Dr.-Ing. Martin Heinisch

22. Juli 2020

Eingegangen

Prüfbericht

Hautirritationstest

Prüfberichtsnummer: ISO 202005-02909_HI

CYTOX
biologische Sicherheitsprüfungen
Gottlieb-Keim-Straße 60
95448 Bayreuth, Germany

tel. 0921-1511-254
fax 0921-1511-255
mobil 0179-5102577

info@cytox.de
www.cytox.de

Prüfobjekt: 08.06.20

AgSept Protect Lösung

Durchgeführt im Auftrag von:

B + H Solutions GmbH
Schnaiter Str. 11-13

D- 73630 Remshalden

Eingang des Prüfmaterials: 18.05.20 Durchführung der Prüfung: 22.05.20

Ergebnis **Die AgSept Protect Lösung zeigt keine hautirritierende Wirkung.**

Beschreibung und Durchführung der Prüfung:

Angewandte Normen: ISO 10993-1 (2018), ISO 10993-10 (2013), OECD TG 439

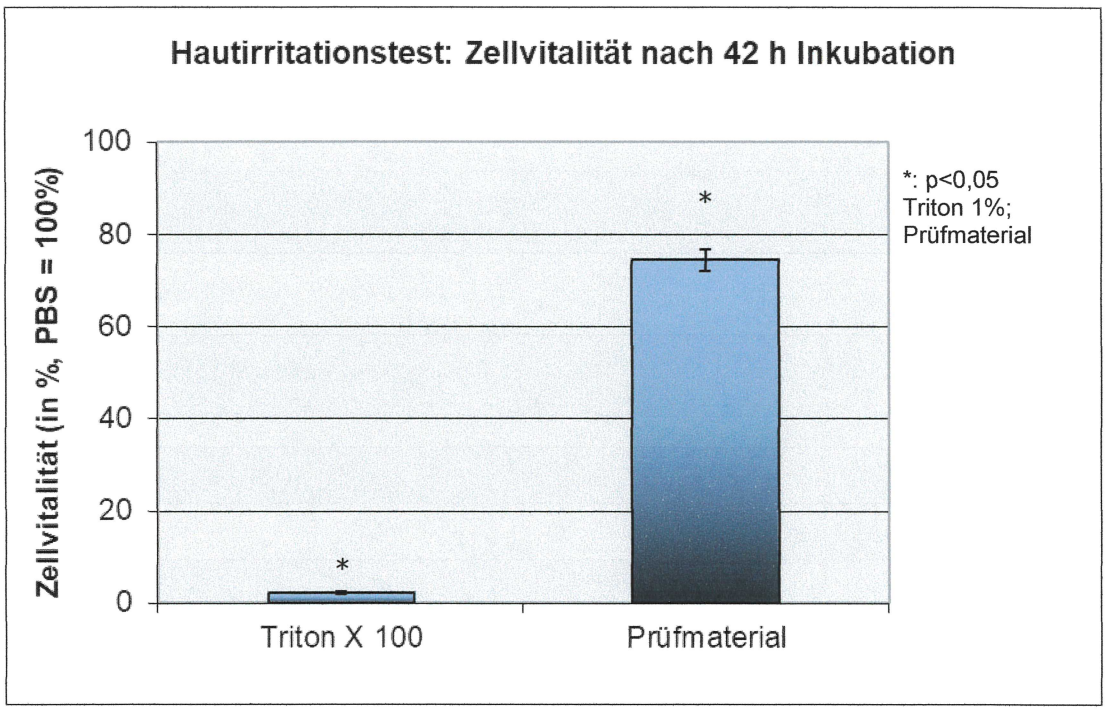
Auf der Grundlage von ISO-10993-1 (2018) und ISO 10993-10 (2013) wurde eine *in vitro* Prüfung zur Bestimmung der hautirritierenden Wirkung durchgeführt. Verwendet wurde ein *in vitro* rekonstituiertes, humanes, epidermales 3D-Hautkulturmodell, Typ epiCS, Lot-Nr. 100-AJ0848-1. Die Prüfung wurde auf der Grundlage der ECVAM Arbeitsstandards durchgeführt.
Die Inserts mit den Hautkulturmodellen wurden 24 h vor Verwendung in frischem Maintenance Medium im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.
Nach dieser Vorkultivierung wurde auf jedes Insert zur Benetzung 50 µl steriles PBS pipettiert.
Als (hautirritierende) Positivkontrolle wurde nun auf je ein Insert 50 µl Triton X 100 steril aufgebracht, als (nicht hautirritierende) Negativkontrolle auf je ein Insert 50 µl PBS. Auf die dritte Insertgruppe wurde steril je 50 µl des zu prüfenden Produkts auf die jeweilige Insertoberfläche aufgebracht.
Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden alle Inserts intensiv mit sterilem PBS gewaschen, trockengetupft und in Zellkulturplatten mit je 1000 µl pro Kavität Maintenance Medium 42 h im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

Messung der LDH-Freisetzung:
Nach Abschluss der Inkubation wurde pro Kavität je 2 x 100 µl Maintenance-Medium entnommen und hiermit die LDH-Freisetzung der Zellen mittels des „Cytotoxicity Detection Kits (LDH)" von Roche Diagnostics bestimmt.

Messung der Zellvitalität mittels MTT:
Die Inserts wurden steril entnommen, auf Papier trockengetupft und in eine 24-Loch-Zellkulturplatte mit je 300 µl Assay Medium verbracht. Das Assay-Medium enthielt zusätzlich 1mg/ml MTT-Substanz (Sigma M5655). Alle Inserts wurden weitere 3 h im Begasungsbrutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach der Inkubation wurden alle Inserts erneut trockengetupft und in eine neue, leere 24-Loch-Zellkulturplatte gegeben. Jede Kavität mit Insert wurde mit je 2 ml Isopropanol komplett bedeckt, die 24-Loch-Zellkulturplatte mit einer Folie verklebt und 2 h auf einem Plattenschüttler geschüttelt. Jedes Insert wurde nun aufgestochen und der komplette Insertinhalt weitere 10 min auf dem Plattenschüttler geschwenkt. Die Extinktion jedes Isopropanolextraktes wurde bei 570 nm gegen einen Isopropanolblankwert ermittelt. Relativ zum Negativkontrollwert (PBS) wurde nun die Vitalität jedes Hautkulturmodells berechnet.

Ergebnisse:

Vitalitätsbestimmung (MTT-Test)

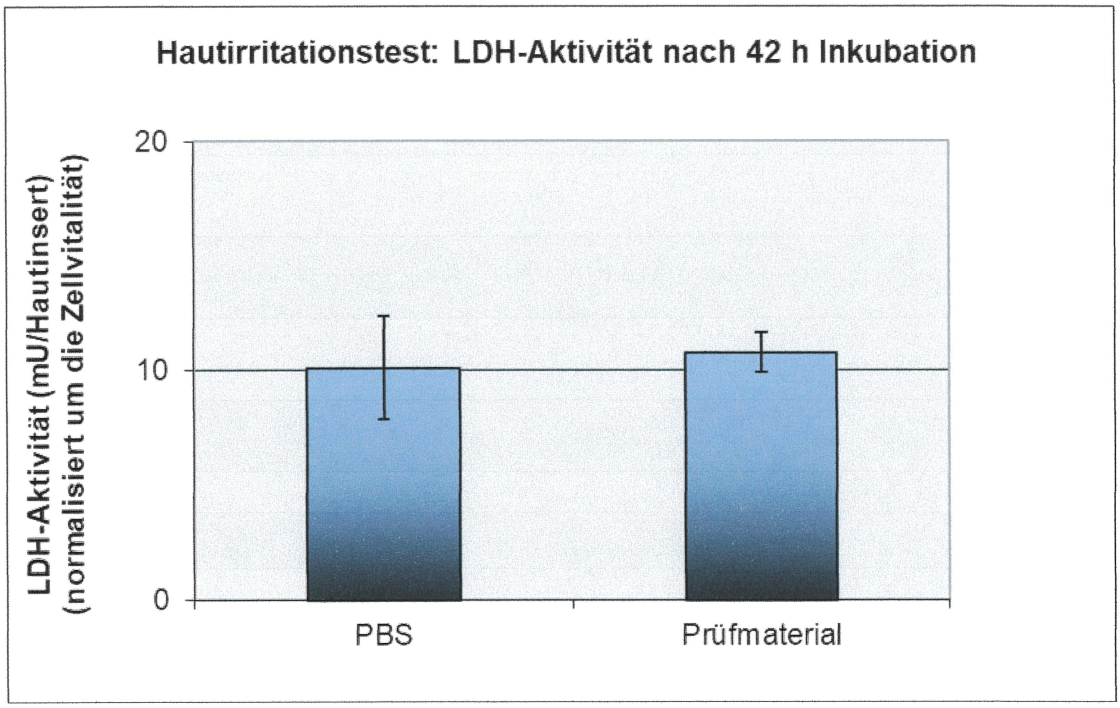


Messwerte (rel. Vitalität)	Versuch doppelt parallel, n=2		
	Triton X 100	PBS	Prüfmaterial
Mittelwert	2,22	100	74,50
Standardabw.	0,24	4,38	2,36

(PBS-Werte nicht in der Grafik dargestellt)

Der Wert der hautirritierenden Positivkontrolle (Triton X 100, 1 %) liegt mit 2,2 % des Negativkontrollwertes im gültigen Bereich unterhalb von 15 % relativ zur PBS-Negativkontrolle.
Vitalitätswerte in Gegenwart von Prüfmaterialien, die den Vitalitätswert der nichthautirritierenden Negativkontrolle um mehr als 50 % unterschreiten, werden als hautirritierend bewertet. Dies ist im vorliegenden Versuch nicht der Fall. Das Prüfmaterial zeigt keine hautirritierende Wirkung.

LDH-Freisetzung



LDH-Freisetzung (mU/ml)	Versuch doppelt parallel, n=2		
	Triton X 100	PBS	Prüfmaterial
Mittelwert	3611,29	10,13	10,80
Standardabw.	92,53	2,27	0,85

(Triton X 100-Werte nicht in der Grafik dargestellt)

Mit dem Testmaterial inkubierte Hautinserts zeigen keine signifikante Erhöhung der LDH-Aktivität im Vergleich zu den mit PBS inkubierten Hautinserts.

Ergebnis	**Die AgSept Protect Lösung zeigt keine hautirritierende Wirkung.**

Erläuterungen / Interpretationen:

keine

Prüfung durchgeführt von: Dietmar Scheddin

genehmigt durch: Dietmar Scheddin
(Dr. D. Scheddin / Geschäftsführer CYTOX)

Hinweis: Die auszugsweise Wiedergabe des Untersuchungsberichtes ist ohne schriftliche Genehmigung von CYTOX nicht gestattet.