

Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektions- mitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin

Fassung vom 1. Dezember 2014

1 Einleitung

In dieser Leitlinie wird die Durchführung von Suspensionsversuchen zum Nachweis der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren beschrieben. Diese Versuche sind sowohl ohne als auch mit zusätzlicher Belastung durch foetales Kälberserum (FKS) im Testansatz durchzuführen. Eine Titerreduktion von mindestens 4 logarithmischen Stufen ($4 \log_{10}$) lässt den Schluss zu, dass das Mittel unter den geprüften Bedingungen viruzide Eigenschaften besitzt.

Verschiedene Parameter des *in-vitro* Tests können die Ergebnisse beeinflussen (u. a. Virus, Zellen, Passagenzahl, Zytotoxizität). Weiterhin bestimmen die Titrationsbedingungen zur Bestimmung der Viruskonzentration (u. a. Probenverdünnungsfaktor und Anzahl der getesteten Replikate pro Verdünnung) die Genauigkeit der Prüfung und haben damit ebenfalls Einfluss auf die Aussage über die viruzide Wirksamkeit des zu testenden Desinfektionsmittels. In der vorliegenden Leitlinie finden daher biometrische Aspekte besondere Aufmerksamkeit.

Aus den Ergebnissen dieser Suspensionsversuche können Anwendungsempfehlungen für die Mittel allerdings nur in begrenztem Umfang abgeleitet werden, da die Wirkungsbedingungen, wie sie in einer homogenen Suspension herrschen, in der Anwendungspraxis zumeist nicht vorliegen. Der Suspensionsversuch bietet jedoch Aussagen über die grundsätzliche Wirksamkeit des getesteten Desinfektionsmittels.

Bei praxisnahen Tests (z. B. [1]) dient die Leitlinie somit als Vorprüfung und zur Ableitung praxisnaher Prüfbedingungen.

Die Begriffe „begrenzt viruzid“ (wirksam gegen behüllte Viren wie z.B. Influenzavirus, Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus, HIV) und „viruzid“ (wirksam gegen unbehüllte Viren; die Wirksamkeit gegen unbehüllte Viren schließt eine Wirksamkeit gegen behüllte Viren ein) werden im Sinne der Definition der Stellungnahme des Arbeitskreises Viruzidie am RKI [2] verwendet.

Es ist zu berücksichtigen, dass der Begriff „viruzid“ nicht alle bekannten pathogenen Viren einbezieht, da bestimmte Viren, z. B. Hepatitis-A-Virus oder Par-

voviren, ggf. eine höhere Resistenz aufweisen können als die eingesetzten Testviren.

2 Testviren

Für die Desinfektionsmittelprüfung sind folgende Viren zu verwenden:

2.1 Chemische Desinfektion

2.1.1 Wirkungsbereich „begrenzt viruzid“

- Vacciniavirus, Stamm Elstree¹ oder Modified Vacciniavirus Ankara (MVA),
- Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV), Stamm NADL.

2.1.2 Wirkungsbereich „viruzid“

- Poliovirus Impfstamm Typ I, Stamm LSc-2ab,
- Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75 ATCC VR-5,

¹ Beschäftigte, die Versuche mit diesem Virus durchführen, sollten entsprechend geimpft sein.

- SV40, Stamm 777,
- Murines Norovirus, Stamm S99.

2.2 Chemothermische Desinfektion (Temperatur > 30 °C)

- Bovines Parvovirus, Stamm Haden oder Minute virus of Mice (MVM) ATCC VR-1346.

Bezugsquellen für die Virusstämme bzw. Virussuspensionen sind auf der DVV-Homepage (www.dvv-ev.de – Fachausschuss „Virusdesinfektion“) angegeben. Zusätzlich sind über das Friedrich-Loeffler-Institut folgende Testviren erhältlich: BVDV, MNV (S99), Poliovirus, SV40.

3 Bereitung der Virussuspensionen

Viren sind in Zellkulturen zu vermehren. Die Methoden, die zur Herstellung der Virussuspension eingesetzt werden, können in Abhängigkeit vom Testvirus differieren. Die Suspension sollte einen Titer von nicht weniger als 10^8 TCID₅₀/ml haben.

Der Virustiter darf auch niedriger als 10^8 TCID₅₀/ml – jedoch nicht geringer als 10^6 TCID₅₀/ml – sein. Der Einsatz geringerer Titer muss im Prüfbericht erläutert und begründet werden. Die Höhe des Titers muss gewährleisten, dass jeweils eine Titerreduktion von mindestens 4 log₁₀-Stufen bei der Desinfektionsmittelprüfung abgelesen werden kann.²

4 Bereitung der Desinfektionsmittel-Verdünnung

Das zu prüfende Desinfektionsmittel wird mit Wasser standardisierter Härte (WSH, s. Anhang 4) 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

² Sollte dies im Ausnahmefall nicht möglich sein, ist das Large-Volume-Plating (LVP) s. 6 anzuwenden.

1,25-fache konzentrierter sein als die zu prüfende Konzentration (s. 5).

Präparate, die unverdünnt angewendet werden bzw. in gebrauchsfertiger Form in den Handel kommen sollen, werden zur Ermittlung einer Kinetik mit Aqua bidest.³ verdünnt. Aus den nachfolgend beschriebenen Testbedingungen folgt für diese Produkte, dass keine höheren Konzentrationen als 80 % geprüft werden können.

Eine zusätzliche Prüfung in 90 %iger Konzentration (0,1 Teil Virussuspension, 0,9 Teile Aqua bidest. bzw. FKS, 9 Teile Desinfektionsmittel) ist zulässig, wenn der Wirkmechanismus dies begründet.

Bei unverdünnt anzuwendenden Desinfektionsmitteln dürfen keine aufkonzentrierten Zubereitungen geprüft werden.

5 Durchführung der Suspensionsversuche

Fetales Kälberserum (FKS)⁴, Aqua bidest. und die Desinfektionsmittel-Verdünnung werden auf 20 ± 2 °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 ± 2 °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. Entsprechend dem Anwendungsbereich sind in der Regel 4 Ein-

³ In europäischen Normen wird Wasser als Aqua bidest. definiert, das frei von zelltoxischen Substanzen ist und mit einem Glasdestillationsapparat hergestellt wurde. Alternativ wird die Verwendung von Aqua ad iniectionem gemäß europäischem Arzneibuch empfohlen. Somit sollte sofern kein steriles Glas-destilliertes Wasser verwendet wird, destilliertes oder demineralisiertes Wasser eingesetzt werden, dessen relevante Kennwerte wie Leitfähigkeit und TOC denen, in der jeweils aktuellen Europäischen Pharmakopöe für Aqua ad iniectionem angegeben, entsprechen.

⁴ Für Prüfungen mit dem Testvirus BVDV bzw. bovinem Parvovirus ist FKS zu verwenden, das weder Antikörper gegen BVDV bzw. bovinen Parvovirus noch diese Viren selbst enthält.

wirkzeiten des Mittels zu prüfen, die auch die für die Anwendung vorgesehene Einwirkzeit beinhalten:

entweder 0,5; 1; 2,5; 5 (ggf. 1,5; 2) Minuten⁵ oder 5; 15; 30 und 60 min.

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 Einwirkzeit ersichtlich ist (Kinetik).

Die Wirksamkeit der Desinfektionsmittel ist sowohl ohne als auch mit FKS-Belastung zu prüfen (10 % Endkonzentration im Versuchsansatz bzw. 9 % bei Prüfung von unverdünnt anzuwendenden Produkten in 90 %iger Konzentration, s. 4). Die Viruskontrollansätze müssen die gleichen FKS-Konzentrationen enthalten wie die Prüfansätze.

Alle Versuche sind mindestens in zwei unabhängigen Ansätzen an unterschiedlichen Versuchstagen durchzuführen.

5.1 Prüfungen zur chemothermischen Desinfektion

Chemothermische Verfahren im Bereich höher als 30 °C sind mit Parvoviren bei den vom Hersteller vorgegebenen Temperaturen zu prüfen. Abweichend von den unter 5 genannten Zeiten ist vorrangig die für das Verfahren beantragte Einwirkzeit zu prüfen. Die Kinetik der Virusinaktivierung muss aus der Wahl davon

⁵ Für die ordnungsgemäße praktische Durchführung der Händedesinfektion sind Einwirkzeiten, die in den praxisnahen Versuchen für die bakterizide Wirksamkeit ermittelt wurden, erforderlich. Diese dürfen für die Auslobung einer Wirksamkeit gegen Viren auf der Grundlage eines Suspensionstest nicht unterschritten werden, auch wenn ein experimenteller Nachweis der Wirksamkeit in kürzeren Zeiten vorliegt.

Tab. 1 Kontrollversuche für die Prüfung von chemothermischen Desinfektionsverfahren

Virustiter	20 °C	Verfahrenstemperatur	60 °C/10 min
Kontrolle nach 7.1.1 und 7.1.2	X	X	–
Versuchsansatz nach 5.1 (a und b)	X	X	–
Referenzprüfung	–	–	X

abgeleiteter weiterer Einwirkzeiten und/oder Konzentrationen ersichtlich werden. Es sind mindestens 2 Konzentrations-Zeit-Relationen zu prüfen.

Diese Prüfungen müssen, sofern das Desinfektionsverfahren aus mehreren Komponenten (z. B. Wasch- und Desinfektionsmittel) besteht, jeweils a) mit dem Waschmittel bzw. Waschverstärkern allein und b) mit dem vollständigen Verfahren – Wasch- und Desinfektionsmittel – in getrennten Versuchsansätzen bei der vorgesehenen Verfahrenstemperatur und ggf. zu berücksichtigenden Anwendungsbedingungen (z. B. Zeitpunkt der Zugabe des Desinfektionsmittels) durchgeführt werden. Die Prüfungen nach a) und b) müssen zusätzlich auch bei 20 °C erfolgen (s. **Tab. 1**). Die Kontrollen nach 7.1 sind zusätzlich auch bei der Verfahrenstemperatur durchzuführen.

Fetales Kälberserum (FKS) und Aqua bidest. werden einzeln auf 20 ± 2 °C bzw. die Verfahrenstemperatur temperiert. Die Desinfektionsmittellösung bzw. alle Verfahrenskomponenten werden gemäß der Anwendungsvorschrift für das jeweilige Verfahren hergestellt und in den Versuchen einmal bei 20 ± 2 °C und zum Zweiten bei der Verfahrenstemperatur eingesetzt. Dazu werden jeweils ein Teil der Virussuspension (20 ± 2 °C) mit einem Teil FKS bzw. Aqua bidest. (jeweils temperiert) gemischt; sodann werden acht Teile der Desinfektionsmittel-Verdünnung (1,25-fach; auf Verfahrenstemperatur temperiert) hinzugegeben und vermischt. Das Gemisch wird für die Dauer der zu prüfenden Einwirkzeit bei 20 ± 2 °C bzw. der Verfahrenstemperatur gehalten.

6 Bestimmung der Infektiosität der Proben im Suspensionsversuch

Als Methodik zur Bestimmung der Viruskonzentration, kommen quantale Tests

(Endverdünnungsmethode) oder quantitative Tests (Plaquetest) in Frage, die als Makro- oder Mikrotests ausgeführt werden können. Als Indikator für die Virusinfektion der Zellen wird der zytopathische Effekt, d. h. die Veränderung der Zellen, die als Ergebnis der Virusvermehrung in den Zellen beobachtet wird, herangezogen.

Nach den zu prüfenden Einwirkzeiten ist aus dem Versuchsansatz (s. 5) eine Verdünnungsreihe in eiskaltem Kulturmedium anzulegen (z. B. 0,5 ml Gemisch zu 4,5 ml Medium; 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 Angabe des Zeitfaktors im Versuchsprotokoll) auf Zellkulturen zu verimpfen. Dabei ist eine mögliche Nachwirkung des Desinfektionsmittels auszuschließen (s. 7.3).

Sollte die Zytotoxizität des Desinfektionsmittels so stark sein, dass eine Abnahme des Infektiositätstiters um $4 \log_{10}$ nicht erfassbar ist, kann versucht werden, die Zytotoxizität zu vermindern (z. B. mittels Gelfiltration, Mikrofiltration, geeigneten chemischen Neutralisationsmitteln). Diese Verfahren können auch angewendet werden, wenn die Wirkung des Desinfektionsmittels nach der Einwirkzeit durch Verdünnen nicht ausreichend aufgehoben werden kann. Das gewählte Verfahren ist detailliert zu beschreiben und durch entsprechende Kontrollen ist nachzuweisen, dass es den Virusnachweis (Titer) nicht beeinträchtigt. Werden Gelfiltration oder Mikrofiltration angewendet, sind alle relevanten Testbedingungen mit und ohne Filtration zu prüfen (die alleinige Prüfung der Viruskontrolle mit und ohne Filtration ist nicht ausreichend). Die Prüfansätze mit Desinfektionsmittel müssen ebenfalls mit und ohne Filtration geprüft werden (siehe auch

Memorandum des Fachausschusses Virusdesinfektion, Anhang 7).

Eine weitere Methode, den Nachweis der Abnahme der Infektiosität nach Einwirkzeit des Desinfektionsmittels zu verbessern bzw. zu präzisieren, ist die Testung eines größeren Probenvolumens, das sogenannte „Large-Volume-Plating“ (LVP). Diese Methode darf nur angewendet werden, wenn in dem oben beschriebenen Testansatz (Endverdünnungsmethode ohne Maßnahmen zur Reduktion der Zytotoxizität) aus den im vorangegangenen Absatz beschriebenen Gründen nicht möglich ist, eine Titerreduktion $\geq 4 \log_{10}$ zu erzielen. Es dient der Verbesserung der Nachweisgrenze und ist nur sinnvoll, wenn im Infektiositätstest (Endverdünnungsmethode oder Plaquetest) keine bzw. nur eine sehr geringe Infektiosität nachweisbar ist. Für diesen Test wird das Prüfgemisch gerade soweit mit Kulturmedium verdünnt, dass keine Zytotoxizität mehr erkennbar ist. Diese Verdünnung wird sofort (unter Angabe des Zeitfaktors) auf eine möglichst große Anzahl Zellkulturen in Mikrotiterplatten verimpft. Die Anzahl der Platten und somit das für die Prüfung verwendete Volumen bestimmt die Nachweisgrenze.⁶

Nach Inkubation unter den für die Titration mit dem jeweiligen Virus spezifischen Bedingungen, werden die Zellkulturen unter dem Mikroskop auf zytopathische Effekte untersucht. Aus der Zahl der infizierten Zellkulturen bzw. aus dem insgesamt verwendeten Probenvolumen, das keine Infektiosität zeigt, wird die Viruskonzentration bzw. Nachweisgrenze berechnet und diese für die Berechnung des Reduktionsfaktors verwendet (s. 8).

Das gewählte Verfahren ist detailliert zu beschreiben.

⁶ Hierbei sollten Volumina von mindestens 62,5 ml auf nicht weniger als sechs 96-Well Platten (wie in Anhang 1 angegeben) verteilt werden. Die Verwendung geringerer Mengen bedarf der Begründung.

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 Wasser standardisierter Härte (bei unverdünnt anzuwendenden Produkten Aqua bidest.) gemischt. Nach Ablauf der maximalen Einwirkzeit sind Verdünnungsreihen (s. 6) 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 WSH (bei unverdünnt anzuwendenden Produkten Aqua bidest.) gemischt. Nach Ablauf der maximalen Einwirkzeit sind Verdünnungsreihen (s. 6) 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 WSH (bei unverdünnt anzuwendenden Produkten Aqua bidest.) bzw. ein Teil WSH (bei unverdünnt anzuwendenden Produkten Aqua bidest.) und ein Teil FKS mit acht Teilen der Desinfektionsmittelverdünnung gemischt. Wie bei der Bestimmung der Virusinfektiosität (s. 6) werden hiervon Verdünnungsreihen angelegt, mit denen die Zellkulturen inokuliert werden.

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 Prüfgemisch (bestehend aus dem Versuchsansatz (s. 5) mit einer geeigneten Desinfektionsmittel-Verdünnung) mit 9 Teilen eiskaltem Kulturmedium vermischt und für die Zeitphase zwischen Beendigung der Einwirkzeit des Desinfektionsmittels und Ansatz der Verdünnungsreihe (s. 6) 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.

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. mit acht Teilen Desinfektionsmittel in der Verdünnung, die keine Nachwirkung (s. 7.3) oder Zytotoxizität (s. 7.2) zeigt, versetzt. Diese Mischungen werden für eine Stunde analog der Art der Bestimmung der Infektiosität der Virussuspensionen (s. 6 und Anhang 1) mit der Zellkultur in Kontakt gebracht. Als Negativkontrolle hierzu werden parallel zu den Mischungen mit Desinfektionsmittel Zellkulturen in gleicher Weise mit PBS in Kontakt gebracht und unter gleichen Bedingungen für eine Stunde inkubiert. Danach wird die Desinfektionsmittellösung bzw. PBS 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 diesen Zellkulturen bestimmt.

Die Differenz der Titer der mit PBS bzw. Desinfektionsmittel vorbehandelten Zellen 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 Referenzkontrolle

Zusätzlich zu jedem Versuchs- bzw. Kontrollansatz ist ein Vergleichsversuch mit einer geeigneten Referenzsubstanz durchzuführen.

Die Prüfung einer Referenzsubstanz dient dem Nachweis der Eignung der Testviren, d. h. dem Nachweis, dass sie gegenüber bestimmten Wirkstoffen eine stets gleichbleibende Tenazität aufweisen. Die Auswahl der Referenzsubstanz sollte sich am Wirkstoff des zu prüfenden Produkts orientieren, da abhängig vom Wirkmechanismus unterschiedliche Eigenschaften der Testviren zu erwarten sind. Bei aldehydischen Produkten ist Formaldehyd, bei oxidativ-wirksamen Produkten Peressigsäure (PES) und bei alkoholhaltigen Produkten Ethanol zu verwenden. Bei Wirkstoffgemischen sollte die Referenzsubstanz für den Wirkstoff mit der höchsten Konzentration im Produkt ausgewählt werden. Die Prüfung wird analog Pkt. 5. jedoch ohne Belastung durchgeführt, wobei die Produktprüflösung durch die Referenzprüflösung ersetzt wird.

Die Prüflabore sind aufgefordert, laborinterne Referenzwerte zu erstellen. Aus diesen Daten sollen zu einem späteren Zeitpunkt für die Bewertung von Gutachten verbindliche Werte festgelegt werden.⁷ Orientierende Angaben zu Reduktionsfaktoren bei ausgewählten Viren und Referenzsubstanzen sind in Anhang 2 aufgeführt.

7.6.1 Referenzkontrolle für aldehyd-haltige Produkte

Die Versuche sind bei pH 7,0 ohne Serumbelastung bei 20 ± 2 °C durchzuführen.

⁷ Derartige Daten können dem DVV-Fachausschuss (siehe: <http://www.dvv-ev.de>) übermittelt werden.

ren. Die Konzentration soll (im Versuchsansatz) 0,7 g Formaldehyd/100 ml betragen, die Einwirkzeit 5, 15, 30 und 60 min (für Poliovirus: 30, 60 und 120 min). 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 3).

7.6.2 Referenzkontrolle für chemothermische Desinfektionsverfahren mit Peressigsäure

Diese Untersuchungen sind mit Parvoviren durchzuführen. Dazu wird 0,005% Peressigsäure bei 60°C mit einer Einwirkzeit von 10 min geprüft. Die Gehaltsbestimmung und Herstellungsbedingungen für die Peressigsäurelösung sind in Anhang 3 beschrieben.

8 Berechnung des Reduktionsfaktors

Für die Bewertung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln ist der Virustiter (mit seinem 95% Konfidenzintervall) ohne (Titer a) und mit Einwirkung des Desinfektionsmittels (Titer b) zu bestimmen und aus der Differenz der Reduktionsfaktor (RF) einschließlich dessen 95% Konfidenzintervall zu ermitteln. Der Virustiter (TCID₅₀/ml oder PFU/ml) kann auf verschiedene Weise ermittelt werden, u. a. bei Endpunkttitrationen nach der Gleichung von Spearman und Kärber [3–5], bzw. im Falle des LVP s. 6 nach Taylor oder Poisson [5, 6]. Eine Beispielrechnung ist im Anhang 8 enthalten.

8.1 Berechnung des Virustiters und seines 95% Konfidenzintervalls nach Spearman und Kärber [5]

Die Berechnung des logarithmischen Infektionstiters nach Spearman und Kärber (log₁₀ TCID₅₀/ml) erfolgt nach:

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

Dabei ist:

m = negativer dekadischer Logarithmus des Titers bezogen auf das Testvolumen

x_k = Logarithmus der kleinsten Dosis (Verdünnungsstufe) bei der alle Zellkulturen positiv reagieren
 d = Logarithmus des Verdünnungsfaktors
 p_i = beobachtete Reaktionsrate

Die Standardabweichung (s) von m errechnet sich nach [5]:

$$s_m = d \sqrt{\sum \{p_i(1-p_i) / (n-1)\}}$$

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 (k) des Titers entspricht näherungsweise 2 s_m .

Bei der Titerberechnung muss die Vorverdünnung der Probe berücksichtigt werden.

8.2 Berechnung des Reduktionsfaktors und seines 95% Konfidenzintervalls

Der Reduktionsfaktor (RF) wird errechnet als Differenz des logarithmierten Virustiters der jeweiligen Viruskontrolle („Kontroll-Titration“ s. 7.1.1 und 7.1.2, Titer a) und nach Einwirkung des Desinfektionsmittels („Restvirus“, Titer b).

Der Reduktionsfaktor (RF) berechnet sich demnach aus:

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

Dabei ist:

RF_{T1} = Reduktionsfaktor des ersten Versuchsansatzes
 $a = \log_{10}$ TCID₅₀/ml oder PFU/ml der Kontroll-Titration des ersten Versuchsansatzes
 $b = \log_{10}$ TCID₅₀/ml oder PFU/ml der Restvirus-Titration des ersten Versuchsansatzes

Das 95% Konfidenzintervall des RF des ersten Ansatzes ($K_{RF(T1)}$) berechnet sich aus den Konfidenzintervallen (k) der Virustiter, wobei k_a das 95% Konfidenzinter-

vall des Kontrolltiters (a) und k_b das 95% Konfidenzintervall des Restvirustiters (b) ist. Das 95% Konfidenzintervall (k) des Titers entspricht näherungsweise 2 s_m . Das 95% Konfidenzintervall des RF wird nach folgender Formel berechnet [5]:

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

Dabei ist:

$K_{RF(T1)}$ = 95% Konfidenzintervall des RF des ersten Versuchsansatzes
 k_a = 95% Konfidenzintervall der Kontroll-Titration des ersten Versuchsansatzes
 k_b = 95% Konfidenzintervall der Restvirus-Titration des ersten Versuchsansatzes

Für jeden Versuchsansatz ist der Reduktionsfaktor und das 95% Konfidenzintervall zu berechnen.

8.3 Berechnung des Titers und des Reduktionsfaktors aus dem Large-Volume-Plating (LVP)

Der Nachweis von Restvirus kann durch die Testung eines großen Probenvolumens (LVP) verbessert werden. Wird im Testansatz mit Desinfektionsmittel kein oder sehr wenig Virus („Restvirus“) festgestellt, würde die Berechnung nach Spearman-Kärber einen zu hohen Wert für den Titer b ergeben.⁸ Werden noch einige Viruspartikel beim LVP gefunden, kann

⁸ Die Berechnung des Titers nach Spearman-Kärber setzt voraus, dass Verdünnungen einer Probe getestet werden, wobei die niedrigste Verdünnung eine Reaktionsrate von 100% und die höchste Verdünnung eine Reaktionsrate von 0 haben soll. Je mehr Verdünnungen im Bereich < 100% aber > 0% getestet werden, um so genauer ist die Bestimmung des Titer (TCID₅₀/ml). Ist die Reaktionsrate der niedrigsten getesteten Verdünnung < 100% nimmt man bei der Berechnung an, dass die nächste niedrigere Verdünnung eine 100%ige Reaktionsrate gezeigt hätte. Ist die Reaktionsrate aber klein, vielleicht ≤ 25% (2 von 8 Wells) oder gar 0, so kann die Annahme einer 100%igen Reaktionsrate der nächsten niedrigeren Verdünnung einen zu hohen Titer ergeben. Das ist insbesondere bei einem niedrigen Verdünnungsfaktor (3 oder 5) von Bedeutung, weil erfahrungsgemäß die Reaktionsrate über mehrere Verdünnungsschritte abnimmt.

die Viruskonzentration gemäß der nachfolgenden Formel berechnet werden. Die Formel ist von der Taylor-Reihe abgeleitet, die eine Annäherung an exponentielle Funktionen darstellt (Taylor-Formel). Das Ergebnis, umgerechnet in den logarithmischen Wert, ist der Titer b und wird für die Berechnung des Reduktionsfaktors eingesetzt. Eine $TCID_{50}$ entspricht 0,69 infektiösen Viruspartikeln.

$$c = \frac{D}{V_w} \left(-\ln \frac{n - n_p}{n} \right)$$

Dabei ist:

- c = Konzentration der infektiösen Viruspartikel
- D = Verdünnung
- V_w = Volumen pro Well
- n = Anzahl inokulierter Wells
- n_p = Anzahl Virus-positiver Wells

Wird beim LVP kein Virus gefunden, ist die Taylor Formel nicht gültig und deshalb muss die Poisson – Formel angewendet werden. Sie berücksichtigt die statistische Verteilung weniger Viruspartikel in einem großen Volumen [5]. Es ist die Berechnung der Virusmenge, die vorliegen müsste, um bei einem gegebenen Probenvolumen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % ein positives Ergebnis zu erhalten. Nach folgender Formel wird die Zahl der Viruspartikel berechnet, die, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und umgewandelt in den logarithmischen Wert den Titer b darstellt und für die Berechnung des Reduktionsfaktors eingesetzt wird:

$$p = e^{-cv} \text{ und abgeleitet nach } c$$

$$c = \ln p / -V$$

Dabei ist:

- p = ist die Wahrscheinlichkeit mit der kein Virus nachgewiesen wird; die Wahrscheinlichkeit, kein Virus zu finden, soll nicht größer als 5 % sein ($p = 0,05$), so dass die Zahl der Viruspartikel berechnet wird, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % nachgewiesen werden kann.
- c = Konzentration der infektiösen Viruspartikel
- V = Testvolumen

Der Reduktionsfaktor wird berechnet, wie in 8.2 beschrieben. Die nach der Taylor-Formel oder der Poisson-Formel berechneten Titer werden aus pragmatischen Gründen ohne 95 % Konfidenzintervall ($k_b = 0$) angegeben. Somit entspricht rechnerisch das 95 % Konfidenzintervall des Reduktionsfaktors dem 95 % Konfidenzintervall des Titers der Kontroll-Titration (a); d. h. die Formel wandelt sich um in:

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

Dabei ist:

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

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

Der mittlere RF aus beiden Ansätzen und sein 95 % Konfidenzintervall werden 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:

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

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

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

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

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.

10 Untersuchungsbericht

Die Versuchsergebnisse sind tabellarisch und ggf. graphisch, einschließlich der mit der jeweiligen Referenzsubstanz 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, einschließlich der Rohdaten) und eine Wertung des Befundes enthalten (s. 9).

Anhang 1

Hinweise zur Durchführung des Infektiositätstests

Die Prüfung der Infektiosität der Suspensionen und ihrer Verdünnungen kann als Mikrotest in Platten erfolgen. Zur Titerbestimmung kann die Endverdünnungsmethode ($TCID_{50}$) (Mikro- und Makrotest) oder der Plaquetest (Mikrotest) eingesetzt werden.

Mikrotest in Platten

Beispiel: In die Vertiefungen der 96-Well-Zellkulturplatte werden 0,05–0,15 ml der jeweiligen Verdünnungsstu-

fe appliziert (6 bis 8 Wells pro Verdünnungsstufe). Diese kann entweder auf bereits angewachsene Zellen aufgebracht oder zu 0,05–0,15 ml Zellsuspension hinzugefügt werden. Werden bereits ange-

wachsene Zellkulturen verwendet, kann nach einer Adsorptionsdauer von 1–2 h das Medium gewechselt werden. Die Kulturen werden bei 37 °C bebrütet (in der Regel 5–15 Tage) und anschließend mi-

kroskopisch auf zytopathische Effekte geprüft. Die Infektiosität der Proben wird als TCID₅₀/ml angegeben.

Anhang 2

Tab. 2 Orientierende Angaben zu Reduktionsfaktoren bei verschiedenen Referenzsubstanzen und Viren						
Testvirus/Wirkstoff	Alkoholische Produkte: Ethanol		Aldehydische Produkte: Formaldehyd		Oxidativ-wirksame Produkte: PES	
	Konz./EWZ	RF	Konz./EWZ	RF	Konz./EWZ	RF
Vacciniavirus	n.n.f.		n.n.f.		n.n.f.	
Poliovirus	n.n.f.		0,7%/30 min 0,7%/60 min	0,5–2,5 2–4,5	n.n.f.	
Adenovirus	n.n.f.		n.n.f.		n.n.f.	
SV 40	n.n.f.		n.n.f.		n.n.f.	
MNV	n.n.f.		n.n.f.		n.n.f.	
MVM	–		n.n.f.		0,005%/10 min (60 °C) (50 ppm)	1,5–2,5

n.n.f. noch nicht festgelegt

Anhang 3

Chemische Gehaltsbestimmungen

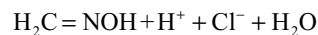
a. Quantitative Bestimmung von Formaldehyd

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) bereitete 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 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wird am pH-Meter mit 0,5 N Natronlauge wieder auf pH 3,0 zurücktitriert.

Berechnung des Formaldehydgehaltes der Probe:

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

b. Titration von PES

Peressigsäuren sind Gleichgewichtssysteme aus den Komponenten: Peressigsäure, Wasserstoffperoxid, Essigsäure und Wasser.

Peressigsäure wird bei 4 °C gelagert.

Aus dem z. B. ca. 40%igen Peressigsäurekonzentrat wird eine Stammlösung hergestellt. Haltbarkeit der Stammlösung maximal 1 Tag bei 4 °C.

Die Gehaltsbestimmung erfolgt durch Titration deshalb jeweils maximal einen Tag vor dem Versuch.

Material

Peressigsäure
ortho-Phosphorsäure 85 % p. A.
Kaliumjodid p. A.
1 % Stärkelösung – Stärke p. A.
Ammoniumheptamolybdat -Tetrahydrat p. A.
0,1 N Natriumthiosulfatlösung
Aqua bidest, Eisflocken
Herstellung der Stärkelösung:
1 g Stärke werden in 100 ml Wasser gelöst, aufgekocht und abkühlen gelassen. (Haltbarkeit maximal 4 Wochen)

Zu beachten ist, dass bei der Titration mit mindestens 100 ml Eiswasser verdünnt wird. Bei zu geringer Verdünnung reagiert Wasserstoffperoxid auch schon in der Kälte etwas mit dem Jodid.

Durchführung

1. Bestimmung des PES-Gehaltes
Zu 100 ml Eiswasser werden 10 ml 5%ige ortho-Phosphorsäure und ca. 0,5 g Kaliumjodid gegeben und jeweils gut gemischt, danach werden 3–4 Tropfen Stärkelösung zugefügt.

Nach Zugabe der Probenlösung⁹ wird sofort und schnell unter ständigem Rühren mit Natriumthiosulfatlösung auf das Verschwinden der Blaufärbung titriert. Entscheidend ist das erste Verschwinden der Färbung; nach kurzem Stehen tritt die Blaufärbung wieder auf, da H₂O₂ langsam mit dem Jodid reagiert.

Berechnung

$$\frac{\text{ml } 0,1 \text{ N Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 3,803}{10 \times \text{ml Probe}} = \% \text{Peressigsäure}$$

Verbrauch Natriumthiosulfatlösung $\hat{=}$ Gehalt an Peressigsäure
1 ml 0,1 N Natriumthiosulfatlösung $\hat{=}$ 3,803 mg Peressigsäure

⁹ z. B. bei einer 1 %igen Peressigsäurelösung 1 ml, bei einer 0,1 %igen Peressigsäurelösung 10 ml.

2. Bestimmung des Wasserstoffperoxid-Gehalts

Eine Spatelspitze Ammoniumheptamolybdat wird zugeben und die Lösung auf Raumtemperatur erwärmt, danach wird erneut mit Natriumthiosulfatlösung auf Entfärbung titriert.

Berechnung

$$\frac{\text{ml } 0,1 \text{ N Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 1,701}{10 \times \text{ml Probe}} = \% \text{H}_2\text{O}_2$$

Verbrauch Natriumthiosulfatlösung $\hat{=}$ Gehalt an H₂O₂
1 ml 0,1 N Natriumthiosulfatlösung $\hat{=}$ 1,701 mg H₂O₂

Anhang 4

Herstellung von Wasser standardisierter Härte

Für die Herstellung werden 2 Lösungen benötigt:

Lösung A:

19,84 g wasserfreies Magnesiumchlorid (MgCl₂) und 46,24 g wasserfreies Kalziumchlorid (CaCl₂) werden in Aqua bi-

dest. 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 Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) 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 12 h zu verbrauchen.

Die Härte muss 376 ppm, berechnet auf Kalziumkarbonat, betragen.

Anhang 5

Tabellarische und graphische Darstellung der Prüfungsergebnisse

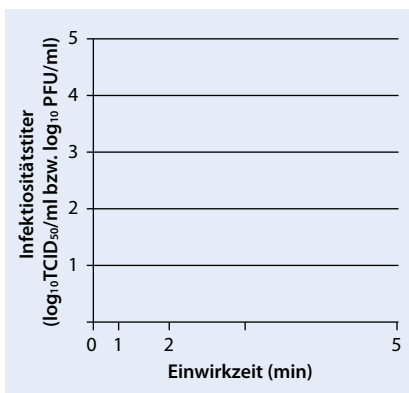
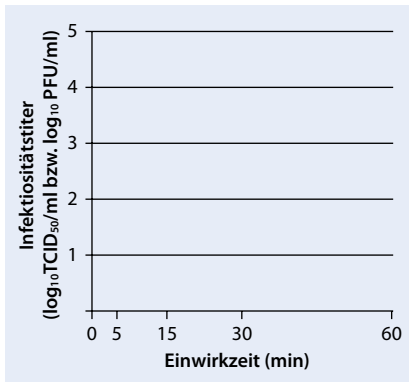
a. Beispiel für die tabellarische Darstellung der Prüfungsergebnisse

Tab. 3 Beispiel für die tabellarische Darstellung der Prüfungsergebnisse (Angaben zur Zytotoxizität des Desinfektionsmittels und zur maximal nachweisbaren Abnahme des Infektiositätstiters)

Konzentration des Desinfektionsmittels im Ansatz (%)	Virustiter der Kontroll-Titration (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml bzw. log ₁₀ PFU/ml) einschließlich 95 % Konfidenzintervall	Zytotoxizität	Virustiter 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			

¹EWZ Einwirkzeit

- b. Beispiele für die graphische Darstellung der Prüfungsergebnisse



Anhang 6

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 Literaturziten).
- Die Wirksubstanzen, die vorgesehenen Anwendungskonzentrationen 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 WSH 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 sowie die Art der Bestimmung und der Berechnung der Viruskonzentration (Titer) genau zu beschreiben. Jegliche Abweichungen von der Leitlinie sind exakt zu beschreiben und zu begründen.
- 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 [3, 4] bzw. beim LVP die Formeln nach Taylor bzw. Poisson [5, 6]. Die statistische Auswertung und die Bestimmung des 95 % Konfidenzintervalls des Reduktionsfaktors (RF) ist nach den Vorgaben unter 8. durchzuführen.

Anhang 7

Memorandum zur Verwendung von Molekularsiebfiltrations-Säulen in der Desinfektionsmittelprüfung

(Stand: 18. Mai 2013)

Bei der Desinfektionsmittelprüfung muss zum Nachweis der virusinaktivierenden Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels eine Titerreduktion um 4 log₁₀-Stufen nach der angegebenen Einwirkzeit nachgewiesen werden. Da einige Desinfektionsmittel jedoch eine starke Zytotoxizität aufweisen, kann diese Titerreduktion nicht immer erreicht werden. In der EN 14476 und der Leitlinie der DVV/RKI wird für solche Fälle eine „Entgiftung“ des

Prüfgemisches durch Molekularsiebfiltration z. B. mittels Sephadex™LH 20 Säulen vorgeschlagen. Mit diesem Verfahren kann die Zytotoxizität in Abhängigkeit von den Wirkstoffen in der Regel um eine log₁₀-Stufe verringert werden. In einigen Laboren werden die Molekularfiltrations-Säulen auch bei nicht zytotoxischen Desinfektionsmitteln zum Abstoppen der virusinaktivierenden Wirkung eingesetzt. Die Erfahrungen in mehreren Laboren haben gezeigt, dass in diesen Molekularsiebverfahren infektiöse Viren in nicht vorhersagbarer Weise zurückgehalten werden und somit zu falschen Ergebnissen führen können. Es wird eine virusinaktivierende Wirksamkeit vorgetäuscht, die tatsächlich nicht vorhanden ist.

Dieser Effekt konnte bei verschiedenen Virus-Spezies und bei Desinfektionsmitteln mit unterschiedlicher Wirkstoffbasis beobachtet werden. **Tab. 4** zeigt verschiedene Beispiele mit und ohne Einsatz der Molekularfiltrations-Säulen: Bei den QAV-basierten Formulierungen 1, 3 und 4 kam es zu deutlicher Zurückhaltung infektiöser Viren in den Säulen, während bei dem QAV-basiertem Präparat 2 keine Beeinflussung zu beobachten war. In direkten Vergleichsstudien von Prüfgemischen, filtriert und unfiltriert, wurden Titerunterschiede von bis zu 3 log₁₀-Stufen gemessen. Bei den parallelen Titrationen der Viruskontrollen gab es diesen Rückhalte-Effekt nicht. Daraus resultiert die Hypothese, dass die Zusammensetzung des Prüfgemisches, bestehend aus Desinfektionsmittel, Testvirussuspension und gegebenenfalls Proteinbelastung, der kritische Faktor ist.

In einigen Gutachten und Publikationen findet man immer wieder Desinfektionsmittelprüfungen, die ausschließlich unter Verwendung dieser Molekularsiebfiltration durchgeführt wurden. In Einzelfällen fällt es schwer, die Richtigkeit dieser Daten sicher zu bewerten. Es fehlen Vergleichsansätze, die belegen, dass kein Restvirus in den Säulen zurückgehalten wurde. Wir möchten deshalb darauf hinweisen, dass bei Desinfektionsmittelprüfungen, in denen ohne „Entgiftung“ die geforderte Titerreduktion nicht erreicht werden kann, alle Zeitpunkte mit und ohne Molekularsiebfiltration gemessen werden müssen. Auf diese Weise kann er-

Tab. 4 Beispiele für Testergebnisse mit und ohne Säulen

Wirkstoff	Konzentration	Prüfvirus	Belastung	Zytotoxizität	Säule	Virustiter Kontrolle	Virustiter (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) nach			
							5 min	15 min	30 min	60 min
QAV 1	1%	Rota	Aqua bidest	3,50	Nein	7,13±0,37	6,00±0,38	5,63±0,41	5,63±0,41	n.d.
				2,50	Ja	7,00±0,38	≤2,50±0,00	≤2,50±0,00	≤2,50±0,00	n.d.
QAV 2	0,25%	Rota	Aqua bidest	3,50	Nein	7,13±0,37	6,75±0,33	6,75±0,44	5,88±0,37	n.d.
				2,50	Ja	7,00±0,38	6,63±0,25	6,50±0,35	6,75±0,44	n.d.
QAV 3	1%	Adeno	FKS	3,50	Nein	7,64±0,29	n.d.	n.d.	n.d.	5,79±0,37
				3,50	Ja	7,50±0,40	n.d.	n.d.	n.d.	≤3,50±0,00
		SV40	3,50	Nein	7,79±0,37	n.d.	n.d.	n.d.	5,21±0,55	
			3,50	Ja	7,79±0,37	n.d.	n.d.	n.d.	≤3,50±0,00	
QAV 4	1%	Adeno	FKS	3,50	Nein	7,64±0,29	n.d.	n.d.	n.d.	6,07±0,49
				2,50	Ja	7,50±0,40	n.d.	n.d.	n.d.	≤2,50±0,00
	0,5%	SV40	4,50	Nein	7,79±0,37	n.d.	n.d.	n.d.	6,36±0,29	
			3,50	Ja	7,79±0,37	n.d.	n.d.	n.d.	≤3,50±0,00	
Alkohol+CHG	80%	Adeno	Aqua bidest.	4,50	Nein	8,00±0,46	n.d.	6,75±0,33	n.d.	n.d.
				2,50	Ja	7,25±0,44	n.d.	≤2,63±0,25	n.d.	n.d.

kannt werden, ob Virus in den eingesetzten Säulen verblieben ist. Gegebenenfalls müssen andere Maßnahmen (z. B. höhere Virustiter) eingesetzt werden. Zum Abstoppen der virusinaktivierenden Wirkung in nicht zytotoxischen Lösungen sind diese Säulen ungeeignet, da vor allem bei kurzen Einwirkzeiten der genaue Zeitpunkt des Abstoppens nicht so genau bestimmt werden kann wie beim Anlegen von Verdünnungsreihen.

Anhang 8

1. Beispiel zur Berechnung des Titers und des Reduktionsfaktors nach Spearman und Kärber

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

Aus den in **Tab. 5** angegebenen Zahlenwerten errechnet sich der Titer (s. 8.1):

$$m = -6 + \frac{1}{2} - 1 \times 2,38 = 7,88$$

Unter Berücksichtigung des eingesetzten Testvolumens beträgt der Titer 8,88 log₁₀ TCID₅₀/ml.

Die Standardabweichung und das 95% Konfidenzintervall des Titers wird aus den gegebenen Werten wie folgt berechnet (vgl. 8.1):

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

Da p₁ = 1, p₂ = 0,75, p₃ = 0,5 und p₄ = 0,13 und n in allen Verdünnungen 16 ist, ist

$$\begin{aligned} P_1(1-p_1) / (n_1-1) &= 0 \\ P_2(1-p_2) / (n_2-1) &= 0,75(1-0,75) / (16-1) = 0,0125 \\ P_3(1-p_3) / (n_3-1) &= 0,50(1-0,50) / (16-1) = 0,0167 \\ P_4(1-p_4) / (n_4-1) &= 0,13(1-0,13) / (16-1) = 0,0075 \end{aligned}$$

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

$$s_m = 0,19,$$

$$\text{d. h. } 2s_m = 0,38$$

$$\text{Daraus resultiert } k_a = 0,38$$

Der Titer der Kontroll-Titration beträgt somit 8,88 ± 0,38 log₁₀ TCID₅₀/ml.

Bei analoger Berechnung des Restvirus-Titers des ersten Versuchsansatzes (Zahlen nicht angegeben) ergibt sich für diesen ein Beispielwert von 3,50 ± 0,32 log₁₀ TCID₅₀/ml.

Der Reduktionsfaktor (RF) berechnet sich aus (vgl. 8.2):

$$RF_{T1} = 8,88 - 3,50$$

Der RF des ersten Versuchsansatzes beträgt 5,38 log₁₀.

Das 95% Konfidenzintervall des RF (K_{RF(T1)}) berechnet sich nach (vgl. 8.2):

$$K_{RF(T1)} = \sqrt{(0,38)^2 + (0,32)^2} = 0,50$$

Der Reduktionsfaktor des ersten Versuchsansatzes beträgt somit 5,38 ± 0,50 log₁₀.

Unter der Annahme, dass unter analogen Rahmenbedingungen im zweiten Versuchsansatz die Titer der Kontroll-Titration und der Restvirus-Titration 8,25 ± 0,22 log₁₀ TCID₅₀/ml und 3,25 ± 0,34 log₁₀ TCID₅₀/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. 8.4):

$$RF_{(mi)} = (5,38 + 5,00) / 2 = 5,19$$

Das 95% Konfidenzintervall des mittleren RF (K_{RF(mi)}) wird ermittelt nach (vgl. 8.4):

$$K_{RF(mi)} = \sqrt{(0,50^2 + 0,40^2) / 2} = 0,45$$

Somit beträgt der Gesamt-RF aus beiden Versuchsansätzen (mit 95%-Konfidenzintervall) bei den gegebenen exemplarischen Werten 5,19 ± 0,45 log₁₀.

Die Einzeltitrationen erfüllen hinsichtlich der Genauigkeit die Anforderung der

Tab. 5 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 log₁₀-Verdünnungsreihe. Eine ähnliche Genauigkeit wird erreicht bei Verwendung einer 1:3-er Verdünnungsreihe und Testung von 8 Replikaten pro Verdünnung.

Leitlinie, da die 95%-Konfidenzintervalle der errechneten Titer $\leq 0,5 \log_{10}$ betragen.

2. Beispiel zur Berechnung des Titers und des Reduktionsfaktors aus dem Large-Volume-Plating nach 8.3

Nimmt man an, dass nach Einwirkung des Desinfektionsmittels nur noch geringe Infektiosität festgestellt und deshalb das LVP angewendet wird, so gibt es zwei Möglichkeiten zur Berechnung des Titers b, der dann, wie in 8.2 beschrieben, für die Berechnung des Reduktionsfaktors verwendet wird.

a. Berechnung nach der Taylor-Formel:

Werden beim LVP einige infizierte Zellkulturen gefunden, kann der Titer nach folgender Formel berechnet werden:

$$c = \frac{D}{V_w} \left(-\ln \frac{n - n_p}{n} \right)$$

c = Konzentration der infektiösen Viruspartikel

D = Verdünnung

V_w = Volumen pro Well

n = Anzahl inokulierter Wells

n_p = Anzahl Virus-positiver Wells

Für die Beispielrechnung werden verwendet:

V_w = 0,1 ml

n = 96

n_p = 9

D = 1000

Trägt man diese Werte in die obige Formel ein, ist das Ergebnis 984 infektiöse Einheiten/ml. Eine TCID₅₀ entspricht 0,69 infektiösen Viruspartikeln. In TCID₅₀ umgerechnet ergibt sich ein Titer von $984 : 0,69 = 1426 \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$. Der Wert, der für die Berechnung des Reduktionsfaktors eingesetzt wird, ist der dekadische Logarithmus dieses Titers, nämlich $3,15 \log_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$.

b. Berechnung nach der Poisson-Formel:

Werden beim LVP keine infizierten Zellkulturen gefunden, kann die „95-prozentige Nachweisgrenze“ wie folgt berechnet werden:

$$c = \ln p / -V$$

Dabei ist:

p = die Wahrscheinlichkeit mit der kein Virus nachgewiesen wird; die Wahrscheinlichkeit kein Virus zu finden soll nicht größer als 5% sein (p = 0,05). Es wird somit die Viruskonzentration berechnet, die bei einem gegebenen Probenvolumen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% nachgewiesen werden kann.

V = Testvolumen [ml]

Im Beispiel soll eine wegen der Zytotoxizität 1:1000 verdünnte Probe auf einer Mikrottestplatte (96 Wells, 0,1 ml/Well) verimpft worden sein.

Daraus ergibt sich folgende Berechnung:

$$p = 0,05, \ln p = -2,99$$

V = $96 \times 0,1 \text{ ml}$; das getestete Volumen beträgt 9,6 ml

Eingesetzt in die Formel ergibt sich ein Wert von $\leq 0,31 \text{ Viruspartikeln/ml}$. Unter Berücksichtigung der Verdünnung ($0,31 \times 1000$) ergibt sich ein Wert von 310 infektiösen Viruspartikeln pro ml. Da eine TCID₅₀ 0,69 infektiösen Viruspartikeln entspricht, ergibt sich ein Titer von $310 : 0,69 = 445 \text{ TCID}_{50}$ dessen Logarithmus $\leq 2,65 \log_{10} \text{ TCID}_{50}$ ist. Dieser Wert ist der Titer, der für die Berechnung des Reduktionsfaktors eingesetzt wird.

Für die Berechnung des Reduktionsfaktors und dessen 95% Konfidenzintervall nehmen wir an, dass der Titer der Kontroll-Titration, wie in der Beispielrechnung ausgeführt, $8,88 \pm 0,38 \log_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ beträgt. Für die Berechnung des Restvirus-Titers wurde ein Titer von $3,15 \log_{10} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ festgestellt. Der Reduktionsfaktor beträgt dann $(8,88 - 3,15) 5,73 \log_{10}$.

Da der Restvirus-Titer aus pragmatischen Gründen der Berechnung kein 95% Konfidenzintervall hat, ergibt sich ein Reduktionsfaktor von $5,73 \pm 0,38 \log_{10}$.

Wird bei der Bestimmung des Restvirus-Titers keine Infektiosität gefunden und der Titer nach der Poisson-Formel ermittelt, ergibt die Berechnung des Reduktionsfaktors $(8,88 - 2,65) 6,23 \log_{10}$.

Da der Restvirus-Titer aus pragmatischen Gründen der Berechnung kein 95% Konfidenzintervall hat, ergibt sich ein Reduktionsfaktor von $\geq 6,23 \pm 0,38 \log_{10}$. Das Zeichen \geq wird hier dem Reduktionsfaktor vorangestellt, um zu zeigen, dass keine restliche Infektiosität nachgewiesen worden ist; d. h. der Reduktionsfaktor hat mindestens diesen Wert, kann möglicherweise aber auch höher sein.

Korrespondenzadressen

Prof. Dr. H.F. Rabenau

Mitglieder des Fachausschuss

„Virusdesinfektion“ der DVV

Homburg

Rabenau@em.uni-frankfurt.de

Dr. I. Schwebke

Mitglieder des Fachausschuss

„Virusdesinfektion“ der DVV

Homburg

Schwebkei@rki.de

Literatur

1. Rabenau HF, Schwebke I, Steinmann J, Eggers M, Rapp I, Neumann-Haefelin D (2012) Quantitative Prüfung der viruziden Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel auf nicht-porösen Oberflächen (Anwendung im Bereich Humanmedizin). *Hyg Med* 37: 78–85
2. Prüfung und Deklaration der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren. Stellungnahme des Arbeitskreises Viruzidie am RKI (2004) *Bundesgesundheitsbl* 47: 62–66
3. Spearman, C (1908) The method of „right and wrong cases“ („constant stimuli“) without Gauss's formulae. *Br J Psychol* 2:227–242
4. Kärber, G (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche [A contribution to the collective treatment of a pharmacological experimental series]. *Archiv für experimentelle Pathol Pharmacol* 162:480–483
5. 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* 84:4740–4744. bzw. CPMP/BWP/268/95: Note for Guidance on virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses. <http://www.ema.europa.eu>
6. Taylor JR (1997) *An Introduction to Error Analysis: The Study of Uncertainties in Physical Measurements*. 2nd ed., University Science Books, 327 pp