

Prüfbericht und Gutachten
für

Laboratorium Dr. rer. nat. H. D. Deppe

Hooghe Weg 35
47906 Kempen
(<http://www.dr-deppe.de>)

**Untersuchungen
zur Wirksamkeit von

Spray in Neu**

gegenüber dem

**Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)
(Surrogat für HCV)**

im
quantitativen Suspensionsversuch

Testmethode nach der Leitlinie der DVV und des RKI
(in der Fassung vom 15. Juni 2005)

Dr. Jochen Steinmann
MikroLab GmbH
Norderoog 2
D-28259 Bremen

Phone: +49 (0) 421-27819102
Fax: +49 (0) 421-2760283
E-mail: MikroLab.GmbH@t-online.de
<http://www.mikrolab-gmbh.de>

06.11.2006



PRÜFBERICHT D06ML359B

1. Laboratorium

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

2. Identifizierung der Probe (Prüfgegenstand)

Auftraggeber	Laboratorium Dr. rer. nat. H. D. Deppe
Produktbezeichnung	Spray in Neu
Anwendungsbereich	Flächendesinfektion
Chargennummer	29080601
Herstellungsdatum	-
Verfall	-
Aktive Substanz(en) und ihre Konzentration(en) in 100 g	43,0 g Ethanol (99 %) 0,05 g Didecyldimethylammoniumchlorid
Aussehen und Geruch	klare, farblose Flüssigkeit produktspezifisch
pH-Wert(e) (Glaselektrode)	unverdünnt: 5,48 (20°C)
Lagerbedingungen	Raumtemperatur, dunkel (Aufbewahrungsbereich nicht frei zugänglich)
Lieferdatum	04.09.2006

3. Material

3.1 Medium und Reagenzien

- Eagle`s Minimum Essential Medium mit Earle`s BSS (EMEM, Cambrex Bio Science Verviers s.p.r.l., Katalog Nr. 12-125F)
- Fötales Kälberserum (Biochrom AG, Artikel Nr. S 0115)
- Formaldehydlösung (Riedel-de-Häen, Artikel Nr. 33220)
- Aqua bidest. (Fresenius Kabi Deutschland, Artikel Nr. P2N 1636071)
- PBS (Invitrogen, Artikel Nr. 18912-014)
- MicroSpin™ S-400 HR-Säulen (Amersham Biosciences Europe GmbH, Artikel Nr. 27-5140-01)



3.2 Virus und Zellen

Das BVDV Stamm NADL (VR-534) stammte von Frau Dr. Stephanie Bendfeldt, Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Vor den Inaktivierungsversuchen wurde das Virus einmal in primären Kälbernierenzellen und fünfmal in KOP-R-Zellen (Ösopharynxgewebe vom Rind) passagiert.

Die KOP-R-Zellen (Passage 42) stammten von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere auf der Insel Riems (Dr. R. Riebe, Katalog Nr. RIE 244). Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf morphologische Veränderungen und auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht. Morphologische Veränderungen und Mykoplasmen konnten dabei wiederholt nicht nachgewiesen werden.

3.3 Geräte

- Brutschrank (CO₂-Inkubator, Nunc GmbH & Co. KG, Modell QWJ 350)
- Vortex Mischer (Genie Mischer, Typ G 560E)
- pH-Meter 315i (WTW, Artikel Nr. 2A10-100)
- Tischzentrifuge (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Typ 113)
- Umkehrmikroskop (Olympus, Typ CK 30)
- Zentrifuge 5804 R (Eppendorf AG)

Wasserbad (JULABO, Julabo U 3)

4. Prüfbedingungen

Prüftemperatur	20°C ± 0,5°C
Produktkonzentration	unverdünnt (80,0 %) und 10,0 % (unwirksamer Bereich)
Einwirkzeiten	0,5, 1,0, 2,0 und 5,0 Minuten
Eiweißbelastung	10,0 % fötales Kälberserum
Aufhebung der Desinfektionsmittelwirkung	Gelfiltration
Verdünnungsmittel	Wasser standardisierter Härte (10,0 %)
Virusstamm	BVDV Stamm NADL
Zeitraum der Prüfung	04.09.2006 –06.11.2006
Abschluss der Prüfung	06.11.2006



5. Methoden

5.1 Herstellung der Virussuspension

Für die Herstellung der Virussuspension wurden KOP-R-Zellen, die mit Eagle's Minimum Essential Medium und 10 % bzw. 2 % fötalem Kälberserum (keine Antikörper gegen BVDV nachweisbar) kultiviert worden sind, in 175 cm² Zellkulturflaschen (Nunc GmbH & Co. KG, Artikel Nr. 156502) mit dem BVDV beimpft. Nach Ausbildung des zytopathogenen Effektes (CPE) (nach ca. 3-4 Tagen) folgte ein Einfrier-/Auftauvorgang. Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 3000 UpM und 4°C für zehn Minuten entfernt. Der Überstand wurde als Virussuspension gewonnen, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

5.2 Desinfektionsmittel

Das Prüfpräparat ist unverdünnt eingesetzt worden. Bedingt durch die Zugabe von Virussuspension und Belastungssubstanz resultierte eine 80,0 %ige Prüfkonzentration.

Ferner wurde das zu prüfende Desinfektionsmittel mit Wasser standardisierter Härte verdünnt, um den unwirksamen Bereich (10,0 %) darzustellen.

5.3 Inaktivierungsversuche und Kontrollansätze

Die Inaktivierungsversuche sind entsprechend der Leitlinie der DVV und des RKI durchgeführt worden (1). Acht Volumenanteile des Desinfektionsmittels wurden mit einem Volumenanteil Virussuspension und einem Volumenanteil Aqua bidest. vermischt. Bei den Versuchen mit Eiweißbelastung wurde anstelle von Aqua bidest. ein Volumenanteil fötales Kälberserum zugegeben.

Bedingt durch eine vereinfachte Handhabung und die in geringer Menge zur Verfügung stehende Virusstammlösung belief sich das Endvolumen auf 1 mL.

Für die Bestimmung des initialen Virustiters im Inaktivierungsversuch wurden Kontrollansätze (Viruskontrollen) nach der längsten der geprüften Einwirkzeiten mitgeführt. Ein Volumenanteil der Virussuspension ist mit neun Volumenanteilen Aqua bidest. bzw. mit einem Volumenanteil fötalem Kälberserum und acht Volumenanteilen Aqua bidest. gemischt worden.

Ein weiterer Kontrollansatz des Prüfsystems bestand aus einem Volumenanteil Virussuspension, vier Volumenanteilen PBS (0,1 M, pH-Wert 7,0) und fünf Volumenanteilen



einer 1,4 %igen (w/v) Formaldehyd-Lösung. Die Einwirkzeiten für diese Kontrolle betragen 5, 15, 30 und 60 Minuten.

Für die Bestimmung der Zytotoxizität des Desinfektionsmittels wurden zwei Volumenanteile Aqua bidest. mit acht Volumenanteilen des Desinfektionsmittels bzw. der Desinfektionsmittelverdünnung gemischt und nach serieller Verdünnung in Zehnerschritten in die Mikrotiterplatte überführt. Da in Vorversuchen festgestellt wurde, dass die Zytotoxizität so stark war, dass eine Abnahme des Infektiositätstiters um vier \log_{10} -Stufen nicht mehr gewährleistet ist, wurde die Zytotoxizität nach Ablauf der Einwirkungszeit mittels Gelfiltration vermindert. Hierfür wurden unmittelbar nach Ablauf der Einwirkzeit jeweils 100 μL der Ansätze auf eine MicroSpinTM S-400 HR-Säule gegeben, die vorher nach den Angaben des Herstellers präpariert worden war.

Entsprechende Kontrollen für den Nachweis, dass der Virustiter durch den Einsatz der Säulen nicht beeinträchtigt wird, wurden mitgeführt.

Für die Kontrolle der Zellsuszeptibilität (Interferenzkontrolle) wurden zwei Volumenanteile Aqua bidest. bzw. ein Volumenanteil fötales Kälberserum und ein Volumenanteil Aqua bidest. mit acht Volumenanteilen des Desinfektionsmittels (PBS als Kontrolle) vermischt, auf die MicroSpinTM S-400 HR-Säule gegeben und nach Zentrifugation und entsprechender Verdünnung zu den vorgelegten Zellen pipettiert. Nach sechs Tagen ist eine vergleichende Titration der Virussuspension auf den derart vorbehandelten und auf unbehandelten (PBS) Zellen vorgenommen worden.

Alle Versuchsansätze wurden in geschlossenen Plastikröhrchen (Sarstedt AG & Co., Artikel Nr. 55.468.001) in einem Wasserbad bei $20^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Nach den einzelnen Einwirkzeiten wurden Teilmengen entnommen, und die Restinfektiosität der Ansätze ist bestimmt worden.

Die Inaktivierungsansätze sind in zwei vollständig unabhängigen Versuchen an unterschiedlichen Versuchstagen durchgeführt worden.

Eine Nachwirkungskontrolle, wie sie in der Leitlinie der DWV und des RKI beschrieben ist, wurde nicht mitgeführt, da die einzelnen Verdünnungsreihen sofort nach Ablauf der Einwirkzeiten durchgeführt wurden.



Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Kontrollen wurde eine Zellkontrolle mitgeführt, in der die Zellen entsprechend der Versuchansätze nur mit Zellkulturmedium versehen worden sind.

5.4 Bestimmung der Infektiosität

Die Bestimmung der Infektiosität erfolgte mit Hilfe der Endpunkttitration im Mikrotiter-Verfahren. Dabei wurden die Proben nach ihrer Entnahme zunächst in eiskaltem Medium mit dem Faktor 10 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 100 µL der einzelnen Verdünnungen in acht Kavitäten einer sterilen 96-well Mikrotiterplatte (Nunc GmbH & Co. KG, Artikel Nr. 149026) mit präformiertem Monolayer aus KOP-R-Zellen überführt (pro Kavität ca. 10-15 x 10³ Zellen) und die Platten bei 37°C im CO₂-Brutschrank (5 % CO₂-Gehalt) inkubiert. Nach 10 Tagen erfolgte die Auswertung der Ansätze über die Beurteilung des virusspezifischen CPE in den einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte mit einem inversen Mikroskop. Die Berechnung des Virustiters als infektiöse Dosis (TCID₅₀) wurde nach der Methode von Spearman (2) und Kärber (3) mit folgender Formel vorgenommen:

$$\log_{10} \text{TCID}_{50} = X_0 + 0,5 - \sum r/n.$$

Dabei ist:

X_0 = log₁₀ der niedrigsten Verdünnung mit 100 % positiver Reaktion

r = Anzahl der positiven Bestimmungen der niedrigsten Verdünnungsstufe mit 100 % positiver und aller höheren positiven Verdünnungsstufen

n = Anzahl der Bestimmungen pro Verdünnungsstufe.

5.5 Berechnung und Bewertung der virusinaktivierenden Wirksamkeit

Die Beurteilung der virusinaktivierenden Wirksamkeit des zu prüfenden Desinfektionsmittels erfolgte durch Berechnung des Titerabfalls (Subtraktion) gegenüber der jeweils parallel durchgeführten Kontrolltitration ohne Desinfektionsmittel (Viruskontrollprobe). Die Differenz wurde als Reduktionsfaktor (RF) mit dem 95 % Konfidenzintervall angegeben.

Nach der Leitlinie der DVV und des RKI kann immer dann von einer Virus-Wirksamkeit ausgegangen werden, wenn eine Titerreduktion von ≥ 4 log₁₀-Stufen (Inaktivierung $\geq 99,99$ %) darstellbar ist (1).



6. Ergebnisse

6.1 Bestimmung der Zytotoxizität

Parallel zu den Inaktivierungsversuchen wurde die Zytotoxizität des Flächendesinfektionsmittels Spray in Neu (80,0 % und 10,0 %) und der 0,7 %igen Formaldehyd-Lösung ermittelt (Tabelle 1).

Die als Kontrolle mitgeführte Formaldehyd-Lösung wirkte toxisch auf die eingesetzten KOP-R-Zellen bei der Anwendung einer 1:1000-Verdünnung. Dies bedeutet rechnerisch einen $\log_{10}CD_{50}/mL$ -Wert (CD_{50} = zytotoxische Dosis, in Analogie zum $TCID_{50}$ -Wert) von 4,50 (siehe Tabelle 1).

Bei der Überprüfung von Spray in Neu (80,0 % und 10,0 %) ergab sich einheitlich eine $\log_{10}CD_{50}/mL$ von 2,50. Somit ist in der 1:10-Verdünnung eine Zytotoxizität nachgewiesen (Tabelle 1).

Nach der Behandlung mit den MicroSpinTM S-400 HR-Säulen reduzierte sich der $\log_{10}CD_{50}/mL$ -Wert für Spray in Neu (80,0 %) auf $\leq 1,50$.

Diese Versuche zur Feststellung der Zytotoxizität sind unbedingt erforderlich, um die untere Nachweisbarkeitsschwelle für nicht inaktiviertes BVDV zu determinieren.

6.2 Kontrolle der Zellsuszeptibilität (Interferenzkontrolle)

Mittels dieser Kontrolle sollte gezeigt werden, dass die Suszeptibilität der Zellen für die Virusinfektion durch die Behandlung mit dem Desinfektionsmittel in einer gerade nicht mehr toxischen Konzentration nicht beeinflusst wurde.

Die Differenz des Titers der Viruskontrollprobe auf den mit Desinfektionsmittel vorbehandelten Zellen im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle (PBS) betrug weniger als 0,5 \log_{10} (Tabelle 2; Rohdaten siehe Appendix). Somit ergab sich keine Beeinflussung der Zellen durch das geprüfte Desinfektionsmittel.

6.3 Virusinaktivierende Wirksamkeit der Formaldehyd-Kontrolle

Die als Referenzlösung mitgeführte 0,7 %ige Formaldehyd-Lösung reduzierte den BVDV-Titer nach 5 bzw. 15 Minuten um $\geq 0,63 \pm 0,51$ bzw. $\geq 1,00 \pm 0,35$ \log_{10} -Stufen. Nach 30 und 60 Minuten betragen die RF $\geq 1,00 \pm 0,35$ (Tabelle 2; Rohdaten siehe Appendix).



6.4 Virusinaktivierende Wirksamkeit des Desinfektionsmittels

Die Untersuchungsergebnisse der Inaktivierungsversuche finden sich in den Tabellen 2 bis 4 (Rohdaten siehe Appendix). Auf eine graphische Darstellung der Resultate ist aufgrund der fehlenden Kinetik der Virus-Inaktivierung verzichtet worden.

Das Flächendesinfektionsmittel Spray in Neu wurde unverdünnt (80,0 %) und als 10,0 %ige Lösung (Darstellung des unwirksamen Bereiches) bei 20°C eingesetzt. Die gewählten Einwirkzeiten betragen 0,5, 1,0, 2,0 und 5,0 Minuten.

Spray in Neu wies unverdünnt in beiden Ansätzen eine Wirksamkeit gegenüber dem BVDV auf. Bereits nach 30 Sekunden Einwirkzeit war in allen Ansätzen, also auch in Gegenwart der interferierenden Substanz, kein BVDV mehr zu detektieren. Die Reduktionsfaktoren betragen zu diesem Zeitpunkt $\geq 4,13 \pm 0,25$ bzw. $\geq 4,13 \pm 0,25$ (Ansatz ohne Belastung) und $\geq 4,13 \pm 0,25$ bzw. $\geq 4,25 \pm 0,33$ (Ansatz mit FKS). Dies entspricht in allen Fällen einer Inaktivierung von $\geq 99,99$ % und demonstriert damit eine Virus-Wirksamkeit.

Daraus errechnen sich folgende mittlere RF: $\geq 4,13 \pm 0,18$ (Ansatz ohne Belastung) und $\geq 4,19 \pm 0,21$ (Ansatz mit FKS).

Bei der Überprüfung der 10,0 %igen Lösung ließ sich nach zwei Minuten (Ansatz ohne Belastung) bzw. einer Minute (Ansatz mit Belastung) kein Virus mehr detektieren (Tabelle 4). Die entsprechenden Reduktionsfaktoren betragen $\geq 3,00 \pm 0,35$ bzw. $\geq 3,00 \pm 0,00$.

- Dr. J. Steinmann -

Wiss. techn. Leiter der MikroLab GmbH



7. Qualitätssicherung

Eine Qualitätssicherung der Ergebnisse erfolgte u.a. dadurch, dass die Bestimmung der virusinaktivierenden Eigenschaften von Desinfektionsmitteln in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der Guten Laborpraxis (GLP) durchgeführt wurde.

- 1) Chemikaliengesetz der Bundesrepublik Deutschland, Anhang 1, datiert vom 01.08 1994 (BGBl. I, 1994, S. 1703). Anhang zuletzt geändert am 14. Mai 1997 (BGBl. I, 1997, S. 1060)
- 2) OECD Grundsätze der Guten Laborpraxis (überarbeitet 1997); OECD Environmental Health and Safety Publications; Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring – Number 1. Environment Directorate, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris 1998.

Die Plausibilität der Ergebnisse wurde zusätzlich durch die unterschiedlichen Kontrollen gesichert, die in den Inaktivierungsansätzen mitgeführt wurden (siehe 5.3).

8. Archivierung

Ein Original des Prüfberichtes und alle Protokolle der Schriftwechsel wurden im Archiv der MikroLab GmbH archiviert.

Gemäß DIN EN ISO/IEC 17025:2000 übernimmt die MikroLab GmbH keine inhaltliche Verantwortung für eine eventuell sinnentstellende Darstellung der Prüfmethode und Prüfergebnisse aufgrund von auszugsweiser Wiedergabe des vorliegenden Prüfberichtes.



9. Literatur

1. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Institutes (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin (in der Fassung vom 15. Juni 2005)
Hyg & Med, 30, 2005, 460-467
2. Spearman, C.: The method of 'right or wrong cases' (constant stimuli) without Gauss's formulae.
Brit J Psychol; 2 1908, 227-242
3. Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch Exp Path Pharmac; 162, 1931, 480-487

Tabelle 1: Zytotoxizität von Spray in Neu und der 0,7%igen Formaldehyd-Lösung vor und nach Behandlung mit MicroSpin™ S-400 HR-Säulen.

vor Behandlung	Konz.	Belastung	Verdünnungsstufen				
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Prüfpräparat	10,0%	Aqua bidest.	+	-	-	-	-
Prüfpräparat	10,0%	10,0% FKS	+	-	-	-	-
Prüfpräparat	80,0%	Aqua bidest.	+	-	-	-	-
Prüfpräparat	80,0%	10,0% FKS	+	-	-	-	-
Formaldehyd	0,7%	PBS	+	+	+	-	-
nach Behandlung			Verdünnungsstufen				
	Konz.	Belastung	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵
Prüfpräparat	10,0%	Aqua bidest.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prüfpräparat	10,0%	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prüfpräparat	80,0%	Aqua bidest.	-	-	-	-	-
Prüfpräparat	80,0%	10,0% FKS	-	-	-	-	-
Formaldehyd	0,7%	PBS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 2 (1. Ansatz): Inaktivierung des BVDV durch Spray in Neu (80,0%) und Formaldehyd (0,7%) im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C.

Produkt	Konz.	Belastung	log ₁₀ TCID ₅₀ /mL einschließlich 95% Konfidenzintervall nach					Reduktionsfaktor einschließlich 95% Konfidenzintervall nach					≥ 4 log ₁₀ Reduktion nach
			0,5 min	1,0 min	2,0 min	5,0 min		0,5 min	1,0 min	2,0 min	5,0 min		
Prüfpräparat	80,0%	Aqua bid.	≤1,50±0,00	≤1,50±0,00	≤1,50±0,00	≤1,50±0,00	≥4,13±0,25	≥4,13±0,25	≥4,13±0,25	≥4,13±0,25	0,5 min		
Prüfpräparat	80,0%	10,0% FKS	≤1,50±0,00	≤1,50±0,00	≤1,50±0,00	≤1,50±0,00	≥4,13±0,25	≥4,13±0,25	≥4,13±0,25	≥4,13±0,25	0,5 min		
			log₁₀ TCID₅₀/mL einschließlich 95% Konfidenzintervall nach										
Kontrollen	Konz.	Belastung	5 min	15 min	30 min	60 min	5 min	15 min	30 min	60 min	≥ 4 log₁₀ Reduktion nach		
Formaldehyd	0,7%	PBS	≤4,88±0,37	≤4,50±0,00	≤4,50±0,00	≤4,50±0,00	0,63±0,51	≥1,00±0,35	≥1,00±0,35	≥1,00±0,35	≥ 15 min		
Viruskontr.	n.a.	Aqua bid.	n.d.	n.d.	n.d.	5,50±0,35	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
Viruskontr.	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	5,75±0,33	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
Viruskontr. (S)	n.a.	Aqua bid.	n.d.	n.d.	n.d.	5,63±0,25	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
Viruskontr. (S)	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	5,63±0,25	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
Interferenz- Kontrolle PBS	n.a.	Aqua bid.	n.d.	n.d.	n.d.	6,13±0,37	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
Interferenz- Kontrolle Des.	n.a.	Aqua bid.	n.d.	n.d.	n.d.	5,88±0,37	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
Interferenz- Kontrolle Des.	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	5,88±0,37	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		

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

Viruskontr. (S) = Viruskontrolle mit Säule

Tabelle 3 (2. Ansatz): Inaktivierung des BVDV durch Spray in Neu (80,0%) und Formaldehyd (0,7%) im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C.

Produkt	Konz.	Belastung	log ₁₀ TCID ₅₀ /mL einschließlich 95% Konfidenzintervall nach					Reduktionsfaktor einschließlich 95% Konfidenzintervall nach					≥ 4 log ₁₀ Reduktion nach
			0,5 min	1,0 min	2,0 min	5,0 min		5 min	15 min	30 min	60 min		
Prüfpräparat	80,0%	Aqua bid.	≤1,50±0,00	≤1,50±0,00	≤1,50±0,00	≤1,50±0,00	≥4,13±0,25	≥4,13±0,25	≥4,13±0,25	≥4,13±0,25	0,5 min		
Prüfpräparat	80,0%	10,0% FKS	≤1,50±0,00	≤1,50±0,00	≤1,50±0,00	≤1,50±0,00	≥4,25±0,33	≥4,25±0,33	≥4,25±0,33	≥4,25±0,33	0,5 min		
Kontrollen	Konz.	Belastung	log ₁₀ TCID ₅₀ /mL einschließlich 95% Konfidenzintervall nach										≥ 4 log ₁₀ Reduktion nach
Formaldehyd	0,7%	PBS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Viruskontr.	n.a.	Aqua bid.	n.d.	n.d.	n.d.	5,63±0,25	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Viruskontr.	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	5,50±0,00	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Viruskontr. (S)	n.a.	Aqua bid.	n.d.	n.d.	n.d.	5,63±0,25	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Viruskontr. (S)	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	5,75±0,33	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Interferenz-Kontrolle PBS	n.a.	Aqua bid.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Interferenz-Kontrolle Des.	n.a.	Aqua bid.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	
Interferenz-Kontrolle Des.	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	

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

Viruskontr. (S) = Viruskontrolle mit Säule

Tabelle 4: Inaktivierung des BVDV durch Spray in Neu (10,0%) und Formaldehyd (0,7%) im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C.

Produkt	Konz.	Belastung	log ₁₀ TCID ₅₀ /mL einschließlich 95% Konfidenzintervall nach					Reduktionsfaktor einschließlich 95% Konfidenzintervall nach					≥ 4 log ₁₀ Reduktion nach
			0,5 min	1,0 min	2,0 min	5,0 min	5 min	15 min	30 min	60 min			
Prüfpräparat	10,0%	Aqua bid.	≤2,88±0,37	≤2,63±0,25	≤2,50±0,00	≤2,50±0,00	≥2,63±0,51	≥2,88±0,43	≥3,00±0,35	≥3,00±0,35	≥ 2,0 min		
Prüfpräparat	10,0%	10,0% FKS	≤2,88±0,37	≤2,50±0,00	≤2,50±0,00	≤2,50±0,00	≥2,63±0,37	≥3,00±0,00	≥3,00±0,00	≥3,00±0,00	≥ 1,0 min		
Kontrollen	Konz.	Belastung	log ₁₀ TCID ₅₀ /mL einschließlich 95% Konfidenzintervall nach					Reduktionsfaktor einschließlich 95% Konfidenzintervall nach					≥ 4 log ₁₀ Reduktion nach
Formaldehyd	0,7%	PBS	5 min	15 min	30 min	60 min	5 min	15 min	30 min	60 min	n.d.		
Viruskontr.	n.a.	Aqua bid.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.		
Viruskontr.	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	5,50±0,35	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
Viruskontr. (S)	n.a.	Aqua bid.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
Viruskontr. (S)	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
Interferenz-Kontrolle PBS	n.a.	Aqua bid.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
Interferenz-Kontrolle Des.	n.a.	Aqua bid.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		
Interferenz-Kontrolle Des.	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.		

n.d. = nicht durchgeführt n.a. = nicht anwendbar Viruskontr. (S) = Viruskontrolle mit Säule

DR. JOCHEN STEINMANN
Wiss. techn. Leiter der
MikroLab GmbH

Norderoog 2
D-28259 Bremen

phone: +49 (421) 27819102
fax: +49 (421) 2760283
<http://www.mikrolab-gmbh.de>
E-Mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

2006-11-06
Dr. St/NM

Laboratorium Dr. rer. nat. H. D. Deppe
Hooghe Weg 35

47906 Kempen

BVDV efficacy of Spray in Neu in a quantitative suspension test at 20°C

EXPERT OPINION

The virus-inactivating properties of the surface disinfectant Spray in Neu of Laboratorium Dr. rer. nat. H. D. Deppe against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strain NADL were investigated by a quantitative suspension test according to the guideline of the Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (German Association for the Control of Virus Diseases) and of the Robert Koch-Institute (RKI).

BVDV was chosen as a surrogate of hepatitis C virus (HCV) since there is no animal model or cell 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 virus-inactivating properties if within the recommended exposure period the titre is reduced by $\geq 4 \log_{10}$ (inactivation $\geq 99.99\%$).

Spray in Neu was examined undiluted at 20°C. The exposure times were 0.5, 1.0, 2.0 and 5.0 minutes. After an exposure time of 30 s virus reduction exceeded 4 \log_{10} -steps in all assays. Due to the lack of guidelines simulating practical conditions, results of the quantitative suspension test lead to the recommendation to use the instrument disinfectant Spray in Neu for inactivation of BVDV (surrogate of HCV) as follows:



Dr. J. Steinmann

undiluted

30 s

DR. JOCHEN STEINMANN

Wiss. techn. Leiter der
MikroLab GmbH

Norderoog 2
D-28259 Bremen

Tel.: +49 (421) 27819102
Fax: +49 (421) 2760283
<http://www.mikrolab-gmbh.de>
E-Mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

06.11.2006
Dr. St/NM

Laboratorium Dr. rer. nat. H. D. Deppe
Hooghe Weg 35

47906 Kempen

BVDV-Wirksamkeit Wirksamkeit von Spray in Neu im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C

GUTACHTEN

Das Flächendesinfektionsmittel Spray in Neu des Laboratoriums Dr. rer. nat. H. D. Deppe wurde gemäß Auftrag auf seine virusinaktivierenden Eigenschaften gegenüber dem BVDV Stamm NADL nach der Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) und des Robert Koch-Institutes (RKI) untersucht.

Das Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) diente dabei als Surrogatvirus für das Hepatitis C Virus (HCV), da dieses nicht im Tiermodell oder einem Zellkultursystem zur Vermehrung gebracht werden kann. Durch die Testung dieses Surrogatvirus wird die Möglichkeit geschaffen, Aussagen zu Anwendungsempfehlungen für das zu prüfende Präparat bezüglich der Inaktivierung des HCV zu machen.

In der Leitlinie der DVV und des RKI wird dann von einer Virus-Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels ausgegangen, wenn nach einer bestimmten Einwirkzeit eine Reduktion des initialen Virustiters um $\geq 4 \log_{10}$ -Stufen (Inaktivierung $\geq 99,99\%$) erfolgt ist.

Das Flächendesinfektionsmittel Spray in Neu wurde unverdünnt bei 20°C untersucht. Die Einwirkzeiten betragen 0,5, 1,0, 2,0 und 5,0 Minuten. Nach 30 Sekunden war eine Reduktion des Virustiters in allen Ansätzen um \geq vier \log_{10} -Stufen nachweisbar. Nach diesen Ergebnissen des quantitativen Suspensionsversuchs kann in Ermangelung praxisnaher Prüfrichtlinien empfohlen werden, das Flächendesinfektionsmittel Spray in Neu zur BVDV-Inaktivierung (Surrogat für HCV) wie folgt einzusetzen:

unverdünnt 30 Sekunden


Dr. J. Steinmann

Appendix Tabelle 1: Rohdaten (BVDV) für Spray in Neu (DVV/RKI) nach Behandlung mit MicroSpin™ S-400 HR Säulen (1. Versuch)

Produkt	Konzentration	Inertierende Substanz	Elowirkzeit (min)	Verdünnungen (log ₁₀)												
				1	2	3	4	5	6	7	8	9				
Spray in Neu	80,0%	Aqua bidest.	0,5	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	
			1,0	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.
			2,0	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.
		5,0	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	
		0,5	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	
		1,0	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	
	10,0% FKS	2,0	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	
		5,0	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	
		n.a.	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	
		n.a.	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	
		n.a.	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	
		n.a.	tttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	
Spray in Neu Zytotoxizität ohne Säulen	80,0%	Aqua bidest.	n.a.	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.		
		10,0% FKS	n.a.	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.		
		Aqua bidest.	n.a.	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.		
Spray in Neu Zytotoxizität mit Säulen	80,0%	Aqua bidest.	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4440	0030	0000	0000	n.d.		
		10,0% FKS	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	n.d.	
		Aqua bidest.	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	n.d.	
Viruskontrolle mit Säule	n.a.	10,0% FKS	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	n.d.	n.d.	
		Aqua bidest.	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	n.d.	n.d.
Viruskontrolle ohne Säule	n.a.	10,0% FKS	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	n.d.	n.d.	
		Aqua bidest.	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4444	n.d.	n.d.

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

t = zytotoxisch

0 = kein Virus nachweisbar
1 bis 4 = Virus vorhanden (Grad des CPE in 8 Kavitäten einer Mikrotiterplatte)

Appendix Tabelle 2: Rohdaten (BVDV) für Spray in Neu (DVV/RKI) nach Behandlung mit MicroSpin™ S-400 HR Säulen (2. Versuch)

Predictor	Konzentration	Inhibierende Substanz	Einwirkzeit (min)	Verdünnungen (log ₁₀)														
				1	2	3	4	5	6	7	8	9						
Spray in Neu	80,0%	Aqua bidest.	0,5	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
			1,0	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
			2,0	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
		5,0	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
		0,5	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
		1,0	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
	10,0% FKS	2,0	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
		5,0	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
		n.a.	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		n.a.	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		n.a.	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		n.a.	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Spray in Neu Zytotoxizität ohne Säulen	80,0%	Aqua bidest.	n.a.	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
		10,0% FKS	n.a.	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
		10,0% FKS	n.a.	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Spray in Neu Zytotoxizität mit Säulen	80,0%	Aqua bidest.	n.a.	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
		10,0% FKS	n.a.	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
		10,0% FKS	n.a.	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Viruskontrolle mit Säule	n.a.	Aqua bidest.	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0004	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.		
		10,0% FKS	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
		10,0% FKS	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0033	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
Viruskontrolle ohne Säule	n.a.	Aqua bidest.	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	4000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
		10,0% FKS	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
		10,0% FKS	n.a.	4444	4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	

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

t = zytotoxisch

0 = kein Virus nachweisbar
1 bis 4 = Virus vorhanden (Grad des CPE in 8 Kavitäten einer Mikrotiterplatte)

Appendix Tabelle 3: Rohdaten (BVDV) für Spray in Neu (DV/IRKI)

Produkt	Konzentration	Inaktive/aktive Substanz	Dosis/Zeit (mg)	Zeitpunkte (t)												
				1	2	3	4	5	6	7	8					
Spray in Neu	10,0%	Aqua bidest.	0,5	ttt	0404	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	
			1,0	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
			2,0	ttt	0040	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
		10,0% FKS	5,0	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
			0,5	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
			1,0	ttt	0444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
	10,0%	Aqua bidest.	2,0	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
			5,0	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
			n.a.	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
		10,0% FKS	n.a.	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
			n.a.	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
			n.a.	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
Spray in Neu Zytotoxizität ohne Säulen	10,0%	Aqua bidest.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
			n.a.	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
		10,0% FKS	n.a.	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.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Viruskontrolle mit Säule	n.a.	Aqua bidest.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
			n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
		10,0% FKS	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
			n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Viruskontrolle ohne Säule	n.a.	Aqua bidest.	n.a.	4444	4444	4444	4444	0030	0000	0000	0000	0000	0000	0000		
			n.a.	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000		
		10,0% FKS	n.a.	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000		
			n.a.	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000	0000	0000		

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

t = zytotoxisch

0 = kein Virus nachweisbar
1 bis 4 = Virus vorhanden (Grad des CPE in 8 Kavitäten einer Mikrotiterplatte)

Appendix Tabelle 4: Rohdaten (BVDV) für die Formaldehyd-Kontrolle (20°C)

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	ttt	ttt	ttt	0004	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
				ttt	ttt	ttt	0440	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
			15	ttt	ttt	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
				ttt	ttt	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
			30	ttt	ttt	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
				ttt	ttt	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.
60	ttt	ttt	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.			
	ttt	ttt	ttt	0000	0000	0000	0000	0000	0000	n.d.			
Formaldehyd Zytotoxizität	0.7% (m/V)	PBS	n.a.	ttt	ttt	ttt	0000	0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Virus-Kontrolle	n.a.	Aqua bid.	n.a.	4444	4444	4444	4444	4440	0030	0000	0000	0000	0000
				4444	4444	4444	4444	4444	0000	0000	0000	0000	0000

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

t = zytotoxisch

0 = kein Virus vorhanden
1 bis 4 = Virus vorhanden (Grad des CPE in 8 Kavitäten einer Mikrotiterplatte)

Appendix Tabelle 5: Rohdaten für die Zellsuszeptibilität

Produkt	(titrierbare) Silylsiliz	Verdünnung	Verdünnungen (log ₁₀)										
			1	2	3	4	5	6	7	8			
PBS	Aqua bidest.	ohne	4444	4444	4444	4444	4444	4334	0000	0000	0000	0000	n.d.
			4444	4444	4444	4444	4444	4444	3000	0000	0000	0000	n.d.
		10,0%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Testprodukt	Aqua bidest.	80,0%	4444	4444	4444	4444	4444	0404	0000	0000	0000	0000	n.d.
			4444	4444	4444	4444	4444	0400	0000	0000	0000	0000	n.d.
		10,0%	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Testprodukt	FKS	80,0%	4444	4444	4444	4444	4444	4400	0000	0000	0000	0000	n.d.
			4444	4444	4444	4444	4444	0004	0000	0000	0000	0000	n.d.

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

t = zytotoxisch

0 = kein Virus vorhanden
1 bis 4 = Virus vorhanden (Grad des CPE in 8 Kavitäten einer Mikrotiterplatte)