

Value Products GmbH
Binzmühlestrasse 97
8050 Zürich
Switzerland



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



Anerkannt durch/Recognized by
Zentralstelle der Länder
für Gesundheitsschutz
bei Arzneimitteln und
Medizinprodukten
ZLG-AP-314.10.23
www.zlg.de

2023-04-28

PRÜFBERICHT / TEST REPORT

| | |
|--|--|
| Prüfungsnummer / <i>test id</i> : | 2023-1118 |
| Probennummer / <i>sample id</i> : | SN 36548 |
| Prüfprodukt / <i>test sample</i> : | Sonoplus |
| Auftraggeber / <i>client</i> : | Value Products GmbH |
| Hersteller / <i>manufacturer</i> : | Value Products GmbH |
| Auftragsdatum / <i>date of order</i> : | 2023-03-24 |
| Prüfzeitraum / <i>test period</i> : | 2023-04-25 bis / <i>to</i> 2023-04-27 |
| Prüfmethode / <i>test method</i> : | EN ISO 10993-5 (2009) Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro Zytotoxizität <i>Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity</i> |
| Information / <i>information</i> : | keine / <i>none</i> |

Identifizierung der Probe / identification of the sample

| | |
|--|--|
| Probennummer / <i>sample id</i> : | SN 36548 |
| Prüfprodukt / <i>test sample</i> : | Sonoplus |
| Chargennummer / <i>batch number</i> : | - |
| Lieferdatum / <i>date of delivery</i> : | 2023-04-17 |
| Lieferzustand / <i>delivery state</i> : | unsteril / <i>non-sterile</i> |
| Lagerbedingung / <i>storage condition</i> : | die des Herstellers / <i>those of the manufacturer</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 / <i>test method:</i> | <p>EN ISO 10993-5 (2009) Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf In-vitro-Zytotoxizität</p> <p>EN ISO 10993-5 (2009) Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity</p> <p>SOP 09-001, REV013</p> |
| Prüftemperatur / <i>test temperature:</i> | 22.3°C |
| Rel. Luftfeuchtigkeit / <i>rel. humidity:</i> | 33% |
| Probenbehandlung / <i>sample handling:</i> | <p>Das Prüfprodukt wurde nach manueller Aufbereitung, entsprechend der Hersteller Angaben, geprüft. Hierzu wurde das Prüfprodukt im Vorfeld in 70°C warmes Wasser eingelegt, abkühlen gelassen und im Anschluss mit kühlem Wasser abgespült.</p> <p><i>The test product was tested after manual preparation in accordance with the manufacturer's instructions. For this purpose, the test product was first soaked in 70°C water, allowed to cool and then rinsed with cool water.</i></p> |
| Extraktionsbedingung / <i>extraction condition:</i> | EN ISO 10993-12 (2021) |
| Extraktionsmenge und volumen / <i>sample amount and volume:</i> | 14,07g Material in 70,35ml Extraktionsmedium / <i>14.07g material in 70.35ml extraction medium</i> |
| Extraktionsmedium / <i>extraction medium:</i> | MEM + 9% fötales Kälberserum + 1% Antibiotikallösung + L-Glutamin (Komplettmedium) / <i>MEM + 9% fetal bovine serum + 1% antibiotic solution +</i> <i>L-glutamine (complete medium)</i> |
| Extraktionsdauer / <i>duration of extraction:</i> | 24h ± 2h |
| Extraktionstemperatur / <i>temperature of extraction:</i> | 37°C ± 1°C |

Prüfverfahrenbeschreibung / description of the test method

Extrakt / extract

| | |
|-----------------------------------|--|
| pH-Wert / <i>pH-value</i> : | 7.32 |
| Farbe / <i>colour</i> : | rot / <i>red</i> (natürliche Farbe des Mediums / <i>natural colour of medium</i>) |
| Präzipitat / <i>precipitate</i> : | keines / <i>none</i> |
| Behandlung / <i>processing</i> : | keine / <i>none</i> |
| Lagerung / <i>storage</i> : | nicht zutreffend / <i>not applicable</i> |
| Kommentar / <i>comment</i> : | - |

Prüfanforderung / test requirement:

| | |
|------------------------|---|
| EN ISO 10993-5 (2009): | Neutral Rot / <i>neutral red</i> Zellvitalität / <i>cell viability</i> ≥ 70% |
|------------------------|---|

Prüfverfahrenbeschreibung / description of the test method

Zellkultivierung / cell culture:

L929-Zellen (ATCC CCL 1) sind eine adhärenente Zelllinie des murinen Bindegewebes. Die Vorratshaltung erfolgt in 250ml Gewebekulturflaschen. Die Zellen werden alle 3-4 Tage passagiert. Nach der 80. Passage wurde die Vorratshaltung aus der Stammkultur neu angelegt. Zur Testung werden die Zellen in einer Konzentration von $0,1 - 0,3 \times 10^6$ Zellen/ml in Microtiter-Zellkulturtestplatten F96 eingesät und 24h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das Anzuchtmedium besteht aus MEM mit 9% FBS sowie L-Glutamin, und 1% Antibiotikallösung (Penicillin, Streptomycin).

Stock cultures of L929 cells (ATCC CCL-1), an adherent cell line derived from murine connective tissue, were maintained in 250ml culture flasks at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The cells were passaged every 4 days into new culture flasks. Passage number was kept below 80. For the test $0.1 - 0.3 \times 10^6$ cells/ml were seeded into a 96 well microtiter culture cluster and incubated for 24h at 37°C and 5% CO₂ atmosphere. The culture medium consists of MEM supplemented with 9% fetal calf serum, 1% antibiotic solution (Penicillin G, Streptomycin sulfate) and L-glutamine.

Exposition / treatment:

Nach 24 Stunden Kultivierung der Zellen in Multiwell-Zellkulturschalen liegen die Zellen als Monolayer vor. Nun wird ein Mediumwechsel mit Testmedium vorgenommen. Dazu wird das Medium dekantiert und das Prüfmedium vorsichtig hineinpipettiert (100µl pro Vertiefung). Eine Inkubation für 24 Stunden im Brutschrank schließt sich an.

After 24 hours of incubation, cells are in the form of a monolayer within the Multiwell tissue culture dishes. The medium is exchanged with the test medium by carefully decanting the medium and adding 100µl of test medium, followed by incubation for an additional period of 24 hours.

Extrakte / extracts:

Extrakte werden gemäß EN ISO 10993-12 (2021) frisch vor der Prüfung hergestellt, wenn nicht anders beschrieben. Sollte eine Lagerung notwendig sein, wird der Extrakt bei -20°C gelagert (bis zu 48 Stunden), danach bei -80°C (bis zu 2 Wochen).

Extracts are made fresh before testing in according to EN ISO 10993-12 (2021), unless specified otherwise. In the event that storage becomes necessary the extract is stored at -20°C (< 48h) and after that at -80°C (up to 2 weeks).

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

| | |
|---|---|
| Testmedium / <i>test medium</i> : | Das Testmedium ist der Extrakt (100%) oder eine Verdünnung davon, wie angegeben, welche mit komplettem Zellmedium hergestellt wurde. <i>The test medium is either the neat extract (100%) or a dilution thereof prepared with complete cell culture medium, as indicated.</i> |
| Neutral Rot Methode / <i>neutral red method</i> : | Vitale Zellen nehmen den Farbstoff Neutralrot auf. Tote Zellen können den Farbstoff nicht aufnehmen und bleiben ungefärbt. Die Farbintensität der Eluationslösung wird photometrisch gemessen. <i>Viable cells incorporate the dye neutral red. Dead cells do not incorporate the dye and remain unstained. The degree of uptake can be followed by photometrically measuring the release of neutral red upon elution from the cells.</i> |
| Kontrollen / <i>controls</i> : | Als Negativkontrolle wurde Zellmedium ohne Prüflösung inkubiert. Zur Überprüfung der Sensitivität des Testsystems wurde zusätzlich als Positivkontrolle 0,15mg/ml Natriumdodecylsulfat (SDS) in MEM Kulturmedium im Test eingesetzt. (N=9). <i>Negative controls were cells incubated with MEM medium without any additions. Positive controls were incubated with a 0.15 mg/mL sodium dodecyl sulfate (SDS) in MEM medium. (N=9).</i> |
| Neutral Rot Ergebnisauswertung / <i>neutral red result evaluation</i> : | Die optische Dichte (A_{560}) von 12 Parallelansätzen (Wells) wird ermittelt. Angegeben in Tabelle 1 als Durchschnitt. Eine Zellvitalität von weniger als 70% bezogen auf die Negativkontrolle gilt als zytotoxisches Ergebnis. $(OD_{neg.Kontrolle}/100\% = OD_{Produkt}/x)$. <i>Optical density (A_{560}) of 12 wells was determined. This is shown as mean values in table 1. A viability of less than 70% relative to the negative control is considered to be cytotoxic result.</i> $(OD_{neg.control}/100\% = OD_{produkt}/x)$. |
| Verwendete Reagenzien / <i>used reagents</i> : | siehe Anlage B / <i>see annex B</i> |
| Laboranalyse durchgeführt von / <i>lab analysis performed by</i> : | Celine Fengler |

Prüfergebnisse / test results EN ISO 10993-5

Figure 1: Boxplot of the cell viability

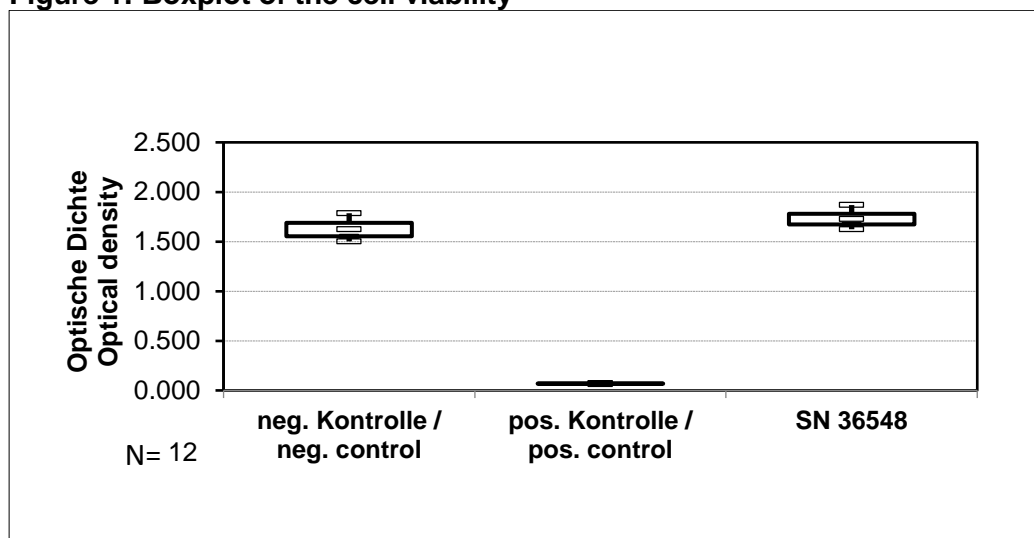


Table 1: Descriptive statistic

| | N | Mean value [OD] | Minimum [OD] | Maximum [OD] | Standard deviation | Cell viability [%] | Acceptance criteria / result |
|------------------|----|--------------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------------|------------------------------|
| Negative control | 9 | 1.626 | 1.503 | 1.787 | 0.086 | 100.00 | accepted |
| Positive control | 9 | 0.069 | 0.062 | 0.074 | 0.003 | 4.24 | accepted |
| SN 36548 | 12 | 1.730 | 1.624 | 1.868 | 0.070 | 106.40 | not cytotoxic |

Legende und Verifizierung / legend and verification

| | |
|--------|--|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| FBS | Fötales Kälberserum / <i>fetal bovine serum</i> |
| MEM | Minimum Essential Medium |
| ml | Milliliter / <i>millilitres</i> |
| N | Stichprobenumfang / <i>sample size</i> |
| OD | Optische Dichte / <i>optical density</i> |
| OD (A) | Absorption / <i>absorbance</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat / <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| µl | Mikroliter / <i>microlitres</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 EN ISO 10993-5 (2009) resultierte der Extrakt des Prüfproduktes „Sonoplus“ in einer Zellvitalität bestimmt mittels Neutralrotmethode von mehr als 70% im Vergleich zur Negativkontrolle und ist deshalb als nicht zytotoxisch zu bewerten.

According to EN ISO 10993-5 (2009), the extract of the tested test sample „Sonoplus“ resulted in a cell viability using neutral red method of more than 70% in comparison to the negative control and is therefore be considered to be not cytotoxic.

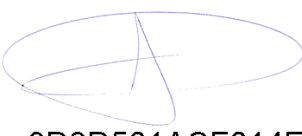
Archivierung / archiving:

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 to the named test samples. Reproduction of any part of this report requires the written permission of HygCen Germany GmbH.*

Schwerin, 2023-04-28

DocuSigned by:

8D3D501ACF014E4...
Nicole Moller-Titel
Vice Division Manager
Biological Test Methods

Schwerin, 2023-04-28

DocuSigned by:

BD051B9D54C746F...
Dr. med. univ. S. Werner
Head of Scientific-Technical Affairs
Medical Devices

Anlage A / annex A



Figure A1: Sonoplus

Anlage B / annex B

Table B1: Reagents

| Reagent | ID | Manufacturer | Batch | Expiration date |
|-------------------|-------------|--------------|---------------|-----------------|
| Medium | MEM | BioSell | BS.6166683 | 31.12.2024 |
| FBS | Serum | BioSell | BS.330151.5HI | 28.02.2028 |
| Additive | L-glutamine | BioSell | BS.337656D | 30.04.2024 |
| Antibiotic mix | Pen/Strep | BioSell | BS.337626D | 30.04.2024 |
| Control | SDS | Merck | K53504360151 | 30.06.2026 |
| Vital dye | Neutral Red | Roth | 200289923 | 29.10.2024 |
| Culture flasks | T75 | Sarstedt | 2024921 | 31.12.2027 |
| Microtiter plates | Plates | Greiner | E220836N | 21.07.2026 |