

DOLOMITICERT s.c.a.r.l.
Z.I. Villanova 7/A
32013 Longarone (BL)
Italy

Bischofshofen, 13.10.2020

Prüfbericht / test report B 25843a

Labor-Nr. / <i>identification of the test laboratory:</i>	B 25843a
Prüfprodukt / <i>test product:</i>	Single use medical three-layer masks
Auftraggeber / <i>ordered by:</i>	FEDERAL STATE UNITARY ENTERPRISE "MOSCOW ENDOCRINE PLANT" 23Novokhokhlovskaya Str. Moscow Russia, 109052
Auftragsnummer / <i>order number:</i>	REF 845
Auftragsdatum / <i>date of order:</i>	2020-10-01
Materialeingang / <i>date of delivery:</i>	2020-10-02
Prüfzeitraum / <i>period of analysis:</i>	2020-10-05 bis / to 2020-10-07
Lagerbedingungen / <i>storage conditions:</i>	erfolgt nach Angabe des Herstellers / <i>according to the manufacturer's specifications</i>
Prüfbedingungen / <i>test conditions:</i>	Die Prüfung erfolgte im Anlieferungszustand. / <i>The test was done in the delivery state.</i>

Prüfmethode / *test method*:

SOP 09-001

Biologische Beurteilung von Medizinprodukten
Zytotoxizität von Eluaten gemäß / *Biological
evaluation of medical devices testing according to
EN ISO 10993-5:2009*

Teil 5: Prüfung auf Zytotoxizität, Anhang A,
Aufnahme von Neutralrot /
*Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, annex A, neutral
red uptake (NRU)*

Prüfung auf Irritation und Sensibilisierung gemäß /
*Test for irritation and sensitization according to
EN ISO 10993-10:2013*

Teil 10: Prüfung der Membranintegrität /
Part 10: Test of cell membrane integrity

Probenbehandlung / <i>sample processing</i> :	gemäß / <i>according to</i> EN ISO 10993-12:2012 Das Produkt ist während des gesamten Prüfverfahrens aseptisch behandelt worden. / <i>The product was treated under aseptic conditions throughout the complete test procedure.</i>
Probenahme / <i>sampling</i> :	Es wurde ein repräsentatives Teil der Probe zur Überprüfung verwendet. / <i>A representative part of the test sample was used for testing.</i>
Raumtemperatur / <i>room temperature</i> :	21.8 °C
Relative Luftfeuchtigkeit (Raum) / <i>relative humidity (room)</i> :	46 %
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> :	Medizinische Gesichtsmasken zur Verminderung der Infektionsverbreitung / <i>Medical face masks to minimise the risk of infection spreading.</i>
Extrakt / <i>extract</i>:	
Extraktionsbedingungen / <i>conditions of extraction</i> :	gemäß / <i>according to</i> EN ISO 10993-12:2012
Extraktionsverhältnis / <i>extract ratio</i> :	6 cm ² /ml
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 + 2% FBS + 1% Pen/Strep + L-Glutamin (Komplettmedium) / <i>DMEM supplemented with 2% FBS and 1% pen/strep + l-glutamine (complete medium)</i>
Extraktionsdauer / <i>duration of extraction</i> :	24 h ± 2h
Extraktionstemperatur / <i>temperature of extraction</i> :	37°C ± 1°C
pH-Wert des Extrakts / <i>pH value from the extract</i> :	B 25843a 100% Extrakt / <i>extract</i> 8.30
Farbveränderung / <i>change of colour</i> :	nein / <i>no</i>
Präzipitat / <i>precipitate</i> :	ohne / <i>without</i>
Extraktbehandlung / <i>treatment of extraction</i> :	keine / <i>none</i>
Extraktlagerung / <i>storage of extracts</i> :	nicht zutreffend / <i>not applicable</i>
Kommentare / <i>comments</i> :	keine / <i>none</i>

**Beobachtungen Zellreaktion /
notice cell reaction:**

Morphologische Veränderungen /
morphological transformations: keine / none

Prüfanforderung / test requirement:

EN ISO 10993-5, Anhang / *annex A:*

Neutralrot Methode / *neutral red uptake*
Zellvitalität / *cell viability* ≥ 70%

EN ISO 10993-10:

LDHe
Zellschädigung / *cell damage* ≤ 30%

Materialien und Methoden / materials and methods

Zellkultivierung / *cell culture:*

Vero-Zellen (ATCC CCL-81) sind eine adhärenzte Zelllinie des Nierengewebes einer äthiopischen Grünmeerkatze. Zur Testung wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in Microtiter-Zellkulturtestplatten F96 angelegt und 24 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert, um eine semikonfluente Einschichtkultur zu bilden.

Stock cultures of Vero cells (ATCC CCL-81), an adherent cell line derived from grivet kidney tissue, were used. Cells with a concentration of 1×10^5 cells/ml were seeded in 96- multi well plates and incubated 24 hours at 37°C and 5% CO₂ to form a cell culture monolayer.

Exposition / *treatment:*

Nach 24 Stunden Inkubationszeit der Zellen wurde ein Mediumwechsel mit Testmedium vorgenommen. Dazu wurde das Medium dekantiert und 100 µl pro Vertiefung Prüfmedium hineinpipettiert. Eine Inkubation für 24 Stunden bei 37°C und 5% 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 at 37°C and 5% CO₂.

Blindprobe NR Methode /
blank feed NR uptake:

Als Blindprobe wurde Kompletmedium ohne Prüfmedium inkubiert.

As blank feed cells were incubated with complete medium without test medium.

Extrakte / *extracts:*

Extrakte wurden frisch vor der Prüfung gemäß EN ISO 10993-12:2012 hergestellt, sofort für die Prüfung verwendet und nicht gelagert.

Extracts were generally prepared fresh according to EN ISO 10993-12:2012, used immediately for the assay and were not stored.

- Prüfmedium / *test medium*: Das Prüfmedium ist der Extrakt (100%) oder eine Verdünnung davon, welche mit Kompletmedium hergestellt wurde.
The test medium is either the neat extract (100%) or a dilution of it, prepared with complete cell culture medium.
- NR Methode / *NR uptake*: Vitale Zellen nehmen den Farbstoff Neutralrot auf. Tote Zellen können den Farbstoff nicht aufnehmen und bleiben ungefärbt. Die Farbintensität der Eluationslösung wurde photometrisch bei 540nm gemessen.
Viable cells incorporate the dye neutral red. Dead cells do not incorporate the dye and remain unstained. The intensity of the colour of the elution solution was measured by using photometric determination at 540nm.
- 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
- Referenzkontrolle NR Methode / *reference control NR method*: Als Negativkontrolle wurde sterile Baumwolle in Kompletmedium verwendet. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle 0,15mg/ml Natriumdodecylsulfat im Test eingesetzt.
As negative control, cells were incubated with sterile cotton in complete medium. As positive control, cells were incubated in complete medium containing 0.15 mg/ml sodium dodecyl sulfate.
- 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 / <i>neutral red result evaluation:</i>	Die optische Dichte (A_{540}) von 12 Parallelansätzen wird ermittelt. Eine Zellvitalität von weniger als 70% bezogen auf die Blindprobe gilt als zytotoxisches Ergebnis. <i>Optical density (A_{540}) of 12 wells was determined. A cell viability of less than 70% relative to the blank feed is considered to be a cytotoxic result.</i>																												
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. <i>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.</i>																												
NR-Medium / <i>NRmedium:</i>	NR-Farbstoff, Wasser, DMEM / <i>NR- dye, water, DMEM</i>																												
NR-Desorptionslösung / <i>desorption solution:</i>	Ethanol-/Eisessig Lösung / <i>ethanol-/ glacial acetic acid solution</i>																												
Zellen / <i>cells:</i>	<table border="0"> <tr> <td>ATCC Nr. / <i>No.:</i></td> <td>Charge / <i>batch:</i></td> <td>Passage / <i>passage:</i></td> <td>Firma / <i>company:</i></td> </tr> <tr> <td>CCL 81</td> <td>LOT 2695</td> <td>P61</td> <td>Friedrich- Loefer-Institut</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Charge / <i>batch:</i></td> <td>Ablaufdatum / <i>expiration date:</i></td> <td>Firma / <i>company:</i></td> </tr> <tr> <td>DMEM:</td> <td>0000920735</td> <td>2022-07-27</td> <td>Lonza</td> </tr> <tr> <td>Serum / <i>serum:</i></td> <td>BCBZ4242</td> <td>2023/06</td> <td>Sigma-Aldrich</td> </tr> <tr> <td>Antibiotika / <i>antibiotics:</i></td> <td>MS00K1</td> <td>2021-11-23</td> <td>biowest</td> </tr> <tr> <td>Komplettmedium / <i>complete medium:</i></td> <td colspan="3">Herstellungsdatum / <i>date of production:</i> 2020-10-02</td> </tr> </table>	ATCC Nr. / <i>No.:</i>	Charge / <i>batch:</i>	Passage / <i>passage:</i>	Firma / <i>company:</i>	CCL 81	LOT 2695	P61	Friedrich- Loefer-Institut		Charge / <i>batch:</i>	Ablaufdatum / <i>expiration date:</i>	Firma / <i>company:</i>	DMEM:	0000920735	2022-07-27	Lonza	Serum / <i>serum:</i>	BCBZ4242	2023/06	Sigma-Aldrich	Antibiotika / <i>antibiotics:</i>	MS00K1	2021-11-23	biowest	Komplettmedium / <i>complete medium:</i>	Herstellungsdatum / <i>date of production:</i> 2020-10-02		
ATCC Nr. / <i>No.:</i>	Charge / <i>batch:</i>	Passage / <i>passage:</i>	Firma / <i>company:</i>																										
CCL 81	LOT 2695	P61	Friedrich- Loefer-Institut																										
	Charge / <i>batch:</i>	Ablaufdatum / <i>expiration date:</i>	Firma / <i>company:</i>																										
DMEM:	0000920735	2022-07-27	Lonza																										
Serum / <i>serum:</i>	BCBZ4242	2023/06	Sigma-Aldrich																										
Antibiotika / <i>antibiotics:</i>	MS00K1	2021-11-23	biowest																										
Komplettmedium / <i>complete medium:</i>	Herstellungsdatum / <i>date of production:</i> 2020-10-02																												

Abkürzungen / abbreviations

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
FBS	Fetales Kälberserum	<i>Fetal Bovine Serum</i>
Pen/Strep	Penicillin, Streptomycin Antibiotialösung	<i>Penicillin, Streptomycin antibiotic solution</i>
ATCC	American Type Culture Collection	<i>The American Type Culture Collection</i>
NR	Neutralrot	<i>Neutral red</i>
ml	Milliliter	<i>Millilitre</i>
µl	Mikroliter	<i>Microliter</i>
Optische Dichte (A)	Absorption (A)	<i>Absorbance (A)</i>

Ergebnisauswertung Neutralrot Methode / result neutral red uptake:

Abbildung 1 / Figure 1: Boxplot der Zellvitalität / Boxplot of the cell viability B 25843a

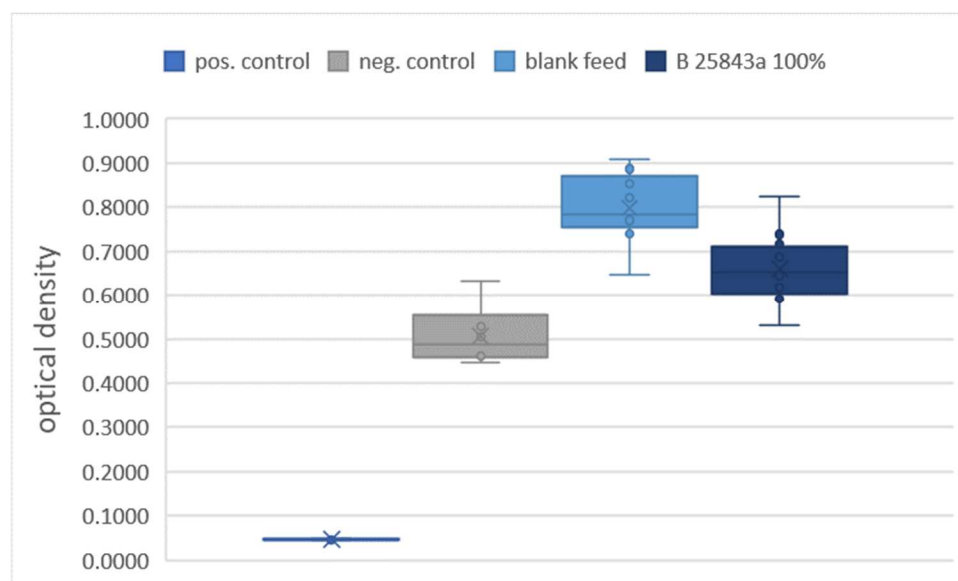


Tabelle 1 / Table 1: Deskriptive Statistik / descriptive statistics B 25843a

	N	Durchschnitt / mean	Zell-vitalität / cell viability (%)	Minimum	Maximum	Standardabweichung / standard deviation	p-value ¹
Blindprobe / blank feed	9	0.798	100.00	0.646	0.909	0.080	-
Neg. Kontrolle / neg. control	6	0.506	63.44	0.446	0.631	0.068	-
Pos. Kontrolle / pos. control	9	0.047	5.84	0.045	0.049	0.001	-
B 25843a 100 %	12	0.660	82.73	0.532	0.823	0.078	0.8872

Ergebnis B 25843a: 82.73% Zellvitalität in Bezug auf die Blindprobe bei 100% Extrakt.
Result B 25843a: 82.73% cell viability regarding to the blank feed using the 100% extract solution.

Verifizierung des Verfahrens

OD der Blindprobe $\geq 0,3$

Eine Prüfung erfüllt die Annahmekriterien, wenn der linke und der rechte Mittelwert der Blindproben um nicht mehr als 15% vom Mittelwert aller Blindproben abweichen.

Verification of the process:

OD of blind value ≥ 0.3

Test was considered as positive when the difference of the mean values of the blank feeds on the left and on the right side of the plate do not deviate more than $\pm 15\%$ from all blank feeds together.

¹ U-Test nach Mann-Whitney vs. Kontrolle / *U test (Mann-Whitney) vs. Control*
 Prüfbericht B 25843a

Ergebnisauswertung LDH Methode / result LDH method:

Abbildung 2 / Figure 2: Freisetzung / release B 25843a

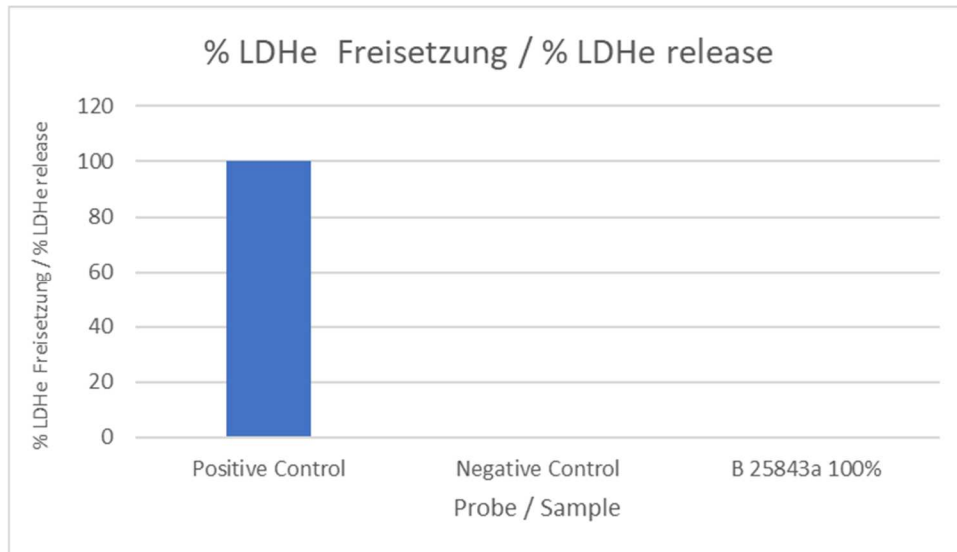


Tabelle 2 / Table 2: Deskriptive Statistik / descriptive statistics B 25843a

	N	Standardabweichung / standard deviation	LDH Freisetzung / LDH release (%)
Pos. Kontrolle / pos. control	6	0.07	100
Neg. Kontrolle / neg. control	6	0.02	0.00
B 25843a 100 %	6	0.00	0.00

**Schlussfolgerung /
conclusion:**

Bei 100% Extrakt des Produktes **Single use medical three-layer masks** resultierte eine Zellvitalität von mehr als 70 % im Vergleich zur Blindprobe und ist deshalb als nicht zytotoxisch zu bewerten.

*The extract of 100% the product **Single use medical three-layer masks** resulted in a cell viability of more than 70 % in comparison to the blank feed and can therefore be considered as not cytotoxic.*

Der Extrakt des Produktes **Single use medical three-layer masks** 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 **Single use medical three-layer masks** 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 Felgen
Stellvertretender technischer Leiter / *vice technical manager*

Anhang zum Prüfbericht B 25843a
attachment to test report B 25843a

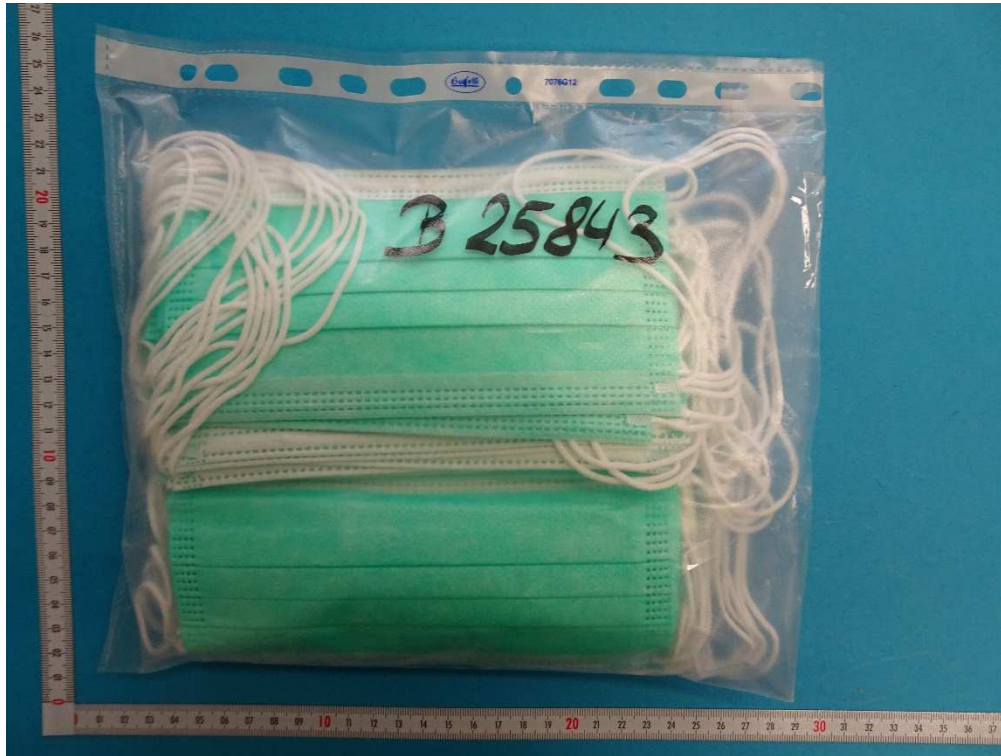


Abb. 1: Single use medical three-layer masks