

# WIRKUNG DES OZONOS AUF CORONA VIREN

Prüfbericht (SN 29606, 2020-1004)  
der HygCen Germany GmbH  
mit Erklärungen und gutachterlicher Stellungnahme



Bei Rückfragen steht Ihnen  
das Team der OZONOS GmbH  
gerne zur Verfügung:

**OZONOS GmbH**  
Ginzkeyplatz 11  
A - 5020 Salzburg

T: +43 (662) 238 288 0  
F: +43 (662) 238 288 99  
E: [frischluft@ozonos.com](mailto:frischluft@ozonos.com)

# Hintergrund und Erläuterungen zum Prüfbericht (SN 29606, 2020-1004) der HygCen Germany GmbH

## Wirkung des OZONOS auf Coronaviren

### Hintergrund der Prüfung

Die OZONOS GmbH hat im Frühjahr 2020 das Prüfinstitut HygCen Germany GmbH beauftragt die viruzide (= Inaktivierung von Viren) Wirkungsweise der OZONOS-Produkte auf den Bovines Coronavirus (BCoV) zu überprüfen. Die HygCen Germany GmbH ist ein durch die Deutsche Akkreditierungsstelle (DAkkS) bescheinigtes „kompetentes, unabhängiges und überparteiliches“ Prüfinstitut und besitzt aktuell eine Akkreditierung nach EN ISO/ IEC 17025 für Desinfektionsmittel und Medizinprodukte. Aus diesem Grund wurde die HygCen Germany GmbH von der OZONOS GmbH für die Prüfung ausgewählt.

Bei der üblichen Prüfroutine der HygCen Germany GmbH wird festgestellt, ob das untersuchte Verfahren für den untersuchten Krankmacher (Bakterien, Viren, Sporen, Pilze) eine Desinfektion erreicht oder nicht. Eine Desinfektion ist die Reduktion der Krankmacher auf eine Anzahl, bei der man nicht mehr krank wird. Bei Viren spricht man üblicherweise von Desinfektion, wenn mindestens 99,99 % der Viren inaktiviert werden. In der Fachsprache heißt das auch „eine Reduktion um 4 log<sub>10</sub>-Stufen“. Bildlicher gesprochen heißt das, nach der Desinfektion ist von 10.000 Viren nur mehr eines über, was seine krankmachenden Eigenschaften behalten hat.

In den OZONOS-Produkten geht die viruzide Wirkung von der UV-C-Strahlung und dem erzeugten Ozon aus. Außerhalb des Geräts, d.h. in der Raumluft und auf den Oberflächen (Möbel, Böden, Wänden usw.), wirkt ausschließlich das abgegebene Ozon. Die HygCen Germany GmbH hat auf Basis der EN 17272 - *Quantitative Keimträgerprüfung zur luftübertragenen Raumdesinfektion durch automatisierte Verfahren* die viruzide Wirkung auf Bovines Coronaviren auf Oberflächen überprüft. Dieses Vorgehen ist Standard für den Nachweis der viruziden Wirksamkeit von Verfahren. Für die Wirksamkeit auf Viren in der Luft, z.B. Viren in Speicheltröpfchen (Husten, Niesen), gibt es laut HygCen Germany GmbH keine passende und verlässliche Prüfanordnung. Dies ist aber laut HygCen Germany GmbH weiter nicht relevant, da die Tröpfchen verhältnismäßig schnell zu Boden sinken und die Viren auf den Oberflächen ablagern. Nach einer telefonischen Auskunft hat die HygCen Germany GmbH hierzu auch eigene Versuche durchgeführt. Diesen Umstand spiegeln auch die Empfehlungen der Behörden wieder, dass man in geschlossenen Räumen einen Mindestabstand von 1 m einhalten soll. Durch die höhere Konzentration von Ozon im Gerät und der UV-C-Strahlung kann

generell von einer höheren viruziden Wirksamkeit auf durchgesaugte Luft ausgegangen werden.

## **Ergebnis der Prüfung**

Aufgrund der Vorschriften des Prüfinstituts stand im Zentrum der Prüfung bei der Hyg-Cen Germany GmbH der Nachweis der desinfizierenden Wirkung. Die hierfür notwendige Reduktion um 99,99 % der Coronaviren wurde mit dem OZONOS AC-1 Pro in dem 73,44 m<sup>3</sup> großem Raum nach 24 Stunden Dauerbetrieb nicht erreicht (3. Satz der Schlussfolgerungen, Seite 7). Nach 24 Stunden wurde eine Reduktion der Coronaviren um ca. 90 % bestätigt (2. Satz der Schlussfolgerungen, Seite 7). Das entspricht einer Reduktion um 1,25 log<sub>10</sub>-Stufen.

## **Erläuterung zum Prüfbericht**

1. Die OZONOS-Produkte wurden nicht als „medizinische Desinfektionsmethode“ im strengen Sinne der Vorschriften konzipiert. Eine Reduktion um 99,99 % ist wünschenswert, jedoch in der gewählten Versuchsanordnung (Raumgröße, Ozonkonzentration usw.) nicht realistisch. Das Ziel der Prüfung war es, die Wirksamkeit von Ozon auf Coronaviren in „vernünftigen“ Konzentrationen von einem akkreditierten, unabhängigen Prüfinstitut zu zeigen. Diesem Anspruch der OZONOS GmbH wird das Vorgehen und das Ergebnis gerecht.
2. Das Ergebnis zeigt eine Wirksamkeit gegen Coronaviren auch bei geringen Konzentrationen. Die Anwendung der OZONOS Produkte zur Intensivreinigung ist daher sinnvoll.

## **Was bedeutet das für den Einsatz der OZONOS Produkte?**

Die Versuchsanordnung mit 73,44 m<sup>3</sup> (ca. 30 m<sup>2</sup>) Raumgröße stellt für die typische (Heim-)Anwendung der OZONOS-Produkte eher eine Obergrenze da. In der Realität wird der OZONOS bei einer Intensivreinigung unter günstigeren Bedingungen in Betrieb sein. Für die Beurteilung der Sicherheit wurden zusätzlich eigene Modellrechnungen durchgeführt. Diese ergaben für die Prüfungsordnung im Prüfraum eine Ozonkonzentration von 0,05 ppm bis 0,06 ppm. Verglichen mit den Ozonkonzentrationen von meist mehr als 1 ppm, die bei einer Desinfektion mit Ozongeneratoren entstehen, ist diese Konzentration natürlich viel geringer! Daher kann man mit OZONOS unter Einhaltung einiger Regeln einen unbedenklichen Betrieb für Mensch und Tier gewährleisten und trotzdem die gewünschte Wirkung erreichen.

[ 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

Prüftemperatur(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 / RVB-003 <i>Bovine Corona virus</i> 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
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% 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

# PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Friedrich von Rheinbaben

Virologie, Mikrobiologie, Hygiene

---

Friedrich von Rheinbaben · Garather Weg 21 ·  
40589 Monheim am Rhein

An  
OZONOS GmbH  
Friedensstraße 2-6  
A - 5020 Salzburg

**Garather Weg 21  
40589 Monheim am Rhein**

**Tel.:** +49 (0)171 6767 009  
**E-Mail:** f.v.rheinbaben@t-online.de

Monheim, den 25.05.2020

## **Gutachterliche Stellungnahme**

### **Wirkung des Produkts Ozonos AC-PRO der Fa. Ozonos GmbH, Salzburg, Österreich gegenüber dem Bovinen Coronavirus (BCoV)**

Nach Prüfung des Produktes **Ozonos AC-PRO** der Firma Ozonos GmbH im Prüflabor HygCen Germany GmbH in Anlehnung an EN 17272, Quantitative Keimträgerprüfung zur luftübertragenden Raumdesinfektion durch automatisierte Verfahren, siehe Prüfbericht PB 2020-1004, SN 29606 vom 12.05.2020, gebe ich folgende Beurteilung:

Das Produkt Ozonos AC-PRO wurde gegenüber dem Bovinen Coronavirus (BCoV) geprüft.

Die Wirkung des genannten Gerätes beruht auf der Freisetzung von Ozon. Es wurde in einem Testraum mit einem Raumvolumen von ~73,5m<sup>3</sup> über einen Zeitraum von 24h betrieben.

Das Testverfahren erfolgte in Anlehnung an EN 17272, jedoch mit nur 3 Prüfkörpern, die so in 1,2m Höhe und im Abstand von 2m vom laufenden Gerät vertikal aufgehängt wurden, dass die Virus-kontaminierten Oberflächen vom Gerät abgewandt waren. Die zusätzliche Prüfanschmutzung auf den Keimträgern entsprach einer niedrigen Belastung von 0,3g/l Rinderserumalbumin.

Die Ergebnisse zeigten eine Virustiterreduktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle von durchschnittlich 1,25 Zehnerpotenzen (durchschnittliche Wiederfindungsrate von 3 Keimträgern, RF ~1,25lg-Stufen).

PD Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Friedrich von Rheinbaben