

Watch Water GmbH
Fahlachstr. 14
68165 Mannheim



2020-03-31

RE-PRÜFBERICHT / RE-TEST REPORT

Probennummer / <i>sample id number</i> :	SN 29308
Prüfungsnummer / <i>test number</i> :	2020-0658
Prüfprodukt / <i>test sample</i> :	VIROL - OXY
Auftraggeber / <i>client</i> :	Watch Water GmbH
Auftragsdatum / <i>date of order</i> :	2020-03-05
Prüfzeitraum / <i>test period</i> :	2020-03-24 – 2020-03-27
Prüfmethode / <i>test method</i> :	EN 14476 (2013+A2:2019): Quantitativer Suspensionstest - Viruzide Wirksamkeit (Phase 2, Stufe 1) <i>Quantitative suspension test - virucidal activity</i> (<i>phase 2, step 1</i>)
Information / <i>information</i> :	Testdurchführung mit Bovinem Coronavirus / <i>test run with Bovine Corona Virus</i> niedrige Belastung / <i>clean conditions</i>

Identifizierung der Probe / identification of the sample

Prüfprodukt / <i>test sample</i> :	VIROL - OXY
Probennummer / <i>sample id number</i> :	SN 29308
Chargennummer / <i>batch number</i> :	VO2020D03M03
Formulierungscode / <i>formulation code</i> :	nicht angegeben / <i>not specified</i>
Lieferdatum / <i>date of delivery</i> :	2020-03-09
Lagerbedingungen / <i>storage conditions</i> :	die des Herstellers / <i>those of the manufacturer</i>
Vom Hersteller zur Anwendung empfohlenes Verdünnungsmittel / <i>sample diluent recommended by the manufacturer for use</i> :	Leitungswasser / <i>tap water</i>
Aussehen / <i>appearance</i> :	rosa Pulver / <i>pink powder</i>
Geruch / <i>odour</i> :	produktspezifisch / <i>product specific</i>
Wirkstoffsubstanz(en) laut Herstellerangaben / <i>active substance(s) according to the manufacturer</i> :	in 100g / <i>per 100g</i> : 4.67g H ₂ O ₂

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

Prüfmethode / test method:

EN 14476 (2013+A2:2019)*:

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika -
Quantitativer Suspensionsversuch Viruzidie für in
der Humanmedizin verwendete chemische
Desinfektionsmittel und Antiseptika -
Prüfverfahren und Anforderungen
(Phase 2, Stufe 1)

EN 14476 (2013+A2:2019):*

*Chemical disinfectants and antiseptics – Virucidal
quantitative suspension test for chemical
disinfectants and antiseptics used in human
medicine – Test method and requirements
(phase 2, step 1)*

SOP 02-200

* Für den Nachweis der viruziden Wirksamkeit nach EN 14476 werden Suspensionen von 8 Volumenteilen des Desinfektionsmittels (Produktprüflösung) mit einem Teil Belastungssubstanz (0,3% bei der Prüfung von dirty conditions bzw. 0,03% bei der Prüfung von clean conditions) und einem Volumenteil Virussuspension mit einem Titer von mindestens 10^7 TC ID 50 / ml inkubiert. Nach Ablauf der Einwirkungszeit wird die Wirkung des Desinfektionsmittels durch Verdünnen (bzw. Gel-Filtration) gestoppt und zur Ermittlung des Restvirusgehaltes eine Verdünnungsreihe entsprechend der Progression 1:10 / 1:100 / 1:1000 u.s.w. angelegt. Die Titration erfolgt im Mikrotitersystem auf 96-well Platten. Darüber hinaus werden folgende Kontrollen durchgeführt: Viruskontrolle, Zytotoxizitätskontrolle, Suszeptibilitätskontrolle und Referenzinaktivierung. Die Kalkulation der Ergebnisse erfolgt nach Spearman und Kärber und wird als Differenz zwischen dem Titer der Viruskontrolle und dem Titer der Produktprüflösung unter Einbeziehung eines 95%igen Konfidenzintervalles berechnet.

** For the evaluation of the virucidal activity according to EN 14476 suspensions of 8 parts by volume of the disinfectant solution (sample test solution) were mixed with one volume of an interfering substance (0.3% in the test with dirty conditions and 0.03% for clean conditions) and one volume of virus suspension with a titer of at least 10^7 TC ID 50 / ml After the contact time the disinfectant activity was stopped by diluting (or gel filtration). For the determination of residual virus content, a dilution series according to the progression of 1:10 / 1:100 / 1:1000 etc. was prepared. The titration was carried out in microtiter 96-well plates. In addition, the following controls were performed: virus control, cytotoxicity control, susceptibility control and a reference inactivation. The calculation of titer reductions is based on the method of Spearman and Kärber and is measured as the difference between the titer of the virus control and the titer of sample test solution including a 95% confidence interval.*

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

Prüftemperatur(en) / <i>test temperature(s):</i>	20°C ± 1°C	
Produktprüfkonzentration(en) / <i>sample test concentration(s):</i>	2%, 1%, 0.5% (m/v) Tatsächliche Prüfkonzentrationen / <i>real test concentrations</i>	
Aussehen der Produktverdünnungen / <i>Appearance of the product-dilutions:</i>	klar / <i>clear</i>	
Stabilität der Produktverdünnung / <i>Stability of the productdilution:</i>	Keine Veränderungen der Stabilität und des Aussehens während der Testdurchführung. / <i>no changes in stability and appearance during the testprocedure.</i>	
	kein Niederschlag oder Ausfällungen / <i>no flocculants or precipitation</i>	
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>	1
Zelllinie zur Vermehrung / <i>cell line for replication:</i>	PT-Zellen / <i>PT-cells</i>	CCLV-RIE 11

Prüfverfahrenbeschreibung / description of the test method

Titrationenverfahren /
method of titration:

Virustitration auf Zellen als Monolayer in 96-Well Mikrotiterplatten. 0,5ml Produktprüflösung werden mit 4,5ml eiskaltem DMEM + 2% FBS bis zu einer Verdünnung von 10^{-8} verdünnt. 100µl von jeder Verdünnung wurden in 8 wells der Mikrotiterplatte pipettiert. / *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% FBS up to a dilution of 10^{-8} . 100µl of each dilution were pipetted into 8 wells of the microtitre plate.*

Einwirkzeit(en) / contact time(s):

10 Minuten / minutes

Bebrütungstemperatur /
incubation temperature:

$36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

Probenverdünnungsmittel /
diluent used for test solution:

Wasser standardisierter Härte /
hard water according to standard

Verfahren zur Beendigung der Wirkung des
Produktes und / procedure to stop action of
the sample:

Verdünnung bis 10^{-4} innerhalb von 10sec mit eisgekühltem DMEM + 2% FBS /
Dilution up to 10^{-4} within 10sec with ice-cold DMEM + 2% FBS

Stabilität und Aussehen des Gemisches
während des Prüfablaufs / stability and
appearance of the mixture during the
procedure:

kein Niederschlag oder Ausfällungen /
no flocculants or precipitation

pH-Werte / pH-values 20°C:

2% in WSH ¹⁾	2.00
1% in WSH ¹⁾	2.23
0.5% in WSH ¹⁾	2.48

¹⁾ Wasser standardisierter Härte /
hard water according to standard

Prüfverfahrenbeschreibung / description of the test method

Kontrolle der Zellsensibilität /
control of cell susceptibility:

Vergleichende Virustitrationen wurden auf Zellen
welche mit 0,01% Produktlösung bzw. PBS
behandelt wurden, durchgeführt / *comparative
virus titrations were performed on cells, which had
been treated with 0.01% solution of the sample
respectively PBS*

Referenz Virusinaktivierung /
reference virus inactivation:

0,7% Formaldehydlösung /
0.7% (V/V) formaldehyde solution

Einwirkzeiten / *contact times:* 30, 60mn

Prüfanforderung / test requirement:

EN 14476:

Reduktion / *reduction* $\geq 4\lg$

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 Standardabweichung / calculation of the standard error

$$S_m = \sqrt{d^2 \sum \{p_i(1-p_i)\} / (n-1)}$$

- S_m = Standardfehler des logarithmischen Titers / *standard error of logarithmic titre*
 d = Logarithmus des Verdünnungsfaktors / *logarithm of dilution factor*
 p_i = Beobachtete Reaktionsrate / *observed reaction rate*
 n = Anzahl der Prüfobjekte je Verdünnung / *number of test objects per dilution*

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*

Berechnung des 95 %-Vertrauensbereich von R aus der ersten Annäherung (KR(T1)) / calculation of the 95 % confidence interval of R of the first approach

$$K_{R(T1)} = 2 \times \sqrt{S_a^2 + S_b^2}$$

- K_{R(T1)} = 95 %-Vertrauensbereich von R aus dem ersten Prüflauf / *95 % confidence interval of the R of the first test run*
 S_a = Standardfehler der Kontrolltitration aus dem ersten Prüflauf / *standard error of control titration of the first test run*
 2S_a = 95 %-Vertrauensbereich der Kontrolltitration aus dem ersten Prüflauf / *95 % confidence interval of control titration of the first test run*
 S_b = Standardfehler der „Restvirus“-Titration aus dem ersten Prüflauf / *standard error of "rest virus" titration of the first test run*
 2S_b = 95 %-Vertrauensbereich der „Restvirus“-Titration aus dem ersten Prüflauf / *95 % confidence interval of "rest virus" titration of the first test run*

Sofern im Testansatz mit Desinfektionsmittel kein „Restvirus“ mehr nachweisbar ist, entspricht das 95% KI des RF des Testansatzes dem des Kontrollansatzes.

Von einer Wirksamkeit des Desinfektionsmittels gegen Viren wird immer dann ausgegangen, wenn der Reduktionsfaktor $\geq 4\lg$ Stufen beträgt.

In case no “residual virus” is detectable in the test procedure with test corresponds this with the 95% CI of the RF of the test procedure with the control.

For virucidal activity the product shall demonstrate at least a decimal lg reduction factor of $\geq 4\lg$ units.

Zusammenfassungen der Ergebnisse des quantitativen Suspensionstests entsprechend EN 14476 mit **VIROL - OXY** und Bovinem Coronavirus sind in den Tabellen 1- 2 dargestellt. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Kontrollen zusammengefasst.

*Summaries of the results of the quantitative suspension test according EN 14476 with **VIROL - OXY** and Bovine Coronavirus are shown in tables 1-2. In table 3 the results of the controls are summarized.*

Ergebnisse Bovines Coronavirus / test results Bovine Coronavirus

Tabelle 1 / table 1: Zusammenfassung der Ergebnisse von **VIROL - OXY** und Bovinem Coronavirus / summary of the results with **VIROL - OXY** and Bovine Coronavirus

Produktkonzentration / test sample concentration	Belastung / interfering substance	CD ₅₀	Ig-TCID ₅₀ nach ... min Ig-TCID ₅₀ after ... min	Titerreduktion ≥ 4lg nach...min ≥ 4lg reduction after ... min
(m/v)			10	
VIROL - OXY 2%	0.3g/l BSA	≤ 3.50	≤ 3.50 ± 0.00	-
VIROL - OXY 1%	0.3g/l BSA	≤ 2.50	≤ 2.50 ± 0.00	10
VIROL - OXY 0.5%	0.3g/l BSA	≤ 2.50	≤ 2.50 ± 0.00	10
Viruskontrolle / virus control	0.3g/l BSA	n.a.	6.75 ± 0.32	n.a.
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose			
CD ₅₀	Zytotoxische Dosis / cytotoxic dose			
n.a.	nicht anwendbar / not applicable			
n.d.	nicht durchgeführt / not done			
BSA	Rinderserumalbumin / bovine serum albumin			

Ergebnisse Bovines Coronavirus / test results Bovine Coronavirus

Tabelle 2 / table 2: Zusammenfassung der Ergebnisse von **VIROL - OXY** und Bovinem Coronavirus anhand der Reduktionsfaktoren / summary of the results with **VIROL - OXY** and Bovine Coronavirus showing the reduction factors

Produktkonzentration / test sample concentration	Belastung / interfering substance	CD ₅₀	Viruskontrolle / virus control [Ig-TCID ₅₀]	Reduktionsfaktor / reduction factor [Ig-TCID ₅₀]
(m/v)				10min
VIROL - OXY 2%	0.3g/l BSA	≤ 3.50	6.75 ± 0.32	≥ 3.25 ± 0.32
VIROL - OXY 1%	0.3g/l BSA	≤ 2.50		≥ 4.25 ± 0.32
VIROL - OXY 0.5%	0.3g/l BSA	≤ 2.50		≥ 4.25 ± 0.32
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose			
CD ₅₀	Zytotoxische Dosis / cytotoxic dose			
n.a.	nicht anwendbar / not applicable			
n.d.	nicht durchgeführt / not done			
BSA	Rinderserumalbumin / bovine serum albumin			

Ergebnisse Bovines Coronavirus / test results Bovine Coronavirus

Tabelle 3 / table 3: Viruskontrollen und Referenzinaktivierung mit Bovinem Coronavirus /
virus controls and reference inactivation of Bovine Coronavirus

Konzentration der Kontrolle / concentration of the control	Belastung / interfering substance	CD ₅₀	Ig-TCID ₅₀ nach ... min Ig-TCID ₅₀ after ... min			
			0	10	30	60
(v/v)			0	10	30	60
Formaldehyd 0.7% (V/V)	PBS	≤ 4.50	n.d.	n.d.	≤ 4.50 ± 0.00	≤ 4.50 ± 0.00
Viruskontrolle / virus control 20°C	0.3g/l BSA	n.a.	n.d.	6.75 ± 0.32	n.d.	n.d.
Nachwirkungskontrolle / inactivation control 2% VIROL - OXY	0.3g/l BSA	n.a.	7.13 ± 0.36	n.d.	n.d.	n.d.
Nachwirkungskontrolle / inactivation control WSH	0.3g/l BSA	n.a.	7.50 ± 0.00	n.d.	n.d.	n.d.
Zellsensibilität / cell susceptibility (PBS)	0.3g/l BSA	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	6.50 ± 0.00
Zellsensibilität / cell susceptibility (0.01 VIROL - OXY)	0.3g/l BSA	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	6.50 ± 0.00
TCID ₅₀	Tissue culture infectious dose					
CD ₅₀	Zytotoxische Dosis / cytotoxic dose					
n.a.	nicht anwendbar / not applicable					
n.d.	nicht durchgeführt / not done					
BSA	Rinderserumalbumin / bovine serum albumin					
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung / phosphate buffered salt solution					

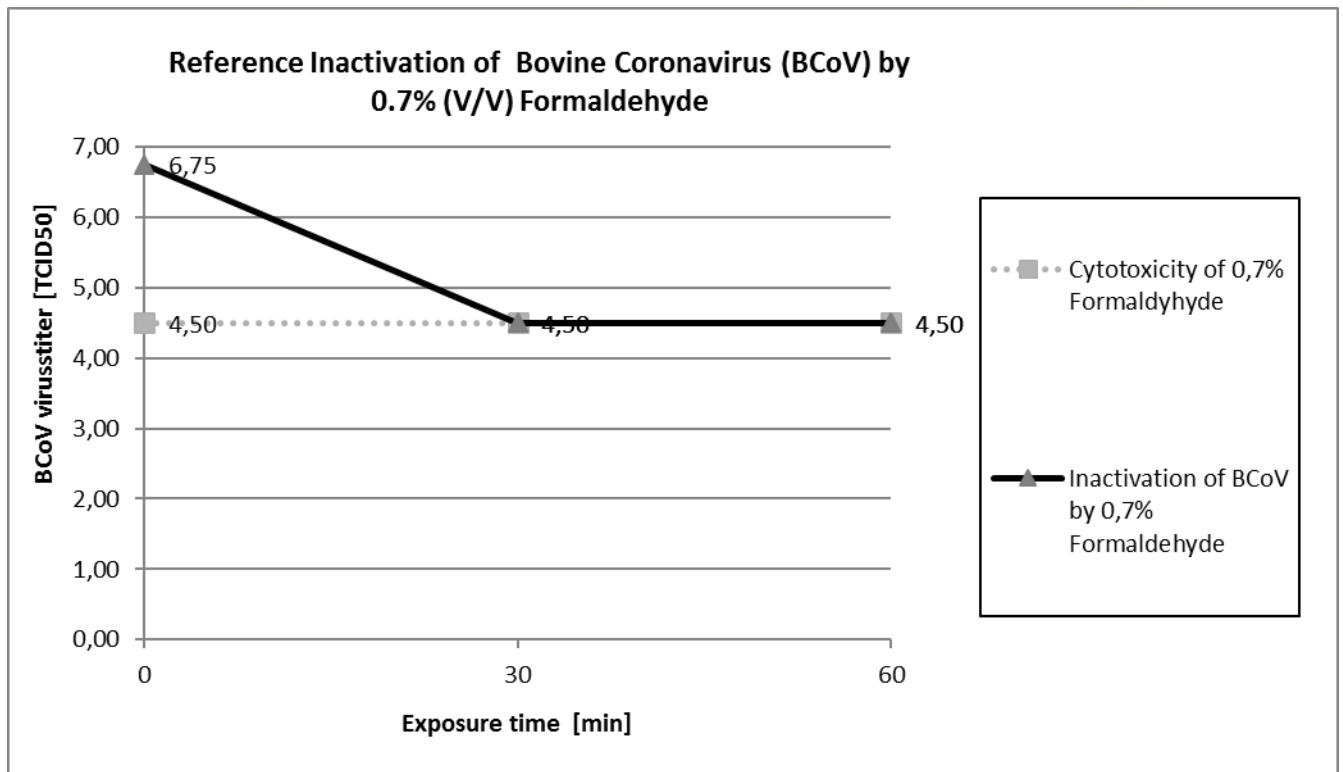


Abb. 1 / fig. 1 : Referenzinaktivierung von Bovinem Coronavirus durch 0,7% Formaldehyd / *reference inactivation of Bovine Coronavirus by 0.7% formaldehyde*

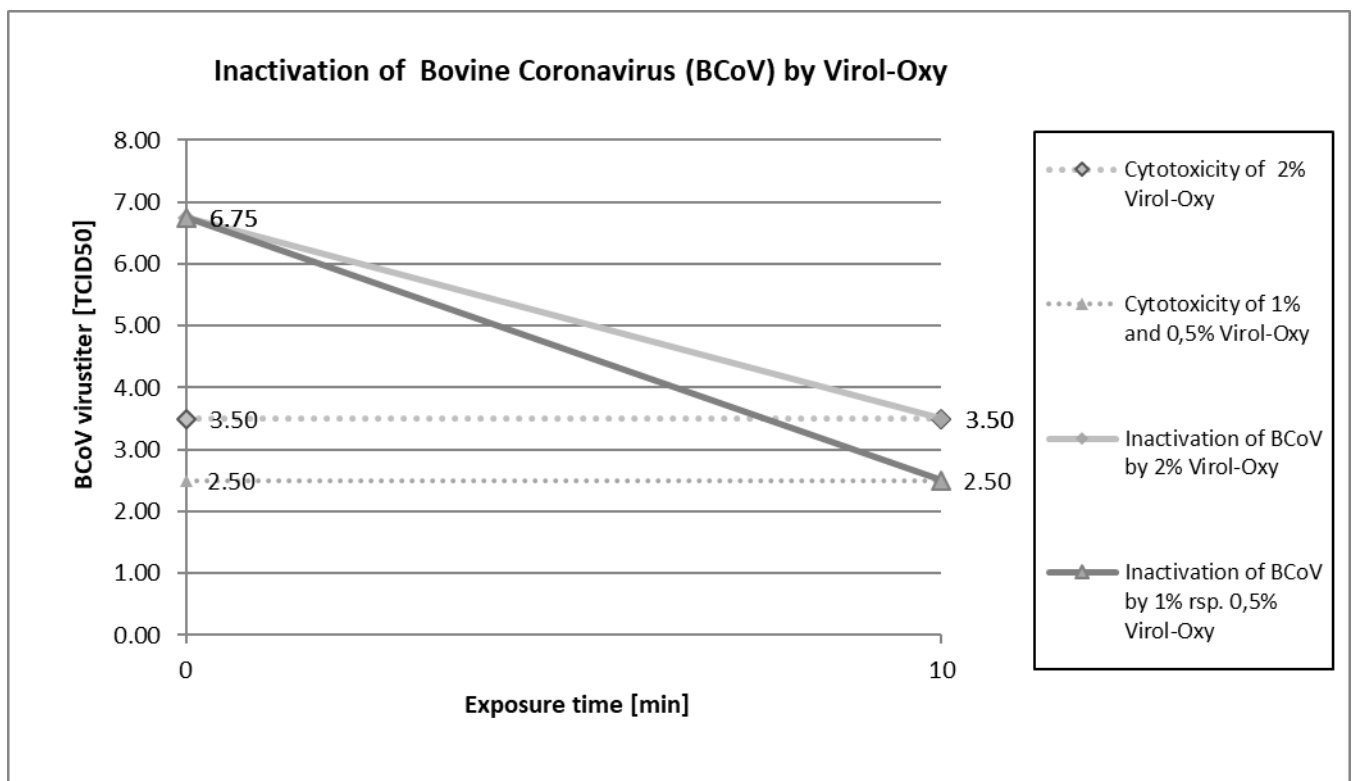


Abb. 2 / fig. 2 : Inaktivierung von Bovinem Coronavirus durch VIROL - OXY / *inactivation of Bovine Coronavirus by VIROL - OXY*

Verifizierung des Verfahrens / verification of the methodology

Zytotoxizität / *cytotoxicity*: Das 2%ige Produkt **VIROL - OXY** zeigte bei einer Verdünnung von 10^{-3} (3,50 CD_{50}) keinen zytotoxischen Effekt. Das 1%ige und 0,5%ige Produkt zeigten bei einer Verdünnung von 10^{-2} (2,50 CD_{50}) keinen zytotoxischen Effekt. Dies stört folglich nicht die erforderlichen Verdünnungen zum Nachweis einer viruziden Wirkung.

*The 2% sample **VIROL - OXY** showed no cytotoxic effect at a dilution of 10^{-3} (3.50 CD_{50}).*

The 1% and 0.5% product showed no cytotoxic effect at a dilution of 10^{-2} (2.50 CD_{50}).

Therefore this does not affect the dilutions needed to demonstrate the virucidal activity.

Viruskontrolle /
virus control:

Der Virustiter für das Bovinem Coronavirus betrug $6,75 \pm 0,32$ $TCID_{50}$. Die nachweisbare Titerreduktion für die Konzentrationen 1% und 0,5% betrug somit $\geq 4lg$.

The virus titre for Bovine Coronavirus was 6.75 ± 0.32 $TCID_{50}$.

The detectable titre reduction for the concentrations 1% and 0.5% was $\geq 4lg$.

Zellsensibilität /
cell susceptibility:

Die vergleichende Virustitration auf vorbehandelten und nicht vorbehandelten Zellen zeigte einen Unterschied von $< 1lg$ Stufen.

The comparative virus titration on pretreated cells and not pretreated cells showed a difference $< 1lg$ units of the virus titre.

Referenzinaktivierung /
reference inactivation:

Der Reduktionsfaktor von 0,7% Formaldehyd betrug nach 30 und 60 Minuten Einwirkungszeit $\geq 2,25lg$.

The reduction factor of 0.7% formaldehyde was $\geq 2.25lg$ after 30 and 60 minutes contact time.

Nachwirkungskontrolle /
inactivation control:

Die vergleichende Virustitration der Nachwirkungskontrolle und der Viruskontrolle zeigte einen Unterschied von $< 0,5lg$ Stufen.

The comparative virus titration of the control of efficiency of suppression of samples activity and the virus control showed a difference of $< 0.5lg$ units.

Schlussfolgerung / conclusion:

Nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten mit dem 1%igen und 0,5%igen **VIROL - OXY** bei niedriger Belastung konnte keine Vermehrung von Bovinem Coronavirus in Kulturen von PT-Zellen nachgewiesen werden.

Die erforderliche Titerreduktion von $\geq 4lg$ Stufen konnte nachgewiesen werden.

*After an exposure time of 10 minutes with 1% and 0.5% **VIROL - OXY** under clean conditions no replication of Bovine Coronavirus could be detected in cultures of PT-cells.*

The required titre reduction of $\geq 4lg$ units could 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.*

Dieser RE-Prüfbericht ersetzt den ursprünglichen Prüfbericht vom 31.03.2020 aufgrund eines Schreibfehlers auf der Seite 11. / *This RE test report replaces the test report dated 2020-03-31 due to a typo on page 11.*



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



Dipl. Umweltwiss. J. Köhnlein
Division manager

