HOHENSTEIN

Hohenstein Laboratories · Schloss Hohenstein · 74357 Bönnigheim

Brenmoor Ltd.
18 Ryefield Business Park
Belton Road
Silsden
WEST YORKSHIRE, BD20 OEE
UNITED KINGDOM

Hohenstein Laboratories GmbH & Co. KG

Schloss Hohenstein
74357 Bönnigheim · Germany

Hygiene, Umwelt & Medizin
Hygiene, Environment & Medicine
Telefon / *Phone* +49 7143 271 444
Fax +49 7143 271 94421
bioservice@hohenstein.de

Zuständig für Rückfragen / *Contact person*	Unser Zeichen / *Our ref.*	Datum / *Date*
Anne te Boekhorst	prof. dh-atb	15. Oktober 2015

Prüfbericht Nr. / *Test report no.* 15.8.5.0149/4

Mitgeltender Prüfbericht / Applicable document 15.8.5.0127

Auftraggeber: *Client:*	siehe Anschrift *see address*
Prüfgegenstand: *Test sample:*	siehe Seite 2 *see page 2*
Auftragsdatum: *Date of order:*	08.06.2015 und / *and* 08.07.2015
Eingang Prüfgegenstand: *Receipt of test samples:*	08.05.2015 und / *and* 08.07.2015
Prüfzeitraum: *Period of testing:*	08.06.2015 bis / to 26.06.2015 und / *and* 13.07.2015 bis / to 17.07.2015
Probenahme: *Sampling:*	Der Prüfgegenstand wurde uns vom Auftraggeber übersandt *The test sample has been delivered to us by the client*

Der Prüfbericht umfasst 6 Seiten. / The test report comprises 6 pages.

UNTERSUCHUNGSZIEL / *AIM OF TEST*

In vitro Screening Test zur Untersuchung des sensibilisierenden Potenzials eines textilen Prüfgegenstands.

In vitro screening test for investigation of the sensitizing potential of a test sample.

PRÜFGEGENSTAND / *TEST SAMPLES*

Probennr. / *Sample n°*	Prüfgegenstand / *Test sample*
15.8.5.0149-3	Wristband FAST100 (ALL FAST100, FAST15, INFAFAST, TODFAST RANGES
15.8.5.0149-4	Wristband FAST100-LCB (ALL FAST100-LCB, FAST15-LCB, INFAFAST-LCB, TODFAST-LCB RANGES)
15.8.5.0149-5	Babysoft Wristband (ALL BABYSOFT & UNISOFT RANGES)
15.8.5.0149-6	Babysoft Foam Sleeve (ALL BABYSOFT AND UNISOFT RANGES)
15.8.5.0189	ECO RANGE MATERIAL

METHODE / *METHODS*

PRÜFGRUNDLAGE

AW-QM-11.08.03.068 RevSta 1[A]
in Verbindung mit DIN EN ISO 10993-12: 2012-10 und DIN EN ISO 105-E04: 2013-08
Mit Biokompatibilitätsuntersuchungen nach DIN EN ISO 10993 wird die biologische Verträglichkeit von Produkten geprüft. Der Sensibilisierungstest greift den Testansatz in der Norm DIN EN ISO 10993-10 auf.

Zelllinie
U937 Histiozyten (Immunzellen)

Kulturmedium
RPMI mit 25mM HEPES, 2 % L-Glutamin und 10 % FCS

Extraktionsverfahren
Inkubation des Prüfgegenstands mit saurer Schweißlösung nach Norm DIN EN ISO 105-E04 für 24 Std. unter leichtem Schütteln bei 37 °C; der Original-Schweißextrakt wird auf pH 7,3 - 7,4 eingestellt und sterilfiltriert.

Inkubation der Zellkultur
48 Std. mit Original-Schweißextrakt

Auswertung
Die Zellen reagieren auf sensibilisierende Substanzen, indem sie bestimmte Oberflächenmarker ausbilden. An diese Oberflächenmarker werden spezifisch Antikörper gebunden, die mit einem Fluoreszenz-farbstoff gekoppelt sind. Mittels Durchflusszytometrie wird der prozentuale Anteil der so markierten Zellen bestimmt. Daraus berechnet sich die „Relative Fluoreszenz-Intensität“ (RFI).

TEST SPECIFICATION

AW-QM-11.08.03.068 RevSta 1[A]
in addition with DIN EN ISO 10993-12: 2012-10 and DIN EN ISO 105-E04: 2013-08
With biocompatibility according to DIN EN ISO 10993 biocompatibility of products is tested. The Sensitization Test makes use of the test principles described in the standard DIN EN ISO 10993-10.

Cell line
U937 histiocytes (immune cells)

Culture medium
RPMI with 25mM HEPES, 2 % L-Glutamine and 10 % FBS

Extraction process
Incubation of test sample with an acid perspiration solution according to DIN EN ISO 105-E04 for 24 hours with slight shaking at 37 °C; the original perspiration extract is adjusted to pH 7.3 to 7.4 and sterilised by filtration.

Incubation of cell culture
48 hours with original perspiration extract

Evaluation
The cells respond to sensitizing substances by expression of surface markers. Specific antibodies labelled with fluorescent dyes bind to these surface markers. Using flow cytometry the percentage of the fluorescent cells are detected. Depending on these values the “relative fluorescent intensity” (RFI) is calculated.

Kontrollen

Lösungsmittelkontrolle: Schweißlösung (pH 7,3 - 7,4)

Positivkontrolle: 1 µg / ml DNCB in Schweißlösung

Negativkontrolle: 0,2 % DMSO in Schweißlösung

Controls

Solvent control: Perspiration solution (pH 7.3 to 7.4)

Positive control: 1 µg / ml DNCB in perspiration solution

Negative control: 0,2 % DMSO in perspiration solution

BERECHNUNGSGRUNDLAGE

Die Berechnung der Relativen Fluoreszenz-Intensität erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{RFI} = \frac{\text{MFI chem. behandelte Zellen} - \text{MFI chem. behandelte Isotypkontrollzellen}}{\text{MFI mit Schweißlösung behandelte Zellen} - \text{MFI mit Schweißlösung behandelte Isotypkontrollzellen}}$$

RFI: Relative Fluoreszenz-Intensität
MFI: Mittlere Fluoreszenz-Intensität

CALCULATION

The calculation of the relative fluorescent intensity is:

$$\text{RFI} = \frac{\text{MFI chem. treated cells} - \text{MFI chem treated isotypecontrol cells}}{\text{MFI with perspiration solution treated cells} - \text{MFI with perspiration solution treated isotypecontrol cells}}$$

RFI: relative fluorescent intensity
MFI: mean fluorescent intensity

ERGEBNIS / *RESULT*

Kontrollen / *controls*:

	MFI Mittelwert / *MFI average value* in %		Relative Fluoreszenz-Intensität / *relative fluorescent intensity* in %	
	Antikörper / *antibody*	Isotyp-Kontrolle / *isotype control*		Limit
Negativkontrolle / *Negative control*	3,76	0,13	**88**	**< 120**
Lösungsmittelkontrolle / *Solvent control*	4,39	0,25	**100**	**100**
Positivkontrolle / *Positive control*	5,59	0,41	**125**	**> 120**

Prüfgegenstand / *test sample*:

	MFI Mittelwert / *MFI average value* in %		Relative Fluoreszenz-Intensität / *relative fluorescent intensity* in %	
	Antikörper / *antibody*	Isotyp-Kontrolle / *isotype control*		Limit
15.8.5.0149-3	5,52	0,84	**113**	**> 120**
15.8.5.0149-4	4,92	0,42	**109**	
15.8.5.0149-5	4,55	0,34	**102**	
15.8.5.0149-6	4,90	0,47	**107**	

Versuchsdurchführung: atb, pli *Test performance: atb, pli*

Kontrollen / *controls*:

	MFI Mittelwert / *MFI average value* in %		Relative Fluoreszenz-Intensität / *relative fluorescent intensity* in %	
	Antikörper / *antibody*	Isotyp-Kontrolle / *isotype control*		Limit
Negativkontrolle / *Negative control*	0,63	0,04	**90**	**< 120**
Lösungsmittelkontrolle / *Solvent control*	0,67	0,01	**100**	**100**
Positivkontrolle / *Positive control*	1,01	0,01	**153**	**> 120**

Prüfgegenstand / *test sample*:

	MFI Mittelwert / *MFI average value* in %		Relative Fluoreszenz-Intensität / *relative fluorescent intensity* in %	
	Antikörper / *antibody*	Isotyp-Kontrolle / *isotype control*		Limit
15.8.5.0189	0,72	0,01	**108**	**< 120**

Versuchsdurchführung: atb *Test performance: atb*

ZUSAMMENFASSUNG / *CONCLUSION*

Die Prüfung auf Sensibilisierung erlaubt die Beurteilung eines Gefahrenpotenzials der untersuchten Substanzen, Allergien auszulösen. Dieses wird als Summenparameter erfasst. Der Test ist keine Analytik zu allergie-auslösenden Einzelsubstanzen.

The examination on sensitization permits the evaluation of a risk potential to trigger hypersensitivity. This potential is recorded as sum parameter. The test is no analysis of single allergenic substances.

BEURTEILUNGSKRITERIEN

Durch sensibilisierende Substanzen werden U937 Zellen dazu angeregt, Oberflächenmarker zu bilden, an die spezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper gebunden werden können. Im Durchflusszytometer wird der prozentuale Anteil der positiven Zellen über die Fluoreszenz-Intensität bestimmt. Diese Werte bilden die Berechnungsgrundlage für den RFI nach oben stehender Gleichung. Proben mit einem RFI von **120 % und höher** werden als potenziell sensibilisierend gewertet (Bauch *et al.* [Regul Toxicol Pharmacol(2012) 63:489-504]).

ASSESSMENT CRITERIA

*In the presence of sensitizing substances, U937 cells are stimulated to express surface markers to which specific fluorescent labelled antibodies are bound. The percentage of positive cells is detected via fluorescent intensity with flow cytometry. These data provide the basis of RFI calculation (see equation above). Samples with an RFI of **120 % and above** are assessed as potentially sensitizing (Bauch et al. [Regul Toxicol Pharmacol(2012) 63:489-504]).*

BEURTEILUNG

ASSESSMENT

- Probe / *Sample* 15.8.5.0149-3

Unter den angegebenen Bedingungen zeigte der Schweißextrakt der Probe einen RFI-Wert von 113 %. Dies bedeutet, die Probe zeigt in diesem Test keine biologische Aktivität. **Ein Sensibilisierungspotential wurde nicht festgestellt**.

*The perspiration extract of the test material showed an RFI of 113 % under the mentioned test conditions. That means that the test material shows in this test no significant biological activity. **A sensitizing potential was not detected.***

- Probe / *Sample* 15.8.5.0149-4

Unter den angegebenen Bedingungen zeigte der Schweißextrakt der Probe einen RFI-Wert von 109 %. Dies bedeutet, die Probe zeigt in diesem Test keine biologische Aktivität. **Ein Sensibilisierungspotential wurde nicht festgestellt**.

*The perspiration extract of the test material showed an RFI of 109 % under the mentioned test conditions. That means that the test material shows in this test a significant biological activity. **A sensitizing potential was not detected.***

- Probe / *Sample* 15.8.5.0149-5

Unter den angegebenen Bedingungen zeigte der Schweißextrakt der Probe einen RFI-Wert von 102 %. Dies bedeutet, die Probe zeigt in diesem Test keine biologische Aktivität. **Ein Sensibilisierungspotential wurde nicht festgestellt**.

*The perspiration extract of the test material showed an RFI of 102 % under the mentioned test conditions. That means that the test material shows in this test no significant biological activity. **A sensitizing potential was not detected.***

- Probe / *Sample* 15.8.5.0149-6

Unter den angegebenen Bedingungen zeigte der Schweißextrakt der Probe einen RFI-Wert von 107 %. Dies bedeutet, die Probe zeigt in diesem Test keine biologische Aktivität. **Ein Sensibilisierungspotential wurde nicht festgestellt**.

*The perspiration extract of the test material showed an RFI of 107 % under the mentioned test conditions. That means that the test material shows in this test no significant biological activity. **A sensitizing potential was not detected.***

HOHENSTEIN

▪ Probe / *Sample* 15.8.5.0189

Unter den angegebenen Bedingungen zeigte der Schweißextrakt der Probe einen RFI-Wert von 108 %. Dies bedeutet, die Probe zeigt in diesem Test keine biologische Aktivität. **Ein Sensibilisierungspotential wurde nicht festgestellt**.

The perspiration extract of the test material showed an RFI of 108 % under the mentioned test conditions. That means that the test material shows in this test no significant biological activity. ***A sensitizing potential was not detected.***

Schloss Hohenstein, 15. Oktober 2015

Der Geschäftsführer
Managing Director

Prof. Dr. Dirk Höfer

Hohenstein Laboratories · Schloss Hohenstein ·

Bereichsleiterin
Hygiene, Umwelt & Medizin
Head of Division
Hygiene, Environment & Medicine

Dr. Anja Gerhardts

"The translation was carried out to the best of a non-native speaker's knowledge. Liability cannot be taken."

Das Ergebnis bezieht sich nur auf die eingereichten Prüfgegenstände. Der Bericht darf nicht auszugsweise, sondern nur in seinem vollen Umfang weitergegeben werden. Eine Benutzung des Berichts zu Werbezwecken oder die Veröffentlichung freier Interpretationen der Ergebnisse ist nur mit ausdrücklicher Genehmigung der Hohenstein Institute zulässig. Rechtsverbindlich ist der im Original unterschriebene Bericht. Die vom Kunden übergebenen Unterlagen bzw. Materialien, insbesondere Prüfgegenstände, werden, soweit die Beschaffenheit dies zulässt, 3 Monate bei uns aufbewahrt. Für den gesetzlich geregelten Bereich der Persönlichen Schutzausrüstung und Medizinprodukte gilt eine Aufbewahrungsfrist von 10 Jahren.
The results relate only to the test samples submitted. This report must only be reproduced in full and not in extract form. Use of the report in advertising or the publication of free interpretations of the results is only allowed with the express permission of the Hohenstein Institute. Only the signed original report is legally binding. Documents and materials delivered by the client, especially test samples, will be retained by us for 3 months, provided their condition allows it. For Personal Protective Equipment (PPE) and medical devices, which is regulated by law, a retention period of 10 years is applicable.