS COME FROM NCTC (NATIONAL COLLECTION OF TYPE CULTURES) /ATCC (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION) AND ARE STORED AT - 75 °C ± 5 °C		

CONDITIONS OF STORAGE UNTIL THE BEGINNING OF THE TEST:	ROOM-TEMPERATURE
LOCATION OF THE TEST:	CHELAB SRL – VIA MARRADI 45 – 59100 PRATO (PO)
CONDITIONS OF INCUBATION OF THE INOCULATED FORMULA:	22,5 °C ± 2,5 °C FOR 28 DAYS

Sample ID: 20.503439.0001 **BLUE SOAP RIF. B9.846**
 Receiving date: 04/02/2020 Period of testing: 06/02/2020 - 09/03/2020

	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404
Inoculation condition	200 µL of suspension / 20 g of sample				
Count of initial suspensions:					
N (UFC/mL)	65.000.000	59.000.000	58.000.000	5.700.000	4.700.000
N₀ (UFC/g)	650.000	590.000	580.000	57.000	47.000
log N₀	5,81	5,77	5,76	4,76	4,67
Test Result:					
N 7 days (UFC/g)	<300	<400	<300	<300	
R 7 days (log reduction)	>3,33	>3,17	>3,28	>2,28	
N 14 days (UFC/g)	<300	<400	<300	<300	<150
R 14 days (log reduction)	>3,33	>3,17	>3,28	>2,28	>2,50
N 28 days (UFC/g)	<300	<400	<300	<300	<150
R 28 days (log reduction)	>3,33	>3,17	>3,28	>2,28	>2,50

NEUTRALIZER EFFICACY:

For *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *A. brasiliensis* neutralizer verification passed at dilution 1:10. For *S. aureus* neutralizer verification passed at dilution 1:100. The neutralizer efficacy is demonstrated if the counts performed on Nvf (mixture of the neutralizer and the formulation) is at least 50% of the counts performed on Nvn (mixture of the neutralizer and diluent).

CONCLUSIONS:

The cosmetic formulation considered in this test meets the requirements of criterion "A", defined by ISO 11930:2019, and it can be considered protected against microbial proliferation. The cosmetic formulation is deemed to meet the requirements of this International Standard, without additional rationale.

EVALUATION CRITERIA:

Log reduction values ($R_x = \lg N_0 - \lg N_x$) required ^a								
Micro-organisms	Bacteria			<i>C. albicans</i>			<i>A. brasiliensis</i>	
Sampling time	T7	T14	T28	T7	T14	T28	T14	T28
Criteria A	≥3	≥3 and NI ^b	≥3 and NI	≥1	≥1 and NI	≥1 and NI	≥0 ^c	≥1 and NI
Criteria B	Not performed	≥3	≥3 and NI	Not performed	≥1	≥1 and NI	≥0	≥0 and NI

^a In this test, an acceptable range of deviation of 0,5 log is accepted (see 5.7).
^b NI: no increase in the count from the previous contact time.
^c $R_x = 0$ when $\lg N_0 = \lg N_x$ (no increase from the initial count).

BLUE SOAP RIF. B9,846				
INCI/CTFA NAME				
AQUA/WATER				
GLYCERIN				
POLYSORBATE 20				
PHENOXYETHANOL				
SODIUM GLUCONATE				
COCAMIDOPROPYL BETAINE				
ETHYLHEXYLGLYCERIN				
CHLORPHENESIN				
DISODIUM COCOAMPHODIACETATE				
MENTHA ARVENSIS LEAF OIL				
CETRIMONIUM CHLORIDE				
LIMONENE				
CITRIC ACID				
SODIUM CHLORIDE				
CITRUS LIMON (LEMON) PEEL OIL				
PANTHENOL				
ALOE BARBADENSIS LEAF JUICE POWDER				
C.I. 42090/BLUE 1				
SODIUM HYALURONATE				