

Hauptsitz

Prüfinstitut
HyGCEN Germany GmbH
Bornhövedstrasse 78
19055 Schwerin

Phone: +49 (0) 385 5682 65
Fax: +49 (0) 385 5983 74
Email: info@hygcen.de
Web: www.hygcen.de



[HYGCEN GERMANY GMBH | BORNHÖVEDSTRASSE 78 | 19055 SCHWERIN]

ELIXIR GLOBAL
Free Industrial Zone
Kutaisi
Georgia



Deutsche
Akkreditierungsstelle
D-PL-18818-02-01
D-PI-1921R-02-02



Zertifiziert und akkreditiert
Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten
ZLG-AP-314.10.23

2020-03-30

PRÜFBERICHT / TEST REPORT

Probennummer / *sample id number:* SN 29325

Prüfungsnummer / *test number:* 2020-0530

Prüfprodukt / *test sample:* Elixir for Disinfection

Auftraggeber / *client:* ELIXIR GLOBAL

Auftragsdatum / *date of order:* 2020-03-10

Prüfzeitraum / *test period:* 2020-03-24 – 2020-03-27

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 Bovinem Coronavirus /
test run with Bovine Corona Virus
niedrige Belastung / *clean conditions*

Identifizierung der Probe / identification of the sample

Prüfprodukt / <i>test sample</i> :	Elixir for Disinfection
Probennummer / <i>sample id number</i> :	SN 29325
Chargennummer / <i>batch number</i> :	Batch of Quart. II 2019
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> :	konzentrierte Anwendung / <i>concentrated application</i>
Aussehen / <i>appearance</i> :	klare, farblose Flüssigkeit / <i>clear, colourless liquid</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 / per 100g: 0.045% Hypochlorous acid (HClO) - CAS 7790-92-3 / EINICS-No. 232-232-5, 0.005% Hypochlorite Ion (OCl ⁻) - CAS-No. 14380-61-1 / EINECS-No. 231-668-3, 0.260% Sodium chloride (NaCl), CAS-No 7647-14-5 EINECS-No 231-598-3, 99.690% Water (electro-activated) - CAS 7732-18-5 / EINECS 231-791-2

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 Spearmann 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>	97%, 80%, 50%, 10% (v/v) Tatsächliche Prüfkonzentrationen / <i>real test concentrations</i>
Aussehen der Produktverdünnungen / <i>Appearance of the product-dilutions:</i>	klare, farblose Flüssigkeiten / <i>clear, colourless liquids</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 / RVB-003 <i>Bovine Corona virus</i> 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

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

Titrationsverfahren /
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):*

30 und / and 60 Sekunden / *seconds*

Bebrütungstemperatur /
incubation temperature:

36°C ± 1°C

Probenverdünnungsmittel /
diluent used for test solution:

destilliertes Wasser / *distilled water*

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:*

97% in ad ¹⁾	3.93
80% in ad ¹⁾	4.25
50% in ad ¹⁾	4.13
10% in ad ¹⁾	4.28

¹⁾ destilliertes Wasser / *distilled water*

Prüfverfahrensbeschreibung / description of the test method

Kontrolle der Zellsensibilität /
control of cell susceptibility:

Vergleichende Virustitrationen wurden auf Zellen welche mit 0,1% Produktlösung bzw. PBS behandelt wurden, durchgeführt / *comparative virus titrations were performed on cells, which had been treated with 0.1% solution of the sample respectively PBS*

Referenz Virusinaktivierung /
reference virus inactivation:

0.7% (v/v) Formaldehyde / *formaldehyd*

Einwirkzeiten / *contact times:* 30, 60min.

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 **Elixir for Disinfection** 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 **Elixir for Disinfection** 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 **Elixir for Disinfection** und Bovinem Coronavirus / summary of the results with **Elixir for Disinfection** and Bovine Coronavirus

Produktkonzentration / test sample concentration	Belastung / interfering substance	CD ₅₀	Ig-TCID ₅₀ nach ... sec Ig-TCID ₅₀ after ... sec		Titerreduktion ≥ 4lg nach...sec ≥ 4lg reduction after ... sec
			30		60
Elixir for Disinfection 97%	0.3g/l BSA	≤ 1.50	≤ 1.50 ± 0.00	≤ 1.50 ± 0.00	30
Elixir for Disinfection 80%	0.3g/l BSA	≤ 1.50	≤ 1.50 ± 0.00	≤ 1.50 ± 0.00	30
Elixir for Disinfection 50%	0.3g/l BSA	≤ 1.50	2.00 ± 0.38	≤ 1.50 ± 0.00	30
Elixir for Disinfection 10%	0.3g/l BSA	≤ 1.50	6.50 ± 0.36	6.75 ± 0.44	-
Viruskontrolle / virus control 0.1ml	0.3g/l BSA	n.a.	n.d.	6.13 ± 0.36	n.a.
Viruskontrolle / virus control 1.0ml	0.3g/l BSA	n.a.	n.d.	7.00 ± 0.38	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				

Tabelle 2 / table 2: Zusammenfassung der Ergebnisse von **Elixir for Disinfection** und Bovinem Coronavirus anhand der Reduktionsfaktoren / summary of the results with **Elixir for Disinfection** and Bovine Coronavirus 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]	
				30sec	60sec
Elixir for Disinfection 97%	0.3g/l BSA	≤ 1.50	6.13 ± 0.36	≥ 4.63 ± 0.36	≥ 4.63 ± 0.36
Elixir for Disinfection 80%	0.3g/l BSA	≤ 1.50		≥ 5.50 ± 0.38	≥ 5.50 ± 0.38
Elixir for Disinfection 50%	0.3g/l BSA	≤ 1.50	7.00 ± 0.38	5.00 ± 0.54	≥ 5.50 ± 0.38
Elixir for Disinfection 10%	0.3g/l BSA	≤ 1.50		0.50 ± 0.52	0.25 ± 0.58
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 Referenzaktivierung 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 ... Ig-TCID ₅₀ after ...			
			0	1min	30min	60min
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 0.1ml	0.3g/l BSA	n.a.	n.d.	6.13 ± 0.36	n.d.	n.d.
Viruskontrolle / virus control 20°C 1.0 ml	0.3g/l BSA	n.a.	n.d.	7.00 ± 0.38	n.d.	n.d.
Nachwirkungskontrolle / inactivation control Elixir for Disinfection 80%	0.3g/l BSA	n.a.	8.38 ± 0.42	n.d.	n.d.	n.d.
Nachwirkungskontrolle / inactivation control distilled water	0.3g/l BSA	n.a.	8.38 ± 0.26	n.d.	n.d.	n.d.
Zellsensibilität / cell susceptibility (PBS)	0.3g/l BSA	n.a.	n.d..	n.d.	n.d.	6.63 ± 0.26
Zellsensibilität / cell susceptibility (0.1% Elixir for Disinfection)	0.3g/l BSA	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	6.38 ± 0.42
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					

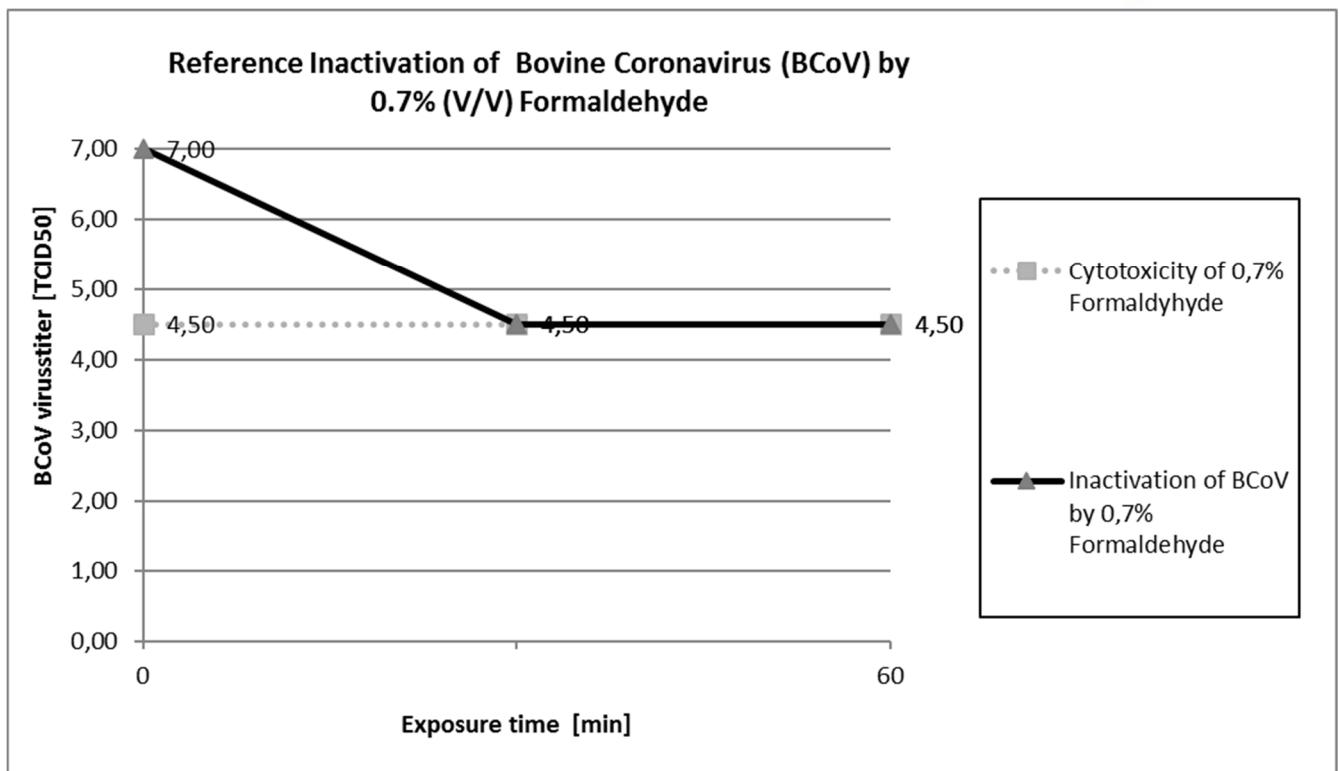


Abb. 1 / fig. 1 : Referenzaktivierung von Bovinem Coronavirus durch 0,7% Formaldehyde / reference inactivation of Bovine Coronavirus by 0.7% formaldehyde

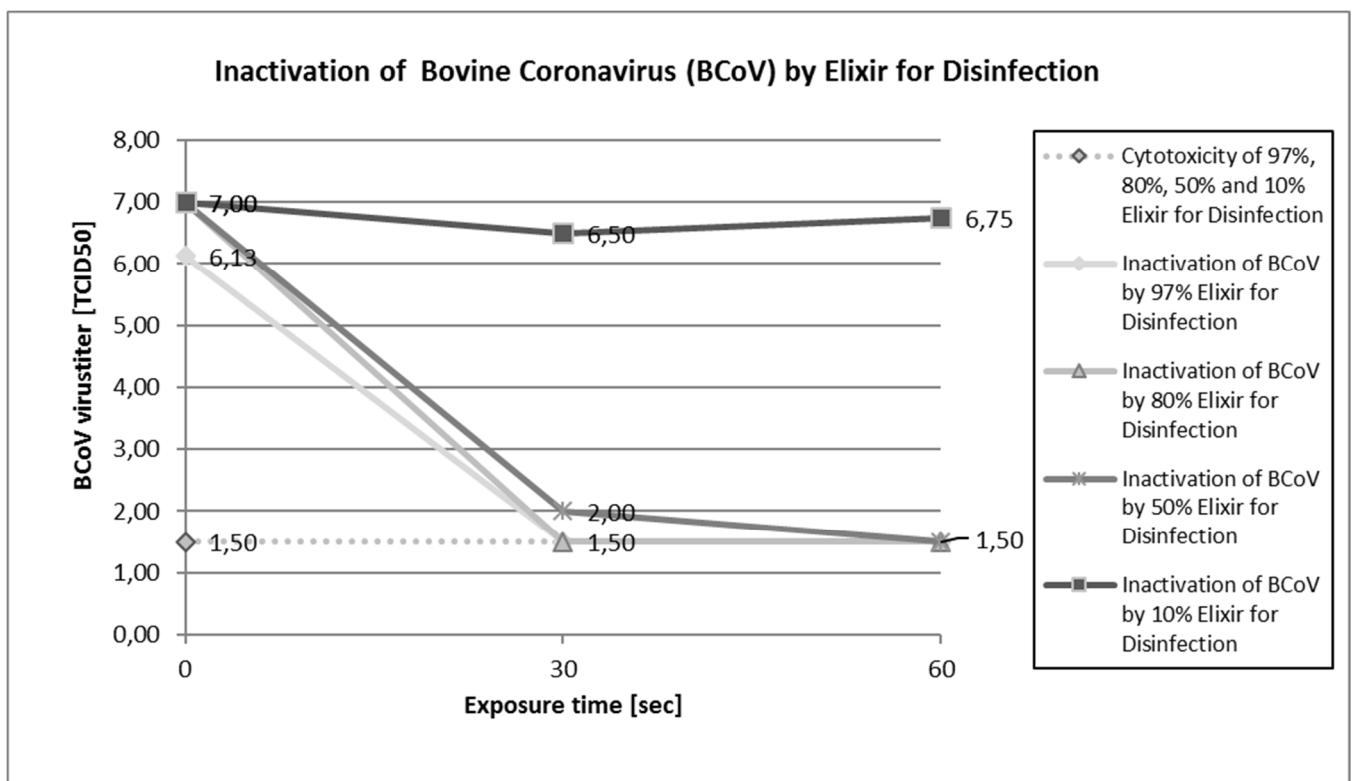


Abb. 2 / fig. 2 : Inaktivierung von Bovinem Coronavirus durch Elixir for Disinfection / inactivation of Bovine Coronavirus by Elixir for Disinfection

Verifizierung des Verfahrens / verification of the methodology

Zytotoxizität / cytotoxicity: Das 97%ige, 80%ige, 50%ige und 10%ige Produkt **Elixir for Disinfection** zeigte bei einer Verdünnung von 10^{-1} ($1,50 \text{ CD}_{50}$) keinen zytotoxischen Effekt.

Dies stört folglich nicht die erforderlichen Verdünnungen zum Nachweis einer viruziden Wirkung.

*The 97%, 80%, 50% and 10% sample **Elixir for Disinfection** showed no cytotoxic effect at a dilution of 10^{-1} (1.50 CD_{50}).*

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

Viruskontrolle /
virus control:

Der Virustiter für das Bovinem Coronavirus betrug $7,00 \pm 0,38 \text{ TCID}_{50}$ für die Ansätze mit dem 80%igen, 50%igen und 10%igen Produkt und $6,13 \pm 0,36 \text{ TCID}_{50}$ für den Ansatz mit dem 97%igen Produkt. Die nachweisbare Titerreduktion betrug somit $\geq 4\text{lg}$.

The virus titre for Bovine Coronavirus was $7.00 \pm 0.38 \text{ TCID}_{50}$ for the test run with the 80%, 50% and 10% product and $6.13 \pm 0.36 \text{ TCID}_{50}$ for the test run with the 97% product. The detectable titre reduction was $\geq 4\text{lg}$.

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.

Referenzaktivierung /
reference inactivation:

Der Reduktionsfaktor von 0,7% Formaldehyde betrug nach 30 und 60 Minuten Einwirkungszeit $\geq 2,5\text{lg}$.

The reduction factor of 0.7% formaldehyd was $\geq 2.5\text{lg}$ 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 30 und 60 Sekunden mit dem 97%, 80% und 50%igen Produkt **Elixir for Disinfection** bei niedriger Belastung konnte keine Vermehrung von Bovinem Coronavirus in Kulturen von PT-Zellen nachgewiesen werden.

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

*After an exposure time of 30 and 60 seconds with the 97%, 80% and 50% **Elixir for Disinfection** under clean conditions no replication of Bovine Coronavirus could be detected in cultures of PT-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. Ausszugsweise 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

