

DR. JOCHEN STEINMANN

Wiss. techn. Leiter der
MikroLab GmbH

D-28259 Bremen
Norderoog 2

Tel.: +49 (421) 27819102
Fax: +49 (421) 2760283
E-Mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

01.07.2004
Dr. St/sbe

Laboratorium Dr. H.D. Deppe
Hooghe Weg 35

47906 Kempen

Wirksamkeit von ENDO STAR gegenüber dem Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C

UNTERSUCHUNGSBERICHT

Untersuchungen zur Inaktivierung des Hepatitis C Virus (HCV) durch chemische Desinfektionsmittel sind nicht möglich, da für diesen Erreger keine geeigneten Replikationssysteme vorhanden sind. Kürzlich ist die Wirkung von phenol- und chlorhaltigen Desinfektionsmitteln gegenüber dem HCV mit Hilfe der Bindungsfähigkeit und der Infektiosität an bzw. in Vero-Zellen untersucht worden (1). Ein anderer experimenteller Ansatz basiert auf der Auswahl von Testviren, die weitestgehend identisch sind hinsichtlich der Struktur und ihrem physikochemischen Verhalten mit dem Erreger, der nicht oder nur schwer zu replizieren ist. Für das HCV ist verschiedentlich das Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) als sogenanntes Surrogatvirus genannt worden (2, 3). Dieses Virus gehört wie das HCV in die Familie der Flaviviridae (Genus Pestivirus). Es handelt sich um ein kleines, behülltes ssRNA-Virus mit einem nichtsegmentierten Positivstrang. Durch die Testung von Surrogatviren wird bei der Viruzidie-Prüfung die Möglichkeit geschaffen, entsprechende Aussagen zu Anwendungskonzentration und Einwirkzeit von chemischen Desinfektionsmitteln gegenüber humanpathogenen Viren zu machen, für die keine geeigneten Replikationssysteme zur Verfügung stehen.

Prüfvirus war deshalb aus den oben genannten Gründen das BVDV. Die Inaktivierungsversuche sind dabei in enger Anlehnung an die Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes (BGA, jetzt Robert Koch-Institut) und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren durchgeführt worden (4, 5).

1. Laboratorium

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

2. Identifizierung der Probe

Produktbezeichnung	ENDO STAR
Hersteller	Laboratorium Dr. H.D. Deppe
Chargennummer	2404046
Aussehen und Geruch	klare, farblose Flüssigkeit produktspezifisch
pH-Wert (Glaselektrode)	unverdünnt: 10,1 (20°C) 1,0%: 8,9 (20°C)
Lieferdatum	05.05.2004
Lagerbedingungen	Raumtemperatur, dunkel (Aufbewahrungsbereich nicht frei zugänglich)
Aktive Substanz(en) und ihre Konzentration(en) in 100 g	10,0 g Alkyldimethylammoniummethosulfat 2,0 g Polyhexamethylenbiguanid 3,6 g Cocospropylendiaminguanidiumdiacetat

3. Prüfbedingungen

Zeitraum der Prüfung	07.05.2004 - 18.06.2004
Prüftemperatur	20°C ± 1°C
Produktprüfkonzentration	1,0%
Einwirkzeiten	15, 30 und 60 Minuten
Eiweißbelastung	0,2% Serumalbumin (BGA/DVV) 10,0% foetales Kälberserum (BGA/DVV)
Verdünnungsmittel	Aqua bidest.
Virusstamm	BVDV Stamm NADL

4. Material und Methoden

4.1 Herstellung der Virussuspension

Das BVDV Stamm NADL (VR-534) stammte von Frau Dr. Stephanie Bendfeldt, Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Vor den Inaktivierungsversuchen war das BVDV fünfmal in KOP-R Zellen (Ösopharynxgewebe vom Rind) und einmal in primären Kälbernierenzellen passagiert worden. Die KOP-R Zellen stammten von der Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin (ZBV) der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere (BFAV) auf der Insel Riems (Dr. R. Riebe, Katalog-Nr. RIE 244).

Für die Herstellung der Virussuspension wurden KOP-R Zellen, die mit Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Cambrex Bio Science Verviers s.p.r.l., B-4800 Verviers) und 10% bzw. 2% foetalem Kälberserum (keine Antikörper gegen BVDV nachweisbar) kultiviert worden sind, in 75 cm² Zellkulturflaschen (Nunc GmbH & Co. KG, D-65203 Wiesbaden) mit dem BVDV beimpft. Nach Ausbildung des cytopathischen Effektes (ca. 3-4 Tage) folgte ein dreifacher Einfrier-/Auftauvorgang. Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 770 x g für zehn Minuten entfernt, und der Überstand ist als Virussuspension gewonnen worden. Die Aufbewahrung erfolgte nach Aliquotierung bei -80°C.

4.2 Inaktivierungsversuche

Die Ansätze sind entsprechend der Richtlinie des BGA und der DVV durchgeführt worden. Acht Volumenteile des Desinfektionsmittels in der 1,25fachen der gewünschten Konzentration wurden mit einem Volumenteil Virussuspension und einem Volumenteil Aqua bidest. vermischt. Bei den Versuchen mit Eiweißbelastung wurde anstelle von Aqua bidest. ein Volumenteil foetales Kälberserum (FKS, Biochrom AG, D-12247 Berlin) bzw. einer 2%igen Rinderserumalbumin-Lösung (bovine serum albumin = BSA, Cohn Fraktion V, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82024 Taufkirchen) zugegeben.

Eine Kontrolle bestand aus einem Volumenteil Virussuspension, vier Volumenteilen PBS und fünf Volumenteilen einer 1,4 %igen Formaldehyd-Lösung. Die Bestimmung der Formaldehyd-Konzentration wurde mit der Hydroxylammoniumchlorid-Methode vorgenommen. Ferner sind Kontrollansätze für die Bestimmung des Virustiters nach der längsten der geprüften Einwirkzeiten mitgeführt worden.

Die Inaktivierungsversuche wurden in geschlossenen Plastikröhrchen (Sarstedt AG & Co., D-51582 Nümbrecht) in einem Wasserbad bei $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Nach den einzelnen Einwirkzeiten wurden Teilmengen entnommen, und die Restinfektiosität ist bestimmt worden. Diese Versuche erfolgten unter Einbeziehung von Sephacryl-Säulen (siehe 4.5). Unmittelbar nach Ablauf der Expositionszeit sind 100 μL des Ansatzes in eine MicroSpin™ S-400 HR-Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH, D-79021 Freiburg) gegeben worden. Es folgte eine Zentrifugation bei 3.000 UpM in einer Heraeus Biofuge A (Heraeus Separationstechnik GmbH, D-37520 Osterode).

4.3 Bestimmung der Infektiosität

Die Bestimmung der Infektiosität erfolgte mit Hilfe der Endverdünnungstitration mit dem Mikrotiter-Verfahren. Dabei wurden die Proben, die nach ihrer Entnahme mit eiskaltem EMEM in ganzzahligen Potenzen von 10 verdünnt waren, jeweils zu 100 μL in acht Kavitäten einer sterilen Polystyrolplatte mit flachem Boden (Nunc GmbH & Co. KG) überführt. Danach folgte die Zugabe von je 100 μL einer frisch trypsinierten KOP-R Zellkultur (28. bis 35. Passage). Diese Suspension war so eingestellt, dass sich ca. $10\text{-}15 \times 10^3$ Zellen pro Kavität befanden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im CO_2 -Brutschrank (5% CO_2 -Gehalt) für fünf Tage. Die Ableseung geschah mit einem umgekehrten Mikroskop, und die Berechnung der infektiösen Dosis (ID_{50}) ist nach der Methode von Spearman (6) und Kärber (7) vorgenommen worden.

4.4 Bestimmung der Cytotoxizität

Für die Bestimmung der Cytotoxizität des Desinfektionsmittels wurden zwei Volumenteile PBS mit acht Volumenteilen des Desinfektionsmittels gemischt und nach seriellen Verdünnung in die Mikrotiter-Platte überführt. Anschließend folgte die Zugabe der Zellsuspension. Diese Versuche sind auch mit Sephacryl-Säulen (siehe 4.5) durchgeführt worden.

Die Berechnung der cytotoxischen Dosis erfolgte als $\log_{10} \text{CD}_{50}/\text{mL}$ (in Analogie zum ID_{50} -Wert).

4.5 Reduktion der Cytotoxizität

Da der BVDV-Titer bei unseren Versuchen $10^{8,0}$ ID₅₀/mL nicht erreichte und da für das zu prüfende Präparat eine größere Cytotoxizität gemessen wurde, sind zur Darstellung eines Titerabfall von vier log₁₀-Stufen Sephacryl-Säulen eingesetzt worden. Unmittelbar nach Ablauf der Einwirkzeit wurden jeweils 100 µL der Ansätze in eine MicroSpin™ S-400 HR-Säule gegeben, die vorher nach Angaben des Herstellers präpariert und zusätzlich mit 200 µL einer 0,5%igen BSA-Lösung gespült worden war.

4.6 Berechnung der viruziden Wirksamkeit

Die Beurteilung der viruziden Wirkung des zu prüfenden Desinfektionsmittels erfolgte durch Berechnung der Titerreduktion gegenüber der jeweils parallel durchgeführten Kontrolltitrationen ohne Desinfektionsmittel. Die Differenz wird als Reduktionsfaktor (RF) angegeben.

5. Ergebnisse

Parallel zu den Inaktivierungsversuchen wurde die Cytotoxizität der 0,7%igen Formaldehyd-Lösung und des Instrumentendesinfektionsmittels ENDO STAR (1,0%) ermittelt. Die als Kontrolle mitgeführte Formaldehyd-Lösung wirkte toxisch auf die eingesetzten KOP-R-Zellen bei Anwendung der 0,1%igen Verdünnung (1 : 1000). Dies bedeutet rechnerisch einen log₁₀ CD₅₀-Wert (in Analogie zum ID₅₀-Wert) von 4,5 (Tabelle 1).

Demgegenüber ergab sich bei der Überprüfung des Instrumentendesinfektionsmittels ENDO STAR (1,0%) eine log₁₀ CD₅₀/mL von 3,5. Damit ist in der 1 : 100-Verdünnung eine Cytotoxizität nachgewiesen worden.

Nach der Behandlung mit den Sephacryl-Säulen reduzierte sich der log₁₀ CD₅₀-Wert für ENDO STAR und für die Formaldehyd-Lösung auf $\leq 1,5$.

Diese Versuche zur Feststellung der Cytotoxizität sind unbedingt erforderlich, um die untere Nachweisbarkeitsschwelle für nichtinaktiviertes BVDV zu determinieren.

Eine parallel durchgeführte Kontrolle des Virustiters vor und nach Behandlung mit den MicroSpin™ S-400 HR-Säulen ergab bei den hier beschriebenen Versuchen keine bzw. eine geringfügige Reduktion, die in allen Fällen unter einer halben \log_{10} -Stufe lag (Daten tabellarisch nicht dargestellt).

Die Untersuchungsergebnisse der Inaktivierungsversuche finden sich in der Tabelle 2 (Rohdaten siehe Appendix). Die 0,7%ige Formaldehyd-Lösung reduzierte den BVDV-Titer nach fünf bzw. 15 Minuten um 1,13 bzw. 3,00 \log_{10} -Stufen. Nach 30 Minuten betrug der RF 4,38 und nach 60 Minuten 4,63.

Das Instrumentendesinfektionsmittel ENDO STAR wurde als 1,0%ige Lösung eingesetzt. Die Einwirkzeiten betragen 15, 30 und 60 Minuten.

Die Tabelle 2 zeigt, dass das geprüfte Instrumentendesinfektionsmittel ENDO STAR eine überragende Wirksamkeit gegenüber dem BVDV aufwies. So war das Instrumentendesinfektionsmittel in der Lage, in allen Ansätzen den initialen Virustiter nach 15 Minuten Einwirkzeit entscheidend zu reduzieren. Die Reduktionsfaktoren betragen $\geq 4,75$ (Ansatz ohne Belastung), $\geq 4,25$ (Ansatz mit BSA) bzw. $\geq 4,50$ (Ansatz mit FKS) und entsprechen in allen Ansätzen einer Inaktivierung von $\geq 99,99\%$ und damit einer Virus-Wirksamkeit. Bekanntlich wird in der Richtlinie des BGA und der DVV immer dann von einer Virus-Wirksamkeit ausgegangen, wenn eine Titerreduktion von gleich oder größer vier \log_{10} -Stufen (Inaktivierung $\geq 99,99\%$) darstellbar ist.



Dr. J. Steinmann

DR. JOCHEN STEINMANN

Wiss. techn. Leiter der
MikroLab GmbH

D-28259 Bremen
Norderoog 2

Tel.: +49 (421) 27819102
Fax: +49 (421) 2760283
E-Mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

01.07.2004
Dr. St/sbe

Laboratorium Dr. H.D. Deppe
Hooghe Weg 35

47906 Kempen

Wirksamkeit von ENDO STAR gegenüber dem Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C

GUTACHTERLICHE BEURTEILUNG

Das Instrumentendesinfektionsmittel ENDO STAR des Laboratoriums Dr. H.D. Deppe wurde gemäß Auftrag auf seine viruziden Eigenschaften gegenüber dem Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) in enger Anlehnung an die Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes (BGA, jetzt Robert Koch-Institut) und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) untersucht. Das BVDV diente dabei als Surrogatvirus für das Hepatitis C Virus, da dieses nicht im Tiermodell und in einem Zellkultursystem zur Vermehrung gebracht werden kann. Durch die Testung dieses Surrogatvirus wird die Möglichkeit geschaffen, Aussagen zu Anwendungsempfehlungen für das zu prüfende Präparat hinsichtlich Hepatitis C zu machen.

In der Richtlinie des BGA und der DVV wird dann von einer Virus-Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels ausgegangen, wenn nach einer bestimmten Einwirkzeit eine Reduktion des initialen Virustiters um \geq vier \log_{10} -Stufen (Inaktivierung \geq 99,99%) erfolgt ist. Das Instrumentendesinfektionsmittel ENDO STAR wurde als 1,0%ige Lösung untersucht. Die Einwirkzeiten betragen 15, 30 und 60 Minuten. Nach 15 Minuten war eine Reduktion des Virustiters um vier \log_{10} -Stufen nachweisbar. Zusammenfassend kann nach diesen Untersuchungsergebnissen empfohlen werden, das Instrumentendesinfektionsmittel ENDO STAR zur BVDV-Inaktivierung wie folgt einzusetzen:

1,0% 15 Minuten


Dr. J. Steinmann

DR. JOCHEN STEINMANN

Wiss. techn. Leiter der
MikroLab GmbH

D-28259 Bremen
Norderoog 2

Tel.: +49 (421) 27819102
Fax: +49 (421) 2760283
E-Mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

2004-07-01
Dr. St/sbe

Laboratorium Dr. H.D. Deppe
Hooghe Weg 35

47906 Kempen

BVDV efficacy of ENDO STAR in a quantitative suspension test at 20°C

EXPERT'S INVESTIGATION REPORT

The virucidal efficacy of the instrument disinfectant ENDO STAR from Laboratorium Dr. H.D. Deppe against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) was investigated by a quantitative suspension test according to the guideline of the Bundesgesundheitsamt (Federal Board of Health) and the Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (German Association for the Control of Virus Diseases). BVDV was chosen as a surrogate virus for hepatitis C virus since there is no animal model or tissue culture system for growing this virus. Testing this surrogate virus the possibility is created to give recommendations for the inactivation of HCV by the disinfectant.

According to this suspension test, a disinfectant or a disinfectant solution at a particular concentration is considered as having virucidal efficacy if within the recommended exposure period the titre is reduced by 4 logs₁₀.

ENDO STAR was examined as a 1.0%. The exposure times were 15, 30 and 60 minutes. After an exposure time of 15 minutes virus reduction exceeded 4 log₁₀-steps. Summarizing the results of the experiments it can be recommended to use the instrument disinfectant ENDO STAR for the inactivation of BVDV as follows:

1.0% 15 min.


Dr. J. Steinmann

Literatur

1. Agolini, G., A. Russo and M. Clement:
Effect of phenolic chlorine disinfectants on hepatitis C virus binding and infectivity.
Am J Infect Control 1999; 17: 236-239
2. Sattar, S.A., J. Tetro, V.S. Springthorpe and A. Giulivi:
Preventing the spread of hepatitis B and C viruses: Where are germicides relevant ?
Am J Infect Control 2001; 29: 187-197
3. Zitzmann, N., A.S. Mehta, S. Carrouée, T.D. Butters, F.M. Platt et al.:
Imino sugars inhibit the formation and secretion of bovine viral diarrhea virus, a pestivirus model of hepatitis C virus: Implications for the development of broad spectrum anti-hepatitis virus agents.
Proc Natl Acad Sci USA, 1999; 96: 11878-11882
4. Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren.
Bundesgesundheitsblatt 1982; 25: 397-398
5. Kommentar zur Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren.
Bundesgesundheitsblatt 1983; 26: 413-414
6. Spearman, C.: The method of 'right or wrong cases' (constant stimuli) without Gauss's formulae.
Brit J Psychol 1908; 2: 227-242
7. Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch Exp Path Pharmac 1931; 162: 480-487

Tabelle 1: Cytotoxizität von ENDO STAR (1,0%) und der 0,7%igen Formaldehyd-Lösung vor und nach Behandlung mit MicroSpin™ S-400 HR-Säulen.

Konzentration	Belastung	Verdünnungsstufen				
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
vor Behandlung						
1,0%	ohne	+	+	-	-	-
1,0%	0,2% BSA	+	+	-	-	-
1,0%	10,0% FKS	+	+	-	-	-
Formaldehyd-Konzentration						
0,7%	ohne	+	+	+	-	-
nach Behandlung						
1,0%	ohne	-	-	-	-	-
1,0%	0,2% BSA	-	-	-	-	-
1,0%	10,0% FKS	-	-	-	-	-
Formaldehyd-Konzentration						
0,7%	ohne	-	-	-	-	-

Tabelle 2: Inaktivierung des BVDV durch ENDO STAR (1,0%) und Formaldehyd (0,7%) im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C ± 1°C nach Behandlung mit MicroSpin™ S-400 HR-Säulen.

Produkt	Konz.	Belastung	Reduktion				≥ 4 log ₁₀ nach
			15 Min.	30 Min.	60 Min.	120 Min.	
Prüfpräparat	1,0%	ohne	≤ 1,50	≤ 1,50	≤ 1,50	n.d.	15 Min.
Prüfpräparat	1,0%	0,2% BSA	≤ 1,50	≤ 1,50	≤ 1,50	n.d.	15 Min.
Prüfpräparat	1,0%	10,0% FKS	≤ 1,50	≤ 1,50	≤ 1,50	n.d.	15 Min.
Formaldehyd	0,7%	ohne	5 Min.	15 Min.	30 Min.	60 Min.	
Virus-Kontrollprobe	n.a.	ohne	5,12	3,75	1,87	1,62	30 Min.
Virus-Kontrollprobe	n.a.	0,2% BSA	n.d.	n.d.	n.d.	6,25	n.a.
Virus-Kontrollprobe	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	5,75	n.a.
			n.d.	n.d.	n.d.	6,00	n.a.

n.a. = nicht anwendbar

n.d. = nicht durchgeführt

Appendix Tabelle 1: Rohdaten für EndoStar (BGA/DVV) nach Behandlung mit MicroSpin™ S-400 HR Säulen

Produkt	Konzentration	Interferierende Substanz	Einwirkzeit (min)	Verdünnungen (log ₁₀)												
				1	2	3	4	5	6	7	8	9				
Endostar	1,0%	Aqua bidest.	15	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	
			30	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.
			60	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.
			120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	1,0%	0,2% BSA	15	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.
			30	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.
			60	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.
			120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	1,0%	10,0% FKS	15	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.
			30	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.
			60	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.
			120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EndoStar Cytotoxizität	1,0%	Aqua bidest.	n.a.	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	
Viruskontrolle	n.a.	Aqua bidest.		4444	4444	4444	4444	4444	4444	3030	0300	0000	0000	n.d.	n.d.	
				4444	4444	4444	4444	4444	3320	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.
				4444	4444	4444	4444	4444	0030	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.
		10,0% FKS		4444	4444	4444	4444	4444	0003	0000	0000	0000	n.d.	n.d.		
		10,0% FKS		4444	4444	4444	4444	4444	3330	0000	0000	0000	n.d.	n.d.		

n.a. = nicht anwendbar
n.d. = nicht durchgeführt

CT:cytotoxisch

0 = kein Virus vorhanden

1 bis 4 = Virus vorhanden (Grad des CPE in 8 Wells einer Mikrotiterplatte)

Appendix Tabelle 2: Rohdaten für die Formaldehyd-Kontrolle nach Behandlung mit MicroSpin™ S-400 HR Säulen

Produkt	Konzentration	Interferierende Substanz	Einwirkzeit (min)	Verdünnungen (log ₁₀)											
				1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Formaldehyd	0,7% (m/V)	PBS	5	4444	4444	4444	3300	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.		
				4444	4444	4444	0333	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
				4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
				4444	4444	0033	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
Formaldehyd Cytotoxizität	0,7% (m/V)	PBS	n.a.	0030	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.		
				0203	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
				0300	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
				0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	
				0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.

n.a. = nicht anwendbar
n.d. = nicht durchgeführt

CT: cytotoxisch

0 = kein Virus vorhanden

1 bis 4 = Virus vorhanden (Grad des CPE in 8 Wells einer Mikrotiterplatte)