

Dermatest[®] GmbH Engelstr. 37 48143 Münster

Bio-Sanitas GmbH GF Matthias Winkelmann
Rudolf Diesel Strasse 5-7
50226 Frechen

Münster, 11.09.2020

Fachärztliches, dermatologisches Gutachten über einen Epikutantest zur
Prüfung auf primäre Irritation und zum Nachweis einer bestehenden
Sensibilisierung am Menschen bei einmaliger Applikation des
nachstehenden Produktes

Bio-Sanitas

Menschliche Hygiene und Oberflächen

Auftraggeber: Bio-Sanitas GmbH GF Matthias Winkelmann
Rudolf Diesel Strasse 5-7
50226 Frechen

Testpersonen: 30 Probanden, sämtlich hautgesund

Testkonzentration: unverdünnt



PRINZIP UND METHODEN

Das Ziel der Studie ist primäre Hautreizungen durch das Testprodukt und/ oder bestehende Sensibilisierungen gegen das Testprodukt nachzuweisen.

Die Testsubstanzen werden in geeigneten Konzentrationen okklusiv auf die Haut aufgetragen.

Der epikutane Kontakt mit dem Testprodukt ist somit örtlich und zeitlich begrenzt und wird durch die Okklusionsbedingungen intensiviert, sodass die Absorption der Testsubstanzen begünstigt wird. Nach 24, 48 und 72 Stunden wird die Haut untersucht.

Die Okklusion wird verwendet, damit das vermutete topische Allergen leichter durch das Stratum corneum penetrieren kann um die Effektorzellen zu erreichen, die eine lokale Reaktion des Immunsystems hervorrufen könnte.

Damit eine positive Reaktion hervorgerufen werden kann, muss der Schwellenwert der Irritation/ Sensibilität überschritten werden.

Eine positive Reaktion auf einen korrekt applizierten Epikutantest gilt als Nachweis für eine primäre Reizung durch die Testsubstanz, jedoch nicht zwangsläufig als Beweis für eine Sensibilisierung.

Bei bereits bestehenden Sensibilisierungen werden allergische Hautreaktionen durch den Epikutantest provoziert.

DURCHFÜHRUNG

Angehende Testpersonen erhalten eingehende Aufklärung über den Studienverlauf. Wenn eine Teilnahme gewünscht ist und die Studienbedingungen erfüllt sind, unterschreibt der Proband die Einverständniserklärung und die medizinische Anamnese wird erhoben.

20 mg bzw. 20 µl des Testproduktes werden unverdünnt auf ein vorgefertigtes selbstklebendes Pflaster (Curatest® F Folien-Testpflaster, Fa. Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG) auf die klinisch gesunde Haut des oberen Rückens aufgebracht und fixiert. Gewebeartige Produkte werden in einer Fläche von 0,8 cm² mit Hilfe des selbstklebenden Pflasters auf den Rücken der Probanden aufgebracht.

Das Testpflaster wird nach einer Expositionsdauer von 24 Stunden abgenommen und erstmals dermatologisch und allergologisch beurteilt. Eine zweite und dritte Beurteilung erfolgen nach 48 und 72 Stunden.

Die Bewertung der Testreaktion erfolgt 30 Minuten nach der Entfernung der Testpflaster.

Bei unsicheren Testreaktionen bzgl. ihres Typs (allergisch oder irritativ) werden auch spätere Ablesungen durchgeführt.

Alle Beurteilungen werden bei standardisierter Beleuchtung durchgeführt.

Die Studienteilnehmer werden instruiert die Testareale während der Anwendungsphase trocken zu halten.

PROBANDEN

Die Testgruppe besteht aus 30 erwachsenen, männlichen und weiblichen Probanden.

In dieser Testgruppe befinden sich immer Probanden mit (sehr) trockener, fettiger, normaler und sensibler Haut.

EINSCHLUSSKRITERIEN

- Standarddesign: Personen ab 18 Jahren mit gesunder Haut im Testareal

AUSSCHLUSSKRITERIEN

- Akute organische Krankheit
- Schwangerschaft und Stillzeit
- Bestehende Sensibilisierung auf Inhaltsstoffe des Prüfpflasters
- Schwerwiegende Erkrankungen
- Applikation von wirkstoffhaltigen Präparaten und Pflegemitteln bis 4 Wochen vor Testbeginn
- Einnahme von Medikamenten, die die Hautreaktion beeinträchtigen können (Glucocorticoide, Antiallergika, topische Immunmodulatoren, etc.)
- Stark gebräunte Haut

TESTERGEBNISSE

Testkonzentration: Produkt unverdünnt

Nr.	Name	Geschlecht	Alter	Diagnose	24 h	48 h	72 h
1.	BrJö	m	50	hautgesund	-	-	-
2.	BrMe	w	48	hautgesund	-	-	-
3.	GiLu	w	55	hautgesund	-	-	-
4.	GiMi	m	62	hautgesund	-	-	-
5.	HaEl	w	63	hautgesund	-	-	-
6.	HoUl	w	57	hautgesund	-	-	-
7.	HuSi	w	54	hautgesund	-	-	-
8.	JuFa	m	27	hautgesund	-	-	-
9.	JuJo	m	20	hautgesund	-	-	-
10.	JuMi	w	24	hautgesund	-	-	-
11.	JuMy	w	54	hautgesund	-	-	-
12.	LeAl	w	26	hautgesund	-	-	-
13.	LeHe	w	63	hautgesund	-	-	-
14.	LeMa	m	58	hautgesund	-	-	-
15.	MaVi	w	39	hautgesund	-	-	-
16.	MüDi	m	64	hautgesund	-	-	-
17.	MüVe	w	61	hautgesund	-	-	-
18.	NeNe	w	69	hautgesund	-	-	-
19.	OeAn	w	35	hautgesund	-	-	-
20.	OeKa	m	63	hautgesund	-	-	-
21.	OeMa	m	36	hautgesund	-	-	-
22.	OeNi	w	45	hautgesund	-	-	-
23.	PiMa	m	33	hautgesund	-	-	-
24.	RuMa	w	65	hautgesund	-	-	-
25.	ScTo	m	47	hautgesund	-	-	-
26.	ScAn	w	55	hautgesund	-	-	-
27.	ScCh	m	24	hautgesund	-	-	-
28.	SeJa	w	22	hautgesund	-	-	-
29.	SeMa	w	18	hautgesund	-	-	-
30.	SeSi	w	42	hautgesund	-	-	-

TESTERGEBNISSE

WERTUNGEN DES KONTROLLFELDES

Testkonzentration: Leerfeld

Nr.	Name	Geschlecht	Alter	Diagnose	24 h	48 h	72 h
1.	BrJö	m	50	hautgesund	-	-	-
2.	BrMe	w	48	hautgesund	-	-	-
3.	GLu	w	55	hautgesund	-	-	-
4.	GIMi	m	62	hautgesund	-	-	-
5.	HaEl	w	63	hautgesund	-	-	-
6.	HoUl	w	57	hautgesund	-	-	-
7.	HuSi	w	54	hautgesund	-	-	-
8.	JuFa	m	27	hautgesund	-	-	-
9.	JuJo	m	20	hautgesund	-	-	-
10.	JuMi	w	24	hautgesund	-	-	-
11.	JuMy	w	54	hautgesund	-	-	-
12.	LeAl	w	26	hautgesund	-	-	-
13.	LeHe	w	63	hautgesund	-	-	-
14.	LeMa	m	58	hautgesund	-	-	-
15.	MaVi	w	39	hautgesund	-	-	-
16.	MüDi	m	64	hautgesund	-	-	-
17.	MüVe	w	61	hautgesund	-	-	-
18.	NeNe	w	69	hautgesund	-	-	-
19.	OeAn	w	35	hautgesund	-	-	-
20.	OeKa	m	63	hautgesund	-	-	-
21.	OeMa	m	36	hautgesund	-	-	-
22.	OeNi	w	45	hautgesund	-	-	-
23.	PiMa	m	33	hautgesund	-	-	-
24.	RuMa	w	65	hautgesund	-	-	-
25.	ScTo	m	47	hautgesund	-	-	-
26.	ScAn	w	55	hautgesund	-	-	-
27.	ScCh	m	24	hautgesund	-	-	-
28.	SeJa	w	22	hautgesund	-	-	-
29.	SeMa	w	18	hautgesund	-	-	-
30.	SeSi	w	42	hautgesund	-	-	-

AUSWERTUNGSKRITERIEN

Die Beurteilung erfolgt aufgrund der morphologischen Ausprägung modifiziert nach Empfehlungen der ICDRG (Fregert S (1981/ 2nd edition) Manual of Contact Dermatitis. On behalf of the International Contact Dermatitis Research Group and the North American Contact Dermatitis Group, Munksgaard Publishers, Copenhagen).

Tabelle 3: Beurteilung von Epikutantestreaktionen

Symbol	Morphe	Bedeutung
-	keine Reaktion	negativ
?	nur Erythem, kein Infiltrat	fraglich
+	Erythem, Infiltrat, evtl. diskrete Papeln	einfach-positive Reaktion
++	Erythem, Infiltrat, Papeln, Vesikel	zweifach-positive Reaktion
+++	Erythem, Infiltrat, konfluierende Vesikel	dreifach-positive Reaktion
ir	versch. Veränd. (Seifeneffekt, Vesikel, Blase, Nekrose)	irritativ
nt		nicht getestet

ALLGEMEINE DERMATOLOGISCHE INTERPRETATIONSKRITERIEN:

Wichtig ist es bei der Beurteilung der Ergebnisse, zwischen toxischen und allergischen Reaktionen zu unterscheiden. In der Regel werden die zum Zeitpunkt 72 Std. oder später als "+" bis "+++" beurteilten Reaktionen als "allergisch" gedeutet.

In die Bewertung kann die Reaktionsdynamik einfließen. Testreaktionen allergischen Typs können bestehen oder sogar stärker werden am Tag nach Entfernung der Testpflaster ("Plateau-Muster" bzw. "Crescendo"). Im Gegensatz dazu spricht ein "Decrescendo"-Muster (abschwächen der Reaktion nach Entfernen des Pflasters) eher für eine irritative Reaktion.

Bei Spätreaktionen, die etwa 10-14 Tage nach Applikation des Epikutantests erstmalig auftreten, ist an eine ("iatrogene") Sensibilisierung durch den Test zu denken.

Eine irritative/ allergische Reaktion äußert sich in einem Erythem und kann auch ein leichtes Infiltrat aufweisen.

Papeln, Vesikeln und Blasen können sowohl als Zeichen einer Irritation als auch einer Allergie auftreten, wohingegen Pusteln und Nekrosen starke irritative Reaktionen kennzeichnen.

Das ursprüngliche Applikationsareal kann in beiden Reaktionsformen deutlich überschritten werden. Zudem kann die individuelle Ausprägung der Reaktion stark schwanken.

BEURTEILUNG DER TESTERGEBNISSE

Bei keinem der 30 Probanden kam es bei den Epikutantestungen nach internationalen Richtlinien der ICDRG (International Contact Dermatitis Research Group) nach 24, 48 und 72 Stunden zu irgendwelchen Hautveränderungen im Testbezirk.

Daraus ist zu folgern, dass das Produkt bei der praktischen Anwendung nicht zu unerwünschten Hautreaktionen durch eine hautreizende Wirkung führen wird.



Dr. med. Gerrit Schlippe
Facharzt für Dermatologie,
Venerologie



Dr. med. Werner Voss
Facharzt für Dermatologie,
Venerologie, Allergologie,
Phlebologie und Umweltmedizin

Literatur:

1. Suzuki, J., Environ Dermatol 4-3:202-21-1997
2. ICDRG, Proposal for a revised international standard series of patch tests, Contact Dermatitis, No. 36, 121-123 (1997)
3. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, April 1999 <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>
4. Scientific Basis of Patch Testing – S. Iris Ale and Howard I. Maibach, Dermatol. Beruf Umwelt / Occup. Environ. Dermatol. 50, Nr. 2, 43-50 (2002)
5. Scientific Basis of Patch Testing Part II – S. Iris Ale and Howard I. Maibach, Dermatol. Beruf Umwelt / Occup. Environ. Dermatol. 50, Nr. 3, 91-96 (2002)
6. Scientific Basis of Patch Testing Part III – S. Iris Ale and Howard I. Maibach, Dermatol. Beruf Umwelt / Occup. Environ. Dermatol. 50, Nr. 4, 131-133 (2002)
7. Cosmetics & Toiletries magazine, www.CosmeticsandToiletries.com, Vol. 127, No. 5/May 2012, pages 356-360

Dermatest[®] GmbH Engelstr. 37 48143 Münster

Bio-Sanitas GmbH GF Matthias Winkelmann
Rudolf Diesel Strasse 5-7
50226 Frechen

Muenster, 11.09.2020

Dermatological report on human Patch Test for primary skin irritation and
to detect existing sensitisations of human subjects after single
application of

Bio-Sanitas

Menschliche Hygiene und Oberflächen

Customer: Bio-Sanitas GmbH GF Matthias Winkelmann
Rudolf Diesel Strasse 5-7
50226 Frechen

Test Panel: 30 panellists of either sex,
without visible skin diseases or known hypersensitivity

**Concentration
of the product:** undiluted



PRINCIPLE AND METHODS

The objective of the study is to detect primary skin irritation potential and/ or existing allergic sensitisation to the test substance.

The test substance is applied to the skin of the panellist via an occlusive patch at a suitable concentration.

The patch limits contact of the panellist's skin with the test substance to a local area and exposure is exaggerated due to the occlusive conditions. The skin is checked at 24, 48 and 72 hours.

The occlusion eases the absorption of the suspected topical allergen allowing it to penetrate the stratum corneum to the viable (effector) cells of the skin and thus presenting a local challenge to the immune system.

If the threshold level of sensitivity is reached, a positive reaction could potentially be induced.

A positive reaction to a correctly applied patch provides evidence of primary irritation to the substance tested, but is not necessarily evidence of sensitisation.

Patch testing provokes allergic skin reactions in already sensitised panellists.

PROCEDURES

Prospective panellists receive a complete explanation of study procedures. If they wish to participate and agree to the conditions of the study, panellists sign a written, informed consent and provide a medical history.

20 mg/ 20 µl of the undiluted test product is applied to an adhesive plaster (Curatest® F Folien-Testpflaster, Fa. Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG) and affixed to clinically healthy skin on the upper back. Textile products are affixed with a sample size of 0,8 cm² with the adhesive plaster on the upper back.

After a 24 hour exposure period, the plaster is removed and the exposed skin is dermatologically assessed and graded. The second and third assessments are performed after 48 and 72 hours respectively.

All assessments are conducted 30 minutes after removal of the test plaster.

Where a positive reaction is observed, but it is unclear whether the observed reaction is due to sensitisation or irritation, subsequent readings can be performed.

All assessments are performed under standard lighting conditions.

The panellists are instructed to keep the test sites dry.

PANELLISTS

The test panel included 30 adult male and female subjects.

INCLUSION CRITERIA

- Standard design: Subjects aged 18 years and above with healthy skin in the test area

EXCLUSION CRITERIA

- Acute diseases
- Pregnancy and lactation period
- Sensitisation to ingredients of the test plaster
- Severe illnesses
- Application of pharmaceutical products and skin care products with active ingredients until 4 weeks before testing
- Intake of drugs that possibly can interfere with skin reactions (steroids, antiallergics, topical immuno modulator, etc.)
- Extremely tanned skin

RESULTS

Table 1: Results of patch testing for the test substance
Concentration of the product: undiluted

No.	Name	Gender	Age	Diagnosis	24 h	48 h	72 h
1.	BrJö	m	50	healthy skin	-	-	-
2.	BrMe	f	48	healthy skin	-	-	-
3.	GiLu	f	55	healthy skin	-	-	-
4.	GiMi	m	62	healthy skin	-	-	-
5.	HaEl	f	63	healthy skin	-	-	-
6.	HoUl	f	57	healthy skin	-	-	-
7.	HuSi	f	54	healthy skin	-	-	-
8.	JuFa	m	27	healthy skin	-	-	-
9.	JuJo	m	20	healthy skin	-	-	-
10.	JuMi	f	24	healthy skin	-	-	-
11.	JuMy	f	54	healthy skin	-	-	-
12.	LeAl	f	26	healthy skin	-	-	-
13.	LeHe	f	63	healthy skin	-	-	-
14.	LeMa	m	58	healthy skin	-	-	-
15.	MaVi	f	39	healthy skin	-	-	-
16.	MüDi	m	64	healthy skin	-	-	-
17.	MüVe	f	61	healthy skin	-	-	-
18.	NeNe	f	69	healthy skin	-	-	-
19.	OeAn	f	35	healthy skin	-	-	-
20.	OeKa	m	63	healthy skin	-	-	-
21.	OeMa	m	36	healthy skin	-	-	-
22.	OeNi	f	45	healthy skin	-	-	-
23.	PiMa	m	33	healthy skin	-	-	-
24.	RuMa	f	65	healthy skin	-	-	-
25.	ScTo	m	47	healthy skin	-	-	-
26.	ScAn	f	55	healthy skin	-	-	-
27.	ScCh	m	24	healthy skin	-	-	-
28.	SeJa	f	22	healthy skin	-	-	-
29.	SeMa	f	18	healthy skin	-	-	-
30.	SeSi	f	42	healthy skin	-	-	-

RESULTS

Table 2: RESULTS of patch testing for the CONTROL
Concentration of the product: blank patch test

No.	Name	Gender	Age	Diagnosis	24 h	48 h	72 h
1.	BrJö	m	50	healthy skin	-	-	-
2.	BrMe	f	48	healthy skin	-	-	-
3.	GLu	f	55	healthy skin	-	-	-
4.	GIMi	m	62	healthy skin	-	-	-
5.	HaEl	f	63	healthy skin	-	-	-
6.	HoUl	f	57	healthy skin	-	-	-
7.	HuSi	f	54	healthy skin	-	-	-
8.	JuFa	m	27	healthy skin	-	-	-
9.	JuJo	m	20	healthy skin	-	-	-
10.	JuMi	f	24	healthy skin	-	-	-
11.	JuMy	f	54	healthy skin	-	-	-
12.	LeAl	f	26	healthy skin	-	-	-
13.	LeHe	f	63	healthy skin	-	-	-
14.	LeMa	m	58	healthy skin	-	-	-
15.	MaVi	f	39	healthy skin	-	-	-
16.	MüDi	m	64	healthy skin	-	-	-
17.	MüVe	f	61	healthy skin	-	-	-
18.	NeNe	f	69	healthy skin	-	-	-
19.	OeAn	f	35	healthy skin	-	-	-
20.	OeKa	m	63	healthy skin	-	-	-
21.	OeMa	m	36	healthy skin	-	-	-
22.	OeNi	f	45	healthy skin	-	-	-
23.	PiMa	m	33	healthy skin	-	-	-
24.	RuMa	f	65	healthy skin	-	-	-
25.	ScTo	m	47	healthy skin	-	-	-
26.	ScAn	f	55	healthy skin	-	-	-
27.	ScCh	m	24	healthy skin	-	-	-
28.	SeJa	f	22	healthy skin	-	-	-
29.	SeMa	f	18	healthy skin	-	-	-
30.	SeSi	f	42	healthy skin	-	-	-

INTERPRETATION CRITERIA

The assessment is based on the morphologic changes detailed in the modified guidelines of ICDRG (Fregert S (1981/ 2nd edition) Manual of Contact Dermatitis. On behalf of the International Contact Dermatitis Research Group and the North American Contact Dermatitis Group, Munksgaard Publishers,Copenhagen).

Table 3: Grading of the patch test reactions

Symbol	Morphology	Meaning
-	no reaction	negative
?	only erythema, no infiltration	doubtful
+	erythema, infiltration, possibly discrete papules	weak positive reaction
++	erythema, infiltration, papules, vesicles	strong positive reaction
+++	erythema, infiltration, papules, confluent vesicles	extreme severe positive reaction
ir	different changes (soap effect, vesicles, bulla, necrosis)	irritative
nt		not tested

GENERAL DERMATOLOGICAL INTERPRETATION CRITERIA:

The distinction between irritation and allergy is of importance. As a general rule, a positive reaction is said to be „allergic“ if it has been graded as “+” to “+++ “ up to 72 hours or beyond.

Understanding the dynamics of the reaction may aid the assessment.

Allergic test reactions could persist ("Plateau-type") or even worsen ("Crescendo-type") on the day after the plaster has been removed). A "Decrescendo"-type (decrease of reaction after removal of plaster) on the other hand, indicates irritation.

If delayed reactions only develop 10-14 days after application, ("iatrogenic") sensitisation should be considered.

Irritative and allergic reactions present erythema and could also cause infiltration.

Papules, vesicles and bullae could demonstrate irritation as well as allergy, whereas pustules and necrosis point to severe irritation reactions.

Both reactions could spread beyond the original application site.

Moreover the individual expression of a reaction lies within a wide range.

CONCLUSION

No evidence of any skin disorder was detected in the test area of any of the 30 panellists after conducting patch testing for 24, 48 and 72 hours according to the internationally recognised guidelines of ICDRG (International Contact Dermatitis Research Group).

It can be concluded that the use of the product will not cause any unwanted skin reactions due to an irritating effect.


Dr. med. Gerit Schlippe
Investigating specialist
for dermatology, venereology




Dr. med. Werner Voss
Investigating specialist
for dermatology, allergology,
venereology, phlebology
and environmental medicine

Literature:

1. Suzuki, J., Environ Dermatol 4-3:202-21-1997
2. ICDRG, Proposal for a revised international standard series of patch tests, Contact Dermatitis, No. 36, 121-123 (1997)
3. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, April 1999 <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>
4. Scientific Basis of Patch Testing – S. Iris Ale and Howard I. Maibach, Dermatol. Beruf Umwelt / Occup. Environ. Dermatol. 50, Nr. 2, 43-50 (2002)
5. Scientific Basis of Patch Testing Part II – S. Iris Ale and Howard I. Maibach, Dermatol. Beruf Umwelt / Occup. Environ. Dermatol. 50, Nr. 3, 91-96 (2002)
6. Scientific Basis of Patch Testing Part III – S. Iris Ale and Howard I. Maibach, Dermatol. Beruf Umwelt / Occup. Environ. Dermatol. 50, Nr. 4, 131-133 (2002)
7. Cosmetics & Toiletries magazine, www.CosmeticsandToiletries.com, Vol. 127, No. 5/May 2012, pages 356-360

Dermatest[®] GmbH Engelstr. 37 48143 Münster

Bio-Sanitas GmbH GF Matthias Winkelmann
Rudolf Diesel Strasse 5-7
50226 Frechen

Münster, 11.09.2020

Zertifikat über das Produkt **Bio-Sanitas** **Menschliche Hygiene und Oberflächen**

Dermatologische Prüfungen am Menschen 2020

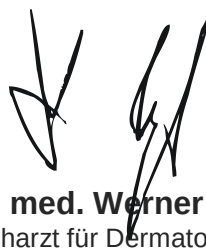
Die von mir unter fachärztlicher Kontrolle durchgeführten dermatologischen Prüfungen Ihres o. g. Produktes bestand das Produkt mit

„sehr gut“

Bei dem genannten Präparat traten im Epikutantest nach internationalen Richtlinien keine toxisch-irritativen Unverträglichkeitsreaktionen auf. Das Präparat kann deshalb mit dermatologisch getestet deklariert werden.


Dr. med. Gerrit Schlippe
Facharzt für Dermatologie,
Venerologie




Dr. med. Werner Voss
Facharzt für Dermatologie,
Venerologie, Allergologie,
Phlebologie und Umweltmedizin



Dermatest[®] GmbH Engelstr. 37 48143 Münster

Bio-Sanitas GmbH GF Matthias Winkelmann
Rudolf Diesel Strasse 5-7
50226 Frechen

Muenster, 11.09.2020

Certificate

for the Product

Bio-Sanitas

Menschliche Hygiene und Oberflächen

Dermatological test on humans in 2020

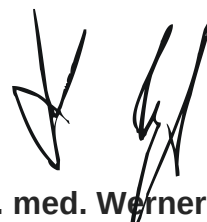
The dermatological test performed by us on your product under the control of dermatological specialists was passed for this product with the rating of

„excellent“

This product did not lead to toxic-irritative intolerance reactions in patch testing carried out in accordance with international guidelines. The preparation can therefore be declared as dermatologically tested.



Dr. med. Gerrit Schlippe
Investigating specialist
for dermatology, venereology



Dr. med. Werner Voss
Investigating Specialist
for dermatology, allergology,
venereology, phlebology
and environmental medicine

