

TENZI Sp. z o.o.
Skarbimierzycze 20
PL-72-002 Doluje



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



Anerkannt durch/Recognized by
Zentralstelle der Länder
für Gesundheitsschutz
bei Arzneimitteln und
Medizinprodukten
ZLG-AP-314.10.23
www.zlg.de

2020-10-20

PRÜFBERICHT / TEST REPORT

Probennummer / <i>sample id number</i> :	SN 30290
Prüfungsnummer / <i>test number</i> :	2020-2129
Prüfprodukt / <i>test sample</i> :	Alcovirex
Auftraggeber / <i>client</i> :	TENZI Sp. z o.o.
Auftragsdatum / <i>date of order</i> :	2020-07-15
Prüfzeitraum / <i>test period</i> :	2020-10-06 bis / <i>to</i> 2020-10-09
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 Coronavirus</i> niedrige Belastung / <i>clean conditions</i>

Identifizierung der Probe / *identification of the sample*

Prüfprodukt / <i>test sample:</i>	Alcovirex
Probennummer / <i>sample id number:</i>	SN 30290
Chargennummer / <i>batch number:</i>	15.07.2020
Lieferdatum / <i>date of delivery:</i>	2020-07-22
Lagerbedingungen / <i>storage conditions:</i>	die des Herstellers / <i>those of the manufacturer</i>
Vom Hersteller zur Anwendung empfohlenes Verdünnungsmittel / <i>sample diluent</i> <i>recommended by the manufacturer for use:</i>	konzentrierte Anwendung / <i>concentrated application</i>
Aussehen / <i>appearance:</i>	klare, farblose Flüssigkeit / <i>clear colourless liquid</i>
Geruch / <i>odour:</i>	produktspezifisch / <i>product specific</i>
Wirkstoffsubstanz(en) laut Herstellerangaben / <i>active substance(s)</i> <i>according to the manufacturer:</i>	in 100g / <i>per 100g:</i> 70g Ethanol / <i>70g ethanol</i>

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

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>	80%, 50%, 25% (v/v) tatsächliche Prüfkonzentrationen / <i>real test concentrations</i>	
Aussehen der Produktverdünnung(en) / <i>appearance of the product dilution(s):</i>	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 virus:</i>	Bovines Coronavirus BCoV / <i>Bovine Coronavirus</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
	Passage Nr. / <i>Passage no.</i>	P72
Titrimationsverfahren / <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 product 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>	60 Sekunden / <i>seconds</i>	

Prüfverfahrenbeschreibung / description of the test method

Bebrütungstemperatur / <i>incubation temperature:</i>	36°C ± 1°C
Probenverdünnungsmittel / <i>diluent used for test solution:</i>	destilliertes Wasser / <i>distilled water</i>
Verfahren zur Beendigung der Wirkung des Produktes / <i>procedure to stop action of the sample:</i>	Verdünnung bis 10 ⁻⁴ innerhalb von 10s mit eisgekühltem DMEM + 2% FKS / <i>Dilution up to 10⁻⁴ within 10s with ice-cold DMEM + 2% FBS</i>
Stabilität und Aussehen des Gemisches während des Prüfablaufs / <i>stability and appearance of the mixture during the procedure:</i>	keine Veränderungen der Stabilität und des Aussehens während der Testdurchführung / <i>no changes in stability and appearance during the test procedure</i> kein Niederschlag oder Ausfällungen / <i>no flocculants or precipitation</i>
pH-Werte / <i>pH-values 20°C:</i>	100%: pH = 6.43 80% in a.d.*: pH = 5.98 50% in a.d.: pH = 5.75 25% in a.d.: pH = 6.05 *) a.d. = destilliertes Wasser / <i>distilled water</i>
Kontrolle der Zellsensibilität / <i>control of cell susceptibility:</i>	Vergleichende Virustitrationen wurden auf Zellen welche mit 0,1% Produktlösung bzw. PBS behandelt wurden, durchgeführt / <i>comparative virus titrations were performed on cells, which had been treated with 0.1% solution of the sample respectively PBS</i>
Referenz Virusinaktivierung / <i>reference virus inactivation:</i>	0,7% (m/v) Formaldehydlösung / <i>0.7% (m/v) formaldehyde solution</i>
Einwirkzeit(en) / <i>contact time(s):</i>	30 und / <i>and</i> 60 Minuten / <i>minutes</i>
Referenz Virusinaktivierung / <i>reference virus inactivation:</i>	70% (v/v) Isopropanol / <i>70% (v/v) isopropanol</i>
Einwirkzeit(en) / <i>contact time(s):</i>	60 Sekunden / <i>seconds</i>

Prüfanforderung / test requirement:

EN 14476: Reduktion / *reduction* ≥ 4lg

Versuchsdurchführung / test procedure

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 unter hoher Belastung bzw. 0,03% bei der Prüfung unter niedriger Belastung) und einem Volumenteil Virussuspension mit einem Titer von mindestens 10^7 TCID₅₀/ml inkubiert.

Nach Ablauf der Einwirkzeit 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 usw. 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) are mixed with one volume of an interfering substance (0.3% in the test under dirty conditions and 0.03% in the test under clean conditions) and one volume of virus suspension with a titer of at least 10^7 TCID₅₀/ml.

After the contact time the disinfectant activity is 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. is prepared. The titration is carried out in 96-well microtiter plates. In addition, the following controls are 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.

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*

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

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 **Alcovirex** und Bovinem Coronavirus sind in den Tabellen 1- 2 dargestellt. In der Tabelle 3 sind die Ergebnisse der Kontrollen zusammengefasst.

*Summaries of the results of the quantitative suspension test according EN 14476 with **Alcovirex** 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 **Alcovirex** und Bovinem Coronavirus / summary of the results with **Alcovirex** and Bovine Coronavirus

Produktkonzentration / <i>test sample concentration</i>	Belastung / <i>interfering substance</i>	Ig-CD ₅₀	Ig-TCID ₅₀ nach / <i>Ig-TCID₅₀ after</i>	Titerreduktion ≥ 4lg nach Sekunden / ≥ 4lg reduction after seconds
(v/v)			60s	
Alcovirex 80%	0.3g/l BSA	≤ 2.50	≤ 2.50 ± 0.00	60
<i>Alcovirex 50%</i>		≤ 1.50	≤ 1.50 ± 0.00	60
Alcovirex 25%		≤ 1.50	6.88 ± 0.36	-
Viruskontrolle / <i>virus control 1ml</i>		n.a.	7.00 ± 0.44	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>			

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

Produktkonzentration / <i>test sample concentration</i>	Belastung / <i>interfering substance</i>	Ig-CD ₅₀	Viruskontrolle <i>virus control</i> [lg-TCID ₅₀]	Reduktionsfaktor <i>reduction factor</i> [lg-TCID ₅₀]
(v/v)				60s
Alcovirex 80%	0.3g/l BSA	≤ 2.50	7.00 ± 0.44	≥ 4.50 ± 0.44
<i>Alcovirex 50%</i>		≤ 1.50		≥ 5.50 ± 0.44
Alcovirex 25%		≤ 1.50		0.12 ± 0.57
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>			

Ergebnisse Bovines Coronavirus / test results Bovine Coronavirus

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

Konzentration der Kontrolle / concentration of the control	Belastung / interfering substance	lg-CD ₅₀	lg-TCID ₅₀ nach / lg-TCID ₅₀ after			
			0min	60s	30min	60min
0,7% (m/v) Formaldehydlösung / 0.7% (m/v) formaldehyde solution	PBS	≤ 4.50	n.d.	n.d.	≤ 4.50 ± 0.00	≤ 4.50 ± 0.00
70% (v/v) Isopropanol / 70% (v/v) isopropanol	0.3g/l BSA	≤ 2.50	n.d.	≤ 2.50 ± 0.00	n.d.	n.d.
Viruskontrolle / virus control 20°C 1ml		n.a.	n.d.	7.00 ± 0.44	n.d.	n.d.
Nachwirkungskontrolle / inactivation control 80% Alcovirex		≤ 2.50	8.25 ± 0.50	n.d.	n.d.	n.d.
Nachwirkungskontrolle ad / inactivation control distilled water		n.a.	7.88 ± 0.42	n.d.	n.d.	n.d.
Zellsensibilität / cell susceptibility (PBS)		n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	6.88 ± 0.36
Zellsensibilität / cell susceptibility (0.1% Alcovirex)		≤ 1.50	n.d.	n.d.	n.d.	7.00 ± 0.38
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					

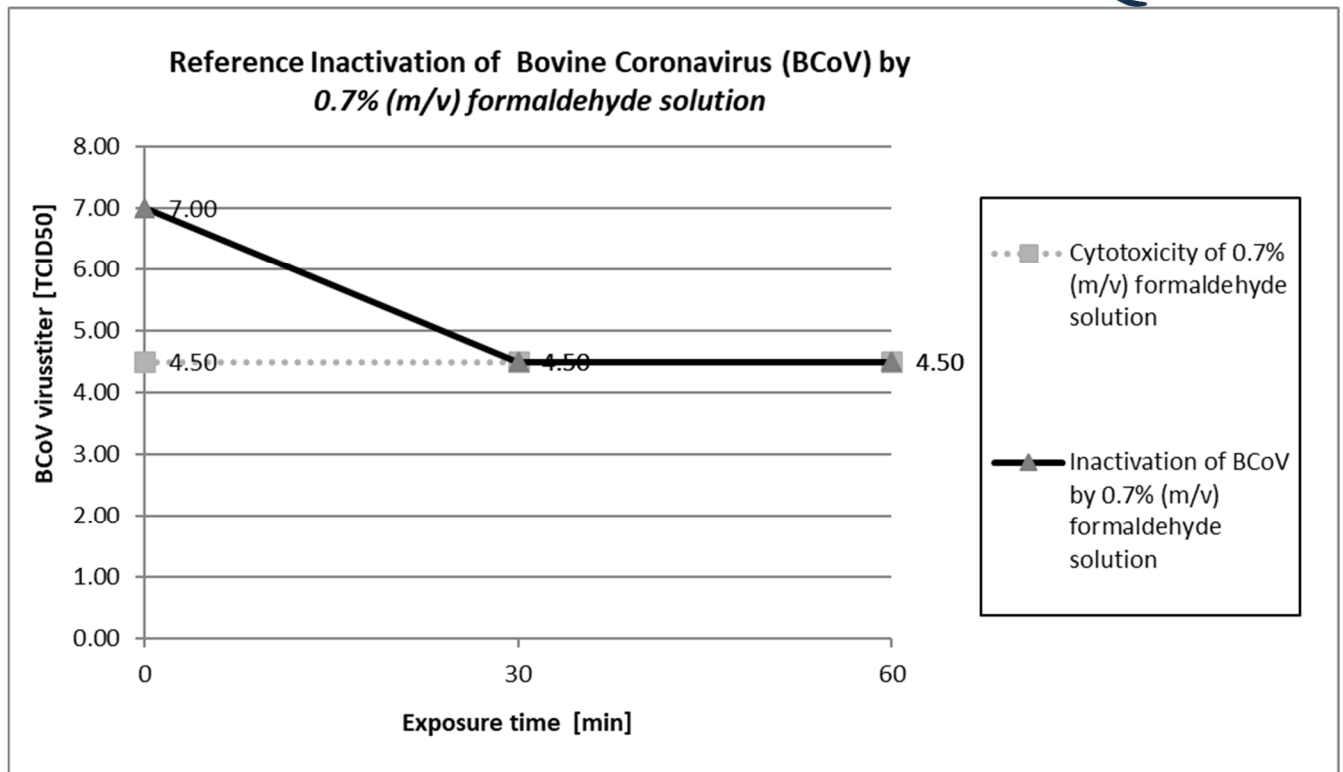


Abb. 1 / fig. 1: Referenzinaktivierung von Bovinem Coronavirus durch 0,7% (m/v) Formaldehydlösung /
reference inactivation of Bovine Coronavirus by 0.7% (m/v) formaldehyde solution

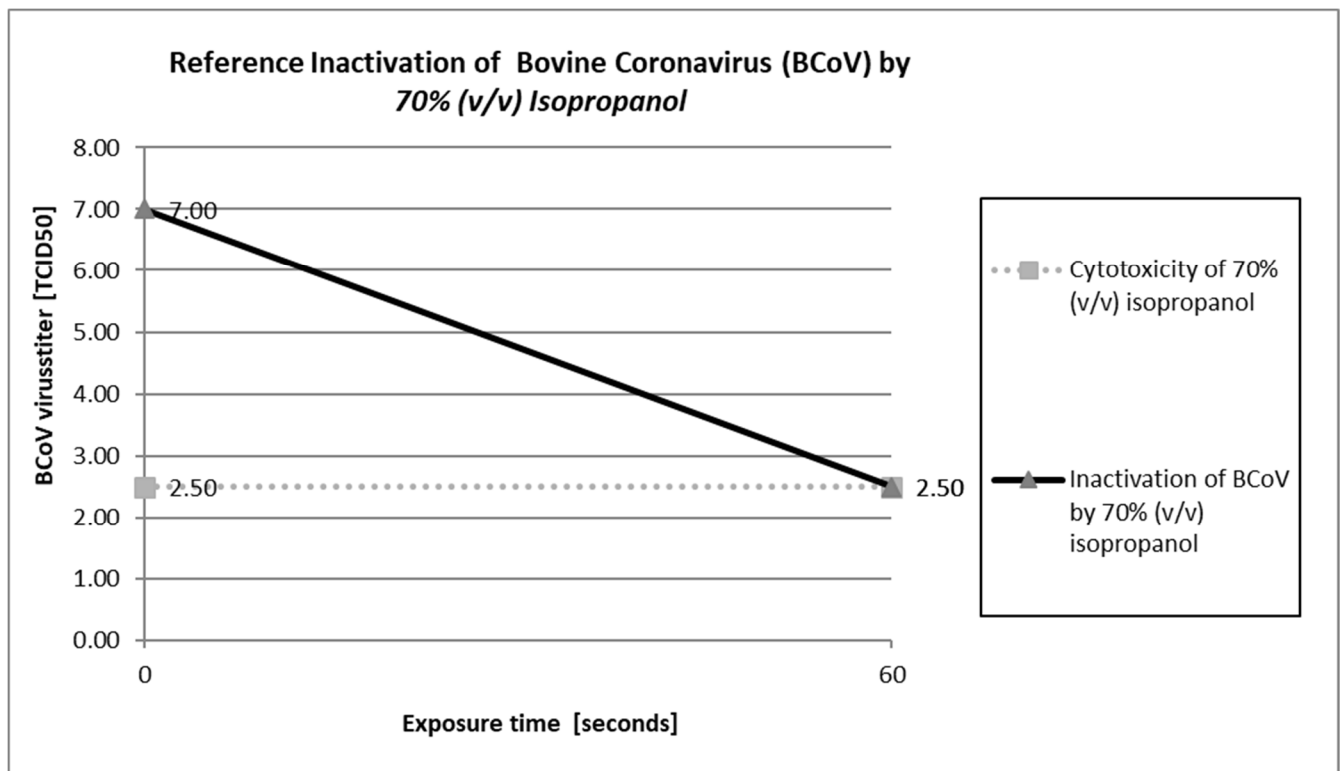


Abb. 2 / fig. 2: Referenzinaktivierung von Bovinem Coronavirus durch 70% (v/v) Isopropanol /
reference inactivation of Bovine Coronavirus by 70% (v/v) isopropanol

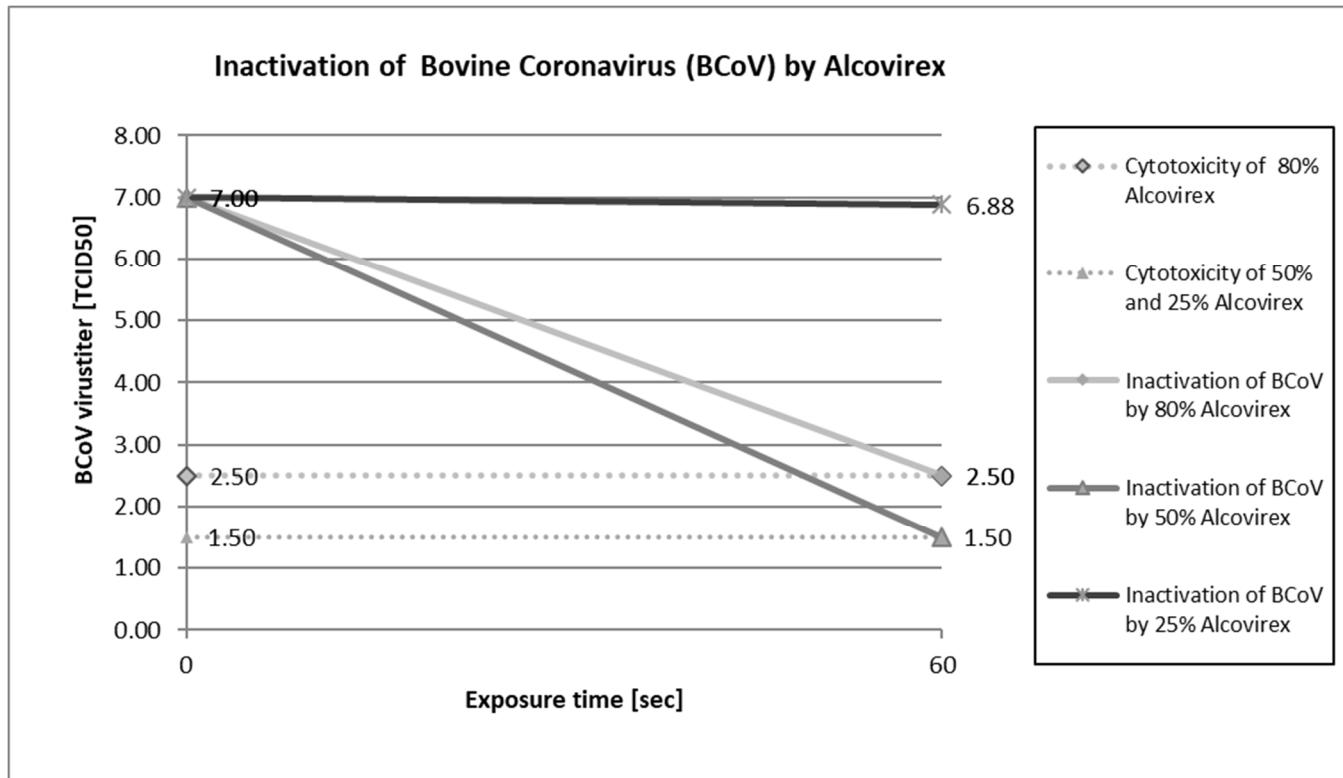


Abb. 3 / fig. 3 : Inaktivierung von Bovinem Coronavirus durch **Alcovirex** /
*inactivation of Bovine Coronavirus by **Alcovirex***

Verifizierung des Verfahrens / Verification of the methodology

Zytotoxizität / *cytotoxicity*: Das **80%ige** Produkt **Alcovirex** zeigte bei einer Verdünnung von 10^{-2} (2,50lg-CD₅₀) keinen zytotoxischen Effekt sowie das **50%ige** und **25%ige** Produkt zeigte bei einer Verdünnung von 10^{-1} (1,50lg-CD₅₀) keinen zytotoxischen Effekt. Dies stört folglich **nicht** die erforderlichen Verdünnungen zum Nachweis einer viruziden Wirkung.

Samples with 80% of the product Alcovirex showed no cytotoxic effect at a dilution of 10^{-2} (2.50lg-CD₅₀) as well as samples with 50% and 25% of the product showed no cytotoxic effect at a dilution of 10^{-1} (1.50lg-CD₅₀).

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

Viruskontrolle /
virus control:

Der Virustiter für das Bovine Coronavirus betrug 7,00lg ± 0,44 TCID₅₀. Die nachweisbare Titerreduktion betrug somit ≥ 4lg.

The virus titre for Bovine Coronavirus was 7.00lg ± 0.44 TCID₅₀. The detectable titre reduction was ≥ 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% (m/v) Formaldehydlösung betrug nach 30 und 60 Minuten Einwirkungszeit ≥ 2,5lg sowie der Reduktionsfaktor von 70% (v/v) Isopropanol betrug nach 60 Sekunden Einwirkungszeit ≥ 4,5lg.

The reduction factor of 0.7% (m/v) formaldehyde solution was ≥ 2.5lg after 30 and 60 minutes contact time as well as the the reduction factor of 70% (v/v) isopropanol was ≥ 4.5lg after 60 seconds 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 EN 14476 (2013+A2:2019) konnte mit der Charge 15.07.2020 des Produktes Alcovirex unter niedriger Belastung bei 20°C nach 60 Sekunden bei Verdünnung auf 80% und 50% (v/v) keine Vermehrung von Bovinem Coronavirus in Kulturen von PT-Zellen nachgewiesen werden. Die erforderliche Titerreduktion von $\geq 4\lg$ Stufen konnte erreicht werden.

According to EN 14476 (2013+A2:2019), with the batch 15.07.2020 of the product Alcovirex no replication of Bovine Coronavirus could be detected in cultures of PT-cells under clean conditions at 20°C in 60 seconds when diluted at 80% and 50% (v/v).

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

