



inc. Biological Consulting Services
of North Florida, Inc.

Le 22 avril 2021

M. Adam Anthony
BioZone Scientific International, Inc.
7616 Southland Blvd., Suite 114
Orlando, Florida 32809 USA
E-mail : adam.anthony@biozonescientific.com

Objet : Inactivation d'un substitut de SARS-CoV-2 par l'unité Biozone AC® de BioZone Scientific ; BCS ID 2104054.

Monsieur Anthony,

Nous avons terminé l'étude d'efficacité virucide d'un exemplaire de l'unité génératrice d'ozone Biozone AC® . Pour cette étude, nous avons utilisé le substitut de coronavirus OC43 (ATCC VR-1558) afin d'évaluer les propriétés virucides de l'unité vis-à-vis du SARS-CoV-2 dans un espace clos. Le virus a été inoculé sur des supports non poreux qui ont ensuite été placés dans une enceinte vitrée de 0,28 m³ contenant l'unité BioZone AC® . L'unité a fonctionné en continu dans l'enceinte hermétique pendant 30 minutes. L'efficacité virucide a été mesurée après ces 30 minutes d'exposition.

L'étude a conclu que l'exposition continue à l'ozone dans l'enceinte hermétique pendant 30 minutes avait entraîné une inactivation mesurée du virus sur les surfaces non poreuses inoculées. Dans les pages qui suivent, vous trouverez un résumé de la méthodologie employée et des résultats de notre analyse. En cas de doute ou pour toute demande de précisions, n'hésitez pas à me contacter.

Veuillez agréer, Monsieur, mes sentiments respectueux.

George Lukasik, Ph.D.
Directeur du laboratoire

- Page 1 sur 7 -

BCS Laboratories, Inc. - Gainesville

4609 NW 6th Street, Ste. A, Gainesville, Florida 32609 Tél. (352) 377-9272, Fax (352) 377-5630

www.microbioservices.com

FL DOH #E82924, PA DEP 68—03950, ISO/IEC 17025:2005 L2422 (L-A-B), EPA# FL01147

Fichier : Inactivation d'un substitut de SARS-CoV-2 par 30 min de fonctionnement du système Biozone AC de BioZone Scientific BCSID 2105053
Ce document ne pourra être reproduit, excepté dans sa totalité, sans le consentement écrit de BCS Laboratories



Analyse de l'infectiosité de la culture cellulaire par le virus de laboratoire :

Le coronavirus humain OC43 (ATCC VR-1558) a été multiplié et dénombré par la technique du nombre le plus probable (NPP) en utilisant comme hôte une lignée d'adénocarcinome colorectal iléo-cæcal humain HRT18G (ATCC® CRL-11663). Les cellules ont été cultivées dans des flacons de culture cellulaire T-25. Pour le dénombrement, le virus a été compté en unités infectieuses conformément à la méthodologie d'analyse décrite dans la Méthode standard 9510 (APHA, 2012) et la norme EPA /600/4-84/013. En résumé, des aliquotes d'un échantillon contenant le virus ont été inoculées à des monocouches de cellules HRT18G fraîchement préparées (ayant environ 90 % de confluence). Chaque volume d'échantillon a été inoculé en cinq exemplaires. Puis les cellules ont été incubées pendant 14 jours dans un milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (dMEM, Mediatech Inc, USA) avec 2 % de sérum bovin fœtal (FBS, Mediatech, USA), à 36,5 °C et 5 % de CO₂. Les cellules ont été observées au microscope de façon routinière pour détecter des signes de dégénérescence. Les cellules des flacons présentant des marqueurs d'infection (effets cytopathiques ou ECP) ont été enregistrés comme positifs (+) tandis que ceux qui ne présentaient aucun ECP ont été enregistrés comme négatifs (-). Puis le nombre le plus probable de virus infectieux dans un échantillon a été calculé à l'aide du logiciel MPNCALC (version 0.0.0.23). Pour les expériences-tests, un échantillon viral conservé sous forme congelée (typiquement > 1 x 10⁸ UI/mL) a été décongelé rapidement dans un bain-marie à 35 °C. La suspension virale contenait 2 % de FBS et a été utilisée dans les 15 minutes suivant sa décongélation. Avant d'être utilisée dans l'étude, la suspension virale a été diluée à 1:1 dans de l'eau de dilution tamponnée au phosphate (PBW). La dilution résultante a été utilisée dans l'étude et a été dénombrée en effectuant des séries de dilutions de facteur 10 dans du PBS puis inoculée à des cellules HRT18G comme décrit précédemment.

- Page 2 sur 7-

BCS Laboratories, Inc. - Gainesville

4609 NW 6th Street, Ste. A, Gainesville, Florida 32609
Tél. (352) 377-9272, Fax. (352) 377-5630

www.microbioservices.com

FL DOH #E82924, PA DEP 68—03950, ISO/IEC 17025:2005 L2422 (L-A-B), EPA# FL01147

Fichier : Inactivation d'un substitut de SARS-CoV-2 par 30 min de fonctionnement du système Biozone AC de BioZone Scientific BCSID 2105053

Ce document ne pourra être reproduit, excepté dans sa totalité, sans le consentement écrit de BCS Laboratories



Unité testée :

Une unité BioZone AC® destinée au test a été livrée par le commanditaire de l'étude le 8 avril 2021. L'unité s'est vu attribuer l'identification BCS ID 2104053. Elle a été placée dans une enceinte vitrée de 0,28 m3 qui était connectée à un appareil mesurant la concentration d'ozone (2B Technologies, Model 106-L. Co, USA). Un ventilateur était également placé dans l'enceinte afin d'assurer une dispersion uniforme de l'ozone. L'unité a fonctionné en continu pendant toute l'expérience.

Expérience-test : 8 avril 2021

L'étude a été menée en utilisant la procédure SOP D-1 de BCS portant sur l'efficacité d'une désinfection. La réalisation de l'expérience était adaptée du protocole ASTM E3135-18 (Pratique standard pour déterminer l'efficacité antimicrobienne de l'irradiation germicide aux ultraviolets vis-à-vis de micro-organismes sur des supports avec simulation de sol) et des paramètres requis par le client. En résumé, des supports en verre stériles de 25 x 26 mm ont été inoculés par cent microlitres de solution diluée du virus de laboratoire (contenant une concentration finale de 1 % de FBS). Trois supports ont été utilisés pour chaque période d'exposition. Des supports inoculés, placés dans l'enceinte mais non exposés à l'ozone, ont servi de témoins de contrôle. Des supports non inoculés ont servi de témoins négatifs. L'exposition a été effectuée avec un temps de contact de 30 minutes. La température ambiante lors de l'expérience a été maintenue entre 20,0 et 22,0 °C. Suivant l'exposition des supports à l'ozone, chacun d'entre eux été transféré en conditions d'asepsie dans un tube contenant 10 mL de bouillon de neutralisation D/E stérile.

- Page 3 sur 7-

BCS Laboratories, Inc. - Gainesville

4609 NW 6th Street, Ste. A, Gainesville, Florida 32609
Tél. (352) 377-9272, Fax. (352) 377-5630

www.microbioservices.com

FL DOH #E82924, PA DEP 68—03950, ISO/IEC 17025:2005 L2422 (L-A-B), EPA# FL01147

Fichier : Inactivation d'un substitut de SARS-CoV-2 par 30 min de fonctionnement du système Biozone AC de BioZone Scientific BCSID 2105053
Ce document ne pourra être reproduit, excepté dans sa totalité, sans le consentement écrit de BCS Laboratories



Les tubes ont été placés sur un agitateur orbital et agités à faible vitesse pendant 15 minutes. Après agitation, des dilutions de facteur 10 des suspensions ont été réalisées dans du PBW. Le nombre d'unités virales (infectieuses) viables dans les échantillons a été déterminé, à l'aide de la procédure d'analyse du nombre le plus probable (NPP) décrite précédemment, en utilisant la lignée cellulaire HRT18G. Les tableaux 1 et 2 présentent les résultats de l'étude. Des témoins de contrôle de la cytotoxicité et des témoins négatifs ont été réalisés en utilisant des échantillons traités mais non inoculés.

Les descriptions et les noms concernant le matériel utilisé sont issus des documents présentés. L'analyse a été autorisée et commandée par le client ou son représentant. Les données résultantes sont représentatives de l'analyse menée sur les échantillons collectés et de leur état au moment de l'analyse. Les données fournies sont strictement représentatives de l'expérience menée en conditions de laboratoire et en utilisant le matériel/les échantillons/les articles fournis par le client (ou son représentant) et de leur état au moment de l'analyse. Les données obtenues ne sont pas forcément représentatives ni indicatives d'un processus et/ou d'une application de la vie réelle.

Les échantillons ont été analysés conformément aux méthodes appropriées ; cependant, en raison des limites inhérentes aux méthodes, il est possible que des micro-organismes ne soient pas détectés. BCS Laboratories n'offre aucune garantie, explicite ou implicite, concernant la qualité, la sûreté et/ou la pureté de tout échantillon, lot ou provenance, ni des processus dont ils découlent. Les contrôles d'assurance qualité ont été effectués comme décrit dans la méthode et conformément aux bonnes pratiques de laboratoire.

- Page 4 sur 7 -

BCS Laboratories, Inc. - Gainesville

4609 NW 6th Street, Ste. A, Gainesville, Florida 32609
Tél. (352) 377-9272, Fax. (352) 377-5630

www.microbioservices.com

FL DOH #E82924, PA DEP 68—03950, ISO/IEC 17025:2005 L2422 (L-A-B), EPA# FL01147

Fichier : Inactivation d'un substitut de SARS-CoV-2 par 30 min de fonctionnement du système Biozone AC de BioZone Scientific BCSID 2105053

Ce document ne pourra être reproduit, excepté dans sa totalité, sans le consentement écrit de BCS Laboratories



Sauf indication contraire, l'analyse virale a été réalisée conformément aux pratiques et procédures de laboratoire énoncées par la norme ISO 17025:2017 et les normes de certification NELAP/TNI. BCS n'offre aucune garantie, explicite ou implicite, concernant la propriété, la qualité marchande, la sûreté ou l'adaptation à une finalité particulière de tout bien ou produit en question.

- Page 5 sur 7-

BCS Laboratories, Inc. - Gainesville

4609 NW 6th Street, Ste. A, Gainesville, Florida 32609
Tél. (352) 377-9272, Fax. (352) 377-5630

www.microbioservices.com

FL DOH #E82924, PA DEP 68—03950, ISO/IEC 17025:2005 L2422 (L-A-B), EPA# FL01147

Fichier : Inactivation d'un substitut de SARS-CoV-2 par 30 min de fonctionnement du système Biozone AC de BioZone Scientific BCSID 2105053
Ce document ne pourra être reproduit, excepté dans sa totalité, sans le consentement écrit de BCS Laboratories



Tableau 1. Efficacité de la production continue d’ozone par Biozone AC® dans un espace clos sur l’inactivation du coronavirus OC43 (ATCC VR-1558) inoculé sur des supports vitrés. L’efficacité a été déterminée pour divers temps d’exposition dans l’enceinte vitrée de 0,28 m³ contenant l’unité. Étude menée conformément à la requête du commanditaire et aux directives de l’ASTM E3135-18

Échantillon	Unités virales infectieuses encore présentes sur chaque support	Pourcentage de réduction par rapport aux supports témoins	Pourcentage moyen de réduction par rapport aux supports témoins
Unités virales infectieuses inoculées par support	1,7 x 10 ⁶		
Unités encore présentes sur les supports témoins (non exposés à l’ozone)	2,2 x 10 ⁵		
	5,4 x 10 ⁵		
Unités encore présentes sur les supports après 30 minutes d’exposition continue	2,2 x 10 ³	99,4 %	99,3 %
	5,4 x 10 ³	98,6 %	
	4,7 x 10 ²	99,9 %	

*Le nombre le plus probable (NPP) d’unités virales infectieuses (UI) a été calculé grâce au logiciel MPNCalc conformément à la norme EPA 600/R95/178. Le dénombrement a été réalisé en inoculant des aliquotes des dilutions de l’échantillon sur des monocouches fraîchement préparées de cellules HRT18G (CCL-11663) cultivées en flacon et en détectant le développement d’effets cytopathiques (ECP) lors d’une période d’incubation de 10 à 14 jours. Les cellules étaient incubées à 36,5 °C dans une atmosphère à 5 % de CO₂. Les UI exprimées en nombres NPP représentent ce qui a été récupéré sur chacun des supports utilisés lors de l’expérience.

Tableau 2. Données brutes de la culture HRT18G inoculée. Les flacons, en cinq exemplaires, ont été inoculés par différents volumes et dilutions de chaque échantillon issu de l'expérience testant l'efficacité virucide. Les résultats positifs et négatifs des effets cytopathiques (ECP) dans les flacons de culture cellulaire inoculés sont utilisés pour calculer les NPP présentés dans le Tableau 1.

Échantillon	Volume inoculé (mL) à la dilution indiquée									
	1,0 à 100	0,1 à 100	1,0 à 10-2	0,1 à 10-2	1,0 à 10-4	0,1 à 10-4	1,0 à 10-6	0,1 à 10-6	1,0 à 10-8	0,1 à 10-8
Inoculum initial	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	5/5	4/5	1/5	N.E.
Témoin négatif de l'expérience (de contrôle de la cytotoxicité)	0/5	0/5	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Témoin positif de la culture cellulaire	5/5	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Témoin négatif de la culture cellulaire	0/5	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Témoin de contrôle de la neutralisation	5/5	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Résultats issus des supports témoins	N.E.	N.E.	5/5	5/5	4/5	2/5	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	N.E.	N.E.	5/5	5/5	5/5	2/5	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
Efficacité à 30 minutes d'exposition	5/5	5/5	4/5	2/5	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	5/5	5/5	5/5	2/5	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.
	5/5	5/5	4/5	2/5	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.	N.E.

* Le nombre indiqué en numérateur est le nombre de flacons inoculés présentant des ECP positifs tandis que le nombre indiqué en dénominateur indique le nombre total de flacons inoculés par le volume et la dilution d'échantillon indiqués. N.E. : Non effectué

- Page 7 sur 7-

BCS Laboratories, Inc. - Gainesville

4609 NW 6th Street, Ste. A, Gainesville, Florida 32609 Tél. (352) 377-9272, Fax. (352) 377-5630

www.microbioservices.com

FL DOH #E82924, PA DEP 68—03950, ISO/IEC 17025:2005 L2422 (L-A-B), EPA# FL01147

Fichier : Inactivation d'un substitut de SARS-CoV-2 par 30 min de fonctionnement du système Biozone AC de BioZone Scientific BCSID 2105053

Ce document ne pourra être reproduit, excepté dans sa totalité, sans le consentement écrit de BCS Laboratories

