

HygCen GmbH • Postfach 11 01 35 • D-19001 Schwerin

TePax GmbH
Oranienstrasse 13
65812 Bad Soden



Akkreditiert durch
Zentralstelle der Länder
für Gesundheitsschutz
bei Arzneimitteln
und Medizinprodukten
ZLG-P-715.98.13

AKS Akkreditierung: AKS-PL-21301
Verzeichnis: www.aks-hannover.de
Staatliche Akkreditierungsstelle Hannover

04.10.2010

**Zytotoxizitätsprüfung nach DIN EN ISO 10993-5
SOP 09-001**

PR Ü F B E R I C H T

Proben-Nr.: SN 10983a

Lieferdatum: 15.09.2010

Produkt: Muster, weiss

Auftraggeber: TePax GmbH

Prüfmethode: Zytotoxizität von Eluaten gemäß DIN EN ISO 10993-5:2009-10
Biologische Beurteilung von Medizinprodukten
Teil 5: Prüfung auf Zytotoxizität
SOP 09-001

Prüfzeitraum: 29.09. – 01.10.2010

Prüfbedingungen: Prüfklima: 24 °C/ 32% rel. Feuchte
Konditionierung: 24 Std.
Die Prüfung erfolgte im Anlieferungszustand.

SN 10983a Seite 1 von 3

Beschreibung der Prüfmethode

Extraktionsbedingungen:	60 cm ² Material in 10 ml MEM + 9 % Serum + 1 % Antibiotikallösung bei 37 °C für 24 h = Extraktionsmedium
Methodik	<p>Zellkultivierung</p> <p>FL-Zellen (American Type Culture Collection CCL 62) sind eine Zelllinie des menschlichen Amnions. Die Vorratshaltung erfolgt in 250 ml Gewebekulturflaschen (Greiner GmbH). Die Zellen werden alle 4 d passagiert. Nach der 100. Passage wurde die Vorratshaltung aus der Stammkultur neu angelegt.</p> <p>Zur Testung werden die Zellen in einer Konzentration von 1-2 x 10⁶ Zellen/ml in Microtiter-Zellkulturtestplatten F96 (Biochrom) eingesät und 20-24h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.</p> <p>Das Anzuchtmedium besteht aus MEM (Minimum Essential Medium) mit 9% FBS (Fötales Kälberserum) sowie Glutamin, Penicillin, Streptomycin und Neomycin.</p>
Exposition	<p>Nach 24h Kultivierung der Zellen in Multiwell-Zellkulturschalen lagen die Zellen als Monolayer vor. Nun wurde ein Mediumwechsel mit Extraktionsmedium vorgenommen. Dazu wurde das Medium dekantiert und das Prüfmedium mit einer Mehrkanalpipette vorsichtig hineinpipettiert (100µl pro Vertiefung).</p> <p>Eine 24 stündige Inkubation im Brutschrank schließt sich an.</p>
Messprinzip	Vitale Zellen nehmen den Farbstoff Neutralrot auf. Zerstörte Zellen können den Farbstoff nicht aufnehmen und bleiben ungefärbt. Die Farbintensität der Elutionslösung wird photometrisch gemessen.
Messung	Nach Abschluss der Inkubation wird die Microtiterplatte mit PBS (Phosphate Buffered Saline) gewaschen und Kulturmedium, das den Farbstoff Neutralrot (50µg/ml) enthält, auf die Zellen pipettiert. Nach einer 3stündigen Inkubation wird die Microtiterplatte erneut gewaschen um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Mit Elutionslösung (1% (V/V) Essigsäure in 50% (V/V) Ethanol) wird der vorhandene Farbstoff aus den Zellen herausgelöst. Nach 1h Stunde Elution erfolgt die photometrische Messung.
Kontrollen	Als Negativkontrolle wurde Zellmedium ohne Prüflösung inkubiert. Zur Überprüfung der Sensitivität des Testsystems wurde zusätzlich als Positivkontrolle 1,5mg/ml Natriumdodecylsulfat (SDS) in Kulturmedium im Test eingesetzt.
Auswertung	Die Zellzahl von 12 Parallelansätzen wurde ermittelt und anschließend statistisch ausgewertet.

Abbildung 1: Boxplot der Zellvitalität

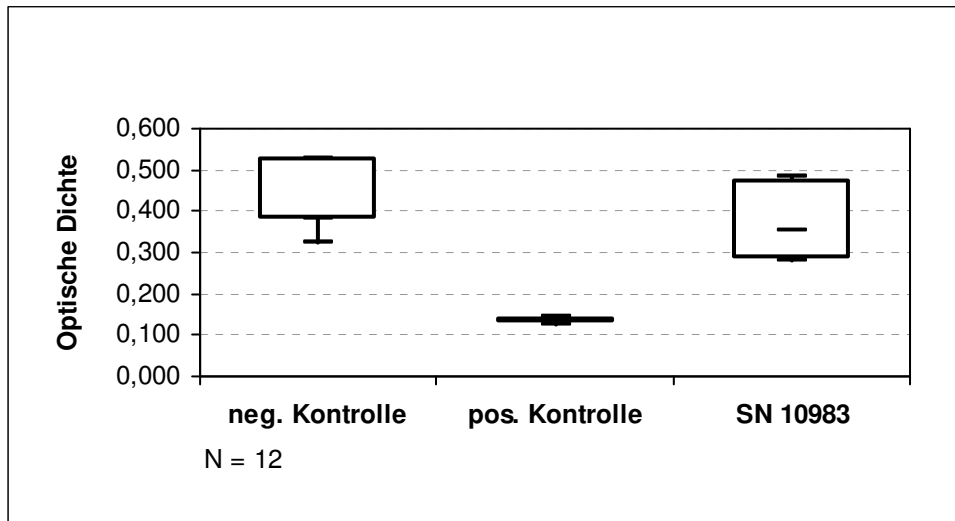


Tabelle 1: Deskriptive Statistik (Zellvitalität)

	N	Mean	Zellvitalität (%)	Minimum	Maximum	Std. Deviation	p*
Negativ-Kontrolle	9	0,437	100,00	0,326	0,529	0,089	-
Positiv-kontrolle	9	0,137	31,27	0,128	0,144	0,007	-
SN 10983	12	0,370	84,67	0,280	0,485	0,091	0,9756

*U-Test nach Mann-Whitney vs. Kontrolle

HygCen
 Centrum für Hygiene und medizinische Produktsicherheit

Prof. Dr. med. H.-P. Werner
 Wissenschaftlich-technischer Leiter

Dipl. Umweltwiss. J. Köhnlein
 stellv. Bereichsleiterin