

AFT International Advanced Foot Technology  
Ter Stratenweg 50  
BE-2520 Oelegem  
Belgium



Deutsche  
Akkreditierungsstelle  
D-PL-18818-02-01  
D-PL-18818-02-02



Anerkannt durch/Recognized by  
Zentralstelle der Länder  
für Gesundheitsschutz  
bei Arzneimitteln und  
Medizinprodukten  
ZLG-AP-314.10.23  
www.zlg.de

2020-05-29

## PRÜFBERICHT / TEST REPORT

Proben-Nr. / <i>sample id number</i> :	SN 29702
Prüfprodukt / <i>test sample</i> :	Material Letex
Prüfungsnummer / <i>sample number</i> :	2020-1142
Auftraggeber / <i>client</i> :	Prüf- und Forschungsinstitut e.V. (PFI) Marie-Curie-Str. 19 66953 Pirmasens
Hersteller / <i>manufacturer</i> :	AFT International Advanced Foot Technology
Auftragsdatum / <i>date of order</i> :	2020-04-30
Lieferdatum / <i>date of delivery</i> :	2020-05-06
Prüfzeitraum / <i>test period</i> :	2020-05-18 - 2020-05-20
Prüfmethode / <i>test method</i> :	Zytotoxizität von Eluaten gemäß EN ISO 10993-5:2009 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten Teil 5: Prüfung auf Zytotoxizität (SOP 09-001)  <i>Cytotoxicity of eluates according to EN ISO 10993-5:2009 Biological evaluation of medical devices Part 5: tests for cytotoxicity: in vitro (SOP 09-001).</i>
Information / <i>information</i> :	-

**Identifizierung der Probe / identification of the sample**

Probennummer / *sample id number*: SN 29702

Prüfprodukt / *test sample*: Material Letex

Chargennummer / *batch number*: -

Lieferdatum / *date of delivery*: 2020-05-06

Lagerbedingungen / *storage conditions*: die des Herstellers / *those of the manufacturer*

Aussehen / *appearance*: Fotodokumentation im Anhang /  
*photo documentation in the annex*

Bestimmungsgemäße Anwendungsart  
gemäß Herstellerangaben /  
*Intended use according to the manufacturer*: Keine Angaben / *no information*

**Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method**

Prüfmethode / <i>test method</i> :	<b>EN ISO 10993-5 (2009)</b> <b>Biologische Beurteilung von Medizinprodukten -</b> <b>Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität</b>  <b>EN ISO 10993-5 (2009)</b> <b>Biological evaluation of medical devices -</b> <b>Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity</b>  <b>SOP 09-001</b>
Prüftemperatur(en) / <i>test temperature(s)</i> :	22.1°C ± 1°C
Rel. Luftfeuchtigkeit / <i>rel. humidity</i> :	38%
Testmaterialbehandlung / <i>sample processing</i> :	Die Prüfung erfolgte im Anlieferungszustand / <i>Sample(s) were tested as delivered</i>
Extraktionsbedingungen / <i>extraction conditions</i> :	EN ISO 10993-12 (2012)
Extraktionsmenge und Volumen / <i>sample amount and volume</i> :	1,59g Material in 11,5ml Extraktionsmedium (8ml + 3,5ml Absorption) / <i>1.59g material in 11.5ml extraction medium (8ml + 3.5ml absorption)</i>
Extraktionsmedium / <i>extraction medium</i> :	Saure Schweißlösung (EN) / <i>Artificial acidified sweat solution (EN)</i>
Extraktionsdauer / <i>duration of extraction</i> :	24h
Extraktionstemperatur / <i>temperature of extraction</i> :	37°C ± 1°C

**Extrakt / extract:**

pH-Werte / <i>pH values:</i>	7.2
Farbe / <i>colour:</i>	keine Veränderung / <i>no change</i>
Präzipitat / <i>precipitate:</i>	keines / <i>none</i>
Behandlung / <i>processing:</i>	keine / <i>none</i>
Lagerung / <i>storage:</i>	nicht zutreffend / <i>not applicable</i>
Kommentare / <i>comments:</i>	-
Laboranalyse durchgeführt von / <i>lab analysis performed by:</i>	Mrs. Nicole Möller-Titel

**Prüfanforderung / test requirement:**

EN ISO 10993-5:	Neutral Rot / <i>neutral red</i> Zellvitalität / <i>cell viability</i> ≥ 70%
-----------------	---

## **Materialien und Methoden / materials and methods**

### Zellkultivierung / *cell culture:*

L929-Zellen (ATCC CCL 1) sind eine adhärenzte Zelllinie des murinen Bindegewebes. Die Vorratshaltung erfolgt in 250 ml Gewebekulturflaschen. Die Zellen werden alle 3-4 Tage passagiert. Nach der 80. Passage wurde die Vorratshaltung aus der Stammkultur neu angelegt. Zur Testung werden die Zellen in einer Konzentration von  $0.5 \times 10^6$  Zellen/ml in Microtiter-Zellkulturtestplatten F96 eingesät und 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Das Anzuchtmedium besteht aus MEM mit 9% FBS sowie L-Glutamin, und 1% Antibiotikallösung (Penicillin, Streptomycin).

*Stock cultures of L929 cells (ATCC CCL-1), an adherent cell line derived from murine connective tissue, were maintained in 250 mL culture flasks at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The cells were passaged every 4 days into new culture flasks. Passage number was kept below 80. For the test  $0.5 \times 10^6$  cells/mL were seeded into a 96 well microtiter culture cluster and incubated for 24h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The culture medium consists of MEM (Minimum Essential Medium) supplemented with 9% fetal calf serum, 1% antibiotic solution (Penicillin G, Streptomycin sulfate) and L-glutamine.*

### Exposition / *treatment:*

Nach 24 Stunden Kultivierung der Zellen in Multiwell-Zellkulturschalen lagen die Zellen als Monolayer vor. Nun wurde ein Mediumwechsel mit Testmedium vorgenommen. Dazu wurde das Medium dekantiert und das Prüfmedium vorsichtig hineinpipettiert (100 µl pro Vertiefung). Eine Inkubation für 24 Stunden im Brutschrank schließt sich an.

*After 24 hours of incubation the medium was exchanged with the test medium by carefully decanting the medium and adding 100 µL of test medium, followed by incubation for an additional period of 24 hours.*

### Extrakte / *extracts:*

Extrakte werden gemäß EN ISO 10993-12:2012 hergestellt, wenn nicht anders beschrieben. Extrakte in saurer Schweißlösung werden 2-fach konzentriert hergestellt. Der Extrakt wird danach 1:1 mit komplettem Zellkulturmedium verdünnt um das 100% Testmedium herzustellen. Extrakte werden normalerweise frisch vor der Prüfung hergestellt. Sollte eine Lagerung notwendig sein, wird der Extrakt bei -20°C gelagert (bis zu 48 Stunden), danach bei -80°C (bis zu 2 Wochen).

*Extracts are made according to EN ISO 10993-12:2012, unless specified otherwise. Extracts in acidified artificial sweat solution are made at 2x strength and then diluted 1:1 with complete cell culture medium to afford the 100% test medium. Extracts are generally prepared fresh coincident with the test date. In the event that storage becomes necessary the extract is stored at -20°C (< 48h) and after that at -80°C (up to 2 weeks).*

Testmedium / *test medium:*

Das Testmedium ist der Extrakt (100%) oder eine Verdünnung davon, wie angegeben, welche mit komplettem Zellmedium hergestellt wurde.

*The test medium is either the neat extract (100%) or a dilution thereof prepared with complete cell culture medium, as indicated.*

Neutral Rot Methode /  
*neutral red method:*

Vitale Zellen nehmen den Farbstoff Neutralrot auf. Tote Zellen können den Farbstoff nicht aufnehmen und bleiben ungefärbt. Die Farbintensität der Eluationslösung wird photometrisch gemessen.

*Viable cells incorporate the dye neutral red. Dead cells do not incorporate the dye and remain unstained. The degree of uptake can be followed by photometrically measuring the release of neutral red upon elution from the cells.*

Kontrollen / *controls:*

Als Negativkontrolle wurde Zellmedium ohne Prüflösung inkubiert. Zur Überprüfung der Sensitivität des Testsystems wurde zusätzlich als Positivkontrolle 0,15mg/ml Natriumdodecylsulfat (SDS) in MEM Kulturmedium im Test eingesetzt. (N=9)

*Negative controls were cells incubated with MEM medium without any additions. Positive controls were incubated with a 0.15 mg/mL sodium dodecyl sulfate (SDS) in MEM medium. (N=9)*

Neutral Rot Ergebnisauswertung /  
*Neutral red result evaluation:*

Die optische Dichte ( $A_{560}$ ) von 12 Parallelansätzen (Wells) wird ermittelt. Eine Zellvitalität von weniger als 70% bezogen auf die Negativkontrolle gilt als signifikant zytotoxisches Ergebnis.

*Optical density ( $A_{560}$ ) of 12 wells was determined. A viability of less than 70% relative to the negative control is considered to be cytotoxic result.*

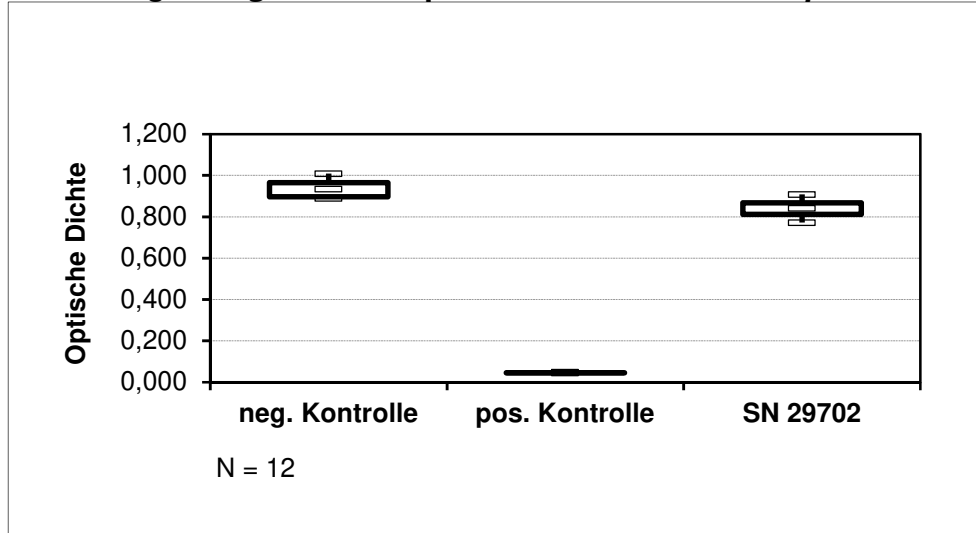
## Reagenzien / reagents

Reagenz / reagent	ID	Hersteller/ manufacturer	Charge / batch	Verfallsdatum / expiration Date
Medium	MEM	BioWest	0055Z	31.01.2021
FBS	Serum	BioChrom	BCBV9856	-
Additive(s)	L-Glutamin / L-glutamine	Biochrom	0279G	31.03.2021
Antibiotic Mix	Pen/Strep	Sigma	018M4825V	-
Kontrolle / Control	SDS	Merck	K49143160734	30.06.2022
Kontrolle / Control (LDHe)	Triton X	Merck	K47606598712	-
Vital Dye	Neutral Red	Roth	60153624	-
Detection Kit	LDHe Reagent Kit	Roche	40490800	28.02.2022
Culture flasks	-	Sarstedt	20921	28.02.2025

## Abkürzungen / abbreviations

<b>MEM</b>	Minimum Essential Medium	<i>Minimum Essential Medium</i>
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection	<i>The American Type Culture Collection</i>
<b>ml</b>	Milliliter	<i>Milliliter / Millilitre</i>
<b>µL</b>	Mikroliter	<i>Microliter</i>
<b>Optische Dichte (A)</b>	Absorption (A)	<i>Absorbance (A)</i>
<b>FBS</b>	Fötales Kälberserum	<i>Fetal Bovine Serum</i>

**Abbildung 1 / Figure 1: Boxplot der Zellvitalität / Boxplot of the cell viability**



**Tabelle 1 / Table 1: Deskriptive Statistik / Descriptive statistics**

	N	Durchschnitt (mean)	Zellvitalität (cell vitality) (%)	Minimum	Maximum	Standard- abweichung (std. deviation)	p-value*
<b>Neg. Kontrolle (neg. control)</b>	9	0,939	100,00	0,889	1,009	0,043	-
<b>Pos. Kontrolle (pos. control)</b>	9	0,046	4,87	0,045	0,048	0,001	-
<b>SN 29702</b>	12	0,842	89,73	0,771	0,908	0,042	0,8632

\* U-Test nach Mann-Whitney vs. Kontrolle / U test (Mann-Whitney) vs. Control

Analyst(s): Mrs. Nicole Möller-Titel



**Schlussfolgerung /  
conclusion:**

Der Extrakt des Produktes „Material Letex“ resultierte in einer Zellvitalität von mehr als 70% im Vergleich zur Kontrolle und ist deshalb als nicht zytotoxisch zu bewerten.

*The extract of the product "Material Letex" resulted in a cell vitality of more than 70% in comparison to the control and can therefore be considered to be not cytotoxic.*

**Archivierung:**

**Eine Ausfertigung des Berichtes wird zusammen mit den Rohdaten im Archiv des Auftragnehmers aufbewahrt.**

**Archiving:**

***A copy of the test report will be kept together with the raw data in the contractor's archive.***

**Hinweis:**

Die Prüfergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die genannten Prüfprodukte. Auszugsweise Wiedergabe dieses Berichtes nur mit schriftlicher Genehmigung der HygCen Germany GmbH.

**Note:**

*The test results refer only to the named test samples. Reproduction of any part of this report requires the written permission of HygCen Germany GmbH.*



Prof. Dr. med. H.-P. Werner  
Head of Scientific-Technical Affairs  
Medical Devices



Dr. rer. nat. Antje Stolzenburg  
Division Manager Biological Test Methods

**Anlage A zum Prüfbericht SN 29702 vom 29.05.2020**  
**Annex A for test report SN 29702 of 2020-05-29**



Abbildung 2 / *Figure 2*: Material Letex