

Leitlinie¹ der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V.² und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin
Fassung vom 15. Juni 2005

1 Einleitung

Derzeit wird eine Europäische Norm im Bereich der Viruzidietestung erarbeitet [1]. Bis zu deren Inkrafttreten, gilt die vorliegende Leitlinie als Aktualisierung der ursprünglichen Fassung von 1982 [2]. Darin sind insbesondere der aktuelle Stand des Wissens und Gegebenheiten zur Auswahl der Testviren berücksichtigt. Durch die geplante Eradikation der Poliomyelitis [3] wird das Poliovirus nur noch begrenzte Zeit für die Viruzidietestung zur Verfügung stehen. Zur Zeit wird geprüft, welches Virus das Poliovirus ersetzen kann. Bis zum Abschluss dieser Untersuchungen wird gemäß der WHO-Entscheidung das Polio-Impfvirus anstelle des Wildvirus verwendet. Die Änderung des Adenovirus-Stammes erfolgt in Anpassung an die Europäische Norm E DIN EN 14476 [1].

Nach Fertigstellung der europäischen Norm zur Viruzidieprüfung im Bereich der Humanmedizin ist soweit erforderlich eine Prüfung der weiteren Anwendung der vorliegenden Leitlinie vorgesehen.

In dieser Leitlinie wird die Durchführung von Suspensionsversuchen beschrieben. Die Versuche zur Viruzidie sind sowohl ohne als auch mit zusätzlicher Belastung durch Eiweiß im Testansatz durchzuführen. Eine ausreichende Titerreduktion lässt den Schluss zu, dass das Mittel unter den geprüften Bedingungen die mit dieser Prüfmethode nachweisbaren viruziden Eigenschaften besitzt.

Aus den Ergebnissen von Suspensionsversuchen können Anwendungsempfehlungen für die Mittel nur in begrenztem Umfang abgeleitet werden. Derart günstige Wirkungsbedingungen, wie sie in einer homogenen Suspension herrschen, liegen in der Anwendungspraxis zumeist nicht vor. D.h. es ist zu berücksichtigen, dass der Suspensionsversuch nicht in jedem Fall praxisnah ist. Er bietet jedoch Aussagen über die Effizienz des getesteten Desinfektionsmittels und ermöglicht somit den Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Desinfektionsmittel. Verschiedene Parameter des Invitro-Tests (u.a. verwendetes Virus, verwendete Zellen, Passagenzahl, Zytotoxizität) können die Ergebnisse beeinflussen. Weiterhin bestimmen die Titrationsbedingungen (u.a. Probenverdünnungsfaktor für die Titration und Anzahl der getesteten Replikate pro Verdünnung) die Genauigkeit der Prüfung und haben damit zusammen mit den vorgenannten Parametern Einfluss auf die Aussage über die viruzide Wirksamkeit des zu testenden Desinfektionsmittels. In der vorliegenden Leitlinie finden daher biometrische Aspekte besondere Aufmerksamkeit. Damit soll sichergestellt werden, dass der ermittelte Reduktionsfaktor (s. u.) mit hoher Wahrscheinlichkeit die „wahre Wirksamkeit“ widerspiegelt.

In dieser Leitlinie werden die Begriffe "begrenzt viruzid" (wirksam gegen behüllte Viren) und "viruzid" (wirksam gegen unbehüllte Viren; die Wirksamkeit gegen unbehüllte Viren schließt eine Wirksamkeit gegen behüllte Viren ein) im Sinne der Definition der Stellungnahme des Arbeitskreises Viruzidie am RKI [4] verwendet.

¹ Die Bezeichnung „Richtlinie“ wurde aus juristischen Gründen in „Leitlinie“ geändert

² Fachausschuss „Virusdesinfektion“: Dr. J. Blümel, Prof. Dr. W. Gerlich, Prof. Dr. D. Neumann-Haefelin, Prof. Dr. H.F. Rabenau, Dr. I. Rapp, PD Dr. F. von Rheinbaben, Prof. Dr. B. Ruf, PD Dr. A. Sauerbrei, Dr. I. Schwebke, Dr. J. Steinmann, Dr. H. Willkommen, Prof. Dr. M.H. Wolff, Prof. Dr. P. Wutzler

Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass der Begriff „viruzid“ nicht alle bekannten pathogenen Viren einbezieht, da bestimmte Viren, insbesondere Hepatitis A Virus (HAV) oder Parvoviren, ggf. eine höhere Resistenz aufweisen als die eingesetzten Testviren.

Praxisnahe Prüfungen für die Hände-, Flächen- und Instrumentendesinfektion sind nicht Inhalt dieser Leitlinie; weitere Leitlinien dieses Inhaltes sind vorgesehen.

2 Testviren

Es sind folgende Viren zu verwenden:

2.1 Chemische Desinfektion

2.1.1 Wirkungsbereich „begrenzt viruzid“

- Vacciniavirus, Stamm Elstree³,
- Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Stamm NADL

2.1.2 Wirkungsbereich „viruzid“

- Vacciniavirus, Stamm Elstree,
- Polio-Impfstamm Typ I, Stamm LSc-2ab,
- Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75,
- Polyomavirus⁴ (SV 40), Stamm 777.

2.2 Chemothermische Desinfektion (Temperatur > 40°C)

- Bovines Parvovirus, Stamm Haden

Bezugsquellen für die Virusstämme bzw. Virussuspensionen sind auf der DVV-Homepage (www.dvv-ev.de - Fachausschuss „Virusdesinfektion“) angegeben. Sie können auch bei der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V., Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Hans-Knöll-Str. 2, D - 07745 Jena erfragt werden.

3 Bereitung der Virussuspensionen

Viren sind in Zellkulturen oder anderen geeigneten Systemen zu vermehren. Die Methoden, die zur Herstellung der Virussuspension eingesetzt werden, können in Abhängigkeit vom Testvirus differieren. Der Gehalt der Suspensionen an Viren sollte nicht weniger als 10^8 TCID₅₀/ml betragen.

Dies kann u.a. wie folgt gewährleistet werden: Die mit dem Virus infizierten Kulturen können mit dem gesamten Medium und Zelldetritus mindestens einmalig eingefroren und aufgetaut werden. Abweichend hiervon wird bei Zellkulturen, in denen Adenovirus vermehrt wird, vor dem Einfrieren und Auftauen das Anzuchtmedium abgegossen und die Kultur mit neuem Medium in 1/10 des ursprünglichen Volumens beschickt.

Die Virussuspensionen können, z.B. nach vorangegangener niedertouriger Zentrifugation, für 60 Min. bei 40.000 x g und +4° C zentrifugiert werden, so dass sich die Viren im Bodensatz anreichern. Das Sediment wird in PBS (Phosphate Buffered Saline) aufgenommen und zur Entfernung von Zelldetritus erneut niedertourig zentrifugiert. Alternativ kann ggf. auch eine Ultraschallbehandlung von virusinfizierten Zellen für die Präparation hochtitriger Virussuspensionen angewendet werden.

Der Virustiter darf auch niedriger als 10^8 TCID₅₀/ml sein, wenn gewährleistet ist, dass eine Titerreduktion von 4 log₁₀-Stufen bei der Desinfektionsmittelprüfung abgelesen werden kann.

³ Beschäftigte, die Versuche mit diesem Virus durchführen, sollten entsprechend geimpft sein

⁴ alte Bezeichnung: Papovavirus SV40

4 Bereitung der Desinfektionsmittel-Verdünnung

Das zu prüfende Desinfektionsmittel wird mit Wasser standardisierter Härte (s. Anhang 3) verdünnt. Die Verdünnung ist so zu wählen, dass die zu prüfende Konzentration des Desinfektionsmittels im Gemisch von Virussuspension und Desinfektionsmittel (Versuchsansatz) vorliegt. Die für die Durchführung dieser Versuche verwendeten Desinfektionsmittel-Verdünnungen müssen daher um das 1,25-fache konzentrierter sein als die zu prüfende Konzentration (siehe Pkt. 5). Für Präparate, die unverdünnt angewendet werden bzw. in gebrauchsfertiger Form in den Handel kommen sollen, hat dies zur Folge, dass keine höheren Konzentrationen als 80 % geprüft werden können. Bei unverdünnt anzuwendenden Desinfektionsmitteln dürfen keine aufkonzentrierten Zubereitungen geprüft werden.

5 Durchführung der Suspensionsversuche

Virussuspension, fetales Kälberserum (FKS)⁵, Aqua bidest. und die Desinfektionsmittel-Verdünnung werden auf 20° C temperiert. Ein Teil der Virussuspension wird mit einem Teil FKS bzw. Aqua bidest. gemischt; sodann werden acht Teile der Desinfektionsmittel-Verdünnung (1,25-fach) hinzugegeben und vermischt. Das Gemisch wird für die Dauer der zu prüfenden Einwirkzeit bei 20° ± 0,5° C gehalten.

Sollen Desinfektionsmittel bei Temperaturen unter 20°C angewendet werden, so müssen die Prüfungen bei den entsprechenden Temperaturen (z.B. 4°C) durchgeführt werden. Chemothermische Verfahren im Bereich höher als 40°C sind ausschließlich mit Parvoviren bei den vom Hersteller vorgegebenen Temperaturen zu prüfen.

Entsprechend dem Anwendungsbereich sind in der Regel 4 Einwirkzeiten des Mittels zu prüfen:

entweder 0,5; 1; 2,5; 5 (ggf. 1,5; 2) Minuten
oder 5; 15; 30 und 60 Minuten.

Mittel, die in der Desinfektionspraxis mit kurzen Einwirkzeiten zur Anwendung kommen sollen (z. B. Händedesinfektionsmittel) sind vornehmlich mit kurzen Einwirkzeiten zu prüfen. Bei Mitteln, für die in der Desinfektionspraxis lange Einwirkzeiten vorgesehen sind, kann gegebenenfalls die Prüfung kurzer Einwirkzeiten entfallen. Die Konzentrationen und Einwirkzeiten des Desinfektionsmittels sind so zu wählen, dass aus dem Prüfergebnis die Abhängigkeit der viruziden Wirkung des Mittels von der Konzentration bzw. der Einwirkdauer ersichtlich ist (Kinetik).

Die Wirksamkeit der Desinfektionsmittel ist sowohl ohne als auch mit FKS-Belastung (10% Endkonzentration im Versuchsansatz) zu prüfen. Die Viruskontrollansätze müssen die gleichen FKS-Konzentrationen enthalten wie die Prüfansätze.

Alle Versuche sind mindestens in zwei unabhängigen Ansätzen durchzuführen.

6 Bestimmung der Infektiosität der Virussuspensionen

Als Methodik kommen quantale Teste (Endverdünnungsmethode) oder quantitative Teste (Plaquetest) in Frage. Zu den zu prüfenden Einwirkzeiten ist von dem Gemisch aus Virussuspension und Desinfektionsmittel eine Verdünnungsreihe in eiskaltem Kulturmedium anzulegen (z. B. 0,5 ml Gemisch zu 4,5 ml Medium; möglichst keine kleineren Mengen - bei Abweichung von dieser Vorgabe ist eine Begründung anzugeben). Die Röhrchen der Verdünnungsreihe sind unmittelbar nach der Verdünnung in ein Eisbad (0 - 4° C) zu stellen. Die Verdünnungen sind sofort (unter

⁵ Für Prüfungen mit dem Testvirus BVDV bzw. Parvovirus ist FKS zu verwenden, das weder Antikörper gegen BVDV bzw. Parvovirus noch diese Viren selbst enthält.

Angabe des Zeitfaktors im Versuchsprotokoll) auf Zellkulturen zu verimpfen. Dabei ist eine mögliche Nachwirkung des Desinfektionsmittels auszuschließen (siehe 7.3). Wenn erforderlich, kann die Wirkung des Desinfektionsmittels durch Gelfiltration, Mikrofiltration oder chemische Neutralisation aufgehoben werden. Das gewählte Verfahren ist detailliert zu beschreiben und durch entsprechende Kontrollen ist nachzuweisen, dass es den Virusnachweis (Titer) nicht beeinträchtigt. Die Infektiosität der Versuchsansätze kann in Makro- oder Mikrotests bestimmt werden. Als Infektiositätsparameter kann der zytopathische Effekt in der Endverdünnungsmethode oder die Plaquebildung bestimmt werden.

7 Kontroll- und Vergleichsversuche

7.1 Viruskontrollen

Als Viruskontrolle wird der Titer der nicht mit Desinfektionsmittel behandelten Virussuspension unter Prüfbedingungen ohne bzw. mit FKS-Belastung bestimmt.

7.1.1 Viruskontrolle ohne Belastung

Hierzu wird ein Teil Virussuspension mit neun Teilen Aqua bidest. gemischt. Nach Ablauf der maximalen Einwirkzeit sind Verdünnungsreihen anzulegen und der Titer zu bestimmen.

7.1.2 Viruskontrolle mit Belastung

Hierzu wird ein Teil der Virussuspension mit einem Teil FKS und acht Teilen Aqua bidest. gemischt. Nach Ablauf der maximalen Einwirkzeit sind Verdünnungsreihen anzulegen und der Titer zu bestimmen.

7.2 Zytotoxizitätskontrolle

Die nachfolgend beschriebene Zytotoxizitätskontrolle des Desinfektionsmittels dient dazu, virusbedingte zytopathische Veränderungen von zelltoxischen Effekten abzugrenzen:

Hierzu werden zwei Teile Aqua bidest. mit acht Teilen der Desinfektionsmittelverdünnung gemischt. Wie bei der Bestimmung der Virusinfektiosität werden hiervon Verdünnungsreihen angelegt, mit denen die Zellkulturen inokuliert werden.

Sollte die Zytotoxizität des Desinfektionsmittels so stark sein, dass eine Abnahme des Infektiositätstiters um $4 \log_{10}$ nicht erfassbar ist, kann durch geeignete Methoden nach Ablauf der Einwirkzeit versucht werden, die Zytotoxizität zu vermindern (z.B. mittels Gelfiltration, Mikrofiltration oder geeigneten chemischen Neutralisationsmitteln). Das gewählte Verfahren ist detailliert zu beschreiben und durch entsprechende Kontrollen ist nachzuweisen, dass es den Virusnachweis (Titer) nicht beeinträchtigt.

7.3 Nachwirkungskontrolle

Kontrollen zur Nachwirkung sind dann durchzuführen, wenn insbesondere bei kurzen Einwirkzeiten eine methodisch bedingte unkontrollierte Nachwirkung des Desinfektionsmittels über die Einwirkzeit hinaus nicht ausgeschlossen werden kann. In der Regel sollte der zeitliche Abstand nach Ablauf der Einwirkzeit bis zum Ansatz der Verdünnungsreihe für die Titration nicht größer als 15-30 Sekunden sein. Es wird ein Teil Virussuspension mit einem Teil FKS bzw. Aqua bidest. gemischt; sodann werden acht Teile einer geeigneten Desinfektionsmittel-Verdünnung hinzugegeben, vermischt und für die Zeitphase zwischen Beendigung der Einwirkzeit des Desinfektionsmittels und Ansatz der Verdünnungsreihe zur Titration im Eisbad

inkubiert. Anschließend werden Verdünnungsreihen angelegt, um eine Titerbestimmung vorzunehmen. Zur Ermittlung der Desinfektionsmittel-Verdünnung, die keine Nachwirkung mehr zeigt, sind in der Regel die ersten beiden Verdünnungsstufen des Desinfektionsmittels einzusetzen. Von einer vernachlässigbaren oder nicht vorhandenen Nachwirkung des Desinfektionsmittels kann ausgegangen werden, wenn die Differenz des Titers im Vergleich zur Viruskontrolle $\leq 0.5 \log_{10}$ beträgt.

Werden andere Verfahren als das unter 6 beschriebene Verdünnungsverfahren zur Verringerung der Zytotoxizität (siehe Pkt. 7.2) oder zur Aufhebung der Desinfektionsmittelwirkung (z.B. Gelfiltration, Mikrofiltration oder chemische Neutralisation) angewendet, sind diese analog zu prüfen.

7.4 Interferenzkontrolle - Kontrolle der Zellsuszeptibilität

Mit der Interferenzkontrolle soll nachgewiesen werden, dass die Suszeptibilität der Zellen für die Virusinfektion durch die Behandlung mit dem Desinfektionsmittel nicht negativ beeinflusst wird.

Es werden zwei Teile Aqua bidest. bzw. ein Teil FKS und ein Teil Aqua bidest. mit acht Teilen Desinfektionsmittel in der Verdünnung, die keine Nachwirkung (siehe Pkt. 7.3) oder Zytotoxizität (siehe Pkt. 7.2) zeigt, versetzt. Diese Mischungen werden für eine Stunde analog der Art der Bestimmung der Infektiosität der Virussuspensionen (siehe Pkt. 6 und Anhang 1) mit der Zellkultur in Kontakt gebracht. Nach der Einwirkzeit wird die Desinfektionsmittellösung von der Zellkultur entfernt. Anschließend werden Verdünnungsreihen der Virussuspension (unter Berücksichtigung des für die Ermittlung der Infektiosität nach der Desinfektionsmitteleinwirkung verwendeten Verdünnungsfaktors) angelegt und der Titer auf dieser Zellkultur bestimmt. Die Differenz des hiermit ermittelten Titers im Vergleich zur Viruskontrolle (siehe Pkt. 7.1.1 bzw. Pkt. 7.1.2) sollte nicht mehr als $0.5 \log_{10}$ betragen.

7.5 Zellkontrolle

Die Zellen werden wie im Versuchsansatz behandelt jedoch nur mit Zellkulturmedium versehen.

7.6 Formaldehydkontrolle

Zusätzlich zu jedem Versuchs- bzw. Prüfansatz ist ein Vergleichsversuch mit Formaldehyd bei pH 7,0 ohne Serumbelastung bei $20^\circ \pm 0,5^\circ \text{C}$ durchzuführen. Die Konzentration soll (im Versuchsansatz) $0,7 \text{ g Formaldehyd}/100 \text{ ml}$ betragen, die Einwirkzeit 5, 15, 30 und 60 Minuten (für Poliovirus auch 120 Minuten; eine Einwirkzeit von 5 Minuten kann dann entfallen). Für diesen Versuchsansatz werden ein Teil Virussuspension mit 4 Teilen Phosphatpuffer (0,1 M; pH 7,0) und 5 Teilen einer 1,4%igen Formaldehydlösung gemischt (siehe Anhang 2).

Die Differenz des Titers der Viruskontrolle (siehe Pkt. 7.1.1 bzw. Pkt. 7.1.2) und des Titers der Formaldehydkontrolle soll bei Polioviren bei einer Einwirkzeit von 30 Minuten 0.5 bis $2.5 \log_{10}$ und bei einer Einwirkzeit von 60 Minuten 2 bis $4.5 \log_{10}$ betragen [1].

8 Berechnung des Reduktionsfaktors

Die Beurteilung der Wirksamkeit der Desinfektionsmittel-Verdünnung erfolgt durch die Ermittlung des Reduktionsfaktors. Der Reduktionsfaktor ist die Differenz aus dem

ohne Einwirkung des Desinfektionsmittels erhaltenen Infektiositätstiter (\log_{10} TCID₅₀/ml bzw. \log_{10} Plaque bildende Einheiten(PFU)/ml der Viruskontrollen (siehe Pkt. 7.1.1 bzw. Pkt. 7.1.2), und dem nach Einwirkung des Desinfektionsmittels erhaltenen Infektiositätstiter (siehe Pkt. 6). Die Titer sind mit ihrem 95% Konfidenzintervall zu ermitteln und daraus der Reduktionsfaktor mit dem 95% Konfidenzintervall zu berechnen (siehe Anhang 6).

9 Untersuchungsbericht

Die Versuchsergebnisse sind tabellarisch und ggf. graphisch, einschließlich der im Formaldehydvergleichsversuch erhobenen Befunde, zusammenzustellen. Der Untersuchungsbericht muss die Chargenbezeichnung des zu prüfenden Mittels, die wirksamen Bestandteile des Desinfektionsmittels sowie detaillierte Angaben über die Prüfmethodik, die Ergebnisse (ermittelte Reduktionsfaktoren mit 95%-Konfidenzintervall) und eine Wertung des Befundes enthalten (siehe Anhang 4 und 5). Im Suspensionsversuch gelten diejenigen Konzentrationen eines Desinfektionsmittels als wirksam gegen Viren, die bei der jeweiligen Einwirkungsdauer den Titer an infektiösen Viren um mindestens 4 Zehnerpotenzen herabsetzen (Reduktionsfaktor von $\geq 4 \log_{10}$).

Literatur

- 1 E DIN EN 14476 (2002-07): Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch Viruzidie für in der Humanmedizin verwendete Desinfektionsmittel und Antiseptika - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1) Beuth-Verlag, Berlin, Wien, Zürich
- 2 Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren. Bundesgesundheitsbl 25: (1982) 397-398
- 3 WHO/V&B/03.11 www.who.int
- 4 Prüfung und Deklaration der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren. Stellungnahme des Arbeitskreises Viruzidie am RKI Bundesgesundheitsbl 47: (2004) 62-66
- 5 Spearman, C. (1908). The method of "right and wrong cases" ("constantstimuli") without Gauss's formulae. British Journal of Psychology 2: 227-242.
- 6 Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche [A contribution to the collective treatment of a pharmacological experimental series]. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie 162: 480-483
- 7 Bekanntmachung über die Zulassung von Arzneimitteln, Anforderungen an Validierungsstudien zum Nachweis der Virussicherheit von Arzneimitteln aus menschlichem Blut oder Plasma vom 20. Dezember 1993/21. Januar 1994. Bundesanzeiger Nr. 84 4740-4744

*Verfasser: Fachausschuss „Virusdesinfektion“ der DVV,
korrespondierende Autoren:
Prof H.F. Rabenau, Institut für Med. Virologie, Paul-Ehrlich-Str. 40,
60596 Frankfurt/M
Dr. I. Schwabke, Robert Koch-Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin*

Anhang 1

Hinweise zur Durchführung des Infektiositätstests

Die Prüfung der Infektiosität der Suspensionen und ihrer Verdünnungen kann als (Mikrotiter)Platten-, bzw. Röhrchentest zur Bestimmung der TCID₅₀ oder im Plaquetest erfolgen.

a) (Mikrotiter)Platten-Test

Beispiel: In die Vertiefungen der (Mikrotiter)Platte werden 0,05-0,2 ml der jeweiligen Verdünnungsstufe appliziert. Diese kann entweder auf bereits angewachsene Zellen aufgebracht oder zu 0,05-0,2 ml Zellsuspension hinzugefügt werden. Werden bereits angewachsene Zellkulturen verwendet, ist nach einer Adsorptionsdauer von 1-2 h das Medium zu wechseln. Die Kulturen werden bei 37°C bebrütet (in der Regel 5-15 Tage) und anschließend mikroskopisch auf zytopathische Effekte geprüft. Die Infektiosität der Proben wird als TCID₅₀/ml angegeben.

b) Röhrchentest

Beispiel: Konfluierende einschichtige Zellrasen in Kulturröhrchen werden mit 0,2 ml der Verdünnungsstufen beimpft. Nach einer Adsorptionsdauer von 1-2 h bei 37°C wird das Kulturmedium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die Kulturen werden bei 37°C bebrütet (in der Regel 5-15 Tage) und anschließend mikroskopisch auf zytopathische Effekte geprüft. Die Infektiosität der Proben wird als TCID₅₀/ml angegeben.

c) Plaquetest

Beispiel: Konfluierende Zellrasen in 24-Well-Zellkulturplatten werden mit 0,5-1 ml der Verdünnungsstufen beimpft. Nach einer Adsorption von 1-2 h bei 37°C werden die Inokula entfernt und die Zellrasen mit Medium gespült. Danach wird der Zellrasen mit 1 ml Overlay überschichtet und die Kultur in einem CO₂-Brutschrank über 3-7 Tage bebrütet. (Das Overlay besteht aus Agar, der in einer Endkonzentration von 2% in Aqua bidest. aufgenommen wird. Nach Abkühlung erfolgt die Zugabe der gleichen Menge an doppelt konzentriertem Zellkulturmedium, das zuvor auf ca. 40°C erwärmt wurde.) Anschließend erfolgt eine Fixierung und Färbung mit 0,3% Kristallviolett in 3% Formalin. Nach 2-3 h kann das Overlay mit Leitungswasser abgespült und der Zellrasen mit Aqua dest. nachgespült werden. Die Plaques werden unter einem Mikroskop ausgezählt. Die Infektiosität der Proben wird als PFU/ml angegeben.

Anhang 2

Quantitative Bestimmung von Formaldehyd

Der Formaldehydgehalt der im Handel befindlichen konzentrierten Formaldehydlösungen ist in der Regel unterschiedlich und kann auch von den Lagerungsbedingungen abhängig sein. Es ist daher unumgänglich, den Formaldehydgehalt der für den Vergleichsversuch verwendeten Formaldehydlösung bzw. deren Verdünnung quantitativ zu bestimmen. Es ist dabei zu berücksichtigen, dass Formaldehydlösungen, die aus konzentrierten Formaldehydlösungen (z. B. Formalin) bereitet wurden, Polymere enthalten und bei Raumtemperatur erst nach einigen Tagen die maximale, dem Gehalt an Formaldehyd entsprechende Wirksamkeit besitzen.

Quantitative Bestimmung von Formaldehyd zum Beispiel mit Hydroxylammoniumchlorid:

Das Prinzip der Methode ist folgendes:

Formaldehyd reagiert mit Hydroxylammoniumchlorid unter Bildung des entsprechenden Oxims. Hierbei wird eine äquivalente Menge von Wasserstoffionen frei, die den pH-Wert des Reaktionsansatzes in den sauren Bereich verschieben:



Der pH-Wert des Ansatzes wird mit Natronlauge auf den anfänglichen pH-Wert zurücktitriert. Aus der verbrauchten Menge an Natronlauge wird der Gehalt der Probe an Formaldehyd errechnet.

Durchführung der Bestimmung:

Von der zu untersuchenden Probe wird eine Menge, die 100 bis 150 mg Formaldehyd enthält, in eine für die Titration am pH-Meter geeignete Vorlage pipettiert und mit Aqua dest. auf ca. 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wird am pH-Meter mit ca. 0,5 N Salzsäure auf genau pH 3,0 eingestellt. 25 ml einer zuvor bereits auf pH 3,0 eingestellten ca. 0,5 N Hydroxylammoniumchloridlösung werden hinzupipettiert und die Mischung 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wird am pH-Meter mit 0,5 N Natronlauge wieder auf pH 3,0 zurücktitriert.

Berechnung des Formaldehydgehaltes der Probe:

$$\frac{\text{Verbrauchte Menge an 0,5 N NaOH in ml} \times 30,03}{\text{Volumen der Probe in ml} \times 20} = \text{Gehalt der Probe an Formaldehyd in g in 100 ml.}$$

Anhang 3

Herstellung von Wasser standardisierter Härte

Für die Herstellung werden 2 Lösungen benötigt:

Lösung A:

19,84 g wasserfreies Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g wasserfreies Kalziumchlorid (CaCl_2) werden in Aqua bidest. gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt (es können auch äquivalente Mengen wasserhaltiger Salze verwendet werden). Die Lösung wird im Dampfsterilisator sterilisiert. Sie kann bei 2°C bis 8°C bis zu einem Monat aufbewahrt werden.

Lösung B:

35,02 g Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO_3) werden in Aqua bidest. gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration sterilisiert. Sie kann bei 2°C bis 8°C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

Für die Herstellung von 1 Liter Wasser standardisierter Härte werden in einen sterilisierten 1000 ml-Messkolben mindestens 600 ml steriles Aqua bidest. gegeben. Dazu werden 6,0 ml Lösung A und 8,0 ml Lösung B gegeben und nach dem Durchmischen mit Aqua bidest. zu 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert dieser Lösung muss 7,0 + 0,2 betragen. Falls erforderlich ist der pH-Wert mit 1 N Natriumhydroxid (NaOH) bzw. 1 N Salzsäure (HCl) einzustellen. Wasser standardisierter Härte ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 24 h zu verbrauchen.

Die Härte muss 300 ppm, berechnet auf Kalziumkarbonat, betragen.

Anhang 4

Tabellarische und graphische Darstellung der Prüfungsergebnisse

- a) Beispiel für die tabellarische Darstellung der Prüfungsergebnisse
(Angaben zur Zytotoxizität des Desinfektionsmittels und zur maximal nachweisbaren Abnahme des Infektiositätstiters)

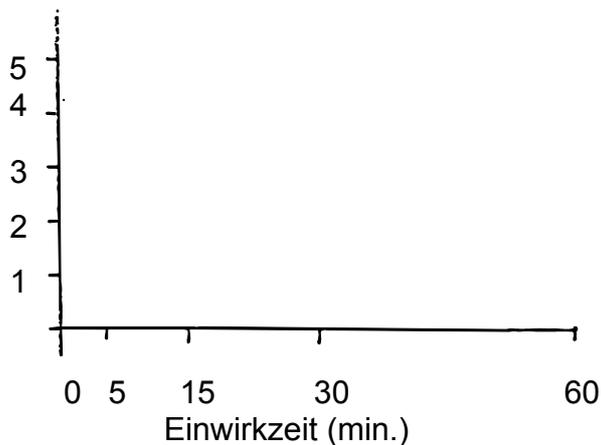
Testvirus	Konzentration des Desinfektionsmittels im Ansatz (%)	Virus-titer der Kontroll-Titration (\log_{10} TCID ₅₀ /ml bzw. \log_{10} PFU/ml) einschließlich 95% Konfidenzintervall	Virus-titer der „Restvirus“-Titration (\log_{10} TCID ₅₀ /ml bzw. \log_{10} PFU/ml) einschließlich 95% Konfidenzintervall				Reduktionsfaktor nach ... (min) einschließlich 95% Konfidenzintervall						
			1.EWZ ¹	2.EWZ	3.EWZ	4.EWZ	1. EWZ	2. EWZ	3. EWZ.	4. EWZ			

¹ EWZ = Einwirkzeit

- b) Beispiele für die graphische Darstellung der Prüfungsergebnisse

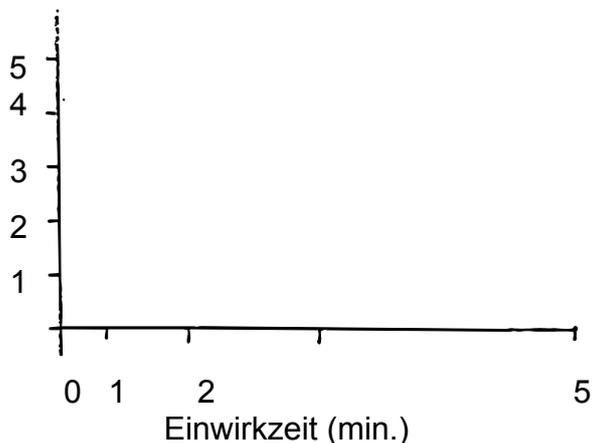
Infektiositätstiter

(\log_{10} TCID₅₀/ml
bzw.
 \log_{10} PFU/ml)



Infektiositätstiter

(\log_{10} TCID₅₀/ml
bzw.
 \log_{10} PFU/ml)



Anhang 5

Hinweise zur Abfassung von Gutachten über Desinfektionsmittelprüfungen

- In der Einleitung sollte kurz berichtet werden, für welchen Anwendungsbereich (z.B. Hände-, Flächen-, Instrumenten- bzw. Wäschedesinfektion) das Mittel eingesetzt werden soll. Insbesondere muss angegeben werden, unter welchen Bedingungen das Mittel anzuwenden ist und warum das Mittel für wirksam gehalten wird (z. B. anhand von Literaturzitate).
- Die Wirksubstanzen, die vorgesehenen Arbeitskonzentrationen und die Identität der Prüfprobe müssen vollständig genannt werden.
- Das Desinfektionsmittel ist genau zu beschreiben: Chargen-Nr., Herstellungsdatum, Verfallsdatum, physikalische Eigenschaften, Farbe, pH-Wert (der pH-Wert der Prüflösungen im Prüfmuster und in der Gebrauchsverdünnung mit Aqua bidest. soll gemessen werden. Dies gilt nicht für alkoholische Lösungen >60%).
- Die Herkunft, Präparation und Passagegeschichte des Prüfvirus sowie der verwendeten Zelllinien sollen beschrieben werden.
- Die Methodik für die Prüfungen und die Kontrollversuche muss exakt beschrieben werden. Ein Verweis auf die Leitlinie ist nicht ausreichend. Insbesondere ist die Herstellung und ggf. die Art der Aufkonzentrierung der Testvirussuspension genau zu beschreiben.
- Die Ergebnisse aller Versuche müssen tabellarisch als Rohdaten und als berechnete TCID₅₀- bzw. PFU-Werte, einschließlich der 95% Konfidenzintervalle angegeben werden. Die Methode der Titerberechnung muss ebenfalls genannt werden. Hierzu eignet sich z.B. die Methode nach Spearman und Kärber [5, 6] (siehe Anhang 6). Die statistische Auswertung und die Bestimmung des 95% Konfidenzintervalls des Reduktionsfaktors (RF) ist nach den Vorgaben in Anhang 6 durchzuführen.

Anhang 6

Biometrische Auswertung der Versuchsansätze und Beurteilung der virusdesinfizierenden Wirkung (Reduktionsfaktor [RF]):

Für die Bewertung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln ist der Virustiter vor und nach Einwirkung des Desinfektionsmittels zu bestimmen und aus der Differenz der Reduktionsfaktor (RF) einschließlich dessen 95% Konfidenzintervall zu ermitteln. Die Virustitrationen sind so durchzuführen, dass der Virustiter ein 95% Konfidenzintervall von $\leq 0.5 \log_{10}$ aufweist. Die Anzahl der Replikate pro Verdünnung (z.B. 8, 12 oder 16) und der Verdünnungsfaktor in der Verdünnungsreihe (z.B. 3, 5 oder 10), die für die Titration verwendet wird, sind entsprechend festzulegen. Alle Versuche sind in zwei unabhängigen Ansätzen durchzuführen.

Von einer ausreichenden, Desinfektionsmittel-bedingten Titerreduktion ist auszugehen, wenn der mittlere RF (s.u.) mindestens $4 \log_{10}$ beträgt. Die Ergebnisse dürfen nicht durch zytotoxische Einflüsse, Interferenzen oder Nachwirkung des Desinfektionsmittels beeinträchtigt sein.

Der Virustiter (TCID₅₀/ml oder PFU/ml) kann auf verschiedene Weise ermittelt werden, u.a. nach der Gleichung von Spearman und Kärber [5,6]

A 6.1 Berechnung des Virustiters mit dem 95% Konfidenzintervall

Beispiel:

Die Berechnung des logarithmischen Infektionstiters nach Spearman und Kärber in TCID₅₀/ml erfolgt nach:

$$m = x_k + d/2 - d \sum p_i$$

Dabei ist:

m = Logarithmus des Titers bezogen auf das Testvolumen

X_k = Logarithmus der kleinsten Dosis (Verdünnungsstufe) bei der alle Testobjekte positiv reagieren

d = Logarithmus des Verdünnungsfaktors

p_i = beobachtete Reaktionsrate

Die Standardabweichung (s) von m errechnet sich nach [7]:

$$S_m = \sqrt{d^2 \sum \{(p_i (1 - p_i) / (n - 1))\}}$$

Dabei ist

s_m = Standardabweichung des logarithmierten Titers

d = Logarithmus des Verdünnungsfaktors

p_i = beobachtete Reaktionsrate

n = die Anzahl der pro Verdünnung eingesetzten Testobjekte

Das 95% Konfidenzintervall des Titers entspricht näherungsweise 2 s_m. Bei der Titerberechnung muss die Vorverdünnung der Probe berücksichtigt und auf das gleiche Volumen bezogen werden.

A 6.2 Berechnung des Reduktionsfaktors und seines 95% Konfidenzintervalls

Der Reduktionsfaktor (RF) wird errechnet als Differenz des logarithmierten Virustiters vor („Kontroll-Titration“ siehe Pkt. 7.1.1 und Pkt. 7.1.2, = Titer a) und nach Einwirkung des Desinfektionsmittels („Restvirus“, s. Pkt. 6, Titer = b) .

Der Reduktionsfaktor (RF) berechnet sich demnach aus:

$$RF_{T1} = a - b$$

Dabei ist:

RF_{T1} = Reduktionsfaktor des ersten Versuchsansatzes

a = log₁₀ TCID₅₀/ml der Kontroll-Titration des ersten Versuchsansatzes

b = log₁₀ TCID₅₀/ml der Restvirus-Titration des ersten Versuchsansatzes

Das 95% Konfidenzintervall des RF des ersten Ansatzes ($K_{RF(T1)}$) berechnet sich nach:

$$K_{RF(T1)} = \sqrt{(2 s_a)^2 + (2 s_b)^2}$$

Dabei ist:

$K_{RF(T1)}$ = 95% Konfidenzintervall des RF des ersten Versuchsansatzes

s_a = Standardabweichung der Kontroll-Titration des ersten Versuchsansatzes

$2s_a$ = 95% Konfidenzintervall der Kontroll-Titration des ersten Versuchsansatzes

s_b = Standardabweichung der Restvirus-Titration des ersten Versuchsansatzes

$2s_b$ = 95% Konfidenzintervall der Restvirus-Titration des ersten Versuchsansatzes

Alle Versuche sind in zwei unabhängigen Ansätzen durchzuführen. Für jeden Ansatz ist der Reduktionsfaktor und das 95% Konfidenzintervall zu berechnen.

Sofern im Testansatz mit Desinfektionsmittel („Restvirus“) kein Virus mehr nachweisbar ist, wird das 95% Konfidenzintervall ermittelt durch:

$$K_{RF(T1)} = \sqrt{2 (K_{RF(T1)})^2}$$

A 6.3 Berechnung des mittleren Reduktionsfaktors ($RF_{(mi)}$) und seines 95% Konfidenzintervalls

Der mittlere RF aus beiden Ansätzen und sein 95% Konfidenzintervall wird wie folgt berechnet:

$$RF_{(mi)} = (RF_{T1} + RF_{T2}) / 2$$

Dabei ist:

$RF_{(mi)}$ = mittlerer Reduktionsfaktor

RF_{T1} = Reduktionsfaktor des ersten Versuchsansatzes

RF_{T2} = Reduktionsfaktor des zweiten Versuchsansatzes

Das 95% Konfidenzintervall des mittleren RF ($K_{RF(mi)}$) berechnet sich aus:

$$K_{RF(mi)} = 1/2 \sqrt{(K_{RF(T1)})^2 + (K_{RF(T2)})^2}$$

Dabei ist:

$K_{RF(mi)}$ = 95% Konfidenzintervall des mittleren Reduktionsfaktors

$K_{RF(T1)}$ = 95% Konfidenzintervall des Reduktionsfaktors des ersten Versuchsansatzes

$K_{RF(T2)}$ = 95% Konfidenzintervall des Reduktionsfaktors des zweiten Versuchsansatzes

A 6.4. Beispielrechnung

Titerberechnung der Kontroll-Titration des ersten Versuchsansatzes (T1):

Tabelle 2: Beispielwerte für ein Versuchsergebnis

Verdünnung	\log_{10}	Anzahl der positiven Kulturen pro Verdünnung	p_i
1: 10	1	16/16	1,0
1: 100	2	16/16	1,0
1: 1.000	3	16/16	1,0
1: 10.000	4	16/16	1,0
1: 100.000	5	16/16	1,0
1: 1.000.000	6	16/16	1,0
1:10.000.000	7	12/16	0,75
1:100.000.000	8	8/16	0,50
1:1.000.000.000	9	2/16	0,13
1:10.000.000.000	10	0/16	0

Ausgangsparameter: 100 µl Inokulum pro Vertiefung, 16 Replikate pro Verdünnungsstufe und eine \log_{10} -Verdünnungsreihe.
Eine ähnliche Genauigkeit wird erreicht bei Verwendung einer 1:3-er Verdünnungsreihe und Testung von 8 Replikaten pro Verdünnung.

Aus den in Tabelle 2 angegebenen Zahlenwerten errechnet sich der Titer (siehe Pkt. A 6.1):

$$m = - 6 + 1/2 - 1 \times 2.38 = 7.88$$

Unter Berücksichtigung des eingesetzten Testvolumens beträgt der Titer 8.88 \log_{10} TCID₅₀/ml.

Die Standardabweichung und das 95% Konfidenzintervall des Titers wird aus den gegebenen Werten wie folgt berechnet (vgl. Pkt. A 6.1):

$$S_m = \sqrt{1^2 \sum \{(p_i (1 - p_i) / (16 - 1))\}}$$

Da $p_1 = 1$, $p_2 = 0,75$, $p_3 = 0,5$ und $p_4 = 0,13$ und n in allen Verdünnungen 16 ist, ist

$$P_1 (1 - p_1) / (n_1 - 1) = 0$$

$$p_2 (1 - p_2) / (n_2 - 1) = 0,75 (1 - 0,75) / (16 - 1) = 0,0125$$

$$p_3 (1 - p_3) / (n_3 - 1) = 0,50 (1 - 0,50) / (16 - 1) = 0,0167$$

$$p_4 (1 - p_4) / (n_4 - 1) = 0,13 (1 - 0,13) / (16 - 1) = 0,0075$$

$$s_m = \sqrt{1 (0,0125 + 0,0167 + 0,0075)}$$

$$s_m = 0.19, \text{ d.h. } 2s_m = 0.38$$

Der Titer der Kontroll-Titration beträgt somit $8.88 \pm 0.38 \log_{10}$ TCID₅₀/ml.

Bei analoger Berechnung des Restvirus-Titers des ersten Versuchsansatzes ergibt sich für diesen ein Beispielwert von $3.50 \pm 0.32 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$.

Der Reduktionsfaktor (RF) berechnet sich aus (vgl. Pkt. A 6.2):

$$\text{RF}_{T1} = 8.88 - 3.50$$

Der RF des ersten Versuchsansatzes beträgt $5.38 \log_{10}$.

Das 95% Konfidenzintervall des RF ($K_{\text{RF}(T1)}$) berechnet sich nach (vgl. Pkt. A 6.2):

$$K_{\text{RF}(T1)} = \sqrt{(2 \times 0.19)^2 + (2 \times 0.16)^2} = 0.50$$

Der Reduktionsfaktor des ersten Versuchsansatzes beträgt somit $5.38 \pm 0.50 \log_{10}$.

Unter der Annahme, dass unter analogen Rahmenbedingungen im zweiten Versuchsansatz die Titer der Kontroll-Titration und der Restvirus-Titration $8.25 \pm 0.22 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ und $3.25 \pm 0.34 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ betragen, ergibt sich für RF_{T2} einschließlich 95% Konfidenzintervall ein Wert von 5.0 ± 0.40 .

Der mittlere RF aus beiden Ansätzen einschließlich 95% Konfidenzintervall wird berechnet nach (vgl. Pkt. A 6.3):

$$\text{RF}_{(mi)} = (5.38 + 5.0) / 2 = 5.19$$

Das 95% Konfidenzintervall des mittleren RF ($K_{\text{RF}(mi)}$) wird ermittelt nach (vgl. Pkt. A 6.3):

$$K_{\text{RF}(mi)} = 1/2 \sqrt{(0.50)^2 + (0.40)^2} = 0.32$$

Somit beträgt der Gesamt-RF aus beiden Versuchsansätzen (mit 95%-Konfidenzintervall) bei den gegebenen exemplarischen Werten $5.19 \pm 0.32 \log_{10}$.

Die Einzeltitrationen erfüllen hinsichtlich Genauigkeit die Anforderung der Leitlinie, da die 95%-Konfidenzintervalle der errechneten Titer $\leq 0.5 \log_{10}$ betragen.