



Dr Pasem AHMED
Elvytys- ja jatkuvan
seurantaosaston johtaja -
Rambouilletin sairaala
p.ahmed@ch-rambouillet.fr



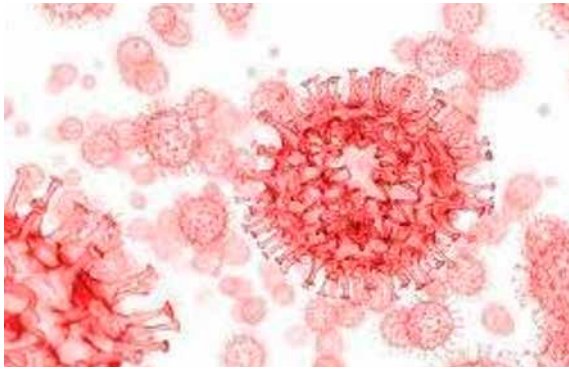
Testiraportti AP BIO 1000

11/2020

Hakemisto:

1. COVID ja tarttuminen: **s. 1**
2. COVID ja suljetut tilat: **s. 2**
3. Tarvitaanko ilmankiertoa? : **s. 3**
4. Ilmanpuhdistin: **s. 4**
 - Edut/haitat
5. Testin tavoitteet: **s. 6**
 - Esittely
6. Testattu ilmanpuhdistin: **s. 7**
 - Esittely: AP BIO 1000
7. AP BIO 1000: **s. 8**
 - 1. ongelma: Leviäminen?
 - 2. ongelma: Miksi H14-suodatin?
 - Alustavat päätelmät
8. AirFend-järjestelmän kasvipölyaine: **s. 15**
9. AirFend-järjestelmä: **s. 17**
 - In vitro -tulokset
10. AirFend-järjestelmä: **s. 19**
 - In situ -tulokset:
 - Toteutusedellytykset
 - Pintanäytteet
 - Kertyminen ilmassa
 - Päätelmät
11. Päätelmä: **s. 25**
12. Viitteet: **s. 26**
13. Liite: **s. 27**

1 | COVID ja tarttuminen



COVID-hiukkaset ovat pallomaisia, ja niiden halkaisijalta on 0,06–0,14 μm tai keskimäärin noin 0,125 μm elektronimikroskoopilla mitattuna (1). Tämänhetkisten tietojen mukaan SARS-CoV-2 ei pysy suspensiossa, ja suurin osa leviämisestä tapahtuu syljen (suuret $5 \mu\text{m} \geq 5 \mu\text{m}$ pisarat) ja hiukkasten (aerosoli $<5 \mu\text{m}$) välityksellä (2).

Virus leviää, kun tartunnan saanut henkilö levittää virushiukkasia sisältäviä pisaroita yskimällä, aivastamalla tai puhumalla jopa tietyn matkan päästä.

Todisteet osoittavat, että koronaviruksen hienoja aerosolifraktioita on kerätty tietyllä etäisyydellä lähettävästä potilaasta (3).



On huomattava, että kliiniset ja kokeelliset tutkimukset (koronaviruksen vesisuspensio) osoittavat, että jotkut näistä hiukkasista voivat viipyä ilmassa useita tunteja (4.5).

2 | COVID ja suljetut tilat

Solidaarisuus- ja terveysministeriö suosittelee, että kaikissa suljetuissa tiloissa varmistetaan aina säännöllinen ilmanvaihto painovoimaisella tai koneellisella ilmanvaihdolla ”uuden” ilman saamiseksi ulkoa ja sisäilman poistamiseksi, jotta estetään **ilman hallitsematon kiertäminen rakennuksessa (6)**.

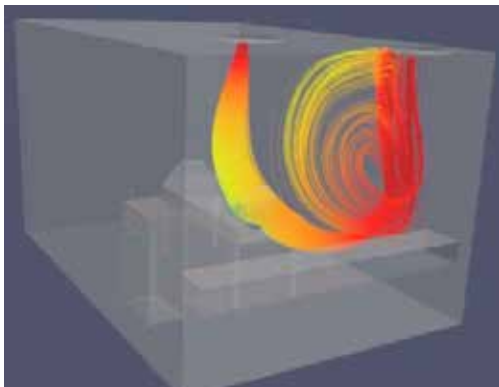
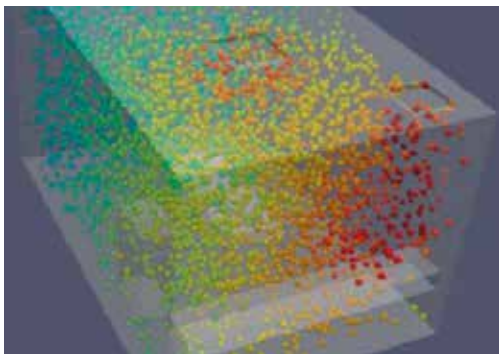
”MIKSI ILMAN KIERTÄMISTÄ ON VÄLTETTÄVÄ?”

Elintarvike-, ympäristö- ja työterveys- ja työturvallisuusvirasto totesi syyskuussa 2017 julkaistussa asiantuntijaraportissaan, että saatavilla olevat tiedot eivät osoittaneet sisäilman puhdistuslaitteiden tehokkuutta ja turvallisuutta **todellisissa olosuhteissa (7)**.



3 | Tarvitaanko ilmankiertoa?

Toistettakoon, että on suositeltavaa varmistaa säännöllinen ilmanvaihto kaikissa suljetuissa tiloissa painovoimaisella ilmanvaihtojärjestelmällä. Potilashuoneissa on varmistettava hyvä ilmanvaihto. Kokeessamme, kun vain koneellinen ilmanvaihto on käytössä, potilaan pään alueelle kohdistuu noin 2,4 cm/s poistoilmavirtaus huoneen keskellä olevaan ilmanottoaukkoon.



RIITTÄÄKÖ KONEELLINEN ILMANVAIHTO?

Ranskalaisessa standardissa NF S90-351 terveydenhuollon valvotuille ympäristöalueille todetaan, että tehohoituhuoneet kuuluvat vähintään riskiluokkaan 2.

Tartuntapotilaiden huoneet voivat kuulua korkeamman riskin luokkaan. Kokemuksemme ja konfiguraatiomme mukaan ilman on vaihduttava 10 kertaa tunnissa. 350 m³/h nopeudella 60 m³ kokonaispinta-alalla näyttää siltä, että ilmanvaihtokapasiteetti ei riitä. Valitettavasti edellä kuvatulla ilmanvaihtojärjestelmällä ei ole aina helppoa varmistaa korkeaa ilman vaihtumisnopeutta; tämä on kuitenkin helpompaa ikkunan ollessa auki. Tästä syystä olemme kiinnostuneita testaamaan ilmanpuhdistusratkaisua, joka tarjoaa lisää teoreettista ja empiiristä turvallisuutta terveydenhuollon työntekijöille sairaalaympäristössä.

4 | Lisätäkö ilmanpuhdistin?

MITKÄ OVAT ILMANPUHDISTIMIEN TAI ILMANKIERRÄTYSLAITTEIDEN KÄYTTÖÖN LIITTYVÄT KESKEISET ONGELMAT?

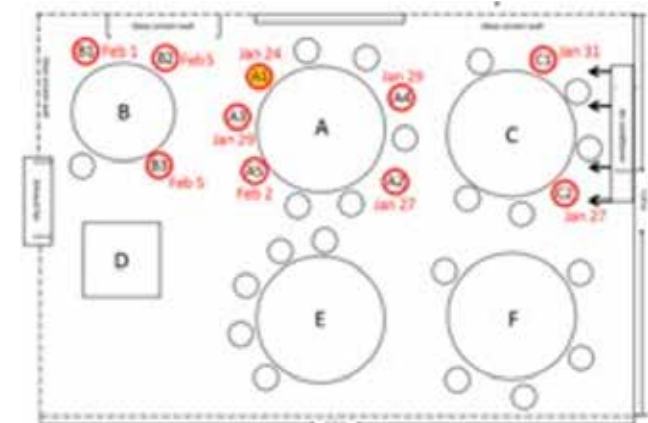
1. ongelma:

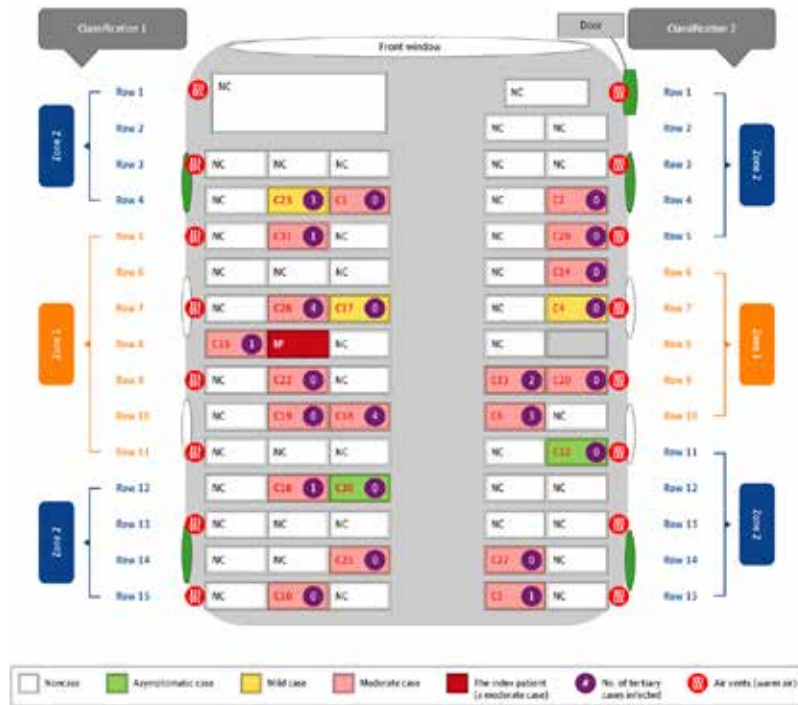
HEPA-tyyppiset ”mekaaniset” suodattimet pystyvät yleensä suodattamaan aerosolihiukkasia. On kuitenkin välttämätöntä, että ilman vaihtumisnopeus on merkittävä, jotta pisaroiden ja aerosolien väheneminen huoneessa olisi huomattava. Lisäksi ilmanpuhdistimen tuottama ilman sekoittaminen lisää ilman nopeutta huoneessa ja voi nopeuttaa viruksia kantavien aerosolien leviämistä, mikä lisää siten terveydenhuollon työntekijöiden tartuntariskiä. **Siksi on hyvin vaikeaa määrittää tällaisten laitteiden todellinen tehokkuus viruksen leviämisessä.**

Tämä ilmiö on havaittu kiinalaisessa ravintolassa (8).

Istuinjärjestelyn mukaan potilas A1 oli yli metrin päässä potilaista B1 ja C1.

Ilmastointivirtaus näyttää siis edistäneen mikropisaroiden siirtymistä perheen A pöydästä perheen B ja sen jälkeen perheen C pöytään. Se, että vain ilmastoinnin ilmavirran akselin sisällä olevissa pöydissä istuneet saivat tartunnan, viittaa siihen, että leviäminen tapahtui vain tällä tavalla.





Sama pätee äskettäin julkaistuun tutkimukseen altistuksesta linja-autossa (9), jossa tartunnan saaneiden henkilöiden istumapaikka viittasi aerosolin leviämiseen kierrätetyn ilman mukana.

Potilaan lähellä ja kaukana olevien alueiden vertailut osoittavat, että altistumisen todennäköisyydessä ei ollut eroa; viittaa massiiviseen altistumiseen kierrätetyn ilman kautta (edestä taakse).

2. ongelma:

Viruksen hiukkaskoko ja HEPA-suodattimet:

Kun huomioidaan virushiukkasten $0,125 \mu\text{m}$:n koko, aerosoloitujen hiukkasten koko ja HEPA-suodattimien kyky siepata hiukkasia, joiden ”koko on $0,3 \mu\text{m}$ tai enemmän”, onko tällaisen suodattimen käytöstä viruksen sieppaamisessa sitä levittämättä hyötyä?

3. ongelma:

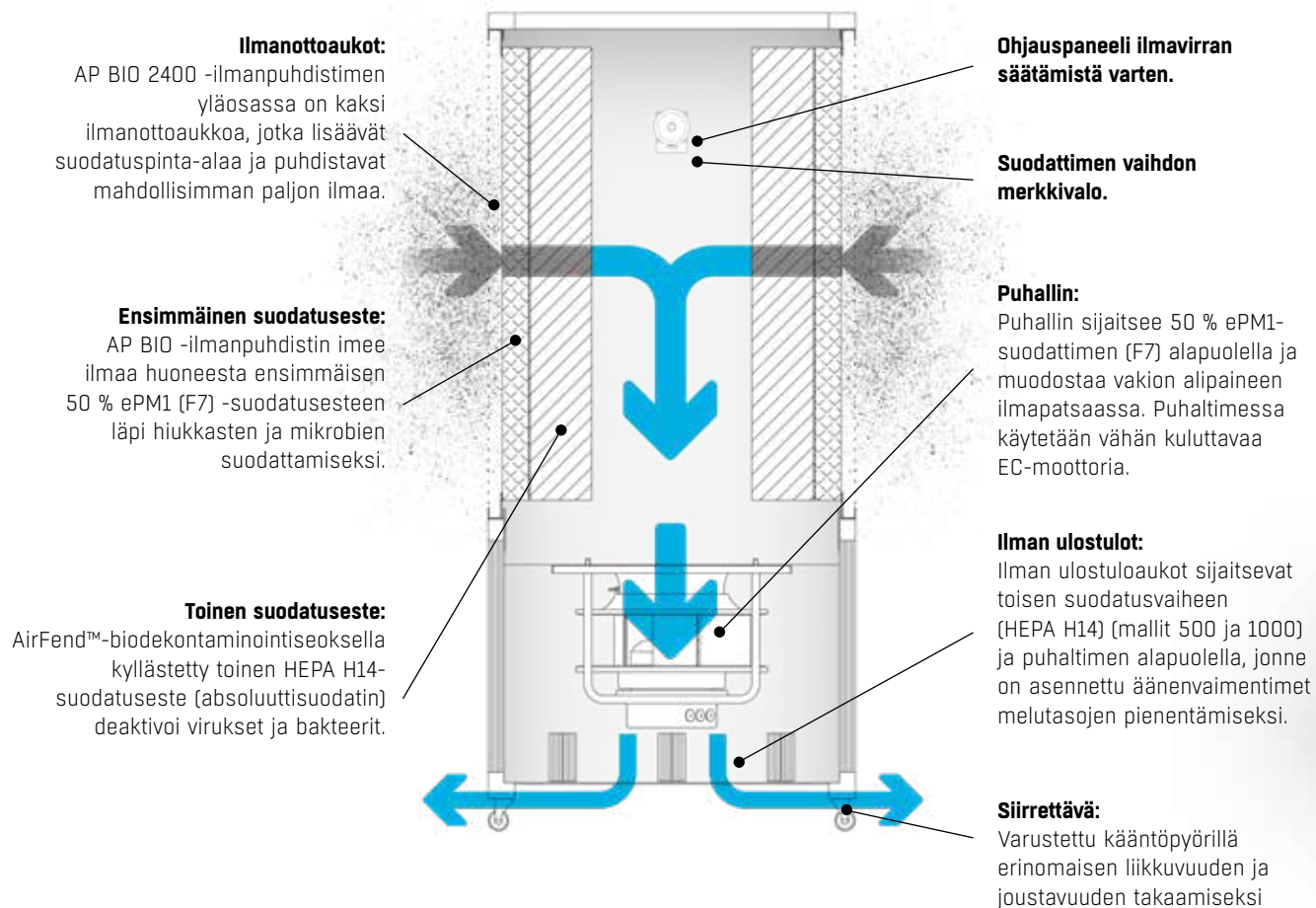
Suodattimet täytyvät virushiukkasista. Tämä aiheuttaa merkittävän altistumisriskin teknikolle, jos suodatinta ei käsitellä varovasti (käsineet, maski, suojalasit ja asianmukainen jätehuolto).

5 | Testin tavoitteet

- 1. Pystyykö AP BIO 1000 AirFend -järjestelmä tarjoamaan desinfioidua ilmaa ja in situ -desinfiointiin.**
- 2. Arvioi virushiukkasten leviämiskäsi laitteiden tehohoitohuoneeseen muodostamien ilmavirtojen perusteella.**
- 3. Tällaisten laitteiden hyöty SARS-Cov2-virushiukkasia sisältävissä tehohoitohuoneissa.**
- 4. COVID-19-altistumisriskin arviointi käytettyä suodatinta käsiteltäessä.**

6

Testattu ilmanpuhdistin AP BIO 1000



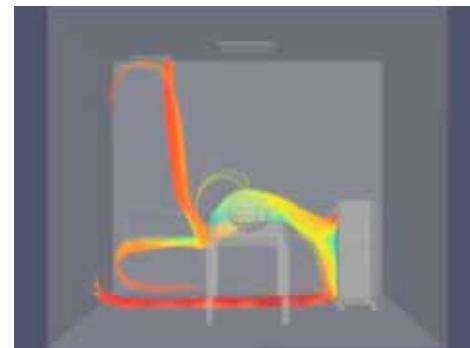
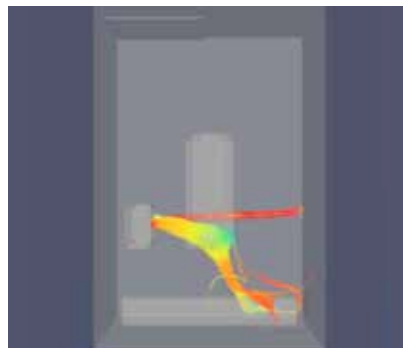
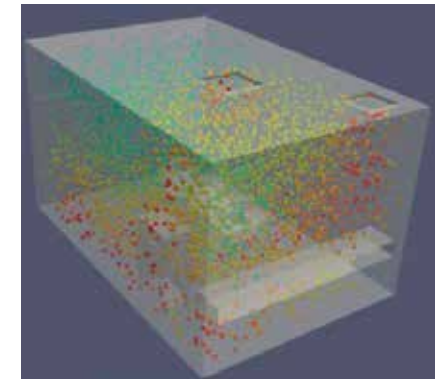
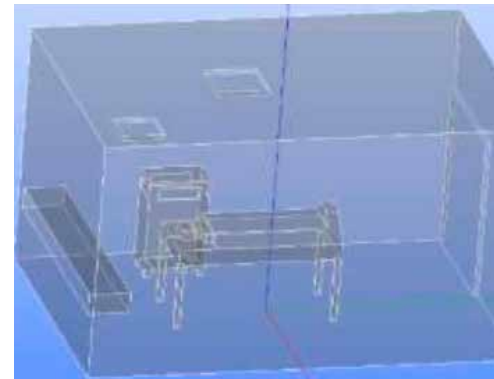
RATKAISEEKO TÄMÄN ILMANPUHDISTIMEN KÄYTTÖ ONGELMAT?

Huom: Piirustus AP BIO 2400, toiminta sama kuin AP BIO 1000:ssa

1. ongelma: leviäminen

AIHEUTTAAKO AP BIO 1000 -SUODATINPUHDISTIMEN ILMANVAIHTONOPEUS VIRUSHIUKKASTEN LEVIÄMISVAARAN HENKILÖSTÖÖN?

Tähän kysymykseen vastaamiseksi suoritettiin simulaatio käyttäen OpenFoamin PIMPLE- ja MPPIC-ratkaisijoita. Ne mahdollistavat eri rajoituksia sisältävien turbulenttien virtausten tunnistamisen paikallaan. Toimitetuista suunnitelmista on laadittu yksinkertaistettu digitaalinen malli. Huoneen keskellä on sänky, koneellisen ilmanvaihdon tulo ja poisto, penkki ja AP BIO 1000 -ilmanpuhdistin.



Ilma virtaa potilaan ympärillä koneellisen ilmanvaihdon ja ilmanpuhdistimen ollessa käynnissä. Potilashuone sivulta, edestä ja ylhäältä.

Kun ilmanpuhdistin kytketään päälle (siirtymävaihe), virtaus on jokseenkin monimutkainen.

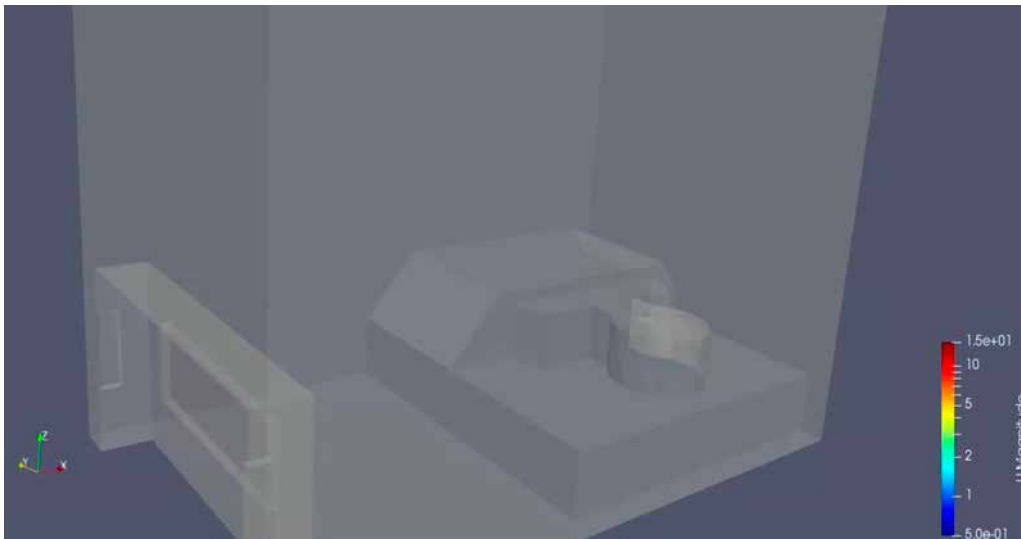
Jos potilaan kasvot altistuvat edelleen suoraan koneellisesta ilmanvaihdosta tulevalle ilmalle, tämä virtaus ei suuntaudu kattoilmanvaihtoa, vaan pikemminkin ilmanpuhdistinta kohti, joka sijaitsee noin metrin päässä potilaasta.

Saastunut ilma virtaa tämän jälkeen kahteen suuntaan:

- Suurin osa ilmasta virtaa laitteen yläsäleikköön ja suodatetaan.
- Pienempi osa ilmasta virtaa alas maahan, missä nopea ulosvirtaus ilmanpuhdistimesta pyörittää sitä.

Tämä ilmavirta kulkee sängyn alitse ja osuu potilaaseen päin olevaan seinään. Osa tästä ilmasta palautuu sitten potilaalle.

On kuitenkin tärkeää huomata, että tämä ilmavirta pysyy lattiatasolla, missä hengitys- tai altistumisriski on pienempi.



Simulointivideo, jossa aivastus 1/10 sekunnissa, 10–100 mikronin hiukkaset leviävät 50 km/h nopeudella AP BIO 1000 -ilmanpuhdistimen eteen, jonka asetuksena 1000 m³/h (ilmanpoisto noin 1 m/s), ja koneellisen ilmanvaihdon ilmanvaihtonopeus ajaa myös ilmaa ilmanpuhdistinta kohti.

Tämän simulaation ansiosta voimme päätellä, että AP BIO 1000 -ilmanpuhdistin ei aiheuta teoreettista riskiä virushiukkasten leviämisestä terveydenhuollon henkilöstöön.

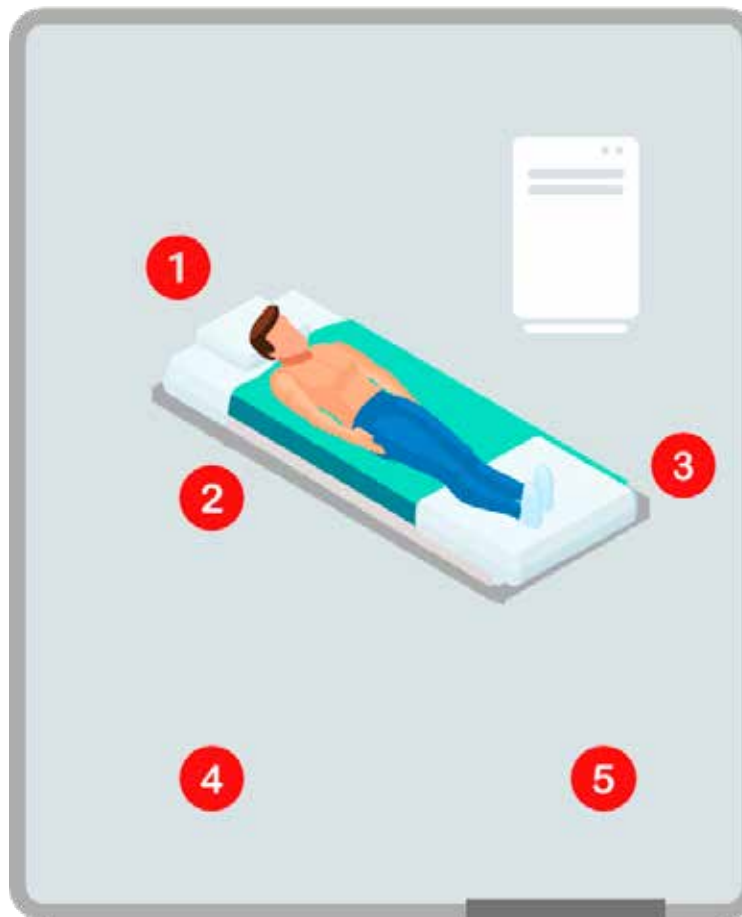
PIENENEKÖ AEROSOLIEN JA PISAROIDEN MÄÄRÄ ENNEN AP APIO 1000:N KÄYTTÖNOTTOA JA SEN JÄLKEEN?

Loogisesti ilmanpuhdistin vähentää keskimääräistä hiukkaspitoisuutta potilaan huoneessa, mukaan lukien puhumisesta, hengityksestä ja yskästä aiheutuvat aerosolit ja pisarat.

Siksi voimme olettaa, että viruksen nopeuden pienentäminen ympäristössä vähentää viruksen keskimääräistä leviämiskäyttöä.

Vastaavasti hiukkasmäärän arviointi suoritettiin in situ potilashuoneessa. Tämä määrä ilmaistaan hiukkasten lukumääränä neliömillimetrillä.

Huom: inerttien ja elävien hiukkasten välillä ei tehdä eroa.



1. Potilaan pääalue
2. Potilaan keskivartalon alue
3. Potilaan jalkojen alue
4. Potilashuoneen vasen alue
5. Potilashuoneen oikea alue

Testijärjestely ja näytteenottoalueet

TULOKSET: HIUKKASET ≥ 5 MIKROMETRIÄ



	T0	T20	T60	K6
Keskiarvo (/m ³)	10 147,1	11 865,7	4 638,0	423,8
Standardipoikk. (/m ³)	3 434,4	7 616,8	1 881,4	482,5
LSC 95 % (/m ³)	13 372,5	19 019,0	6 339,2	876,9

*Käyrän nousu noin klo 10.30 johtuu siitä, että sairaanhoitaja avasi oven.
Hiukkasmäärä laski kuitenkin nopeasti seuraavien 30 minuutin aikana.*

** Luottamusyläraja (LSC 95 %) - LSC 95 % mittaa, missä määrin tulos on tarkkuudella lähellä todellisuutta*

TULOKSET: HIUKKASET $\geq 0,5$ MIKROMETRIÄ

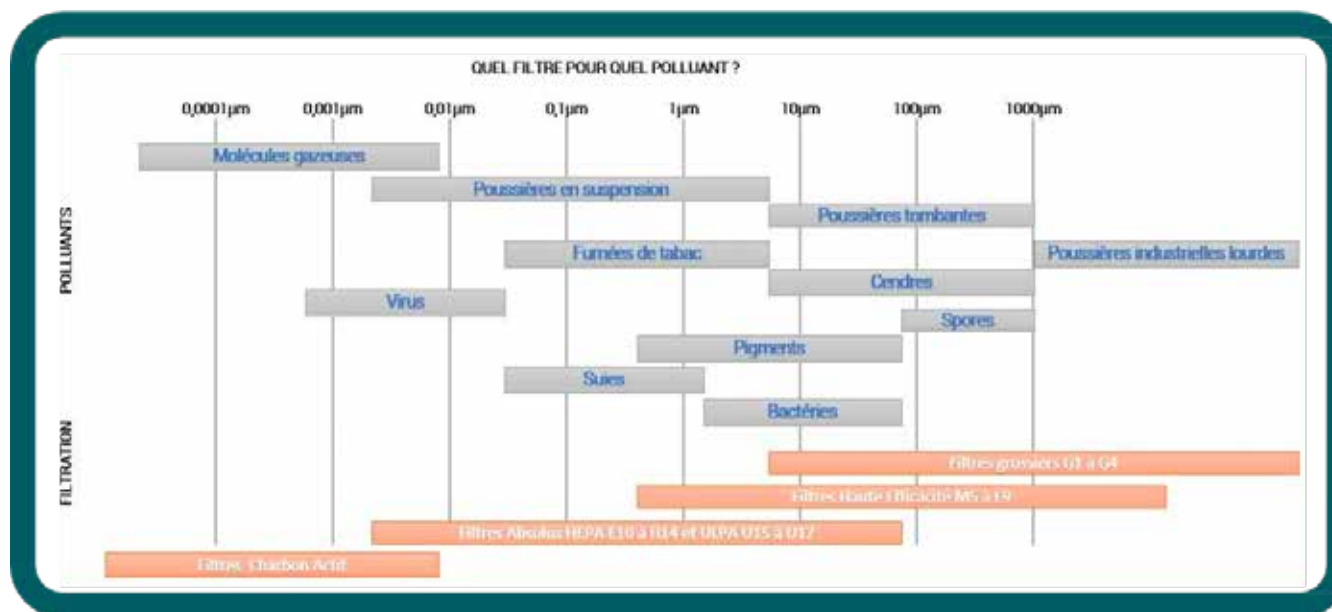


	T0	T20	T60	K6
Keskiarvo (/m ³)	334 006,1	75 808,8	29 287,6	13 890,4
Standardipoikk. (/m ³)	1 110 360,5	46 516,3	9 588,7	5 085,0
LSC 95 % (/m ³)	437 651,1	119 494,6	38 292,9	18 666,0

* Luottamusyläraja (LSC 95 %) - LSC 95 % mittaa, missä määrin tulos on tarkkuudella lähellä todellisuutta

2. ongelma: Tarvitaanko H14-suodatusta?

ONKO H14-SUODATTIMESTA HYÖTYÄ VIRUKSEN SUODATTAMISEKSI JA SIEPPAAMISEKSI HAJOTTAMATTA HIUKKASIA?



Kun huomioidaan virushiukkasten noin 0,125 µm:n koko, aerosoloitujen hiukkasten koko ja HEPA-suodattimien kyky suodattaa hiukkasia, joiden ”koko on vähintään 0,3 µm”, onko tällaisen suodattimen käytöstä kontaminoituneen ilman suodatuksessa hyötyä?

Vuoden 2016 NASA-tutkimus osoitti hyvin selvästi, että HEPA-suodatin sieppaa jopa 0,01 µm:n hiukkaset. Näin ollen nämä suodattimet sieppaavat erittäin tehokkaasti erittäin suuren prosentimäärän nanohiukkasista ja myös kooltaan yli 0,3 µm:n hiukkasista (10).

VASTAUKSET 1. ONGELMAAN:

- AP BIO 1000 ei aiheuta ylimääräistä riskiä viruksen leviämisestä terveydenhuollon henkilöstöön simuloiduissa olosuhteissa.
- Kaikki tässä kokeessa mitatut elementit osoittavat merkittävää halkaisijaltaan ≥ 5 ja $\geq 0,5 \mu\text{m}$:n hiukkasten vähenemistä potilashuoneessa.
- On huomattava, että AP BIO 1000 -ilmanpuhdistimen asennus on mahdollistanut luokituksen muuttamisen ISO8:sta ISO6:een.

Numéro de classification	Concentrations maximales admissibles (particules/m ³ d'air) en particules de taille égale ou supérieure à celle donnée ci-dessous					
	ISO (N)	0,1 μm	0,2 μm	0,3 μm	0,5 μm	1 μm
Classe ISO 1	10	d	d	d	d	e
Classe ISO 2	100	24 ^b	10 ^b	d	d	e
Classe ISO 3	1 000	237	102	35 ^b	d	e
Classe ISO 4	10 000	2 370	1 020	352	83 ^b	e
Classe ISO 5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	d, e, f
Classe ISO 6	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293
Classe ISO 7	c	c	c	352 000	83 200	2 930
Classe ISO 8	c	c	c	3 520 000	832 000	29 300
Classe ISO 9 ^a	c	c	c	35 200 000	8 320 000	293 000

VASTAUKSET 2. ONGELMAAN:

- Oletetaan paikallisen hygrometrinen muutoksen tuloksena oleva kuivan viruksen (pisarat, aerosolit) vektori
- H14-suodattimen ansiosta AP BIO 1000 pystyy suodattamaan kooltaan $0,125 \mu\text{m}$:n virushiukkasia.

AirFend-suodatusjärjestelmä Kasviperäisten aineiden sekoitus

Valmistajan toimittaman kasviperäisten aineiden seoksen turvallisuus (liite 1) ennen kokeen alkua



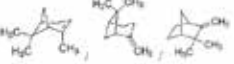

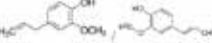
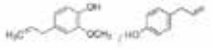
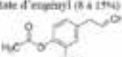
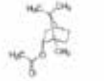
Valmistajan seoksen koostumus:

Vegetabilis fibris, Eugenia caryophyllata, Olea europaea L, Salvia officinalis, Thymus vulgaris, Origanum vulgare, Rosmarinus officinalis, Satureja hortensis, Cinnamomum verum.

Kirjallisuudessa on vähän tietoa tämän koostumuksen sisältämien kasviuutteiden (jauhemuodossa) yhdistelmästä Olemassa oleva tieto tämän koostumuksen joistakin yhdistelmistä tulee eteerisillä öljyillä tehdyistä tutkimuksista. AirFend-järjestelmässä käytetty koostumus ei kuitenkaan sisällä eteerisiä öljyjä, vaan sen aktiivisia molekyylejä.

Eteeristen öljyjen farmakologisia ominaisuuksia on tutkittu ja vahvistettu lukuisissa tutkimuksissa, ja näistä farmakologisista tutkimuksista on kirjoitettu yli 2000 artikkelia vuodesta 1995 lähtien.

Samana ajanjaksona on viitattu yli 1800 kertaa näiden samojen bioaktiivisten aineiden toksikologisiin ja kliinisiin tutkimuksiin.

Huiles essentielles Origan Vulgaire (Origanum vulgare L. ssp. vulgare)	Sesquiterpènes gittunonine (traces) 
Huile essentielle Cannelle de Ceylan (écorce) (Cinnamomum verum J. Presl.)	Coumarines Coumarine 
Huile essentielle Romarin Officiel à 1-6 cineole (Rosmarinus officinalis L.)	Monoterpènes α (0,8 à 1,2 %) et β (1 à 7 %) pinène / camphène (4 à 4,3%) 
Huile essentielle Cannelle de Ceylan (écorce) (Cinnamomum verum J. Presl.)	Aldéhydes aromatiques cinnamaldéhyde (80 à 100%) 
Huiles essentielles Cannelle de Ceylan (écorce) (Cinnamomum verum J. Presl.)	Phénols eugénol (2,2 à 10%) / isoeugénol (0,03%) 
Girofler (clou de) (Eugenia caryophyllus Bull et Hurr.)	eugénol (70 à 100%) / dialcylol (0,20%) 
Huiles essentielles Girofler (clou de) (Eugenia caryophyllata Bull et Hurr.)	Cétones acétate d'eugényl (8 à 15%) 
Romarin officinal CT Verbénone (Rosmarinus officinalis L.)	Acétate de bornyle (12%) 

AirFend-koostumuksen sisältämiä aktiivisia molekyylejä kutsutaan fysikaalisilta ja kemiallisilta ominaisuuksiltaan haihtuviksi orgaanisiksi yhdisteiksi (VOC).

Erilaisten VOC-lähteiden merkitystä on korostettava, jotta vältetään sekaannus synteettisten VOC-yhdisteiden antropogeenisten päästöjen riskin ja VOC-uutteen hyödyllisten vaikutusten välillä valvotuissa ja mitatuissa käytöissä (NAT VOC).

Haihtuvat orgaaniset yhdisteet (NAT VOC), jotka ovat pääosin peräisin isopreenin ja terpeenien biosynteesistä, ovat kasvin toissijaisia metaboliitteja. Haihtuvissa muodoissaan niiden vaikutukset voivat olla suoria tai epäsuoria muutaman muutosprosessin jälkeen. Kuten kasvin monilla muilla toissijaisilla metaboliiteilla, niillä on sekä myrkyllisiä vaikutuksia tietyissä olosuhteissa että ihmisille kiinnostavia farmakologisia ominaisuuksia (11), kuten:

- timjamin ja kanelin yhdistelmä vähentää hengitysteiden tulehduksellista hyperreaktiivisuutta ja tiettyjä solujen tulehdusparametreja, joten niitä voidaan mahdollisesti pitää adjuvantteina hoitoina hengitystieinfektioissa (12)
- vastaavasti on raportoitu, että joillakin kasveilla, kuten kanelilla, bergamotilla, sitruunaruoholla, timjamilla ja laventelilla, on vahvoja antiviraalisia vaikutuksia A-influenssavirusta vastaan (13)

Tällä hetkellä ei ole mahdollista toimittaa täydellistä kirjallisuusluetteloä tämän koostumuksen tutkimuksesta. Tämän raportin laatimista varten luetuista lukuisista tutkimuksista käy kuitenkin ilmi, että sen käytön tutkiminen ahtaissa tiloissa ja kotitalouksissa erityisesti mitatuilla annoksilla olisi erittäin kiinnostavaa, erityisesti sen antimikrobisten (bakterisidiset ja fungisidiset), virusidisten ja akarisidisten vaikutusten osalta (14).

Nykyisen tieteellisen tiedon perusteella hyöty-riskisuhde suosisi sen käyttöä valvottaessa asianmukaisesti sen ympäristöannosta koskevia suosituksia.

9

AirFend-järjestelmä In vitro -testitulokset

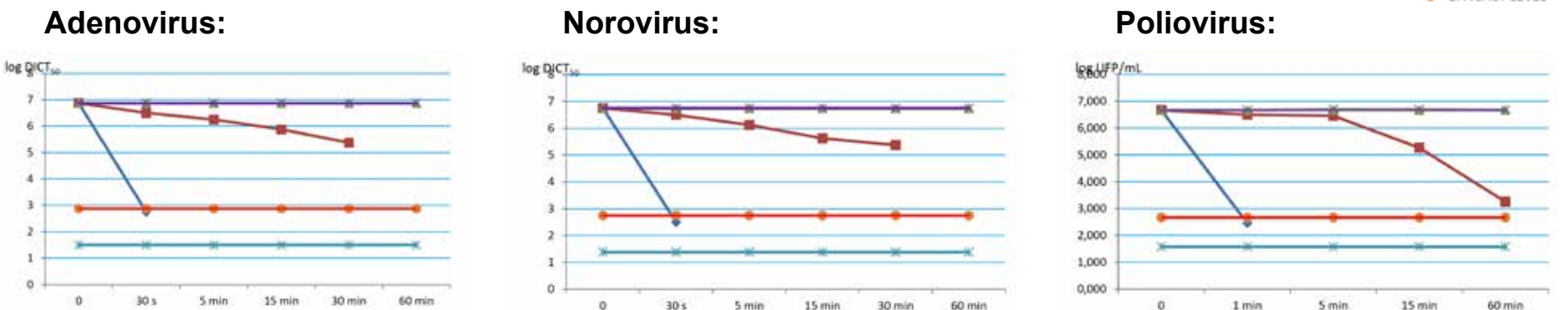
Täysin luonnollisen koostumuksen ansiosta AirFend™-suodatusjärjestelmän kuvataan kykenevän estämään ja neutraloimaan 100 % viruksista (mukaan lukien Sars-CoV-2) ja bakteereista, kun ilma virtaa puhdistimen läpi.

MITÄ TODISTEITA ON KÄYTETYN 100-PROSENTTISEN LUONNOLLISEN KOOSTUMUKSEN TEHOKKUUDESTA?

Kaikki kerätyt asiakirjat osoittavat AirFend-järjestelmässä käytetyn koostumuksen todellista aktiivisuutta:

- Bakterisidinen, standardien NF EN 13727 ja EN 1040 mukaisesti (liitteet 2, 3)
- Fungisidinen, standardin NF EN 1275 mukaisesti (liite 4)
- Täysin virusidinen, standardin NF EN 14476 mukaisesti (liite 5)

Esimerkkejä saaduista tuloksista:



Käytetyn tuotteen in vitro -tehokkuus on siis osoitettu sekä puhtaissa että likaisissa olosuhteissa*.

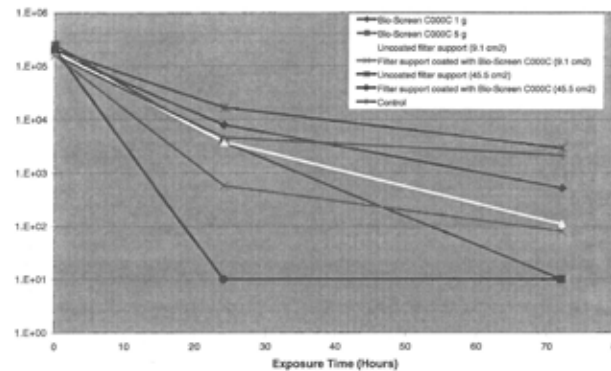
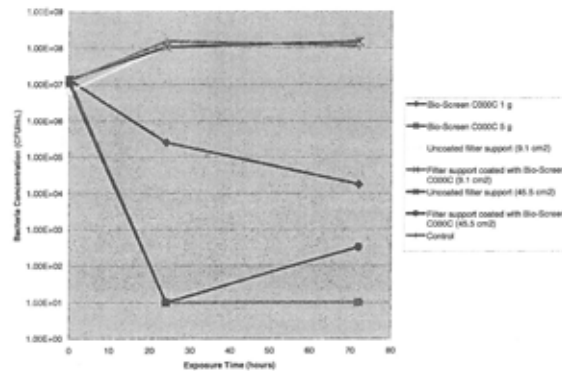
* 3 ml/l lampaan punasoluja ja 3 g/l naudan albumiinia

NSF:n (kansanterveys- ja turvallisuusriskien hallinta) Ann Arborissa Michiganissa Yhdysvalloissa johtama tutkimus ei osoita tämän koostumuksen huonompaa tehoa verrattuna tiettyihin kemikaaleihin, kuten kvaternaarisiin ammoniumeihin tai natriumhypokloriittiin (liite 6).

Lisäksi tehokkuustestejä on tehty myös suodattimille, jotka sisältävät erilaisia kasviperäisiä pitoisuuksia (liite 7).

Suodattimet on testattu tietyillä tyypin BG (*Bacillus subtilis*), BG- (*Pseudomonas aeruginosa*) ja hiivojen (*Aspergillus flavus*) bakteereilla.

Agent	Sodium & Calcium Hypochlorite	Quaternary Ammonium Compounds	Bioscreen C0000C
Performance	Moderate	Moderate to high	Moderate
Contact Time	Minutes	Minutes	Minutes to Hours
pH	Alkaline	Acidic to neutral	Acidic
Corrosiveness	Corrosive to iron and aluminum	Corrosive to iron, copper, and brass	Noncorrosive
Source	Chemical	Chemical	Natural
Antimicrobial Performance	Broadspectrum (Bacterial, Viral, Fungal)	Broadspectrum (Bacterial, Viral, Fungal)	Broadspectrum (Bacterial, Viral, Fungal)
Environmental Attributes			Biodegradable
Regulatory Status	Registered Pesticide	Registered Pesticide	Generally Recognized as Safe, Minimum Risk Pesticide



Nämä testit selventävät, että pinnoitettaessa suodattimet 5 % konsentraatiolla kasviformulaatiota testatuista mikro-organismeista saadaan vähintään 4 log-yksikön (maks. 6 log) vähenemä.

Activité	Indicatrice testée	sur milieu TSA		
Filtre testé	Filtre 1 (coût P3)		Filtre 3 (coût P3)	Filtre 4 (coût P3)
	Boite 1: Confiance de l'opérateur	Confiance de l'opérateur	Boite 3: Confiance de l'opérateur	Boite 4: Confiance de l'opérateur
	Boite 2: Confiance de l'opérateur	Confiance de l'opérateur	Boite 5: Confiance de l'opérateur	Boite 6: Confiance de l'opérateur
	Boite 3: Confiance de l'opérateur	Confiance de l'opérateur	Boite 7: Confiance de l'opérateur	Boite 8: Confiance de l'opérateur
	Boite 4: Confiance de l'opérateur	Confiance de l'opérateur	Boite 9: Confiance de l'opérateur	Boite 10: Confiance de l'opérateur
	Boite 5: Confiance de l'opérateur	Confiance de l'opérateur	Boite 11: Confiance de l'opérateur	Boite 12: Confiance de l'opérateur
Contrôle	Solution de bactéries et de moisissures sur boîtes de Pétri avec milieu TSA sans contact avec les filtres		Filtres déposés sur boîtes de Pétri avec milieu TSA sans contact avec le solution bactérienne/moisissures	
	Boite 1: Confiance de l'opérateur		Boite 1: Confiance de l'opérateur	
	Boite 2: Confiance de l'opérateur		Boite 2: Confiance de l'opérateur	
Activité	Fongicide testée sur milieu MAFY			
Filtre testé	Filtre 1 (coût P3)		Filtre 3 (coût P3)	Filtre 4 (coût P3)
	Boite 1: Confiance de l'opérateur	Confiance de l'opérateur	Boite 3: Confiance de l'opérateur	Boite 4: Confiance de l'opérateur
	Boite 2: Confiance de l'opérateur	Confiance de l'opérateur	Boite 5: Confiance de l'opérateur	Boite 6: Confiance de l'opérateur
	Boite 3: Confiance de l'opérateur	Confiance de l'opérateur	Boite 7: Confiance de l'opérateur	Boite 8: Confiance de l'opérateur
	Boite 4: Confiance de l'opérateur	Confiance de l'opérateur	Boite 9: Confiance de l'opérateur	Boite 10: Confiance de l'opérateur
	Boite 5: Confiance de l'opérateur	Confiance de l'opérateur	Boite 11: Confiance de l'opérateur	Boite 12: Confiance de l'opérateur
Contrôle	Solution de bactéries et de moisissures sur boîtes de Pétri avec milieu MAFY sans contact avec le solution bactérienne/moisissures		Filtres déposés sur boîtes de Pétri avec milieu MAFY sans contact avec le solution bactérienne/moisissures	
	Boite 1: Confiance de l'opérateur		Boite 1: Confiance de l'opérateur	
	Boite 2: Confiance de l'opérateur		Boite 2: Confiance de l'opérateur	

Todistettu ilmanpuhdistusteho ja desinfiointitehokkuus P3- ja P4-suodattimille, joiden kasvipoitoisuus on suurempi (valmistaja ei ole ilmoittanut pitoisuutta) (liite 8).

10

AirFend-järjestelmä

In situ -testit: toiminnalliset olosuhteet

Ottaen huomioon, että aiemmin kerätyt elementit on tehty in vitro tai in situ, mutta ympäristössä, jossa ilmaa hallitaan, laitetta on päätetty testata ”todellisessa” tehohoituhuoneessa COVID-19-tartunnan saaneella potilaalla.

Näytteenottohuone: 60 m³

Lämpötilat: 19–21 °C

Kosteus: 60 g/m³

Ei biologisesti desinfioitu

Potilas:

Ei intuboitu

Hoito nopeassa

hapetuksessa (OHD)

Otettu sisään J6:n kohdalla kontaminaation jälkeen.

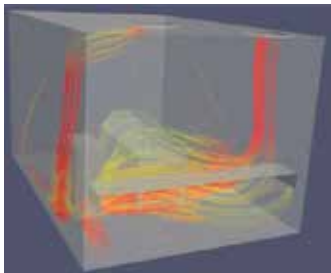


Laite paikallaan huoneessa testien suorittamisen jälkeen. Alkuperäisestä poikkeava sijainti.

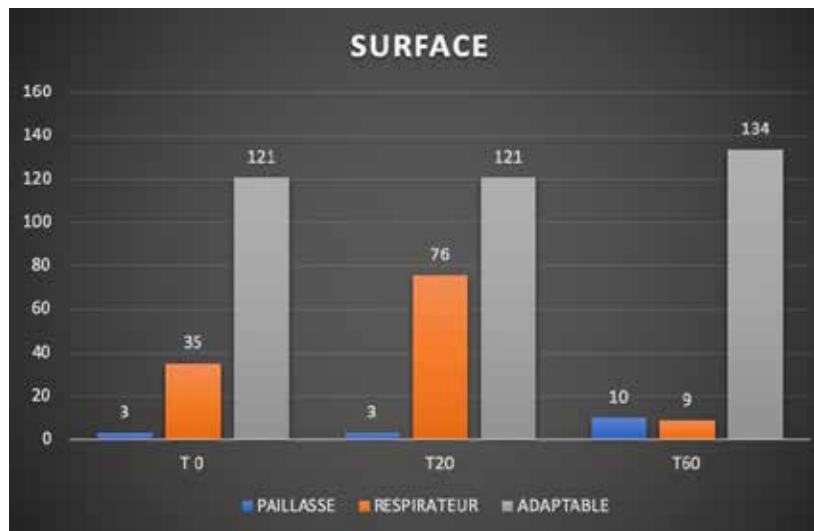
AP BIO 1000:

Koska valittu potilas on nopeassa hapetuksessa (OHD), teoreettisten virushiukkasten määrä ympäristössä on huomattavasti suurempi kuin intuboidusta potilaasta saatu, ja vielä suurempi, jos potilaan järjestelmä on suljettu. Testit tehtiin potilaskontaminaation J12 ja J25 välillä

OVATKO KÄSITELLYN ILMAN KANSSA KOSKETUKSISSA OLEVAT PINNAT EDES OSITTAIN DEKONTAMINOITUJA?



Suodatettu ilmavirta leviää maata kohti neljään suuntaan: oveen, ovimattoon, sängyn alle ja laitteen takana olevaan seinään.

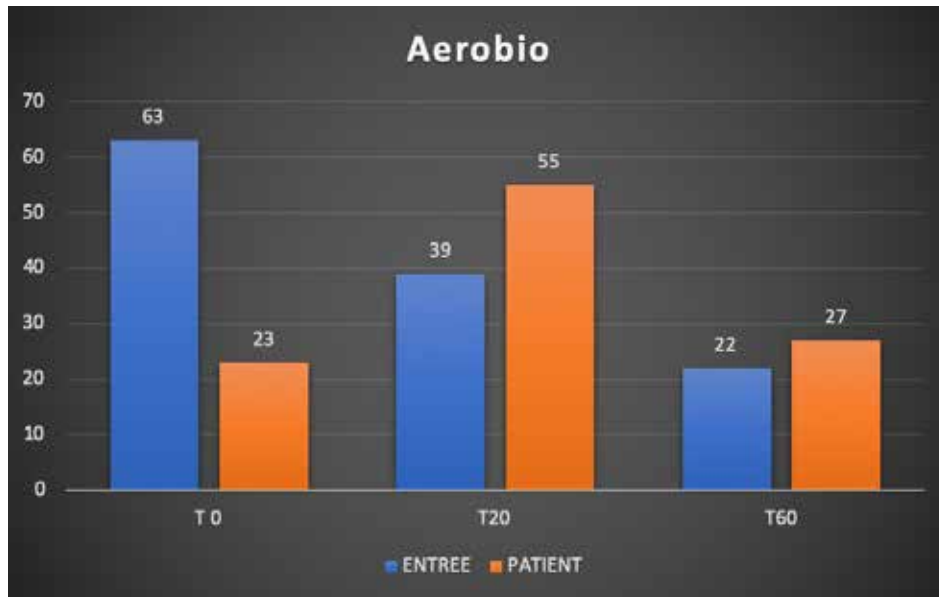


Näytteiden erilaisia tuloksia on vaikea tulkita, koska huonetta ei oltu biopuhdistettu ennen koetta, ja T18:n (18 min) kohdalla havaittiin kontaminaatiota sairaalan henkilökunnan yhden huoneen sisäänkäynnin vieressä. Vastaavasti voimme nähdä pesäkkeiden lisääntymistä eri alueilla, erityisesti hengityksensuojaimesta.

Kuitenkin 40 minuutin kuluttua tämä ”uudelleen kontaminoitunut” alue osoittaa merkittävän **88,15 % vähenemisen elinkelpoisten hiukkasten pitoisuudessa kuutiometrillä (ufc/m³)**. Koska hengityksensuojain on alueella, jolla ”dekontaminoiva” ilmavirta on tärkein (sijaitsee* 1 m:ssä) vs. lepotila (sijaitsee* 2,0 m:ssä) / mukautuva (sijaitsee* 1,8 m:ssä), voimme olettaa, että AirFend-ilmavirralla on todennäköisesti pintoja dekontaminoiva vaikutus, jos ne altistuvat sille riittävästi.

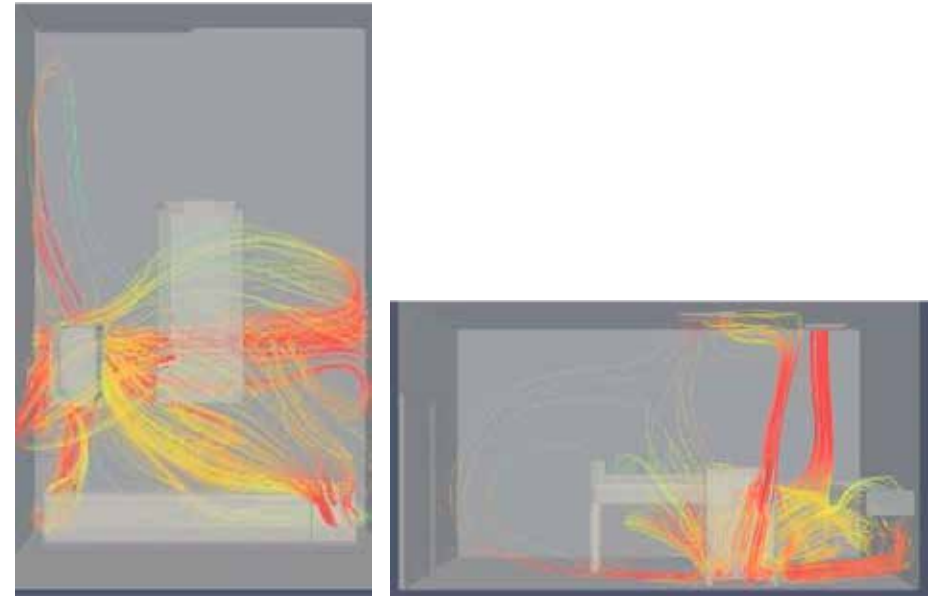
* AP BIO -laitteesta

AP BION SUODATTAMA ILMA DEKONTAMINOIDAAN, MUTTA VOIDAANKO SITÄ PITÄÄ MYÖS DEKONTAMINOIVANA?



Tämän kokeen aikana voimme nähdä:

- **38,1 % (Ufc/m³) alenema 20 minuutissa** ja **65,1 % alenema 60 minuutissa** huoneen sisäänkäynnin luona.
- **50,9 % alenema 40 minuutin** kuluttua ympäristön uudelleenkontaminoitumisesta.



Sama huomio kuin aiemmin henkilöstön jäsenen tullessa huoneeseen T18:n kohdalla. Sen jälkeen pesäkkeet lisääntyvät potilastasolla.

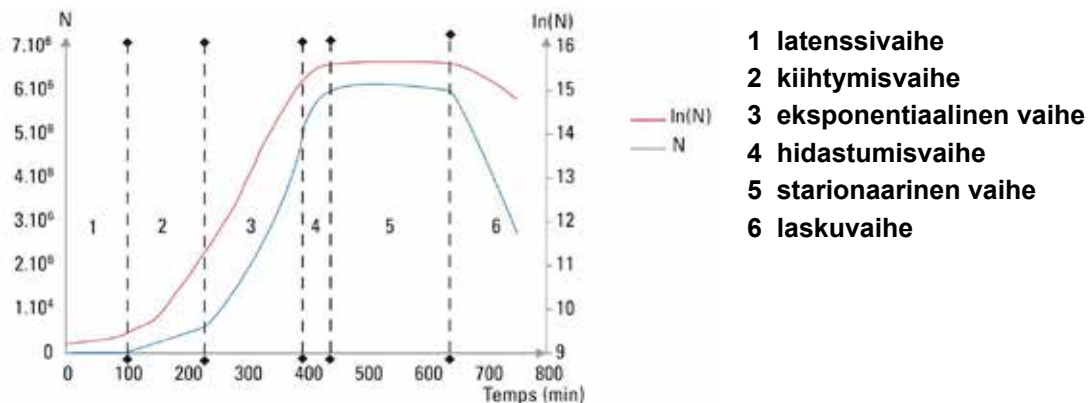
Pintojen osalta:

Vertaamalla in vitro- ja in situ -tietoja on selvää, että AirFend-järjestelmällä ja sen koostumuksella on antimikrobisia ominaisuuksia pinnoilla.

Nämä ominaisuudet riippuvat kuitenkin varmuudella aktiivisen tuotteen pitoisuudesta kyseisillä pinnoilla.

Tämän seurauksena tuotteelle eniten altistuneilla pinnoilla on todellinen bakterisidinen vaikutus (88 %) ja hidastava vaikutus bakteerien luonnolliselle kasvulle.

HUOM. Tämä hypoteesi on voimassa edellyttäen, että bakteeripesäkkeitä ei ole vaiheissa 5 tai 6.



Ilman osalta:

Saimme valmistajalta in situ -tulokset (ei sairaalapohjaiset) omiin tuloksiimme vertaamista varten.

Ne ovat yhdenmukaisia kokeessamme saatujen tulosten kanssa, joten ilman epäpuhtauksien määrä vähenee vähintään 50 % (valmistajan bakteriostatia) ja jopa 65,1 % (vs. valmistajan 73,3 %).

On huomattava, että *Aspergillus fumigatus* -tutkimus ennen AP BIO 1000:n käyttöönottoa ja sen jälkeen oli negatiivinen. Siksi näitä tuloksia ei esitetä asiakirjassa.

Toimittajatestit ovat saatavilla pyynnöstä.

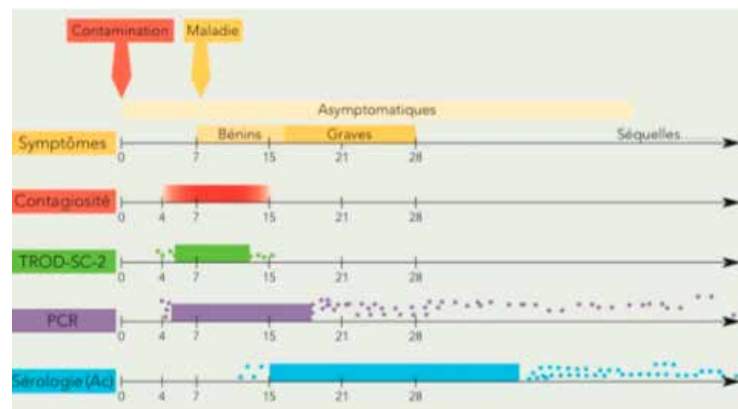
ONKO SUODATTIMESSA ENÄÄ VIRUS-DNA:TA JA VOIKO SEN KÄSITTELYÄ HELPOTTAA?

Valmistaja suoritti erilaisia in vitro -testejä, jotka osoittivat bakterisidien ja fungisidien tehokkuuden käsitellyissä suodattimissa (katso s.15). Näiden suodattimien virusidiaktiivisuudelle ei kuitenkaan suoritettu testejä.

Tähän kysymykseen vastaamiseksi tarkastelimme COVID-19-ongelmaa. Siksi otettiin pintapyyhkäisyjä PCR-testiä varten:

- F7-suodattimesta (järjestelmän ensimmäinen este)
- H14-suodattimessa (jonka on tarkoitus estää virus).

Nämä näytteet otettiin J15:llä siten, että tartunta oli pysyvää potilashuoneessa.



Centre Hospitalier de Rambouillet Laboratoire de Biologie Médicale

HVG Rea
Nom: HVG
Prénom: Ruz

Laboratoire

U.F. (hébergement) Code U.F./Correspondant: 3013

Pratiqués de: 1511205 Intégration de: 1511205 Référence labo: 201117271 (1481625) Status passés de: 1511205 à 1234 Status: 1511205 1425 complète: 1511205 1425

Sur machine patient n° de 12111, écouvillon avec milieu de transport VIRUS

BACTERIOLOGIE

Détection du génome de SARS CoV-2

Résultat: Négatif

Remarque: Et NON testé Car-2 dénué

"Les données vous concernant collectées dans le cadre du présent examen biologique, en lien avec l'épidémie de Covid-19, sont enregistrées dans le système d'information national dénommé S3 DSI, afin de servir par la direction générale de la santé. Ce système d'information public a pour finalité de centraliser les résultats des examens de dépistage Covid-19 en vue de leur réalisation à des fins d'évaluation sanitaire, de surveillance épidémiologique et de recherche via la plateforme données de santé. Pour plus d'information sur ce traitement de vos données, consultez le site du ministère de la santé (https://solidarites-sante.gouv.fr/le-covid-19/la-donnee-personnelle-et-covid-19). Pour exercer vos droits (accès, rectification, limitation, voie d'apposition), nous vous invitons à contacter l'administrateur correspondant à la possession des données - Directeur générale de la santé (DGSI) - Ministère des solidarités et de la santé - 14 avenue Daumesnil - 75106 PARIS CTSP ou l'adresse électronique sds@sgsi.fr"

Valeurs par: DESBOIS Delphine

Dr. Desbois Delphine Dr. Bridoux Delphine Dr. Amouroux Isabelle Dr. Lehoucq Marie-Christine Dr. Struzianski Laurence
Praticien hospitalier Praticien hospitalier Chef de Service Praticien hospitalier Praticien hospitalier

N° de dossier: 1511175 (1481625) Laboratoire: 4122106 Page 1 sur 1

VASTAUKSET 3. ONGELMAAN :

COVID-19:n virus-DNA:ta ei löytynyt AP BIO 1000:n suodattimista, joka sijaitsi potilaan huoneessa, jossa oli vaikea SarS-CoV2 ja tarttuva keuhkosairaus.

Suodattimien turvalliseen käsittelyyn liittyvän ongelman osalta on todennäköistä, että AirFend-järjestelmällä on tehokas virusidaalinen vaikutus COVID-19:een, minkä ansiosta huoltoteknikot voivat käsitellä suodattimia turvallisesti.

Useita rajoituksia on kuitenkin tunnistettu:

- Kattava, mutta ei koko pinnan laajuinen pintapyyhkäisy.
- Potilaiden tarttuvuus vaihtelee ajan myötä (15)

Suodattimista vaaditaan todennäköisesti eri PCR-näytteet taudin etenemisen eri vaiheissa, jotta tämä voidaan vahvistaa varmuudella.

	Classification of illness severity	Median (IQR*) duration of SARS-CoV-2 positivity in cohort, days	Viral dynamics in patients with severe illness vs those with non-severe illness	p value
Chen et al (2020) ²⁵	ICU vs non-ICU patients	11 (95% CI 10–12)	Median time to viral clearance significantly longer in ICU vs non-ICU patients (HR 3.17, 95% CI 2.29–4.37)	Only HR provided
Chen et al (2020) ²⁶	China CDC guideline (version 7)	12 (8–16)	Shedding duration varies by severity: asymptomatic 6 days; mild 10 days; moderate 12 days; serious 14 days; critical 32 days	<0.0001
Tan et al (2020) ²⁷	China CDC guideline (version 6)	Nasopharyngeal swab: 12 (range 3–38); any sample: 22 (range 3–38)	Viral shedding significantly longer in patients with severe illness: any sample 23 days vs 20 days (note that nasopharyngeal swab 14 vs 11 days was non-significant)	0.023 (any sample)
Xu et al (2020) ²⁸	WHO criteria	17 (13–32)	Higher proportion of patients with severe illness had shedding >15 days (34.2% vs 16.2%)	0.049
Yan et al (2020) ²⁹	China CDC guideline (version 6)	23 (18–32)	No difference in shedding duration (general illness 23 days vs severe illness 26 days vs critical illness 28 days)	0.51
Zheng et al (2020) ³³	China CDC guideline (version 6)	Respiratory sample: 18 (13–29)	Shedding duration significantly longer in patients with severe illness (21 vs 14 days) in respiratory samples; no difference in shedding duration in stool or serum samples	0.04

CDC=Center for Disease Control and Prevention, HR=hazard ratio, ICU=intensive care unit. SARS-CoV-2=severe acute respiratory syndrome coronavirus 2. *IQR unless otherwise stated.

Table 1: Severity of illness and viral dynamics

11 | Johtopäätös

AP BIO 1000 on testattu todellisessa tilanteessa tehohoituhuoneessa, jossa oli yksi intuboitunut potilas, jolla oli COVID.

Kaikki koettamme edeltäneet asiakirjat osoittivat FläktGroupin AP BIO 1000 -ilmanpuhdistimen AirFend-järjestelmään integroidun kasvipohjaisen koostumuksen tehokkuuden in vitro. Tämä asiakirja on kirjoitettu käsittelemään useita H14-suodattimia käyttäviin ilmanpuhdistimiin liittyviä ongelmia.

Työmme on johtanut siihen päätelmään, että:

1. **AP BIO 1000 -ilmanpuhdistin ei sisällä käytännössä riskiä viruksen leviämiseksi terveydenhuollon henkilöstöön**
2. **Tämän laitteen käyttö vähentää merkittävästi halkaisijaltaan ≥ 5 ja $\geq 0,5$ μm hiukkasten määrää potilashuoneessa, ja saa näin aikaan virusvektoreiden aleneman/hajoamisen testatussa ympäristössä.**
3. **AP BIO 1000 mahdollistaa siirtymisen ilmanlaatutasolta ISO8 tasolle ISO6.**
4. **Ilmanpuhdistimesta tulevalla ilmalla on todellinen bakterisidinen vaikutus kaikkein alttiimpiin (laitetta lähinnä oleviin) pintoihin. Tämä vaikutus on kuitenkin heikompi kohteissa, jotka sijaitsevat 1,8 m:n päässä AP BIO:sta.**
5. **Puhdistimesta tulevalla ilmalla on ilmassa bakterisidinen vaikutus (20 minuutin käytön jälkeen) bakteerien dekontaminointinopeuden ollessa 50 – 65,1 %.**
6. **COVID-19:n virus-RNA:ta ei löytynyt AP BIO 1000:n suodattimista.**
7. **Terveydenhuollon henkilökunta ja potilaat eivät ilmoittaneet toksisuutta tai lyhytaikaisia sivuvaikutuksia kuukauden aikana.**

12 | Viitteet

1. Zhu et al, A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019, February 20, 2020
N Engl J Med 2020; 382:727-733DOI:10.1056/NEJMoa20010172020.
2. Liu, Y., Ning, Z., Chen, Y. et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals. Nature 582, 557–560 (2020)
3. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature. 2020.
4. Kimberly A. Prather, Linsey C. Marr et al. Airborne transmission of SARS-CoV-2. Science 16 Oct 2020: Vol. 370, Issue 6514, pp. 303-304)
5. Van Doremalen N, Bushmaker T, Morris DH, Holbrook MG, Gamble A, Williamson BN, et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1. New England Journal of Medicine. 2020; 0: null. doi:10/ggn88w
6. <https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/covid-19-aeration-ventilation-climatisation.pdf>
7. <https://www.anses.fr/fr/system/files/AIR2012SA0236Ra.pdf>
8. Lu J, Gu J, Li K, et al. COVID-19 Outbreak Associated with Air Conditioning in Restaurant, Guangzhou, China, 2020, Emerg Infect Dis. 2020;26(7):10.3201/eid2607.200764. doi:10.3201/eid2607.200764
9. Ye shen and al. Community Outbreak Investigation of SARS-CoV-2 Transmission Among Bus Riders in Eastern China, JAMA Intern Med. Published online September 1, 2020. doi:10.1001/jamainternmed.2020.5225
10. Perry JL, Agui, JH, & Vijayakumar R. (2016, May). Submicron and Nanoparticulate Matter Removal by HEPA-Rated Media Filters and Packed Beds of Granular Materials. <https://ntrs.nasa.gov/citations/20170005166>
11. Eszter Csikós and al. Effects of Thymus vulgaris L., Cinnamomum verum J.Presl and Cymbopogon nardus (L.) Rendle Essential Oils in the Endotoxin-induced Acute Airway Inflammation Mouse Model, Molecules 2020, 25(15), 3553; <https://doi.org/10.3390/molecules25153553>
12. Abdul Rouf Wani and al., An updated and comprehensive review of the antiviral potential of essential oils and their chemical constituents with special focus on their mechanism of action against various influenza and coronaviruses, Microb Pathog. 2020 Nov 16;104620. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104620
13. Aouni M, Pelen F, Soulimani R (2013) Étude de l'activité antimicrobienne d'un mélange de 41 huiles essentielles et domaines d'application. Phytothérapie 4:225– 36
14. Abdullahi ME (2013) A Synopsis on Biogenic and Anthropogenic Volatile Organic Compounds Emissions: Hazards and Control. Internat J Engineer Sci 2(5):145–53
15. Muge Cevik, MRCP Matthew Tate, MRCP Ollie Lloyd, MRCP Alberto Enrico Maraolo, MD Jenna Schafers, MRCP and al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis, Lancet November 19, 2020 [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30172-5)

Liite 1



**CENTRE EUROPÉEN MEDICAL BIOCLIMATIQUE
DE RECHERCHE ET D'ENSEIGNEMENT UNIVERSITAIRE**
Rue Croix de Bretagne - Villard Saint Pancrace - 05100 BRIANÇON

Tel : 04.92.20.52.56 - Fax : 04.92.20.13.03
Email : cembreu@univ-briancon.fr - Internet : <http://www.cembreu.fr>
Organisme de recherche enregistré sous le numéro : 03 04 003 70 04

ATTESTATION

Le composé décontaminant dénommé Bio-screen[®] est un produit naturel antiseptique et analgésique ne présentant aucune toxicité connue décrite à ce jour chez l'Homme.

Fait à Villard Saint Pancrace, le 14/10/02

Docteur Sc. Odile MASSOT

Directeur de Recherche-CEMBREU

TRANSLATION



THE TOXICOLOGY GROUP, LLC

A Wholly Owned Company of NSF International

June 6, 2005

Mr. Alex Wijnsenbeek
H.B.A. GmbH
45 La Vater Strasser
CH8002 Zurich, Switzerland

RE: Profile Of Bioscreen C000C

Dear Mr. Wijnsenbeek:

The Toxicology Group (TTG) has been working with H.B.A. for approximately 3 years to investigate Bioscreen C000C and continues to assist in developing efficacy, stability and other necessary data to support product claims in particular end use areas to develop specific distribution channels. TTG originally evaluated the product attributes particularly as they pertained to the requirements of the "Minimum Risk Pesticide" guidelines, as specified in US-Environmental Protection Agency Federal Insecticide, Rodenticide, and Fungicide Act, Section 25 (b). As importantly, The Toxicology Group also determined that all substances incorporated in the mixture were determined to be Generally Regarded as Safe (G.R.A.S.) for addition to foods by the US - Food and Drug Administration (as specified in 21 CFR, 184.1257).

Based on a review of the ingredient profiles and these two regulatory affirmations, our scientific team of experts is confident that this natural proprietary mixture of substances presented a viable alternative to the many chemically based antimicrobials currently on the market today. Our multidisciplinary team of scientists including, toxicologists, microbiologists, chemists, and engineers continue to generate and review efficacy and stability data on Bioscreen C000C. This data includes product efficacy against various bacteria, fungi, and virus. The product is tested both in its neat form and as a tincture. It has proven efficacious against a broad range of organisms in both forms.

The Toxicology Group, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 Dixboro Road • Ann Arbor • MI 48105
Phone (800) 673-6275
Fax (769) 827-7760
www.toxgroup.org

Liite 2

Liite 3

Liite 4

Liite 5

KALLISTE
M. Jean ANGELOUS
110 Allée des Dauphins
30330 SAINT-ISMIER

DETERMINATION OF THE VIRUCIDAL ACTIVITY OF THE Biocell-Mg1 PRODUCT ACCORDING TO THE EN 14476+A2:07-2019 STANDARD

ANALYSIS REPORT R/20/19993A

Version #	Validation - Scientific & Technical Director / Quality Director	Verification - Assistant of the Scientific & Technical Director	Edition date of the report	Date of amendment
1	J.-F. LACROIX	J.-F. LACROIX	24/07/2020	1

File E20/20/0001
Report R/20/19993A
110 Allée des Dauphins 30330 SAINT-ISMIER France
T: +33 (0) 4 67 29 40 00 F: +33 (0) 4 67 29 40 01 E: info@analytice.com
ANISO is certified to ISO 9001:2015 - ISO 14001:2015 - ISO 45001:2018 - ISO 22716:2018 - ISO 22717:2018 - ISO 22718:2018

© Tous droits réservés. Toute réimpression ou utilisation non autorisée sans la permission écrite de la société Analytice Agri & Food Analysis est formellement interdite. Toute reproduction ou utilisation non autorisée sans la permission écrite de la société Analytice Agri & Food Analysis est formellement interdite. All rights reserved. Any reprinting or unauthorized use without the written permission of Analytice Agri & Food Analysis is expressly prohibited. Any reproduction or unauthorized use without the written permission of Analytice Agri & Food Analysis is expressly prohibited.

TABLE OF CONTENTS

	Page
1. Mission	3
2. Sample identification	3
3. Experimental conditions	3
4. Method validation	4
4.1. Cytotoxicity	4
4.2. Susceptibility to viruses	4
4.3. Validations of the cold shock method	4
4.4. Inactivation assays of the virus with a control solution	6
5. Testing - Calculation of the virucidal activity	7
5.1. FOR ADENOVIRUS	7
5.2. FOR POLIOVIRUS	7
5.3. FOR NOROVIRUS	8
6. Methodology validation	9
7. Conclusion	10

APPENDIX

Appendix: pages 11 to 26

SAMPLES IDENTIFICATION

Our reference	Information provided by the client	Date of Manufacturing	Date of analysis
E20/0491	Biocell-Mg1 Soc. T20	11/06/2020	From 15/06 to 20/07/2020

Your order:

File E20/20/0001
Report R/20/19993A
110 Allée des Dauphins 30330 SAINT-ISMIER France
T: +33 (0) 4 67 29 40 00 F: +33 (0) 4 67 29 40 01 E: info@analytice.com
ANISO is certified to ISO 9001:2015 - ISO 14001:2015 - ISO 45001:2018 - ISO 22716:2018 - ISO 22717:2018 - ISO 22718:2018

1. Mission

The firm KALLISTE asks the firm ANALYTICE to undertake a study to test the virucidal activity of the product BIOCELLMg1 according to the EN 14476+A2:07-2019 standard chemical antibiotics and disinfectants - inactivating suspension tests for chemical disinfectants and antibiotics used in human medicine.

2. Sample identification

Manufacturer: KALLISTE
11062020
Production date: non commercialized
Storage condition: room temperature
Active substances: plant complex (Tinct. galeae)
Appearance of the product: brown powder
Product (destined for use): as recommended by the manufacturer
Date of delivery of the product: 15/06/2020
Date of test: from 15/06/2020 to 20/07/2020

3. Experimental conditions

Temperature used during the assay: 20°C ± 1°C
Inoculum units: log TCID₅₀ and log UFFIND, for Poliovirus
Exposure time: 30 min, 15 min, 5 min
Final concentrations tested: 0.1% (undiluted), 0.01% and 0.001%
Diluent used for the product: distilled water

Adenovirus: stock 5, attenuated strain 75, grown on HEp-2 cells, under 5% CO₂ atmosphere.
Poliovirus: murine neurovirulent strain 339, grown on RAB 284 T cells, under 5% CO₂ atmosphere and poliovirus type 1, strain C-26, grown on VERO cells, under 5% CO₂ atmosphere.
0.2 g/L biocell active solution: cold shock.

Viral titre:

Viral titres are expressed in log TCID₅₀ for adenovirus and norovirus and log UFFIND, for Poliovirus.

- For adenovirus, titre = 5.375 log TCID₅₀
- For norovirus, titre = 6.750 log TCID₅₀
- For poliovirus, titre = 6.967 log UFFIND.

File E20/20/0001
Report R/20/19993A
110 Allée des Dauphins 30330 SAINT-ISMIER France
T: +33 (0) 4 67 29 40 00 F: +33 (0) 4 67 29 40 01 E: info@analytice.com
ANISO is certified to ISO 9001:2015 - ISO 14001:2015 - ISO 45001:2018 - ISO 22716:2018 - ISO 22717:2018 - ISO 22718:2018

4. Method validation

4.1. Cytotoxicity

- For adenovirus, the HEp-2 cells were exposed to the BIOCELLMg1 product and a mean cytotoxic effect was observed at the dilution 10⁻¹.

- For norovirus, the RAB1 cells were exposed to the BIOCELLMg1 product and a mean cytotoxic effect was observed at the dilution 10⁻¹.

- For poliovirus, the VERO cells were exposed to the BIOCELLMg1 product and a mean cytotoxic effect was observed at the dilution 10⁻¹.

4.2. Susceptibility to viruses

The viruses were treated on cell cultures untreated with the product (indicator cell line) and stored on cell cultures treated with the product. According to the European standard EN 14476+A2:07-2019, the BIOCELLMg1 product used at the dilution of 10⁻¹ does not have an effect on the adenovirus titration method (the difference between viral titres must be > 1.2 log).

ADENOVIRUS	Viral titre (log TCID ₅₀)		
	Untreated cell cultures	Treated cell cultures	Viral titre (log TCID ₅₀)
Dilution			
BIOCELLMg1 10 ⁻¹	6.375	6.375	6.308

According to the European standard EN 14476+A2:07-2019, the BIOCELLMg1 product used at the dilution of 10⁻¹ does not have an effect on the adenovirus titration method (the difference between viral titres must be > 1.2 log).

POLIOVIRUS	Viral titre (log UFFIND)		
	Untreated cell cultures	Treated cell cultures	Viral titre (log UFFIND)
Dilution			
BIOCELLMg1 10 ⁻¹	6.868	6.534	6.520

According to the European standard EN 14476+A2:07-2019, the BIOCELLMg1 product used at the dilution of 10⁻¹ does not have an effect on the poliovirus titration method (the difference between viral titres must be > 1.2 log).

NOROVIRUS	Viral titre (log TCID ₅₀)		
	Untreated cell cultures	Treated cell cultures	Viral titre (log TCID ₅₀)
Dilution			
BIOCELLMg1 10 ⁻¹	6.750	6.250	6.308

According to the European standard EN 14476+A2:07-2019, the BIOCELLMg1 product used at the dilution of 10⁻¹ does not have an effect on the norovirus titration method (the difference between viral titres must be > 1.2 log).

File E20/20/0001
Report R/20/19993A
110 Allée des Dauphins 30330 SAINT-ISMIER France
T: +33 (0) 4 67 29 40 00 F: +33 (0) 4 67 29 40 01 E: info@analytice.com
ANISO is certified to ISO 9001:2015 - ISO 14001:2015 - ISO 45001:2018 - ISO 22716:2018 - ISO 22717:2018 - ISO 22718:2018

4.3. Validations of the cold shock method

The method is validated if the difference between viral titres is > 1.2 log.

Product Concentration	Viral titre (log TCID ₅₀)			Difference with the viral suspension
	Organic cell feed	Trial 1 (log TCID ₅₀)	Trial 2 (log TCID ₅₀)	
BIOCELLMg1	0.2 g/L biocell active solution	5.875	5.875	0.00

Product Concentration	Viral titre (log UFFIND)			Difference with the viral suspension
	Organic cell feed	Trial 1 (log UFFIND)	Trial 2 (log UFFIND)	
BIOCELLMg1	0.2 g/L biocell active solution	6.967	6.967	0.00

Product Concentration	Viral titre (log TCID ₅₀)			Difference with the viral suspension
	Organic cell feed	Trial 1 (log TCID ₅₀)	Trial 2 (log TCID ₅₀)	
BIOCELLMg1	0.2 g/L biocell active solution	6.750	6.750	0.00

File E20/20/0001
Report R/20/19993A
110 Allée des Dauphins 30330 SAINT-ISMIER France
T: +33 (0) 4 67 29 40 00 F: +33 (0) 4 67 29 40 01 E: info@analytice.com
ANISO is certified to ISO 9001:2015 - ISO 14001:2015 - ISO 45001:2018 - ISO 22716:2018 - ISO 22717:2018 - ISO 22718:2018

4.4. Inactivation assays of the virus with a control solution

The viral titre reduction difference between the start of the viral suspension treated with 0.2 % formaldehyde and the viral suspension control must be between -0.5 and -1.0 log after 30 min of exposure (± 0.5 log after 60 min for the poliovirus).

FOR ADENOVIRUS			
Formaldehyde 0.2%	Viral titre (log TCID ₅₀)	Viral titre reduction (log TCID ₅₀)	
Viral suspension control	6.375		
Inactivation 5 min	6.250	0.625	
Inactivation 15 min	6.375	1.000	
Inactivation 30 min	6.375	1.380	

FOR POLIOVIRUS			
Formaldehyde 0.2%	Viral titre (log UFFIND)	Viral titre reduction (log UFFIND)	
Viral suspension control	6.967		
Inactivation 5 min	6.454	0.213	
Inactivation 15 min	6.287	0.420	
Inactivation 30 min	6.228	0.472	

FOR NOROVIRUS			
Formaldehyde 0.2%	Viral titre (log TCID ₅₀)	Viral titre reduction (log TCID ₅₀)	
Viral suspension control	6.750		
Inactivation 5 min	6.125	0.625	
Inactivation 15 min	6.625	1.125	
Inactivation 30 min	6.375	0.375	

File E20/20/0001
Report R/20/19993A
110 Allée des Dauphins 30330 SAINT-ISMIER France
T: +33 (0) 4 67 29 40 00 F: +33 (0) 4 67 29 40 01 E: info@analytice.com
ANISO is certified to ISO 9001:2015 - ISO 14001:2015 - ISO 45001:2018 - ISO 22716:2018 - ISO 22717:2018 - ISO 22718:2018

5. Testing - Calculation of the virucidal activity

5.1. FOR ADENOVIRUS

The concentrations of the product demonstrated a virucidal activity on the virus tested if the viral titre reduction is > 1.2 log.

BIOCELLMg1					
PRODUCT	Concentration	Time of exposure	Temperature	Viral titre (log TCID ₅₀)	
				Viral titre (log TCID ₅₀)	Viral titre reduction
BIOCELLMg1	0.2%	30 h	20°C	6.350	4.375
	0.01%			5.750	4.125
	0.001%			6.250	5.825

BIOCELLMg1

BIOCELLMg1					
PRODUCT	Concentration	Time of exposure	Temperature	Viral titre (log UFFIND)	
				Viral titre (log UFFIND)	Viral titre reduction
BIOCELLMg1	0.2%	30 h	20°C	6.625	6.200
	0.01%			7.150	6.725
	0.001%			6.125	6.700

BIOCELLMg1

BIOCELLMg1					
PRODUCT	Concentration	Time of exposure	Temperature	Viral titre (log UFFIND)	
				Viral titre (log UFFIND)	Viral titre reduction
BIOCELLMg1	0.2%	1 min	20°C	2.425	4.213
	0.01%			2.888	5.575
	0.001%			5.888	5.575

BIOCELLMg1

BIOCELLMg1					
PRODUCT	Concentration	Time of exposure	Temperature	Viral titre (log UFFIND)	
				Viral titre (log UFFIND)	Viral titre reduction
BIOCELLMg1	0.2%	1 min	20°C	2.475	4.213
	0.01%			3.125	5.558
	0.001%			6.450	5.575

File E20/20/0001
Report R/20/19993A
110 Allée des Dauphins 30330 SAINT-ISMIER France
T: +33 (0) 4 67 29 40 00 F: +33 (0) 4 67 29 40 01 E: info@analytice.com
ANISO is certified to ISO 9001:2015 - ISO 14001:2015 - ISO 45001:2018 - ISO 22716:2018 - ISO 22717:2018 - ISO 22718:2018

5.3. FOR NOROVIRUS

BIOCELLMg1

BIOCELLMg1					
PRODUCT	Concentration	Time of exposure	Temperature	Viral titre (log TCID ₅₀)	
				Viral titre (log TCID ₅₀)	Viral titre reduction
BIOCELLMg1	0.2%	30 h	20°C	2.250	4.380
	0.01%			2.500	4.260
	0.001%			6.125	6.825

BIOCELLMg1

BIOCELLMg1					
PRODUCT	Concentration	Time of exposure	Temperature	Viral titre (log TCID ₅₀)	
				Viral titre (log TCID ₅₀)	Viral titre reduction
BIOCELLMg1	0.2%	30 h	20°C	2.425	4.375
	0.01%			2.825	4.125
	0.001%			3.875	5.875

File E20/20/0001
Report R/20/19993A
110 Allée des Dauphins 30330 SAINT-ISMIER France
T: +33 (0) 4 67 29 40 00 F: +33 (0) 4 67 29 40 01 E: info@analytice.com
ANISO is certified to ISO 9001:2015 - ISO 14001:2015 - ISO 45001:2018 - ISO 22716:2018 - ISO 22717:2018 - ISO 22718:2018

TRIAL 2

	Concentration	ORGANIC SOIL LOAD	EXPOSURE TIME	Dilutions					
				-1	-2	-3	-4	-5	-6
BIOCELL-MG1 TRIAL 2	97,00%	0,3 g/l BSA	1 min	23	3	0			
				25	4	0			
	28			3	0				
	128			13	2				
80,00%	119	13	2						
	131	14	2						
10,00%				402	45,00	5,00			
				453	49,00	5,00			
				502	53,00	5,00			
			VIRAL CONTROL	6,667					
BIOCELL-MG1 TRIAL 2 Cytotoxicity	97,00%	0,3 g/l BSA	N.A.	23	3				
				23	3				
				27	3				
Formaldehyde	0,70%		5				210	21	2
							217	22	3
							230	23	2
							202	20	2
15				206	22	2	0		
				199	20	2	0		
60				112	12	1	0	0	
				106	12	1	0	0	
				103	10	1	0	0	
Formaldehyde (cytotoxicity)	0,70%		N.A.	30	3				
				28	3				
				33	3				
VIRAL CONTROL OF INFECTIVITY	N.A.	PBS	0				487	49	5
							480	48	6
							476	48	5
							479	49	5
60							480	49	5
							492	49	6
VIRAL CONTROL OF INFECTIVITY	N.A.	0,3 g/l BSA	0				488	49	5
							473	48	5
							480	49	5
							465	47	5
60							470	47	5
							470	48	5

Sensitivity of the cells to the Poliovirus:

Product	Dilution	ORGANIC SOIL LOAD		Dilutions						total plaques	Log UFP/mL	Log R
				-1	-2	-3	-4	-5	-6			
BIOCELL-MG1	10 ⁻²	0,3 g/l BSA	Untreated cells				460	47	5	1535	6,664	0,329
							461	46	5			
			Treated cells				458	47	6			
							211	23	3			
						225	24	3	719	6,334		
						206	21	3				

Liite 6



THE TOXICOLOGY GROUP, LLC

A Wholly Owned Company of NSF International

The Toxicology Group, LLC has been pleased to be a partner with HBA in their quest to provide an alternative antimicrobial solution and look forward to continuing to work with them on developing the technology to its fullest.

Sincerely,

Maryann Sanders
Senior Scientist

The Toxicology Group, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 Dixboro Road • Ann Arbor • MI 48105
Phone (800) 673-6275
Fax (769) 827-7760
www.toxgroup.org



THE TOXICOLOGY GROUP, LLC

A Wholly Owned Company of NSF International

Based on the testing performed to date, it is our opinion that the Bioscreen C000C is a viable antimicrobial alternative for many situations where chemical sanitizers are currently employed. It offers the industry a unique **natural** product that can be classified as a:

- Minimum risk pesticide (per US-EPA)
- Contains:
- All Generally Recognized as Safe ingredients (as specified in 21CFR, 184.1257)
- Has:
- Antimicrobial capabilities
- And is
- Biodegradable.

For reference included here is a chart, which compares the key performance advantages of Bioscreen C000C to two other primary disinfectants.

Table 1 – Key performance and advantages of Bioscreen C000C			
Agent	Sodium & Calcium Hypochlorite	Quaternary Ammonium Compounds	Bioscreen C000C
Performance	Moderate	Moderate to high	Moderate
Contact Time	Minutes	Minutes	Minutes to Hours
pH	Alkaline	Acidic to neutral	Acidic
Corrosiveness	Corrosive to iron and aluminum	Corrosive to iron, copper, and brass	Noncorrosive
Source	Chemical	Chemical	Natural
Antimicrobial Performance	Broadspectrum (Bacterial, Viral, Fungal)	Broadspectrum (Bacterial, Viral, Fungal)	Broadspectrum (Bacterial, Viral, Fungal)
Environmental Attributes			Biodegradable
Regulatory Statues	Registered Pesticide	Registered Pesticide	Generally Recognized as Safe, Minimum Risk Pesticide

The Toxicology Group, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 Dixboro Road • Ann Arbor • MI 48105
Phone (800) 673-6275
Fax (769) 827-7760
www.toxgroup.org

Liite 7

TEST REPORT

Efficacy Testing of
Antimicrobial Filter Treatments

Client: B.B.A. GmbH
Client Number: 10190
Program: 130
Contracting Organization: The Toxicology Group, LLC
789 DeSoto Road
Ann Arbor, MI 48106-0140
USA
Products: Bio-screen C00C
Filter screen coated with Bio-screen C00C
Uncoated Filter screen
Job Number: 1000904
Date of Experimentation: December 1, 2008 - December 6, 2008
Overall Study Result: COMPLETE

Study Director: Robert Donofrio Date: 1-16-09

TTC Review: Wayne Swales Date: 1/16/09

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 DeSoto Road • Ann Arbor, MI 48106-0140
471.766.8000 • 800.457.0771 • Fax: 734.766.8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it may only be used as intended. It may not be reproduced or used for advertising or other purposes unless our signature or in connection with our name is used without special permission in writing.
Page 1 of 12

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 DeSoto Road • Ann Arbor, MI 48106-0140
471.766.8000 • 800.457.0771 • Fax: 734.766.8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it may only be used as intended. It may not be reproduced or used for advertising or other purposes unless our signature or in connection with our name is used without special permission in writing.
Page 1 of 12

STUDY PERSONNEL

STUDY DIRECTOR:
Robert S. Donofrio, M.S., Ph.D. Candidate Director of Microbiology
Professional personnel involved:
Robin Beckwith, B.S. Microbiologist II
Teresa Chumakova, B.S. Associate Microbiologist
Josh Wanta, B.S. Microbiology Technician

METHODOLOGY

A. Stock Culture Preparations
The bacterial challenge organisms *P. aeruginosa* 1542 and *B. subtilis* 9172 were individually inoculated in 10 mL Tryptic Soy Broth and passed three times. All incubations were performed at 37°C for 24 hours. The challenge organisms were harvested via replicate centrifugation at 3000 g and washing with sterile buffered dilution water (BDW). The cell densities for the bacterial challenges were estimated using pour plating with Standard Plate Count Agar. All plates were incubated at 37°C for 24 hours.

B. Protocol
The following test setup was utilized for all challenge organisms. Triplicate bottles containing 100 mL of BDW were amended individually with the following test products: 1g of Bio-screen C00C, 1g of Bio-screen C00C, 9 cm² of uncoated filter support, 9.1 cm² of filter support coated with 5g Bio-screen C00C per square foot, 45.3 cm² of uncoated filter support, and 45.3 cm² of filter support coated with 5g Bio-screen C00C per square foot. The sizes of the filter support pieces were calculated to correspond to the concentrations of Bio-screen C00C being tested; 5.1 cm² of coated surface corresponded to 1g of Bio-screen C00C (1% suspension) and 45.3 cm² corresponded to 5g Bio-screen C00C (5% suspension). An inoculum control consisting none of the products was also included. The bottles were spiked with the challenge organism to achieve a minimum final concentration of 1 x 10⁷ colony forming units per milliliter (CFU/mL). All bottles were placed on a rotary shaker set at 100 rpm at 22°C. Aliquots of 1.0 mL from each bottle were aseptically removed at the following time points: 0, 24, and 72 hours. The 1.0 mL aliquot was transferred to 9 mL of a neutralizer solution consisting of lecithin, Tween 80, and phosphate buffer. Serial dilutions were carried out in BDW then spread plated onto *Pseudomonas* Isolation Agar for *P. aeruginosa* or Tryptic Soy Agar for *B. subtilis*. The plates were incubated at 37°C for 24 hours prior to enumeration with a Quebec colony counter.

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 DeSoto Road • Ann Arbor, MI 48106-0140
471.766.8000 • 800.457.0771 • Fax: 734.766.8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it may only be used as intended. It may not be reproduced or used for advertising or other purposes unless our signature or in connection with our name is used without special permission in writing.
Page 1 of 12

Table 1. Survivability of *P. aeruginosa* 1542. The products added to 100 mL of BDW are provided. Microorganism concentrations are given in colony forming units (CFU/mL). The results are means of three replicates.

Exposure Time (Hours)	Bio-screen C00C 1 g	Bio-screen C00C 5 g	Uncoated Filter support (9.1 cm ²)	Filter support coated with Bio-screen C00C (9.1 cm ²)	Uncoated Filter support (45.3 cm ²)	Filter support coated with Bio-screen C00C (45.3 cm ²)	Control
0	1.37E+07	1.34E+07	6.70E+06	1.03E+07	1.38E+07	1.10E+07	1.29E+07
24	2.50E+05	<1.00E+01	1.11E+06	<1.00E+01	1.06E+06	<1.00E+01	1.56E+06
72	1.80E+04	<1.00E+01	1.40E+06	<1.00E+01	1.32E+06	3.30E+02	1.15E+06

Table 2. Log change in *P. aeruginosa* population with varying products. An asterisk (*) indicates that no reduction occurred in the organism population remained static or increased.

Log Reduction	Bio-screen C00C 1 g	Bio-screen C00C 5 g	Uncoated Filter support (9.1 cm ²)	Filter support coated with Bio-screen C00C (9.1 cm ²)	Uncoated Filter support (45.3 cm ²)	Filter support coated with Bio-screen C00C (45.3 cm ²)	Control
24 hours	1.74	>6.13	*	>6.01	*	>6.04	*
72 hours	2.88	>6.13	*	>6.01	*	4.52	*

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 DeSoto Road • Ann Arbor, MI 48106-0140
471.766.8000 • 800.457.0771 • Fax: 734.766.8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it may only be used as intended. It may not be reproduced or used for advertising or other purposes unless our signature or in connection with our name is used without special permission in writing.
Page 1 of 12

TABLE OF CONTENTS

Test Report - Cover Page..... 1
Table of Contents..... 2
Study Personnel..... 3
Background..... 4
Methodology..... 5
Results and Discussion..... 6
Appendix A - Tables and Figures..... 7
Reference Page..... 12

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 DeSoto Road • Ann Arbor, MI 48106-0140
471.766.8000 • 800.457.0771 • Fax: 734.766.8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it may only be used as intended. It may not be reproduced or used for advertising or other purposes unless our signature or in connection with our name is used without special permission in writing.
Page 1 of 12

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 DeSoto Road • Ann Arbor, MI 48106-0140
471.766.8000 • 800.457.0771 • Fax: 734.766.8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it may only be used as intended. It may not be reproduced or used for advertising or other purposes unless our signature or in connection with our name is used without special permission in writing.
Page 1 of 12

RESULTS AND DISCUSSION

The uncoated filter supports of 9.1 and 45.3 cm² did not affect the microorganism count at the exposure times tested. None of the products tested (Bio-screen C00C powder suspension and coated filter) were efficacious against *B. subtilis* over the exposure period utilized (Table 1, Appendix A).

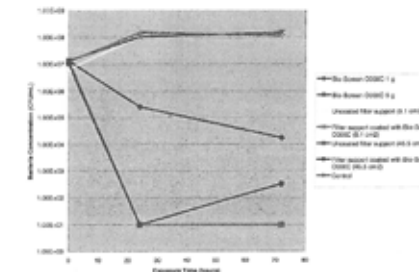
Uncoated filter supports of both sizes were not efficacious against *P. aeruginosa* (Table 1, Appendix A). The coated filter supports of 9.1 cm² (1g Bio-screen C00C or equivalent to 1%) and 45.3 cm² (5g Bio-screen C00C or equivalent to 5%) showed a greater than six log reduction in the *P. aeruginosa* population within 24 hours (Table 1, Appendix A).

Bio-screen C00C (powder suspension) at 1% showed better efficacy on either organism. For the 1% powder suspension of Bio-screen C00C, there was a greater than six log reduction in the *P. aeruginosa* population within 24 hours (Table 1, Appendix A).

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 DeSoto Road • Ann Arbor, MI 48106-0140
471.766.8000 • 800.457.0771 • Fax: 734.766.8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it may only be used as intended. It may not be reproduced or used for advertising or other purposes unless our signature or in connection with our name is used without special permission in writing.
Page 1 of 12

Figure 1. Survival of *P. aeruginosa* with varying products. The limit of detection is 10 CFU/mL. The microorganism concentration is given in CFU/mL. The exposure times are provided in hours. For 9.1 cm² (1g Bio-screen C00C or equivalent to 1%) and for 45.3 cm² (5g Bio-screen C00C or equivalent to 5%).



THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 DeSoto Road • Ann Arbor, MI 48106-0140
471.766.8000 • 800.457.0771 • Fax: 734.766.8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it may only be used as intended. It may not be reproduced or used for advertising or other purposes unless our signature or in connection with our name is used without special permission in writing.
Page 1 of 12

TEST REPORT

Efficacy Testing of Antimicrobial Filter Treatments

Client: H.R.A. (EMBE)
Client Number: 02090
Program: 156
Contracting Organization: The Toxicology Group, LLC
789 Dickens Road
Annapolis, MD 21403-0140
USA
Product: Bio-Screens C000C
Filter support coated with Bio-Screens C000C
Uncoated Filter screen
Job Number: 210000454
Date of Experimentation: January 5, 2009-January 14, 2009
Overall Study Results: COMPLETE

Study Director: Robert D. Siefert Date: 1/25/09

TTC Review: Megan L. Smith Date: 1/26/09

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 Dickens Road • Annapolis, MD • 48017 • USA
(781) 389-8000 • (800) 775-1275 Toll Free • Fax: 781-389-8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it can only be reproduced verbatim. It may not be reproduced in part for advertising or other purposes without our signature or in connection with any other product without specific permission in writing.
1/25/2009/04
Page 2 of 10

BACKGROUND

Bio-Screens C000C is a powder with pesticidal properties made from natural ingredients. The test material has been evaluated for efficacy and matrix compounds (sugars and regents screen, sodium chloride). Bench scale testing to determine the antimicrobial efficacy of various filter materials impregnated with Bio-Screens C000C was conducted upon to assist in the development of future applications. One organism from each basic microorganism group (gram-positive *Bacillus subtilis*, gram-negative *Pseudomonas aeruginosa*, fungus *Aspergillus flavus*) was to be tested against a Bio-Screens C000C laden filter to allow for comparative efficacy. This report details the efficacy work performed on Bio-Screens C000C laden filters against *Aspergillus flavus*.

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 Dickens Road • Annapolis, MD • 48017 • USA
(781) 389-8000 • (800) 775-1275 Toll Free • Fax: 781-389-8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it can only be reproduced verbatim. It may not be reproduced in part for advertising or other purposes without our signature or in connection with any other product without specific permission in writing.
1/25/2009/04
Page 4 of 10

TABLE OF CONTENTS

Test Report - Cover Page..... 1
Table of Contents..... 2
Study Personnel..... 3
Background..... 4
Methodology..... 5
Results and Discussion..... 6
Appendix A - Tables and Figures..... 7
Reference Page..... 10

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 Dickens Road • Annapolis, MD • 48017 • USA
(781) 389-8000 • (800) 775-1275 Toll Free • Fax: 781-389-8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it can only be reproduced verbatim. It may not be reproduced in part for advertising or other purposes without our signature or in connection with any other product without specific permission in writing.
1/25/2009/04
Page 7 of 10

METHODOLOGY

A. Stock Culture Preparation
The fungal challenge strain *A. flavus* ATCC 9296 was prepared by inoculation of four Potato Dextrose Agar plates (PDA) with 0.5 mL of the stock culture. The plates were incubated at 25°C for 4 days. A spore suspension was prepared from the plates according to the methods outlined in AGAC 95.17. An approximate cell density of the suspension was obtained via direct counts using a hemocytometer and bright field microscopy.

B. Protocol
The following test setup was utilized for all challenge organisms. Triplicate bottles containing 100 mL of SBOW were amended individually with the following test products: 1g of Bio-Screens C000C, 5g of Bio-Screens C000C, 9 cm² of uncoated filter support, 9.1 cm² of filter support coated with 10g Bio-Screens C000C per square foot, 45.5 cm² of uncoated filter support, and 45.5 cm² of filter support coated with 10g Bio-Screens C000C per square foot. The sizes of the filter support pieces were calculated to correspond to the concentrations of Bio-Screens C000C being tested; 9.1 cm² of coated surface corresponded to 1g of Bio-Screens C000C (1% suspension) and 45.5 cm² corresponded to 5g Bio-Screens C000C (5% suspension). An inoculum control containing none of the products was also included. The bottles were spiked with the challenge organism to achieve a minimum final concentration of 1 x 10⁷ colony forming units per milliliter (CFU/mL). All bottles were placed on a rotary shaker set at 160 rpm at 22°C. Aliquots of 1.0mL from each bottle were aseptically removed at the following time points: 0, 24, and 72 hours. The 1.0 mL aliquot was transferred to 9 mL of a neutralizer solution consisting of lecithin, Tween 80, and phosphate buffer. Serial dilutions were carried out in SBOW then spread plated onto PDA. The plates were incubated at 22°C for 5-7 days prior to enumeration with a Quebec colony counter.

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 Dickens Road • Annapolis, MD • 48017 • USA
(781) 389-8000 • (800) 775-1275 Toll Free • Fax: 781-389-8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it can only be reproduced verbatim. It may not be reproduced in part for advertising or other purposes without our signature or in connection with any other product without specific permission in writing.
1/25/2009/04
Page 7 of 10

RESULTS AND DISCUSSION

Filters treated with a 1% Bio-Screens C000C (spore suspension) did not show a significant difference over the uncoated filter control, when tested for efficacy against *A. flavus*. This was not unexpected as the Bio-Screens C000C powder tested here was not efficacious against this organism at a 1% weight concentration when tested in its pure form. (See test report Preliminary Assessment of the Antimicrobial Properties of Bio-Screens C000C, organism *A. flavus*, dated April 2, 2002).

Filters treated with a 5% by weight suspension of Bio-Screens C000C showed a greater than four log reduction in the *A. flavus* population within 24 hours (Table 2, Appendix A), a significantly greater reduction than the uncoated filter control.

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 Dickens Road • Annapolis, MD • 48017 • USA
(781) 389-8000 • (800) 775-1275 Toll Free • Fax: 781-389-8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it can only be reproduced verbatim. It may not be reproduced in part for advertising or other purposes without our signature or in connection with any other product without specific permission in writing.
1/25/2009/04
Page 8 of 10

Table 1. Survivability of *A. flavus* 9296. The products added to 100 mL of SBOW are provided. Microorganism concentrations are given in colony forming units (CFU/mL). The results are means of three replicates.

Exposure Time (hours)	Bio-Screens C000C 1.1%	Bio-Screens C000C 5g	Uncoated filter support (9.1 cm ²)	Filter support coated with Bio-Screens C000C (9.1 cm ² @ 1%)	Uncoated filter support (45.5 cm ²)	Filter support coated with Bio-Screens C000C (45.5 cm ² @ 5%)	Control
0	1.80E+05	2.00E+05	1.90E+05	1.60E+05	3.00E+05	2.10E+05	1.60E+05
24	6.00E+05	3.70E+05	3.80E+05	5.80E+02	1.68E+04	<1.00E+01	4.00E+03
72	5.30E+03	<1.00E+01	1.10E+02	8.00E+01	3.90E+03	<1.00E+01	2.10E+03

Table 2. Log change in *A. flavus* population with varying products.

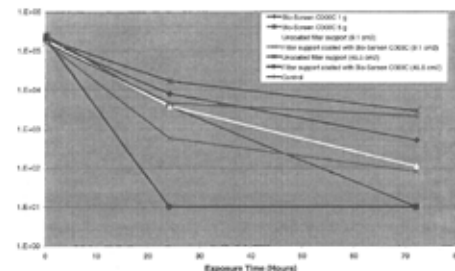
Log reduction	Bio-Screens C000C 1.1%	Bio-Screens C000C 5g	Uncoated filter support (9.1 cm ²)	Filter support coated with Bio-Screens C000C (9.1 cm ² @ 1%)	Uncoated filter support (45.5 cm ²)	Filter support coated with Bio-Screens C000C (45.5 cm ² @ 5%)	Control
24 hours	1.35	1.80	1.70	2.44	1.08	14.32	1.54
72 hours	2.54	14.40	3.24	3.30	1.84	14.32	1.88

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 Dickens Road • Annapolis, MD • 48017 • USA
(781) 389-8000 • (800) 775-1275 Toll Free • Fax: 781-389-8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it can only be reproduced verbatim. It may not be reproduced in part for advertising or other purposes without our signature or in connection with any other product without specific permission in writing.
1/25/2009/04
Page 8 of 10

APPENDIX A

TABLES AND FIGURES



THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 Dickens Road • Annapolis, MD • 48017 • USA
(781) 389-8000 • (800) 775-1275 Toll Free • Fax: 781-389-8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it can only be reproduced verbatim. It may not be reproduced in part for advertising or other purposes without our signature or in connection with any other product without specific permission in writing.
1/25/2009/04
Page 9 of 10

THE TOXICOLOGY GROUP, LLC
A Wholly Owned Company of NSF International
789 Dickens Road • Annapolis, MD • 48017 • USA
(781) 389-8000 • (800) 775-1275 Toll Free • Fax: 781-389-8000
E-mail: nsf@toxgroup.com • Internet: www.toxgroup.com

This report is intended upon the conditions that it can only be reproduced verbatim. It may not be reproduced in part for advertising or other purposes without our signature or in connection with any other product without specific permission in writing.
1/25/2009/04
Page 9 of 10

Liite 8

