

Add´n solutions GmbH & Co.KG
Föhrenstraße 7
78532 Tuttlingen

Project No. 1949
BA- Nr.
Begin of testing 02.02.2017
Prüfbeginn
End of testing 06.02.2017
Prüfende
Date of Report 07.02.2017
Datum Bericht
Customer No. 30167
Kunden Nr.

Identification of test item / Identifikation des Prüfgegenstands

Test item name

Bezeichnung des Prüfgegenstands
Klemme

Test item no.

Nummer des Prüfgegenstands
-

Date test item received / Order number

Eingang Prüfgegenstände / Bestellnummer
01.02.2017 / Besuch

Batch No.

Chargen-Nr.
-

Condition at delivery

Anlieferzustand
i.O.

Material

Material

Number of tested items

Anzahl getesteter Prüfgegenstände

Stainless steel 1.4021

1x 1

Edelstahl 1.4021

Total surface of test item

Größe der Oberfläche des Prüfgegenstandes

Ca 90cm²

Article No. Cytotoxicity

Artikel-Nr. Zytotoxizität

70780



Test results (summary) / Prüfergebnis (Zusammenfassung)

The cell growth inhibition of L929 mouse fibroblast cells by the test item "Klemme" was 6,3 % after 72 h incubation. The test item is therefore considered to have no cytotoxic effect.

Die Wachstumshemmung von L929 Maus Fibroblastenzellen durch den Prüfgegenstand "Klemme" betrug 6,3 % nach 72 Stunden Inkubation. Der Prüfgegenstand wird daher als nicht-zytotoxisch wirksam betrachtet.

Project No. 1949
 BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
 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%	6,3	5,0
	Extrakt 50%	-0,2	3,9
	Extrakt 25%	1,5	4,7
	Extrakt 12,5%	0,8	4,5
Positive control <i>Positiv-kontrolle</i>	DMSO 6%	83,2	5,0
	DMSO 3%	65,4	4,9
	DMSO 1,5%	50,8	2,9
	DMSO 0,75%	30,9	1,3
	Negative control	3,9	4,4

Table 2: Mikrosopic evaluation / mikroskopische Beurteilung

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

Project No. 1949
BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
Berichtsdatum

Table 3: Score value (according to ISO 10993-5 and USP 87) / Gradeinteilung (gemäß ISO 10993-5 and 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% Wachstumshemmung bis zu 20%
Slight reactivity, no cytotoxicity Leichte Reaktivität, keine Zytotoxizität	Growth inhibition of >20-30% Wachstumshemmung zwischen 20% und 30%
Slight cytotoxicity Leichte Zytotoxizität	Growth inhibition of >30-50% Wachstumshemmung zwischen 30% und 50%
Cytotoxicity Zytotoxizität	Growth inhibition of >50-70% Wachstumshemmung zwischen 50% und 70%
Severe cytotoxicity Starke Zytotoxizität	Growth inhibition of more than 70% Wachstumshemmung >70%

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.


Project No. 1949
BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
Berichtsdatum

Signatures / Unterschriften

Liptingen, 07.02.2017..... 

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

Liptingen, 07.02.2017..... 

Volker Burger
Director Testing Services
Leiter der Prüfeinrichtung
CleanControlling Medical GmbH & Co. KG

Project No. 1949
BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
Berichtsdatum

Distribution and number of reports / Verteilung und Anzahl der Berichte

CleanControlling Medical GmbH & Co. KG	1
Sponsor <i>Auftraggeber</i>	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. 1949
BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
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. 1949
BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
Berichtsdatum

Materials and test items / Material und Prüfgegenstände

Test items / Prüfgegenstände

Test item description: <i>Beschreibung des Prüfgegenstandes:</i>	Klemme
Test item no.: <i>Produkt-Nr.:</i>	-
Batch No.: <i>Chargen-Nr.:</i>	-
Surface area: <i>Oberflächen-Größe:</i>	Ca 90 cm ²
Material:	Metal
Product-specific features: <i>Produktspezifische Besonderheiten:</i>	Delivered unsterile/ <i>Unsteril angeliefert</i>

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

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

Die oben aufgeführten Informationen wurden vom Auftraggeber bereitgestellt und von der Prüfeinrichtung nicht verifiziert.

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

Project No. 1949
 BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
 Berichtsdatum

Media, materials and apparatus / Medien, Material und Geräte

Chemicals and media / Chemikalien und Medien

Material	Company Firma
RPMI 1640 Medium	Lonza
Fetal bovine serum (FBS) <i>Fötales bovines Serum</i>	Biochrom
Phosphate buffered saline (PBS) <i>Phosphatgepufferte Salzlösung</i>	VWR
Trypsin	Biochrom
Cell culture plates <i>Zellkulturplatten</i>	VWR
DMSO	Carl Roth
Crystal violet <i>Kristallviolett</i>	Carl Roth
Sodium citrate <i>Natriumcitrat</i>	Carl Roth
Methanol	Carl Roth
Ethanol	VWR
Pyrogen free bags <i>Pyrogenfreie Beutel</i>	VWR

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 endotoxin testing <i>Gängige Ausrüstung eines Endotoxin Test-Labors</i>	

Project No. 1949
BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
Berichtsdatum

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 RPMI 1640 cell culture medium (with 10% FBS, 1 ml / 3 cm² surface of test item → 30 ml) for 24 +/- 2 hours at 37 +/- 1 °C.

The negative control (non-cytotoxic glass object plate) was treated the same way with 1 ml / 6 cm² surface (→ 6,6 ml).

Der Prüfgegenstand wurde zunächst, soweit nicht steril angeliefert, mittels Dampfsterilisation bei 121°C für 20 Minuten sterilisiert. Nach dem Abkühlen wurde der Prüfgegenstand unter aseptischen Bedingungen in einen sterilen Plastikbeutel überführt und in RPMI 1640 Zellkulturmedium (mit 10% FBS, 1 ml / 3 cm² Oberfläche → 30 ml) für 24 +/- 2 Stunden bei 37 +/- 1°C inkubiert.

Die Negativkontrolle (nicht-zytotoxischer Glas-Objektträger) wurde gleichermaßen behandelt, aber mit 1 ml / 6 cm² Oberfläche (→ 6,6 ml).

Project No. 1949
BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
Berichtsdatum

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 RPMI 1640 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 4-5 hours of incubation, the cells were microscopically checked for attachment to the well bottom. The extract from the test item was diluted with RPMI 1640 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 RPMI 1640 (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. 1949
BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
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 RPMI 1640 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 4-5 Stunden Inkubation wurde geprüft, ob die Zellen sich am Boden der Wells festgesetzt hatten. Der Extrakt des Prüfgegenstands wurde nun in mehreren Schritten mit RPMI 1640 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 RPMI 1640 gefüllt (Kontrolle). Die Inkubation mit den Lösungen wurde für 72 +/-2 Stunden unter Standard-Zellkulturbedingungen durchgeführt.

Project No. 1949
BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
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.

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. 1949
BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
Berichtsdatum

Archiving / Archivierung

Every document generated during the execution of this study is stored in the archive of CleanControlling Medical GmbH & Co. KG. 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 final report.

At present, the archiving period 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 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 Abschlussberichtes.*

Die Archivierungszeit beträgt 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. 1949
BA- Nr.

Date of report 07.02.2017
Berichtsdatum

Information / Hinweis

According to customer request (purchase order Besuch) the testing was performed only once.

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.

Gemäß Kundenwunsch (Bestellung Besuch) wurde die Prüfung nur einmal durchgeführt.

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