



STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV

Šrobárova 49/48
Praha 10
100 00

PARDAM NANO4FIBERS s.r.o.
Žižkova 2759
413 01 Roudnice nad Labem
Česká Republika

VÁŠ DOPIS ZN.:

ZE DNE: 6.8.2020

NAŠE ZN.: č.j. 8966/2020

CTZB 187-8966/20-160, EX 201209

VYŘIZUJE: RNDr. Hana Bendová, Ph.D.

TEL./FAX.: 2 6708 2327

E-MAIL: hana.bendova@szu.cz

DATUM: 21.9.2020

ODBORNÝ POSUDEK ke zkoušce cytotoxicity in vitro a zkoušce stanovení kožní dráždivosti na člověku.

PŘEDMĚT ŽÁDOSTI:

K Vaší žádosti ze dne 6.8.2020 o provedení zkoušky cytotoxicity in vitro a zkoušky stanovení kožní dráždivosti na člověku, Vám sdělujeme:

PŘEDLOŽENÝ VZOREK:

VZ 3/20/160: BreaSAFE COMMUNITY MASK

Zadavatel:

PARDAM NANO4FIBERS s.r.o.
Žižkova 2759
413 01 Roudnice nad Labem
Česká Republika

PŘEDLOŽENÁ DOKUMENTACE:

Dokumentace nebyla předložena.

PROVEDENÉ ZKOUŠKY:

Zkouška stanovení cytotoxicity byla provedena dle SOP č. 1/3 Zkoušky na cytotoxicitu in vitro (ČSN EN ISO 10993-5: Část 5, články 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 8.5, 9, 10, Příloha A).

Zkouška stanovení kožní dráždivosti na člověku byla provedena dle SOP č. 2/3 Zkoušky na dráždivost a přecitlivělost oddáleného typu (ČSN EN ISO 10993-10: Část 10, články 1, 2, 3, 4, 5, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 7.5, Příloha A, B.1, B.2, C, E, F) – zkouška kožní dráždivosti ve skupině dobrovolníků.

Předložený vzorek byl spotřebován na uvedená vyšetření.

ODBORNÉ POSOUZENÍ:

Zkoušky byly provedeny ve Zkušebních laboratořích č. 1206, akreditované ČIA, Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti.

ZÁVĚR:

Za podmínek testu extraktu z materiálu, vzorek VZ 3/20/160 je necytotoxický.

Zkoušený materiál VZ 3/20/160 není významné kožní dráždilo.



MUDr. Dagmar Jírová, CSc.
vedoucí

Centrum toxikologie a zdravotní bezpečnosti

STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV
Centrum toxikologie
a zdravotní bezpečnosti
Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10

PŘÍLOHY:

Protokol o výsledku laboratorních zkoušek č. 3/20/160 – Protokol o zkoušce stanovení cytotoxicity

Protokol o výsledku laboratorních zkoušek č. 3/20/160 – Protokol o zkoušce stanovení kožní dráždivosti na člověku



Státní zdravotní ústav
Centrum laboratorních činností
Laboratoře toxikologie



Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10
Tel.: +420 267082439 E-mail: hana.bendova@szu.cz

Zkušební laboratoř č. 1206, akreditovaná ČIA podle normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2018

Protokol o výsledku laboratorních zkoušek č.3/20/160

Zadavatel: PARDAM NANO4FIBERS s.r.o.

Adresa: Žižkova 2759, 413 01 Roudnice nad Labem

Referenční číslo: CTZB 187-8966/2020

Vzorek

Název:

VZ 3/20/160: BreaSAFE COMMUNITY MASK

Vyšetření

SOP 1/3 Zkoušky na cytotoxicitu in vitro (ČSN EN ISO 10993-5: 2010 Část 5, články 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 8.5, 9, 10, Příloha A)

Datum příjmu vzorku: 10.8.2020

Datum provedení zkoušky: 31.8. - 4.9.2020

Datum vyhotovení protokolu: 17.9.2020

Celkový počet stran: 5

Schválil technický vedoucí: RNDr. Hana Bendová, Ph.D.



Zkoušky byly provedeny na adrese laboratoře. Výsledky zkoušek se vztahují ke vzorku, jak byl přijat od zákazníka a týkají se pouze předmětu zkoušky. Tento protokol o zkoušce nenahrazuje jiné dokumenty ani schválení výrobku. Bez písemného souhlasu zkušební laboratoře se nesmí protokol reprodukovat jinak než celý.

PROTOKOL O ZKOUŠCE STANOVENÍ CYTOTOXICITY

Zkušební pracoviště: Laboratoře toxikologie (Centrum laboratorních činností, Státní zdravotní ústav Praha, Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10).

Zkouška byla provedena dle SOP 1/3 Zkoušky na cytotoxicitu in vitro (ČSN EN ISO 10993-5: Část 5, články 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.1, 8.2, 8.3, 8.5, 9, 10, Příloha A).

Byl proveden: test cytotoxicity extraktu z materiálu vzorků - TEST EXTRAKTU.

ZPRÁVA O PROVEDENÍ TESTU (TEST REPORT)

TESTOVANÝ VZOREK (označ. VZ)

VZ 3/20/160: BreaSAFE COMMUNITY MASK

Zadavatel: PARDAM NANO4FIBERS s.r.o.

Žižkova 2759

413 01 Roudnice nad Labem

BUNĚČNÁ LINIE

Myší fibroblasty - linie Balb/c 3T3-L1 (Evropská sbírka buněčných kultur, Velká Británie, ECACC No.86052701).

KULTIVAČNÍ MEDIUM

D-MEM (Dulbeccova modifikace minimálního esenciálního media dle Eaglea, LONZA, číslo šarže 734 457) s obsahem antibiotik (PNC 100 IU/ml, STM 100 µg/ml, LONZA, číslo šarže 6MB 057) obohacené 10% inaktivovaného telecího séra (GIBCO, číslo šarže 1794524), pH 7.2, čerstvě připravené, ne starší než 1 týden.

KONTROLY

- **POZITIVNÍ KONTROLA (PK)**

Materiál, který vyvolává reprodukovatelnou cytotoxickou reakci:

Laurylsíran sodný (SLS - Dodecyl sulfate sodium salt, SIGMA), finální koncentrace v kultivačním mediu 1, 10, 20 µg/ml.

- **NEGATIVNÍ KONTROLA (NK)**

Materiál, který nevyvolává cytotoxickou reakci: Hydron - poly[(2-hydroxyethyl) methakrylát] (Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha).

- **KONTROLA REAGENCIÍ (RK)**

Extrakční činidlo bez zkoušeného materiálu podrobené extrakčním podmínkám:
Kultivační medium bez séra.

- **KONTROLA BUNĚK (K)**

Kultivační medium bez séra.

METODIKA TESTU

- **PROCEDURA TESTU EXTRAKTU**

Ke kultivaci byly použity destičky s plochým dnem pro tkáňové kultury 8x12 jamek (TPP). Jako buněčný substrát sloužila buněčná linie 3T3, suspenze 10^5 buněk v 1 ml kultivačního media, inokulace 0,1 ml suspenze (1×10^4 buněk) do 1 jamky. Kultivační podmínky: 37°C, 7,5% CO₂ (inkubátor pro tkáňové kultury HERAccll). Prekultivace k získání monolayeru buněčné kultury probíhala 24 hodin před expozicí testovanému materiálu. Kultury byly založeny v kvadrupletech pro extrakty z materiálu vzorku a kontroly. U kultur založených v kvadrupletech bylo po 24 hodinové prekultivaci odstraněno kultivační medium a přidáno 0,2 ml extraktu z experimentálního vzorku, resp. jeho ředění, resp. kontrolních vzorků (PK, NK, RK, K). Následovala kultivace 24 hodin (37°C, 7,5% CO₂) a obarvení neutrální červení dle protokolu INVITTOX č. 46 (0,2 ml roztoku neutrální červeně na jamku, inkubace 3 hod, fixační roztok ethanol/kyselina octová). Po ukončení kultivace byla stanovena cytotoxicita kvantitativně (fluorimetricky) na základě inkorporace vitálního barviva (neutrální červeně).

PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ

Extrakt byl připraven v poměru 3 cm² plochy vzorku na 1 ml extrakčního činidla (D-MEM bez séra) dle ČSN EN ISO 10993-12. Extrakce probíhala 24 hodin, při 37°C, v uzavřené kultivační lahvi za aseptických podmínek dle ČSN EN ISO 10993-5. Extrakt byl připraven čerstvý a použit do testu do 24 hodin po ukončení extrakce. Připravený 100% extrakt byl dále ředěn kultivačním mediem bez séra.

- **STANOVENÍ CYTOTOXICITY**

Po ukončení kultivace byl zjištěn stupeň cytotoxicity (kvantitativní snížení životaschopnosti buněk) fluorimetrickou metodou. Fluorimetrická metoda stanovení cytotoxicity je založena na inkorporaci vitálního barviva (neutrální červeně) do živých

buněk (neutral red uptake) a detekci fluorescence v systému excitačního (530 nm) a emisního filtru (590 nm) při průchodu studeného světla. Pro detekci emitované fluorescence a měření fluorescenčních jednotek byl použit fluorescenčně-luminiscenční reader BioTek FLX800TBI. Stupeň cytotoxicity je vyjadřován v % detekované fluorescence v kultuře s přítomností testované látky vůči kontrolní kultuře bez přítomnosti testované látky. (Ref.: Rat, P. et al. (1994). New in vitro fluorimetric microtitration assays for toxicological screening of drugs. Cell Biology and Toxicology, 10, 329-337).

VÝPOČET

Při kvantitativním stanovení fluorimetrickou metodou je životnost kultury určena výpočtem:

$$\text{životnost kultury (\%)} = \frac{\text{průměr FSU vzorku} - \text{průměr FSU blanku}}{\text{průměr FSU kontroly} - \text{průměr FSU blanku}}$$

Průměrné hodnoty fluorescence vyjadřují u každé skupiny průměrnou hodnotu fluorescence ze všech čtyř jamek po odečtu průměrné hodnoty fluorescence osmi jamek s fixačním roztokem (blank). Vlastní stanovení cytotoxicity vyjadřuje procento životnosti kultury ve skupině pokusné i kontrolní (VZ, PK, RK, NK) vůči souběžné kontrole (K).

Stupeň toxicity extraktu:

životnost 70% a více.....necytotoxický
 životnost vyšší nebo rovna 50% a nižší než 70%.....mírně cytotoxický
 životnost vyšší nebo rovna 30% a nižší než 50%.....středně cytotoxický
 životnost nižší než 30%.....silně cytotoxický

VÝSLEDKY

• CYTOTOXICITA - STANOVENÍ FLUORIMETRICKY

Test č.1

Vzorek č. ředění extraktu	Fluorescence (FSU) průměr	Relativně ke kontrole % kontroly
VZ 3/20/160		
10%	3629,1	101,6
25%	3607,1	101,0
50%	3738,6	104,6
100%	3741,9	104,7
K	3572,6	100,0

3/20/160 - 4/5



PK – SLS

1 µg/ml	3085,1	90,5
10 µg/ml	271,4	8,0
20 µg/ml	194,9	5,7
NK	3583,9	105,2
RK	3254,9	95,5
K	3407,4	100,0

Test č.2

Vzorek č.	Fluorescence (FSU)	Relativně ke kontrole
ředění extraktu	průměr	% kontroly

VZ 3/20/160

10%	2267,9	100,0
25%	2264,1	99,9
50%	2266,6	100,0
100%	2310,1	101,9
K	2266,9	100,0

PK – SLS

1 µg/ml	2100,0	97,9
10 µg/ml	127,8	6,0
20 µg/ml	136,3	6,4
NK	2438,8	113,7
RK	2142,3	99,9
K	2144,8	100,0

Zkoušku provedli: RNDr. K. Kejlová, Ph.D., J. Losová

Za provedení testu: RNDr. K. Kejlová, Ph.D.

-----konec protokolu-----



Státní zdravotní ústav

Centrum laboratorních činností Laboratoře toxikologie



Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10
Tel.: +420 267082439 E-mail: hana.bendova@szu.cz

Zkušební laboratoř č. 1206, akreditovaná ČIA podle normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2018

Protokol o výsledku laboratorních zkoušek č.3/20/160

Zadavatel: PARDAM NANO4FIBERS, s.r.o.

Adresa: Žižkova 2759, 413 01 Roudnice nad Labem

Referenční číslo: CTZB 187-8966/2020

Vzorek

Název:

VZ 3/20/160: BreaSAFE COMMUNITY MASK

Vyšetření

SOP 2/3 Zkoušky na dráždivost a přecitlivělost oddáleného typu (ČSN EN ISO 10993-10: 2014 Část 10: články 1, 2, 3, 4, 5, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 7.5, Příloha A, B.1, B.2, C, E, F) - Zkouška kožní dráždivosti ve skupině dobrovolníků

Datum příjmu vzorku: 10.8.2020

Datum provedení zkoušky: 1.9. – 4.9.2020

Datum vyhotovení protokolu: 7.9.2020

Celkový počet stran: 7

Schválil technický vedoucí: RNDr. Hana Bendová, Ph.D.



Zkoušky byly provedeny na adrese laboratoře. Výsledky zkoušek se vztahují ke vzorku, jak byl přijat od zákazníka a týkají se pouze předmětu zkoušky. Tento protokol o zkoušce nenahrazuje jiné dokumenty ani schválení výrobku. Bez písemného souhlasu zkušební laboratoře se nesmí protokol reprodukovat jinak než celý.

PROTOKOL O ZKOUŠCE

STANOVENÍ KOŽNÍ DRÁŽDIVOSTI NA ČLOVĚKU

Zkušební pracoviště: Laboratoře toxikologie, Centrum laboratorních činností, Státní zdravotní ústav, Šrobárova 49/48, 100 00 Praha 10.

Zkouška byla provedena dle SOP 2/3 Zkoušky na dráždivost a přecitlivělost oddáleného typu (ČSN EN ISO 10993-10: Část 10: články 1, 2, 3, 4, 5, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 7.5, Příloha A, B.1, B.2, C, E, F)

Dermální dráždivost byla testována pro: komunitní roušku. Cílem zkoušky je stanovit, zda materiál představuje významné potenciální nebezpečí kožního podráždění po akutní expozici.

ZPRÁVA O PROVEDENÍ TESTU (TEST REPORT)

**ZKOUŠENÝ MATERIÁL (označ. VZ) / IDENTIFIKACE, příp.
FYZIKÁLNĚCHEMICKÉ VLASTNOSTI**

VZ 3/20/160: BreaSAFE COMMUNITY MASK

Zadavatel: PARDAM NANO4FIBERS s.r.o.
Žižkova 2759
413 01 Roudnice nad Labem

PŘÍPRAVA VZORKU

- Zkoušený materiál v kapalném stavu

VZ 3/20/160: Zkoušený materiál byl aplikován bez úpravy o rozměrech 2,5 x 2,5 cm

KONTROLY

- Pozitivní kontrola

20% Dodecylsulfát sodný (SDS) aplikovaný v množství 0,4 ml.

DOBROVOLNÍCI

Výběr lidských dobrovolníků a postup testování se řídí principy zakotvenými v Helsinské deklaraci - WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (1964, revize 2013) Mezinárodní etické směrnici pro biomedicínský výzkum zahrnující lidské účastníky (International Ethical Guidelines for Health-related Research Involving Humans (CIOMS, 2016). Studie je realizována se souhlasem etické komise SZÚ.

Výběr osob je prováděn na principu úplné dobrovolnosti. Všichni dobrovolníci splnili podmínky pro zařazení do studie a za tímto účelem vyplnili speciální dotazník. Třetina dobrovolníků byla stejného pohlaví, demografické údaje dobrovolníků jsou

uvedeny v tabulce č.1. Veškerá dokumentace o studii je důvěrná. Zkoušku dokončilo 30 osob.

Tabulka č.1 - Demografické údaje dobrovolníků

Dobrovolník č.	Iniciály	Věk	Pohlaví
1	HZ	55	Ž
2	PM	56	Ž
3	JM	26	M
4	JM	49	Ž
5	JM	46	M
6	LJ	42	Ž
7	ŠD	67	Ž
8	JL	58	Ž
9	DL	69	Ž
10	KL	61	Ž
11	PI	62	M
12	PD	59	Ž
13	UJ	54	Ž
14	DJ	65	M
15	OD	62	M
16	SM	47	Ž
17	JZ	53	Ž
18	UR	57	Ž
19	SM	69	Ž
20	BO	28	M
21	BI	58	M
22	BH	56	Ž
23	VA	35	M
24	PJ	30	M
25	AT	57	M
26	JL	34	Ž
27	HI	34	Ž
28	DM	43	Ž
29	KK	55	Ž
30	RM	49	M

POSTUP ZKOUŠKY

- **Aplikace zkoušeného materiálu**

Na horní vnější část paže byl aplikován testovaný materiál VZ 3/20/160 o rozměrech 2,5 x 2,5 cm pomocí uzavřené komůrky s gázovým terčíkem o průměru 1,8 cm.

Uzavřené komůrky: Hill Top Chambers, HILL TOP BIOLABS, USA

- **Aplikace pozitivní kontroly**

Na horní vnější část paže byla aplikována pomocí uzavřené komůrky s gázovým terčíkem o průměru 1,8 cm pozitivní kontrola v množství 0,4 ml (20% SDS).

Uzavřené komůrky: Hill Top Chambers, HILL TOP BIOLABS, USA

- **Doba expozice**

Doba expozice byla postupně prodlužována na intervaly aplikace 15 min, 30 min, 1h, 2h, 3 h a 4 h. Zbytky testované látky byly odstraněny opláchnutím a jemným setřením.

- **Klinické pozorování a klasifikace kožních reakcí**

Odečet byl prováděn v intervalech 0 h (ihned po odstranění krytu), dále 1 až 2 h, 24 h, 48 h a 72 h po skončení aplikace. Reakce byly hodnoceny podle klasifikace uvedené v tabulce č.2 - Zkouška dráždivosti lidské kůže, klasifikační stupnice.

Tabulka 2 - Zkouška dráždivosti lidské kůže, klasifikační stupnice

Popis reakce	Číselné hodnocení
žádná reakce	0
slabě pozitivní reakce (obvykle charakterizovaná lehkým erytémem a/nebo suchá kůže na převažující části místa aplikace)	1
mírně pozitivní reakce (obvykle zřetelný erytém nebo suchá kůže případně přesahující místo aplikace)	2
silně pozitivní reakce (silný a často přesahující erytém s tvorbou edému a/nebo krusty)	3

- **Hodnocení výsledků**

Pro hodnocení potenciálu dráždivosti testované látky byl použit údaj o počtu dobrovolníků (viz tabulka č. 3), u kterých byla zaznamenána reakce na testovanou látku a údaj o počtu dobrovolníků, u kterých byla zaznamenána reakce na pozitivní kontrolu (viz tabulka č. 4).

Potenciál kožní dráždivosti byl stanoven porovnáním počtu lidských dobrovolníků, u nichž došlo ke kožnímu podráždění po aplikaci zkoušeného materiálu s počtem dobrovolníků, u nichž došlo k reakci na souběžně aplikovaný pozitivní referenční materiál (pozitivní kontrolu).

Jestliže materiál vyvolává u zkušební skupiny osob častý výskyt podráždění kůže, který je obdobný nebo vyšší než u pozitivní kontroly, musí být považován za významné kožní dráždido.

Pokud materiál vyvolává u zkušební skupiny osob výskyt podráždění kůže, který je podstatně a významně menší než u pozitivní kontroly, potom nemůže být považován za významné kožní dráždido.

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno Fischerovým exaktním testem.

VÝSLEDKY

Odečty reakcí jsou uvedeny v příloze č. 1

DISKUSE VÝSLEDKŮ

Na zkoušený materiál VZ 3/20/160 zareagovalo 0 z 30 dobrovolníků, na pozitivní kontrolu 30 z 30 dobrovolníků. Fischerův test potvrdil podstatně a významně menší četnost podráždění kůže na zkoušený materiál než na pozitivní kontrolu.

Zkoušený materiál VZ 3/20/160 není významné kožní dráždido.

Zkoušku provedli: RNDr. Hana Bendová, Ph.D., RNDr. Lucie Jedličková, Ph.D.

Za provedení testu: RNDr. Hana Bendová, Ph.D.



Tabulka č. 4 - Pozitivní kontrola - Údaje o pozorovaných reakcích

Dobrovolník č.	Interval odečtu / klasifikace kožní reakce				
	0h klasifikace	1 až 2h klasifikace	24h klasifikace	48h klasifikace	72h klasifikace
1	1	1	1	1	1
2	0	1	2	3	3
3	0	2	2	2	2
4	1	1	1	1	1
5	0	1	1	1	1
6	1	2	2	2	1
7	1	1	2	3	3
8	1	1	2	3	3
9	1	2	3	3	3
10	0	1	1	1	1
11	1	2	3	3	3
12	1	1	1	1	1
13	1	2	2	2	2
14	1	1	1	1	1
15	2	3	3	3	3
16	1	2	3	3	3
17	2	3	3	3	3
18	1	1	2	3	3
19	1	1	1	1	1
20	1	1	2	3	3
21	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1
23	0	1	2	2	2
24	1	2	2	2	2
25	0	1	2	3	3
26	1	1	1	1	1
27	1	1	2	2	2
28	0	1	1	1	1
29	1	2	3	3	3
30	1	2	3	3	3

-----konec protokolu-----