

# EFFECT OF THE OZONOS ON CORONA VIRUSES

**Test Report (SN 29606, 2020-1004)  
HygCen Germany GmbH  
with Background and Explanations**



# **Background and explanation to the test report (SN 29606, 2020-1004) of HygCen Germany GmbH Effect of the OZONOS on corona viruses**

## **Background of the test**

In spring 2020, OZONOS GmbH commissioned the test laboratory HygCen Germany GmbH to test the virucidal (= inactivation of viruses) effect of OZONOS products on Bovine Coronavirus (BCoV). HygCen Germany GmbH is a "competent, independent and non-partisan" testing institute certified by the German Accreditation Body (DAkKS) and is currently accredited according to EN ISO/ IEC 17025 for disinfectants and medical devices. For this reason HygCen Germany GmbH was selected by OZONOS GmbH for the test.

The usual test routine of HygCen Germany GmbH determines whether or not the examined method achieves disinfection for the examined pathogen (bacteria, viruses, spores, fungi). A disinfection is the reduction of the pathogens to a number where one no longer becomes ill. In the case of viruses, disinfection is usually defined as the inactivation of at least 99.99% of the viruses. In technical language this also means "a reduction of 4 log<sub>10</sub> steps". Figuratively speaking, this means that after disinfection, out of 10,000 viruses, only one is left over that has retained its disease-causing properties.

In the OZONOS products, the virucidal effect is caused by UV-C radiation and the ozone produced. Outside the device, i.e. in the room air and on surfaces (furniture, floors, walls, etc.), only the ozone emitted is effective. HygCen Germany GmbH has tested the virucidal effect on bovine corona viruses on surfaces on the basis of *EN 17272 Quantitative Carrier test for Airborne Room Disinfection by Automated Processes*. This procedure is the standard for proving the virucidal effectiveness of procedures. According to HygCen Germany GmbH, there is no suitable and reliable test arrangement for the effectiveness on viruses in the air, e.g. viruses in saliva droplets (coughing, sneezing). According to HygCen Germany GmbH, however, this is not relevant, as the droplets sink to the ground relatively quickly and deposit the viruses on the surfaces. Due to the higher concentration of ozone in the device and the UV-C radiation, a higher virucidal effectiveness on the air that flows through the device can generally be assumed.

## **Result of the test**

Due to the regulations of the testing institute, the focus of the test at HygCen Germany GmbH was on the proof of the disinfecting effect. The necessary reduction of 99.99 % of corona viruses was not achieved with the OZONOS AC-1 Pro in the 73.44 m<sup>3</sup> room after 24 hours of continuous operation (3rd set of conclusions, page 7). After 24 hours a reduction of corona viruses by approx. 90 % was confirmed (2nd sentence of the conclusions, page 7). This corresponds to a reduction of 1.25 log<sub>10</sub> steps.

## **Interpretation of the result**

1. The OZONOS products were not intended as "medical disinfection methods" in the strict sense of the regulations. A reduction of 99.99 % is desirable, but not realistic in the chosen experimental set-up (room size, ozone concentration, etc.). The aim of the test was to show the effectiveness of ozone on corona viruses in "reasonable" concentrations by an accredited, independent testing institute. The procedure and the result clearly meet this demands of OZONOS GmbH.
2. The test arrangement with a room size of 73.44 m<sup>3</sup> (approx. 30 m<sup>2</sup>) is rather an upper limit for the typical (home) application of OZONOS products. In reality the OZONOS will be in operation under more favourable conditions during intensive cleaning. Model calculations show an ozone concentration of 0.05 ppm to 0.06 ppm in permanent operation. The ozone concentrations are much lower compared to a professional disinfection (higher than 1 ppm) with ozone generators, therefore it can be guaranteed that the OZONOS is harmless for humans and animals, provided that a few rules are followed.
3. The result shows the virucidal effect on corona viruses even at low concentrations. The application of OZONOS products for intensive cleaning is therefore appropriate.

[ 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 m<sup>3</sup>) /  
tested device in the test room (73.44 m<sup>3</sup>)



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

Prüf temperatur(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 <sup>-8</sup> 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<sup>-8</sup>. 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 <sup>-4</sup> innerhalb von 10 sec mit eisgekühltem DMEM + 2% FBS / <i>Dilution up to 10<sup>-4</sup> 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 CO<sub>2</sub>- 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 CO<sub>2</sub> incubator, the cytopathogenic effects were read off by means of an inverted microscope.*



## Berechnung der viruziden Wirksamkeit / calculation of the virucidal activity

Der TCID<sub>50</sub> wurde entsprechend der Methode von Spearman und Kärber berechnet /  
*TCID<sub>50</sub> 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<sub>k</sub> = 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<sub>i</sub> = Beobachtete Reaktionsrate / *observed reaction rate*

## Berechnung der Reduktion / calculation of the reduction

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

- R<sub>T1</sub> = Reduktion des ersten Prüflaufs / *reduction from first test run*  
a = lg TCID<sub>50</sub>/ml der Kontrolltitration aus dem ersten Prüflauf / *lg TCID<sub>50</sub>/ml of control titration of the first test run*  
b = lg TCID<sub>50</sub>/ml der „Restvirus“-Titration aus dem ersten Prüflauf / *lg TCID<sub>50</sub>/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 <sub>50</sub>	Scheibe Nr. <i>/ carrier no.</i>	Ig-TCID <sub>50</sub> 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 <sub>50</sub>	Tissue culture infectious dose				
CD <sub>50</sub>	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