

W. Köpp GmbH & Co. KG
Hergelsbendenstr. 20
52080 Aachen

**Hohenstein Laboratories
GmbH & Co. KG**

Schlossteige 1
74357 Bönnigheim · Germany

Life Science & Care
Telefon / Phone +49 7143 271 445
Fax +49 7143 271 94421
bioservice@hohenstein.de

Zuständig für Rückfragen / *Contact person* Unser Zeichen / *Our ref.*
Christin Hammer hec

Datum / *Date*
20. April 2020

Bericht Nr. / Report No. 20.8.5.0202

Auftraggeber: siehe Anschrift
Client: *see address*

Prüfgegenstand: siehe Seite 2
Test sample: *see page 2*

Auftragsdatum: 15.04.2020
Date of order:

Eingang Prüfgegenstand: 14.04.2020
Receipt of test samples:

Prüfzeitraum: 16.04.2020 bis / to 20.04.2020
Period of testing:

Probenahme: Der Prüfgegenstand wurde uns vom Auftraggeber übersandt.
Sampling: *The test sample has been delivered to us by the client.*

Der Bericht umfasst 6 Seiten. / *The report comprises 6 pages.*

UNTERSUCHUNGSZIEL / AIM OF TEST

Prüfung der *in vitro* Zytotoxizität zur biologischen Beurteilung von Medizinprodukten

Tests for in vitro cytotoxicity for biological evaluation of medical devices

PRÜFGEGENSTAND / TEST SAMPLES

Probennr. / Sample No.	Prüfgegenstand	Test sample
20.8.5.0202	Mund-Nasen-Maske Material: Schaumfolie aus Polyethylene-Vinylacetate Materialbezeichnung: K/EV35 weiß Raumgewicht: 35kg/m ³ Chargennummer: 1 EVW21112019	Mouth nose mask Material: foam foil out of polyethylene vinyl acetate Material description: K/EV35 white Volume weight: 35kg/m ³ Lot number: 1 EVW21112019

Der Schweißextrakt wurde aus dem gesamten Prüfgegenstand hergestellt.

Perspiration extract is prepared out of the total article.

METHODE / METHODS

GRUNDSÄTZLICHE VORBEMERKUNGEN

Mit Biokompatibilitätsuntersuchungen nach DIN EN ISO 10993 wird die biologische Verträglichkeit von Produkten geprüft, die u.a. auf intakter Haut ohne Vorerkrankungen und in direktem Kontakt zur Körperoberfläche stehen. Die Prüfung auf Zytotoxizität nach DIN EN ISO 10993-5 ist als Basis für alle Medizinprodukte anerkannt und erforderlich. Durch den Einsatz von Zellkulturen ist es möglich, aus den geprüften Produkten herauslösbare toxische Substanzen nachzuweisen. Zellschädigende Effekte werden mit dem Begriff "Zytotoxizität" beschrieben. Die Zytotoxizitätsprüfung liefert damit erste Anhaltspunkte für die biologische Verträglichkeit des eingesetzten Produktes. Die Freisetzung toxischer Substanzen aus einem Textilprodukt mit Hautkontakt ist Voraussetzung für die Entstehung einer Hautirritation.

Die Prüfung auf Zytotoxizität erlaubt die Beurteilung eines Gefahrenpotenzials zur Hautirritation. Dieses wird als Summenparameter erfasst. Der Test ist keine Analytik zu den irritationsauslösenden Einzelsubstanzen oder auf allergieauslösende Substanzen.

GENERAL REMARKS

This test is carried out by means of biocompatibility tests according to DIN EN ISO 10993. The biological compatibility is tested on products, which, among others, are applied on intact skin without previous illnesses and which are in direct contact to the body surface. The test for cytotoxicity according to DIN EN ISO 10993-5 is an approved methodology and required for medical devices and products. The use of cell cultures allows the detection of extractable toxic substances from the tested products. Cell toxic effects are described by the term "cytotoxicity". The cytotoxicity test provides first evidence for the biological compatibility of the used product. The release of toxic substances from a textile product with skin contact is the precondition for the development of skin irritations.

The test for cytotoxicity permits the evaluation of a risk potential for skin irritation. This potential is recorded as a sum parameter. The test is not an analysis to determine single skin-irritating or allergenic substances.

PRÜFGRUNDLAGE

DIN EN ISO 10993-5: 2009-10^A

Biologische Beurteilung von Medizinprodukten -
Teil 5: Prüfungen auf *in vitro*-Zytotoxizität

In Verbindung mit:

DIN EN ISO 10993-1: 2010-04

Biologische Beurteilung von Medizinprodukten -
Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines
Risikomanagementsystems

DIN EN ISO 10993-12: 2012-10

Biologische Beurteilung von Medizinprodukten -
Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien

DIN EN ISO 105-E04: 2013-08

Textilien - Farbechtheitsprüfungen -
Teil E04: Farbechtheit gegen Schweiß

Zelllinie / Passagenzahl 34

L 929 Zellen (ATCC Nr. CCL1, NCTC Klon 929 L). Die
Zelllinie wird seit vielen Jahren erfolgreich für *in vitro*-
Experimente eingesetzt und zeichnet sich durch eine
gute Klonierungsfähigkeit sowie durch eine hohe
Proliferationsrate aus.

Kulturmedium

DMEM mit 10 % FCS (Firma & Chargennummer intern
dokumentiert).

Extraktionsverfahren

Inkubation des Untersuchungsgutes mit saurer
Schweißlösung nach Norm
DIN EN ISO 105-E04 für 24 Std. unter leichtem
Schütteln bei 37 °C; der Original-Schweißextrakt wird
auf pH 7,3 - 7,4 eingestellt und sterilfiltriert.

Inkubation der Zellkultur

68-72 Std. mit Original-Schweißextrakt in
4 Verdünnungsstufen.

Untersuchung der Zytotoxizität

Nach Inkubation der Zellen wird der Proteingehalt
mittels BCA-Test als Maß für das Zellwachstum mit
dem der Kontrollen verglichen. [1; 2]

TEST SPECIFICATION

*Biological evaluation of medical devices -
Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*

In addition with:

*Biological evaluation of medical devices - Part 1:
Evaluation and testing within a risk management
system*

*Biological evaluation of medical devices - Part 12:
Sample preparation and reference materials*

*Textiles - Tests for colour fastness - Part E04:
Colour fastness to perspiration*

Cell line / passage No. 34

*L 929 Cells (ATCC No. CCL1, NCTC clone 929 L). This
cell line has been used successfully for many years for
in vitro experiments. It is characterized by its good
capability for cloning and its high proliferation rate.*

Culture medium

*DMEM with 10 % FBS (Company and batch number
documented internally)*

Extraction process

*Incubation of test product with an acid perspiration
solution according to
DIN EN ISO 105-E04 for 24 hours with slight shaking
at 37 °C; the original perspiration extract is adjusted to
pH 7.3 to 7.4 and sterilised by filtration.*

Incubation of cell culture

*68-72 hours with original perspiration extract in
4 dilutions.*

Test for cytotoxicity

*After incubation of the cells, the protein amount is
compared with the controls to measure the cell growth
(BC-Assay). [1; 2]*

[1] Smith, P. K., Krohn, R. I., et al. (1985). *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. *Anal Biochem* 150(1): 76-85.

[2] ZLG *Zytotoxizität*. Auswahl der Prüfsysteme, Extraktionsverfahren, Referenzmaterialien, Aussagekraft und Auswertung der Ergebnisse Antworten und Beschlüsse des HAK Biologische Prüfungen.

Eine sensorische Prüfung des Probenmaterials sowie eine Prüfung des Schweißextraktes auf Verfärbung erfolgt durch mehrere Prüfer. Bakterielle Kontaminationen von nicht sterilen Probenmaterialien werden durch Untersuchung des Schweißextraktes festgestellt.

An investigation of the perspiration extract for odor and staining/discoloration is conducted by a panel of testers. Bacterial contamination of non-sterile samples is detected in the perspiration extract.

Eine Positiv- und eine Negativkontrolle werden im Experiment mitgeführt, um die Validität des Testsystems zu bestätigen. In Gegenwart zelltoxischer Substanzen zeigen sich veränderte Proliferations- und Teilungsraten der Zellen (Wachstumshemmungs-Test).

A positive and a negative control are included in the experiment in order to confirm the validity of the test system. In the presence of cytotoxic substances different proliferation and division rates appear (growth inhibition-test).

Lösungsmittelkontrolle

Schweißlösung (pH 7,3 – 7,4)

Solvent control

Perspiration solution (pH 7.3 to 7.4)

Positivkontrolle

DMSO (5 %) in Schweißlösung (pH 7,3 – 7,4)

Positive control

DMSO (5 %) in perspiration solution (pH 7.3 to 7.4)

Negativkontrolle

Kulturmedium

Negative control

Culture medium

Prüfmaterial

Verdünnungen des Probenextrakts in Schweißlösung (pH 7,3 – 7,4)

Test material

Dilutions of the sample extract in perspiration solution (pH 7.3 to 7.4)

Hinweis: Die vorliegende Prüfung der Zytotoxizität an Medizinprodukten (MP) wird nicht explizit im Hinblick auf die Bewertung von Nanopartikeln (ISO/TR 10993-22) ausgeführt. Dies bedeutet, dass keine Risikobewertung der Nanopartikel, die in ein MP eingebracht wurden, oder die bei Herstellung, Sterilisation oder Gebrauch eines MP entstehen können, durchgeführt wird.

Note: The present cytotoxicity test on medical devices (MD) is not performed for the assessment of nanoparticles (ISO/TR 10993-22). This means, that no risk assessment of nanoparticles, integrated in a MD or caused by production, sterilization or use of a MD, is implemented.

BERECHNUNGSGRUNDLAGE

CALCULATION

Die Berechnung der prozentualen Wachstumshemmung (% WH) erfolgt nach folgender Formel:

The calculation of growth inhibition in percentage terms (%WH) is:

$$\%WH = 100 - 100 \times \frac{(OD_{570nm} \text{ Probe/sample}) - (OD_{570nm} \text{ Leerwert/blank})}{(OD_{570nm} \text{ Kontrolle/control}) - (OD_{570nm} \text{ Leerwert/blank})}$$

OD_{570nm} Probe

Mittelwert Extinktionswert einer Probenverdünnung aus 3 Parallelansätzen

OD_{570nm} sample

Average extinction of a sample dilution out of 3 parallel wells

OD_{570nm} Leerwert

Mittelwert Extinktionswert des Leerwerts (ohne Zellen) aus 3 Parallelansätzen

OD_{570nm} blank

Average extinction of the blank (without cells) out of 3 parallel wells

OD_{570nm} Kontrolle

Mittelwert Extinktionswert der Lösungsmittelkontrolle aus 3 Parallelansätzen

OD_{570nm} control

Average extinction of the solvent control out of 3 parallel wells

ERGEBNIS / RESULT

■ Probe / Sample 20.8.5.0202

Im Schweißextrakt wurde mit bloßem Auge **keine Verfärbung / Trübung** beobachtet. Es wurde am Probenmaterial bzw. Schweißextrakt **kein Geruch** festgestellt.

*The observation of perspiration extract showed **no discoloration / turbidity**.
 In the investigation on odor **no smell** was detected.*

Am Schweißextrakt wurde eine Erhöhung des pH-Wertes von 5,5 auf 6,7 beobachtet.

The pH-value in the perspiration extract was 6.7 instead of 5.5.

Rel. Proteingehalt / Rel. protein content OD [570nm]	X	±	s	Wachstumshemmung / growth inhibition in %
Leerwert / blank:	0,1962			
Positivkontrolle / positive control:	0,2940	±	0,0071	92
Negativkontrolle / negative control:	1,6650	±	0,0444	0
Lösungsmittelkontrolle / solvent control:	1,4789	±	0,0457	0
Prüfgegenstand / test sample:				
				Limit
33,30%	1,5300	±	0,0643	0
22,20%	1,4733	±	0,1383	4
14,80%	1,5127	±	0,0837	2
9,90%	1,5990	±	0,0888	0
≤ 30%				

X entspricht Mittelwert aus Mehrfachmessungen
 s entspricht der Standardabweichung
 Versuchsdurchführung: mse1, nka

X is the average of multiple measurements
 s is the standard deviation
 Test performance: mse1, nka

Unter den angegebenen Bedingungen zeigte der Schweißextrakt der Probe eine Wachstumshemmung von 4 % im Zytotoxizitätstest.

Under the mentioned test conditions, the perspiration extract of the test material showed a growth inhibition of 4 % in the cytotoxicity test.

Ausgehend vom Prüfmaterial konnte keine dosisabhängige Wachstumshemmung der L929 Zellen beobachtet werden.

No dose-dependent growth inhibition of L929 cells could be observed, which derived from the test material.

ZUSAMMENFASSUNG / CONCLUSION

BEURTEILUNGSKRITERIEN

Nach DIN EN ISO 10993-5 wird eine Wachstumshemmung von **mehr als 30 %** im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle als eine zytotoxische Wirkung angesehen.

ASSESSMENT CRITERIA

According to DIN EN ISO 10993-5 a growth inhibition of **more than 30 %** in comparison to the solvent control is considered as a clear cell-toxic effect.

BEURTEILUNG

■ Probe / Sample 20.8.5.0202

Gesamtextrakt von Mund-Nasen-Maske

Material: Schaumfolie aus Polyethylene-Vinylacetate

Materialbezeichnung: K/EV35 weiß

Raumgewicht: 35kg/m³

Chargennummer: 1 EVW21112019

Total extract of Mouth nose mask

Material: foam foil out of polyethylene vinyl acetate

Material description: K/EV35 white

Volume weight: 35kg/m³

Lot number: 1 EVW21112019

Die ermittelte Wachstumshemmung von unter 30 % zeigt, dass aus dem Prüfgegenstand keine zelltoxischen Substanzen freigesetzt werden.

The detected growth inhibition of less than 30 % shows that no cytotoxic substances are released.

Schloss Hohenstein, 20. April 2020

Deputy Head of Product Management
& Business Development
Life Science & Care



M.Sc. Christin Hammer



Product Manager
Material Performance
Life Science & Care



Nadja Berner-Dannenmann

Das Ergebnis bezieht sich nur auf die eingereichten Gegenstände. Der Bericht darf nicht auszugsweise, sondern nur in seinem vollen Umfang weitergegeben werden. Eine Benutzung des Berichts zu Werbezwecken oder die Veröffentlichung freier Interpretationen der Ergebnisse ist nur mit ausdrücklicher Genehmigung Hohensteins zulässig. Rechtsverbindlich ist nur der autorisierte Bericht. Die Akkreditierung gilt für die in der Urkundenanlage aufgeführten Verfahren (Akkreditierungen siehe www.hohenstein.de/de/about_hohenstein/akkreditation/akkreditation.html) - im Bericht mit ^A gekennzeichnet.

The results relate only to the samples submitted. This report must only be reproduced in full and not in extract form. Use of the report in advertising or the publication of free interpretations of the results is only allowed with the express permission of Hohenstein. Only the authorized report is legally binding. The accreditation applies for the methods listed in the annex to the certificate (accreditations see www.hohenstein.de/de/about_hohenstein/akkreditation/akkreditation.html) - marked ^A in the report.