

[HYGCEN GERMANY GMBH | BORNHÖVEDSTRASSE 78 | 19055 SCHWERIN]

OZONOS GmbH
Friedensstraße 2-6
A - 5020 Salzburg

2020-05-12

PRÜFBERICHT / TEST REPORT

Probennummer / <i>sample id number</i> :	SN 29606
Prüfungsnummer / <i>test number</i> :	2020-1004
Prüfprodukt / <i>test sample</i> :	OZONOS AC-PRO
Auftraggeber / <i>client</i> :	OZONOS GmbH
Auftragsdatum / <i>date of order</i> :	2020-04-10
Prüfzeitraum / <i>test period</i> :	2020-04-23 – 2020-04-27
Prüfmethode / <i>test method</i> :	EN 17272 - Quantitative Keimträgerprüfung zur luftübertragenen Raumdesinfektion durch automatisierte Verfahren - Bestimmung der bakteriziden, fungiziden, levuroziden, sporiziden, tuberkuloziden, mykobakteriziden, viruziden und Phagen-Wirksamkeit im humanmedizinischen Bereich, Veterinärbereich, in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen - Prüfverfahren und Anforderungen <i>Methods of airborne disinfection by automated process – determination of bactericidal, yeasticidal, fungicidal, sporicidal, mycobactericidal and virucidal activities, SOP 02-059</i>
Information / <i>information</i> :	modifizierte Testdurchführung mit <i>Bovinem Coronavirus</i> / <i>modified test run with Bovine Coronavirus</i> niedrige Belastung / <i>clean conditions</i> <i>Screeningprüfung / screening test</i>

Identifizierung der Probe / identification of the sample

Prüfprodukt / *test sample*: OZONOS AC-PRO

Probennummer / *sample id number*: SN 29606

Lieferdatum / *date of delivery*: 2020-04-17

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

Prüfmethode / *test method*: EN 17272 - Quantitative Keimträgerprüfung zur luftübertragenen Raumdesinfektion durch automatisierte Verfahren - Bestimmung der bakteriziden, fungiziden, levuroziden, sporiziden, tuberkuloziden, mykobakteriziden, viruziden und Phagen-Wirksamkeit im humanmedizinischen Bereich, Veterinärbereich, in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen - Prüfverfahren und Anforderungen

EN 17272 - Methods of airborne disinfection by automated process – determination of bactericidal, yeasticidal, fungicidal, sporicidal, mycobactericidal and virucidal activities, SOP 02-059



Abb. 1 / Fig. 1: Testgerät im Testraum (73.44 m³) /
tested device in the test room (73.44 m³)



Abb. 2 / Fig. 2: Prüfkörper in 2 m Abstand in 1,20 m Höhe (gleiche Höhe des Testgerätes) / test
specimen in 2 m distance and 1.20 m height (same height as the test device)

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

Prüftemperatur(en) / <i>test temperature(s):</i>	20°C ± 1°C	
Belastungssubstanz(en) / <i>interfering substance(s):</i>	niedrige Belastung / <i>clean conditions:</i> 0,3g/l Rinderserumalbumin / <i>0.3g/l bovine serum albumin</i>	
Prüfviren / <i>test organism(s):</i>	Bovines Coronavirus BCoV / <i>Bovine Corona virus</i>	RVB-003
	Passage Nr. / <i>passage no:</i>	P1
Zelllinie zur Vermehrung / <i>cell line for replication:</i>	PT-Zellen / <i>PT-cells</i>	CCLV-RIE 11
Titrationverfahren / <i>method of titration:</i>	Virustitration auf Zellen als Monolayer in 96-Well Mikrotiterplatten. 0,5ml Produktprüflösung werden mit 4,5ml eiskaltem DMEM + 2% FKS bis zu einer Verdünnung von 10 ⁻⁸ verdünnt. 100µl von jeder Verdünnung wurden in 8 wells der Mikrotiterplatte pipettiert. / <i>virus titration on cells as monolayer in 96-well microtitre plates. 0.5ml sample test solution were diluted with 4.5ml icecold DMEM with 2% FCS up to a dilution of 10⁻⁸. 100µl of each dilution were pipetted into 8 wells of the microtitre plate.</i>	
Einwirkzeit(en) / <i>contact time(s):</i>	24h	
Bebrütungstemperatur / <i>incubation temperature:</i>	36°C	
Verfahren zur Beendigung der Wirkung des Produktes und / <i>procedure to stop action of the sample:</i>	Verdünnung bis 10 ⁻⁴ innerhalb von 10 sec mit eisgekühltem DMEM + 2% FBS / <i>Dilution up to 10⁻⁴ within 10 sec with ice-cold DMEM + 2% FBS</i>	

Versuchsdurchführung / test procedure

100µl des Virusinokulums wurden in die Mitte einer jeden Prüfscheibe pipettiert und bis zur sichtbaren Trocknung in der Laminar Flow Bank getrocknet. Die maximale Trocknungszeit betrug 60 min. Die Scheiben wurden innerhalb von 2h nach Ablauf der Trocknungszeit verwendet.

Drei Prüfkörper wurden mittig im Raum aufgehängt. Die kontaminierte Seite war vom Prüfgerät abgewandt.

Nach Ablauf der Einwirkzeit von 24h erfolgte eine Elution der Prüfkörper in 5ml eiskaltem DMEM über 10 min auf einem Kreisschüttler und anschließende Verdünnung bis 10^{-8} in eiskaltem DMEM + 2% FKS. Anschließend erfolgte die Titration auf der Zellkultur.

Dazu wurden die Proben in ganzzahligen Potenzen von 10^0 in 4°C kaltem Medium (DMEM mit 2% FKS) verdünnt. Jeweils 100 µl einer Verdünnung wurden in 8 Vertiefungen einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Die Prüfung erfolgte in zweifach-Bestimmung.

Nach einer Inkubation von 2-4 Tagen bei 37°C im CO₂- Brutschrank wurden mittels eines inversen Mikroskops die zytopathogenen Effekte abgelesen.

100µl of virus inoculum were pipetted into the center of each test disc and dried until visible dryness in the laminar flow bench. The maximum drying time was 60 min. The carriers were used within 2 hours after the drying time. Three test specimens were hanged in the middle of the room. The contaminated side was turned away from the test device.

After the exposure time of 24 hours the test specimen were eluted in 5 ml ice-cold DMEM for 10 minutes on a laboratory shaker. Serial dilutions up to 10^{-8} in ice-cold DMEM + 2% FBS were performed. Then the titration was performed in the cell culture.

Each 100 µl of a dilution was added to 8 wells of a 96-well microtiter plate. The test was performed in duplicate.

After incubation for 2-4 days at 37°C in a CO₂ incubator, the cytopathogenic effects were read off by means of an inverted microscope.

Berechnung der viruziden Wirksamkeit / calculation of the virucidal activity

Der TCID₅₀ wurde entsprechend der Methode von Spearman und Kärber berechnet /
TCID₅₀ was calculated according to the method of Spearman and Kärber

$$m = x_k + d / 2 - d \sum p_i$$

- m = Negativer dekadischer Logarithmus des Titers auf Basis des Prüfvolumens / *negative decimal logarithm of the titre based on the test volume*
- x_k = Logarithmus der niedrigsten Dosierung (Verdünnungsstufe), bei der alle Prüfobjekte eine positive Reaktion abgeben / *logarithm of lowest dose (dilution level) at which all test objects exhibit a positive reaction*
- d = Logarithmus des Verdünnungsfaktors / *logarithm of dilution factor*
- p_i = Beobachtete Reaktionsrate / *observed reaction rate*

Berechnung der Reduktion / calculation of the reduction

$$R_{T1} = a - b$$

- R_{T1} = Reduktion des ersten Prüflaufs / *reduction from first test run*
- a = lg TCID₅₀/ml der Kontrolltitration aus dem ersten Prüflauf / *lg TCID₅₀/ml of control titration of the first test run*
- b = lg TCID₅₀/ml der „Restvirus“-Titration aus dem ersten Prüflauf / *lg TCID₅₀/ml of "rest virus" titration of the first test run*

Ergebnisse Bovines Coronavirus / test results Bovine Coronavirus

Tabelle 1 / table 1: Zusammenfassung der Ergebnisse von Bovinem Coronavirus / *summary of the results with Bovine Coronavirus*

Produktkonzentration / <i>test sample concentration</i>	Belastung / <i>interfering substance</i>	CD ₅₀	Scheibe Nr. <i>/ carrier no.</i>	Ig-TCID ₅₀ nach ...	Reduktionsfaktor nach... / <i>reduction factor after...</i>
				24h	24h
OZONOS AC-PRO	0.3g/l BSA	≤ 1.50	1	4.00	1.42
			2	4.50	0.92
			3	4.00	1.42
Viruskontrolle / <i>virus control</i>	0.3g/l BSA	n.a.	1	5.13	n.a.
			2	5.63	n.a.
			3	5.50	n.a.
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose				
CD ₅₀	Zytotoxische Dosis / <i>cytotoxic dose</i>				
n.a.	nicht anwendbar / <i>not applicable</i>				
n.d.	nicht durchgeführt / <i>not done</i>				
BSA	Rinderserumalbumin / <i>bovine serum albumin</i>				

Schlussfolgerung / conclusion:

Nach einer Expositionszeit von 24h mit dem Prüfgerät OZONOS AC-PRO bei geringer Belastung konnte eine Vermehrung von Bovinem Coronavirus in Kulturen von PT-Zellen nachgewiesen werden.

Die nachgewiesene Titerreduktion beträgt im Mittel 1,25lg. Das entspricht einer Reduktion von etwa 90% des Virus.

Die erforderliche Titerreduktion von ≥ 4lg Stufen konnte nicht nachgewiesen werden.

After an exposure time of 24h with the testing device OZONOS AC-PRO under clean conditions replication of Bovine Coronavirus could be detected in cultures of PT-cells.

The mean titer reduction is 1.25lg. This corresponds to a reduction of around 90% of the virus.

The required titre reduction of ≥ 4lg units could not be demonstrated.

- Archivierung:** Eine Ausfertigung des Berichtes wird zusammen mit den Rohdaten im Archiv des Auftragnehmers aufbewahrt.
- archiving:** *A copy of the test report will be kept together with the raw data in the contractor's archive.*
- Hinweis:** Die Prüfergebnisse beziehen sich ausschließlich auf die genannten Prüfprodukte. Auszugsweise Wiedergabe dieses Berichtes nur mit schriftlicher Genehmigung der HygCen Germany GmbH.
- note:** *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.*

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "S. Werner".

Dr. med. univ. S. Werner
Head of Scientific-Technical Affairs
Microbiological Test Methods

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "J. Köhnlein".

Dipl. Umweltwiss. J. Köhnlein
Division manager