

Parma, 22. Oktober 2020

Betreff: VCT OZONE GENERATOR (O3-NEX OzonePRO) – Wirksamkeitstest gegen Coronavirus

Die Desinfektion von Räumlichkeiten und Transportmitteln ist von größter Bedeutung, um die Ausbreitung von COVID-19 zu verhindern.

Zahlreiche Studien belegen die Wirksamkeit von Ozon als Biozid. Das Istituto Superiore di Sanità Italiano (italienisches Nationalinstitut für Gesundheit) weist in seinem ISS COVID-19-Bericht Nr. 56/2020 vom 23. Juli 2020, der diesen Sachverhalt bewertet, jedoch darauf hin, dass „derzeit keine direkten Beweise für die Wirksamkeit gegen SARS-CoV-2 aus kontrollierten Studien vorliegen“ und kommt zu der Schlussfolgerung, dass „weitere, nach vordefinierten Standards durchgeführte Studien von Nutzen wären, um Regeln für die wirksame und sichere Desinfektion von Räumlichkeiten/Oberflächen zu definieren, damit essenzielle Parameter wie Konzentration und Kontaktdauer bewertet werden können“.

MAHLE AFTERMARKET ITALY S.p.A., Hersteller des Geräts VCT OZONE GENERATOR, hat ein vom italienischen Gesundheitsministerium akkreditiertes und autorisiertes Labor beauftragt, eine spezifische Bewertung für dieses Produkt durchzuführen, um die Wirksamkeit gegen das SARS-CoV-2-Virus festzustellen.

Um das Risiko einer Verbreitung des SARS-CoV-2-Virus und einer Infektion der Anwender zu vermeiden, verwendete das Labor das bovine Coronavirus (BCoV), das normalerweise als Surrogat für SARS-assoziierte Viren (z. B. SARS-CoV oder SARS-CoV-2) verwendet wird und für den Menschen nur gering pathogen ist, während SARS-Viren hoch pathogen sind. Dabei zeigte sich, dass die Resistenz von BCoV gegenüber chemischer Desinfektion mindestens vergleichbar mit der des SARS-Virus ist, wenn nicht sogar etwas höher.

Der MAHLE VCT OZONE GENERATOR ist mit automatischen Ozonbehandlungen unterschiedlicher Dauer ausgestattet, die vom Anwender ausgewählt werden können. Um eine korrekte Bewertung der Wirksamkeit des Produkts zu gewährleisten, wurde für die Behandlung eine kurze Dauer (P1) ausgewählt.

Die vom Labor angewandten Bewertungsmethoden entsprechen folgenden Normen:

AFNOR NF T 72-281, 2014 – Verfahren zur aerogenen Oberflächendesinfektion – Bestimmung der bakteriziden, levuroziden, mykobakteriziden, tuberkuloziden, sporiziden und viruziden Wirkung, einschließlich Bakteriophagen.

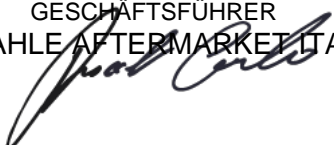
EN 17272:2020/UNI EN 17272:2020 – Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika Verfahren zur aerogenen Raumdesinfektion durch automatisierte Verfahren – Bestimmung der bakteriziden, mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden, levuroziden, viruziden und phagoziden Wirkung.

Die erzielten Ergebnisse bestätigen, dass der vom MAHLE VCT OZONE GENERATOR durchgeführte P1-Zyklus eine Reduktion der infektiösen Aktivität von $\geq 99,683\%$ bewirkt.

Sie belegen insbesondere die Wirksamkeit der mit dem MAHLE VCT OZONE GENERATOR erfolgten Behandlungen und tragen allgemein zum Nachweis der viruziden Wirkung von Ozon gegen das Coronavirus bei.

Der Testbericht ist im Anhang beigefügt.

CARLO ROCCHI
GESCHÄFTSFÜHRER
MAHLE AFTERMARKET ITALY



TITEL	EVALUATION OF DISINFECTION EFFICACY OF VCT OZONE GENERATOR AGAINST <i>Bovine Coronavirus</i> – surface virucidal activity (BEWERTUNG DER DISINFEKTIONSWIRKSAMKEIT DES VCT OZONE GENERATOR GEGEN DAS <i>BOVINE CORONAVIRUS</i> – viruzide Oberflächenaktivität)		
SPONSOR	MAHLE AFTERMARKET ITALY S.P.A. VIA RUDOLF DIESEL 10/A 43122 PARMA ITALIEN		
REFERENZ FÜR VERFAHREN	AFNOR NF T 72-281, 2014 – Verfahren zur aerogenen Oberflächendesinfektion – Bestimmung der bakteriziden, levuroziden, mykobakteriziden, tuberkuloziden, sporiziden und viruziden Wirkung, einschließlich Bakteriophagen EN 17272:2020/UNI EN 17272:2020 – Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Verfahren zur aerogenen Raumdesinfektion durch automatisierte Prozesse – Bestimmung der bakteriziden, mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden, levuroziden, viruziden und phagoziden Wirkung		
GERÄTE UND VERFAHREN			
BEZEICHNUNG DES GERÄTS (*)	VCT OZONE GENERATOR		
GERÄTE-TYPOLOGIE (*)	Ozongenerator – Anwendung in Fahrzeugen und Räumen		
HERSTELLER (*)	MAHLE Aftermarket Italy S.p.A.		
ALIQUOT DER MATERIALPOSITION	LV-MAT-IJE2-20-211-0G25:a		
REGISTRIERUNGSNR. PAKET	IP-LV-2020190-AEJ	EMPFANGSDATUM	08. Juli 2020
(*) VOM SPONSOREN BEREITGESTELLTE INFORMATIONEN			
STARTDATUM DER ANALYSE	02. Oktober 2020	ENDDATUM DER ANALYSE	07. Oktober 2020
VERSUCHSBEDINGUNGEN			
ANMERKUNG	Das bovine Coronavirus (BCoV) wird als Surrogatvirus für SARS-assozierte Viren (z. B. SARS-CoV oder SARS-CoV-2) verwendet, da es eng mit den SARS-Viren (einschließlich SARS-CoV-2) verwandt ist. Für Menschen ist es nur gering pathogen, während SARS-Viren hoch pathogen sind und in BSL-3-Sicherheitslaboren gehandhabt werden müssen. Das BCoV gehört zur selben Betacoronavirus-Gattung wie SARS-Viren und weist veröffentlichten Studien zufolge eine ähnliche Empfindlichkeit für Formulierungen der WHO auf. Tatsächlich erwies sich seine Resistenz gegenüber chemischer Desinfektion als mindestens vergleichbar mit der des SARS-Virus, wenn nicht sogar etwas höher.		
TESTZYKLUS	P1		
DAUER	35 Minuten		



BioPharma
Product Testing

OBERFLÄCHE	Baumwollträger mit einem Durchmesser von 4 cm
TESTTEMPERATUR	Zimmertemperatur (18–25 °C)
STÖRENDE SUBSTANZ	Bovines Serum Albumin (BSA) mit einer Endkonzentration von 0,3 g/L (0,03 % – simuliert Reinraumbedingungen)
TESTVIRUS	<i>Bovine Coronavirus (Betacoronavirus 1), Stamm S379 Riems (RVB-0020)</i>
ZELLINIE	<i>PT (CCLV-RIE 11)</i>

VERSUCHSDURCHFÜHRUNG (ZUSAMMENFASSENDE BESCHREIBUNG)	
TITRATION DER VIRUSSUSPENSION	<p>Die Virussuspension mit einer Konzentration von etwa 1×10^7 und 1×10^9 TCID₅₀/ml (oder einer ausreichend hohen Konzentration, um eine Titerreduktion von mindestens 4 log zu ermöglichen) wurde mittels serieller Verdünnungen im Verhältnis von 1:10 bis 10^{-8} mit eiskaltem Erhaltungsmedium verdünnt, die nach der Filtration mit den MicroSpin™-Säulen (S400 HR), ausgehend von der Virenbestandsuspension, durchgeführt wurden. Jede Verdünnung wurde sechsfach platziert, wobei 0,1 ml in 96-Well-Mikrotiterplatten übertragen wurden, die den konfluenten Monolayer (> 90 %) ohne eiskaltes Erhaltungsmedium enthielten. Parallel dazu wurden mindestens 6 Kavitäten der Mikrotiterplatte nicht mit dem viralen Inokulum befüllt, sondern lediglich mit dem eiskalten Erhaltungsmedium. Diese Kavitäten wurden als Kontrolle der Zelllinie verwendet.</p> <p>Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 ± 1 °C wurden 0,1 ml eiskaltes Erhaltungsmedium hinzugefügt. Nach Ablauf der erforderlichen Inkubationszeit wurde die Zellkultur mit einem inversen Mikroskop untersucht, um einen von der Virussuspension verursachten zytopathischen Effekt (CPE) festzustellen. Anschließend wurde die Infektionsaktivität (TCID₅₀-Auswertung) mit Hilfe der Spearman-Kärber-Methode berechnet.</p>
HERSTELLUNG DER INOKULUM-SUSPENSION	Neun Einheiten der Testvirussuspension wurden einer Einheit der störenden Substanz hinzugegeben. Kurz vor der Verwendung wurde die Inokulum-Suspension vermischt.
INOKULUM DER VERSUCHS-OBERFLÄCHE	Jeder Träger wurde mit 50 µl Inokulum-Suspension inokuliert, die bei Raumtemperatur auf einer Sicherheitswerkbank (Laminar Air Flow Cabinet) bis zu einer sichtbaren Trocknung maximal eine Stunde lang trocknen gelassen wurde.
VIRUSKONTROLL-TITRATION AUF DEM TRÄGER (T)	<p>Zwei Träger wurden inokuliert und die Virus-Wiederfindungsrate wurde für jeden der folgenden Zeitpunkte ermittelt:</p> <ul style="list-style-type: none"> - T 1: Wiederfindungsrate unmittelbar nach der Inokulation - T 2: Wiederfindungsrate unmittelbar nach dem Trocknungsschritt (Zeit 0) - T 3: Wiederfindungsrate nach der geplanten Zyklusdauer (maximale Kontaktdauer) <p>Nach Ablauf der jeweiligen eingestellten Bedingung wurden die Träger in einen Behälter mit 20 ml eiskaltem Erhaltungsmedium überführt.</p> <p>Das Inokulum wurde durch Mischen von den jeweiligen Trägern gelöst. Ausgehend von diesem gelösten Inokulum wurden acht serielle Verdünnungen im Verhältnis von 1:10 mit dem eiskalten Erhaltungsmedium aufbereitet. Von jeder Verdünnung wurden 0,1 ml in eine 96-Well-Mikrotiterplatte, die den konfluenten Monolayer (> 90 %) ohne eiskaltes Kulturmedium enthielt, überführt. Jede Verdünnung wurde in sechs Replikate aufgeteilt. Parallel dazu wurden mindestens 6 Kavitäten der Mikrotiterplatte nur mit dem eiskalten Erhaltungsmedium befüllt. Diese Kavitäten wurden als Kontrolle der Zelllinie verwendet. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 ± 1 °C wurden 0,1 ml eiskaltes Erhaltungsmedium hinzugefügt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellkultur mit einem inversen Mikroskop untersucht, um einen von der Virussuspension verursachten zytopathischen Effekt (CPE) festzustellen. Anschließend wurde die Infektionsaktivität (TCID₅₀-Auswertung) mit Hilfe der Spearman-Kärber-Methode berechnet und der Mittelwert für die Virustitration auf den Trägern (T1 – T2 – T3) wurde für jede eingestellte Bedingung berechnet.</p>

TESTVERFAHREN	<p>Der Versuch wurde in einer 1 m³ großen Schleusenkammer durchgeführt und die Ozonkonzentration wurde während des gesamten Zyklus gemessen.</p> <p>Drei inokulierte Träger wurden in vertikaler Position auf der gegenüberliegenden Seite der Desinfektionsvorrichtung platziert. Der Ozondetektor wurde innerhalb der Kammer positioniert. Anschließend wurde die Kammer verriegelt und der gewählte Zyklus gestartet.</p> <p>Nach dem Ende des eingestellten Zyklus wurde die Kammer geöffnet und die Zwangsbelüftung wurde einige Minuten lang aktiviert, um die Restozonkonzentration in der Luft zu reduzieren und ein sicheres Betreten des Raums zu gewährleisten.</p> <p>Die Testträger wurden nacheinander entnommen und in einen Behälter mit 20 ml eiskaltem Erhaltungsmedium überführt. Das Inokulum wurde durch Mischen von den jeweiligen Trägern gelöst. Ausgehend von diesem gelösten Inokulum wurden acht serielle Verdünnungen im Verhältnis von 1:10 mit dem eiskalten Erhaltungsmedium aufbereitet. Von jeder Verdünnung wurden 0,1 ml in eine 96-Well-Mikrotiterplatte, die den konfluenten Monolayer (> 90 %) ohne eiskaltes Kulturmedium enthielt, überführt. Mindestens 6 Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden nicht mit dem viralen Inokulum befüllt, sondern lediglich mit dem Kulturmedium. Diese Kavitäten wurden als Kontrolle der Zelllinie verwendet. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37±1 °C wurden 0,1 ml eiskaltes Erhaltungsmedium hinzugefügt.</p> <p>Nach Ablauf der erforderlichen Inkubationszeit wurde die Zellkultur mit einem inversen Mikroskop untersucht, um einen von der Virussuspension verursachten zytopathischen Effekt (CPE) festzustellen. Anschließend wurde der Mittelwert für die Infektionsaktivität (TCID₅₀-Auswertung) mit Hilfe der Spearman-Kärber-Methode in der mit dem Testobjekt behandelten Zellkultur berechnet.</p>
VALIDITÄTSKRITERIEN	<p>Der Test auf viruzide Aktivität ist aussagekräftig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:</p> <p><i>Analyse der viralen Aktivität (Virustitration)</i></p> <p>Der minimale Titer der Virussuspensionen beträgt mindestens 1x10⁷ und 1x10⁹ TCID₅₀/ml; in jedem Fall muss er ausreichend hoch sein, um zur Überprüfung des Verfahrens eine Titerreduktion von mindestens 4 Log zu ermöglichen.</p>

BERECHNUNG DER
LOG-REDUKTION

Die Reduktion (R) wurde als Differenz zwischen dem Log-Titer der Viruskontrolle bei maximaler Kontaktdauer (a) und dem Log-Titer des residualen Virus (Restvirus) nach Exposition im eingestellten Zyklus des Geräts (b) berechnet.
Die Reduktion (R) wurde daher wie folgt ermittelt:

$$R = a - b$$

Wobei:

RF = Reduktionsfaktor aus dem Testlauf

 $a = \text{Log TCID}_{50}/\text{ml}$ Viruskontrolltitration auf dem Träger (T3) $b = \text{Log TCID}_{50}/\text{ml}$ Restvirustitration nach dem Testlauf

Der entsprechende %-Wert der Abtötung wurde wie folgt berechnet:

$$\% \text{ Abtötung} = (Aa - Bb)/Aa * 100$$

Wobei:

 $Aa = \text{antiLog TCID}_{50}/\text{ml}$ Viruskontrolltitration auf dem Träger (T3) $Bb = \text{antiLog TCID}_{50}/\text{ml}$ Restvirustitration nach dem Testlauf

ERGEBNISSE	Log-Reduktion und % Abtötung nach dem eingestellten Zyklus auf dem Gerät VCT OZONE GENERATOR		
	Zyklus P1 – 35 min		
	<i>Bovines Coronavirus, Stamm S379 Riems</i>	$\geq 2,50 \pm 0,000$	99,683 %
	Maximale gemessene Ozonkonzentration	$\geq 7,5$ ppm	
Siehe Anhang N. 1–2			
FAZIT	<p>In Übereinstimmung mit den Anforderungen des Sponsors zeigen die erzielten Ergebnisse, dass der vom VCT OZONE GENERATOR durchgeführte Zyklus P1 unter den gewählten Testbedingungen und bei Verwendung von bovinem Serum Albumin (BSA) mit einer Endkonzentration von 0,3 g/L (0,03 % – simuliert Reinraumbedingungen) eine Reduktion $\geq 2,50 \pm 0,000$ Log (99,683 %) des bovinen Coronavirus (Betacoronavirus 1) bewirkt.</p> <p>Entsprechend der Standardreferenz wird die Log-Reduktion in Abhängigkeit zur unbehandelten Kontrolle mit vorgegebener Kontaktzeit berechnet. Das getestete Virus weist jedoch aufgrund seiner Empfindlichkeit gegenüber Austrocknung auf textilen Oberflächen einen signifikanten Verlust seiner Überlebensfähigkeit auf. Unter Berücksichtigung der ursprünglichen Virusmenge, die auf der Testoberfläche getrocknet und nicht der gesamten Verweildauer ausgesetzt wurde, kann festgestellt werden, dass der vom VCT OZONE GENERATOR durchgeführte Zyklus P1 unter den gewählten Testbedingungen und bei Verwendung von bovinem Serum Albumin (BSA) mit einer Endkonzentration von 0,3 g/L (0,03 % – simuliert Reinraumbedingungen) eine Reduktion $\geq 3,50 \pm 0,000$ Log (99,987 %) des bovinen Coronavirus (Betacoronavirus 1) bewirkt.</p>		
ANHANG	<p>N. 1: RAW DATA ELABORATION (Ausführliche Darstellung der Rohdaten) (5 Seiten) N. 2: OZONE LEVEL DETECTION (Bestimmung der Ozonkonzentration) (12 Seiten)</p>		

Dieser Testbericht darf ohne ausdrückliche schriftliche Genehmigung von Eurofins Biolab S.r.l. nicht auszugsweise vervielfältigt werden. Die Testergebnisse beziehen sich nur auf die getesteten Objekte. Die Probenahme ist stets vom Sponsor vorzunehmen, es sei denn, im Testbericht wird ausdrücklich etwas anderes festgelegt. Vom Sponsor bereitgestellte Informationen unterliegen der Verantwortung des Sponsors.

Eurofins Biolab S.r.l. – Via B. Buozzi 2, Vimodrone (Mailand), Italien – P.IVA/USSt-IdNr.: 007620140960
Tel: +39 022507151 – Fax: +39 0225071599 – E-Mail:
InfoFarma@eurofins.com

Überprüft und elektronisch unterzeichnet zur Genehmigung durch den
Technischen Studienleiter von
Elisa Anna Maccagni,
Mitarbeitende,
für die Eurofins Biolab S.r.l. am 23. Oktober 2020 um
12:35:09 UTC+02:00