

[HYGCEN GERMANY GMBH | BORNHÖVEDSTRASSE 78 | 19055 SCHWERIN]

Watch Water GmbH
Fahrlachstr. 14
68165 Mannheim



Deutsche
Akkreditierungsstelle
D-PL-18818-02-01
D-PL-18818-02-02



2020-04-28

PRÜFBERICHT / TEST REPORT

Probennummer / sample id number: SN 29308

Prüfungsnummer / test number: 2020-0525

Prüfprodukt / test sample: VIROL - OXY

Auftraggeber / client: Watch Water GmbH

Auftragsdatum / date of order: 2020-03-05

Prüfzeitraum / test period: 2020-04-21 – 2020-04-24

Prüfmethode / test method:
EN 14476 (2013+A2:2019):
Quantitativer Suspensionstest - Viruzide Wirksamkeit
(Phase 2, Stufe 1)
*Quantitative suspension test - virucidal activity
(phase 2, step 1)*

Information / information:
Testdurchführung mit Poliovirus Typ 1 /
test run with Poliovirus Type 1
niedrige Belastung / clean conditions

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>	produkspezifisch / <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 Konfidenzintervall 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>	3%, 2%, 1%, 0.5% (m/v) Tatsächliche Prüfkonzentrationen / <i>real test concentrations</i>
Aussehen der Produktverdünnung(en) / appearance of the product dilution(s):	Klar / <i>clear</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>	Human poliovirus type 1, strain LSc-2ab Passage Nr. / <i>passage no:</i> P6
Zelllinie zur Vermehrung / <i>cell line for replication:</i>	HeLa ATCC CCL-2
Titrationsverfahren / <i>method of titration:</i>	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. / <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% FBS 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>	10 Minuten / <i>minutes</i>

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

Bebrütungstemperatur / <i>incubation temperature:</i>	36°C ± 1°C
Probenverdünnungsmittel / <i>diluent used for test solution:</i>	Wasser standardisierter Härte / <i>hard water according to standard</i>
Verfahren zur Beendigung der Wirkung des Produktes und / <i>procedure to stop action of the sample:</i>	Verdünnung bis 10^{-4} innerhalb von 10sec mit eisgekühltem DMEM + 2% FBS / <i>Dilution up to 10^{-4} within 10sec with ice-cold DMEM + 2% FBS</i>
Stabilität der Produktverdünnung / <i>stability of the product dilution:</i>	Keine Veränderungen der Stabilität und des Aussehens während der Testdurchführung. / <i>No changes in stability and appearance during the test procedure.</i>
pH-Werte / <i>pH-values</i> 20°C:	kein Niederschlag oder Ausfällungen / <i>no flocculants or precipitation</i>
	3% in WSH ¹⁾ 1.80 2% in WSH ¹⁾ 1.66 1% in WSH ¹⁾ 2.14 0.5% in WSH ¹⁾ 2.47
Kontrolle der Zellsensibilität / <i>control of cell susceptibility:</i>	Vergleichende Virustitrationen wurden auf Zellen welche mit 0,01% Produktlösung bzw. PBS behandelt wurden, durchgeführt / <i>comparative virus titrations were performed on cells, which had been treated with 0.01% solution of the sample respectively PBS</i>
Referenz Virusinaktivierung / <i>reference virus inactivation:</i>	0,7%(V/V) Formaldehydlösung / <i>0.7% (V/V) formaldehyde solution</i>
	Einwirkzeiten / <i>contact times:</i> 30, 60min

Prüfanforderung / test requirement:

EN 14476: Reduktion / *reduction* ≥ 4lg

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 TCID_{50/ml} der Kontrolltitration aus dem ersten Prüflauf / lg TCID_{50/ml} of control titration of the first test run
b = lg TCID_{50/ml} der „Restvirus“-Titration aus dem ersten Prüflauf / lg TCID_{50/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 Poliovirus Typ 1 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 Poliovirus Type 1 are shown in tables 1-2. In table 3 the results of the controls are summarized.*

Ergebnisse Poliovirus Typ 1 / test results Poliovirus Type 1

Tabelle 1 / table 1: Zusammenfassung der Ergebnisse von **VIROL - OXY** und Poliovirus Typ 1 / summary of the results with **VIROL - OXY** and Poliovirus Type 1

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)			10min	
VIROL - OXY 3%	0.3g/l BSA	≤ 2.50	≤ 2.50 + 0.00	10
VIROL - OXY 2%	0.3g/l BSA	≤ 2.50	≤ 2.50 + 0.00	10
VIROL - OXY 1%	0.3g/l BSA	≤ 2.50	≤ 2.50 + 0.00	10
VIROL - OXY 0.5%	0.3g/l BSA	≤ 1.50	5.00 ± 0.38	-
Viruskontrolle / virus control	0.3g/l BSA	n.a.	7.25 ± 0.50	-
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			

Tabelle 2 / table 2: Zusammenfassung der Ergebnisse von **VIROL - OXY** und Poliovirus Typ 1 anhand der Reduktionsfaktoren / summary of the results with **VIROL - OXY** and Poliovirus Type 1 showing the reduction factors

Produktkonzentration / test sample concentration	Belastung / interfering substance	CD ₅₀	Viruskontrolle virus control [lg-TCID ₅₀]	Reduktionsfaktor reduction factor [lg-TCID ₅₀]
(m/v)				10min
VIROL - OXY 3%	0.3g/l BSA	≤ 2.50	7.25 ± 0.50	≥ 4.75 ± 0.50
VIROL - OXY 2%	0.3g/l BSA	≤ 2.50		≥ 4.75 ± 0.50
VIROL - OXY 1%	0.3g/l BSA	≤ 2.50		≥ 4.75 ± 0.50
VIROL - OXY 0.5%	0.3g/l BSA	≤ 1.50		2.25 ± 0.63
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 Poliovirus Typ 1 / test results Poliovirus Type 1

Tabelle 3 / table 3: Viruskontrollen und Referenzaktivierung mit Poliovirus Typ 1 / virus controls and reference inactivation of Poliovirus Type 1

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
(m/v)						
Formaldehyde 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.	7.25 ± 0.50	n.d.	n.d.
Nachwirkungskontrolle / inactivation control (3% VIROL - OXY)	0.3g/l BSA	n.a.	7.50 ± 0.00	n.d.	n.d.	n.d.
Nachwirkungskontrolle WSH / inactivation control hard water	0.3g/l BSA	n.a.	7.88 ± 0.36	n.d.	n.d.	n.d.
Zellsensibilität / cell susceptibility (PBS)	0.3g/l BSA	n.a.	n.d..	n.d.	n.d.	7.00 ± 0.38
Zellsensibilität / cell susceptibility (0.01% VIROL - OXY)	0.3g/l BSA	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	6.75 ± 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					
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung / phosphate buffered salt solution					

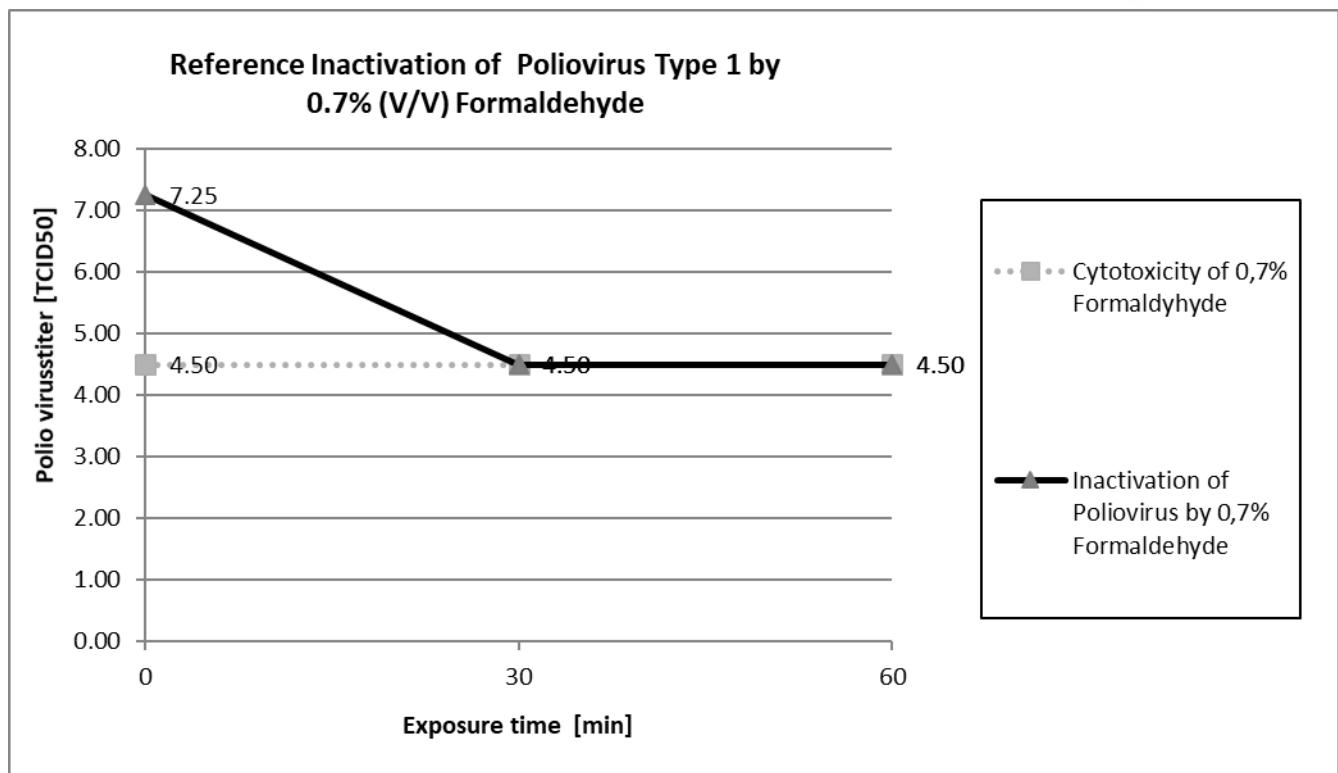


Abb. 1 / fig. 1 : Referenzinaktivierung von Poliovirus Typ 1 durch 0,7% Formaldehyd / reference inactivation of Poliovirus Type 1 by 0,7% formaldehyde

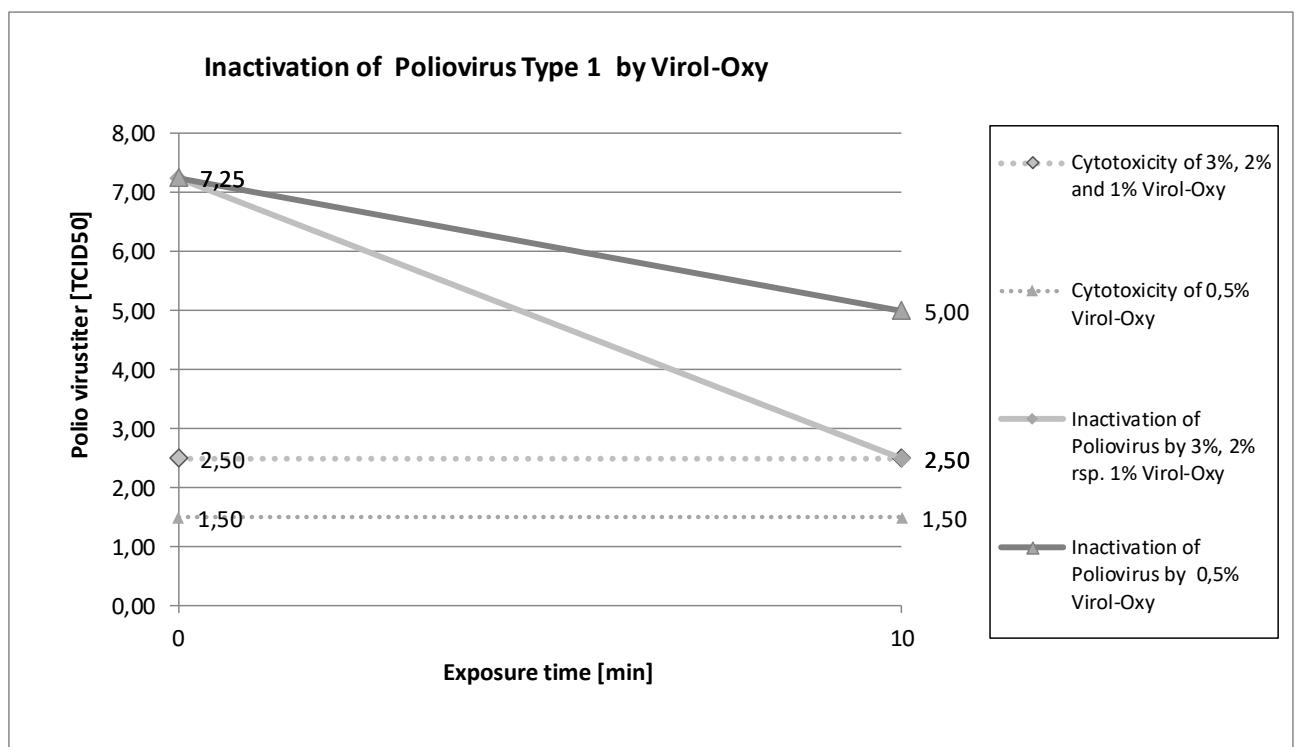


Abb. 2 / fig. 2 : Inaktivierung von Poliovirus Typ 1 durch VIROL - OXY / inactivation of Poliovirus Type 1 by VIROL - OXY

Verifizierung des Verfahrens / verification of the methodology

Zytotoxizität / cytotoxicity: Das 3%ige, 2%ige und 1%ige Produkt **VIROL - OXY** zeigte bei einer Verdünnung von 10^{-2} (2,50 CD₅₀) keinen zytotoxischen Effekt. Das 0,5%ige Produkt **VIROL - OXY** zeigte bei einer Verdünnung von 10^{-1} (1,50 CD₅₀) keinen zytotoxischen Effekt. Dies stört folglich nicht die erforderlichen Verdünnungen zum Nachweis einer viruziden Wirkung.

*The 3%, 2% and 1% sample **VIROL - OXY** showed no cytotoxic effect at a dilution of 10^{-2} (2.50 CD₅₀).*

*The 0.5% sample **VIROL - OXY** showed no cytotoxic effect at a dilution of 10^{-1} (1.50 CD₅₀).*

Therefore this doesn't affect the dilutions needed to demonstrate the virucidal activity.

Viruskontrolle / virus control:

Der Virustiter für das Poliovirus Typ 1 betrug $7,25 \pm 0,50$ TCID₅₀. Die nachweisbare Titerreduktion betrug somit $\geq 4\lg$.

The virus titre for Poliovirus Type 1 was 7.25 ± 0.50 TCID₅₀.

The detectable titre reduction was $\geq 4\lg$.

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 min Einwirkungszeit $\geq 2,75\lg$.

The reduction factor of 0.7% formaldehyde was $\geq 2.75\lg$ after 30 and 60min 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 10min mit dem 3%igen, 2%igen und 1%igen Produkt **VIROL - OXY** bei niedriger Belastung konnte keine Vermehrung von Poliovirus Typ 1 in Kulturen von HeLa Zellen nachgewiesen werden.

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

*After an exposure time of 10min with 3%, 2% and 1% of the product **VIROL - OXY** under clean conditions no replication of Poliovirus Type 1 could be detected in cultures of HeLa cells. The required titre reduction of $\geq 4\lg$ 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.*



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



Dipl. Umweltwiss. J. Köhnlein
Division manager

Annex

Rohdaten – Quantitativer Suspensionsversuch Viruzidie (Phase 2, Stufe 1) mit Poliovirus Typ 1 / Raw data – Virucidal quantitative suspension test (phase 2, step 1) according to EN 14476 with VIROL - OXY and Poliovirus Type 1