

add'n solutions GmbH & Co. KG
Föhrenstraße 7
78532 Tuttlingen

Project No. 7354
BA- Nr.
Begin of testing 21.02.2019
Prüfbeginn
End of testing 26.02.2019
Prüfende
Date of Report 07.03.2019
Datum Bericht
Customer No. 30167
Kunden Nr.

Identification of test item / Identifikation des Prüfgegenstands

Test item name

Bezeichnung des Prüfgegenstands
Pool (Klemme, Schaft, Schere)

Test item no.

Nummer des Prüfgegenstands

-

Date test item received / Order number

Eingang Prüfgegenstände / Bestellnummer
20.02.2019 / Anlieferung

Batch No.

Chargen-Nr.

-

Condition at delivery

Anlieferungszustand

i.O.

Material

Material

-

Number of Test items

Anzahl Prüfgegenstände

Pool (aus 3 Teilen)



Total surface of test item

Größe der Oberfläche des Prüfgegenstandes

Klemme 55cm², Schere 75cm²,

Peek-Schaft: 70cm²

Pooloberfläche: 200cm²

Article No. Cytotoxicity

Artikel-Nr. Zytotoxizität

7003261

Product-specific features

Produktspezifische Besonderheiten

Delivery: non-sterile / unsteril angeliefert

The information about the test items listed above was provided by the sponsor and has not been verified by the test facility.

Die Informationen zu den Prüfgegenständen wurden vom Auftraggeber bereitgestellt und von der Prüfeinrichtung nicht verifiziert.

Test results (summary) / Prüfergebnis (Zusammenfassung)

The cell growth inhibition of L929 mouse fibroblast cells by the test item was 10,2 % after 72 h incubation.

The test item is therefore considered to have no cytotoxic effect.

Die Wachstumshemmung von L929 Maus Fibroblastenzellen durch den Prüfgegenstand betrug 10,2% nach 72 Stunden Inkubation. **Der Prüfgegenstand wird daher als nicht-zytotoxisch wirksam betrachtet.**

Project No. 7354
BA- Nr.

Date of report 07.03.2019
Berichtsdatum

Test results (in detail) / Prüfergebnis (ausführlich)

Table 1: Growth inhibition / Wachstumshemmung

	Condition <i>Behandlung</i>	Growth inhibition [%] <i>Wachstumshemmung [%]</i>	Standard deviation <i>Standardabweichung</i>
	Extrakt 100%	10,2	6,6
	Extrakt 50%	4,4	2,5
	Extrakt 25%	0,7	3,7
	Extrakt 12,5%	0,0	6,2
Positive control <i>Positiv-kontrolle</i>	DMSO 6%	88,4	2,0
	DMSO 3%	81,7	0,8
	DMSO 1,5%	61,2	2,3
	DMSO 0,75%	37,4	4,8
	Negative control	0,0	4,0

Table 2: Mikrosopic evaluation / *mikroskopische Beurteilung*

	Score Values / <i>Reaktivitätsgrad</i>
Extrakt 100%	1
Extrakt 50%	0
Extrakt 25%	0
Extrakt 12,5%	0
DMSO 6%	4
DMSO 3%	4
DMSO 1,5%	3
DMSO 0,75%	2
Negative control	0
Untreated / Unbehandelt	0

The test results exclusively refer to the test items supplied by the sponsor and not to the entire lot, bundle, etc.

Die Prüfergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die getesteten Prüfgegenstände, und nicht auf gesamte Chargen, Gebinde, etc.

Project No. 7354
BA- Nr.

Date of report 07.03.2019
Berichtsdatum

Table 3: Score value (according to ISO 10993-5 and USP 87) / Gradeinteilung (gemäß ISO 10993-5 und USP 87)

Score value Gradeinteilung	Reactivity Reaktivität	Condition of cultures Zustand der Kulturen
0	None Keine	Discrete intracytoplasmatic granules; no cell lysis <i>Diskrete intrazytoplasmatische Granuli, keine Zellauflösung, keine Verringerung des Zellwachstums</i>
1	Slight Gering	Not more than 20% of the cells are round, loosely attached, and without intracytoplasmatic granules; occasional lysed cells are present <i>Nicht mehr als 20% der Zellen sind rund, lose anhaftend und ohne intrazytoplasmatische Granuli oder zeigen Änderungen in der Morphologie, vereinzelt sind aufgelöste Zellen vorhanden, nur geringe Wachstumshemmung bemerkbar</i>
2	Mild Leicht	Not more than 50% of the cells are round and devoid of intracytoplasmatic granules; no extensive cell lysis and empty areas between cells <i>Nicht mehr als 50% der Zellen sind rund, frei von intrazytoplasmatischen Granuli, keine ausgedehnte Zellauflösung; nicht mehr als 50% Wachstumshemmung bemerkbar</i>
3	Moderate Mäßig	Not more than 70% of the cell layers contain rounded cells or are lysed <i>Nicht mehr als 70% der Zellschichten enthalten runde Zellen oder sind aufgelöst; Zellschichten sind nicht vollständig zerstört, jedoch ist mehr als 50% Wachstumshemmung bemerkbar</i>
4	Severe Stark	Nearly complete destruction of the cell layers <i>Fast vollständige oder vollständige Zerstörung der Zellschichten</i>

Table 4: Internal evaluation of the quantitative results / Interne Bewertung der quantitativen Ergebnisse

Evaluation Bewertung	Criterion for evaluation Kriterium für Bewertung
No cytotoxicity Keine Zytotoxizität	Growth inhibition of 0-20% <i>Wachstumshemmung bis zu 20%</i>
Slight reactivity, no cytotoxicity Leichte Reaktivität, keine Zytotoxizität	Growth inhibition of >20-30% <i>Wachstumshemmung zwischen 20% und 30%</i>
Slight cytotoxicity Leichte Zytotoxizität	Growth inhibition of >30-50% <i>Wachstumshemmung zwischen 30% und 50%</i>
Cytotoxicity Zytotoxizität	Growth inhibition of >50-70% <i>Wachstumshemmung zwischen 50% und 70%</i>
Severe cytotoxicity Starke Zytotoxizität	Growth inhibition of more than 70% <i>Wachstumshemmung >70%</i>

The final evaluation of the cytotoxicity of the test item is based on the worst result.
Die finale Bewertung der Zytotoxizität des Prüfgegenstandes basiert auf dem schlechtesten Ergebnis.

FB-M 15-45/10

Seite 3 von 15



Project No. 7354
BA- Nr.

Date of report 07.03.2019
Berichtsdatum

Signatures / Unterschriften

The study director confirms that this study was performed in compliance with the GLP guidelines. Details see chapter "Statement of compliance".

Der Prüfleiter bestätigt mit seiner Unterschrift die Durchführung der Prüfung gemäß der GLP-Richtlinien. Details siehe Abschnitt „Entsprechenserklärung“.

Liptingen, 07.03.2019..... 

Dr. Oliver Podlech
Study Director/ Prüfleiter
CleanControlling Medical GmbH & Co. KG

Quality Assurance confirms, that this report reflects the raw data, and that inspections were carried out regularly. Details see chapter "Quality assurance statement".

Die Qualitätssicherung bestätigt, dass dieser Bericht die Rohdaten widerspiegelt, und dass regelmäßig Inspektionen durchgeführt wurden. Details siehe Abschnitt „Qualitätssicherungserklärung“.

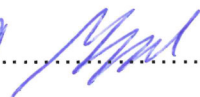
Phases of inspections Phasen der Inspektion

Study Plan Audit
Prüfplan Audit
Raw Data & Report Audit
Rohdaten & Abschlussbericht Audit

Dates of inspections and reports to the management and study director

*Termine der Inspektion und des Berichts an das
Management und den Prüfleiter*

20.02.19
08.03.19

Liptingen, 08.03.19..... 

Martina Gauggel
Member of Quality Assurance Unit
Mitarbeiter der Qualitätssicherung
CleanControlling Medical GmbH & Co. KG

Statement of compliance / Entsprechenserklärung

This study was performed in the testing facilities of CleanControlling Medical GmbH & Co. KG at the laboratory site Auf der Höhe 15, 78576 Emmingen-Liptingen, and it was conducted in compliance with:

- Good Laboratory Practice Regulations as laid down in the Chemical Act "Chemikaliengesetz" of the Federal Republic of Germany, Annex 1 dated August 28, 2013 (BGBl.IS.3498).
- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997); OECD Environmental Health and Safety Publications; Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring – Number 1. Environment Directorate, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris 1999.
- CleanControlling Medical GmbH & Co. KG SOP 15-12 15-43 In vitro Zytotoxizitätstest (Extrakt) Kristallviolett

If deviations from the study plan # 7354, dated 20.02.2019, occurred, they are listed in the chapter „Deviations from the study plan“.

Diese Prüfung wird in den Einrichtungen der CleanControlling Medical GmbH & Co. KG am Laborstandort Auf der Höhe 15, 78576 Emmingen-Liptingen, und im Einklang mit folgenden Richtlinien durchgeführt:

- *Gute Labor-Praxis Richtlinien wie im Chemikaliengesetz der Bundesrepublik Deutschland, Anhang 1 28. August 2013 (BGBl. IS. 3498) dargelegt.*
- *OECD-Prinzipien der guten Laborpraxis (überarbeitete Fassung von 1997); OECD Umwelt-, Gesundheits- und Sicherheitsrichtlinien; Reihe von Grundsätzen der Guten Labor-Praxis und Überwachung der Einhaltung – Nummer 1. Umweltdirektion, Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung, Paris 1999.*
- *CleanControlling Medical GmbH & Co. KG SOP 15-43 In vitro Zytotoxizitätstest (Extrakt) Kristallviolett*

Abweichungen vom Prüfplan 7354 vom 20.02.2019, falls aufgetreten, sind im Kapitel „Abweichungen vom Prüfplan“ aufgelistet.

Project No. 7354
BA- Nr.

Date of report 07.03.2019
Berichtsdatum

Quality assurance statement / Qualitätssicherungserklärung

To ensure the quality of the results, this study and our testing facilities were periodically inspected by a member of the Quality Assurance Unit, independent from the staff involved in the study. The phases and dates of these inspections are listed in the table in chapter "Signatures".

Um die Qualität der Resultate zu sichern, wurden sowohl die Prüfung als auch unsere Prüfeinrichtung regelmäßig von einem von der Prüfung unabhängigen Mitarbeiter der Qualitätssicherung inspiziert. Die Phasen und Zeitpunkte der Inspektionen sind in der Tabelle in Abschnitt „Unterschriften“ aufgelistet.

Distribution and number of reports / Verteilung und Anzahl der Berichte

CleanControlling Medical GmbH & Co. KG	1
Sponsor Auftraggeber	1

Introduction / Einführung

The aim of the in vitro cytotoxicity testing is to determine the presence of extractable cytotoxic substances on a medical device. This test is based on the fact that the growth rate of mammalian cells is significantly decreased in contact with cytotoxic substances. This growth rate can be determined by comparing the cell number of cells after a series of different time periods. The growth inhibition of cells is determined by comparing the number of cells in contact with the extract of a medical device or the device itself with the number of untreated cells after a certain amount of time. The difference in those cell numbers is thereby directly proportional to the cytotoxic effect of the extract or the device.

In this test procedure, L929 mouse fibroblast cells were incubated with the extract of a non-cytotoxic negative control or with a dilution series of the extract of a medical product or a positive control (Dimethylsulfoxid (DMSO) in cell culture medium). The cell number of those treated cells was then compared to untreated control cells after a time period of 72 hours. The resulting ratio is the percentage of growth inhibition induced by the medical device.

This test procedure is based on the standard DIN EN ISO 10993-5 [1]. According to this specification, a growth inhibition of <30% is considered as non-cytotoxic.

Project No. 7354
BA- Nr.

Date of report 07.03.2019
Berichtsdatum

Das Ziel des In vitro Zytotoxizitätstests ist die Prüfung eines Medizinproduktes auf das Vorhandensein von extrahierbaren zytotoxischen Substanzen. Diese Prüfung beruht auf der Tatsache, dass die Wachstumsrate von Säugetierzellen durch den Kontakt mit zytotoxischen Substanzen signifikant reduziert wird. Diese Wachstumsrate wird normalerweise durch den Vergleich der Anzahl von Zellen nach verschiedenen langen Zeitabschnitten ermittelt. Die Wachstumshemmung von Zellen durch zytotoxische Substanzen wird bestimmt, indem die Anzahl der Zellen in Kontakt mit dem Extrakt eines Medizinproduktes oder dem Medizinprodukt selbst nach einer bestimmten Zeit mit der Anzahl unbehandelter Zellen verglichen wird. Der Unterschied der Zellzahlen ist hierbei direkt proportional zu dem zytotoxischen Effekt des Extrakts oder Medizinproduktes.

In diesem Prüfverfahren wurden L929 Maus-Fibroblastenzellen mit dem Extrakt einer Negativkontrolle oder mit einer Verdünnungsreihe des Extraktes eines Medizinproduktes oder einer Positivkontrolle (Dimethylsulfoxid, DMSO in Zellkulturmedium) inkubiert. Die Anzahl dieser behandelten Zellen wurde nach einem Zeitraum von 72 Stunden mit der Anzahl von unbehandelten Kontrollzellen verglichen. Das resultierende Verhältnis entspricht der prozentualen Wachstumshemmung der Zellen durch das Medizinprodukt.

Dieses Testverfahren beruht auf der internationalen Norm DIN EN ISO 10993-5 [1]. Gemäß dieser Norm wird eine Wachstumshemmung <30 % als nicht-zytotoxisch angesehen.

Project No. 7354
BA- Nr.

Date of report 07.03.2019
Berichtsdatum

Media, materials and apparatus / Medien, Material und Geräte

Chemicals and media / Chemikalien und Medien

Material	Company <i>Firma</i>	Lot No. <i>Chargennummer</i>
VLE DMEM Medium	Biochrom	0068G
Fetal bovine serum (FBS) <i>Fötales bovines Serum</i>	Biowest	S17716S1810
Phosphate buffered saline (PBS) <i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>	VWR	18H0156275
Trypsin	Biochrom	0373F
Cell culture plates <i>Zellkulturplatten</i>	VWR	180621078
DMSO	Carl Roth	127253465
Crystal violet <i>Kristallviolett</i>	VWR	3486C343
Sodium citrate <i>Natriumcitrat</i>	Carl Roth	474207826
Methanol	Carl Roth	434221318
Ethanol	VWR	181628
Endotoxin free bags <i>Endotoxinfreie Beutel</i>	VWR	J078754

Apparatus / Geräte

Laminar Air flow / <i>Sterilwerkbank</i>	Thermo Fischer Scientific Safe 2020
Shaking Device / <i>Schüttler</i>	Infors Ecotron
CO2-Incubator	Binder CB 60
Microscope / <i>Mikroskop</i>	Carl Zeiss Primovert
Photometer	Biotek Epoch Reader
Common equipment of cytotoxicity testing <i>Gängige Ausrüstung eines Zytotoxizitäts- Test-Labors</i>	

FB-M 15-45/10

Seite 9 von 15

Test methods / Prüfmethoden

Preparation of extracts / Vorbereitung der Extrakte

At first, the test item, if not received already sterile, was sterilized via steam sterilization at 121° for 20 minutes. After cooling down to room temperature, the test item was transferred into a sterile plastic bag under aseptic conditions. It was then incubated with VLE DMEM cell culture medium (with 10% FBS, 1 ml / 3 cm² surface of test item → 66,67 ml) for 24 +/- 2 hours at 37 +/- 1 °C.

The negative control (non-cytotoxic LDPE film) was treated the same way, an extract of 6.6 ml was made.

The extract showed no change in colour, was clear, and it contained no visible particles.

Der Prüfgegenstand wurde zunächst, soweit nicht steril angeliefert, mittels Dampfsterilisation bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert. Der Prüfgegenstand wurde nach dem Abkühlen unter aseptischen Bedingungen in einen sterilen Plastikbeutel überführt und in VLE DMEM Zellkulturmedium (mit 10% FBS, 1 ml / 3 cm² Oberfläche → 66,67 ml) für 24 +/- 2 Stunden bei 37 +/- 1°C inkubiert.

Die Negativkontrolle (nicht-zytotoxische LDPE-Folie) wurde gleichermaßen behandelt, es wurde ein Extrakt von 6,6 ml gebildet.

Der Extrakt hatte keine veränderte Färbung, war klar, und enthielt keine sichtbaren Partikel.

Growth inhibition testing / Test der Wachstumshemmung

For the growth inhibition test, the cell line L929 (mouse connective tissue fibroblasts) was used. The cells are permanently cultivated (at 37 +/-1°C, 5% CO₂) and regularly controlled for cell growth and absence of mycoplasmas.

For the testing the cells were trypsinized, counted and then a cell solution with a concentration of 100.000 cells/ml was created by dilution with VLE DMEM medium. From this solution 100 µl were pipetted into the wells of a 96-well-microtiterplate, resulting in a population of 10000 cells per well. The plate was then transferred into a CO₂-incubator and incubated at 37 +/-1°C.

After overnight incubation, the cells were microscopically checked for attachment to the well bottom. The extract from the test item was diluted with VLE DMEM in several steps (undiluted (100%), 50%, 25% and 12.5%), the extract from the negative control remained undiluted. As a positive control, Dimethylsulfoxid (DMSO) was used with the dilutions: 6%, 3%, 1.5% and 0.75%.

Following the preparation of the solutions, the wells of the plate were filled with the different solutions with replicas of 6 for every condition. Additionally, 6 wells were filled with pure VLE DMEM (control). The incubation with these solutions lasted for 72 +/-2 hours under standard cell culture conditions.

After the incubation time, the cells were microscopically evaluated (according to USP 87 [2]) using an inverted microscope and then fixated and stained with 50 µl of a crystal violet solution (0,5% in 20% methanol). After 10 minutes the wells were washed with 2 x 100 µl of water, then the plate was allowed to dry overnight (or at least 3-4 hours).

Project No. 7354
BA- Nr.

Date of report 07.03.2019
Berichtsdatum

After drying the wells were filled with 50 µl of a sodium citrate solution (0.1 M in 50% ethanol) and after 10 minutes, the optical density (OD) of each well of the plate was measured in a photometer at 560 nm.

The percentage of growth inhibition was then calculated using the following formula:

$$\text{Growth inhibition} = (1 - (\text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}(\text{mean})})) \times 100$$

The resulting values and standard deviations are the mean values of the 6 replicas.

Für die Prüfung auf Wachstumshemmung wurde die Zelllinie L929 (Maus Bindegewebszellen) verwendet. Die Zellen werden permanent kultiviert (bei 37 +/- 1°C, 5% CO₂) und regelmäßig deren Wachstumsverhalten und die Abwesenheit von Mykoplasmen kontrolliert.

Für die Prüfung wurden die Zellen mittels Trypsin gelöst, gezählt und dann unter Verwendung von VLE DMEM Zellkulturmedium zu einer Lösung mit 100.000 Zellen/ml verdünnt. Von dieser Lösung wurden je 100 µl in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert, somit befanden sich also 10000 Zellen in jedem Well. Die Platte wurde dann in einen CO₂-Inkubator überführt und bei 37 +/- 1°C inkubiert.

Nach Inkubation über Nacht wurde geprüft, ob die Zellen sich am Boden der Wells festgesetzt hatten. Der Extrakt des Prüfgegenstands wurde nun in mehreren Schritten mit VLE DMEM verdünnt (unverdünnt (100%, 50%, 25% und 12.5%), der Extrakt der Negativkontrolle blieb unverdünnt. Als Positivkontrolle wurde die Chemikalie Dimethylsulfoxid (DMSO) in den folgenden Verdünnungen verwendet: 6%, 3%, 1.5% und 0,75%.

Nach der Vorbereitung der Lösungen wurden die Wells der Platte mit 100 µl der verschiedenen Lösungen gefüllt, hierbei wurde jede Lösung in 6 Wells pipettiert. Außerdem wurden 6 Wells nur mit purem VLE DMEM gefüllt (Kontrolle). Die Inkubation mit den Lösungen wurde für 72 +/- 2 Stunden unter Standard-Zellkulturbedingungen durchgeführt.

Project No. 7354
BA- Nr.

Date of report 07.03.2019
Berichtsdatum

Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mikroskopisch beurteilt (gemäß USP 87 [2]) und anschließend mit 50 µl einer Kristallviolett-Lösung (0.5% in 20% Methanol) fixiert und gefärbt. Nach 10 Minuten wurde jedes Well mit 2 x 100 µl Wasser gewaschen, und die Platte über Nacht (oder zumindest 3-4 Stunden) getrocknet.

Nach der Trocknung wurde jedes Well mit 50 µl einer Natriumcitrat-Lösung (0.1 M in 50% Ethanol) gefüllt und nach 10 Minuten die optische Dichte (OD) jedes Wells in einem Photometer bei 560 nm gemessen.

Die prozentuale Wachstumshemmung wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Wachstumshemmung} = (1 - (OD_{\text{Probe}} / OD_{\text{Kontrolle(Mittelwert)}})) \times 100$$

Die Ergebnisse mit ihren Standardabweichungen sind Mittelwerte der 6 Wells.

Deviations from the study plan / Abweichungen vom Prüfplan

There were no deviations from the study plan.

Es gab keine Abweichungen vom Prüfplan.

References / Referenzen

- [1] DIN EN ISO 10993-5 (2009-10): Biological evaluation of medical devices –
Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity
- [2] USP 36, <87>: Biological reactivity tests, in vitro, 2013

Project No. 7354
BA- Nr.

Date of report 07.03.2019
Berichtsdatum

Archiving / Archivierung

Every document generated during the execution of this study is stored in the archive of CleanControlling Medical GmbH & Co. KG, according to GLP regulations. These documents will be archived under the specific project number. This includes:

- all kinds of raw data (printouts and handwritten documents)
- one original of the study plan
- one original of the final report.

According to GLP regulations, the archiving period at present is 15 years. If the sponsor wants to receive the study file at the end of the archiving period, a written request has to be filed to CleanControlling Medical GmbH & Co. KG. Otherwise all documents will be destroyed at the end of the archiving period.

CleanControlling Medical GmbH & Co. KG does not archive samples of the test items. If the sponsor needs an archived sample, the archiving is his own responsibility.

Jegliches Dokument, welches im Laufe der Prüfung generiert wird, wird gemäß der GLP-Richtlinien in den Archiven der CleanControlling Medical GmbH & Co. KG archiviert. Diese Dokumente werden unter der Betriebsauftrags-Nummer archiviert. Dies beinhaltet:

- *sämtliche Rohdaten (Computer-Ausdrucke und von Hand ausgefüllte Dokumente)*
- *ein Original des Prüfplans*
- *ein Original des Abschlussberichtes.*

Gemäß der GLP-Richtlinien beträgt die Archivierungszeit derzeit 15 Jahre. Sollte der Auftraggeber die Prüfunterlagen nach dem Ende der Archivierungszeit übernehmen wollen, so muss er dies der CleanControlling Medical GmbH & Co. KG in schriftlicher Form mitteilen. Anderenfalls werden sämtliche Dokumente am Ende der Archivierungszeit vernichtet.

Die CleanControlling Medical GmbH & Co KG archiviert keine Rückstellmuster. Sollte der Auftraggeber eine Archivierung von Rückstellmustern benötigen, so ist er selbst für deren Archivierung verantwortlich.

Project No. 7354
BA- Nr.

Date of report 07.03.2019
Berichtsdatum

Information / Hinweis

This report is only valid in its complete form.

The duplication of this report in extracts is not allowed without the permission of CleanControlling Medical GmbH & Co. KG.

Dieser Prüfbericht hat nur in vollständiger Form Gültigkeit.

Eine auszugsweise Vervielfältigung ist nur mit Zustimmung von CleanControlling Medical GmbH & Co. KG gestattet.

Revision state / Änderungsstand

Datum/ Date	Index	Beschreibung der Änderung/ Description of revision