

Zwisler Laboratorium GmbH, Blarerstraße 56, D-78462 Konstanz

**ZET Chemie GmbH**  
**Herr Helmut Baur (Auftraggeber)**  
**Heisenbergstrasse 3**  
**D-89584 Ehingen/Donau**

Fax 07391-7008-31



## Kommentar zu Prüfbericht Nr. 1307.0137

Die folgende Bemerkung ist nicht Bestandteil des Prüfberichtes und dient lediglich der Information und Aufklärung des Auftraggebers. Dieser Kommentar ist ohne Unterschrift gültig.

### Bemerkung

In compliance with EN ISO 10993-5:2009 one specimen of the test item was tested in-vitro for cytotoxicity. Therefor L-929 cells were cultured as monolayer (15th split of DSMZ culture: DSM ACC2, mouse connective tissue fibroblasts clone of strain L). An extract in culture medium with serum (37°C, 24 h) was prepared of the non-sterile specimen (50µl specimen + 950 µl cell culture and corresponding dilutions with 25 µl, 10µl and 5µl of the specimen). The culture medium (RPMI 1640, lot 1233100) was supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS, lot 1159166) and 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (lot 1166821). All compounds were purchased from Life Technologies (Invitrogene) GmbH, Darmstadt. The extract was tested undiluted and diluted 1:2, 1:4 and 1:10 in cell culture medium, and was incubated with the cells for two days. Thereafter the degree of cell destruction was evaluated using microscopy and subsequent viability staining (MTT). The suitability of the test system was confirmed by positive and negative controls.

Sample-No. Test Item	Quantitative Evaluation % viability (ISO)	Qualitative Evaluation reactivity grade (USP)
1307.0137 Spezialöl 614 x	77+/-2.6 %	2 (mild reactivity)

**Microscopy/Qualitative Evaluation:** Not more than 50% of the cells were round and/or devoid of intracytoplasmic granules (corresponding to mild reactivity), no extensive cell lysis and empty areas were observed.

**Quantitative Evaluation:** A sample with a cell viability above 70% is considered to be NON CYTOTOXIC, but slightly reactive.

**Qualitative:** The extract resulted in cell reactivities that characterize the sample to comply with USP<87>.

**SUMMARY: The sample is considered to be NON CYTOTOXIC.**

In Übereinstimmung mit der EN ISO 10993-5:2009 wurde ein Muster auf Zytotoxizität geprüft. Hierzu wurde ein konfluentes Monolayer von L-929 Zellen (Passage Nr. 15 einer DSMZ-Kultur: DSM ACC2, mouse connective tissue fibroblasts clone of strain L) in einer Kulturschale angezogen. Von diesem Muster (nicht steril) wurde ein Extrakt in Zellkulturmedium mit Serumzusatz (37°C, 24 h) erstellt (50µl Probe + 950 µl Zellkulturmedium und entsprechende Verdünnungen mit 25 µl, 10 µl und 5 µl der Probe). Das Zellkulturmedium (RPMI 1640, lot 1233100) wurde mit 10% v/v fötalem Kälberserum (FBS, lot 1159166) und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (lot 1166821) versehen. Alle Komponenten wurden bei Life Technologies (Invitrogene) GmbH, Darmstadt erworben. Dieser Extrakt wurde unverdünnt und 1:2, 1:4 bzw. 1:10 in Zellkulturmedium verdünnt in den Test eingesetzt und für zwei Tage mit den vitalen Zellen inkubiert. Anschließend wurde die Reaktivität am Mikroskop bzw. die Vitalität durch MTT-Färbung bestimmt. Die Eignung des Testsystems wurde durch entsprechende Negativ- und Positiv-Kontrollen bestätigt.

Probe-Nr.	Probe	Quantitative Auswertung % Vitalität (ISO)	Qualitative Auswertung reactivity grade (USP)
1307.0137	Spezialöl 614 x	77+/-2,6 %	2 (mild reactivity)

**Mikroskopie/Qualitative Evaluation:** Weniger als 50% der Zellen waren geschädigt (entspricht mild reactivity), etwas Zellyse und zellfreie Stellen wurden beobachtet.

**Quantitative Evaluation:** Da die Vitalität der Zellen über 70% liegt, wird die Probe als NICHT ZYTOTOXISCH, jedoch als leicht reaktiv bewertet.

**Qualitativ:** Die Reaktivität des Extrakts charakterisiert die Probe als der USP<87> entsprechend.

**Zusammenfassung:** Die Probe wird als NICHT ZYTOTOXISCH bewertet.

Dr. Christian Draing, Prüfleiter

Konstanz, den 12.07.2013

Zwisler Laboratorium GmbH, Blarerstraße 56, D-78462 Konstanz

**ZET Chemie GmbH**  
**Herr Helmut Baur (Auftraggeber)**  
**Heisenbergstrasse 3**  
**D-89584 Ehingen/Donau**

Fax 07391-7008-31

D-78462 Konstanz  
Durch DAkkS akkreditiertes Labor  
DAkkS: D-PL-13207-01

 **DAkkS**  
Deutsche  
Akkreditierungsstelle  
D-PL-13207-01-01  
D-PL-13207-01-02

 Aneknennung: ZLG-AP-303.10.34  
www.zlg.de  
Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz  
bei Arzneimitteln und Medizinprodukten

**GLP** Good Laboratory Practice  
Statement of GLP Compliance

## Prüfbericht Nr. 1307.0137

Die Probenahme und Prüfung der Proben erfolgte gemäß den Angaben unter 'Probandaten' bzw. 'Prüfverfahren'. Angaben zur Meßunsicherheit und amtliche Normen zu den Untersuchungsmethoden können beim Prüfleiter eingesehen werden.

### Befunde

#### Spezialöl 614 x

Reactivity	grade 2/2/2/2/2	50µl Öl + 950µl Medium
Vitality	mean 77 +/-2.6%	50µl Öl + 950µl Medium
Vitality	80/79/78/77/74/74%	50µl Öl + 950µl Medium
Reactivity	grade 1/1/1/1/1	25µl Öl + 975µl Medium
Vitality	mean 90 +/-3.1%	25µl Öl + 975µl Medium
Vitality	92/86/88/86/93/94%	25µl Öl + 975µl Medium
Reactivity	grade 0/0/0/0/0	10µl Öl + 990µl Medium
Vitality	mean 106 +/-5.1%	10µl Öl + 990µl Medium
Vitality	109/101/101/105/105/ 115%	10µl Öl + 990µl Medium
Reactivity	grade 0/0/0/0/0	5µl Öl + 995µl Medium
Vitality	110/112/110/105/118/ 123%	5µl Öl + 995µl Medium
Vitality	mean 113 +/-6.2%	5µl Öl + 995µl Medium

#### Negative Control (LDPE)

Reactivity	grade 0/0/0/0/0	when undiluted
Vitality	91/93/96/94/95/93%	when undiluted

#### Positive Control (Latex)

Reactivity	grade 4/4/4/4/4	when undiluted
Vitality	1/1/1/1/0/1%	when undiluted
Reactivity	grade 4/4/4/4/4	at 75%
Vitality	81/21/21/20/21/23%	at 75%
Reactivity	grade 2/2/2/2/2	at 50%

Vitality 72/70/68/68/67/66% at 50%  
Reactivity grade 1/1/1/1/1 at 25%  
Vitality 74/76/79/83/82/78% at 25%

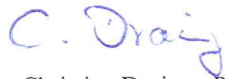
**Positive Control for Diffuse Reaction**

Reactivity grade 3/3/3/3/3 at 0.05% phenol  
Vitality 42/41/41/39/41/41% at 0.05% phenol  
Reactivity grade 4/4/4/4/4 at 0.225% phenol  
Vitality 1/1/0/1/2/1% at 0.225% phenol

Prüfverfahren	Cytotoxic Effect	ISO 10993-5, USP<87>, ZLG	cytotox-3e.doc, Vers. 10
	Extraction	ISO 10993-5, ZLG	cytotox-3e.doc, Vers. 10

Probendaten: Nummer 1307.0137, Probeneingang 26.06.2013, Prüfbeginn 02.07.2013, Prüfende 05.07.2013, die Probenahme erfolgte durch Auftragegeber, 1 Einheit, Zustellungsart DPD, Temperatur bei Anlieferung 17°C,

Das Zeichen '<' bedeutet 'weniger als der angegebene Wert', '>' bedeutet 'mehr als der angegebene Wert'.  
Nachgewiesene Keime sind durch '+ n.' markiert. Der Vermerk 'n.n.' bedeutet, der Keim wurde nicht nachgewiesen. Mit '§' gekennzeichnete Messwerte liegen über dem Grenzwert 'M'. Durch 'A' gekennzeichnete Prüfverfahren sind außerhalb des akkreditierten Bereichs; durch 'U' gekennzeichnete Prüfverfahren werden im Unterauftrag durchgeführt. Die Prüfergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die Probe und nicht auf das ganze Los, die Produktionscharge, etc. Dieser Prüfbericht darf nur mit Erlaubnis des Laboratoriums als Ganzes mit Adresse, Unterschrift auf der letzten Seite und den Ergebnissen von 1 Probe (Nummer 1307.0137) vervielfältigt oder veröffentlicht werden.



Dr. Christian Draing, Prüfleiter

Konstanz, den 12.07.2013

Explanation of the evaluation of test specimen (according to SOP Cytotox-3e, version 10)

Observations for cytotoxicity are evaluated using a reactivity scale from 0 to 4 based on USP <87> (a) and using a cytotoxicity scale based on ISO 10995-5 (b). Additionally an internal comment of the laboratory is added (c).

a) USP<87>: Microscopy/Qualitative Evaluation:

0	None reactivity	Discrete intracytoplasmatic granulas, no cell lysis is observed.
1	Slight	10% to 20% of the cells are round, loosly attached, and without intracytoplasmatic granulas. Some lysed cells are present.
2	Mild	Not more than 50% of the cells are round and devoid of intracytoplasmatic granulas. No extensive cell lysis and empty areas between cells are observed.
3	Moderate	Not more than 70% of the cell monolayer contain rounded cells or are lysed.
4	Severe	Nearly complete destruction of cell monolayer.

b) ISO 10995-5: Quantitative Evaluation

Non cytotoxic	sample extract which results in a cell viability above 70%
Cytotoxic	sample extract which results in a cell viability below 70%

c) internal comment of the laboratory: Quantitative Evaluation

0	Non cytotoxic	sample extract which results in a cell viability above 90%
1	Slight reactivity, non cytotoxic	sample extract which results in a cell viability above 70%
2	Slight cytotoxic	sample extract which results in a cell viability between 50% - 70%
3	Cytotoxic	sample extract which results in a cell viability between 30% - 50%
4	Severe cytotoxic	sample extract which results in a cell viability below 30%