



Headquarters

Testing Laboratory
HygCen Germany GmbH
Bornhövedstrasse 78
19055 Schwerin

Phone: +49 [0] 385 477 419 00
Email: info@hygcen.de
Web: www.hygcen.de
Follow us on LinkedIn

Mack4D GmbH
Lippendorf 16
04575 Neukieritzsch



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

2024-11-29

PRÜFBERICHT / TEST REPORT

Prüfungsnummer / <i>test id</i> :	2024-2845
Probennummer / <i>sample id</i> :	SN 39833
Prüfprodukt / <i>test sample</i> :	audio - mold
Auftraggeber / <i>client</i> :	Mack4D GmbH
Hersteller / <i>manufacturer</i> :	Mack4D GmbH
Auftragsdatum / <i>date of order</i> :	2023-11-30
Prüfzeitraum / <i>test period</i> :	2024-10-11 bis / <i>to</i> 2024-10-18
Prüfmethode / <i>test method</i> :	OECD 442D und / <i>and</i> EN ISO 10993-10 Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 10: Prüfung auf Hautsensibilisierung <i>Biological evaluation of medical devices - Part 10: Test for skin sensitisation</i>
Information / <i>information</i> :	keine / <i>none</i>

Identifizierung der Probe / identification of the sample

Probennummer / <i>sample id</i> :	SN 39833
Prüfprodukt / <i>test sample</i> :	audio - mold
Chargennummer / <i>batch number</i> :	-
Lieferdatum / <i>date of delivery</i> :	2024-09-05
Lieferzustand / <i>delivery state</i> :	unsteril / <i>non-sterile</i>
Sterilisationsmethode / <i>method of sterilisation</i> :	keine Angaben / <i>no details</i>
Lagerbedingung / <i>storage condition</i> :	dunkel und unbehandelt / <i>dark and untreated</i>
Aussehen / <i>appearance</i> :	Fotodokumentation in Anlage A / <i>photo documentation in annex A</i>
Bestimmungsgemäße Anwendungsart gemäß Herstellerangaben / <i>intended use according to the manufacturer</i> :	keine Angaben / <i>no details</i>

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

Prüfmethode / test method:	OECD 442D (2024) und EN ISO 10993-10 (2023) Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 10: Prüfung auf Hautsensibilisierung KeratinoSens™ OECD 442D (2024) and EN ISO 10993-10 (2023) Biological evaluation of medical devices - Part 10: Test for skin sensitisation KeratinoSens™ SOP 09-013, REV010
Prüftemperatur / test temperature:	20.0°C
Rel. Luftfeuchtigkeit / rel. humidity:	48%
Probenbehandlung / sample handling:	Das Prüfprodukt wurde im Anlieferungszustand geprüft. <i>The test sample was tested in the delivery state.</i>
Extraktionsbedingung / extraction condition:	EN ISO 10993-12 (2021)
Extraktionsverhältnis / extraction ratio:	3cm ² /ml
Extraktionsmenge und volumen / sample amount and volume:	<u>Extraktion 1 / extraction 1:</u> 49,77cm ² Material in 16,59ml Extraktionsmedium / 49.77cm ² material in 16.59ml extraction medium <u>Extraktion 2 / extraction 2:</u> 49,77cm ² Material in 16,59ml Extraktionsmedium / 49.77cm ² material in 16.59ml extraction medium
Extraktionsmedium / extraction medium:	DMEM GlutaMax + 9% fetales Kälberserum + 1% Antibiotikallösung + L-Glutamin (Komplettmedium) + 10% DMSO / DMEM GlutaMax + 9% fetal bovine serum + 1% antibiotic solution + L-glutamine (complete medium) + 10% DMSO
Extraktionsdauer / duration of extraction:	72h ± 2h
Extraktionstemperatur / temperature of extraction:	37°C ± 1°C

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method**Extrakt / extract**

pH-Wert / <i>pH-value</i> :	Extraktion 1 / <i>extraction 1</i>	= 8.00
	Extraktion 2 / <i>extraction 2</i>	= 8.01
Farbe / <i>colour</i> :	Extraktion 1 / <i>extraction 1</i>	= pink / <i>pink</i>
	Extraktion 2 / <i>extraction 2</i>	= pink / <i>pink</i>

Bemerkung/Auffälligkeit während des Tests / <i>unusual feature observed</i> :	keine / <i>none</i>
---	---------------------

Kommentar / <i>comment</i> :	-
------------------------------	---

Extraktion durchgeführt von / <i>extraction performed by</i> :	Celine Fengler
--	----------------

Prüfanforderung / test requirement:

OECD 442 (2024) und / <i>and</i> EN ISO 10993-10 (2023):	Induktion der Luziferaseaktivität kleiner als 1,5 / <i>induction of the luciferase activity less than 1.5</i>
---	--

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

Der KeratinoSens™ Assay stellt ein Verfahren dar, welches nach OECD TG 442D (2024) bereits etabliert ist und in der EN ISO 10993-10 (2023) – (Biologische Beurteilung von Medizinprodukten – Teil 10: Prüfungen auf Hautsensibilisierung) als Beispiel für in vitro Versuche zur Sensibilisierung aufgeführt wird.

Im KeratinoSens™-Test wird eine immortalisierte, adhärente Zelllinie aus menschlichen Keratinozyten verwendet, die ein Luciferase-Reportergen enthält, das durch das antioxidative Reaktionselement (en: antioxidant response element, ARE) des menschlichen AKR1C2-Gens kontrolliert wird, von dem bekannt ist, dass es durch hautsensibilisierende Substanzen hochreguliert wird.

The KeratinoSens™ assay is a method which is already established according to OECD TG 442D (2024) and which is included in EN ISO 10993-10 (2023) – (Biological assessment of medical devices – Part 10: Tests for skin sensitisation) as an example for in vitro experiments concerning sensitization.

The KeratinoSens™ test uses an immortalized, adherent cell line from human keratinocytes that contains a luciferase reporter gene that is controlled by the antioxidant response element (ARE) of the human AKR1C2 gene, which is known to that it is upregulated by skin-sensitising substances.

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

Zellkultivierung / cell culture:

KeratinoSens™-Zellen (KeratinoSens, keratinocyte ARE/Nrf2 reporter cell line) sind eine adhärenzte Zelllinie der humanen Epidermis.

KeratinoSens™ und LuSens sind zellbasierte Reportergergen-Assays, die das zweite Schlüsselereignis im Adverse Outcome Pathway für die Hautsensibilisierung modellieren, nämlich die Keratinozytenaktivierung. Die Assays messen die Induktion eines stabil transfizierten Luciferase-Gens unter der Kontrolle des Antioxidans-Response-Elements (ARE), das vom menschlichen AKR1C2- oder Ratten-NQO1-Gen abgeleitet ist.

Die Vorratshaltung erfolgt in 250ml Gewebekulturflaschen. Die Zellen werden alle 3-4 Tage passagiert. Nach der 50. Passage wurde die Vorratshaltung aus der Stammkultur neu angelegt. Zur Testung werden die Zellen in einer Konzentration von $0,8 \times 10^5$ Zellen/ml in Microtiter-Zellkulturtestplatten TPP F96 eingesät und 24h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das Anzuchtmedium besteht aus DMEM Glutamax mit 10% FBS und 500µg/ml Geneticin Antibiotikallösung.

KeratinoSens™ cells (KeratinoSens, keratinocyte ARE / Nrf2 reporter cell line) are an adherent cell line of the human epidermis. KeratinoSens™ and LuSens are cell-based reporter gene assays that model the second key event in the adverse outcome pathway for skin sensitisation, namely keratinocyte activation. The assays measure the induction of a stably transfected luciferase gene under the control of the Antioxidant Response Element (ARE), which is derived from the human AKR1C2 or rat NQO1 gene.

They are stored in 250ml tissue culture flasks (T75). The cells are passaged every 3-4 days. After the 50th passage, the stockpile was re-established from the stock culture. For testing, the cells are used in a concentration of 0.8×10^5 cells/ml were seeded into microtiter cell culture test plates TPP F96 and incubated for 24h at 37°C. and 5% CO₂ in an incubator. The growth medium consists of DMEM Glutamax with 10% FBS and 500µg/ml Geneticin antibiotic solution.

Extrakte / extracts:

Wenn nicht anders beschrieben werden Extrakte gemäß EN ISO 10993-12 (2021) hergestellt mit 10% DMSO über 72h bei 37°C. Extrakte werden normalerweise frisch vor der Prüfung hergestellt. Sollte eine Lagerung notwendig sein, wird der Extrakt bei -20°C gelagert (bis zu 48 Stunden). Vor Aufbringen des Extraktes werden entsprechend Mertl et al. 2019 entsprechende Extraktkonzentrationen (0.03125 – 1%) hergestellt.

Extracts are produced according to EN ISO 10993-12 (2021) with 10% DMSO for 72 hours at 37°C, unless otherwise specified. Extracts are usually made fresh before testing. If storage is necessary, the extract is stored at -20°C (up to 48 hours). Before applying the extract on the cells, according to Mertl et al. 2019 corresponding extract concentrations (0.03125 – 1%) are made.

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

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 (200µl pro Vertiefung).
Das Prüfmedium entspricht 0,03125- 1% des entsprechenden Extraktes mit 1% FBS und 1% DMSO-Anteil.
Eine Inkubation für 48 Stunden im Brutschrank schließt sich an.
*After culturing the cells in multiwell cell culture dishes for 24 hours, the cells were present as a monolayer. A medium change with test medium was now carried out. For this purpose, the medium was decanted and the test medium carefully pipetted into it (200µl per well).
The test medium corresponds to 0.03125-1% of the corresponding extract with 1% FBS and 1% DMSO.
This is followed by incubation for 48 hours in the incubator.*

**Luciferaseaktivität
Methode / luciferase
activity method:**

Nach dem Waschen der Zellen wird in die Vertiefungen der 96-Well Platten zunächst der Lysepuffer und anschließend das Luciferasesubstrat dazugegeben.
Bei Vorhandensein von hautsensibilisierenden Faktoren kommt es im Verlauf der Inkubationszeit zur einer Hochregulierung des Luciferase-Gens und damit zu einer Steigerung des Enzyms Luciferase. Das Substrat wird von der Luciferase umgesetzt, was zu einem Lumineszenz-Signal führt, welches mittels Photometer messbar wird.
*After washing the cells, first the lysis buffer and then the luciferase substrate are added to the wells of the 96-well plates.
If skin-sensitising factors are present, the luciferase gene is upregulated over the incubation period and the enzyme luciferase is increased. The substrate is converted by the luciferase, which leads to a luminescence signal, which can be measured using a photometer.*

**Zellvitalitätsassay MTT/
cell vitality via MTT:**

Parallel zur Luciferaseaktivität wird die Zellvitalität bestimmt.
Vitale Zellen reduzieren den wasserlöslichen Farbstoff MTT in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan.
Tote bzw. nicht vitale Zellen können den Farbstoff nicht reduzieren und erscheinen daher nicht blau-violett sondern eher gelblich. Die Farbintensität der Elutionslösung wird photometrisch gemessen.
*The cell vitality is determined parallel to the luciferase activity.
Vital cells reduce the water-soluble dye MTT into a blue-violet, water-insoluble formazan.
Dead or non-vital cells cannot reduce the dye and therefore do not appear blue-violet but rather yellowish. The color intensity of the elution solution is measured photometrically.*

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

Kontrollen / controls: In jedem Lauf wird eine Negativkontrolle/Lösungsmittel/Extraktionsmittel getestet. Als Kontrolle wird die DMSO-Lösungsmittelkontrolle verwendet, und jede Testplatte enthält mindestens 6x die DMSO-Kontrolle, wie unten angegeben.
A negative control / solvent / extractant is tested in each run. The DMSO solvent control is used as a control, and each test plate contains at least 6x the DMSO control, as indicated below.

Zellvitalität MTT
 Ergebnisauswertung / cell vitality
 MTT result evaluation:

Die optische Dichte (A_{570}) wird ermittelt. Eine Zellvitalität von weniger als 70% bezogen auf die Negativkontrolle gilt als signifikant zytotoxisches Ergebnis und die entsprechenden Konzentrationen des Extraktes des Prüfprodukts werden in der Induktionsbetrachtung zur Luciferaseaktivität rausgenommen.
The optical density (A_{570}) is determined. A cell vitality of less than 70% based on the negative control is considered a significantly cytotoxic result and the corresponding concentrations of the extract of the test product are excluded from the induction analysis for the luciferase activity.

Luciferase Induktion
 Ergebnisauswertung / luciferase
 induction result evaluation:

Ein positiver Befund ist gegeben, wenn die folgenden 3 Konditionen in 2 aus 2 oder 2 aus 3 Wiederholungen zutreffen:

- $I_{\max}$ ist $\geq 1,5$ mal statistisch höher als die der DMSO Kontrollen (zweiseitiger t-test)
- Zellvitalität ist $>70\%$ in die niedrigsten Induktionskonzentration, welche größer als 1,5-fach ist ($EC_{1.5}$)
- Die Induktion der Luciferaseaktivität ist proportional zur Dosis (oder biphasisch).
- Sollte ein grenzwertiges Ergebnis der Induktion zwischen 1,35 – 1,67 vorliegen, wird dies entsprechend der OECD 442D (2024) in einem weiteren Experiment statisch verifiziert.

A positive result is given if the following 3 conditions apply in 2 out of 2 or 2 out of 3 repetitions:

- *$I_{\max}$ is ≥ 1.5 times statistically higher than that of the DMSO controls (two-sided t-test)*
- *Cell vitality is $> 70\%$ in the lowest induction concentration, which is greater than 1.5-fold ($EC_{1.5}$)*
- *The induction of luciferase activity is proportional to the dose (or biphasic).*
- *If a borderline induction result between 1.35 - 1.67 is obtained, this is verified statically in a further experiment in accordance with OECD 442D (2024).*

Prüfverfahrensbeschreibung / *description of the test method*

Verwendete Reagenzien /
used reagents:

siehe Anlage B / *see annex B*

Laboranalyse durchgeführt von /
lab analysis performed by:

Celine Fengler

Prüfergebnisse / test results OECD 442 und / and EN ISO 10993-10

Figure 1: Luciferase activity versus viability

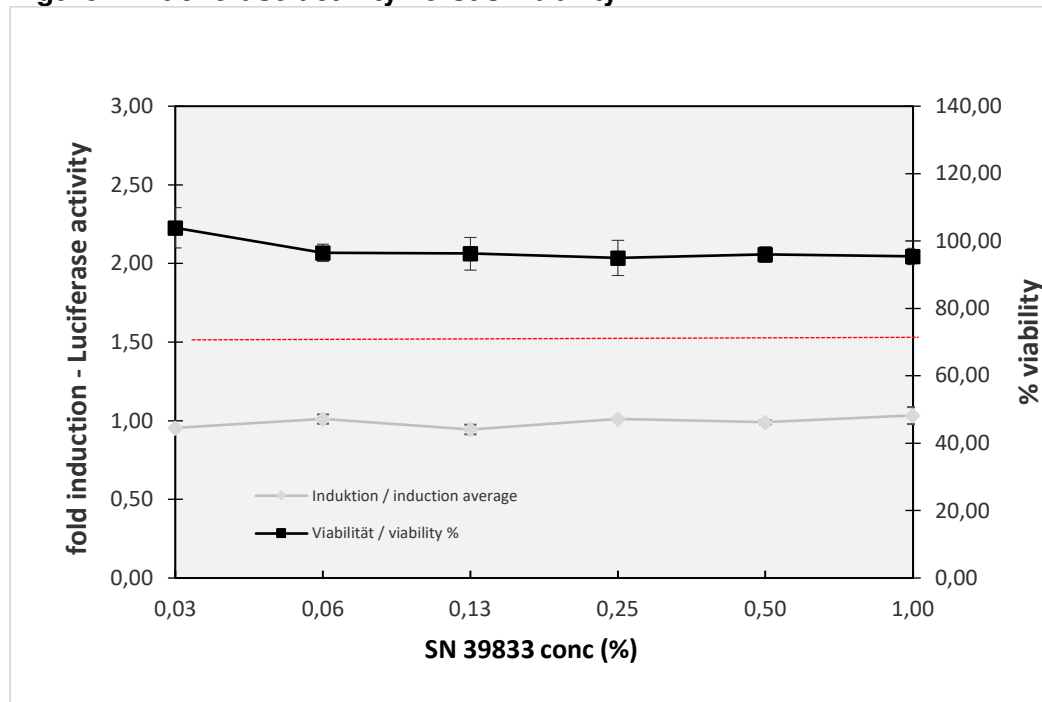


Table 1: Descriptive statistic

DMSO control						Acceptance criteria / result -
Viability in %	100.00					accepted
Induction average	1.05					accepted
Pos. control Cinnamic aldehyde In μM	4	8	16	32	64	
Viability in %	90.32	93.30	90.49	59.25	7.66	accepted
Induction average	1.29	1.57	3.25	13.33	0.12	accepted

SN 39833 Extract in %	0.031	0.063	0.125	0.250	0.500	1.000	Acceptance criteria / result -
Viability %	103.94	96.54	96.28	95.00	96.03	95.43	accepted
Induction average	0.95	1.01	0.95	1.01	0.99	1.03	-
Max. induction in comparison to neg. control	1.03						not sensitising

Legende / legend

DMEM	Minimum Essential Medium / <i>minimum Essential Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid / <i>Dimethyl sulfoxide</i>
FBS	Fötales Kälberserum / <i>fetal bovine serum</i>
$I_{\max}$	Maximale Induktion / <i>maximum induction</i>
OD	Optische Dichte / <i>optical density</i>
OD (A)	Absorption / <i>absorbance</i>
μl	Mikroliter / <i>microlitres</i>
μM	Mikromolar / <i>micromolar</i>



Zusammenfassung / summary

**Abweichung /
deviation:**

Beobachtete Abweichungen von den geltenden Normen und Verfahren /
observed deviations from applicable standards and procedures:

keine / *none*

**Schlussfolgerung /
conclusion:**

Nach OECD 442D und EN ISO 10993-10 (2023) resultierten die Extrakte des Prüfproduktes „audio - mold“ in einer Induktion der Luziferaseaktivität von kleiner als 1,5mal im Vergleich zur DMSO Kontrolle und sind damit als nicht sensibilisierend zu bewerten.

According to OECD 442D and EN ISO 10993-10 (2023), the extracts of the tested test sample “audio - mold” resulted in an induction of the luciferase activity of less than 1.5 times compared to the DMSO control and is therefore to be assessed as non-sensitising.

Archivierung / archiving:

Eine Ausfertigung des Berichtes wird zusammen mit den Rohdaten im Archiv des Auftragnehmers aufbewahrt. / *A copy of the test report will be kept together with the raw data in the contractor’s archive.*

Hinweis / note: Die Prüfergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die genannten Prüfprodukte. Auszugsweise Wiedergabe dieses Berichtes nur mit schriftlicher Genehmigung der HygCen Germany GmbH. / *The test results refer only of the named test samples. Reproduction of any part of this report requires the written permission of HygCen Germany GmbH.*

Prüfberichtshistorie / test report history

Ref.	Ausgabedatum / date of issue	Kommentar / comment	Genehmigt durch / approved by
001	2024-10-29	-	Nicole Möller-Titel
002	2024-11-29	Auf Seite 13 wurde das Bild entfernt und durch ein neues ersetzt. / The figure on page 13 has been removed and replaced by a new one.	Nicole Möller-Titel

Dieser Prüfbericht ersetzt den Prüfbericht PB2024-2845 REV001 vom 29.10.2024. Der ursprüngliche Prüfbericht ist somit ungültig. / *This test report replaces the test report PB2024-2845 REV001 dated 2024-10-29. The original test report is therefore not valid.*

Schwerin, 2024-11-29

DocuSigned by:



8D3D501ACF014E4...

Nicole Möller-Titel
Vice Division Manager
Biological Test Methods

Anlage A / annex A

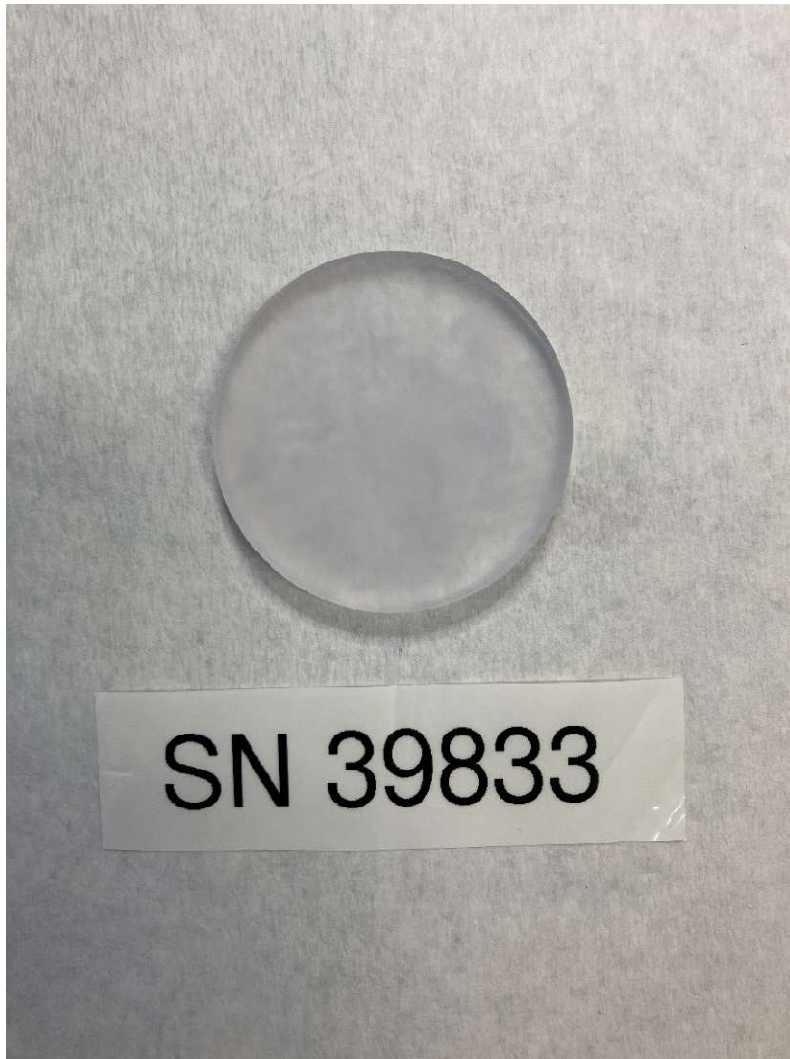


Figure A1: audio - mold

Anlage B / annex B**Table B1: Reagents**

Reagent	ID	Manufacturer	Batch	Expiration date
Medium	DMEM low Glucose, GlutaMAX	Gibco	2858871	31.05.2028
FBS	Serum	BioSell	BS.354598.5D	31.10.2029
Antibiotic mix	Geneticin	Gibco	2888852	30.04.2026
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Merck	RNBM7504	31.05.2026
Vital Dye	MTT	Sigma-Aldrich	MKCV1532	23.09.2028
Lyse buffer	Passive Lysis 5x Buffer	Promega	0000520215	10.04.2026
Induction evaluation	Luciferase Assay System	Promega	0000625006	11.02.2027
Culture flasks	Flask	Sarstedt	4022721	31.07.2029
15ml tube	Tube	Sarstedt	4040921	28.02.2027
50ml tube	Tube	Sarstedt	4043022	31.07.2027
Petri dish	Dish	Greiner	E231037E	26.09.2027