

SONOVIA LTD

1 Habonim St. Ramat Gan

5246205

Israel

Akkreditierte  
Prüfstelle nach  
ÖNORM EN ISO 17025



Bischofshofen, 18.09.2020

## **Prüfbericht / test report B 25436**

Labor-Nr. / <i>identification of the test laboratory:</i>	B 25436
Prüfprodukt / <i>test product:</i>	Medical Face Mask Sonovia
Auftraggeber / <i>ordered by:</i>	SONOVIA LTD
Auftragsdatum / <i>date of order:</i>	2020-08-17
Materialeingang / <i>date of delivery:</i>	2020-08-18
Prüfzeitraum / <i>period of analysis:</i>	2020-09-14 bis / to 2020-09-16
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>

Prüftemperatur / <i>test temperature</i> :	20.0 °C
Relative Luftfeuchtigkeit / <i>relative humidity</i> :	43 %
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 <sup>2</sup> Material in 10 ml Extraktionsmedium / <i>60 cm<sup>2</sup> 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
<b>Extrakt / <i>extract</i>:</b>	
pH-Werte / <i>pH values</i> :	B 25436    100%    8.20 B 25436    50%    8.47
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>
<b>Prüfanforderung / <i>test requirement</i>:</b>	
EN ISO 10993-5:	Neutral Rot / <i>neutral red</i> Zellvitalität / <i>cell viability</i> ≥ 70%

## **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  $0.5 \times 10^6$  Zellen/ml in Microtiter-Zellkulturtestplatten F96 eingesät und 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Das Anzuchtmedium besteht aus MEM mit 9% FBS sowie L-Glutamin, und 1% Antibiotikalösung (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% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cells were passaged every 4 days into new culture flasks. Passage number was kept below 80. For the test  $0.5 \times 10^6$  cells/ml were seeded into a 96 well microtiter culture cluster and incubated for 24h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> 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.*

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.*

Neutral Rot Ergebnisauswertung /  
*neutral red result evaluation*:

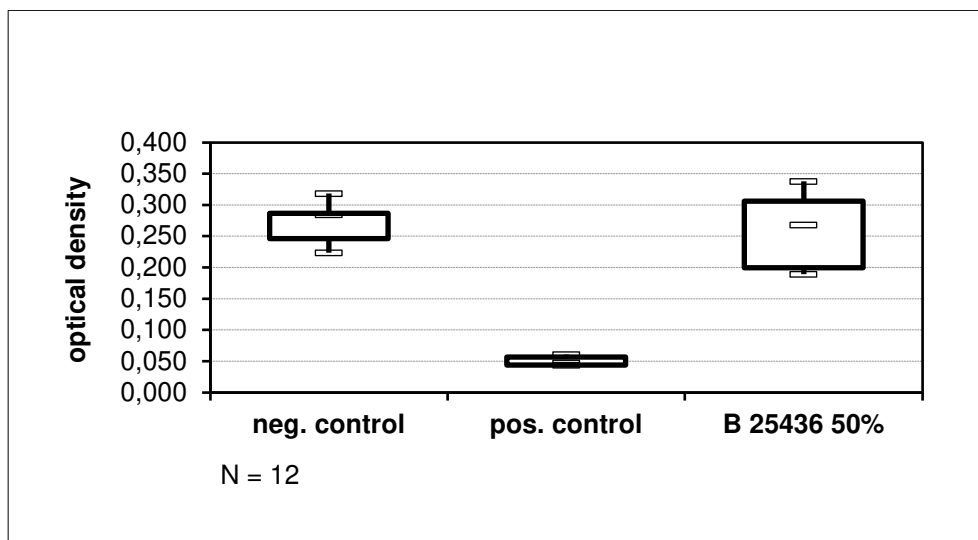
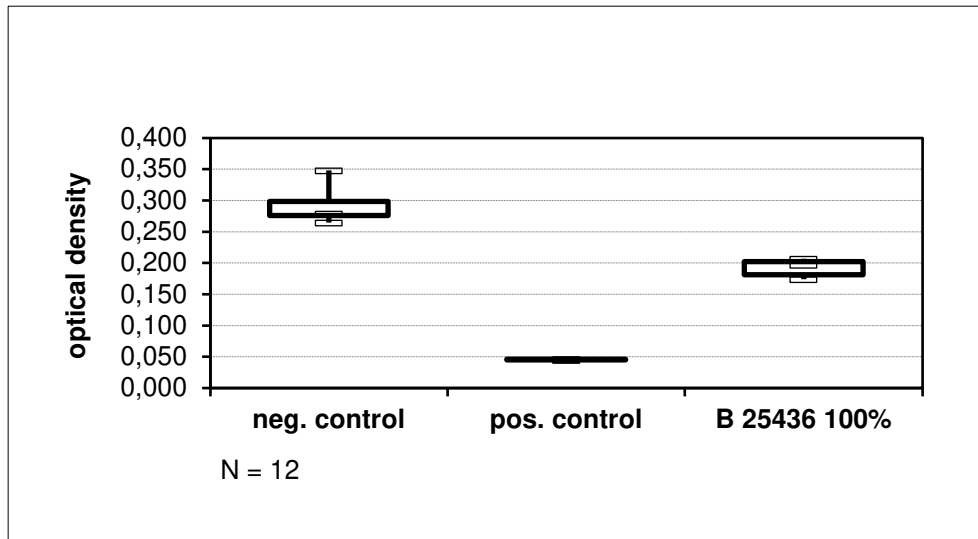
Die optische Dichte ( $A_{560}$ ) von 12 Parallelansätzen (Wells) wird ermittelt. Eine Zellvitalität von weniger als 70% bezogen auf die Negativkontrolle gilt als signifikant zytotoxisches Ergebnis.

*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.*

#### **Abkürzungen / abbreviations**

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

**Abbildung 1 / Figure 1: Boxplot der Zellvitalität Neutral Rot / *Boxplot of the cell viability neutral red B 25436***



**Tabelle 1 / Table 1: Deskriptive Statistik Neutral Rot / Descriptive statistics neutral red  
B 25436**

	N	Durchschnitt / mean	Zell- vitalität / cell vitality (%)	Minimum	Maximum	Standard- abweichung / standard deviation	p-value <sup>1</sup>
<b>Neg. Kontrolle / neg. control</b>	6	0.292	100.00	0.265	0.348	0.031	-
<b>Pos. Kontrolle / pos. control</b>	9	0.046	15.65	0.045	0.046	0.000	-
<b>B 25436 100 %</b>	12	0.193	66.10	0.174	0.207	0.011	0.9947
<b>B 25436 50 %</b>	12	0.260	95.49	0.190	0.338	0.057	0.9998

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  $\geq 0.3$

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

<sup>1</sup> U-Test nach Mann-Whitney vs. Kontrolle / U test (Mann-Whitney) vs. Control  
Prüfbericht B 25436

**Schlussfolgerung /  
conclusion:**

Bei 50% Extrakt des Produktes **Medical Face Mask Sonovia** resultierte in einer Zellvitalität von mehr als 70 % im Vergleich zur Kontrolle und ist deshalb als nicht zytotoxisch zu bewerten.

*The extract of 50% the product **Medical Face Mask Sonovia** resulted in a cell vitality of more than 70 % in comparison to the control and can therefore be considered to be not cytotoxic.*

**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.*

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Werner".

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Feltgen".

Monika Feltgen  
Stellvertretender technischer Leiter / *vice technical manager*

**Anhang zum Prüfbericht B 25436**  
**attachment to test report B 25436**



Abb. 1: Medical Face Mask Sonovia