



# Prüfbericht Irritation

## Test report Irritation

MD\_004\_04D03.r00

---

S.	1 / 1
Autor:	-
Freigabe:	MBo
Freigabedatum:	25.09.20

A handwritten signature in blue ink, appearing to be "MBo", is written over the right side of the table.

BM Bioscience Technology GmbH  
Frau Anja Volkmann  
Roman-Oberaigner-Allee 3  
18299 Laage  
Germany

**Hohenstein Laboratories  
GmbH & Co. KG**

Schlossteige 1  
74357 Bönnigheim · Germany

**Life Science & Care**  
Telefon / Phone +49 7143 271 445  
Fax +49 7143 271 94421  
bioservice@hohenstein.de

Zuständig für Rückfragen / *Contact person* Unser Zeichen / *Our ref.*  
Christin Hammer PLI

Datum / *Date*  
23. September 2020

---

## Bericht Nr. / *Report No.* **20.8.5.1234**

*Mitgeltender Bericht / Applicable report* 20.8.5.1055

**Auftraggeber:** siehe Anschrift  
*Client:* see address

**Prüfgegenstand:** siehe Seite 2  
*Test sample:* see page 2

**Auftragsdatum:** 11.09.2020  
*Date of order:*

**Eingang Prüfgegenstand:** 03.09.2020  
*Receipt of test samples:*

**Prüfzeitraum:** 22.09.2020 bis / to 23.09.2020  
*Period of testing:*

**Probenahme:** Der Prüfgegenstand wurde uns vom Auftraggeber übersandt.  
*Sampling:* The test sample has been delivered to us by the client.

Der Bericht umfasst 7 Seiten. / *The report comprises 7 pages.*

## UNTERSUCHUNGSZIEL / AIM OF TEST

Untersuchung des Prüfmaterials auf Hautirritation und Gewebeverträglichkeit: Hühnerei-Test an der Chorionallantoismembran (HET-CAM).

*Test for a skin irritating potential and tissue compatibility of the test material: Hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HET-CAM).*

## PRÜFGEGENSTAND / TEST SAMPLES

Probennr. / Sample No.	Prüfgegenstand	Test sample
20.8.5.1234	Mund Nasen Maske, blau Probenbezeichnung: medizinische Gesichtsmasken LOT: M03200828 Herstellungsdatum: 28.08.2020	Face Mask, blue Product description: medical face masks LOT: M03200828 Date of manufacture: 28.08.2020

Der Prüfgegenstand wurde wie vom Auftraggeber eingesandt für die Prüfung verwendet.

*The sample was used like handed over by the customer.*

Der Schweißextrakt wurde aus dem gesamten Prüfgegenstand hergestellt.

*Perspiration extract is prepared out of the total article.*

## METHODE / METHODS

### GRUNDSÄTZLICHE VORBEMERKUNG

Der HET-CAM Test wurde ursprünglich eingeführt als ex vivo-Ersatzmethode für den Draize-Test am Kaninchenaugenauge, der zur Irritationsprüfung insbesondere für die Testung auf Haut- und Schleimhautverträglichkeit entwickelt wurde (Draize et al., 1944). Da die Chorionallantoismembran (CAM) empfindlicher als das Kaninchenaugenauge reagiert (Kramer et al., 1995), ist der HET-CAM Test wegen seiner höheren Sensitivität dem Draize-Test als Prüfmodell vorzuziehen.

Aus ethischen Gesichtspunkten wird der HET-CAM als unbedenklich eingestuft, da sich in der CAM in diesem frühen Entwicklungsstadium (ca. bis zum 14. Tag) noch keine Nervenfasern befinden. Somit kann die CAM als schmerzunempfindlich bezeichnet werden und der HET-CAM Test kollidiert nicht mit ethischen und juristischen Aspekten des Tierschutzes (Umweltbundesamt Berlin 1986, Kallenberger 1991). In Deutschland ist der HET-CAM als Alternative zum Draize-Test vom Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) für stark augenreizende Chemikalien zugelassen. Die Bestätigung der Unbedenklichkeit des Untersuchungsgutes sollte nachfolgend noch im Draize-Test am Kaninchen erfolgen (European Commission, 2005).

Die Prüfung auf Hautirritation und Gewebeverträglichkeit an der Chorionallantoismembran (CAM) des Hühnereis (HET-CAM Test) erlaubt die Beurteilung

### GENERAL REMARKS

*The HET-CAM test was originally introduced as ex vivo alternative method for the Draize eye irritancy test on the rabbit. This irritation test was especially developed for testing the skin- and mucosa- compatibility (Draize et al., 1944). Due to the fact that the chorionallantoic membrane (CAM) reacts more sensitive than the rabbit eye (Kramer et al., 1995), the HET-CAM test should be preferred to the Draize test as testing method. From an ethical point of view, the HET-CAM is classified as unobjectionable, because there are not yet any nerve fibres in the CAM in this early stage of development (approx. up to the 14<sup>th</sup> day). Thus the CAM can be designated as insensitive to pain and the HET-CAM test is not in conflict with ethical and legal aspects of animal protection (Umweltbundesamt [Federal Environmental Agency] Berlin 1986, Kallenberger 1991). In Germany, the Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) [Federal Institute for Risk Assessment] permits the HET-CAM test as an alternative to the Draize test for strongly eye-irritating chemicals. In case the test material shall come into contact with the eye, the confirmation of harmlessness at the eye is to be effected still in the Draize test (European Commission, 2005).*

*The test for skin irritation and tissue compatibility at the chorionallantoic membrane (CAM) of the hen's egg (HET-CAM test) enables the evaluation of a possible*

eines Gefahrenpotentials zur Hautirritation. Dieses wird als Summenparameter erfasst.

*risk potential for skin irritation. It is recorded as sum parameter.*

## PRÜFGRUNDLAGE

**INVITTOX-Protokoll Nr. 96: Juni 2007<sup>A</sup>  
und INVITTOX-Protokoll Nr. 47: Juni 2007**  
Hühnerei-Test an der Chorionallantoismembran  
(HET-CAM)

## TEST SPECIFICATION

*Hen's egg test on the chorioallantoic membrane  
(HET-CAM)*

In Verbindung mit:  
DIN EN ISO 10993-1: 2010-04  
Biologische Beurteilung von Medizinprodukten –  
Teil 1: Beurteilung und Prüfungen im Rahmen eines  
Risikomanagementsystems

*In addition with:*

*Biological evaluation of medical devices – Part 1:  
Evaluation and testing within a risk management  
system*

DIN EN ISO 10993-12: 2012-10  
Biologische Beurteilung von Medizinprodukten –  
Teil 12: Probenvorbereitung und Referenzmaterialien

*Biological evaluation of medical devices – Part 12:  
Sample preparation and reference materials*

DIN EN ISO 105-E04: 2013-08  
Textilien – Farbechtheitsprüfungen –  
Teil E04: Farbechtheit gegen Schweiß

*Textiles - Tests for colour fastness – Part E04:  
Colour fastness to perspiration*

Extraktionsverfahren  
Inkubation des Untersuchungsgutes mit saurer  
Schweißlösung nach Norm DIN EN ISO 105-E04 für  
24 h unter leichtem Schütteln bei 37 °C.

*Extraction process  
Incubation of test product with an acid perspiration  
solution according to DIN EN ISO 105-E04 for 24  
hours with slight shaking at 37 °C.*

Eier  
Die verwendeten Eier stammen von Bovan-Hühnern

*Eggs  
The used eggs are from Bovan-hens*

Untersuchung der Irritation  
Die Applikation der Testsubstanz und der Kontrollen  
auf die Chorionallantoismembran (CAM) von 7-9 Tage  
alten Hühnereiern erfolgt in Anlehnung an das  
INVITTOX-Protokoll Nr. 96<sup>A</sup> und 47. Die Beurteilung  
erfolgt nach der Endpunktmethode. Da die  
Schweißextrakte in der Regel durchsichtig bleiben, ist  
ein Abspülen der CAM vor der Beurteilung nicht nötig.

*Test for irritation  
The application of the testing substance and controls  
on the chorioallantoic membrane (CAM) of 7-9 day  
old hen's eggs is carried out on the basis of INVITTOX-  
Protocol N° 96<sup>A</sup> and 47. The assessment is carried out  
according to the endpoint method. Washing-up the  
CAM before evaluation is not necessary, because the  
perspiration extracts normally remain transparently.*

Eine sensorische Prüfung des Probenmaterials, sowie  
eine Prüfung des Schweißextraktes auf Verfärbung  
erfolgt durch mehrere Prüfer.

*An investigation of the perspiration extract for odor  
and staining/discoloration is conducted by a panel of  
testers.*

Eine Positiv- und eine Negativkontrolle werden im Experiment mitgeführt, um die Validität des Testsystems zu bestätigen.

*A positive and a negative control are included in the experiment in order to confirm the validity of the test system.*

Positivkontrolle  
Irritationslösung nach ECVAM in Schweißlösung (pH-Wert 5,5)

*Positive control  
Irritation solution according to ECVAM in Perspiration solution (pH 5.5)*

Negativkontrolle  
Schweißlösung (pH-Wert 5,5)

*Negative control  
Perspiration solution (pH 5.5)*

Prüfgegenstand  
Schweißextrakt des Prüfmaterials

*Test material  
Perspiration extract of the test material*

#### **Definitionen**

#### **Definitions**

##### Hämorrhagie:

Das Ausbluten der Blutgefäße der CAM.

##### Hemorrhage:

*Bleeding of blood vessels of the CAM*

##### Lyse:

Das Verschwinden bzw. Auflösen der Blutgefäße auf der CAM.

##### Lysis

*Disappearing and dissolving of blood vessels on the CAM*

##### Koagulation (Gefäßthrombosierung):

Die Gerinnung des Blutes innerhalb der Blutgefäße.

##### Coagulation (thrombosis of blood vessels):

*The coagulation of the blood inside the blood vessels.*

## **BERECHNUNGSGRUNDLAGE**

## **CALCULATION**

Die Reizwirkung der Testsubstanz und Kontrollen (Hämorrhagie, Lyse und Koagulation) wird nach 5 Minuten bei stereomikroskopischer Vergrößerung beurteilt und den folgenden Zahlenwerten des Endpunkt-Score zugeordnet.

*The irritative effect of the test substance and controls (hemorrhage, lysis and coagulation) is assessed with stereomicroscopic magnification after 5 minutes and classified to the following figures of the endpoint score.*

0 = keine Reaktion  
1 = leichte Reaktion  
2 = mittelschwere Reaktion  
3 = schwere Reaktion

*0 = no reaction  
1 = slight reaction  
2 = moderate reaction  
3 = strong reaction*

Die Summe (S) der stärksten Reaktion (Hämorrhagie, Lyse oder Koagulation) an der CAM der verwendeten Hühnereier wird ermittelt.

*The sum (S) of the strongest reaction (hemorrhage, lysis or coagulation) on the CAM of the used eggs is ascertained.*

## ERGEBNIS / RESULT

### ■ Probe / Sample 20.8.5.1234

Im Schweißextrakt wurde mit bloßem Auge **keine Verfärbung** beobachtet.  
 Es wurde am Probenmaterial bzw. Schweißextrakt ein **schwacher Plastik Geruch** festgestellt.

*The observation of perspiration extract showed **no discoloration**.  
 In the investigation on odor a **slight plastic smell** was detected.*

Am Schweißextrakt wurde keine Veränderung des pH-Wertes von 5,5 beobachtet.

*The pH-value in the perspiration extract was still 5.5.*

Stärke der beobachteten Effekte auf der CAM:  
 5 Minuten nach Applikation.  
 Summe (S) der verwendeten Eier:

*An assessment of the CAM as per ECVAM was made  
 5 minutes after application.  
 Sum (S) of used eggs:*

	Summe / sum				
	Hämorrhagie / Hemorrhage	Lyse / Lysis	Koagulation / Coagulation	Endpunktmethode (deutlichster Effekt) / Endpoint method (most significant effect)	Limit
Positivkontrolle / Positive control	15	15	10	15 ± 0,84	≥ 16
Negativkontrolle / Negative control	0	0	0	0 ± 0	≤ 10
Prüfgegenstand / Test sample	0	0	0	0 ± 0	≤ 10

Versuchsdurchführung: NRO, SEH1, PLI

*Test performance: NRO, SEH1, PLI*

## ZUSAMMENFASSUNG / CONCLUSION

### BEURTEILUNGSKRITERIEN

Aus der Summe (S) der stärksten Reaktion (Hämorrhagie, Lyse und Koagulation) an der CAM der verwendeten Hühnereier ergibt sich eine Bewertung des irritativen Potentials der aufgetragenen Substanzen. Die Bewertung der Reizantwort im HET-CAM Test mit den Abstufungen, Hämorrhagie, Lyse und Koagulation erfolgt in Anlehnung an die Endpunktmethode des INVITTOX-Protokolls Nr. 96<sup>A</sup> und 47.

Endpunkt-Score Summe (S) aus 6 Eiern	Irritations-Kategorie
S ≤ 10	Nicht bis leicht irritierend
10 < S < 16	Mittelstark irritierend
S ≥ 16	Stark irritierend

### ASSESSMENT CRITERIA

*The sum (S) of the strongest reaction (hemorrhage, lysis and coagulation) at the CAM of the used hen's eggs implies the irritating potential of the applied substances.  
 The assessment of the irritative reaction in the HET-CAM test with gradations of hemorrhage, lysis and coagulation is carried out on the basis of the endpoint method following INVITTOX-Protocol N° 96<sup>A</sup> and 47.*

Endpoint score Sum (S) of 6 eggs	Irritation category
S ≤ 10	Not irritative to slightly irritative
10 < S < 16	Moderate irritative
S ≥ 16	Strong irritative

## BEURTEILUNG

## ASSESSMENT

### ■ Probe / Sample 20.8.5.1234

Gesamtextrakt von:  
medizinische Gesichtsmaske  
LOT: M03200828  
Herstellungsdatum: 28.08.2020

Total extract of  
medical face mask  
LOT: M03200828  
Date of manufacture: 28.08.2020

Unter den angegebenen Bedingungen erreichte der Schweißextrakt der Probe den Score: **0 nicht irritierend** im HET-CAM Test an den Blutgefäßen der Chorionallantoismembran. Daraus ist zu schließen, dass im Gebrauch dieses Untersuchungsgutes bei Hautkontakt **keine stark irritativen Substanzen** freigesetzt werden.

Under the mentioned test conditions, the perspiration extract of the sample achieved the score: **0 not irritative** at the blood vessels of the chorionallantoic membrane in the HET-CAM test. Therefore it can be concluded, that **no strong irritative substances** are released during the assigned use of the test material.

Schloss Hohenstein, 23. September 2020

Deputy Director  
Life Science & Care



Dr. Anja Gerhardt



Product Manager  
Material Performance  
Life Science & Care



Nadja Berner-Dannenmann

Das Ergebnis bezieht sich nur auf die eingereichten Gegenstände. 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 Hohensteins zulässig. Rechtsverbindlich ist nur der autorisierte Bericht. Die Akkreditierung gilt für die in der Urkundenanlage aufgeführten Verfahren (Akkreditierungen siehe [www.hohenstein.de/de/about\\_hohenstein/akkreditation/akkreditation.html](http://www.hohenstein.de/de/about_hohenstein/akkreditation/akkreditation.html)) – im Bericht mit <sup>A</sup> gekennzeichnet.

The results relate only to the 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 Hohenstein. Only the authorized report is legally binding. The accreditation applies for the methods listed in the annex to the certificate (accreditations see [www.hohenstein.de/de/about\\_hohenstein/akkreditation/akkreditation.html](http://www.hohenstein.de/de/about_hohenstein/akkreditation/akkreditation.html)) – marked <sup>A</sup> in the report.