

Bischofshofen, 03.06.2020

Prüfbericht / test report B 24433a

Labor-Nr. / <i>identification of the test laboratory:</i>	B 24433a
Prüfprodukt / <i>test product:</i>	SMS FM II / Disposable Face Mask
Musterbezeichnung / <i>sample designation:</i>	SMS FM II / Source material: SMS 20
Chargen-Bez. / <i>batch number:</i>	120520
Auftragsdatum / <i>date of order:</i>	2020-05-13
Materialeingang / <i>date of delivery:</i>	2020-05-20
Prüfzeitraum / <i>period of analysis:</i>	2020-05-27 bis / to 2020-05-29
Lagerbedingungen / <i>storage conditions:</i>	gemäß Herstellerangaben / <i>those of the manufacturer</i>
Prüfbedingungen / <i>test conditions:</i>	Die Prüfung erfolgte im Anlieferungszustand. / <i>The test was done in the delivery state.</i>
Prüfmethode / <i>test method:</i>	SOP 09-001 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten Zytotoxizität von Eluaten gemäß / <i>Biological evaluation of medical devices testing according to EN ISO 10993-5:2009</i> Teil 5: Prüfung auf Zytotoxizität / <i>Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity</i> Prüfung auf Irritation und Sensibilisierung gemäß / <i>Test for irritation and sensitization according to EN ISO 10993-10:2013</i> Teil 10: Prüfung der Membranintegrität / <i>Part 10: Test of cell membrane integrity</i>

Prüftemperatur / <i>test temperature</i> :	20.0 °C
Relative Luftfeuchtigkeit / <i>relative humidity</i> :	37 %
Aussehen / <i>appearance</i> :	Fotodokumentation im Anhang / <i>photo documentation in the annex</i>
Bestimmungsgemäße Anwendungsart gemäß Herstellerangaben / <i>Intended use according to the manufacturer</i> :	keine Angaben / <i>no information</i>
Extraktionsbedingungen / <i>sample processing</i> :	EN ISO 10993-12:2012
Extraktionsmenge und Volumen / <i>sample amount and volume</i> :	60 cm ² Material in 10 ml Extraktionsmedium / <i>60 cm² material in 10 ml extraction medium</i>
Extraktionsmedium / <i>extraction medium</i> :	DMEM + 10% fetales Kälberserum + 1% Antibiotikallösung + L-Glutamin (Komplettmedium) / <i>DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic solution +l-glutamine (complete medium)</i>
Extraktionsdauer / <i>duration of extraction</i> :	24 h
Extraktionstemperatur / <i>temperature of extraction</i> :	37°C ± 1°C
Extrakt / <i>extract</i>:	
pH-Werte / <i>pH values</i> :	B 24433a 100% 8.13
Farbe / <i>colour</i> :	keine Veränderung / <i>no change</i>
Präzipitat / <i>precipitate</i> :	keine / <i>none</i>
Behandlung / <i>processing</i> :	keine / <i>none</i>
Lagerung / <i>storage</i> :	nicht zutreffend / <i>not applicable</i>
Kommentare / <i>comments</i> :	keine / <i>none</i>
Prüfanforderung / <i>test requirement</i>:	
EN ISO 10993-5:	Neutral Rot / <i>neutral red</i> Zellvitalität / <i>cell viability</i> ≥ 70%
EN ISO 10993-10:	LDHe Zellschädigung / <i>cell damage</i> ≤ 30%

Materialien und Methoden / materials and methods

Zellkultivierung / cell culture:

Vero-Zellen (ATCC CCL-81) sind eine adhärenzte Zelllinie des Nierengewebes einer Äthiopischen Grünmeerkatze. Die Vorratshaltung erfolgt in 250 ml Gewebekulturflaschen. Die Zellen werden alle 3-4 Tage passagiert. Nach der 80. Passage wurde die Vorratshaltung aus der Stammkultur neu angelegt. Zur Testung werden die Zellen in einer Konzentration von 0.5×10^6 Zellen/ml in Microtiter-Zellkulturtestplatten F96 eingesät und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das Anzuchtmedium besteht aus MEM mit 9% FBS sowie L-Glutamin, und 1% Antibiotikallösung (Penicillin, Streptomycin).

Stock cultures of Vero cells (ATCC CCL-81), an adherent cell line derived from grivet kidney tissue, were maintained in 250 ml culture flasks at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The cells were passaged every 4 days into new culture flasks. Passage number was kept below 80. For the test 0.5×10^6 cells/ml were seeded into a 96 well microtiter culture cluster and incubated for 24h at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. The culture medium consists of MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with 9% fetal calf serum, 1% antibiotic solution (Penicillin G, Streptomycin sulfate) and L-glutamine.

Exposition / treatment:

Nach 24 Stunden Kultivierung der Zellen in Multiwell-Zellkulturschalen lagen die Zellen als Monolayer vor. Nun wurde ein Mediumwechsel mit Testmedium vorgenommen. Dazu wurde das Medium dekantiert und das Prüfmedium vorsichtig hineinpipettiert (100 µl pro Vertiefung). Eine Inkubation für 24 Stunden im Brutschrank schließt sich an.

After 24 hours of incubation the medium was exchanged with the test medium by carefully decanting the medium and adding 100 µl of test medium, followed by incubation for an additional period of 24 hours.

Extrakte / extracts:

Extrakte werden gemäß EN ISO 10993-12:2012 hergestellt, wenn nicht anders beschrieben. Extrakte werden normalerweise frisch vor der Prüfung hergestellt. Sollte eine Lagerung notwendig sein, wird der Extrakt bei -20°C gelagert (bis zu 48 Stunden), danach bei -80°C (bis zu 2 Wochen).

Extracts are made according to EN ISO 10993-12:2012, unless specified otherwise. Extracts are generally prepared fresh coincident with the test date. In the event that storage becomes necessary the extract is stored at -20°C (< 48h) and after that at -80°C (up to 2 weeks).

Testmedium / *test medium*:

Das Testmedium ist der Extrakt (100%) oder eine Verdünnung davon, wie angegeben, welche mit komplettem Zellmedium hergestellt wurde.

The test medium is either the neat extract (100%) or a dilution thereof prepared with complete cell culture medium, as indicted.

Neutral Rot Methode /
neutral red method:

Vitale Zellen nehmen den Farbstoff Neutralrot auf. Tote Zellen können den Farbstoff nicht aufnehmen und bleiben ungefärbt. Die Farbintensität der Eluationslösung wird photometrisch gemessen.

Viable cells incorporate the dye neutral red. Dead cells do not incorporate the dye and remain unstained. The degree of uptake can be followed by photometrically measuring the release of neutral red upon elution from the cells.

LDHe Methode / LDHe method:

Lactatdehydrogenase (LDH), ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, ist in allen Zellen präsent und wird bei Schädigung der Zellmembran oder Zell-Lyse in das Zellmedium freigesetzt. LDH reduziert Pyruvat zu Lactat, indem NADH zu NAD⁺ oxidiert wird. Die Umwandlung von NADH wird durch eine katalytisch gekoppelte gleichzeitige Umwandlung von INT zu einem unlöslichen Formazansalz photometrisch bestimmt.

Lactate dehydrogenase (LDH), a stable cytoplasmic enzyme, is present in the cytosol, but released into the medium if the cell membrane is damaged or the cells lyse. LDH reduces pyruvate to lactate in the presence of NADH, which is reduced to NAD⁺. Photometric detection follows the consumption of NADH using a catalytically coupled concomitant conversion of INT to an insoluble formazan salt as measurement endpoint

Kontrollen Neutral Rot Methode /
controls neutral red method:

Als Negativkontrolle wurde Zellmedium ohne Prüflösung inkubiert. Zur Überprüfung der Sensitivität des Testsystems wurde zusätzlich als Positivkontrolle 0,15mg/ml Natriumdodecylsulfat (SDS) in DMEM Kulturmedium im Test eingesetzt.

Negative controls were cells incubated with DMEM medium without any additions. Positive controls were incubated with a 0.15 mg/ml sodium dodecyl sulfate (SDS) in DMEM medium.

Kontrollen LDH Methode /
controls LDH method:

Als Negativkontrolle wurde Zellmedium ohne Prüflösung inkubiert. Zur Überprüfung der maximalen LDH-Freisetzung wurde zusätzlich als Positivkontrolle Triton X eingesetzt.

As negative control cells were treated with complete culture medium. The positive control for LDHe is Triton X, which results in maximal release of LDH from cells.

Neutral Rot Ergebnisauswertung /
neutral red result evaluation:

Die optische Dichte (A_{560}) von 12 Parallelansätzen (Wells) wird ermittelt. Eine Zellvitalität von weniger als 70% bezogen auf die Negativkontrolle gilt als signifikant zytotoxisches Ergebnis.

Optical density (A_{560}) of 12 wells was determined. A viability of less than 70% relative to the negative control is considered to be cytotoxic result.

LDHe Ergebnisauswertung /
LDHe evaluation:

Die LDH-Freisetzung von 6 Parallelansätzen wurde ermittelt und relativ zur Positivkontrolle berechnet. Eine LDH-Freisetzung von >30% der Positivkontrolle zeigt eine signifikante Schädigung der Zellmembranen an.

LDH release of 6 wells was determined and calculated relative to the positive control. A LDH-release of >30% of the positive control shows a statistical significant damage of the cell membranes.

Abkürzungen / abbreviations

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
ATCC	American Type Culture Collection	<i>The American Type Culture Collection</i>
ml	Milliliter	<i>Millilitre</i>
µl	Mikroliter	<i>Microliter</i>
Optische Dichte (A)	Absorption (A)	<i>Absorbance (A)</i>
FBS	Fötales Kälberserum	<i>Fetal Bovine Serum</i>

Abbildung 1 / Figure 1: Boxplot der Zellvitalität Neutral Rot / Boxplot of the cell viability neutral red B 24433a

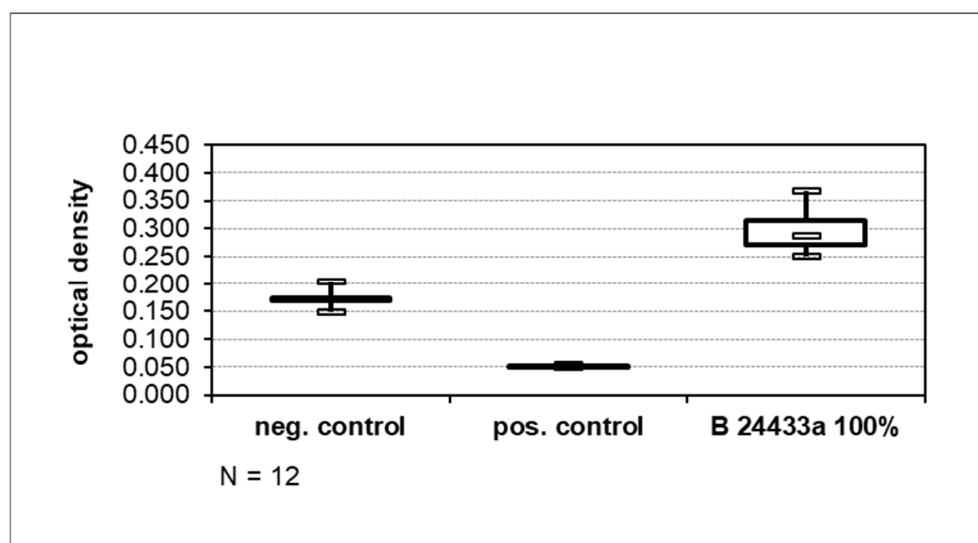


Tabelle 1 / Table 1: Deskriptive Statistik Neutral Rot / Descriptive statistics neutral red B 24433a

	N	Durchschnitt / mean	Zellvitalität / cell vitality (%)	Minimum	Maximum	Standardabweichung / standard deviation	p-value ¹
Neg. Kontrolle / neg. control	6	0.173	100.00	0.150	0.205	0.018	-
Pos. Kontrolle / pos. control	9	0.051	29.43	0.049	0.054	0.002	-
B 24433a 100 %	12	0.296	170.34	0.249	0.367	0.034	1.0000

Verifizierung des Verfahrens

OD der Blindprobe $\geq 0,3$

Differenz der Mittelwerte der Negativkontrolle am linken und rechten Rand $\pm 15\%$.

Verification of the process:

OD of blind value ≥ 0.3

Difference of the mean values of the negative control on the left and right edge $\pm 15\%$.

¹ U-Test nach Mann-Whitney vs. Kontrolle / U test (Mann-Whitney) vs. Control
Prüfbericht B 24433a

Abbildung 2 / Figure 2: Freisetzung von LDH / LDH release B 24433a

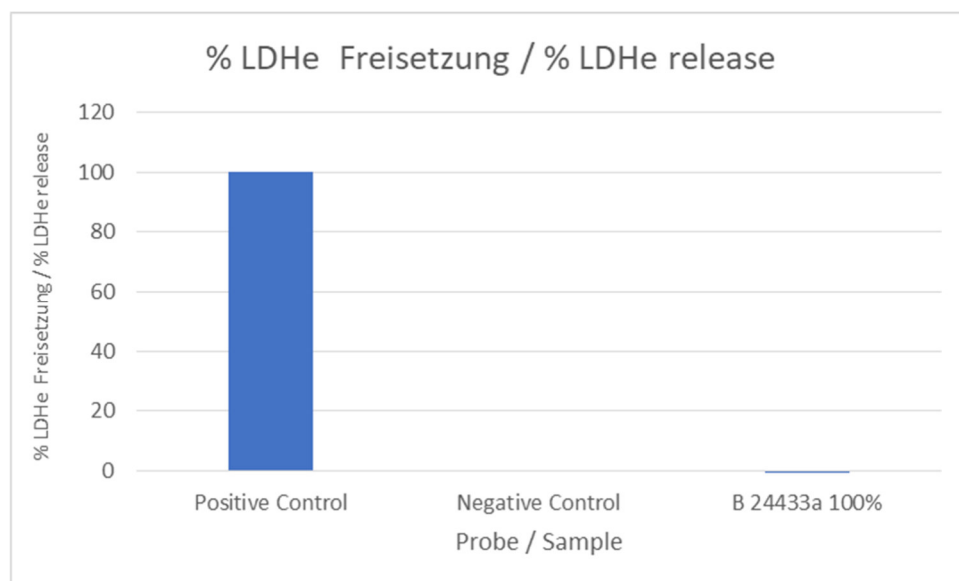


Tabelle 2 / Table 2: Deskriptive Statistik LDH/ Descriptive statistics LDH B 24433a

	N	Standardabweichung / standard deviation	LDH Freisetzung / LDH release (%)
Pos. Kontrolle / pos. control	6	0.02	100
Neg. Kontrolle / neg. control	6	0.03	0.00
B 24433a 100 %	6	0.00	0.00

**Schlussfolgerung /
conclusion:**

Bei 100% Extrakt des Produktes **SMS FM II / Disposable Face Mask** resultierte in einer Zellvitalität von mehr als 70 % im Vergleich zur Kontrolle und ist deshalb als nicht zytotoxisch zu bewerten.

*The extract of 100% the product **SMS FM II / Disposable Face Mask** resulted in a cell vitality of more than 70 % in comparison to the control and can therefore be considered to be not cytotoxic.*

Der Extrakt des Produktes **SMS FM II / Disposable Face Mask** resultierte in einer LDH-Freisetzung von weniger als 30% im Vergleich zur Kontrolle und ist deshalb als nicht irritativ zu bewerten.

*The extract of the product **SMS FM II / Disposable Face Mask** resulted in a LDH release less than 30% in comparison to the control and is therefore considered to be not irritative.*

**Archivierung /
Archiving:**


Eine Ausfertigung des Berichtes wird zusammen mit den Rohdaten im Archiv der HygCen Austria GmbH aufbewahrt. / *A copy of this report is kept together with the raw data in the archive of HygCen Austria GmbH.*

Hinweis / Note:

Der vorliegende Prüfbericht bezieht sich ausschließlich auf die dem Labor vorliegenden Prüfgegenstände. Jede auszugsweise Vervielfältigung bedarf der schriftlichen Genehmigung durch die HygCen Austria GmbH. / *The present test report refers exclusively to the test objects available to the laboratory. Any duplication in extracts requires the written permission of HygCen Austria GmbH.*



Prof. Dr. med. H.-P. Werner
Technischer Leiter / *technical manager*



Monika Feltgen
Stellvertretender technischer Leiter / *vice technical manager*

Anhang zum Prüfbericht B 24433a
attachment to test report B 24433a



Abb. 1: SMS FM II / Disposable Face Mask