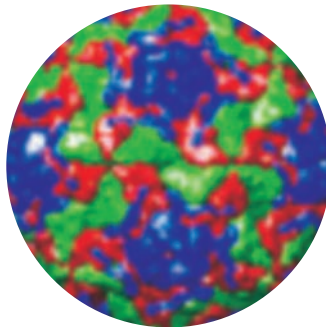


Entwicklung eines quantitativen Keimträgertests zur
Prüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln
gegen animale Viren im Lebensmittelbereich

Ahmad Al-Khleif

أحمد الخليفة



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition wissenschaft
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: **Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer**

**Entwicklung eines quantitativen Keimträgertests zur Prüfung
der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen animale
Viren im Lebensmittelbereich**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von

Ahmad Al-Khleif
Tierarzt aus Hama/ Syrien

Gießen, 2008

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: **Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer**

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Prof. Dr. Dr. habil. Hartmut Eisgruber

Tag der Disputation: 09.12. 2008

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR	3
2.1	Reinigung und Desinfektion	3
2.1.1	Begriffsbestimmungen	3
2.2	Übersicht über Wirkstoffgruppen und ihre Wirkungsmechanismen	5
2.2.1	Aldehyde	5
2.2.2	Organische Säuren	6
2.2.3	Alkohole	6
2.2.4	Alkalien	7
2.2.5	Oxidationsmittel	8
2.2.6	Oberflächenaktive Stoffe (Tenside)	9
2.2.7	Phenol und Phenilderivate	10
2.2.8	Biguanide und Polymerisierte Biguanide	11
2.2.9	Schwermetalle	11
2.3	Anforderungen an chemische Desinfektionsmittel	11
2.4	Einflußfaktoren auf die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln	12
2.5	Wirkungsmechanismen und Anwendungsgebiete	16
2.6	Prüfprinzipien und Vorschriften für die Viruzidieprüfungen	21
2.6.1	Suspensionsversuche	21
2.6.2	Keimträgerversuche	22
2.6.3	Testviren	23
2.6.3.1	Steckbriefe der für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Virusarten.	24
2.6.3.1.1	ECBO-Virus (enteric cytopathogenic bovine orphan virus)	24
2.6.3.1.2	Vaccinia- Virus	25
2.6.3.1.3	Equines Arteritis-Virus (EAV)	25
2.6.3.1.4	Newcastle Disease-Virus (NDV)	26
2.6.3.1.5	Bovines Herpes-Virus (BHV)	26
2.6.3.1.6	Reovirus Typ 1	26
2.6.3.1.7	Bovines Adenovirus Typ 1	27
2.6.4	Belastungssubstanzen	27
2.6.5	Testtemperatur	28

2.7	Prüfrichtlinien für Desinfektionsmittel in verschiedenen Ländern Europas und den USA	28
2.8	Aktueller Stand der vorliegenden CEN Richtlinien im Bereich Antiseptika und Desinfektionsmittel.....	34
3	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	36
3.1	Material und Methoden	36
3.1.1	Zellkulturen	36
3.1.1.1	Permanente und primäre Zellkulturen	36
3.1.1.2	Herstellung von Primärkulturen (FKL, HEF)	36
3.1.1.3	Subkultivierung der Zellkulturen	36
3.1.2	Virusstämme.....	37
3.1.2.1	Verwendete Testviren.....	37
3.1.2.2	Virusvermehrung und Quantifizierung der Infektiosität.....	38
3.1.2.2.1	Bestimmung des Infektiositätstiters	39
3.1.2.2.2	Kalkulation der Infektiositätstiter	40
3.1.3	Desinfektionsmittel	40
3.1.3.1	Grundchemikalien.....	40
3.1.3.2	Kommerzielle Desinfektionsmittel.....	41
3.1.4	Ermittlung der Tenazität verschiedener animaler Viren gegenüber biozid wirksamen Chemikalien	42
3.1.4.1	Suspensionsversuche.....	42
3.1.4.1.1	Prüfung der Zytotoxizität der Produkte	42
3.1.4.1.2	Beurteilung der Tenazität der verschiedenen Virusarten.....	43
3.1.4.1.3	Eiweißbelastung.....	43
3.1.5	Etablierung eines Keimträgermodells zur Bestimmung der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln auf Oberflächen.....	44
3.1.5.1	Testvirus	44
3.1.5.2	Keimträgermaterial im Lebensmittelbereich	44
3.1.5.2.1	Vorbehandlung der Keimträger.....	44
3.1.5.3	Einfluss der Trocknung auf die Infektiosität des Testvirus.....	44
3.1.5.4	Adsorption der Testvirussuspension an die Keimträger	45
3.1.5.5	Desorption des adsorbierten Testvirus von den Keimträgeroberflächen.....	46
3.1.5.5.1	Abschwemmtechnik.....	47
3.1.5.5.2	Abstrichtechnik.....	47
3.1.5.5.3	Prüfung der Keimträger auf verbliebene Infektiosität nach erfolgter Desorption des Testvirus mittels Abschwemm- und Abstrichtechnik	50

3.1.5.6	Untersuchungen zur möglichen Desorption des Testvirus von den Keimträgern nach Überschichtung der Keimträger mit der Desinfektionsmittellösung.....	50
3.1.5.7	Viruzide Wirksamkeit im Handel erhältlicher Desinfektionsmittel für den Lebensmittelbereich	52
3.1.5.7.1	Prüfmethodik.....	52
3.1.5.7.2	Beurteilung der Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfung für Viruzidie.....	52
3.2	Ergebnisse	53
3.2.1	Tenazität unbehüllter und behüllter Virusarten gegenüber verschiedenen biozid wirksamen Grundchemikalien	53
3.2.1.1	Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber Formaldehyd.....	53
3.2.1.2	Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber Formaldehyd.....	53
3.2.1.3	Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber Ameisensäure.....	56
3.2.1.4	Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber Ameisensäure.....	56
3.2.1.5	Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber Peressigsäure.....	58
3.2.1.6	Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber Peressigsäure.....	58
3.2.1.7	Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber Natriumhypochlorit.....	62
3.2.1.8	Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber Natriumhypochlorit.....	62
3.2.2	Zusammenfassende Darstellung der Tenazität veschiedener behüllter und unbehüllter Virusarten gegenüber verschiedenen bioziden Grundchemikalien	65
3.2.3	Etablierung des Keimträgermodelles zur Prüfung der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln auf Oberflächen im Lebensmittelbereich	67
3.2.3.1	Einfluss der Trocknung auf die Infektiosität des Testvirus.....	67
3.2.3.2	Bestimmung der Infektiosität des Testvirus nach Antrocknung an Keimträgeroberflächen unter Verwendung verschiedener Desorptionstechniken.....	73
3.2.3.2.1	Bestimmung der Antrocknungszeit der Testvirussuspension an die Keimträger	73
3.2.3.2.2	Desorption des an die Keimträger angetrockneten Testvirus	75
3.2.3.2.2.1	Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Keimträger	75
3.2.3.2.2.2	Versuchsergebnisse unter Verwendung von V ₂ A-Stahlträgern	77
3.2.3.2.2.3	Versuchsergebnisse unter Verwendung von Trägern aus Makrolon ..	80
3.2.3.2.3	Bestimmung der verbliebenen Infektiosität nach erfolgter Desorption des Testvirus mittels Abschwemm- und Abstrichtechnik von den V ₂ A-Stahl Keimträgern	83
3.2.3.3	Infektiositätsgehalt des ECBO-Virus im Überstand und auf dem Träger nach Zugabe des “Desinfektionsmittels“	87

3.2.4	Methodik des Keimträgertests zur Prüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen animale Viren im Lebensmittelbereich	88
3.2.5	Prüfung verschiedener für den Lebensmittelbereich vorgesehener Desinfektionsmittel auf Viruzidie unter Verwendung des etablierten Keimträgermodells und ECBO- Virus als Testvirus	90
3.2.5.1	Auswahl der Desinfektionsmittel	90
3.2.5.2	Viruzide Wirksamkeit von Steril [®] , HM3000 [®] , Divodes FG [®] und neoquat s [®] ...	91
3.2.5.2.1	Restvirusgehalt auf der V ₂ A-Stahlträgeroberfläche und in dem zur Desinfektion verwendeten Desinfektionsmittel nach Anwendung von Steril [®]	91
3.2.5.2.2	Steril [®] (Hauptwirkstoff: Natriumhypochlorit)	92
3.2.5.2.3	HM 3000 [®] (Hauptwirkstoff: Alkylamin)	92
3.2.5.2.4	Divodes FG [®] (Hauptwirkstoff: Alkohol)	93
3.2.5.2.5	Neoquat s [®] (Hauptwirkstoff: Qua. Ammoniumverbindungen)	94
4	DISKUSSION	95
4.1	Kriterien für die Auswahl eines Testvirus und der Keimträger	95
4.2	Etablierung eines quantitativen Keimträgertests zum Nachweis der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln im Lebensmittelbereich	98
4.3	Praktikabilität der etablierten Testmethodik	103
5	ZUSAMMENFASSUNG	105
6	SUMMARY	107
7	LITERATURVERZEICHNIS	109
8	ANHANG	125
	DANGSAGUNG	152

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Aqua dest	Aqua destillata
AFNOR	Association Française de Normalisation
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASTM	American Society for Testing and Materials
BSI	The British Standard Institution
BPV	Bovines Parvovirus
BAV	Bovines Adenovirus
BSA	Bovines Serumalbumin
BGA	Bundesgesundheitsamt
BHV	Bovines Herpes-Virus
BEV	Bovines Entero-Virus
bzw.	beziehungsweise
ZPE	Zytopathischer Effekt
CEN	Comité Européen de Normalisation, Europäisches Komitee für Normung
°C	Temperatur in Grad Celsius
ca	Circa
cm ²	Quadratcentimeter
DM	Desinfektionsmittel
Abb	Abbildung
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
DVV	Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DLG	Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft
° dH	Die Wasserhärte (deutscher Härtegrad)
ECBO-Virus	Enteritic Cytopathogenic Bovine Orphan
EAV	Equines Arteritisvirus
EN	Europäische Norm
EU	Europäische Union
FKS	Fetales Kälberserum
FCV	Felines Calicivirus
FKL	Fetale Kälberlungezellen
FE	Feline Emryonalzellen (Niere)
HEF	Hühner-Embryo-Fibroblasten

WG	Horizontal Workgroup, Horizontale Arbeitsgruppe des CEN
HE	Hefeextrakt
KID ₅₀	Kulturinfektiöse Dosis 50
KT	Keimträger
Log	Logarithmus
MEM	Minimal Essential Medium
Min	Minuten
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney Cell Line
mg	Milligramm
ml	Milliliter
NDV	Newcastle Disease Virus
n	Anzahl
PBS	Phosphate buffered saline
PES	Peressigsäure
PE	Polyethylen
prEN	Vorschläge/Entwürfe zu europäischen Normen
REO	Respiratory Enteric Orphan Virus
R + D	Reinigung und Desinfektion
SV	Suspensionsversuch
S	Sekunde
s.	siehe
TV	Trypsin-versen
TC	Technical Committee, Technisches Komitee des CEN
Tab.	Tabelle
Vacc.-V.	Vaccinia-Virus
VAH	Verband für angewandte Hygiene
Vero	African green monkey kidney cell line
CVL	Central Veterinary Laboratory, Weybridge
WSH	Wasser standardisierter Härte
Σ	Summe
≥	größer oder gleich

1 EINLEITUNG

Im Bereich der Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln tierischer Herkunft sind Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen ein bedeutender Bestandteil zur Sicherung der Qualität des Lebensmittels und damit des Verbraucherschutzes. Im Wesentlichen zielen diese Maßnahmen auf eine Reduktion des Risikos einer Kontamination des Produktes mit unerwünschten Mikroorganismen. Als unerwünscht sind solche Mikroorganismen anzusehen, die lebensmitteltechnologischer Prozesse negativ beeinflussen oder die zu einem Verderb von Lebensmitteln führen können bzw. in der Lage sind, nach Verzehr der Produkte Infektionen beim Menschen hervorzurufen. Unter den in Frage kommenden Mikroorganismen sind Pilze, Bakterien, Bakteriophagen und Säugerviren zu nennen. Von diesen stellen die Bakterien und Pilze das größere Gefährdungspotential dar. Entsprechend orientieren sich die für die Wirksamkeitsprüfung etablierten Richtlinien von für den Lebensmittelbereich vorgesehenen Desinfektionsmitteln an diesen beiden Klassen von Erregern. Abgesehen von Prüfvorschriften an Bakteriophagen existieren für Desinfektionsmittel im Lebensmittelbereich keine etablierten Prüfmethode an Säugerviren. Diese Situation bildete die Grundlage zur Konzeption der vorliegenden Arbeit. Es liegt durchaus im Bereich des Möglichen, dass tierische Rohmaterialien oder auch durch die mit der Ver- und Bearbeitung betrauten Personen eine Kontamination von Flächen mit Viren erfolgen kann, was eine Gefahr der Viruskontamination der Endprodukte birgt. Aus Überlegungen des Desinfektionsmittelausschusses der DVG heraus rechtfertigt dieses bestehende, wenn auch möglicherweise geringe Risiko, eine Erweiterung des Prüfumfanges von Desinfektionsmitteln, die für diesen Bereich vorgesehen sind.

Was das Methodenspektrum zur Prüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln anbetrifft, war die Situation in Europa in der Vergangenheit lange Zeit sehr stark durch einzelstaatliche Ansätze geprägt (REYBROUCK, 1986). Im Zuge der Harmonisierungsbestrebungen der EG schloss sich 1970 das Comité Européen de Normalisation (CEN) zusammen, um eine Vereinheitlichung der Bewertungskriterien für Desinfektionsmittel innerhalb Europas zu realisieren. Für das Gebiet der Lebensmittel tierischer Herkunft wurden bereits Prüfmethode (Europäische Normen) an verschiedenen Bakterien, Pilzen sowie Bakteriophagen mit lebensmittelhygienischer Relevanz etabliert. Den methodischen Anforderungen existierender europäischer Normen wurde in der Überarbeitung der nationalen Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln der DVG in der 4. überarbeiteten Auflage (2007) Rechnung getragen. Die Umsetzung der EG-Normen in nationale Prüfvorschriften ist jedoch mit erheblichem Aufwand verbunden. Bestimmte Kapitel sind daher zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht bearbeitet. Hierunter fällt n.a. die Etablierung einer Prüftechnik an animalen Viren im Lebensmittelbereich. Da hierfür keine europäische

Vorlage existiert, waren experimentelle Untersuchungen zur Etablierung einer derartigen Prüfmethodik erforderlich.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Entwicklung einer robusten Methode, die eine Beurteilung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln auf viruskontaminierten Oberflächen im Lebensmittelbereich erlaubt. Neben Versuchen zur Auswahl eines geeigneten Modellvirus wurden die Bedingungen, die die Beurteilung einer ausreichend hohen Inaktivierung des Modellvirus auf im Lebensmittelbereich verwendeten Flächen erlaubt, erarbeitet und beschrieben. Mit einer Wirksamkeitsprüfung verschiedener im Handel erhältlicher Desinfektionsmittel sollte abschließend die Eignung der favorisierten Technik dargelegt werden.

2 Literatur

2.1 Reinigung und Desinfektion

2.1.1 Begriffsbestimmungen

Reinigung: „Entfernung unerwünschter Substanzen von Oberflächen, Räumen, Vorrichtungen und Geräten“. Als unerwünscht werden beispielsweise Lebensmittelreste und Beläge erwähnt (WILDBRETT, 2006).

Reinigbar: „Der Ausdruck „reinigbar“ wäre zwar die wortgenaue Übersetzung von „cleanable“, ist aber im Deutschen unüblich. Als Ersatz dafür könnte „reinigungsfreundlich“ erwogen werden.

Mit „cleanable“ wird im englischsprachigen Raum zum Ausdruck gebracht, unter welchem Aufwand unerwünschte Substanzen von Oberflächen entfernt werden können. „Cleanable“ ist dennoch eine Materialeigenschaft, die erst beim Vorgang der Reinigung erkennbar wird.

Für den Begriff „**Desinfektion**“ (Antisepsis) bestehen zahlreiche Definitionen. Nach den „Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel“ der deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) (2. Aufl., 1988) ist Desinfektion die gezielte Eliminierung unerwünschter Mikroorganismen mit dem Ziel, die Funktion, Struktur, oder den Stoffwechsel dieser Mikroorganismen so zu schädigen, dass Übertragungen (Kontaminationen, Besiedelungen, Infektionen) verhindert werden. Diese Definition ist zielgerichtet und ermöglicht durch ihren selektiven Charakter eine sichere Abgrenzung zur Sterilisation. Im Wesentlichen fußt diese Definition auf den Vorstellungen von REBER (1973) und WALLHÄUSER (1988). Nach REBER (1973) ist die Desinfektion eine gezielte Entkeimung mit dem Zweck, die Übertragung bestimmter unerwünschter Mikroorganismen durch Eingriffe in deren Struktur oder Stoffwechsel unabhängig von ihrem Funktionszustand zu verhindern. WALLHÄUSER (1988) definiert „Desinfektion“ als eine selektive Maßnahme mit dem Ziel, die Übertragung bestimmter Mikroorganismen und Viren zu verhindern. Neben einer sicheren Abgrenzung der Desinfektionsmaßnahmen von Maßnahmen zur Sterilisation erlaubt diese Auslegung gleichzeitig eine Anwendung des Begriffes auf Gebieten außerhalb der Medizin, z.B. auf die Lebensmittelhygiene, in der als Schadmikroorganismen nicht nur Krankheitserreger sondern auch den Herstellungsprozess beeinflussende Keime Bedeutung besitzen. Viele Definitionsansätze sind häufig mit einem Mangel an sicherer Abgrenzungsmöglichkeit zu anderen Verfahren

behaftet oder besitzen einen ausschließlichen Bezug zur Infektionsmedizin. Besonders deutlich wird das in einer Arbeit von Koch (1912) in der die Desinfektion als „Vernichtung aller Infektionsstoffe“ bezeichnet wurde. Wenn auch sicherlich die zur Charakterisierung einer Desinfektion zutreffenden Bedingungen gemeint waren, besteht dennoch bei dieser Formulierung keine eindeutige begriffliche Abtrennung zur Sterilisation, (Asepsis) unter der eine Inaktivierung und Eliminierung aller Mikroorganismen inklusive Bakteriensporen zu verstehen ist. Von der per Definition sicher voneinander differenzierbaren Asepsis und Antiseptik ist weiterhin die Antiseptik abzugrenzen. Hierunter fallen alle Maßnahmen zur Hemmung bzw. Verminderung von Keimen auf der Körperoberfläche sowie auf Wunden und Schleimhäuten.

Für den vor allem in Kanada und den USA verbreiteten Begriff “ Sanitization“ existiert kein Synonym im deutschsprachigen Raum. “ Sanitization“ umfasst die Gesamtheit aller Maßnahmen, die zu einer Verminderung der Keimbelastung in einem bestimmten Bereich führt (WALLHÄUSER, 1988). Gegenstand sind demnach nicht nur die Reinigung und Desinfektion sondern das gesamte Hygieneregime. Mit der Desinfektion im Zusammenhang häufig verwendete weitere Begriffe sind nachfolgend aufgelistet (BESSEMS, 2003).

Algizid	Eine Noxe, die unter definierten Bedingungen in der Lage ist, Algen und ihre Sporen abzutöten.
Bakteriostase	Hemmung des Wachstums von Bakterien.
Bakteriostat	Eine Noxe, die unter definierten Bedingungen Bakteriostase verursacht.
Bakterizid	Eine Noxe, die unter definierten Bedingungen in der Lage ist, vegetative Bakterien, aber nicht notwendigerweise deren Sporen abzutöten.
Biozid	Eine Noxe, die in der Lage ist, Mikroorganismen zu inaktivieren. Erregerbezogene Bezeichnungen für die Wirksamkeit sind: algizid, bakterizid, fungizid, sporizid und viruzid.
Sporizid	Eine Noxe, die unter definierten Bedingungen in der Lage ist, bakterielle Sporen abzutöten.
Viruzid	Eine Noxe, die unter definierten Bedingungen in der Lage ist, Viren abzutöten oder zu inaktivieren.

2.2 Übersicht über Wirkstoffgruppen und ihre Wirkungsmechanismen

Nachfolgend werden ausschließlich die für die Desinfektion im veterinärmedizinischen Bereich und im Lebensmittelbereich wichtigsten Desinfektionsmittelwirkstoffe beschrieben (EGGENSPERGER, 1973; SCHLIESSER, 1974, 1975; TRAUTWEIN u. KRÜGER, 1977; SCHLIESSER, 1981; EDELMEYER, 1982; ARNDT, 1983; WELLINGER, 1983; WALLHÄUSER, 1984; JEFFREY, 1995; BREMER, 2003; KÖHLER, 2006).

2.2.1 ALDEHYDE

Aldehyde gehören mit zu den wichtigsten Desinfektionsmitteln. Ein häufig eingesetzter Desinfektionsmittelwirkstoff aus der Wirkstoffgruppe der Aldehyde in der Landwirtschaft ist Formaldehyd. Die Stoffgruppe der Aldehyde zeichnet sich durch eine Carbonylgruppe aus. Ca. 30% der in der Veterinärmedizin eingesetzten Desinfektionsmittel enthalten Aldehyde (Bremer, 2003). Das Formaldehyd wird als eines der "klassischen" Desinfektionsmittel bezeichnet. Neben dem Formaldehyd werden noch Glutardialdehyd, Glyoxaldehyd und Succindialdehyd angewendet.

Formaldehyd (CH_2O) ist ein farbloses, stechend riechendes, entzündbares Gas, das in Wasser eine hohe Löslichkeit besitzt. Die im Handel erhältliche 35 – 40 %ige wässrige Lösung wird als „Formalin“ bezeichnet. Formaldehyd kann aber auch zur Hygienisierung von Fäkalien (MÜLLER und SCHLENKER, 2004) oder gasförmig verwendet werden. Der pH-Wert für Formaldehyd muss zur Erzielung einer optimalen Desinfektionswirkung zwischen 3 bis 10 liegen, der des Formalins zwischen 2,8 bis 4. Formaldehyd neigt zur Polymerisation, was durch die Anwesenheit von Wasser, Säuren und Alkalien begünstigt wird. In der Luft wird Formaldehyd langsam zu Ameisensäure oxidiert. Die Wirkung des Formaldehyds wird durch Ammoniak, Alkalien, H_2O_2 , Jod, Kaliumpermanganat, Eisen und Schwermetalle gehemmt, da die Aldehydgruppe mit Aminogruppen reagiert. Angewendet wird Formaldehyd vor allem als Flächendesinfektionsmittel und bei der Gasdesinfektion in geschlossenen Räumen. Die Vorteile der Aldehyde liegen vor allem im breiten Wirkungsspektrum, guter Materialverträglichkeit (SCHLIESSER, 1981) und biologischer Abbaubarkeit. Zur Neutralisation außerhalb des Körpers wird Ammoniak verwendet, als Antidot nach Verschlucken werden Aktivkohle und Harnstofflösungen eingesetzt. Nach der Gefahrstoffverordnung ist Formaldehyd als „giftig“ zu kennzeichnen. Die Aldehyde besitzen gute bakterizide, tuberkulozide, viruzide und fungizide Wirkung. Bei Temperaturen von über 50°C wirken sie auch sporozid. Formaldehyd wirkt nach MOLDENHAUER (1984) in sehr geringen Konzentrationen nur, wenn entsprechend lange Reaktionszeiten möglich sind. Auch von SPICHER (1979) wird Formaldehyd als ein

langsam wirkendes Mittel bezeichnet. Untersuchungen mit Polioviren haben (SPORKENBACHER-HÖFLER et al., 1983) weiterhin gezeigt, dass Formaldehyd auch zu Veränderungen an der Nukleinsäure führt, was trotz völlig intakter Morphologie der Viruspartikel eine vollständige Inaktivierung zur Folge haben kann.

2.2.2 ORGANISCHE SÄUREN

Der wirksame Bestandteil der organischen Säuren ist die Carboxylgruppe (COOH- Gruppe). Zu den organischen Säuren gehören unter anderem die Ameisen-, Essig- und Propionsäure. Sie sind Vertreter der aliphatischen Monocarbonsäuren, welche eine Carboxylgruppe besitzen, die in wässriger Lösung in Protonen und negativ geladene Säure-Anionen dissoziiert.

Ameisen- (HCOOH), Essig- (CH₃COOH) und Propionsäure (CH₃CH₂COOH) sind farblose, stechend riechende Flüssigkeiten, die mit Wasser und Ethanol in jedem Verhältnis mischbar sind. Ihr Wirkoptimum liegt bei ca. pH 3 bis 6. Die Ameisensäure ist toxischer und wirkt stärker lokal reizend als die anderen aliphatischen Säuren. Konzentrierte Ameisensäure kann zu Verätzungen der Haut führen, verdünnte Lösungen (ca. 1%ig) dienen der Anregung der Hautdurchblutung. Die Dämpfe reizen die Schleimhäute der Atemwege und der Augen. Oral aufgenommen kommt es zu Verätzungen, als Antidot dient Natriumbicarbonat und verdünnte Natronlauge. Die Ameisensäure gilt als „starkes Gift“ und „wassergefährdender Stoff“.

Die Essigsäure führt ab einer Konzentration von >5% zu Schleimhautreizungen und zu lokalen Schäden an den Schneidezähnen nach Inhalation. Nach BÖHM (1987) wirken organische Säuren sehr gut gegen Bakterien und behüllte Viren und sind außerdem gut wirksam gegen Pilze und unbehüllte Viren. WALLHÄUSER (1988) unterscheidet jedoch zwischen der reinen Säurewirkung durch Absenken des pH-Wertes und der ausschließlichen Wirkung des undissoziierten Säureanteils. Dieser kann in die Mikroorganismenzelle eindringen und dort wichtige Stoffwechselfunktionen, in der Regel durch Hemmung der Enzymsysteme, unterbrechen. Der Anteil an undissoziierter Säure sinkt bei steigendem pH-Wert.

2.2.3 ALKOHOLE

Alkohole haben eine eiweißdenaturierende, austrocknende und fettlösende Wirkung. Alkohole wie Ethanol (C₂H₅OH), Propanol und Isopropanol (CH₃)₂-CHOH) sind klare, farblose Flüssigkeiten. Sie sind in Wasser löslich und ihr optimaler Wirkungsbereich liegt im sauren Milieu. Ethanol ist flüchtig, absorbiert Wasser und kann durch nichtionische Detergentien inaktiviert werden.

Alkohole werden in der Medizin weitverbreitet zur Antiseptik eingesetzt, da sie schnell trocknen und hautverträglich sind. Alkohole haben die Eigenschaft schnell in die Mikroorganismen einzudringen (STEUER und LUTZ-DETTINGER, 1990). Sie sind die am raschesten biozid wirkenden Verbindungen. Im Vergleich zu anderen Wirkstoffen werden jedoch erheblich höhere Konzentrationen benötigt. Sie wirken nicht sporozid. Die mikrobizide Wirkung der Alkohole nimmt mit dem Molekulargewicht und der Kettenlänge zu, wobei das Maximum bei 5 bis 8 C-Atomen liegt (z.B. Benzylalkohol, Hexylalkohol). Die behüllten Viren werden relativ leicht durch Alkohole inaktiviert, da sie die Lipidhülle schnell auflösen und somit das Penetrationsvermögen in die Wirtszelle verhindern. Zur Inaktivierung hydrophiler und unbehüllter Viren müssen kurzkettige Alkohole eingesetzt werden. Alkohole sind geeignet, um kleine Oberflächen zu desinfizieren. Bei Temperaturen unter 30 °C sind sie unbeschränkt haltbar und mit mehr als drei Kohlenstoffatomen (Butanol) werden sie aufgrund ihres unangenehmen Geruchs in der Praxis nicht eingesetzt (BESSEMS, 2003).

2.2.4 ALKALIEN

Alkalien nehmen ein breites Wirkungsspektrum ein. Die Hydroxylgruppen (OH⁻ Ionen) sind der wirksame Teil der Alkalien. Zu dieser Stoffklasse gehören unter anderem Natronlauge, Kalilauge und Kalkmilch. Natronlauge (NaOH) ist in Wasser gelöstes, farb- und geruchloses Natriumhydroxid. Der optimale Wirkungsbereich zur Desinfektion liegt bei pH 11. NaOH wird im Veterinärbereich häufig zur Grob- bzw. Flächendesinfektion eingesetzt, bei Seuchenfällen oder Seuchenverdacht als 1 bis 2%ige Lösung. NaOH führt zu Verätzungen der Haut und Schleimhaut. Bei Konzentrationen NaOH > 5% muss das Gefahrensymbol „ätzend“ angegeben werden. Kalilauge (KOH) ist in Wasser gut löslich. Die optimale Desinfektionswirkung liegt bei einem pH-Wert von 11. Kalk ist eines der ältesten Desinfektionsmittel. Die aus frisch gelöschtem Kalk (Ca(OH)₂) hergestellte Kalkmilch (Mischverhältnis: 1Teil gelöschter Kalk: 3Teile Wasser bzw. 1:20) wirkt lediglich keimvermindernd. Angewendet werden Natronlauge und Kalilauge (KOH) als 2 - 4%ige wässrige Lösung. Alkalien zeigen eine viruzide, bakterizide und fungizide Wirkung.

Natronlauge wirkt durch hydrolytische Spaltung von Säureamiden (Proteindenaturierung), die durch die OH⁻ Ionen bedingt wird. Da Laugen das Vermögen haben, Eiweiße und Fette zu lösen, besitzen sie eine gute Tiefenwirkung. Wegen dieser Eigenschaft werden Alkalien auch häufig anderen Desinfektionsmitteln zugesetzt. So kann zum Beispiel durch den Zusatz von Kalkmilch die desinfizierende Wirkung von Natronlauge erhöht werden.

2.2.5 OXIDATIONSMITTEL

In diese Stoffgruppe gehören Halogene und deren Derivate, Persäuren, Peroxide und Ozon.

- Halogene und deren Derivate:

Natriumhypochloritlösungen (NaOCl) sind die bekanntesten Halogene. Sie sind gelblich gefärbt und haben einen charakteristischen Geruch nach Chlor. Bei der Lösung in Wasser entsteht freie unterchlorige Säure, die bei einem pH-Wert von 12 die größte Stabilität aufweist. NaOCl besitzt ein breites Wirkungsspektrum. Gegenüber anderen Desinfektionsmitteln haben die Natriumhypochloritlösungen den Vorteil, dass sie eine geringe Toxizität in den Gebrauchskonzentrationen aufweisen. Konzentrierte Lösungen zeigen eine korrosive Wirkung auf Metall und unter Umständen können sie Hautirritationen (Rötung, Jucken etc.) hervorrufen. Die Stabilität der Hypochloritlösungen ist abhängig von ihrer Konzentration. Hochprozentige Lösungen verlieren im gleichen Zeitraum mehr von ihrer Aktivität als schwache Konzentrationen. So verliert z.B. eine 10%ige Lösung bei Zimmertemperatur und dunkler Aufbewahrung 5% ihrer Wirksamkeit innerhalb von sechs Monaten. Ähnliche Eigenschaften wie das Natriumhypochlorit hat das Kaliumhypochlorit (KOCI). Beide sind in kristalliner Form instabil; Lithiumhypochlorit (LiOCl) und Calciumhypochlorit ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) hingegen sind in fester Form stabil und werden daher als Pulver verwendet. Chloramin T ($\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNNaO}_2\text{S}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) setzt 36% aktives Chlor und 6% aktiven Sauerstoff frei, Trichloroisocyanursäure 90% aktives Chlor und Dichloroisocyanursäure 55 bis 60% aktives Chlor. Die keimtötende Wirkung der Halogene beruht einmal auf der oxidierenden Wirkung ihrer wässrigen Lösung, wodurch z.B. die Sulfhydrylgruppen der Enzyme zu Disulfiden oxidiert werden und zum anderen auf der Halogenisierung von Aminogruppen. Diese Reaktionen finden mit Proteinen aller Art statt, wodurch die starke Reduktion der Wirkung in Gegenwart von Serum erklärt werden kann.

Hypochlorit ist ein schnell wirksames Desinfektionsmittel. Es gibt aber bei einigen gramnegativen Bakterien eine Resistenzbildung (BESSEMS, 2003).

Neben den Hypochloriten wird Jod (J_2) medizinisch genutzt. Wegen der bei der Anwendung auftretenden Verfärbungen wird es jedoch nur als Haut- und Wunddesinfektionsmittel eingesetzt. Als Flächendesinfektionsmittel besitzt es nur geringe Bedeutung. Heute werden vermehrt Jodophore (Verbindungen von Jod mit oberflächenaktiven Substanzen) eingesetzt.

- Persäuren, Peroxide und Ozon:

Ozon (O_3), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Peressigsäure ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$) sowie andere organische Persäuren setzen bei ihrem Zerfall elementaren Sauerstoff frei, der mit fast allen Molekülen der Mikroorganismen rasche und intensive Oxidationsreaktionen eingeht, die zu irreversiblen Schäden am Mikroorganismus führen. Diese Verbindungen sind sowohl in flüssiger als auch in gasförmiger Form relativ instabil und werden für praktische Anwendungen durch u.a. an-

organische Verbindungen wie Schwefelsäure stabilisiert. Peressigsäure (PES) ist in 100 %iger Form eine hochexplosive, farblose, beißend riechende Flüssigkeit, die in Wasser, niederen Alkoholen, Ketonen und Estern löslich ist. Lösungen von <10% gelten als nicht explosiv, sie weisen jedoch nur eine geringe Haltbarkeit auf. Die PES ist ein chemisches Gleichgewichtssystem der Komponenten Essigsäure, Wasserstoffperoxid, Wasser und Peressigsäure (JENTSCH, 1978). Bei Lagerung bei Zimmertemperatur müssen die Desinfektionsmittellösungen wöchentlich, bei Lagerung bei 4°C monatlich frisch hergestellt werden (FLEMMING, 1984). Der optimale Wirkungsbereich der Peressigsäure liegt bei einem pH von 2,5 bis 4. Daneben wird PES als ein sehr ökonomisches Desinfektionsmittel angesehen, da nur geringe Anwendungskonzentrationen (0,001%- 2%ig) notwendig sind und der Preis relativ niedrig ist (SPRÖSSIG, 1979). Von Nachteil ist dagegen, dass der reinen PES in Bezug auf Benetzbarkeit und Penetrationsvermögen Grenzen gesetzt sind (JENTSCH, 1978). PES weist, wie alle oxidativen Desinfektionsmittel, eine gute bakterizide und eine schwache fungizide Wirkung auf (Bessems, 2003).

2.2.6 OBERFLÄCHENAKTIVE STOFFE (Tenside)

Die gemeinsame Eigenschaft aller oberflächenaktiven Substanzen liegt darin, dass sie aufgrund ihres amphiphilen Molekülaufbaus die Oberflächenspannung von Wasser deutlich herabsetzen. Diese Stoffgruppe kann unterteilt werden in anionische Netzmittel mit waschaktiver Wirkung (Seifen, Detergentien) sowie kationische (quaternäre Verbindungen) und amphotere Netzmittel (Amphotenside). Die Gruppe verdankt ihren Namen der Fähigkeit zwischen hydrophoben und hydrophilen Oberflächen zu vermitteln.

Anionenaktive Netzmittel sind keine Desinfektionsmittel, sondern sind zu den Reinigungsmitteln zu zählen. Meist handelt es sich um aliphatische Kohlenwasserstoffe mit einer randständigen COOH-Gruppe. Im sauren Bereich erreichen sie bei 1,9 bis 2,2 pH ihre beste biozide Wirksamkeit. Die Anwesenheit von organischen Materialien (Milch, Blut, etc.) kann ihre Wirkung beeinträchtigen. Der Wirkmechanismus ist noch nicht endgültig geklärt, jedoch wird angenommen, dass es zu einer Inaktivierung bestimmter Enzymsysteme und somit zu einer Störung der Permeabilität der Zellmembran kommt. Anionische Detergentien werden in Mischungen mit organischen oder anorganischen Säuren oder Phosphorsäureestern, oft noch in Verbindung mit nichtionischen Tensiden in der Milchwirtschaft, der Getränke- und Lebensmittelindustrie als sogenannte „Sanitizer“ angewendet.

Bei den kationischen Verbindungen zeichnen sich neben den höhermolekularen Aminen besonders die quaternären Verbindungen (QUATS) durch ihre antimikrobielle Wirksamkeit aus. In der Landwirtschaft werden die quaternären Verbindungen allein wegen ihres hohen Eiweißfehlers nur wenig eingesetzt, dafür sind sie aber in vielen Kombinationspräparaten ent-

halten. Sie besitzen ein relativ breites Wirkungsspektrum, wobei der Effekt gegen grampositive Bakterien im Allgemeinen besser ausgeprägt ist als gegen gramnegative Bakterien. Mykobakterien und Sporen werden jedoch nicht erfasst, und gegen Pilze entwickeln quaternäre Ammoniumverbindungen vor allem eine fungistatische Wirkung (BÖHM, 2002). Ihr Wirkungsmechanismus besteht in einer Zerstörung von Lipidmembranen und der Inaktivierung empfindlicher Enzyme, die auf einer teilweise reversiblen Komplexbildung mit diesen Proteinen beruht. Quaternäre Ammoniumverbindungen werden als Zusatzwirkstoff bei Haut- und Händedesinfektionsmitteln verwendet. Sie werden auch in der pharmazeutischen, kosmetischen und in der Lebensmittelindustrie zur Desinfektion von Flächen in Produktionsräumen im Rahmen von „Sanitizing“-Programmen eingesetzt.

Amphotere Verbindungen, die seit Jahrzehnten als „Tego-Tenside“ im Handel sind, bilden als Aminosäuren im Wasser Kationen, Anionen und sogenannte „Zwitterionen“ (positiv und negativ geladen). „Tego“ ist eine gelbliche bis honiggelbe Flüssigkeit, die mit Wasser mischbar ist. Der wirksamste Desinfektionsbereich liegt zwischen pH 5 und 9. Die desinfizierende Wirksamkeit der Amphotenside ist unter Proteinbelastung und in Anwesenheit von anionischen und nichtionischen Tensiden herabgesetzt.

2.2.7 PHENOL und PHENOLDERIVATE

Nachdem durch die Einführung von Alkylketten, Arylresten und Halogenen wesentlich potentere Desinfektionsmittel als das ursprüngliche Phenol geschaffen wurden, spielen heute eigentlich nur noch Phenolderivate eine Rolle als Desinfektionsmittel.

Phenol (C_6H_5OH) ist eines der ältesten Desinfektionsmittel. Es handelt sich um eine farblose, kristalline Substanz, die sehr charakteristisch riecht und auf der Haut ätzende Eigenschaften aufweist. Phenole sind in Alkohol, Aceton und in Glycerin löslich. Diese Stoffgruppe besitzt als chemische Grundstruktur einen Benzolring. Zu ihr gehören die Phenole, die halogenierten Phenole und die Kresole. Das Wirkungsoptimum liegt im sauren pH-Bereich. Die Aktivität der Phenole kann durch Alkoholzusatz und durch Halogenierung gesteigert werden. Mehrfach halogenierte Verbindungen sind wirksamer und ihre Aktivität steigt mit zunehmendem Atomgewicht des Halogens. Ein gebräuchlicher Vertreter der Phenolderivate ist das Kresol (C_7H_8O , Methylphenol), das als o-Kresol, m-Kresol oder p-Kresol vorliegen kann. Phenole und Phenolderivate wirken als sogenannte Protoplasmagifte, die vorwiegend mit Proteinen reagieren. Halogenierte Phenole und Kresole besitzen nach SCHLIESSER (1981) eine bakterizide (nicht sporozide), fungizide und beschränkt viruzide Wirkung.

Phenole spielen jedoch als Desinfektionsmittel heutzutage kaum noch eine Rolle. Kresole werden zum Teil zur Händedesinfektion und zur Scheuerdesinfektion (Grob- und Flächen-desinfektion) verwendet.

2.2.8 BIGUANIDE UND POLYMERISIERTE BIGUANIDE

Hierzu zählen Alexidin, Chlorhexidin und polymerisierte Biguanide. Chlorhexidin ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$) ist ein weißes, kristallines, geruchloses Pulver, das in Wasser unlöslich ist. Als Chlorhexidingluconat hingegen löst es sich vollständig in Wasser und wird als Salz häufig eingesetzt. Die Desinfektionskraft hat ihr Wirkoptimum bei pH 5 bis 8. Es ist unverträglich mit anionischen Detergentien und anorganischen Anionenverbindungen und verliert seine desinfizierende Wirkung bei Temperaturen über 70°C. In niedrigen Konzentrationen führt Chlorhexidingluconat zu einer Bakteriose und erst bei 500 bis 2000 fach höheren Konzentrationen ist von einem bakteriziden Effekt auszugehen. Obwohl es ein breites antibakterielles Wirkungsspektrum aufweist, ist die viruzide Wirksamkeit begrenzt und die Wirkung gegenüber Sporen und Mykobakterien als nicht ausreichend zu bezeichnen. Von Seiten des Wirkungsmechanismus geht man davon aus, dass der Wirkstoff an der Zelloberfläche adsorbiert und in Folge die Funktion der Zytoplasmamembran schädigt. Anwendung findet Chlorhexidingluconat in wässriger oder alkoholischer Lösung zur präoperativen Hautdesinfektion. Die Alexidine werden als Mittel zur Munddesinfektion eingesetzt.

2.2.9 SCHWERMETALLE

Die schweren Metalle sind wegen sogenannter oligodynamischer Effekte tödlich für Bakterien bei niedrigeren Konzentrationen. Zu dieser Stoffgruppe zählen unter anderem anorganische und organische Quecksilber-Verbindungen (z.B. Mercurichlorid: $HgCl_2$) und organische Zinnverbindungen (Organozinnverbindungen). Sie wirken nach SCHLIESSER (1981) bakterizid und fungizid. Früher spielten sie in der Therapie und bei der Desinfektion eine führende Rolle, heute sind sie aber wegen ihrer hohen Toxizität und ihrer Reaktionsfreudigkeit mit Eiweißen weitgehend von anderen Mitteln verdrängt worden.

2.3 Anforderungen an chemische Desinfektionsmittel

Die Desinfektion mit chemischen Substanzen unterliegt zahlreichen Einflußfaktoren, die vom Milieu oder dem zu desinfizierenden Objekt ausgehen. Gleichzeitig kann die Anwendung dieser Stoffgruppen zu Schäden bzw. Belastungen von Pflanzen, Tieren, Menschen und der

Umwelt führen. Aus diesen Überlegungen heraus wurde von verschiedenen Autoren eine Reihe wünschenswerter Anforderungen an Desinfektionsmitteln gestellt, die wie folgt zusammengefasst werden können (WEUFFEN und PRIVORA, 1972; SCHLIESSER, 1981; STEUER, 1983; FLEMMING, 1984; LUTZ-DETTINGER, 1983; KIRCHHOFF, 1969):

- Breites Wirkungsspektrum
- Rasche und irreversible Wirkung in der Gebrauchskonzentration
- Geringer Wirkungsverlust durch Milieueinflüsse (Eiweiß, Kot, pH-Verschiebungen)
- Gute Wirksamkeit in allen unter natürlichen Bedingungen auftretenden Temperaturbereichen
- Gleichbleibende Zusammensetzung (Stabilität des Konzentrates und der Gebrauchslösung)
- Unschädlichkeit für Mensch, Tier und Umwelt während und nach der Anwendung
- Gute Anwendungseigenschaften (Reinigungseffekt, Benetzungsfähigkeit, gutes Durchdringungsvermögen)
- Geruchsarmut
- Materialverträglichkeit
- Wirtschaftlichkeit.

Kaum ein Desinfektionsmittel wird allen dieser Anforderungen gerecht. Daher müssen für die Anwendung in der Praxis Kompromisse geschlossen werden zwischen unabdingbaren und erwünschten Anforderungen (SCHLIESSER, 1981).

2.4 Einflußfaktoren auf die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln

Im Wesentlichen hängt der Erfolg der Desinfektion ab von:

1. der Art und Menge der Mikroorganismen,
2. der Konzentration des Desinfektionsmittels und
3. der Einwirkungszeit des Desinfektionsmittels.

Zudem sind unter Praxisbedingungen Milieufaktoren (SCHLIESSER, 1975) wie die organische Belastung, der pH-Wert, die Temperatur, die Materialbeschaffenheit und die Feuchtigkeit zu beachten, die in ihrer unterschiedliche Zusammensetzung die Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel u.a. erheblich beeinflussen können.

- Art und Grad der Verschmutzung

Verschiedene Schmutzstoffe, wie z. B. Exkrete, Sekrete, Blut, Futtereiweiß und Staub können die mikrobizide Wirkung von Desinfektionsmitteln reduzieren, (WALHÄUSSER, 1984). Diese Stoffe bilden schützende Hüllen für den Mikroorganismus oder auch antimikrobiell unwirksame Komplexe mit dem Desinfektionsmittel (WILLINGER, 1972).

Allgemein ist die benötigte Menge eines Desinfektionsmittels unter „schmutzigen“ Bedingungen höher als bei einer „sauberen“ Umgebung. Eine von vielen Untersuchern zur Charakterisierung der Wirkung chemischer Desinfektionsmittel unter Einfluß organischer Milieufaktoren verwendete Substanz ist das Rinderserum. Die Zugabe von Rinderserum zu dem Reaktionsgemisch aus Testmikroorganismen und Desinfektionsmittel führte je nach verwendetem Desinfektionsmittel zu unterschiedlich hohen Wirksamkeitsverlusten (Eiweißfehler) (WEINHOLD, 1971). Hinsichtlich dieses Fehlers verhalten sich die verschiedenen, bei der Stalldesinfektion gebräuchlichen Desinfektionswirkstoffe unterschiedlich (SCHLIESSER, 1981; WILLINGER, 1983) (**Siehe Abb. 1**).

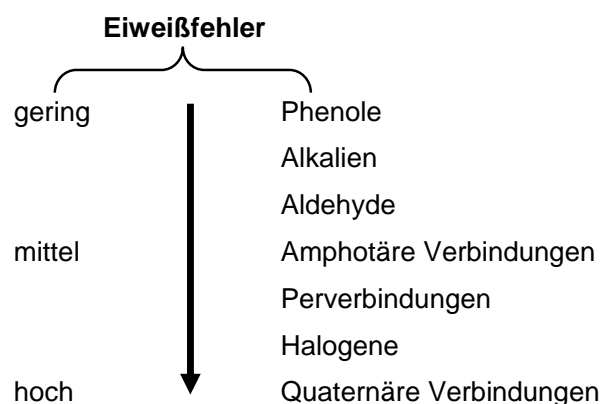


Abbildung 1: Höhe des Eiweißfehlers von verschiedenen Desinfektionsmitteln in Anwesenheit von Rinderserum

- Wasserhärte des Verdünnungswassers

Einfluss auf die Wirksamkeit hat auch die Härte des zur Verdünnung der Desinfektionsmittel verwendeten Wassers (LÄCHELE, 1990). Unter Verwendung von hartem Wasser konnte bei Aldehyden eine 20 bis 30 %ige Verkürzung der Abtötungszeiten und bei Phenolen eine Verlängerung derselben im Vergleich zu Aqua bidestillata festgestellt werden. Unter Kenntnis dieser Verhältnisse wird z.B. für Wirksamkeitsprüfungen von Desinfektionsmitteln Wasser mit einer standardisierten Härte verwendet.

- pH- Wert der Desinfektionsmittellösung

Entscheidender noch als die Wasserhärte ist der pH- Wert des Reaktionsgemisches. Die für einzelne Desinfektionsmittel optimalen pH Bereiche sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: pH- Optimum einiger ausgewählter Desinfektionswirkstoffe (WALLHÄUSSER, 1988).

Desinfektionsmittel	Optimaler pH- Bereich
Formaldehyd	3 bis 10
Glutaraldehyd	5 bis 8,5 (7,5 bis 8,5 optimale bakterizide Wirkung)
Organische Säuren	2 bis 3
Quaternäre Verbindungen	5 bis 9
Phenol und Derivate	2 bis 3

- Temperatur

Nach zahlreichen Autoren ist die Umgebungstemperatur (z.B. Desinfektion von Tierställen im Winter) von großer Bedeutung für die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln (WALLHÄUSSER 1988; THIEL 1977a; WEUFFEN 1973).

PES wies den geringsten Temperaturfehler auf (BREMER, 2003). PES ist zwischen 37°C und -15°C mikrobizid wirksam und bei Minustemperaturen allen anderen Desinfektionsmitteln überlegen (THIEL, 1977a). Andere Autoren stellten fest, dass niedrige Temperaturen die Wirksamkeit der PES nicht vermindern (STELLMACHER et al., 1973; SCHLIESSER und WIEST, 1979). Es ist seit langem bekannt, dass durch eine Erhöhung der Temperatur eine Steigerung der desinfizierenden Wirkung und durch eine Absenkung der Temperatur eine Abnahme der Wirkung eintritt (SCHLIESSER, 1981). Verschiedene Stoffklassen zeigen unterschiedliches Temperaturverhalten. So ist Natronlauge bei 4°C ebenso wirksam wie bei 12°C, während Formalin bei 4°C unwirksam wird (SCHLIESSER, 1981). Andererseits sollen Jod, Chlor und sauerstoffabspaltende Desinfektionsmittel nicht erwärmt werden, da sie sich zersetzen können (BÖHM und STRAUCH, 1987).

Was den Einfluss der Temperatur auf die Wirksamkeit der Desinfektionsmittel betrifft, liegen zahlreiche Untersuchungen vor. Nach den wesentlichen und gut bestätigten Ergebnissen haben niedrige Temperaturen einen z.T. erheblichen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit von Aldehyden, Phenolen, quaternären Ammoniumverbindungen, Amphotensiden und organischen Säuren. PES und Phenole wurden dagegen bei niedrigen Temperaturen in ihrer Wirksamkeit nicht beeinflusst. Höhere Temperaturen zeigten dagegen bei allen Desinfektionsmitteln einen förderlichen Effekt (SCHLIESSER, 1981; BREMER, 2003).

- Art und Beschaffenheit des zu desinfizierenden Materials (z.B. Holz, Metall)

Bei Beachtung der bisher angeführten Faktoren ist im Laborversuch auf glatten Flächen ein guter Desinfektionserfolg zu erzielen. Rauhe Flächen lassen sich dagegen sehr schwer erfolgreich desinfizieren (WILLINGER, 1972). Unter Praxisbedingungen laufen die Desinfektionsmittellösungen an vertikalen, glatten Flächen rasch ab, woraus gegebenenfalls eine Verkürzung der Einwirkungszeit und somit ein ungenügender Desinfektionseffekt resultiert, während poröse, saugfähige Materialien zu einem gewissen Speichereffekt mit erwünschter Langzeitwirkung führen können (SCHLIESSER, 1975).

- relative Luftfeuchtigkeit und Luftbewegung

Was die Luftfeuchtigkeit und Luftgeschwindigkeit anbetrifft, wird davon ausgegangen, dass eine hohe Luftfeuchtigkeit die Diffusion in die Stallbauelemente und damit die Tiefenwirkung des Mittels erhöht. Eine hohe Luftgeschwindigkeit senkt dagegen unter Umständen durch Abkühlung der Oberfläche den Desinfektionseffekt (THIEL, 1977b). Durch niedrige Luftfeuchtigkeit kann es, insbesondere bei poröser Oberflächenbeschaffenheit, zu einer hohen Verdunstungsrate der Desinfektionsmittellösung kommen (THIEL, 1977c). Entsprechend ist dem negativen Einfluß niedriger Luftfeuchtigkeit und hoher Luftgeschwindigkeit nach STRAUCH (1987) durch Ausschalten der Lüftung und Schließen der Fenster und Türen während der Einwirkzeit entgegen zu wirken.

2.5 Wirkungsmechanismen und Anwendungsgebiete

Die Desinfektionsmittelwirkstoffe gehören chemisch sowohl zu den anorganischen Stoffen als auch zu den organischen Chemikalien (STEIGER, 1986). Ein wichtiger Vertreter ist Formaldehyd, welches gegen Bakterien, Bakteriensporen, Pilze und Viren wirkt. Dabei reagiert es mit Carboxyl-, Amino-, Hydroxyl- und/oder Sulfhydryl- Gruppen der Zellproteine sowie mit Nukleinsäuren. Der Wirkungsmechanismus beruht auf Zerstörung von Bestandteilen der Zellwand und Behinderung des Stoffwechsels. Ein Nachteil der Aldehyde ist die starke Temperaturabhängigkeit ihrer Wirkung (optimale Wirkung über 18°C). Aldehyde zeichnen sich durch ihre Wirtschaftlichkeit aus, sind biologisch gut abbaubar und besitzen eine gute Materialverträglichkeit. Dies hat seine Ursache darin, dass Formaldehyd in Verbindung mit Wasser Methylolgruppen bildet, wobei je Molekül zwei chemisch identische reaktionsfähige Gruppen entstehen.

Der Wirkungsmechanismus der Alkalien beruht vor allem auf dem hohen pH- Wert. Dadurch wird die Zellwand der Bakterien zerstört, wobei die Phosphorsäureester der Lipide verseift, die Säureamidbindungen der Peptide hydrolysiert und die Eiweiße denaturiert werden (Schliesser, 1981).

Anorganische Säuren, wie Salzsäure und Schwefelsäure, dissoziieren in wässriger Lösung bis zu 90%. Die freigesetzten Protonen reagieren intensiv und irreversibel mit einer Reihe organischer und anorganischer Verbindungen unter Ausbildung von kovalenten Bindungen. Deshalb wirken diese starken dissoziierenden Mineralsäuren stark korrosiv und werden deshalb in der Praxis selten zur Desinfektion eingesetzt. Organische Säuren wie Ameisen- und Essigsäure dissoziieren mässiger und gelten als umweltfreundlicher, weshalb meistens organische Säuren zur Desinfektion eingesetzt werden. Der Hauptanwendungsbereich liegt bei der Konservierung von Lebensmitteln. Die Wirkungsweise beruht auf dem Dissoziationsvermögen: der lipophile undissoziierte Säureanteil zerstört Zellmembranen, hemmt Stoffwechsellenzyme und bewirkt eine Denaturierung von Proteinen.

Die wichtigsten Vertreter der Sauerstoffabspalter sind Wasserstoffperoxid und die Peressigsäure. Der Wirkungsmechanismus besteht in der Oxidation von Sulfhydrylgruppen in Eiweißmolekülen der Kapsidproteine, was zu deren Denaturierung führt. Peressigsäure wird in fast allen Anwendungsgebieten eingesetzt. Im Umgang mit PES ist höchste Vorsicht geboten, da es in reiner Form Verätzungen verursacht, stark schleimhautreizend ist und einen stechenden Geruch besitzt.

Oberflächenaktive Verbindungen haben eine reinigende Wirkung und ein relativ breites Wirkungsspektrum. Der Wirkungsmechanismus der quaternären Ammoniumverbindungen be-

ruht auf elektrostatischen Interaktionen mit Phospholipiden, reversibler Komplexbildung mit essentiellen Zellproteinen und Zerstörung des Zellmilieus.

Halogene wirken gut gegen Bakterien, Viren und Pilze. Wichtig sind Chlor und Jod bzw. Verbindungen, aus denen sie abgespalten werden. Sie reagieren mit oxidierbaren Aminosäuren von Zellproteinen. Heutzutage ist Hypochlorit im Human-hygienischen Bereich, wozu auch Schwimmbecken gehören, und bei der Herstellung von bestimmten industriellen Produkten als Desinfektionsmittel unentbehrlich. Die Wirkungsweise der Jodverbindungen beruht auf der starken Oxidationskraft des Jods, die eine Proteindenaturierung bewirkt.

Alkohole werden aufgrund ihrer schnellen Wirkung und der geringen Toxizität bei üblichen Anwendungskonzentrationen, mit Ausnahme des Methanols, für die Haut- und Händedesinfektion sowie als Konservierungsmittel in Lebensmitteln, Arzneimitteln und Kosmetika verwendet. Ihre Wirkung beruht auf der Denaturierung von Proteinen.

Nachfolgend wird ein zusammenfassender Überblick über die Wirkungsmechanismen, Wirkungsbereiche, Vorteile, Nachteile sowie die Anwendungsbereiche ausgewählter Stoffklassen von chemischen Desinfektionsmitteln gegeben (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Ausgewählte Desinfektionsmittel und ihre Eigenschaften nach SCHLIESSER (1981), WELLINGER (1983), BÖHM (2002), BESSEMS (2003) und HUNSINGER (2005).

Wirkstoffgruppe	Wirkungsmechanismus	Wirkungsbereich			Vorteile	Nachteile	Anwendungsbereich	
		B	BS	P	V			
Aldehyde und Derivate	Reaktion mit Carboxylamino- Hydroxyl- bzw. Sulfhydrylgruppen der Zellproteine und Nukleinsäuren Bildung irreversibler Methylbrücken	+++	++	++	+++	Geringer Wirkungsverlust durch Verunreinigungen, geringe Korrosivität, breites Wirkungsspektrum, Wirtschaftlichkeit, biologisch abbaubar	Verzögerte Wirkung, schlechte Wirksamkeit ≤ 15 °C Sehr toxisch in Zellkulturen (Nelson, 2003)	gut verwendbar im Tierhaltungsbereich
Alkalien (Laugen)	Verseifung der Phosphorsäureester der Lipide, hydrolytische Spaltung von Säureamiden	++ ¹⁾	±	±	++	Gute Tiefenwirkung sowie eiweiß- und schmutzlösende Wirkung, gute Umweltverträglichkeit	haut- und schleimhautreizende und korrodierende Wirkung, mangelnde Wirksamkeit auf rauen Flächen	Tierhaltungsbereich
Oxidationsmittel	Oxidation von Zellproteinen und Nukleinsäuren	++	+	++	+	Chlor und Chlorabspalter: breites Wirkungsspektrum, geringe Rückstandsgefahr	Geringe Stabilität der Lösungen, hoher Eiweißfehler, (Korrosivität)	<u>Hypochlorit</u> : wird in der Lebensmittelindustrie, veterinärhygienischen Bereichen und Schwimmbecken verwendet; bei der Herstellung von bestimmten industriellen Produkten als Desinfektionsmittel unentbehrlich. <u>Chlordioxid</u> : verwendet bei der Herstellung von Trinkwasser
- Halogene und ihre Derivate	Halogenierung (Chlorabspalter)	++	+	++	+	Chlor und Chlorabspalter: breites Wirkungsspektrum, geringe Rückstandsgefahr	Geringe Stabilität der Lösungen, hoher Eiweißfehler, (Korrosivität)	<u>Hypochlorit</u> : wird in der Lebensmittelindustrie, veterinärhygienischen Bereichen und Schwimmbecken verwendet; bei der Herstellung von bestimmten industriellen Produkten als Desinfektionsmittel unentbehrlich. <u>Chlordioxid</u> : verwendet bei der Herstellung von Trinkwasser

B = Bakterien; BS = Bakteriensporen; P = Pilze; V = Viren

¹⁾ außer Mykobakterien

- keine; ± gering; + genügend; ++ gut; +++ sehr gut; k; keine Angaben

Tabelle 2: Fortsetzung

Wirkstoffgruppe	Wirkungsmechanismus	Wirkungsbereich					Vorteile	Nachteile	Anwendungsbereich
		B	BS	P	V				
Jodophore - Sauerstoff- abspalter (Pero- xide)	Proteindenaturierung durch Oxidation	+++	++	+	+++		Jodverbindungen: gute Tiefen- und Netzwir- kung; lange Wirkdau- er, geringe Toxizität	Hoher Eiweißfehler im niedrigen Kon- zentrationbereich, Jodallergien, Verfär- bung desinifizierter Gegenstände, leicht korrosiv	Im humanmedizinischen Bereich als Haut- und Wunddesinfektionsmittel
Organische- säuren	Hydrolyse und starke Ab- senkung des pH-Wertes	+++	++	+++	+++		Kein Temperaturfehler, Zerfall zu untoxischen Abbauprodukten	Hoher Eiweißfehler, stechender Geruch, Schleimhautreizung, schlechte Material- verträglichkeit	PES: der Hauptanwen- dungsbereich ist die Le- bensmittelindustrie.
Phenolderivate	Eindringen und Trennung der Phospholipid- Doppelschicht, Reaktion mit Zell- und Enzymprote- inen	+++	k	+	++		Gute Wirksamkeit auf rauen Flächen, Abbau zu unschädlichen Pro- dukten, wenig toxisch, umweltverträglich	Eiweißfehler, Korro- sivität, teuer	Für die Konservierung von Lebensmitteln und Kosmetika und einige Vertreter als Desinfekti- onsmittel
		++ ¹⁾	-	+	+		Geringer Eiweiß- und Temperaturfehler, ge- ringe Korrosivität, gute Tiefen-, Netz- und Rei- nungswirkung	Geruchsintensität, Toxizität	Zur Flächendesinfektion in der Tierhaltung

B = Bakterien; BS = Bakteriensporen; P = Pilze; V = Viren

¹⁾ außer Mykobakterien

- keine; ± gering; + genügend; ++ gut; +++ sehr gut; k; keine Angaben

Tabelle 2: Fortsetzung

Wirkstoffgruppe	Wirkungsmechanismus	Wirkungsbereich				Vorteile	Nachteile	Anwendungsbereich
		B	BS	P	V			
Oberflächenaktive Verbindungen								
- anionisch (Detergentien)	„Wasseraktiv“ aber keine Desinfektionswirkung							
- kationisch (quaternäre Ammoniumverbindungen)	Elektrostatistische Interaktionen mit Phospholipiden, reversible Komplexbildung mit essentiellen Zellproteinen	++ ¹⁾	-	+	±	Gute Reinigungs- und Tiefenwirkung, nicht oder wenig korrosiv, ungiftig, geruch- und geschmacklos	Wirkungsverluste bei Vorhandensein von Eiweiß, Seifenresten, Fe- und Calciumionen und niedrigen pH-Werten	<u>Quaternäre Ammoniumverbindungen</u> : verwendet als Zusatzwirkstoff bei Haut und Händedesinfektionsmitteln, auch zur Verwendung in der pharmazeutischen und kosmetischen Industrie sowie in der Lebensmittelindustrie zur Desinfektion von Flächen.
- amphotär	zellwandschädigend und proteindenaturierend durch die kationische, detergent und reinigend durch die anionische Gruppe	++	-	+	±			
- Guanidine	Zytoplasmamembranschädigung, Koagulation von Zellproteinen	++	-	±	±		Eiweiß- und Seifenfehler, Wirkungsverluste bei niedrigen pH-Werten	Zur Haut- und Händedesinfektion

B = Bakterien; BS = Bakteriensporen; P = Pilze; V = Viren

¹⁾ außer Mykobakterien

- keine;

± gering;

+ genügend;

++ gut;

+++ sehr gut;

k; keine Angaben

2.6 Prüfprinzipien und Vorschriften für die Viruzidieprüfungen

Im Jahr 1881 publizierte Robert Koch als Erster ein Testverfahren zur Wirksamkeitsbestimmung von Desinfektionsmitteln. Seit dieser Zeit wurde ein umfangreiches Methodenspektrum entwickelt, das sich aber im Wesentlichen auf zwei verschiedene Testprinzipien reduzieren lässt. Diese werden durch die Prüfung von Desinfektionsmitteln an in diversen flüssigen Medien suspendierten oder an verschiedenen Oberflächen anhaftenden Mikroorganismen repräsentiert. Bedeutende Variationen stellen darüberhinaus die verwendeten Belastungssubstanzen, die Prüftemperaturen und natürlich das verwendete Spektrum an Testmikroorganismen dar. Im Folgenden werden anhand der Viruzidieprüfung die bestehenden Methoden skizziert.

2.6.1 Suspensionsversuche

Eine Bestimmung der viruziden Wirkung im Suspensionsversuch wird seit vielen Jahren durchgeführt. Bei dieser Technik wird eine Testvirussuspension mit definiertem Titer mit Verdünnungen von Desinfektionsmitteln gemischt und nach unterschiedlichen Einwirkungszeiten entnommene Proben auf Induktion virusspezifischer zytopathischer Effekte in der Zellkultur überprüft. Um praxisnahe Bedingungen zu simulieren, fügt man zur Belastung eine Eiweißlösung zur Virussuspension hinzu. Die Untersuchung kann qualitativ oder quantitativ erfolgen.

WEINHOLD und KÖHLER (1971) zeigten, dass mit der Suspensionsmethode gut beurteilbar ist, ob ein Desinfektionsmittel unter optimalen Bedingungen wirksam ist oder nicht. Ergebnisse aus Suspensionsversuchen sind gut reproduzierbar (MAHNEL, 1974). Darüber hinaus erfordert der Suspensionsversuch nur geringen experimentiellen Aufwand, lässt jedoch praxisnahe Aussagen nicht zu. Im Rahmen der Prüfrichtlinien der DVG erfüllt der Suspensionsversuch den Zweck die generelle Wirksamkeit der Prüfsubstanzen zu belegen und gleichzeitig Informationen über einen möglicherweise bestehenden Eiweißfehler zu liefern (McDUFF, 1976).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Suspensionsversuche vorwiegend der Bestimmung der generellen Wirksamkeit einer Prüfsubstanz dienen. Nur beschränkt werden Ergebnisse derartige Untersuchungen als Grundlage für die Abgabe einer Empfehlung für die Praxis verwendet. Weitaus häufiger noch dienen Suspensionsversuche für vergleichende Wirksamkeitsstudien verschiedener biozider Stoffgruppen oder dem Studium diverser Milieueinflüsse wie z.B. der Temperatur auf den Desinfektionsmittelerfolg (BUEREN, 1995; BREMER, 2003).

2.6.2 Keimträgerversuche

Im Keimträgerversuch wird eine definierte Menge eines Virus auf eine definierte Fläche des Trägers aufgebracht. Nach der Antrocknung über eine vorgeschriebene Antrocknungszeit oder bis das Virus vollständig angetrocknet ist, wird der Träger dem Desinfektionsmittel ausgesetzt. Nach der Kontaktzeit des Desinfektionsmittels wird die Reaktion gestoppt und die Restvirusinfektiosität quantitativ bestimmt. Durch Keimträgerversuche sollen Praxisbedingungen simuliert werden, dies aber unter möglichst standardisierten Bedingungen. MAHNEL und KUNZ (1976). An Träger für Viren werden besondere Anforderungen gestellt. Sie sollten möglichst aus einem Material bestehen, das im Stallbereich bei natürlicher Kontamination eine Quelle für Infektionen sein kann. Ferner muss das Trägermaterial chemisch inert sein, damit die gegenüber chemischen Einflüssen relativ empfindlichen Viren nach der Beschickung des Trägers nicht inaktiviert werden. Drittens sind nur Keimträger geeignet, von denen nach Abschluss des Versuches anhaftendes Virus in hoher Quantität reisolierbar ist. Je nach Fragestellung wurden über die Verwendung verschiedenster Keimträger berichtet, z.B. Holzplättchen, Metalle, Glas, Gummi, Glaspapier, Makrolon usw.. Die große Vielfalt verwendeter Keimträger dokumentiert die große Auswahl der im Bereich der Desinfektion bestehenden Fragestellungen. Beispielsweise dienten nach der französischen Norm NF T 72 – 281 der nationalen Normungsinstitution (AFNOR, 1981 und 1989), Uhrglasschälchen, Metallscheiben und Kunststoffplättchen als Keimträger für den Lebensmittelbereich. GREUEL (1963) verwendete Holzkeimträger bei Versuchen zum Nachweis von Unterschieden bei der Verwendung glatter und rauer Keimträger-Oberflächen. Zur Bestimmung der viruziden Wirkung auf Newcastle-Disease-Virus an Oberflächen verwendete KIRCHHOFF (1968) 1 cm² große Scheibchen Agar-Agar (2%ig), Eischalen- und Zellstoffstücke, die durch einlegen in virushaltiger Amnion- Allantois- Flüssigkeit kontaminiert wurden.

STELLMACHER (1969) berichtet über einen qualitativen Holzkeimträgerversuch mit dem NDV- Stamm „Berlin 28“. MAHNEL und KUNZ (1976) führten Versuche mit Keimträgern wie Eischalen, Mullläppchen, Holzspänen und Zementplättchen mit einer Oberfläche von jeweils 2 cm² durch, die mit den Testviren ECBO-Virus, Stamm „LCR- 4“, dem Hepatitis Contagiosa Canis-Virus (HCC) Stamm „Behring“, dem Newcastle Disease-Virus, Stamm „California“ und dem Vaccinia-Virus Stamm „Elstree“ beschickt worden waren. Im Vordergrund der Versuche stand die Frage nach der Eignung der Keimträger zur Bestimmung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln. Von Seiten der Rückgewinnung des Testvirus von den Keimträgern erfüllten je nach verwendetem Virus lediglich Holzspäne, Mullläppchen und Eischalen die Anforderungen nach einer Dokumentation der Virusinaktivierung über mehrere Zehnerpotenzen.

Nach verschiedenen physikalischen Eigenschaften wählte WEINHOLD (1971) Keimträger für Versuche mit dem NDV aus (Verbandmull, Hühnereischalen, 2% iger Agar-Agar, Glas und Holz mit und ohne Zugabe von 40% inaktivierten Rinderserum). Mullträger besaßen eine raue Oberfläche, eine gute Saugkraft und einen niedrigen Feuchtigkeitsgehalt. Hühnereischalen sind charakterisiert durch ihren niedrigen Feuchtigkeitsgehalt und ihre poröse Oberfläche, die eine gute Saugkraft aufweist. 2% Agar-Agar hat eine glatte Oberfläche und besitzt eine mittlere Saugkraft bei hohem Wassergehalt. Glas hat dagegen eine glatte Oberfläche und unterscheidet sich von allen anderen genannten Materialien durch die entweder fehlende Saugkraft oder den fehlenden Feuchtigkeitsgehalt. Holz hat eine raue Oberfläche, große Saugkraft und einen mittleren Feuchtigkeitsgehalt. Alle Versuche unter Verwendung dieser Keimträger erfolgten im Rahmen von Versuchen zur Standardisierung von Desinfektionsmittelprüfungen.

Auch die zahlreichen Versuche von Reuter mit Keimträgern aus Aluminium, Keramik, Holz (REUTER, 1978) und Polyethylen (HANEKE, 1991) sind unter die Fragestellung von Standardisierungsbemühungen im Rahmen der Entwicklung eines Keimträgertests für den Lebensmittelbereich einzuordnen. Weiterhin wurde durch Experimente belegt, dass die Antrocknung an Oberflächen einen Einfluß auf die Stabilität der Keime haben kann. Am Beispiel des Poliomyelitisvirus durch Antrocknung in einer feuchten Kammer war eine optimale Rückgewinnung möglich. Unter offenen Raumbedingungen war die Rückgewinnungsrate deutlich niedriger (SPICHER, 1997). Aus derartigen Versuchen wird geschlossen, dass bei Keimträgerversuchen generell mit einem z.T. erheblichen Verlust an vermehrungsfähigen Mikroorganismen während der Antrocknung an die Träger zu rechnen ist und somit in der Regel nur ein bestimmter Anteil der auf dem Träger haftenden Mikroorganismen reisolierbar und damit nachweisbar wurde (SPICHER, 1997). In Deutschland sind Keimträgerversuche fester Bestandteile der Prüfrichtlinien der DVG. Zur Prüfung der viruziden und bakteriziden/fungiziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln für den Tierhaltungsbereich dienen Keimträger aus Holz und Verbandmull. Es ist abzusehen bzw. bereits entschieden, dass Keimträgerversuche auch in die europäischen Normen integriert werden.

2.6.3 Testviren

Zum Studium der Viruswirksamkeit von Desinfektionsmitteln dienen im Rahmen spezifischer Fragestellungen, wie z.B. die Prüfung der Wirksamkeit von Branntkalk auf in Dunghaufen befindlichem MKS – Virus, zahlreiche Virusarten als Prüfvirus. Das in der Prüfrichtlinien beschriebenen das Spektrum an Virusarten war hingegen wesentlich begrenzter. Nach den französischen Vorgaben (AFNOR, 1989) dienen das MKS - Virus, das Virus der Hepatitis Contagiosa Canis, das Canine Parvovirus und das bovine Parvovirus als Testvirus, in

Deutschland dienen nach den DVG Richtlinien (ANONYM, 2001) ECBO- Virus, Reovirus Typ 1, Vacciniavirus und Newcastle Disease Virus als Testvirus.

Entscheidend für die Auswahl von Testviren ist ihre Tenazität. Die Tenazität ist als Überlebensfähigkeit und Erhaltung der Vermehrungsfähigkeit von Viren unter bestimmten äußeren physikalischen und chemischen Bedingungen oder Einflüssen zu definieren (SPROCKHOFF et al. 1984). Die Tenazität wird im Wesentlichen vom Aufbau des Virus bestimmt (ROLLE und MAYER, 2002). Wird nur einer der für das Eindringen eines Virus in Zellen und für seine Vermehrung notwendigen Bestandteile (Nukleinsäure, Kapsidproteine, Lipide oder Proteine der Hülle) durch physikalische oder chemische Noxen entscheidend geschädigt oder verändert, verliert das Virus seine Infektiosität.

Chemisch- physikalische Parameter mit bedeutendem Einfluss auf die Tenazität von Viren sind in **Tabelle 3** aufgelistet (ROLLE und MAYER, 2002).

Tabelle 3: Einflüsse auf die Tenazität der Viren

Stabilitätsfördernd	Stabilitätsmindernd
Niedrige Temperaturen (< 10°C)	Hohe Temperaturen
Trocknung	Feuchtes Milieu
Optimaler pH (6-8)	PH sauer oder alkalisch
Hohe Viskosität	Proteinarme Lösung
Proteinhaltige Lösung	UV-Strahlen, Tageslicht
Zellgebundenheit	Ionisierende Strahlen
Pökellung, Salzung	Thermische Beugung

2.6.3.1 Steckbriefe der für die vorliegenden Untersuchungen verwendeten Virusarten

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurden die unter aufgeführten Virusarten im Versuch zur Eignung als Testvirus einbezogen.

2.6.3.1.1 ECBO-Virus (enteric cytopathogenic bovine orphan virus)

ECBO- Virus gehört der Familie Picornaviridae und dem Genus Enterovirus an. Das Virus ist unbehüllt, weist einen Durchmesser von ca. 20-25 nm auf und besitzt als Genom eine einsträngige RNA. Bisher sind zwei Serotypen der Bovinen Enteroviren (BEV) bekannt, das Bovine Enterovirus 1 und 2. Obwohl BEV relativ häufig im Darmtrakt, Respirationstrakt und Geschlechtsapparat von Rindern auftritt, konnte bisher kein eindeutiges Krankheitsbild zugeordnet werden (GRANZO, 2000).

Das Virion enthält 4 Hauptstrukturproteine. Die thermische Inaktivierung bei 56 °C verläuft langsam (TAYLOR et al., 1974). Nach MODROW und FALKE (1997) können sie als freie Partikel in der Umwelt relativ lange überdauern. Gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln zeigen alle Picornaviridae eine für Viren hohe Widerstandsfähigkeit (MAHNEL, 1976). Am besten werden sie durch Präparate auf der Basis von Aldehyden oder Persäuren, aber auch durch starke Laugen und freies Chlor in ausreichender Konzentration inaktiviert. Oberflächenaktiven Verbindungen widerstehen die unbehüllten Picornaviridae ausnahmslos (ROLLE und MAYER, 2002). Das Virus vermehrt sich in permanenten Zellkulturen mit hohem Titer. Das Virus ist kein Zoonoserreger (BREMER, 2003; SOULIER, 2005; YILMAZ, 2001).

2.6.3.1.2 Vaccinia- Virus

Vaccinia- Virus gehört zur Familie der Poxviridae und weist einen Durchmesser von 240x300 nm auf. Das Virus ist ein behülltes Virus mit einer doppelsträngigen DNA und kann in Vero-Zellkulturen mit hohem Titer verwendet werden. Das Vaccinia- Virus ist als Impfvirus für die frühere Pockenschutzimpfung des Menschen der bekannteste Vertreter der Familie der Poxviridae. In der Umwelt sind die Pockenviren sehr widerstandsfähig, wenn sie zellgebunden und durch Proteine geschützt vorliegen.

Nach ROLLE und MAYER (2002) können sie im angetrockneten Zustand Monate infektiös bleiben und über weite Strecken verschleppt werden. Die Haltbarkeit von Virusproben beträgt bei 4 °C Wochen, eingefroren (-15 °C und niedriger) Jahre; sogar bei Raumtemperatur überdauern sie mehrere Tage ohne Infektiositätsabfall. Die lipidhaltige Hülle macht die Pockenviren aber labil gegenüber extremen pH-Werten (unter 6 und über 9), Fettlösemitteln, oberflächenaktiven Verbindungen, Detergenzien, Säuren und Laugen. Zur Desinfektion aller Pockenviren eignen sich oberflächenaktive Präparate mit Aldehyden Oxidanzien und Halogenverbindungen und auch organische Säuren (MAHNEL, 1987; ROLLE und MAYER, 2002).

2.6.3.1.3 Equines Arteritis-Virus (EAV)

Das EAV ist ein ca. 50 bis 70 nm großes, behülltes Virus mit einer einsträngigen RNA und gehört zur Familie der Arteriviridae. Das Virus vermehrt sich in permanenten Zellkulturen mit hohem Titer. Das EAV wurde aufgrund von Untersuchungen über die Struktur und Replikation der genomischen RNA als einziges Genus der Familie Arteriviridae zugeordnet (ROLLE und MAYER, 2002). Die Vermehrung verläuft mit einem ZPE und ist in Pferde-, Affen-, Kaninchen-, Esel-, Zebra- und Hamsternierenzellen sowie in einigen permanenten Zelllinien

(BHK-21) möglich. In der Suspension ist das EAV wesentlich weniger widerstandsfähig als ECBO-Virus (BREMER, 2003).

2.6.3.1.4 Newcastle Disease-Virus (NDV)

Das Newcastle Disease Virus ist ein aviäres Paramyxovirus Typ 1 (APMV-1). Die Größe des Virus beträgt 150-300 nm. Es besitzt eine einsträngige RNA und gehört zur Familie der Paramyxoviridae. Die Hülle des Virions besteht aus einer Lipidmembran mit glykosilierten Virusproteinen. Die Vermehrung der Viren findet im Zytoplasma statt, die Reifung erfolgt an der Zellmembran durch Knospung („budding“). Die „Newcastle disease“ (ND) ist eine hochkontagiöse Allgemeininfektion, die unter natürlichen Bedingungen v.a. bei Hühnervögeln zu schweren Verlusten führt. Paramyxoviren besitzen eine geringe Tenazität und werden durch Fettlösungsmittel und Oxidantien leicht angegriffen (LIESS und KAADEN, 2003), dennoch bleibt das Virus in natürlichem Milieu (Ei, Fleisch, Muskel, Stuhl) u.U. sehr lange infektiös (ROLLE und MAYER, 2002). Die Vermehrung und der Nachweis des NDV erfolgt durch die Beimpfung von Bruteiern beziehungsweise von primären Hühnerembryofibroblastenkulturen.

2.6.3.1.5 Bovines Herpes-Virus (BHV)

Das BHV ist ein 120-200 nm großes, behülltes Virus mit einer doppelsträngigen DNA und gehört zur Familie der Herpesviridae. Das Virus vermehrt sich in permanenten Zellkulturen. BHV-1 verursacht eine akute, fieberhafte Erkrankung der oberen und mittleren Atemwege und hat in landwirtschaftlichen Großbetrieben eine große Bedeutung (LIESS und KAADEN, 2003). Im Bereich zwischen pH 5-8 kann die Infektiosität bis zu einem Monat erhalten bleiben. Ab einer Temperatur von 55 °C wird das Virus schnell inaktiviert.

2.6.3.1.6 Reovirus Typ 1

Das Reovirus ist ein unbehülltes doppelsträngiges RNA Virus mit einem Durchmesser von 60-80 nm und gehört zur Familie der Reoviridae. Es vermehrt sich in permanenten Zellkulturen mit hohen Titern. Das Virus ist ein Zoonoseerreger und beteiligt an respiratorischen und enteralen Erkrankungen bei Mensch und Tier. Reoviren zeigen eine mittlere Resistenz gegenüber Hitze, organischen Solventien und non-ionischen Detergentien.

2.6.3.1.7 Bovines Adenovirus Typ 1

Adenoviren sind unbehüllte Viren mit einem Durchmesser von 70-90 nm sowie einer doppelsträngigen DNA und gehören zur Familie der Adenoviridae. Die Familie ist unterteilt in die 2 Genera Mastadenovirus, die Adenoviren der Säuger, und Aviadenovirus, die der Vögel (ROLLE und MAYER, 2003). Die Säugeradenoviren vermehren sich in permanenten Zellkulturen (MDBK- Zellen). Aufgrund ihrer Morphologie und ihrer chemischen Zusammensetzung sind sie sehr resistent gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen. Sie bleiben in einem weiten pH-Bereich (pH 3 bis pH 9) infektiös (MONREAL, 1992). Adenoviren können Pneumoenteritiden im Alter von 1-6 Monaten hervorrufen, und sind mit dem Rinderrippekomplex verbunden (MATTSON, 1973; MOHANTY und DUTTA, 1981).

2.6.4 Belastungssubstanzen

Besondere Bedeutung, nicht nur im Feld, sondern auch bei experimentellen Wirksamkeitsprüfungen haben jene chemischen Stoffe, die mit dem Erreger und dem Desinfektionsmittel aufgrund ihrer unmittelbaren räumlichen Nähe interagieren können, sogenannte Belastungssubstanzen. Mikroorganismen sind in der Regel in Trägersubstanzen organischer und /oder anorganischer Art eingeschlossen oder sie haften an ihnen. Da chemische Desinfektionsmittel einen unmittelbaren Kontakt mit den zu desinfizierenden Keimen benötigen, wird die Desinfektion erschwert, wenn die Keime sich in Exkreten befinden (SATTAR, 1983). Die Herabsetzung der Wirksamkeit in Gegenwart von Blut, Serum, Casein oder anderen Proteinen wird als Eiweißfehler bezeichnet. (WALLHÄUSSER, 1984). Die Eiweißmoleküle bedecken die Oberfläche der Virusteilchen je nach Eiweißkonzentration mehr oder weniger vollständig.

Im Schrifttum mangelt es nicht an Vorschlägen zur Substitution des chemischen Milieus bei der experimentellen Wirksamkeitsprüfung. So wurde z.B. lyophilisiertes Albumin in einer Konzentration von 0,1% als Eiweißbelastung für die Desinfektionsmittelprüfung im Hospitalbereich vorgeschlagen (BECK et al., 1977). So konnte gezeigt werden, dass Chlor einen Eiweißfehler besitzt (VAN KLINGEREN, 1982). Auch Kondensmilch-, virushaltige Allantoisflüssigkeit- und Gewebepreibelastungen dienten als Eiweißquelle (GREUEL, 1963).

Im Tierhaltungsbereich wurden Versuche mit 10% Pferdeserum mit 1% Carboxymethylcellulose und fetalem Kälberserum (FKS) in einer Konzentration von 40% als organische Belastung für Keimträgerversuche durchgeführt (KLEINER und TRENNER, 1988; DVG, 2003). Nach REUTER (1989) werden drei Kategorien der Eiweißbelastung unterschieden und zwar 1% Magermilch und 0,03% bovine Albuminlösung als geringe Belastung, 0,2% Albumin als

eine mittlere Belastung, 10% Rinderserum sowie 0,5% Rinderalbumin als eine starke Belastung.

2.6.5 Testtemperatur

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Prüftemperatur. Bei niedriger Temperatur laufen die Desinfektionsvorgänge erheblich langsamer ab als bei höheren Temperaturen (WALLHÄUSSER, 1984). In den meisten Fällen ist daher eine Steigerung der Wirksamkeit bei höherer Anwendungstemperatur gegeben, wohingegen man im kühlen Bereich, wie z. B. bei 10 °C, einen drastischen Wirksamkeitsverlust feststellen kann. Nach SCHLIESSER und STRAUCH (1981) ist die Temperaturabhängigkeit der viruziden und mikrobiziden Wirkung von Desinfektionsmitteln bei Temperaturen unter 10 °C zu berücksichtigen. Nach SOMNITZ (1973) sind die Phenole bei Temperaturen bis zu – 20 °C voll mikrobizid wirksam. Nach BÖHM (1987) und HERBST (1990) muss bei der Anwendung organischer Säure bei tiefen Temperaturen nicht nur gegenüber Bakterien, sondern auch gegenüber Viren mit einem Wirksamkeitsverlust gerechnet werden. BREMER (2003) hat verschiedene Desinfektionsmittel bei 20, 10 und 4 °C gegenüber ECBO-Virus und EAV getestet. Von den geprüften Desinfektionsmitteln zeigte die Peressigsäure die geringste Beeinflussung ihrer Wirksamkeit durch die Temperatur. Verschiedene weitere Autoren berichten über den z.T. großen Einfluss, den die Umgebungstemperatur auf die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln hat.

2.7 Prüfrichtlinien für Desinfektionsmittel in verschiedenen Ländern Europas und den USA

In England sind zwei Institute für die Viruzidieprüfungen im Bereich Tierhaltung zuständig, dies ist zum einen das CVL (Central Veterinary Laboratory) in Weybridge und zum anderen das "Institute for Animal Health" in Pirbright. Vorgeschrieben ist ein Suspensionsversuch in Anlehnung an den Yeast Suspensionstest der MAFF. Dieser wird mit Eiweiß (inaktivierte Hefe) und ohne Eiweiß durchgeführt. 1960 veröffentlichte das British Standard Institute (BSI) in England eine Methode zur Bestimmung der Wirksamkeit sämtlicher Desinfektionsmittel mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* als Testorganismen.

In Frankreich werden die Normungsaufgaben durch das staatlich eingerichtete Institut AFNOR (Association Francaise de Normalisation) bearbeitet. Dort befassen sich u.a. Pharmazeuten mit der Wirksamkeitsprüfung. In Frankreich ist für die Viruzidieprüfung im Veterinärbereich das französische Landwirtschaftministerium zuständig. Als Prüfviren werden das

Virus der Teschen-Talfan-Disease, das Maul- und Klauenseuche- Virus, das Virus der Hepatitis Contagiosa Canis, das Canine Parvovirus und das bovine Parvovirus verwendet.

Die Niederländische Kommission für Phytopharmazie veröffentlichte 1974 den 5-5-5-Suspensionstest, der als europäische Testmethode einen Vorläufer der späteren europäischen CEN-Normen darstellte. Dabei werden fünf repräsentative Mikroorganismen geprüft. In der Anwendungskonzentration musste das Desinfektionsmittel in 5 min eine Reduktion der Organismen von 5 log-Stufen erreichen.

In den skandinavischen Ländern wird ähnlich wie in Deutschland sowohl Suspensions- als auch Keimträgerversuche zur Bestimmung der mikrobiologischen Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln vorgeschrieben.

In einigen Ländern existieren keine Prüfrichtlinien für die Wirksamkeitsprüfung eines Desinfektionsmittels. Als Beispiel ist das Registrierungssystem in der Schweiz zu nennen. RASCHLE und SCHWAB (1988) haben die schweizerischen Vorschriften zur Registrierung und Zulassung beschrieben.

In den USA sind nach GRÖSCHEL (1991) für Desinfektionsmittelprüfungen unter behördlicher Registrierung Laborversuche notwendig. Die Desinfektionsmittelprüfung kann vom Hersteller selber durchgeführt werden oder unabhängigen kommerziellen oder wissenschaftlichen Laboren übertragen werden. Die Ergebnisse werden von Mitgliedern der „Association of Official Analytical Chemists“ (AOAC), oder einer wissenschaftlichen Organisation, welche zuständig ist für die Zulassung für Analysemethoden in den Bereichen Lebensmittel, Medikamente, landwirtschaftliche Produkte und Umweltsubstanzen ausgewertet. BELAMY (1995) berichtet von einem empfohlenen Viruzidie-Suspensionsversuch für den Humanbereich. Er stammt von der ASTM „American Society for Testing and Materials“ und wird mit den Testviren Polio-, Herpes-, Adenovirus Typ 2-, Influenza A-, Rhino- und Vaccinia-Virus durchgeführt.

In Deutschland wurden für die Humanmedizin, Veterinärmedizin und die Landwirtschaft unabhängige Prüfungs- und Begutachtungsverfahren von Verbänden und Organisationen entwickelt, die sich mit Desinfektionsmitteln und ihrem Einsatz befassen. Sie erstellen unter der Verwendung von objektiven Prüfungskriterien Anwendungsbedingungen für die Desinfektionsmitteln, geben Anstöße für die Weiterentwicklung bzw. Verbesserung der Präparate, in-

formieren den Verbraucher über die Wirksamkeit der Präparate und unterstützen staatliche Stellen bei der Auswahl geeigneter Desinfektionsmittel. Die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) hat seit 1974 eigene Prüfverfahren für die Wirksamkeitsbestimmung von Desinfektionsmitteln für die Tierhaltung und die Lebensmittelhygiene erarbeitet, die sich an die Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) anlehnen.

Es handelt sich hierbei um ein nationales, freiwilliges Prüfverfahren für die chemischen Desinfektionsmittel, die in der Tiermedizin und in der Tierhaltung eingesetzt werden. Die vergleichende Beurteilung und Bewertung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel erfolgt unter Verwendung einer einheitlichen und reproduzierbare Ergebnisse liefernden Prüfmethodik. Da unter Praxisbedingungen eine Vereinheitlichung nicht zu erreichen ist, fordern die Richtlinien der DVG daher reproduzierbare Laboruntersuchungen über das Wirkungsspektrum und die Inaktivierungskinetik von Desinfektionsmitteln. Trotzdem werden Erfordernisse der praktischen Anwendung berücksichtigt. Wegen der Vielfalt der zu inaktivierenden Organismen und der Variabilität der als Träger in Frage kommenden Materialien werden „Modelle“ entwickelt, um den Prüfvorgang zu standardisieren. Sie werden unter den Gesichtspunkten ausgewählt, möglichst praxisnah zu sein und eine Übertragung der erzielten Ergebnisse auf andere Keimarten und Keimträger zu erlauben. Bei der Prüfung auf Viruzidie wird der praktische Desinfektionswert eines Präparates nach dem Ergebnis von Keimträgertests an verschiedenen Materialien (Verbandsmüll, Holz) unter Eiweißbelastung beurteilt. Ergebnisse solcher Versuche werden für wichtiger und zuverlässiger gehalten als Befunde aus Praxisversuchen. Bei der Viruzidie-Prüfung kommt es nicht darauf an, eine möglichst große Zahl verschiedener Trägermaterialien zu verwenden, sondern darauf, die wichtigsten physikalischen Bedingungen der Praxis durch Trägermodelle darzustellen. Durch die hohe Eiweißbelastung wird den erschwerten Bedingungen in der Praxis Rechnung getragen. Die Auswahl der Testviren berücksichtigt, dass die Empfindlichkeit gegenüber Desinfektionsmitteln maßgeblich vom Vorhandensein lipidhaltiger Hüllsubstanzen bestimmt wird. Die Verwendung von Testviren mit und ohne Lipidhüllen erlaubt eine den praktischen Erfordernissen entsprechende Trennung in „viruzide“ und „begrenzt viruzide“ Präparate.

Die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie gründete 1955 einen Ausschuss zur Erarbeitung einheitlicher Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsmitteln. Die erste Richtlinie für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel veröffentlichte DGHM (1958). Die DGHM hatte in ihre Zertifizierung jedoch keine Testverfahren gegenüber Viren fest integriert, sondern die Zusatzbezeichnung „viruzid“ wurde auf der Grundlage der gemeinsamen Richtlinien des Robert-Koch-Instituts (RKI) und der Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung von Viruskrankheiten (DVV) vergeben (ANONYM, 1982, 1983, 2003a). Die Richtlinien der DGHM befassen sich mit der Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln, die in der Humanmedi-

zin verwendet werden. Vor der eigentlichen Erprobung eines Desinfektionsmittels für seinen bestimmten Anwendungszweck steht eine Vorprüfung, bestehend aus einem Verdünnungsversuch und einem Suspensionsversuch. Der Verdünnungsversuch soll klären, in welchen Konzentrationsbereichen das zu beurteilende Präparat bakteriostatisch bzw. fungistatisch wirkt. Anschließend wird im Suspensionsversuch die Inaktivierung der Keime unter Einfluss des Eiweiß- und Seifenfehlers bestimmt. Hat ein Desinfektionsmittel die Vorprüfung „bestanden“, folgt die Hauptprüfung (Keimträgerversuch), bei welcher die erschwerte Bedingung unter Anwendungsgegebenheiten simuliert wird. Hierbei wird, je nach geplantem Einsatzbereich des Desinfektionsmittels (Hände-, Sputum-, Flächen-, Instrumenten-, Wäschedesinfektion), die besondere Eignung in entsprechenden Versuchen geprüft.

Seit November 2003 ist der Verband für Angewandte Hygiene (VAH) die Nachfolgerin der Desinfektionsmittelkommission der DGHM.

Die Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft (DLG) hat eigene Prüfverfahren für "Stalldesinfektionsmittel", für "Reinigungs- und Desinfektionsmittel in der Milcherzeugung" sowie "Mittel zur Euterhygiene" entwickelt. Die Stalldesinfektionsmittel unterliegen zwei Prüfungsverfahren. Zuerst wird eine Prüfung auf Mikrobizidie durchgeführt, die sich in die gleichen drei Abschnitte wie die Prüfung der DVG unterteilt. Des Weiteren prüft die DLG noch anwendungstechnische Gegebenheiten, die sich mit der Materialverträglichkeit, der Benetzbarkeit und den Ausbringungsverfahren der Desinfektionsmittel beschäftigen. Die Reinigungs- und Desinfektionsmittel für die Milcherzeugung werden in der Süddeutschen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft bearbeitet und das Institut für Milchhygiene der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel ist für Mittel in der Euterhygiene zuständig.

Die Zertifizierung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren in der Humanmedizin erfolgt in Deutschland durch die Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheit (DVV) und durch das Robert-Koch-Institut, entsprechend der Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes (BGA, heute RKI). Nach BELLAMY (1995) ist die Richtlinie des BGA die Grundlage der Viruzidieprüfung in der Schweiz. In Österreich und in den Niederlanden werden nach dieser Richtlinie Desinfektionsmittel zugelassen.

CEN (Comité Européen de Normalisation) Prüfmethode: Die Situation im Hinblick auf die Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln ist innerhalb der EU als sehr heterogen zu bezeichnen. Es existieren in den einzelnen europäischen Ländern sehr unterschiedliche Methoden, die nicht miteinander vergleichbar sind (REYBROUCK, 1986).

1990 bekam das Comité Européen de Normalisation (CEN) den Auftrag, eine Harmonisierung und Standardisierung von Methoden zur Wirksamkeitsbestimmung herbeizuführen. Mitglieder der CEN sind die Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Finnland,

Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, der Schweiz, Spanien, der Tschechischen Republik und dem Vereinigten Königreich.

Innerhalb einer Technischen Kommission (TC) des CEN wurden drei Bereiche gebildet.

Diese sind:

- Hygienisch medizinischer Bereich,
- Veterinärbereich
- Lebensmittelindustrie, Haushalte und Institute.

Die Methodik konzentrierte sich auf zwei Verfahren: Suspensions- und Oberflächenverfahren. Ziel ist es, praxisnahe Tests zu entwickeln. Die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln auf mikrobiell kontaminierten Oberflächen wird nach einem neu entwickelten Oberflächenverfahren ermittelt.

Das Technische Komitee CEN/TC 216 unterteilt sich in vier Arbeitsgruppen (WILDBRETT, 2006):

Arbeitsgruppe 1 (CEN/TC 216/WG1) ist zuständig für die Erarbeitung von Prüfnormen für Desinfektionsmittel und Antiseptika, die im medizinischen Bereich eingesetzt werden sollen.

Arbeitsgruppe 2 (CEN/TC 216/WG2) ist zuständig für die Erarbeitung von Prüfnormen und für die Festlegung der Anforderungen für Desinfektionsmittel und Antiseptika, die im Veterinärmedizinischen Bereich eingesetzt werden sollen.

Arbeitsgruppe 3 (CEN/TC 216/WG3) ist zuständig für die Erarbeitung von Prüfnormen und für die Festlegung der Anforderungen für Desinfektionsmittel und Antiseptika, die im Lebensmittelbereich eingesetzt werden, einschließlich der Gebiete, die sich nicht im Geltungsbereich der Zuständigkeit der Arbeitsgruppen 1 und 2 befinden.

Horizontale Arbeitsgruppen (CEN/TC 216/HWG) befassen sich mit der Entwicklung von Wirksamkeitsprüfungen von Desinfektionsmitteln und Antiseptika ohne Bezug zum späteren Einsatzbereich (Phase 1). Zu den Aufgaben kommt noch die Koordination der Zusammenarbeit zwischen Arbeitsgruppen, die Festlegung der Terminologie im Bereich Desinfektion und Antiseptika und die Festlegungen der Anforderungen an die Kennzeichnung von Desinfektionsmitteln. Nach dem Arbeitsprogramm des Technischen Komitees verlaufen die Prüfungen zur Feststellung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln und Antiseptika nach einem mehrstufigen Untersuchungsverfahren.

So werden die Desinfektionsmittel und Antiseptika zur Bestimmung der bakteriziden, fungiziden und sporoziden Basiswirkung zunächst einer Prüfung im Suspensionstest unterzogen (Phase 1). In der Phase 2 werden die Desinfektionsmittel und Antiseptika nach ihrer Wirksamkeit im Hinblick auf spezielle Bedingungen und Anforderungen des jeweiligen Einsatzbereiches geprüft. Es werden zwei Stufen in dieser Phase unterschieden. Phase 2/Stufe 1 sind Suspensionsversuche und umfassen Prüfungen auf Bakterizidie, Fungizidie, Sporozidie und

Viruzidie. Phase 2/Stufe 2 sind Keimträgerversuche bzw. Prüfverfahren für Händedesinfektionsmittel. Phase 3- Versuche sind Testmethoden unter Praxisbedingungen (ANONYM, 1999).

Die Arbeitsgruppe 2 (CEN/TC 216 WG) ist mit folgenden Aufgaben beschäftigt:

1. Entwicklung eines Prüfverfahrens für den quantitativen Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung und Festlegung der Anforderungen an chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich (Phase 2, Stufe 1).
2. Entwicklung eines Prüfverfahrens für den quantitativen Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung und Festlegung der Bewertungskriterien für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich (Phase 2, Stufe 1).
3. Entwicklung eines Prüfverfahrens für den quantitativen Suspensionsversuch zur Bestimmung der sporoziden Wirkung und Festlegung der Bewertungskriterien für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich (Phase 2, Stufe 1).
4. Entwicklung eines Prüfverfahrens für den quantitativen Suspensionsversuch zur Bestimmung der mykobakteriziden Wirkung und Festlegung der Anforderungen an chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich (Phase 2, Stufe 1).
5. Entwicklung eines Prüfverfahrens für den quantitativen Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung und Festlegung der Anforderungen an chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich (Phase 2, Stufe 1).
6. Entwicklung eines Prüfverfahrens für den quantitativen Oberflächentest zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich und Festlegung der Bewertungskriterien (Phase 2, Stufe 2).
7. Entwicklung eines Prüfverfahrens für den quantitativen Oberflächentest zur Bestimmung der viruziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich und Festlegung der Bewertungskriterien (Phase 2, Stufe 2).

Für die Viruzidieprüfung im Bereich der Veterinärmedizin wurde im September 1997 der erste CEN-Entwurf vorgestellt (W1216026 CEN/TC 216/WG2 N 106).

Der aktuelle Entwurf entstand bis zum 17.01.2003 (prEN 14675) (CEN/TC216WI026). In dieser Norm wurden die Bedingungen für eine europaweit einheitliche Prüfung der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln für den Tierhaltungsbereich (Veterinärbereich) festgeschrieben. Im Gegensatz zu den bestehenden Prüfrichtlinien wird nur ein, dafür aber widerstandsfähiges, Testvirus verwendet. Hierbei handelt es sich um das ECBO- Virus (ATCC VR-248), eines der Prüfviren der DVG.

Als Eiweißbelastung diente im wenig verschmutzten Bereich 0,3% bovines Serumalbumin und im stark verschmutzten Bereich eine Mischung aus 1 % bovinen Serumalbumin mit 1 % Hefeextrakt. Neben einer obligatorischen Einwirkzeit bei einer bestimmten Temperatur (10 °C) können die Untersuchungen wahlweise auch bei anderen Einwirkzeiten und anderen Mi-

lieutemperaturen durchgeführt werden. Als viruzid wirksam wird nach CEN ein Desinfektionsmittel bezeichnet, das innerhalb von 30 Minuten bei 10 °C eine Reduktion des Titors des ECBO-Virus um mindestens $4 \log_{10}$ KID₅₀/ml erbringt. Entwürfe zur Prüfung der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln und Antiseptika sind im Umlauf, jedoch noch nicht von allen CEN Mitgliedern akzeptiert.

2.8 Aktueller Stand der vorliegenden CEN Richtlinien im Bereich Antiseptika und Desinfektionsmittel

Nachfolgend sind Normen aufgeführt, die für den veterinärmedizinischen sowie den Lebensmittelbereich erarbeitet wurden.

Veterinärmedizinbereich:

- EN 1656, Ausgabe 2000 Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der **bakteriziden** Wirkung chemischer Desinfektionsmittel - Prüfverfahren und Anforderungen (**Phase2, Stufe1**)
- EN 1657, Ausgabe 2005 Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der **fungiziden** Wirkung chemischer Desinfektionsmittel – Prüfverfahren und Anforderungen (**Phase2, Stufe1**)
- EN 14675, Ausgabe 2006 Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der **viruziden** Wirkung chemischer Desinfektionsmittel – Prüfverfahren und Anforderungen (**Phase2, Stufe1**)
- EN 14204, Ausgabe 2004 Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der **mykobakteriziden** Wirkung chemischer Desinfektionsmittel – Prüfverfahren und Anforderungen (**Phase2, Stufe1**)
- EN 14349, Ausgabe 2007 Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der **bakteriziden** Wirkung chemischer Desinfektionsmittel auf **glatte Oberflächen** - Prüfverfahren und Anforderungen (**Phase 2, Stufe 2**)

Lebensmittelbereich:

- EN 1276, Ausgabe 1997 Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der **bakteriziden** Wirkung chemischer Desinfektionsmittel - Prüfverfahren und Anforderungen (**Phase2, Stufe1**)

-
- EN 1650, Ausgabe 1997 Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der **fungiziden** Wirkung chemischer Desinfektionsmittel – Prüfverfahren und Anforderungen (**Phase2, Stufe1**)
 - EN 13704, Ausgabe 2002 Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der **sporiziden** Wirkung chemischer Desinfektionsmittel – Prüfverfahren und Anforderungen (**Phase2, Stufe1**)
 - EN 13610, Ausgabe 2002 Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der **viruziden** Wirkung chemischer Desinfektionsmittel – Prüfverfahren und Anforderungen (**Phase2, Stufe1**)
 - EN 13697, Ausgabe 2001 Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der **bakteriziden/fungiziden** Wirkung chemischer Desinfektionsmittel auf **glatte Oberflächen** - Prüfverfahren und Anforderungen (**Phase 2, Stufe 2**).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Zellkulturen

3.1.1.1 Permanente und primäre Zellkulturen

Zur Virusvermehrung und zum quantitativen Nachweis der Virusinfektiosität dienten permanente Zelllinien wie Verozellen, eine Zelllinie aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze, MDBK, eine Zelllinie, die aus Rindernieren gewonnen wurde und FE-Zellen (Feline Embryonalzellen). Verozellen besitzen eine gute Empfänglichkeit für das EAV, Vacciniavirus und Reovirus; die MDBK Zelllinie diente für Versuche mit ECBO-Virus und BHV; FE-Zellen dienten für Versuche mit FCV. Darüberhinaus wurden Primärzellkulturen aus der Lunge von Rinderfeten (Fetale Kälberlungen- Zellen, FKL) sowie HEF verwendet. Diese Zellkulturen dienten für Versuche mit BPV bzw. NDV.

Die Vermehrung der Zellen erfolgte in "Earles` Minimal Essential Medium" (MEM) (Fa. Biochrom, Berlin) in Zellkulturflaschen (Fa. Nunc, Wiesbaden) mit einer nutzbaren Zellwachstumsfläche von 162 cm². Das Anzucht- und Erhaltungsmedium enthielt 2% bzw. 5% fetales Kälberserum (FKS) (Fa. PAN Biotech, Aidenbach).

3.1.1.2 Herstellung von Primärkulturen (FKL, HEF)

Die FKL wurden nach üblicher Technik aus Lungen ca. 4-5 Monate alter Rinderfeten und die HEF aus 11 Tage vorbebrüteten Hühnerembryonen (Valo, Fa. Lohmann Cuxhaven) im Trypsinierungsverfahren gewonnen und in Earles` MEM mit Zusatz von 5% bzw. 2% fetalem Kälberserum im Anzucht- bzw. Erhaltungsmedium gezüchtet.

3.1.1.3 Subkultivierung der Zellkulturen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in je nach Bedarf unterschiedlich großen Plastikflaschen bzw. Mikrottestplatten mit 24- bzw. 96- well Mikrottestplatten fachen Vertiefungen in einer

feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C. Dem Nährmedium (Earles` MEM) wurde neben FKS Penicillin und Streptomycin in einer Konzentration von 100 IE/ml bzw. 0,1 mg/ml zugesetzt. Zur Subkultivierung der Zellen (Zellvermehrung) wurde das Erhaltungsmedium dekantiert, der Zellrasen mit einer 0,25 %-igen Trypsin-Versen Lösung gewaschen und anschließend mit einer den Zellrasen gerade benetzenden Menge der Trypsin-Versen Lösung versehen und bei 37 °C bis zur Lösung des Zellrasens vom Boden des Kulturgefäßes inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter Verwendung einer sterilen Glaspipette und einer akku-betriebenen Pipettierhilfe durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren im Erhaltungsmedium resuspendiert und danach in einer Konzentration von ca. 10⁶ Zellen/ml Medium in Kulturflaschen bzw. -platten ausgesät und bei 37 °C wie o. a. bebrütet. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Anzuchtmedium durch Erhaltungsmedium ersetzt.

Für die Quantifizierung der Infektiosität des Virus dienten 96- well Mikrottestplatten (F-Form) mit einem konfluenten Monolayer empfindlicher Zellen. Hierfür wurden zu entsprechender Zeit vor Prüfbeginn eine Zellsuspension durch Trypsinierung gewonnen, im Medium (MEM) mit Zusatz von 5% fetalem Kälberserum suspendiert und in einer Dichte von ca. 10⁶ Zellen/ml ausgesät.

3.1.2 Virusstämme

3.1.2.1 Verwendete Testviren

Als Testviren für die geplanten Untersuchungen im Suspensionsversuch dienten vier unbehüllte und vier behüllte Virusarten.

Bovines Enterovirus Typ 1 ECBO- Virus, (Stamm LCR 4) gehört taxonomisch zur Familie der Picornaviridae und ist ein unbehülltes Virus mit einem Durchmesser von ca. 20-25 nm und einer einsträngiger RNA. MDBK- Zellkulturen dienen zur Vermehrung und zum Nachweis des Virus.

Reovirus Type 1, (Stamm Lang) gehört zur Familie der Reoviridae und ist ein unbehülltes Virus mit einem Durchmesser von 60-80 nm und einer doppelsträngigen RNA. Vero- Zellkulturen dienen zur Vermehrung und zum Nachweis des Virus.

Felines Calicivirus gehört zur Familie der Caliciviridae und ist ein unbehülltes Virus mit einem Durchmesser von 27-40 nm und einer einsträngigen RNA. FE- Zellkulturen dienen zur Vermehrung und zum Nachweis des Virus.

Bovines Parvovirus (Stamm Haden) gehört zur Familie der Parvoviridae und ist ein unbehülltes Virus mit einem Durchmesser von 20 nm und einer einsträngigen DNA. FKL- Zellkulturen dienen zur Vermehrung und zum Nachweis des Virus.

Equines Arteritisvirus (Stamm Bucyrus, CVL- Weybridge) gehört zur Familie der Arteriviridae und ist ein behülltes Virus mit einem Durchmesser von ca. 50 bis 70 nm und einer einsträngigen RNA. Vero- Zellkulturen dienen zur Vermehrung und zum Nachweis des Virus.

Bovines Herpesvirus Typ 1 ((BHV1), Stamm Phylaxia) gehört zur Familie der Herpesviridae und ist ein behülltes Virus mit einem Durchmesser von ca. 120-200 nm und einer doppelsträngigen DNA. MDBK- Zellkulturen dienen zur Vermehrung und zum Nachweis des Virus.

Newcastle disease virus (Stamm Montana) gehört zur Familie der Paramyxoviridae und ist ein behülltes Virus mit einem Durchmesser von 150-300 nm und einer einsträngigen RNA. HEF- Zellkulturen dienen zur Vermehrung und zum Nachweis des Virus.

Vaccinia-Virus (Stamm Elstree) gehört zur Familie der Poxviridae und ist ein behülltes Virus mit einem Durchmesser von 240-450 nm und einer doppelsträngigen DNA. Vero- Zellkulturen dienen zur Vermehrung und zum Nachweis des Virus.

3.1.2.2 Virusvermehrung und Quantifizierung der Infektiosität

Zur Herstellung des jeweiligen Testvirus wurde eine Ampulle mit ca. 1 ml Virussuspension (infektiöser Kulturüberstand) aus der bei -70 °C gelagerten Stammsammlung des Institutes entnommen, bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend zur Vermehrung *via* Adsorptionsverfahren auf einen konfluenten Monolayer der Zellen inokuliert. Hierzu wurde das Kulturmedium der Zellen dekantiert, die Kultur einmal mit physiologischer phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), pH 7,2, gewaschen und das Virus anschließend auf den Zellrasen inokuliert. Nach einer Adsorptionszeit des Virus von 60 min bei 37 °C wurde die Kultur erneut einmal mit PBS gewaschen und nach Versorgung mit MEM ohne Zusatz von FKS wie beschrieben weiter inkubiert.

Die Virusernte erfolgte nach Auftreten eines den gesamten Zellrasen erfassenden virusspezifischen zytopathischen Effekts (ZPE). Hierzu wurde die Kultur gefroren (-70 °C) und aufgetaut und die Virus-Zellsuspension anschließend zur weiteren Freisetzung von u. U. noch zellulär gebundenen Viren mit Ultraschall (Branson Sonifier) für 30 s behandelt. Nach niedertouriger Klärung (10 min bei 1.000 x g) wurde der Überstand (infektiöses Virus) gewonnen und in Aliquots à 1 ml bei -70°C unter der Bezeichnung „Stockvirus“ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die Herstellung des „Saatvirus“ erfolgte unter Verwendung des „Stockvirus“ als Inokulum und in Analogie zur Herstellung des „Stockvirus“.

Zur Vermehrung des „Testvirus“ diente „Saatvirus“. Abweichend von dem Protokoll zur Produktion von „Stock“- und „Saatvirus“ wurde im Anschluss die Testvirussuspension (ECBO-Virus und BPV) mittels Ultrazentrifugation (L8-55, Fa. Beckmann) für 2 Stunden bei 30.000 x g und 4 °C (Rotor 45 Ti) nachträglich konzentriert. Nach Abschluss der Ultrazentrifugation wurde das Pellet mittels Ultraschall in PBS suspendiert und in Aliquots bei -70 °C bis zur Verwendung gelagert.

3.1.2.2.1 Bestimmung des Infektiositätstiters

Zur Ermittlung der Infektiositätstiter wurde eine dekadische Verdünnungsreihe der Virussuspension in MEM mit 5 % FKS im Verhältnis von 0,2 ml Virus zu 1,8 ml MEM hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 0,1 ml in je vier Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit einem konfluenten Rasen der empfänglichen Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Kulturen wie o. a. inkubiert und täglich lichtmikroskopisch auf das Vorliegen eines ZPE hin kontrolliert.

Ergänzend dazu wurde zur Erhöhung der Nachweisgrenze die auf ihre Infektiosität zu prüfende Virussuspension (i. d. R. 10 ml) vollständig auf empfänglichen Zellkulturen pipettiert (4 x 1,0 ml je Vertiefung einer 24 – well Mikrotiterplatte“ und 1 x 5,5 ml auf einen geschlossenen Zellrasen einer Kulturflasche (25 cm²)). Theoretisch betrug die Nachweisgrenze nach dieser Titrationstechnik bis $10^{0,5}$ in KID_{50} /Träger siehe **Abb. 2**.

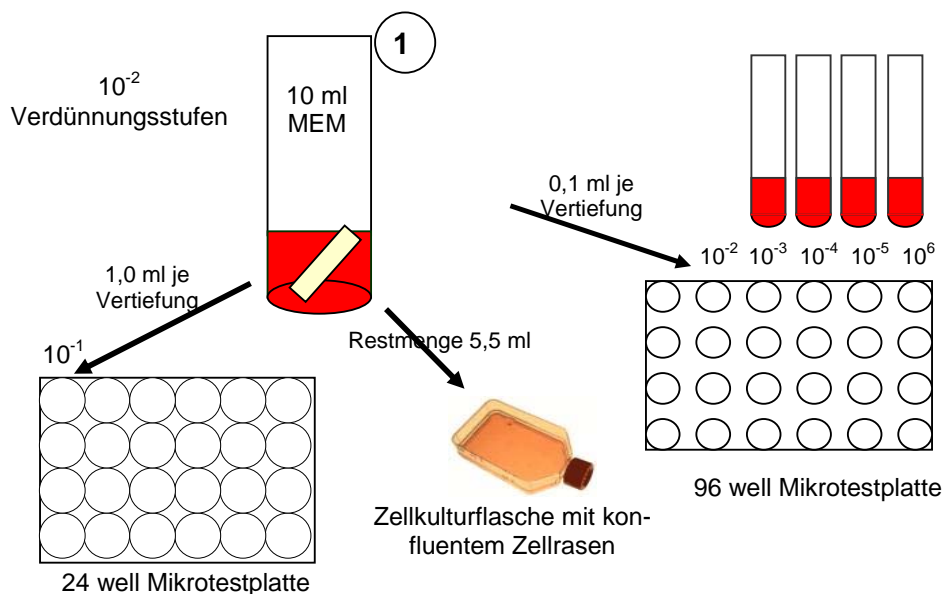


Abbildung 2: Modifikation der Virustitration zur Erhöhung der Nachweisgrenze

3.1.2.2 Kalkulation der Infektiositätstiter

Zur Schätzung der Infektiosität in Kultur-infektiösen Dosen₅₀ (KID₅₀) anhand des ZPE diene die Formel nach Spearman (1908) und Kaerber (1931).

Berechnung nach der Formel:

$KID_{50}/\text{Volumen} = x_0 - d/2 + d/n \times \Sigma x_i$, wobei

- x_0 der positive Exponent der höchsten Verdünnung, bei der alle Testobjekte positiv reagieren
- d der Dosisabstand in Logarithmus 10
- n die Anzahl der pro Verdünnung eingesetzten Testobjekte
- Σx_i die Summe aller auf die Infektion positiv reagierenden Testobjekte, ab und einschließlich der bei x_0

3.1.3 Desinfektionsmittel

3.1.3.1 Grundchemikalien

Für die Überprüfung der Tenazität verschiedener animaler Viren im Suspensionsversuch wurden vier Grundchemikalien der 12. Desinfektionsmittelliste der DVG verwendet (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Biozide Grundchemikalien zur vergleichenden Prüfung der Tenazität animaler Viren

Handelsname	Hersteller	Inhaltsstoffe	Konzentration
Formaldehyd	Fa.MERCK Darmstadt	Formaldehyd Methanol	35%ig 9-11%ig
Natriumhypochlorit	Fa.MERCK Darmstadt	Natriumhypochlorit	13%ig
Ameisensäure	Fa.MERCK Darmstadt	Ameisensäure	98-100%ig
Peressigsäure	Fa.MERCK Darmstadt	Peressigsäure	40%ig

3.1.3.2 Kommerzielle Desinfektionsmittel

Zur Prüfung der Praktikabilität der neu entwickelten Methodik als auch um einen Überblick über die viruzide Wirksamkeit der im Bereich der Lebensmittelindustrie verwendeten Desinfektionsmittel zu erhalten, wurden 4 Desinfektionsmittel aus der 6. Desinfektionsmittelliste für den Lebensmittelbereich stellvertretend für die am häufigsten gelisteten Wirkstoffgruppen ausgewählt. Hierbei handelt es sich um die in **Tabelle 5** aufgeführten Präparate mit unterschiedlichen Wirkstoffen.

Tabelle 5 Für die Keimträgerversuche verwendete kommerzielle Desinfektionsmittel aus der 6. Desinfektionsmittelliste der DVG (Lebensmittelbereich)

Handelsname	Hersteller	Inhaltsstoffe	Konzentration
Steril	Seewald-Chemie GmbH&Co.KG Unna	Activchlor, anorganische Salze, Gerüststoffe	-
neoquat s	Chemische Fabrik Hamburg	5% Phosphonat, 5-15% nichtionische Tenside; Desinfektionswirkstoffen 100 g: 10 g Didecyldimethylammoniumchlorid	10%ig
Divodes FG	JohnsonDiversery Deutschland Mannheim	Isopropanol, n-Propanol	100%ig
HM 3000	Moebert GmbH Rumohr	7,5 g 3- Aminopropyl - Dodecylamin	-

3.1.4 Ermittlung der Tenazität verschiedener animaler Viren gegenüber biozid wirksamen Chemikalien

3.1.4.1 Suspensionsversuche

Die Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an die vom Comité Européen de Normalisation (CEN) herausgegebenen „Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel“ (ANONYM, 2003a). Die Reaktionsgemische bestanden aus einem Teil Virussuspension, acht Teilen des zu prüfenden Desinfektionsmittels in 1,25 facher Konzentration und einem Teil WSH (Ansatz ohne Eiweiß) bzw. einem Teil FKS in zehnfacher Konzentration (Ansatz mit Eiweiß).

Mit Zugabe des Desinfektionsmittels in das Reaktionsgemisch begann die Einwirkzeit. Nach verschiedenen Einwirkungszeiten (15, 30, 60 und 120 Minuten) für unbehüllte Viren und (5, 15, 30, und 60 Minuten) für behüllte Viren wurden Proben von 0,5 ml entnommen, in 4,5 ml MEM suspendiert und anschließend in Zehnerschritten in MEM weiter verdünnt. Parallel zu den Prüfansätzen wurden Reaktionsgemische mit und ohne Eiweiß hergestellt, die anstelle des Desinfektionsmittels WSH enthielten (Viruskontrollen). Die Infektiositätstiter der Prüfansätze und der mitgeführten Viruskontrollen wurden analog den Angaben unter **Punkt 3.1.2.2.1** bestimmt.

Die Differenz der Infektiositätstiter von Viruskontrolle und dem Prüfansatz ergab die Titerreduktion. Alle Testansätze im Suspensionsversuch erfolgten bei einer Temperatur von 20 °C (+/- 1°C).

3.1.4.1.1 Prüfung der Zytotoxizität der Produkte

Die zu prüfenden Testkonzentrationen der Desinfektionsmittel wurden in log 10- Schritten in MEM mit 5% FKS verdünnt und anschließend im Vierfachansatz auf die für die Prüfung verwendeten Zellkulturen mit jeweils 0,1 ml beimpft. Die mikroskopische Untersuchung der Zellkulturen auf das Auftreten zytopathischer Veränderungen erfolgt nach Zeiten, die dem Prüfungsgang entsprechen. Erforderlichenfalls (bei Verdacht auf eine Fixation der Zellen ohne Auftreten einer mikroskopisch erkennbaren Alteration) wurde die Empfänglichkeit der Zellkulturen für das Prüfvirus bestimmt.

3.1.4.1.2 Beurteilung der Tenazität der verschiedenen Virusarten

Die vergleichende Beurteilung der Tenazität der geprüften unbehüllten und behüllten Virusarten gegenüber bioziden Wirkstoffen erfolgte unter Zugrundelegung der **Tabelle 6** über ein Benotungssystem. Jeweils die niedrigste Einwirkzeit bzw. die niedrigste Konzentration an Desinfektionsmittel um das jeweilige Virus um 4 Zehnerpotenzen zu inaktivieren, erhält die Punktzahl 1. Bei Verdopplung, Verdreifachung etc. von Einwirkzeit bzw. Konzentration erhöhte sich die Punktzahl entsprechend. Je höher die Punktzahl für ein Virus, desto höher ist seine Tenazität gegenüber den geprüften Desinfektionsmitteln zu veranschlagen.

Tabelle 6 Vergleichende Objektivierung der Tenazität gegenüber Desinfektionsmitteln am Beispiel von FCV und ECBO- Virus sowie zweier Desinfektionsmittel

Desinfektionsmittel	FCV		ECBO- Virus	
	Minimale Konzentration und Einwirkzeit	Punkte	Minimale Konzentration und Einwirkzeit	Punkte
Formaldehyd	0,5%	<u>1</u>	1%	2
	120 min	1	120 min	<u>1</u>
Natriumphoclorit	0,25%	<u>1</u>	1%	4
	15 min	<u>1</u>	60 min	4
Σ		4		11

Legende: - Die jeweils niedrigsten Werte in einer Zeile erhalten die niedrigste Punktzahl

3.1.4.1.3 Eiweißbelastung

Als Zusatz zu der Testvirussuspension dienten Hefeextrakt (HE) (Merck, Darmstadt, Lot-Nr: 0127-01-7) und bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V (SERVA ELECTROPHORESIS GmbH, Cat: 11930).

In den **Suspensionsversuchen** betrug der Anteil dieser Eiweiße jeweils 1 %.

Auch für die **Keimträgerversuche** fanden diese Eiweiße in einer Konzentration von jeweils 0,1% in der Virussuspension Verwendung. Daneben wurden Versuche mit BSA allein in einer Konzentration von 0,5% in der Virussuspension durchgeführt.

Die Auswahl dieser Substanzen orientierte sich an der im Entwurf vorliegenden europäischen Richtlinie (CEN Norm) zur Prüfung von Desinfektionsmitteln auf Viruzidie im Veterinärbereich (ANONYM, 2003a).

3.1.5 Etablierung eines Keimträgermodells zur Bestimmung der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln auf Oberflächen

Im Rahmen dieser, für eine reproduzierbare Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln an kontaminierten Oberflächen sehr entscheidenden Versuche war zunächst die Auswahl des Testvirus und der Keimträgermaterialien durchzuführen. Weiterhin waren Versuche zum Einfluss der Antrocknung auf die Infektiosität des Testvirus und zu den Einflüssen der Adsorption an die Trägermaterialien sowie der verwendeten Verfahren zur Rückgewinnung des Virus von den Trägern auf die Infektiosität des Testvirus quantitativ zu erfassen.

3.1.5.1 Testvirus

Als Testvirus diente das nach den Kriterien unter **Punkt 4.1** zu wählende Virus.

3.1.5.2 Keimträgermaterial im Lebensmittelbereich

Als Prüfflächen, an die Suspensionen von Mikroorganismen zu adsorbieren und nach erfolgter Desinfektion zurückzugewinnen waren, dienten Träger aus V₂A-Stahl (NE – Metalle-Staufenberg-Treis 20 x 20 x 1 mm, Giessen) und Polyethylen 500 (20 x 20 x 5 mm, ORBI-LAN Kunststoffwerk GmbH, Rosendahl – Osterwick).

3.1.5.2.1 Vorbehandlung der Keimträger

Die V₂A-Stahlkeimträger wurden zur Entfettung für 15 min in einem Isopropanolbad (95 % Isopropanol) gewaschen, anschließend unter fließendem Wasser gespült und zur Trocknung halbaufrecht an den inneren Rand einer Petrischale gelehnt. Danach wurden die Keimträger in Aluminiumfolien verpackt und im Heißluftsterilisator bei 180 °C sterilisiert.

Bei den Keimträgern aus Makrolon war aus Gründen des Fabrikationsprozesses dieses Materials eine Entfettung nicht erforderlich. Die Sterilisation erfolgte 10 min bei 121 °C im Autoklaven.

3.1.5.3 Einfluss der Trocknung auf die Infektiosität des Testvirus

Die Adsorption der Testvirussuspension an die Keimträger erfolgte nach diversen Vorgaben aus dem Schrifttum sowie in Anlehnung an die DVG-Richtlinien zur Prüfung chemischer Des-

infektionsmittel durch Antrocknung des in PBS suspendiertem Testvirus an die Keimträgeroberflächen (DVG, 2000). Zur Bestimmung des möglichen Infektiositätsverlustes durch Trocknung wurde die Testvirussuspension in Glasröhrchen pipettiert, unter dem laminaren Luftstrom einer Reinraumwerkbank bis zur vollständigen Trocknung gelagert und anschließend nach erfolgter Resuspension auf verbliebene Infektiosität untersucht. Als Trocknungszeit wurde der Zeitraum definiert, bei dem das Gewicht des unter dem Luftstrom platzierten Röhrchens seinem Ausgangsgewicht entsprach. Im Einzelnen erfolgte die Durchführung der Versuche nach folgendem Protokoll (**Abb. 4**).

Von der Testvirussuspension, die zuvor im Verhältnis von 1:10 (v/v) in WSH suspendiert worden war, wurden 0,1 ml im Fünffachansatz in zuvor gewogene Glasröhrchen pipettiert. Parallel wurden auch Versuche mit 0,2 ml und 0,3 ml Virussuspension durchgeführt. Anschließend wurden die Röhrchen wie oben beschrieben zur Trocknung in der Reinraumwerkbank gelagert. Nach Ablauf der Trocknungszeit wurde das angetrocknete Testvirus in 1,0 ml WSH resuspendiert. Als mechanische Resuspensionshilfen dienten ein Laborschüttler (Vortexer) und ein Ultraschallwasserbad. Die Reagenzröhrchen wurden zunächst für die Dauer von 2 min auf maximaler Stufe geschüttelt und anschließend für 10 min im Eiswasserbad mit Ultraschall (LABSON 200 Ultraschallgenerator T460 / H Nr. EYH – 12848715, SINGEN) behandelt. Daraufhin erfolgte eine quantitative Bestimmung der verbliebenen Infektiosität.

Als Kontrolle dienten Testvirussuspensionen in luftdicht verschlossenen Röhrchen, die bei jedem Versuchsdurchgang mitgeführt wurden. Von diesen Kontrollansätzen erfolgte eine Bestimmung des Infektiositätstiters jeweils zu Beginn und nach Ablauf der Trocknungszeit. Als Trocknungsverlust in $\log_{10}KID_{50}$ wurde die Differenz der Infektiositätstiters zwischen Kontroll- und Trocknungsansatz definiert.

In Analogie zu diesem Protokoll wurden weitere Versuche zum Einfluss der Trocknung auf die Virusinfektiosität in Abhängigkeit von BSA und HE mit einer Endkonzentration von jeweils 0,1 % in der Virussuspension durchgeführt als auch mit BSA allein in einer Endkonzentration von 0,5%. Diese Experimente erfolgten im Dreifachansatz. Als Vergleich diente eine negative Kontrolle (ohne Eiweißzugabe zu der Testvirussuspension). Konzentrationen und Art der in diesen Versuchen geprüften Eiweißzusätze zu der Testvirussuspension sind den entsprechenden tabellarischen Ergebnisaufstellungen zu entnehmen.

3.1.5.4 Adsorption der Testvirussuspension an die Keimträger

Die Testvirussuspension wurde mit Lösungen von HE und BSA in WSH von jeweils 0,1% (**Punkt 3.1.4.1.3**) im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt und das Gemisch anschließend in einer Menge von jeweils 0,1 ml auf die Oberfläche der Keimträger pipettiert, so dass es zu einer

fast vollständigen, jedoch nicht die Ränder der Träger betreffenden Benetzung kam. Anschließend wurde die Testvirussuspension unter dem laminaren Luftstrom einer Reinraumwerkbank an die Träger angetrocknet. Die Bestimmung der erforderlichen Trocknungszeit erfolgte nach Definierung des Zeitraums, bei dem das Gewicht des unter dem Luftstrom platzierten Trägers seinem Ausgangsgewicht entsprach (**Abb. 3**).

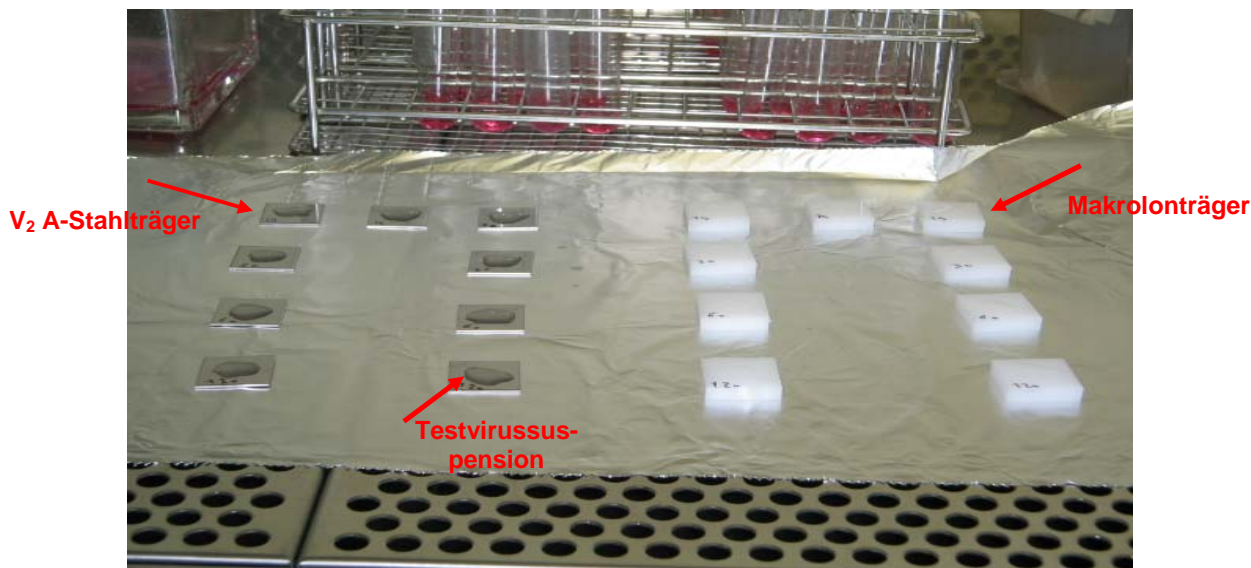


Abb. 3: Zur Trocknung unter dem laminaren Luftstrom einer Reinraumwerkbank verbrachte, mit der Testvirussuspension beschickte Keimträger

3.1.5.5 Desorption des adsorbierten Testvirus von den Keimträgeroberflächen

Die weiteren Versuche galten der Frage, ob das Testvirus nach Trocknung/Adsorption an die für die Versuche vorgesehenen Keimträger aus Stahl und Kunststoff in ausreichend hoher Infektiosität, die eine Beurteilung der Inaktivierung über vier Zehnerpotenzen ermöglicht, von den Trägern zu eluieren ist.

Mit dem Ziel, die Rückgewinnung von infektiösem Virus von den Keimträgeroberflächen zu optimieren, wurden zwei verschiedene Techniken vergleichend angewendet und ausgewertet. Zur Elution und Resuspension des Testvirus diente in einem Fall das Abschwemmen, mechanisch unterstützt durch Schütteln und Ultraschallbehandlung (Abschwemmtechnik), und im anderen Fall das Abtupfern der Trägerflächen mit anschließender Suspension des potentiell mit den Tupfern aufgenommenen Virus (Abstrichtechnik). Die Abschwemmtechnik orientierte sich methodisch an der in den Richtlinien der DVG zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel auf Viruzidie beschriebenen Technik und die Abstrichtechnik an Methoden, die nach DIN zur Bestimmung des bakteriellen Keimgehalts auf Oberflächen dienen (DIN,1988).

Als Viruskontrollen dienten für alle nachfolgend skizzierten Versuche mit der Virussuspension beschickte Keimträger, bei denen während der erforderlichen Trocknungszeit durch einen luftdichten Verschluss eine Antrocknung der Virussuspension an die Keimträger verhindert wurde.

3.1.5.5.1 Abschwemmtechnik

Die mit den Testvirussuspensionen beschickten Keimträger wurden in Plastikröhrchen mit Schraubverschluss und einer maximalen Füllmenge von 50 ml (Fa. Nunc, Wiesbaden) gegeben und mit 10 ml MEM überschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen auf dem Vortexer für unterschiedlich lange Zeiträume (0, 15, 30, 45, 60, 120 s) geschüttelt. Alternativ erfolgte für entsprechend lange Zeiträume eine Behandlung bzw. zusätzliche Behandlung im Ultraschallwasserbad. Zu den genannten Zeiträumen wurden Probenvolumina der Suspensionsflüssigkeit von jeweils 0,5 ml entnommen und der Infektiositätstiter bestimmt (**Abb. 5**).

3.1.5.5.2 Abstrichtechnik

Zum Abtupfern der Keimträgeroberflächen wurde ein steriles Wattestäbchen mit 0,1 ml WSH getränkt und anschließend unter konstantem Druck und unter leichter Drehung für einen Zeitraum von 15 s mäanderförmig auf der Oberfläche bewegt. Daraufhin wurde der Keimträger mit dem gleichen Tupfer für weitere 15 s in einem Winkel von 90° zu den ersten Abstrichbewegungen abgetupfert. Danach schloss sich ein erneuter analog durchgeführter Abtupfervorgang an, für den ein neuer, diesmal jedoch trockener Tupfer verwendet wurde. Danach wurden beide Tupfer in ein Nunc-Röhrchen gegeben und mit 10 ml MEM überschichtet. Alle weiteren Schritte entsprachen methodisch der Abschwemmtechnik.

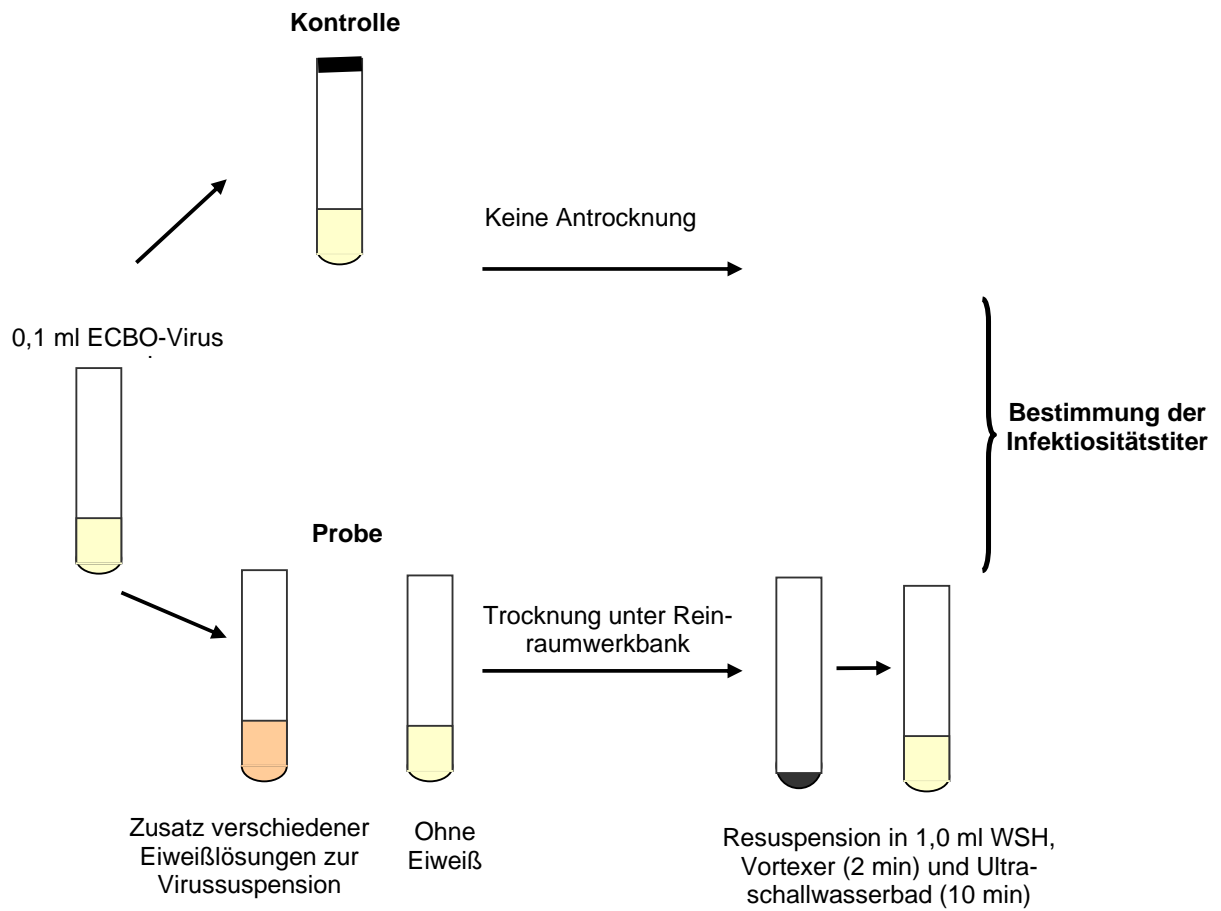


Abb. 4: Schematische Darstellung zur Bestimmung des Einflusses der Antrocknung auf die Infektiosität

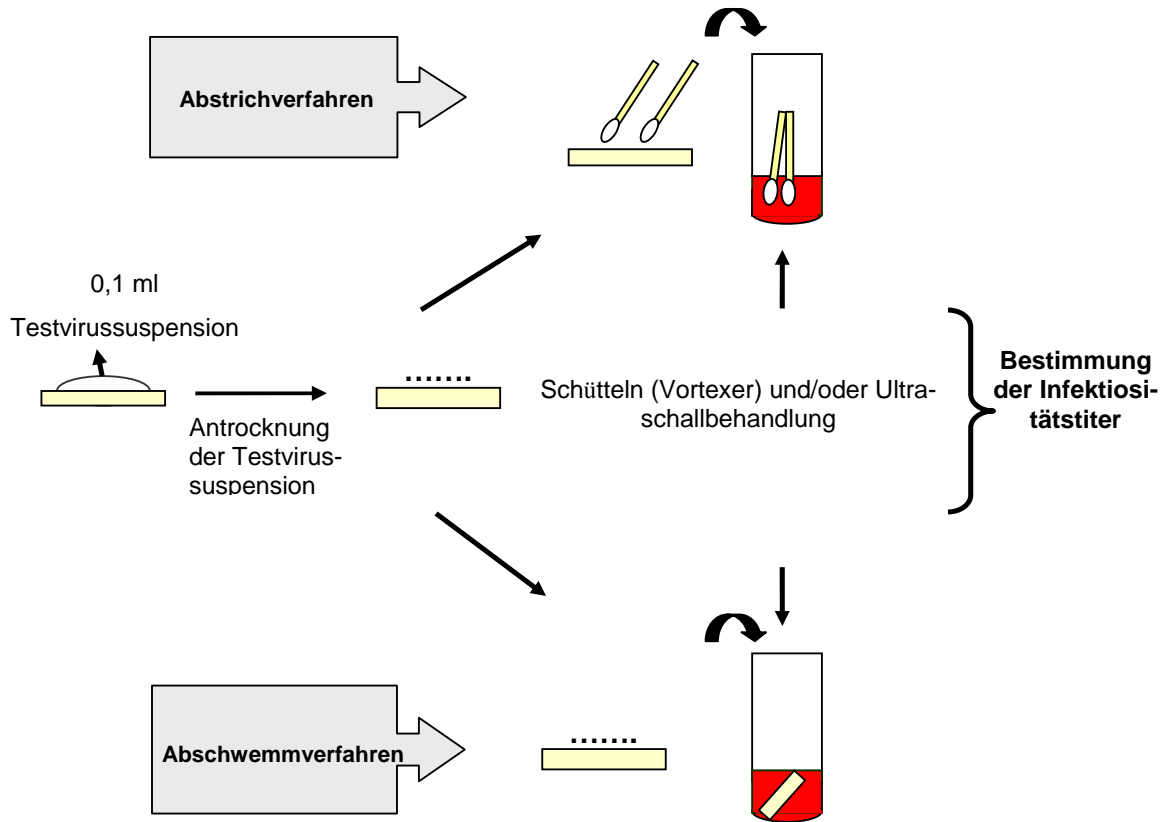


Abb. 5: Schematische Darstellung der Methoden zur Desorption des Testvirus von den Oberflächen der Trägermaterialien

3.1.5.5.3 Prüfung der Keimträger auf verbliebene Infektiosität nach erfolgter Desorption des Testvirus mittels Abschwemm- und Abstrichtechnik

Nach Desorption des Virus von den Keimträgern unter Verwendung der Abschwemm- oder Abstrichtechnik stand zur Diskussion, welche Infektiosität die Keimträger tatsächlich noch aufwiesen. Hierzu wurden die Träger nach Abschluss der Prozedur zur Desorption des Virus von den Trägern aus dem Medium entnommen und in frisches Medium (10 ml) überführt. Daraufhin wurde der o.a. Versuch (Desorption des Virus durch Ultraschallbehandlung und schütteln) erneut durchgeführt und die potentiell resultierenden Virustiter im Suspensionsmedium bestimmt. Parallel hierzu wurden die Keimträger nach der Desorptionsprozedur für 30; 60; 90; und 120 s in einem weiteren Versuch einer direkten Ultraschalleinwirkung (Branson Sonifier) ausgesetzt, um potentielles Testvirus zu desorbieren. Zur Objektivierung des Ergebnisses wurde das Suspensionsmedium anschließend titriert.

3.1.5.6 Untersuchungen zur möglichen Desorption des Testvirus von den Keimträgern nach Überschichtung der Keimträger mit der Desinfektionsmittellösung

Bei der Analyse des Restvirusgehalts der Keimträger nach erfolgter Desinfektion stellte sich die Frage, ob die entsprechende Untersuchung des Keimträgers allein ausreicht, oder aber die nach Ablauf der Kontaktzeit noch auf dem Träger vorhandene Desinfektionsmittellösung in diese Untersuchung miteinzubeziehen sei. Eine getrennte Analyse des Keimträgers und der auf dem Träger befindlichen Desinfektionsmittellösung auf Infektiosität sollte Aufschluss darüber geben, ob das Virus an dem Träger haften bleibt oder durch Überschichtung des Trägers mit Desinfektionsmittel in dem Präparat suspendiert wird. Hierzu wurden viruskontaminierte Träger (**Punkt 3.1.5.4**) mit 0,16 ml WSH (anstelle Desinfektionsmittel) überschichtet und nach Ablauf von 15, 30, 60 und 120 min die Keimträger und WSH quantitativ auf Infektiosität geprüft (**Punkt 3.1.2.2.1**) und (**Abb. 6**).

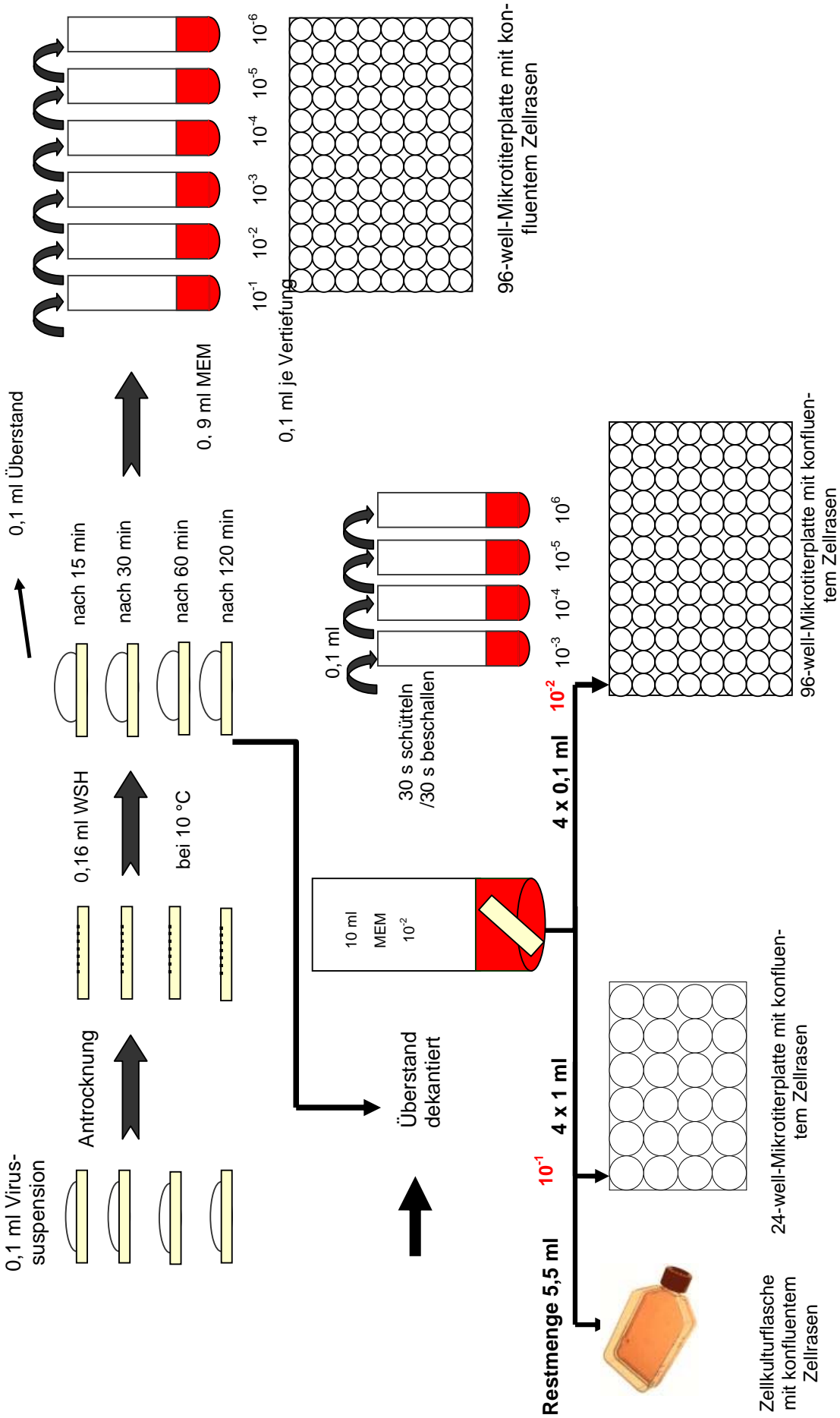


Abb. 6: Schematische Darstellung der Untersuchungen zum Nachweis einer möglichen Desorption des Testvirus von den Keimträgern nach Zugabe des „Desinfektionsmittels“

3.1.5.7 Viruzide Wirksamkeit im Handel erhältlicher Desinfektionsmittel für den Lebensmittelbereich

Um erste Daten über die viruzide Wirksamkeit dieser auf Bakterizidie und oft auch Fungizidie geprüften Substanzen zu erhalten, als auch um die Praktikabilität der etablierten Methodik zu beurteilen, wurden verschiedene kommerzielle Desinfektionsmittel für den Lebensmittelbereich auf ihre viruzide Wirksamkeit hin geprüft (**siehe Punkt 3.1.3.2**).

3.1.5.7.1 Prüfmethodik

Die Prüfung auf Viruzidie erfolgte wie unter **Punkt 3.2.4** und in **Abb. 27** beschrieben.

3.1.5.7.2 Beurteilung der Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfung für Viruzidie

Die Beurteilung der viruziden Wirksamkeit für die Keimträgerversuche (V_2 A-Stahl und Polyethylen 500) erfolgte in Anlehnung an die von der CEN herausgegebenen „Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel“. Dabei gilt eine Titerreduktion um vier Zehnerpotenzen als ausreichend viruzid.

3.2 Ergebnisse

3.2.1 Tenazität unbehüllter und behüllter Virusarten gegenüber verschiedenen biozid wirksamen Grundchemikalien

Nachfolgend sind die Reduktionstiter der geprüften Virusarten nach unterschiedlicher Einwirkungsdauer der in verschiedenen Konzentrationen angewendeten Desinfektionsmittel wiedergegeben. Eine vollständige Aufstellung der Messwerte findet sich im Anhang.

Die graphischen Darstellungen geben die prozentuale Differenz der Infektiositätstiter aus den Kontrollansätzen (ohne Desinfektionsmittel) und den Ansätzen mit den bioziden Substanzen wieder. Die Säulenhöhen entsprechen somit dem Ausmaß des Verlustes an Infektiosität nach Einwirkung der Chemikalien. Insgesamt wurde deutlich, dass die behüllten Virusarten eine geringere Tenazität gegenüber den verwendeten Chemikalien aufwiesen als die unbehüllten Virusarten. Darüberhinaus bestanden Unterschiede in der Tenazität zwischen den Virusarten. Weiterhin wurde aus der Gesamtheit der Versuche erkennbar, dass die verwendeten Grundchemikalien besonders in sehr niedrigen Konzentrationen in Anwesenheit von Eiweiß eine z.T. beträchtlich reduzierte Wirksamkeit aufwiesen.

3.2.1.1 Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber Formaldehyd

Die Widerstandsfähigkeit der unbehüllten Virusarten gegenüber Formaldehyd war nicht einheitlich. Am widerstandsfähigsten erwies sich das Reovirus, gefolgt von bovinem Parvovirus, ECBO – Virus und schließlich FCV.

Unter Eiweißzusatz waren diese Unterschiede zwar ähnlich, jedoch bei eingeschränkter Wirksamkeit gegenüber den verschiedenen Virusarten. Dies war besonders bei der Prüfung mit Reovirus offensichtlich (**siehe Abb. 7.1 und 7.2**).

3.2.1.2 Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber Formaldehyd

Bei der Prüfung der Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber Formaldehyd war EAV am widerstandsfähigsten. Dies traf besonders für die niedrigste Formaldehydkonzentration (0,25%) zu. Bei höherer Konzentration (1,0%) glichen sich die Unterschiede an. Geringfügig weniger widerstandsfähig als das EAV erwiesen sich das BHV1 und das NDV, gefolgt in geringem Abstand von dem Vacciniavirus. Wie bereits bei den unbehüllten Virusarten be-

schrieben, waren auch die behüllten Virusarten, besonders bei niedriger Formaldehydkonzentration durch Eiweißzugabe vor der Einwirkung des Desinfektionsmittels geschützt (**siehe Abb. 7.3 und 7.4**).

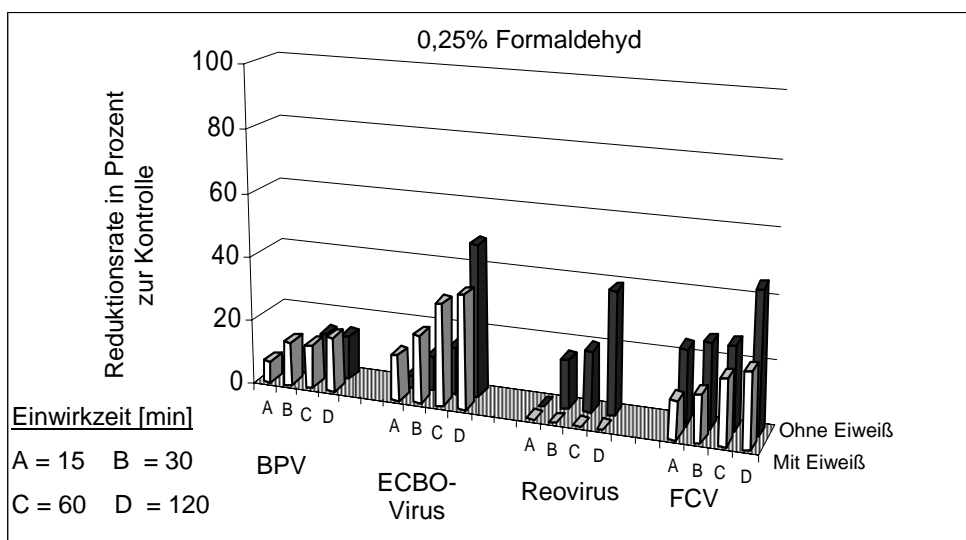


Abb.7.1: Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber 0,25% Formaldehyd

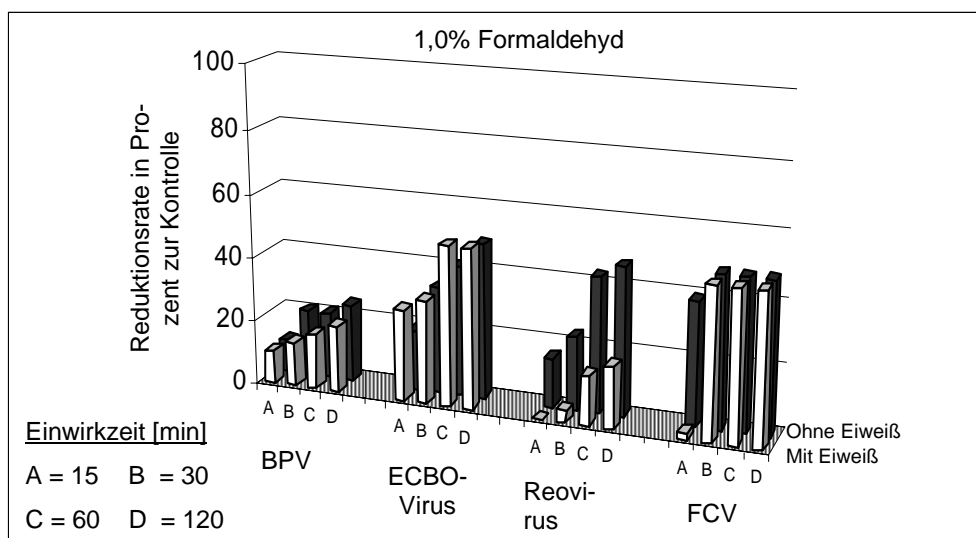


Abb.7.2: Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber 1,0% Formaldehyd

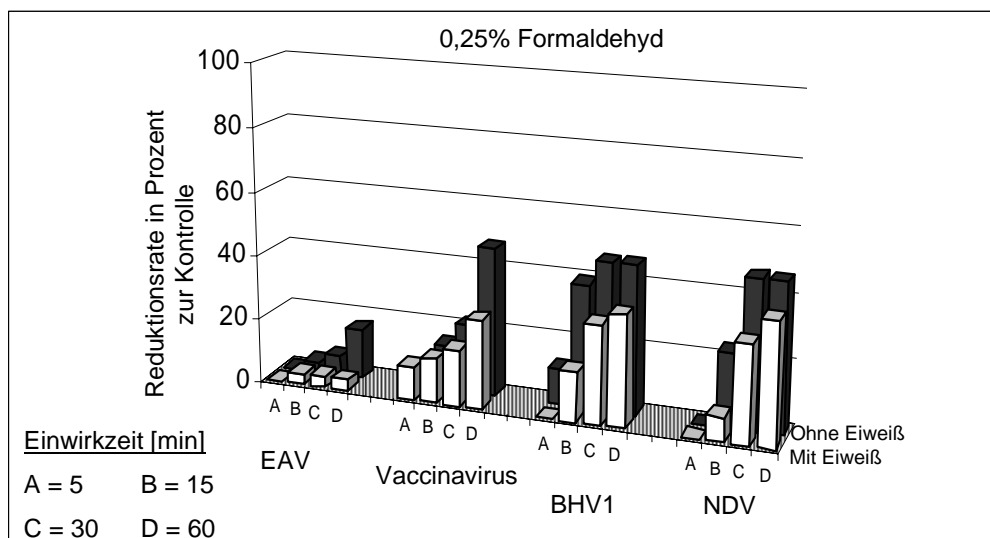


Abb.7.3: Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber 0,25% Formaldehyd

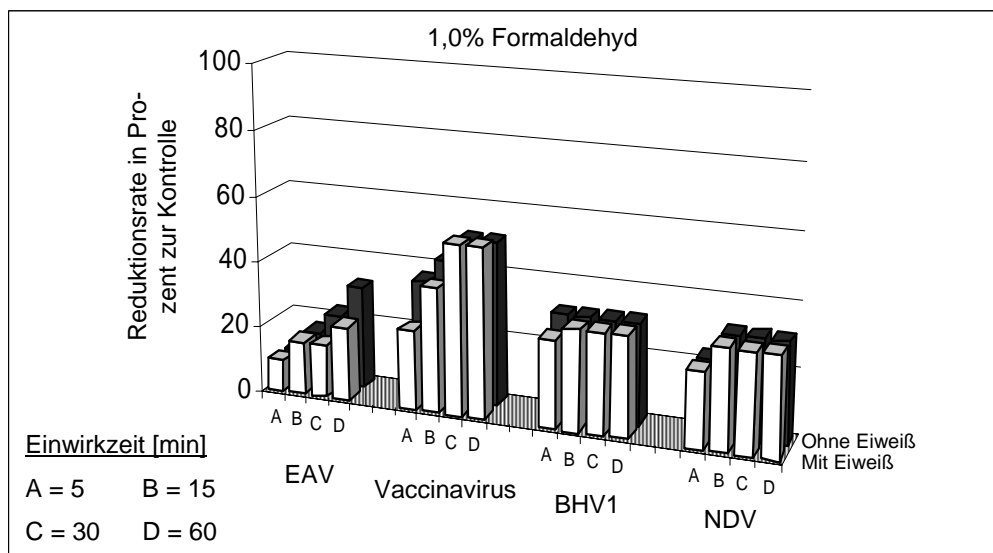


Abb.7.4: Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber 1,0% Formaldehyd

3.2.1.3 Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber Ameisensäure

Die ausgewählten unbehüllten Virusarten wiesen gegenüber Ameisensäure z.T. beträchtliche Tenazitätsunterschiede auf. Sehr deutlich wurde dies beim Vergleich der Tenazitäten von Reoviren und FCV gegenüber der 2%igen Ameisensäurelösung. Geringer waren die Unterschiede sowohl zwischen dem BPV und dem ECBO – Virus als auch zwischen diesen beiden Viren und dem Reovirus. Gemessen an dem Versuch mit der 2%igen Ameisensäurelösung erwies sich das Reovirus am widerstandsfähigsten. BPV, ECBO- Virus und FCV besaßen eine in dieser Reihenfolge abnehmende Widerstandsfähigkeit. (siehe Abb. 8.1 und 8.2).

3.2.1.4 Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber Ameisensäure

Auch bei der Prüfung der Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber Ameisensäure ergaben sich erhebliche Wirksamkeitsunterschiede, besonders im Versuch mit der 0,1%igen Lösung. Gemessen an dem Versuch mit der 0,5%igen Ameisensäure besaßen das EAV und das NDV als auch das Vacciniavirus und das BHV1 jeweils eine vergleichbare Widerstandsfähigkeit. Die höhere Tenazität wiesen in diesem Versuch das NDV und das EAV auf (siehe Abb. 8.3 und 8.4).

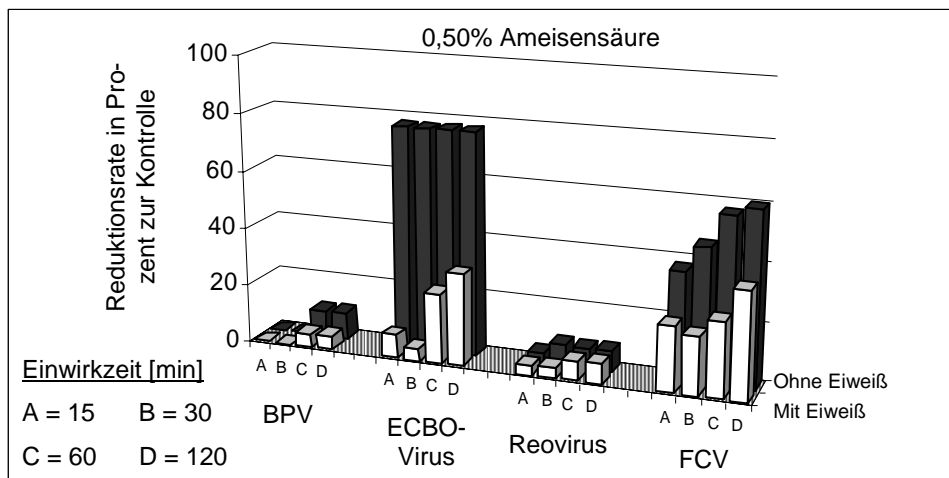


Abb.8.1: Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber 0,50% Ameisensäure

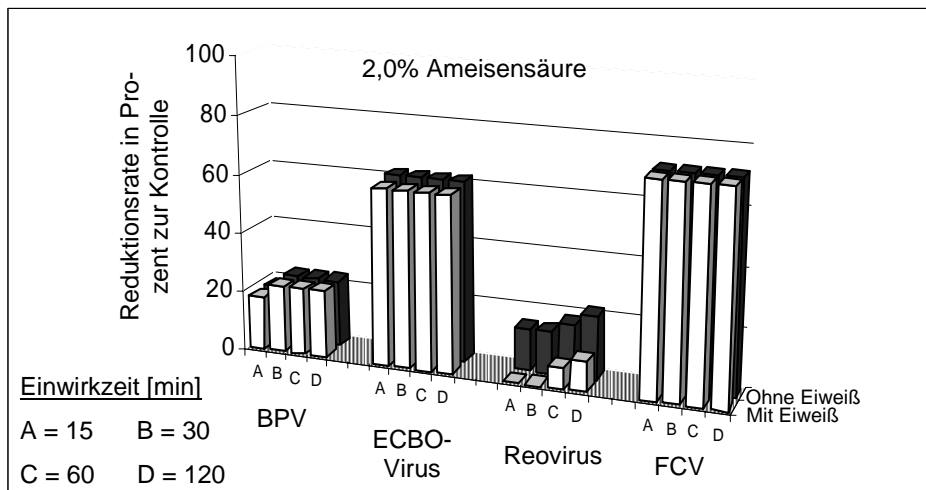


Abb.8.2: Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber 2,0% Ameisensäure

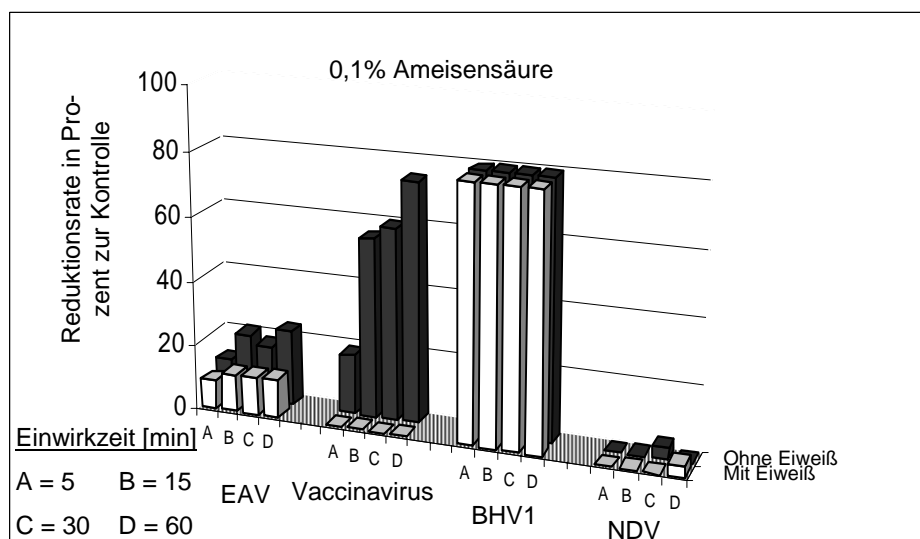


Abb.8.3: Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber 0,1% Ameisensäure

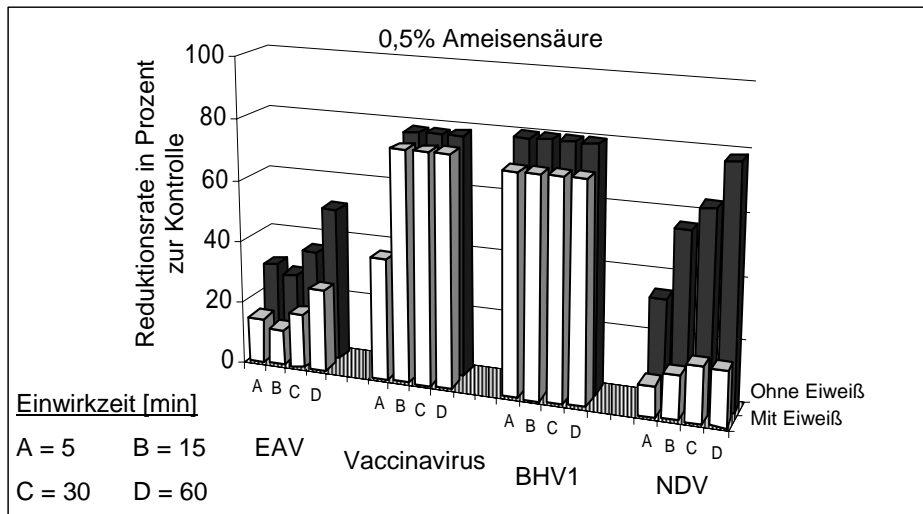


Abb.8.4: Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber 0,5% Ameisensäure

3.2.1.5 Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber Peressigsäure

Unter Einwirkung von Peressigsäure in niedriger Konzentration (0,05%) gab es ähnlich wie bei Aldehyden und Ameisensäure Unterschiede in der Tenazität der unbehüllten Virusarten. Entsprechende Unterschiede liegen auch bei höheren Peressigsäurekonzentrationen vor.

Hiernach besitzen die geprüften Viren in der Reihenfolge FCV, Reovirus, ECBO- Virus eine steigende Tenazität. Auch in diesem Versuch fällt auf, dass der sogenannte Eiweißfehler zwar gegenüber allen Virusarten auftrat (**Abb. 9.1**), aber bei zunehmender Konzentration des Desinfektionsmittels nicht gleichmäßig abnahm, sondern z.B. bei 0,05% Peressigsäure ausschließlich nur noch gegenüber Reovirus messbar war (**Abb. 9.2**).

3.2.1.6 Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber Peressigsäure

Die behüllten Virusarten wiesen gegenüber der Peressigsäure nur geringe Tenazitätsunterschiede auf. Dies traf für alle 3 geprüften Peressigsäure Konzentrationen zu. Eine Reihung der Virusspezies nach ihrer Widerstandsfähigkeit ließ sich hier nicht durchführen (**siehe Abb. 9.4 bis 9.6**).

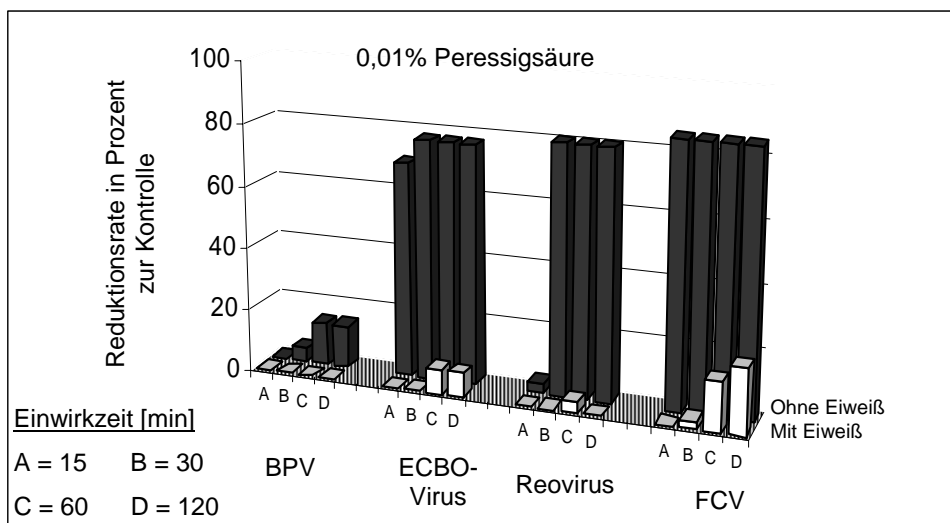


Abb.9.1: Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber 0,01% Peressigsäure

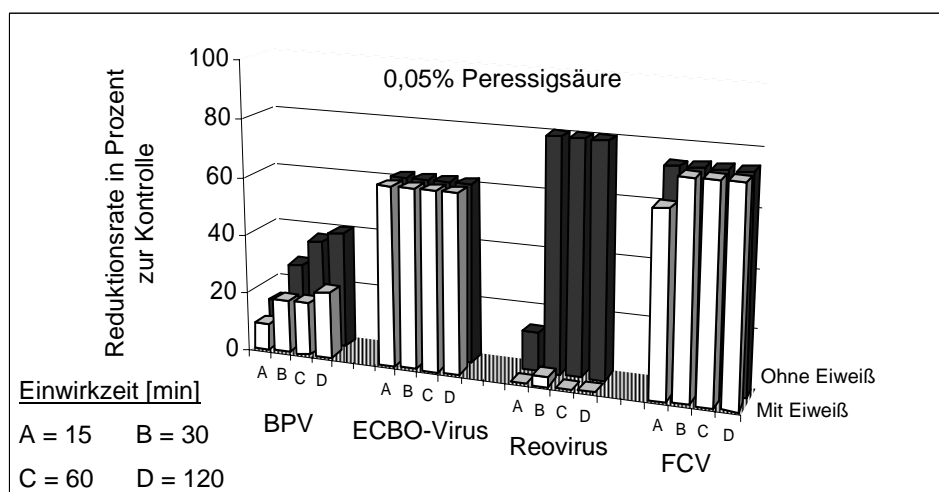


Abb.9.2: Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber 0,05% Peressigsäure

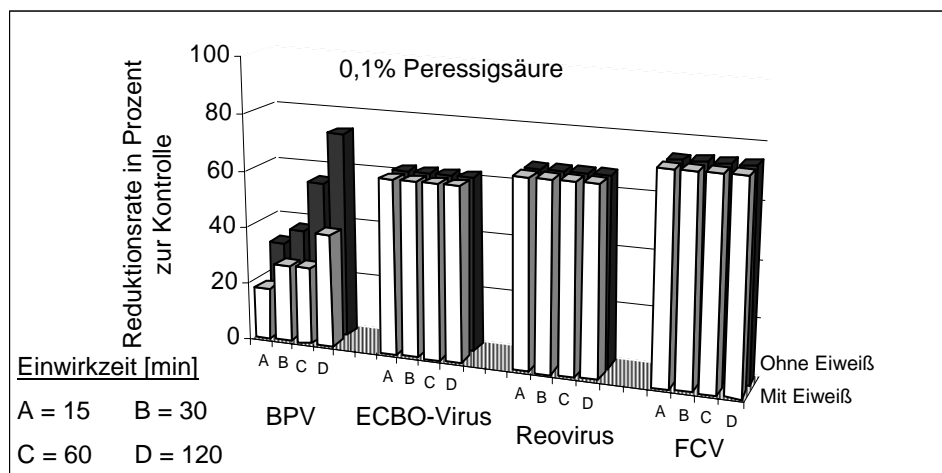


Abb.9.3: Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber 0,1% Peressigsäure

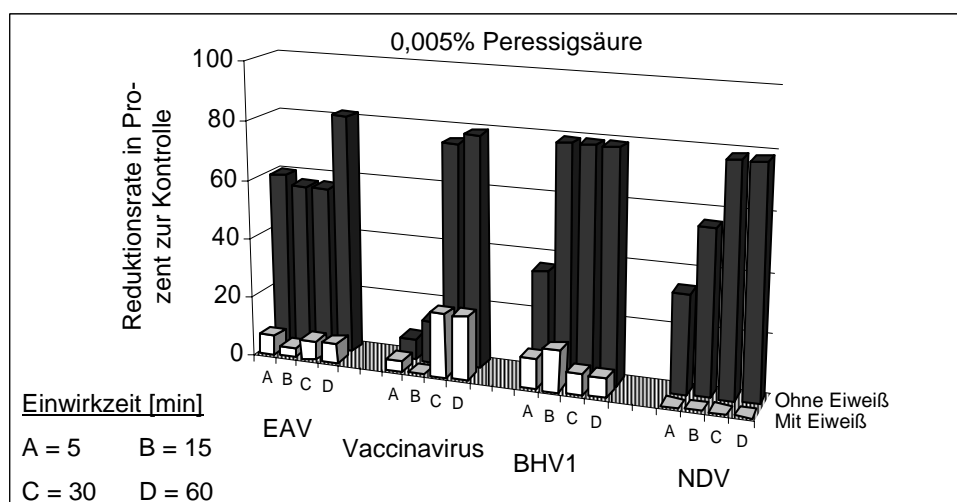


Abb.9.4: Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber 0,005% Peressigsäure

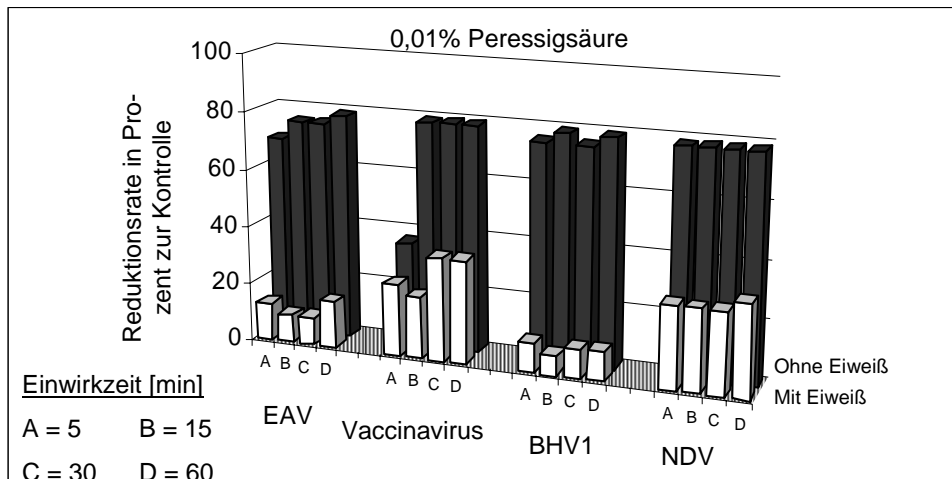


Abb.9.5: Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber 0,01% Peressigsäure

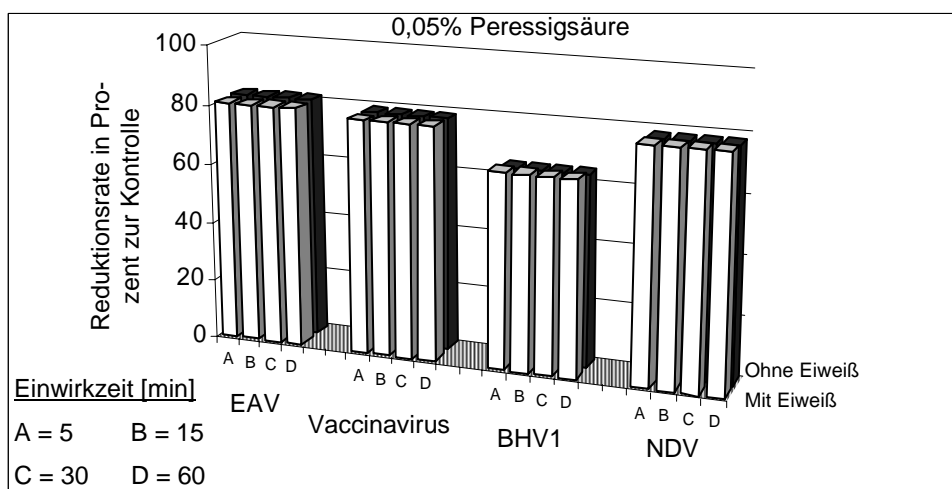


Abb.9.6: Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber 0,05% Peressigsäure

3.2.1.7 Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber Natriumhypochlorit

Wie aus den **Abb. 10.1 und 10.2** hervorgeht, ist ausschließlich aus den Versuchen unter Eiweißbelastung eine unterschiedliche Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber Natriumhypochlorit abzuleiten. Danach besteht in der Reihenfolge vom BPV über das ECBO – Virus, dem Reovirus bis zum FCV eine abnehmende Widerstandsfähigkeit. Nach den Versuchen ohne Eiweißzusatz zu dem Reaktionsgemisch aus Virus und Desinfektionsmittel bestehen zwischen den verschiedenen Virusarten dagegen keine nennenswerten Unterschiede in der Tenazität gegenüber Natriumhypochlorit.

3.2.1.8 Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber Natriumhypochlorit

Die behüllten Virusarten erwiesen sich insgesamt als sehr empfindlich gegenüber Natriumhypochlorit. Lediglich die Versuche mit der 0,1%igen Lösung dieser Substanz wiesen nach den Versuchsergebnissen unter Eiweißbelastung auch Unterschiede in der Tenazität der verwendeten Virusarten auf. Hiernach ist das NDV gegenüber dem EAV, dem Vacciniavirus und dem BHV1 als widerstandsfähiger zu werten. Nach den Versuchen ohne Eiweißzusatz ergaben sich dagegen übereinstimmend zu den Resultaten mit den unbehüllten Virusarten keine nennenswerten Tenazitätsunterschiede (**siehe Abb. 10.3 und 10.4**).

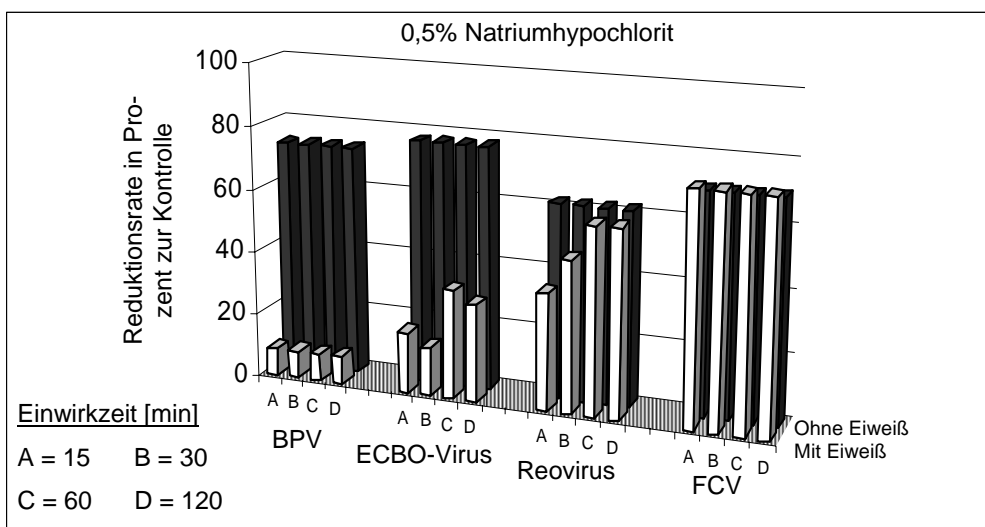


Abb.10.1: Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber 0,5% Natriumhypochlorit

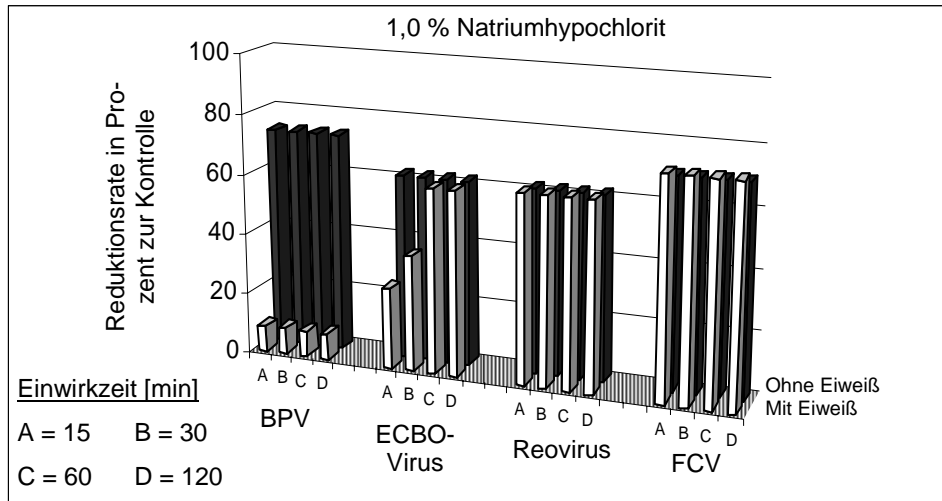


Abb.10.2: Tenazität der unbehüllten Virusarten gegenüber 1,0% Natriumhypochlorit

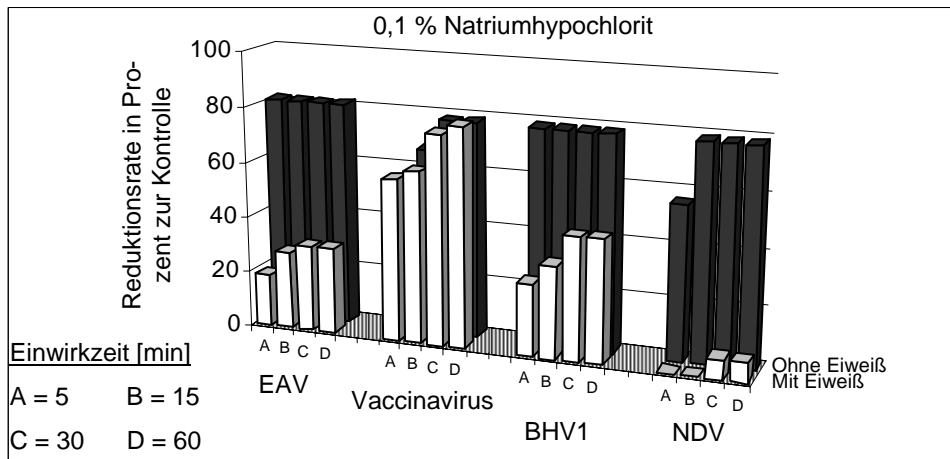


Abb.10.3: Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber 0,1% Natriumhypochlorit

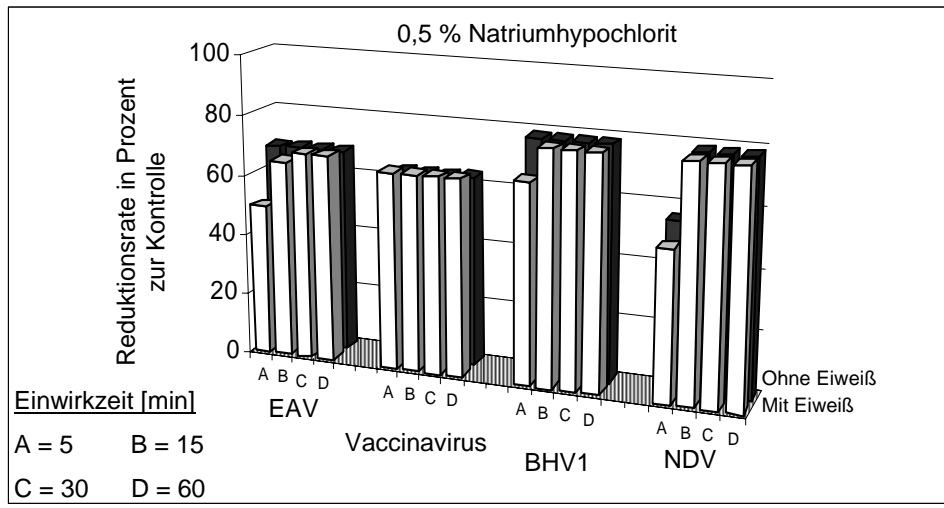


Abb.10.4: Tenazität der behüllten Virusarten gegenüber 0,5% Natriumhypochlorit

3.2.2 Zusammenfassende Darstellung der Tenazität verschiedener behüllter und unbehüllter Virusarten gegenüber verschiedenen bioziden Grundchemikalien

In den Tabellen 7 und 8 sind aus den umfangreichen Untersuchungsergebnissen zur Tenazität unbehüllter und behüllter Virusarten gegenüber bioziden Wirkstoffen ausgewählte Daten wiedergegeben, die zur vergleichenden Beurteilung der Tenazität der geprüften Virusarten verwendet wurden. In allen Fällen gaben diese Daten die jeweils minimale Desinfektionsmittelkonzentration und verwendete Einwirkzeit zur Reduktion der Infektiosität der jeweiligen Viren um 4 Zehnerpotenzen wieder.

Wie unter **Punkt 3.1.4.1.2** zur vergleichenden Beurteilung der Tenazität der geprüften unbehüllten und behüllten Virusarten gegenüber bioziden Wirkstoffen aufgeführt, war die Tenazität von Reoviren und dem ECBO – Virus geringfügig niedriger als beim bovinen Parvovirus. In der Summe erwies sich hiernach das bovine Parvovirus von den in die Untersuchung einbezogenen Virusarten als am widerstandsfähigsten gegenüber den aufgeführten Desinfektionsmitteln. Die behüllten Virusarten als auch das feline Calicivirus erwiesen sich insgesamt als weniger widerstandsfähig als die vorgenannten Erreger. Auffällig war lediglich die unerwartete hohe Tenazität des equinen Arteritisvirus gegenüber Formaldehyd und Ameisensäure. Nach dem EAV als das widerstandsfähigste Virus ist bei fallender Reihung der Tenazität zunächst das NDV und dann auf gleicher Ebene das BHV1 und das Vacciniavirus nach **Punkt 3.1.4.1.2** zu nennen. Unter Beachtung der in **Punkt 4.1** aufgestellten Kriterien zur Auswahl eines geeigneten Testvirus wurde in Verbindung mit den vorgestellten Ergebnissen zur Tenazität verschiedener als Testvirus in Frage kommender Virusarten das ECBO- Virus als Testvirus bestimmt. Das ECBO- Virus vermehrt sich zu hohen Titern in permanenten Zellkulturen und induzierte innerhalb kurzer Zeit (24 h) einen ausgeprägten zytopathischen Effekt in MDBK- Zellen.

Tabelle 7: Tenazität unbehüllter Viren gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln bei 20 °C in der Suspension

Desinfektionsmittel und ihre verwendeten Konzentrationen [%]	Eiweißbelastung (1,0% Hefeextrakt + 1,0% Bovines Serumalbumin)	Minimale Desinfektionsmittelkonzentrationen und Einwirkzeiten zur Reduktion des Titers um 4 Zehnerpotenzen			
		ECBO-Virus	Reo-virus	Felines Calicivirus	Bovines Parvovirus
Formaldehyd 0,25 - 0,5 - 1,0	+	1 %* 120 min	> 1 % >120 min	0,5 % 120 min	>1%> 120 min
Ameisensäure 0,5 - 1,0 - 2,0	+	1 % 15 min	> 2 % > 120 min	1 % 15 min	>2%> 120 min
Peressigsäure 0,01- 0,05 - 0,1	+	0,05 % 15 min	0,1 % 15 min	0,05 % 15 min	>0,1%> 120 min
Natriumhypochlorit 0,25 – 0,5 – 1,0	+	1 % 60 min	0,5 % 60 min	0,25 % 15 min	>1%> 120 min

Tabelle 8: Tenazität behüllter Viren gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln bei 20 °C in der Suspension

Desinfektionsmittel und ihre verwendeten Konzentrationen [%]	Eiweißbelastung (1,0% Hefeextrakt + 1,0% Bovines Serumalbumin)	Minimale Desinfektionsmittelkonzentrationen und Einwirkzeiten zur Reduktion des Titers um 4- Zehnerpotenzen			
		Equines Arteritis Virus	Bovines Herpes Virus	Vaccinia Virus	Newcastle Disease virus
Formaldehyd 0,25 - 0,5 - 1,0	+	> 1 % > 60 min	0,5 %* 30 min	0,5 %* 60 min	0,5 %* 30 min
Ameisensäure 0,1 - 0,5 - 1,0	+	>1 % > 60 min	0,1 % 5 min	0,5 % 15 min	1,0 % 30 min
Peressigsäure 0,005 - 0,01 - 0,05	+	0,05 % 5 min	0,05 % 5 min	0,05 % 5 min	0,05 % 5 min
Natriumhypochlorit 0,1 – 0,5 – 1,0	+	0,5 % 5 min	0,5 % 5 min	0,1 % 5 min	0,5 % 15 min

* Aufgrund der Toxizität von Formaldehyd konnte die Reduktion des Titers nach 4-Zehnerpotenzen nicht nachgewiesen werden

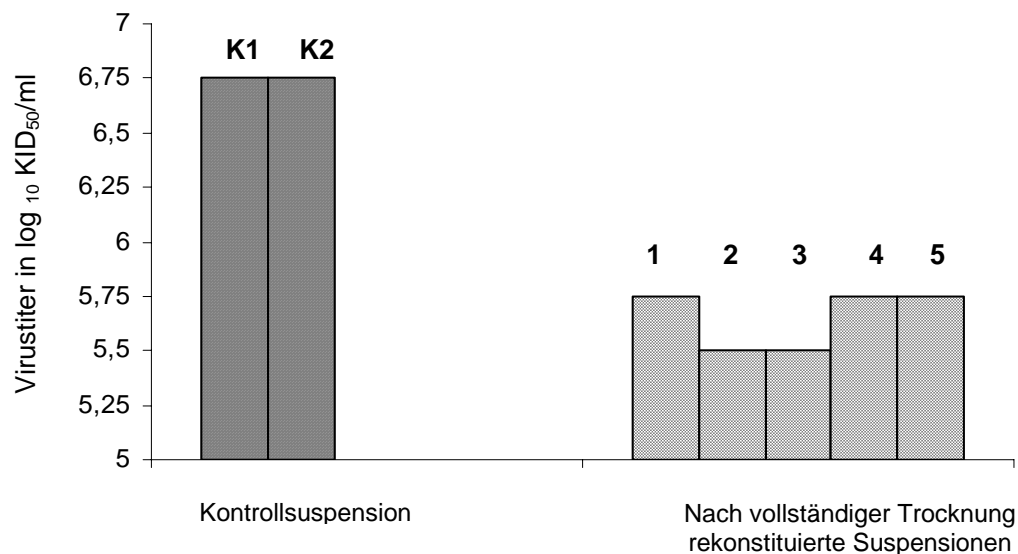
3.2.3 Etablierung des Keimträgermodelles zur Prüfung der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln auf Oberflächen im Lebensmittelbereich

Im Rahmen der Etablierung eines Keimträgermodells waren im Wesentlichen Antworten auf die Fragen nach dem Einfluss der Trocknung auf die Infektiosität des Testvirus, sowie nach der Eignung praktikabler Methoden zur Rückgewinnung des Virus von den Trägermaterialien und dem quantitativen Nachweis der Restinfektiosität des Virus zu finden.

3.2.3.1 Einfluss der Trocknung auf die Infektiosität des Testvirus

Die vollständige Trocknung der in Reagenzglasröhrchen pipettierten Virussuspensionen erforderte unter dem Luftstrom der Reinraumwerkbank bei Raumtemperatur einen Zeitraum von durchschnittlich 2,5 h für 0,1 ml Virussuspension (**Tabelle 9**), 4,0 h für 0,2 ml Virussuspension und 5,5 h für 0,3 ml Virussuspension (**Tabelle 10**). Nach Ablauf dieser Zeitspannen entsprachen die Gewichte der zuvor befüllten Röhrchen jeweils ihrem Gewicht vor Befüllung.

Die zu Beginn und nach Ablauf der Trocknungszeit ermittelten Infektiositätstiter der in geschlossenen Röhrchen mitgeführten Kontrollen, waren in allen durchgeführten Versuchen nahezu identisch. Titerdifferenzen traten vereinzelt lediglich bis zu einer Höhe von $0,25 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ auf. In den mit WSH als Suspensionsmedium für das Virus durchgeführten Versuchen, in denen 0,1 ml Virussuspension eingesetzt wurden, wiesen dagegen die getrockneten und anschließend resuspendierten Virussuspensionen im Vergleich zu den Kontrollen niedrigere Infektiositätstiter auf. In dieser als Fünffachansatz durchgeführten Versuchsreihe, betrugen die Titerreduktionen in drei Fällen eine Höhe von jeweils einer Zehnerpotenz und in zwei Fällen von jeweils 1,25 Zehnerpotenzen (**Abb.11**).



K1= Ausgangstiter

K2= Virustiter am Ende der Antrocknungszeit

Abb.11: Infektiositätstiter des ECBO- Virus der Kontrollsuspension und in der nach vollständiger Trocknung rekonstituierten Suspensionen

Tabelle 9 Ermittlung der Trocknungszeit von 0,1 ml Testvirussuspension in Glasröhrchen unter dem laminaren Luftstrom einer Reinraumwerkbank bei 20 °C und 45-50% relativer Feuchte

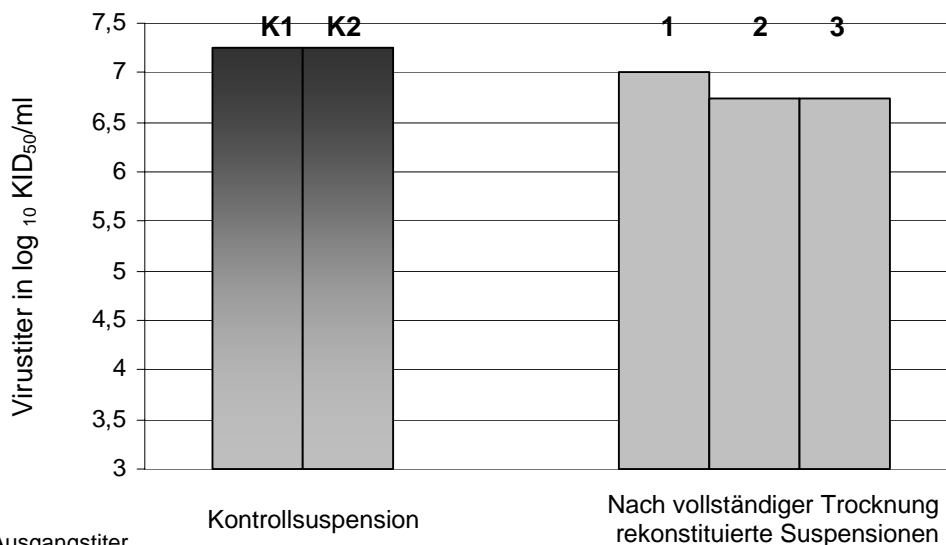
Trocknungszeit (min)	Röhrchengewicht mit 0,1 ml Testvirus [g]					Röhrchengewicht ohne Testvirus [g]
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	
0	10,88	13,03	12,95	15,34	13,85	10,79 (1) 12,93 (2) 12,85 (3) 15,24 (4) 13,75 (5)
30	10,88	13,03	12,94	15,34	13,84	
60	10,87	13,01	12,93	15,32	13,82	
90	10,84	12,99	12,90	15,29	13,79	
120	10,81	12,96	12,87	15,26	13,77	
150	10,79	12,93	12,85	15,24	13,75	

In zusätzlichen Versuchen, die mit Mengen von 0,2 ml und 0,3 ml Virussuspension durchgeführt wurden, betragen die Titerreduktionen nach Trocknung in einem Fall 1,25 Zehnerpotenzen und im zweiten Fall 1,50 Zehnerpotenzen (**Tabelle 22**).

Bei weiteren, methodisch analogen Experimenten, die jedoch mit unterschiedlichen Konzentrationen einer Mischung von HE und BSA bzw. BSA allein in der Virussuspension durchgeführt wurden, lagen nach Trocknung im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen ebenfalls niedrigere Infektiositätstiter vor. Insgesamt entsprachen die Infektiositätsverluste (Titerdifferenzen zwischen Kontrollen und Trocknungsversuchen) jedoch lediglich durchschnittlich der Hälfte, bezogen auf $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$, der Verluste an Infektiosität in den allein mit WSH durchgeführten Versuchen. Die Höhen der Infektiositätsverluste reichten in der überwiegenden Zahl der Versuche von 0,25 bis 0,5 $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$. In lediglich zwei Versuchsansätzen wurden Titerdifferenzen von jeweils 0,75 $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ ermittelt. Wie aus den **Abb. 12 bis 14** zu entnehmen ist, ergaben sich im Hinblick auf die Konzentration der Mischung aus HE und BSA in der Testvirussuspension keine messbaren Unterschiede zwischen den jeweils ermittelten Ergebnissen. Auch die ausschließliche Verwendung von BSA als Zusatz zur Virussuspension ergab von Seiten der Resultate keine Unterschiede zu den Ergebnissen der mit der Mischung von HE und BSA durchgeführten Versuche (**Abb. 15**).

Tabelle 10 Ermittlung der Trocknungszeit von 0,2 ml und 0,3 ml Testvirussuspension in Glasröhrchen unter dem laminaren Luftstrom einer Reinraumwerkbank bei 20 °C und 45-50% Luftfeuchtigkeit

Trocknungszeit (min)	Röhrchengewicht mit Testvirus [g]		Röhrchengewicht ohne Testvirus [g]
	0,2 ml	0,3 ml	
0	12,90	12,99	12,69 (0,2 ml)
30	12,90	12,99	12,68 (0,3 ml)
60	12,88	12,96	
75	12,86	12,93	
105	12,82	12,89	
165	12,78	12,82	
210	12,74	12,77	
240	12,70	12,74	
250	12,69	12,72	
290		12,70	
320		12,68	

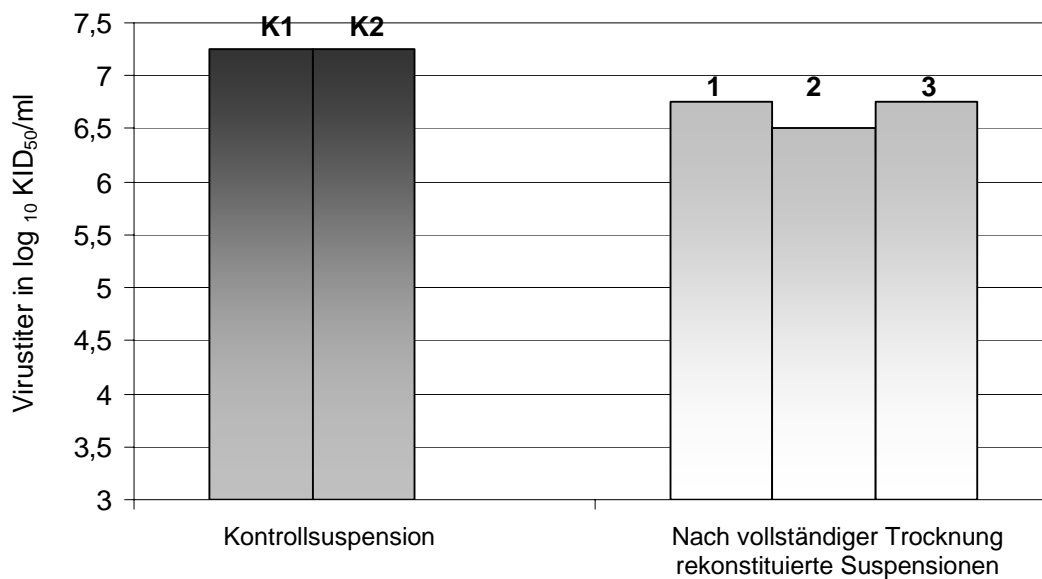


K1= Ausgangstiter

K2= Virustiter am Ende der Antrocknungszeit

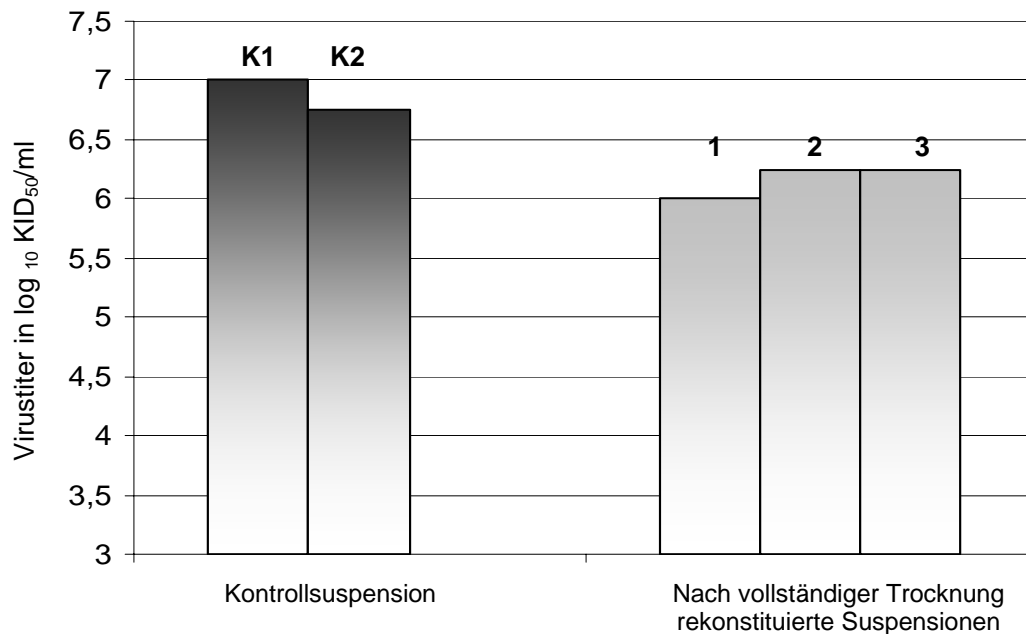
Zusammensetzung des Virussuspensionsmediums vor Antrocknung: 1 Teil PBS + 1 Teil WSH mit jeweils 0,2% BSA und HE

Abb.12 Infektiositätstiter des ECBO- Virus der Kontrollsuspension und nach vollständiger Trocknung in Abhängigkeit vom Eiweißgehalt der Virussuspension vor Antrocknung



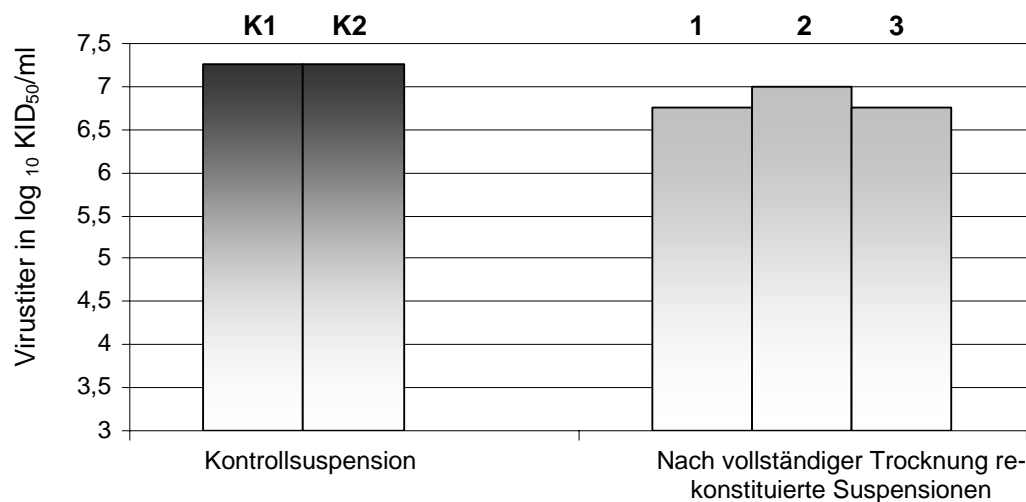
Zusammensetzung des Virussuspensionsmediums vor Antrocknung: 1 Teil PBS + 3 Teile WSH mit jeweils 0,2% BSA und HE

Abb.13 Infektiositätstiter des ECBO- Virus der Kontrollsuspension und nach vollständiger Trocknung in Abhängigkeit vom Eiweißgehalt der Virussuspension vor Antrocknung



Zusammensetzung des Virussuspensionsmediums vor Antrocknung: 1 Teil PBS + 9 Teile WSH mit jeweils 0,2% BSA und HE

Abb.14 Infektiositätstiter des ECBO- Virus der Kontrollsuspension und nach vollständiger Trocknung in Abhängigkeit vom Eiweißgehalt der Virussuspension vor Antrocknung



Zusammensetzung des Virussuspensionsmediums vor Antrocknung: 1 Teil PBS + 1 Teil WSH mit 1,0% BSA

Abb.15 Infektiositätstiter des ECBO- Virus der Kontrollsuspension und nach vollständiger Trocknung in Abhängigkeit vom Eiweißgehalt der Virussuspension vor Antrocknung

3.2.3.2 Bestimmung der Infektiosität des Testvirus nach Antrocknung an Keimträgeroberflächen unter Verwendung verschiedener Desorptionstechniken

Nachdem der Einfluss der Trocknung in Abhängigkeit verschiedener Eiweißzusätze zur Testvirussuspension auf die Infektiosität des Testvirus dokumentiert war, dienten die in diesem Kapitel beschriebenen Experimente der Frage, in welchem Umfang an die Keimträgeroberfläche adsorbiertes Testvirus in infektiöser Form von der Oberfläche zu eluieren war. Damit zielten diese Versuche gleichzeitig auf die Optimierung der Elutionstechnik ab.

3.2.3.2.1 Bestimmung der Antrocknungszeit der Testvirussuspension an die Keimträger

Die mit 0,1 ml der Testvirussuspension beschickten Keimträger, die zur Trocknung/Adsorption unter den laminaren Luftstrom der Reinraumwerkbank platziert wurden, erreichten nach einer durchschnittlich 70-minütigen Lagerung bei Raumtemperatur ihre vor Zugabe der Virussuspension ermittelten Gewichte (**siehe Tabelle 11 und 12**).

Tabelle.11 Ermittlung der Trocknungszeit der auf die Oberfläche der V₂ A-Stahlträger verteilten Testvirussuspension (0,1 ml) unter dem laminaren Luftstrom einer Reinraumwerkbank bei 20 °C und 45-50% relative Feuchte

Trocknungszeit (min)	Trägergewicht mit 0,1 ml Testvirus [g]						Trägergewicht ohne Testvirus [g]
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6	
0	3,17	3,18	3,15	3,14	3,15	3,16	3,07 (1) 3,08 (2)
30	3,14	3,13	3,11	3,10	3,11	3,12	3,05 (3) 3,04 (4)
60	3,10	3,10	3,07	3,07	3,07	3,09	3,05 (5) 3,06 (6)
75	3,07	3,08	3,05	3,04	3,05	3,06	

Tabelle.12 Ermittlung der Trocknungszeit der auf die Oberfläche der Makrolonträger verteilten Testvirussuspension (0,1 ml) unter dem laminaren Luftstrom einer Reinraumwerkbank bei 20 °C und 45-50% relative Feuchte

Trocknungszeit (min)	Trägergewicht mit 0,1 ml Testvirus [g]						Trägergewicht ohne Testvirus [g]
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 4	Nr. 5	Nr. 6	
0	3,10	3,12	3,15	3,13	3,16	3,21	3,0 (1) 3,02 (2)
30	3,07	3,09	3,11	3,10	3,12	3,17	3,05 (3) 3,03 (4)
60	3,03	3,05	3,07	3,06	3,08	3,13	3,06 (5) 3,11 (6)
75	3,0	3,02	3,05	3,03	3,06	3,11	

3.2.3.2.2 Desorption des an die Keimträger angetrockneten Testvirus

3.2.3.2.2.1 Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Keimträger

Die in Abbildung **16a** und **17a** wiedergegebenen rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Ultrastrukturen der Oberflächen der verwendeten Keimträger aus V₂ A-Stahl und Polyethylen. Die makroskopisch glatt und glänzend erscheinenden Materialien wiesen eine rissige, z.T. von Furchen durchzogene unregelmäßige Oberfläche auf. Die an die Träger angetrocknete Virussuspension gleicht im rasterelektronenmikroskopischen Bild borkigen, schuppigen und z.T. auch flockigen Auflagerungen, die mit der Oberfläche der Träger verbunden zu sein scheinen. Viruspartikel sind aufgrund des geringen Durchmessers des ECBO- Virus nicht zu erkennen.

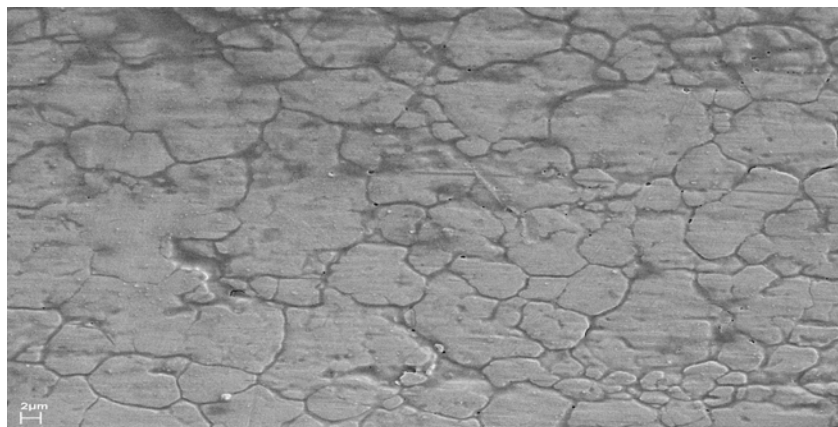


Abbildung 16A: Rasterelektronenmikroskopisches Bild der Oberfläche der V₂ A-Stahl Keimträger (Vergrößerung x 1500, Leo Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen)

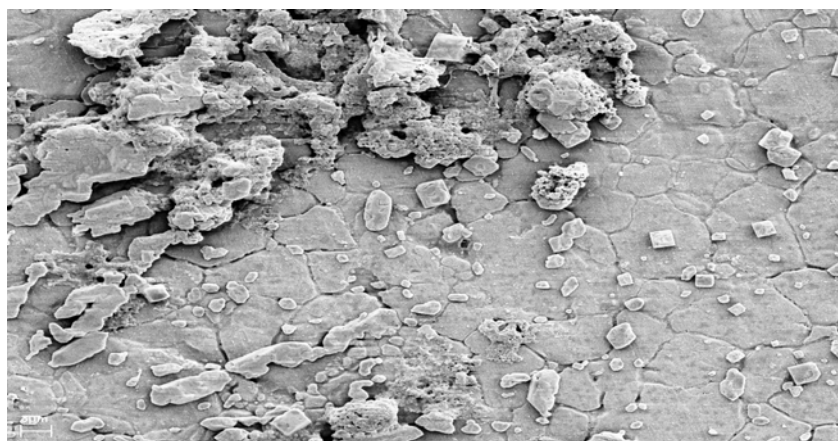


Abbildung 16B: Rasterelektronenmikroskopisches Bild der Oberfläche der V₂ A -Stahl Keimträger nach Anrocknung der Testvirussuspension (Vergrößerung x 1333, Leo Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen)

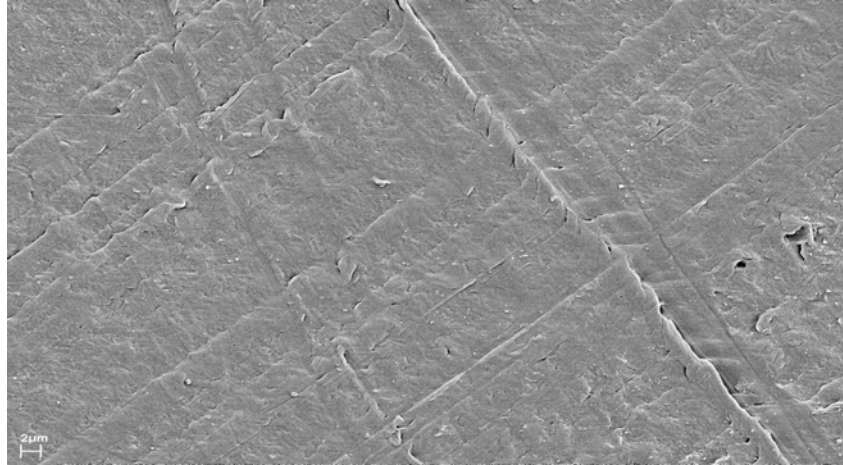


Abbildung 17A: Rasterelektronenmikroskopisches Bild der Oberfläche der Polyethylen Keimträger (Vergrößerung x 1500, Leo Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen)

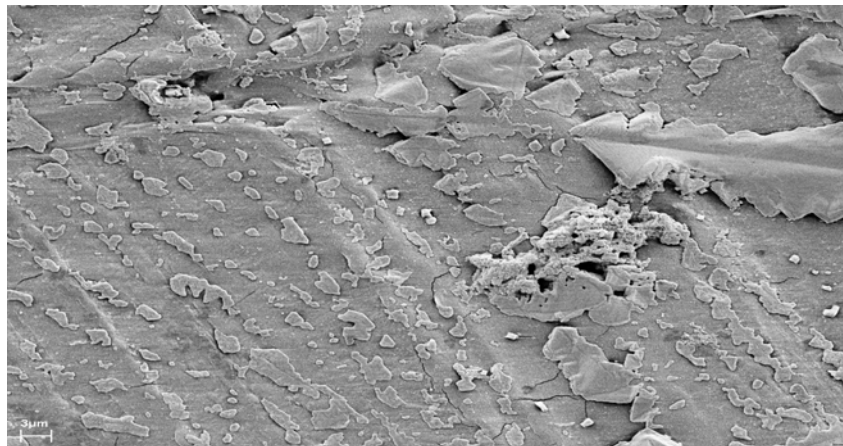


Abbildung 17B: Rasterelektronenmikroskopisches Bild der Oberfläche der Polyethylen Keimträger nach Antrocknung der Testvirussuspension (Vergrößerung x 1333, Leo Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen)

3.2.3.2.2 Versuchsergebnisse unter Verwendung von V₂A-Stahlträgern

Abschwemmtechnik

Die Versuche zur Elution der an die Träger aus V₂A-Stahl adsorbierten Virussuspensionen durch vollständige Benetzung der Träger mit MEM und anschließender Behandlung mit dem Vortexer bzw. Ultraschall resultierten in unterschiedlich hohen Rückgewinnungsanteilen. Die gemessenen Infektiositätstiter erreichten nur in Einzelfällen 10 % des adsorbierten Virus. Dabei war bereits nach kurzer Einwirkzeit ein hoher Anteil des maximal von den Trägern eluierbaren Virus im Eluat nachweisbar. Dies ist den unter dem Zeitraum „0“ aufgeführten Infektiositätstiter der **Tabellen 26 bis 28** zu entnehmen. Zur Bestimmung des Beginns der Elutionszeit wurden die Träger in das Suspensionsmedium vollständig eingetaucht und daraufhin sofort wieder entnommen. Dieser Vorgang benötigte nicht mehr als durchschnittlich 3 s. Eine weitere Behandlung der Träger für einen Zeitraum von 15 s führte zu einem messbaren Anstieg des Infektiositätstiter im Eluat. Was die Titerhöhen betraf, ergaben sich zwischen den geprüften Elutionshilfen (Vortexer, Ultraschall bzw. beides) keine nennenswerten Unterschiede. Auch eine Verlängerung der Behandlungszeiten auf jeweils bis zu 120 s führte bei keiner der Suspensionstechniken zu einem weiteren Anstieg der Titer in den Suspensionsmedien. Dieses Ergebnis ist den **Tabellen 26 bis 28** sowie **Abb. 18** zu entnehmen. Die für diese Zeiträume bestimmten Rückgewinnungsraten variierten bezüglich der Infektiosität und reichten von 1,78 % bis 10 %.

Abstrichtechnik

Die Wiedergewinnung von infektiösem Virus von den zum Abtupfen der Testkeimträgerflächen unter Standardbedingungen verwendeten Watteträgern erfolgte in Analogie zur Abschwemmtechnik. Auch in diesen Versuchen erreichten die Wiedergewinnungsraten nur in Ausnahmefällen einen Wert von 10 %. Die Elution des Testvirus von den Watteträgern zeigte in Verlauf und Höhe der Wiedergewinnungsraten eine hohe Übereinstimmung mit den Versuchsergebnissen zur Abschwemmung des Testvirus von den Keimträgerflächen. Die einzelnen Versuchsergebnisse sind analog zu der Darstellung der Ergebnisse der Abschwemmtechnik in den **Tabellen 29, 30 und 31** wiedergegeben (siehe **Abb. 19**).

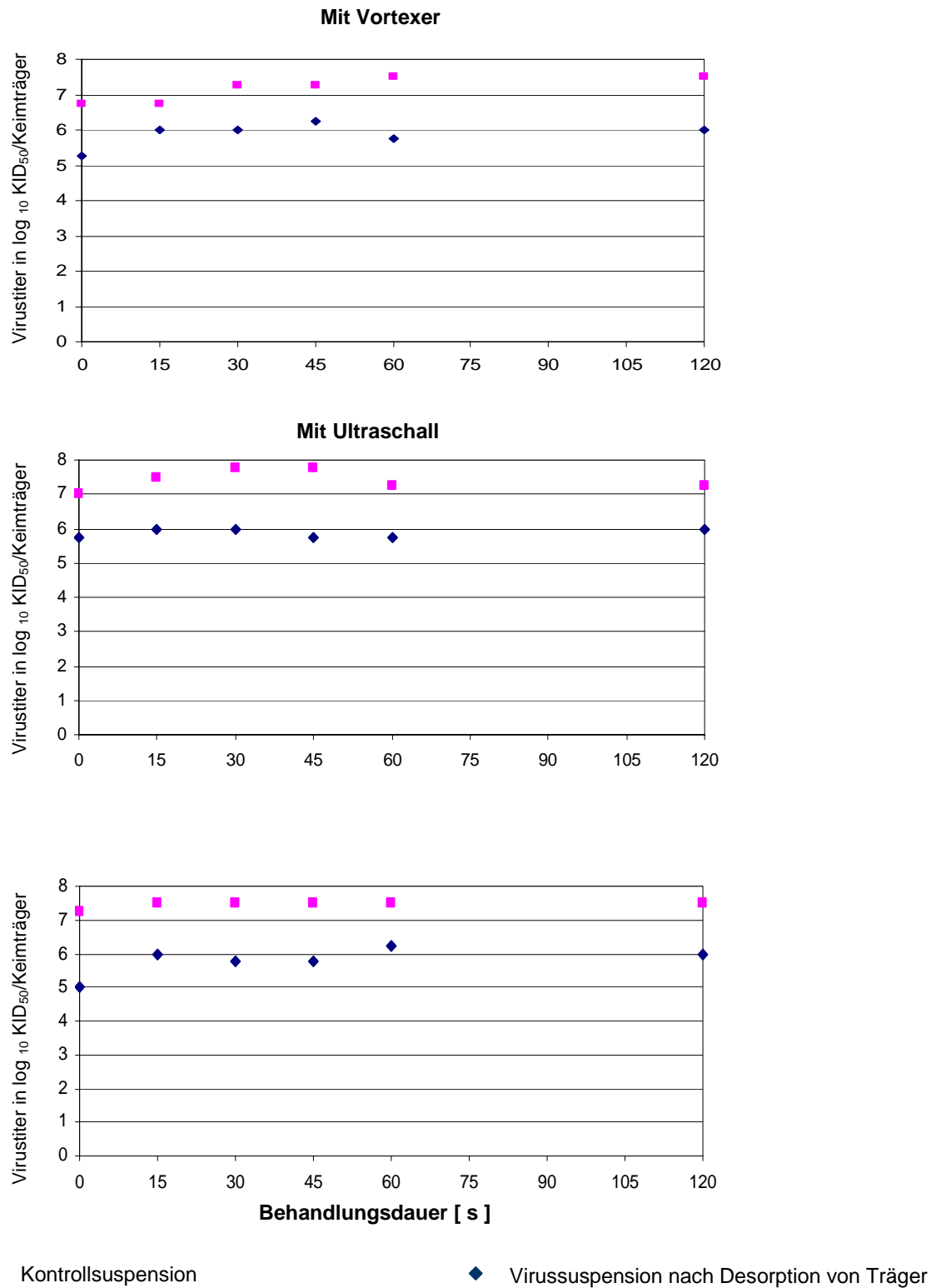


Abb: 18 Infektiositätstiter des mit der Abschwemmtechnik von den V₂ A-Stahl-Trägern desorbierten Testvirus in Abhängigkeit von der Verwendung mechanischer Hilfen

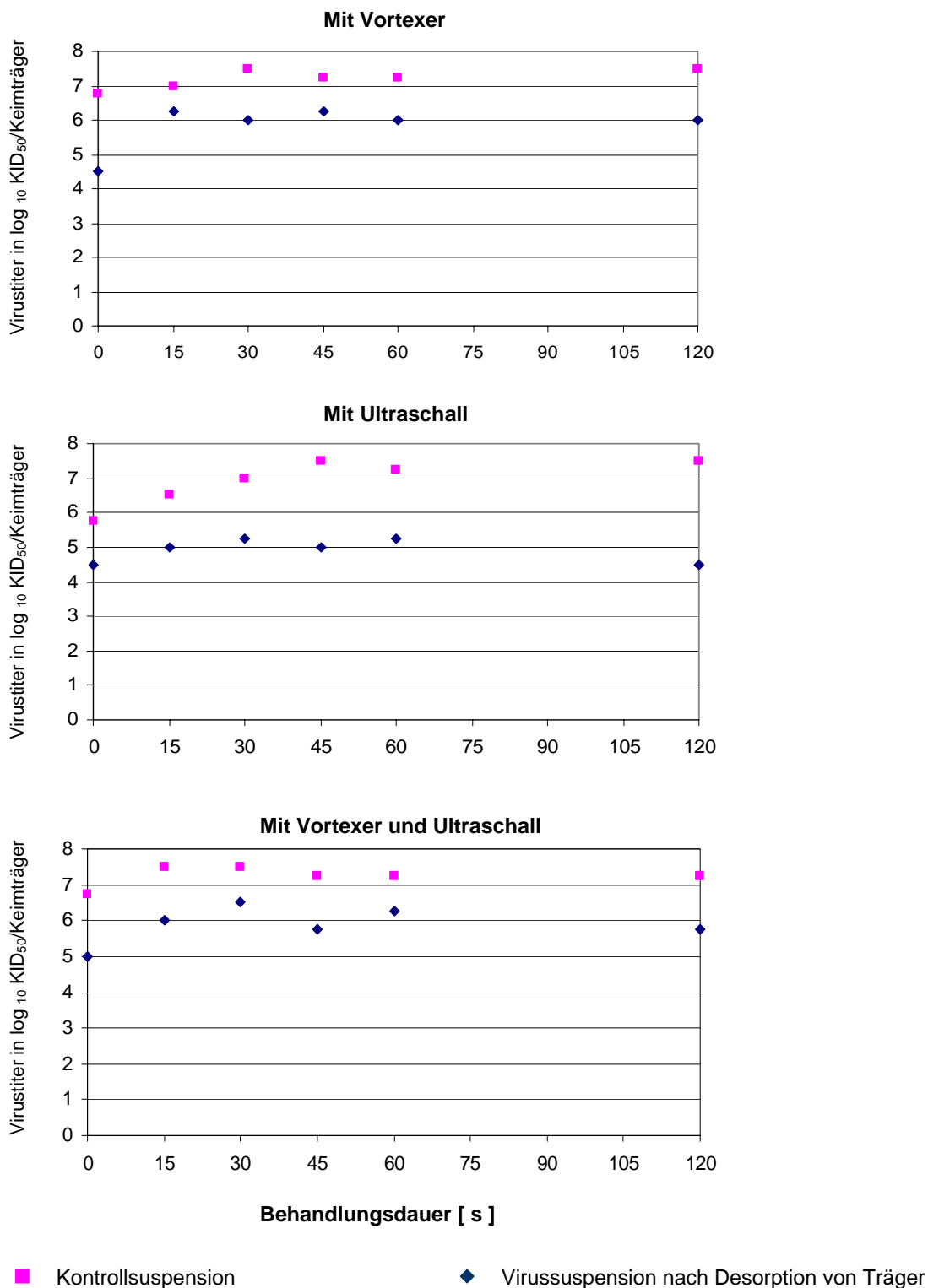


Abb: 19 Infektiositätstiter des mit der Abstrichtechnik von den V₂ A-Stahl-Trägern desorbierten Testvirus in Abhängigkeit von der Verwendung mechanischer Hilfen

3.2.3.2.3 Versuchsergebnisse unter Verwendung von Trägern aus Makrolon

Abschwemmtechnik

Die Versuche zur Abschwemmung des an die Kunststoffoberfläche adsorbierten Virus mit MEM unter Zuhilfenahme eines Laborschüttlers und/oder der Anwendung von Ultraschall ergaben weitgehend übereinstimmende Ergebnisse mit den unter Verwendung von V₂ A Stahl erzielten Resultaten. Die im Rahmen dieser Elutionsversuche ermittelten Infektiositätstiter sind in den **Tabellen 32** (Versuche zur Rückgewinnung des Testvirus unter Verwendung des Vortexers), in **Tabelle 33** (Elutionsversuche mit Ultraschall) und in **Tabelle 34** (Verwendung von Vortexer plus Ultraschall zur Elution) sowie **Abb. 20** dargestellt.

Abstrichtechnik

Das unter Standardbedingungen erfolgte Abtupfern der mit Virus beschickten Kunststoffoberflächen lieferte der Abstrichtechnik vergleichbare Ergebnisse zu den entsprechenden Versuchen mit Edelstahl als Keimträger. Zum Studium dieser Ergebnisse wird auf **Abb. 21** sowie die **Tabellen 35 bis 37** im Anhang unter **Punkt 8** verwiesen.

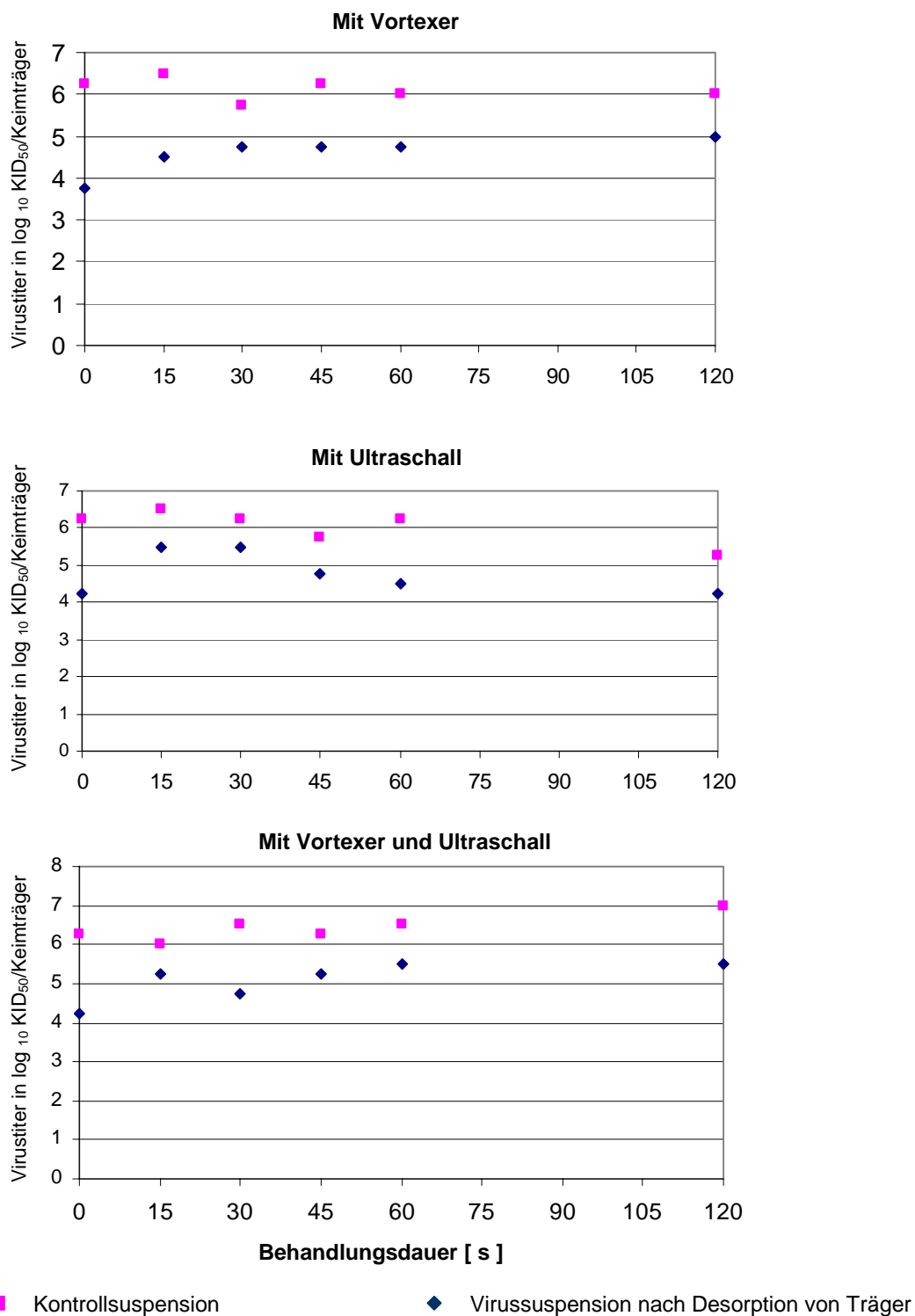
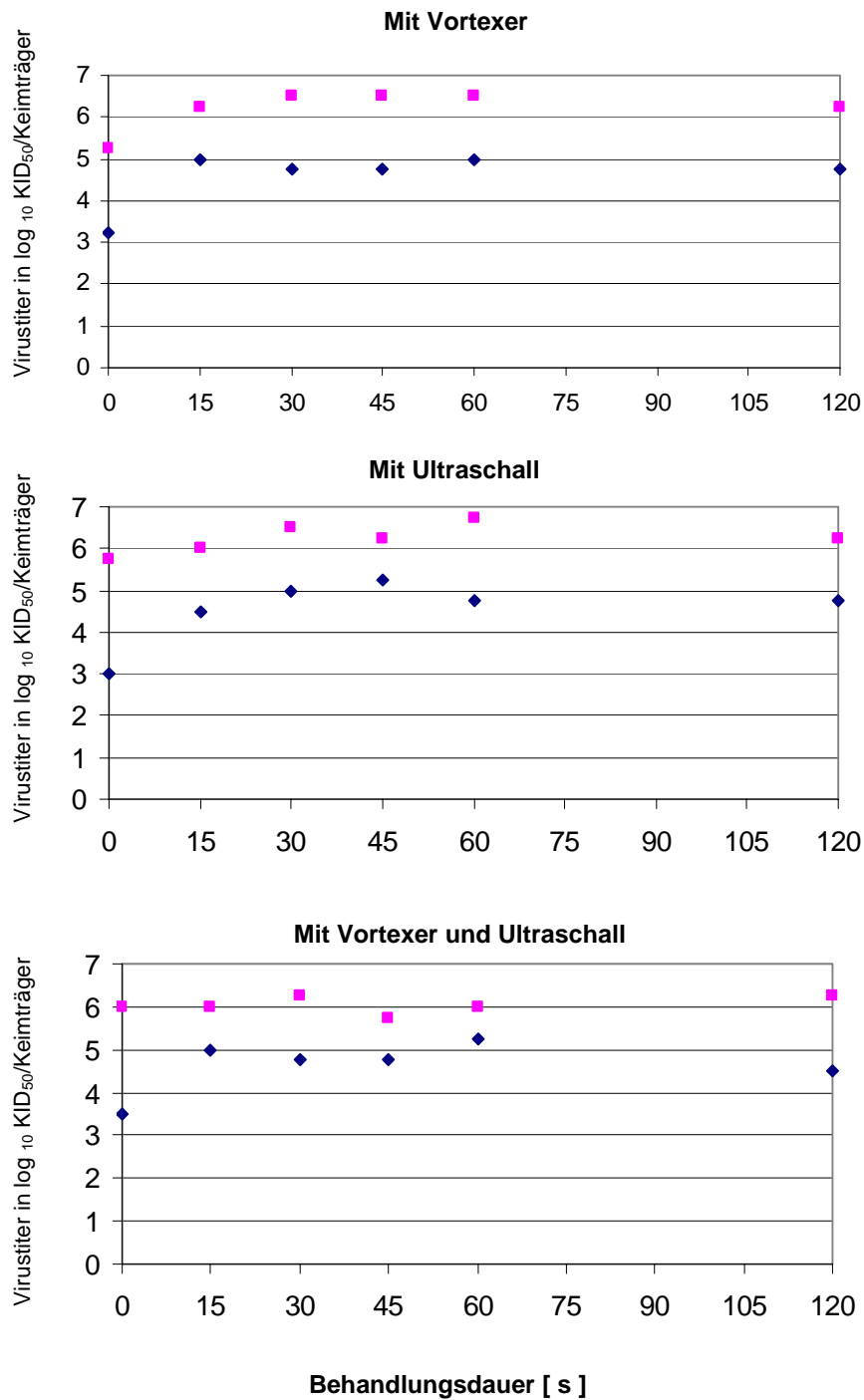


Abb: 20 Infektiositätstiter des mit der Abschwemmtechnik von den Makrolonträgern desorbierten Testvirus in Abhängigkeit von der Verwendung mechanischer Hilfen



■ Kontrollsuspension

◆ Virussuspension nach Desorption von Träger

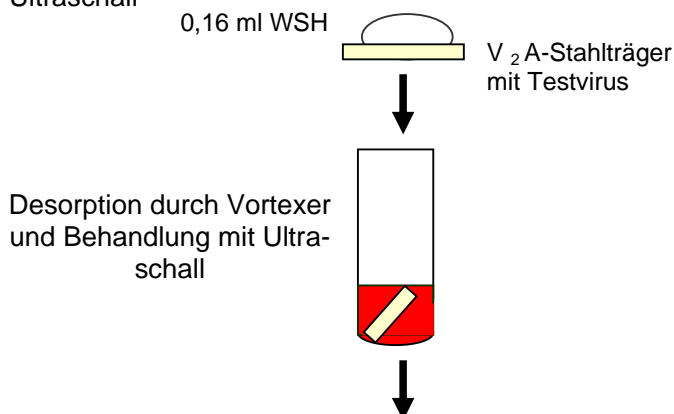
Abb: 21 Infektiositätstiter des mit der Abstrichtechnik von den Makrolonträgern desorbierten Testvirus in Abhängigkeit von der Verwendung mechanischer Hilfen

3.2.3.2.3 Bestimmung der verbliebenen Infektiosität nach erfolgter Desorption des Testvirus mittels Abschwemm- und Abstrichtechnik von den V₂A-Stahl Keimträgern

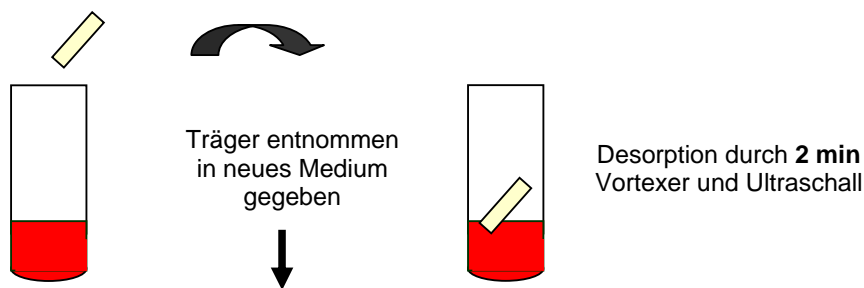
Nach Desorption des Virus von den Keimträgern unter Verwendung der Abschwemm- oder Abstrichtechnik stellte sich die Frage, welche Infektiosität die Keimträger danach noch aufwiesen. Um auf den Keimträgern verbliebenes Testvirus nachzuweisen, wurde eine weitere Desorption des Virus von den Keimträgern mittels Abschwemm- oder Abstrichtechnik unter Verwendung von neuem Medium und Verlängerung der Behandlungszeiten auf jeweils bis zu 2 Minuten durchgeführt (Desorption des Virus durch Ultraschallbehandlung und schütteln). Für die verschiedenen Behandlungszeiten (15, 30, 45, 60 und 120 s) mit Abschwemm- und Abstrichtechnik ergab sich kein weiterer Anstieg der Titer (maximal 0,56%). Lediglich für den Zeitpunkt „0“ ergab sich ein Infektiositätstiter, der ähnlich hoch war wie bei dem ersten Elutionsversuch mit der Abschwemmtechnik (3,16%) bzw. der Abstrichtechnik (5,62%) (**Abb. 22 und 23**).

Auch die Desorption von am Keimträger verbliebenem Testvirus mittels Einwirkung von direktem Ultraschall in neuem MEM für 30, 60, 90 und 120 s führte bei keiner der Suspensionen zu einem weiteren Anstieg der Titer (max. 0,05%) (**Abb. 24**).

Abb: 22 Versuche zum erneuten Nachweis von Restvirus von bereits mit dem Abschwemmverfahren behandelten Träger durch Einwirkung von Vortexer und Ultraschall

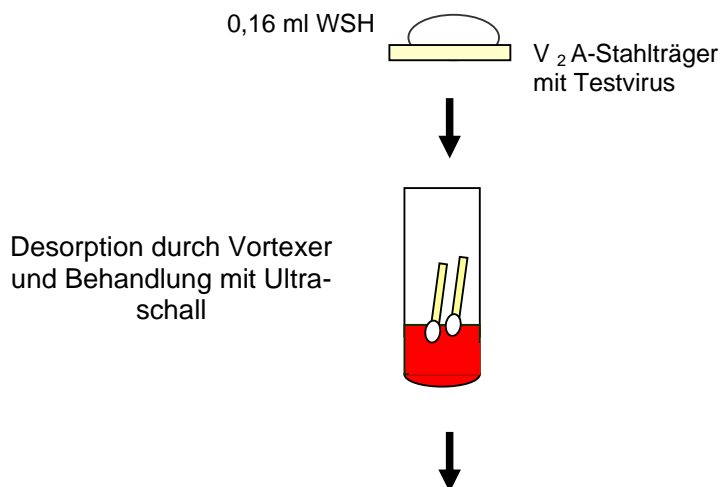


Infektiositätstiter nach verschiedenen Behandlungszeiten mit Vortexer und Ultraschall						
Behandlungsdauer [s]	0	15	30	45	60	120
Virus Kontrollen log ₁₀ KID ₅₀ /Träger	6,0	6,25	6,5	6,25	6,0	6,25
Versuchsansatz log ₁₀ KID ₅₀ /Träger	3,0	5,25	4,75	5,25	5,0	5,0
Prozentuale Rückgewinnungsrate	0,1%	10%	1,79%	10%	10%	5,63%

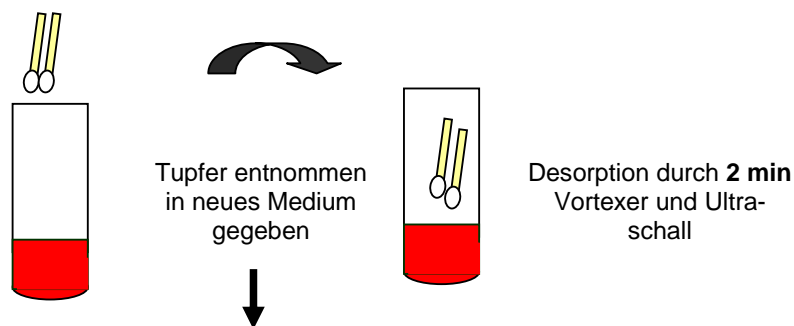


Infektiositätstiter nach verschiedenen Behandlungszeiten mit Vortexer und Ultraschall						
Versuchsansatz log ₁₀ KID ₅₀ /Träger	4,5	2,75	3,0	4,0	2,75	2,75
Prozentuale Rückgewinnungsrate	3,16%	0,03%	0,03%	0,56%	0,05%	0,03%

Abb: 23 Versuche zum erneuten Nachweis von Restvirus von bereits mit dem Abstrichverfahren behandelten Träger durch Einwirkung von Vortexer und Ultraschall

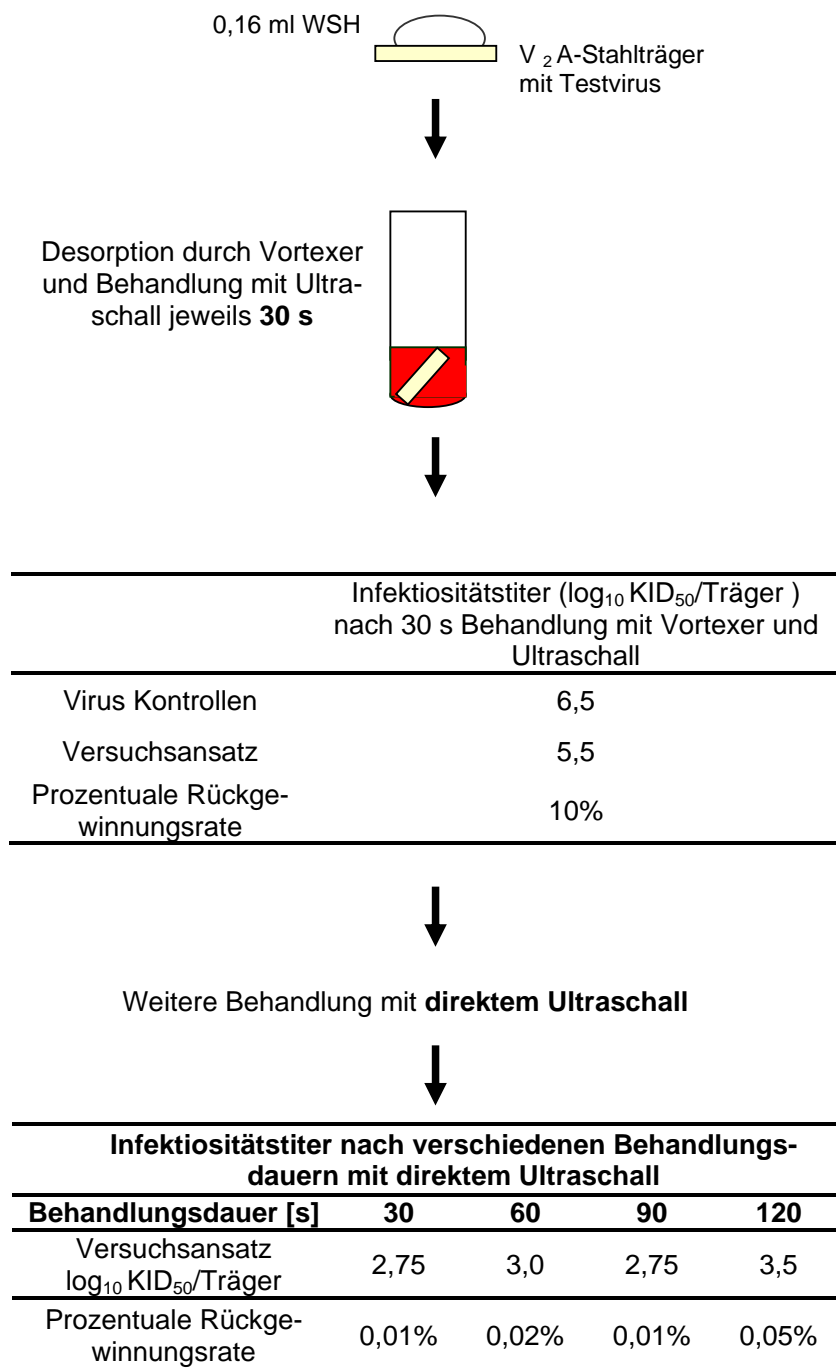


Infektiositätstiter nach verschiedenen Behandlungszeiten mit Vortexer und Ultraschall						
Behandlungsdauer [s]	0	15	30	45	60	120
Virus Kontrollen log ₁₀ KID ₅₀ /Träger	5,75	6,5	6,5	6,25	6,25	6,25
Versuchsansatz log ₁₀ KID ₅₀ /Träger	4,0	5,0	5,5	4,75	5,25	4,75
Prozentuale Rückgewinnungsrate	1,78%	3,17%	10%	3,17%	10%	3,17%



Infektiositätstiter nach verschiedenen Behandlungszeiten mit Vortexer und Ultraschall						
Versuchsansatz log ₁₀ KID ₅₀ /Träger	4,5	3,5	3,75	3,5	3,75	3,5
Prozentuale Rückgewinnungsrate	5,62 %	0,1%	0,17 %	0,17 %	0,31 %	0,17 %

Abb:24 Versuche zum Nachweis vom Restvirus von bereits mit einem Desorptionsverfahren unterzogenen Träger durch direkte Ultraschallbehandlung



3.2.3.3 Infektiositätsgehalt des ECBO-Virus im Überstand und auf dem Träger nach Zugabe des "Desinfektionsmittels"

Die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Zugabe des "Desinfektionsmittels" (anstelle des Desinfektionsmittels wurde WSH verwendet) auf den virusbeschichten Keimträger in der Desinfektionsmittellösung als auch der vom Keimträger nach Abschwemmung ermittelten Infektiositätstiter sind den **Abb. 25 und 26** zu entnehmen. Die Ergebnisse sind in den **Tabellen 38 und 39** und den **Abb. 25 und 26** dargestellt. Wie aus den Abbildungen und den Tabellen zu entnehmen ist, kann in der Desinfektionsmittellösung bereits nach kurzer Einwirkzeit (15 min) ein hoher Infektiositätstiter des Restvirus nachgewiesen werden. Mit Zunahme der Einwirkzeit (bis 120 min) traten keine nennenswerten Veränderungen der Titer auf. Der Titer des an den Keimträgern verbliebenen Testvirus lag jedoch in allen Fällen geringfügig über dem des durch Zugabe des "Desinfektionsmittels" desorbierten Virus. Die Ergebnisse der mit beiden Keimträgernmodellen durchgeführten Versuche waren nahezu identisch.

Abb: 25 Infektiositätsgehalt des ECBO-Virus im Überstand und auf dem Träger nach Zugabe des "Desinfektionsmittels"

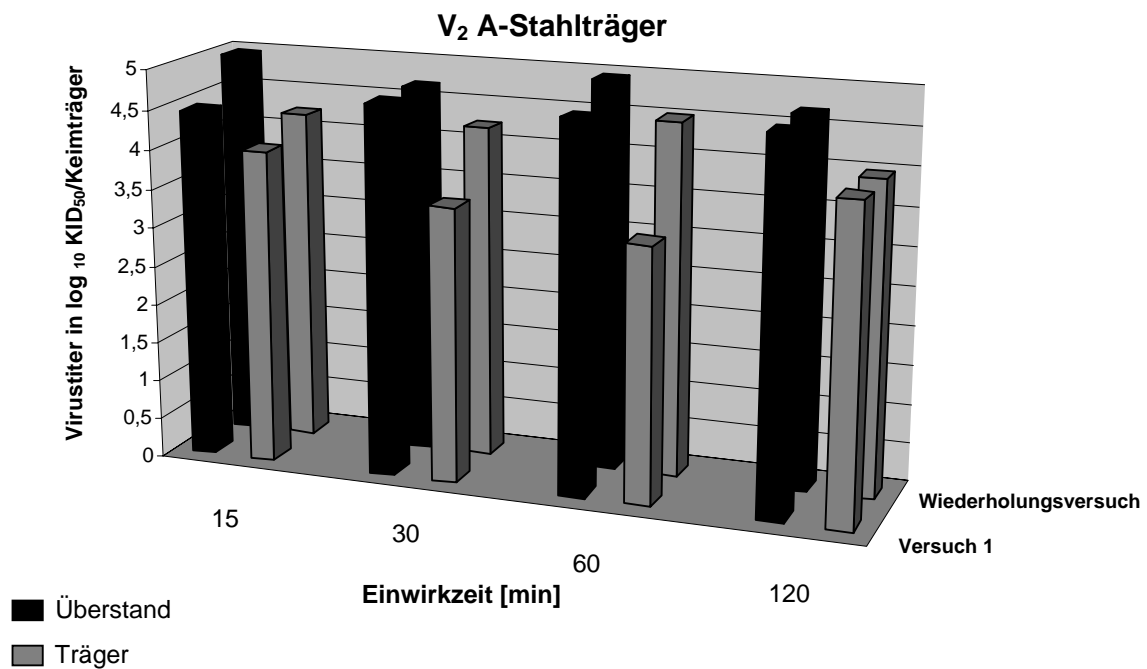
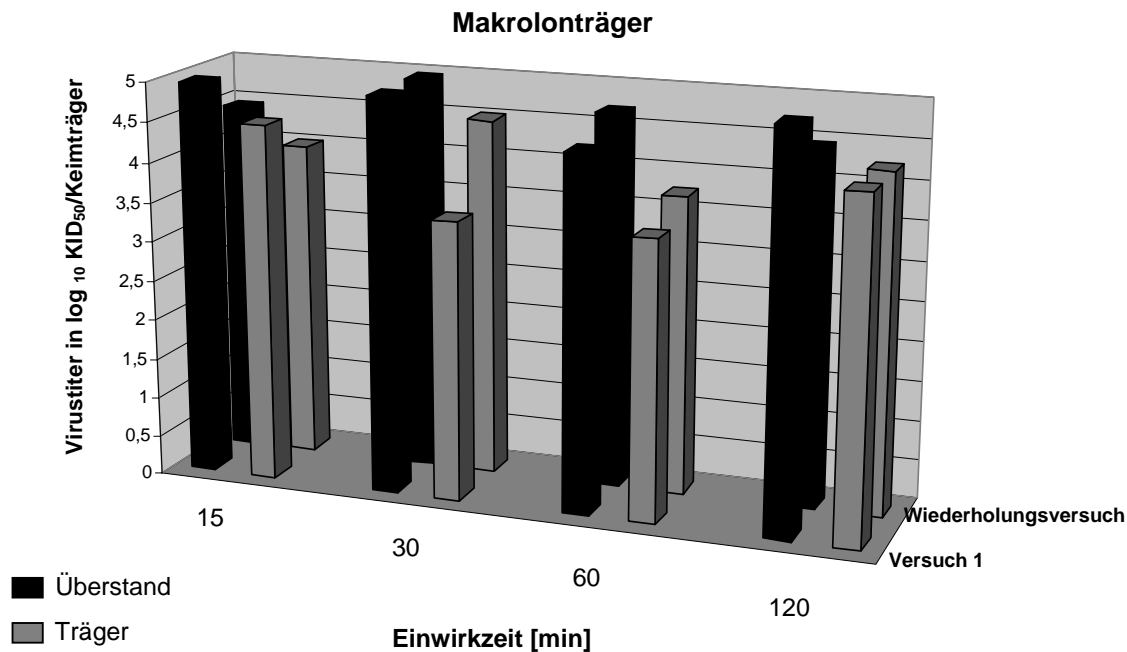


Abb: 26 Infektiositätsgehalt des ECBO-Virus im Überstand und auf dem Träger nach Zugabe des "Desinfektionsmittels"



3.2.4 Methodik des Keimträgertests zur Prüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen animale Viren im Lebensmittelbereich

Aus den Ergebnissen der bisher aufgeführten Versuche ergab sich folgende Anleitung für die Durchführung von Keimträgerversuchen zur Prüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen animale Viren im Lebensmittelbereich.

Die Testvirussuspension wird mit Lösungen von HE und BSA in WSH von jeweils 0,1% (**Punkt 3.1.4.1.3**) im Verhältnis 1:1 (v/v) gemischt. Anschließend werden viruskontaminierte Träger (**Punkt 3.1.5.4**) (Antrocknungszeit 70) mit 0,16 ml Desinfektionsmittel überschichtet und 15, 30, 60, und 120 min bei 10 °C gelagert. Als Viruskontrolle dient 0,16 ml WSH (überschichtete Träger). Am Ende der Einwirkungszeiten von 15, 30, 60, und 120 min werden die Träger inkl. des Desinfektionsmittels in Greiner® Rörchen mit 10 ml MEM eingelegt und für jeweils 30 s mit dem Vortexer und im Ultraschallwasserbad behandelt. Anschließend werden die Suspensionen quantitativ auf Infektiosität geprüft wie unter **Punkt 3.1.2.2.1** dargestellt (**siehe Abb. 27**).

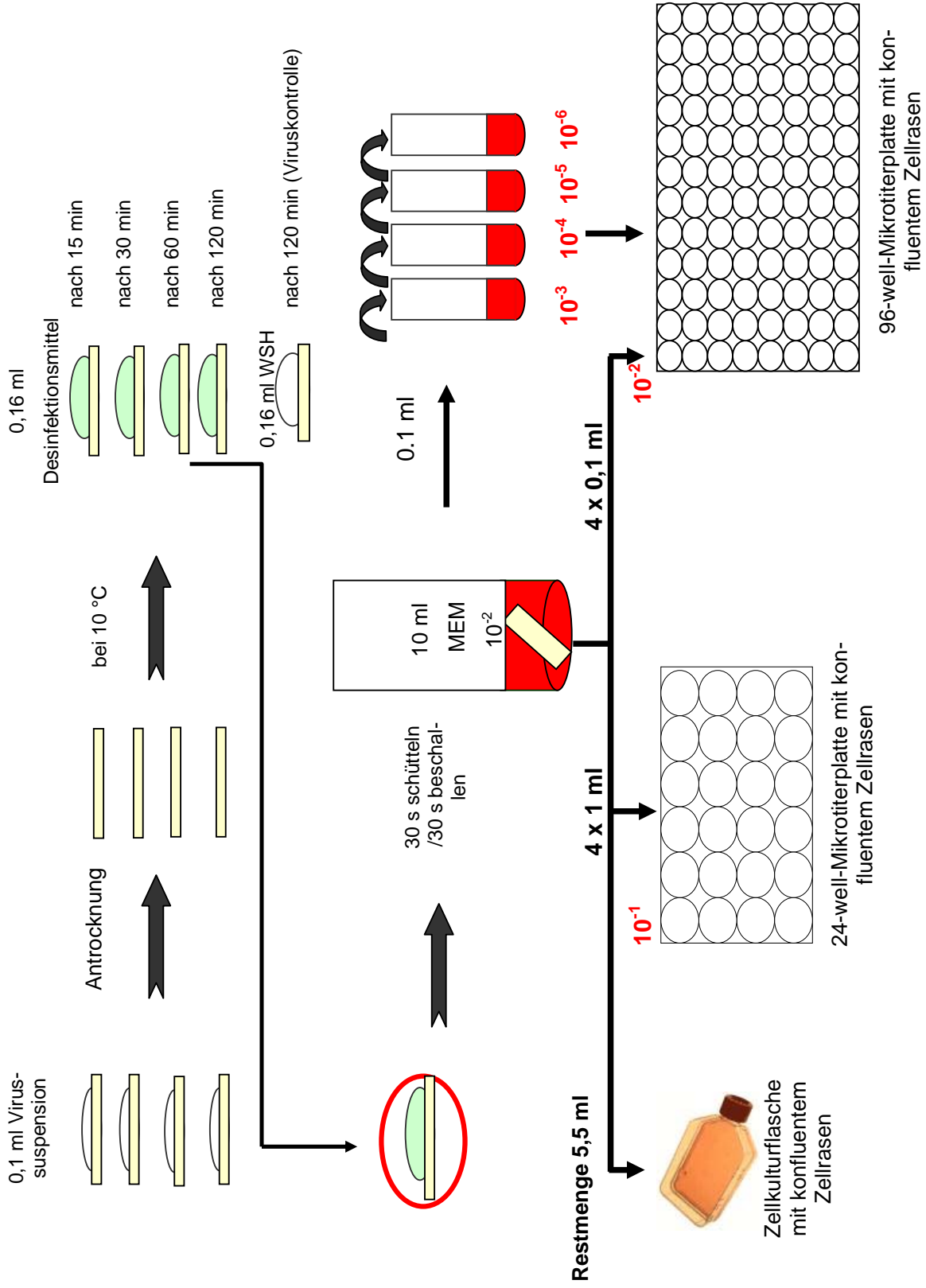


Abb.27: Schematische Darstellung des etablierten Keimträgetests zum Nachweis der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln im Lebensmittelbereich

3.2.5 Prüfung verschiedener für den Lebensmittelbereich vorgesehener Desinfektionsmittel auf Viruzidie unter Verwendung des etablierten Keimträgermodells und ECBO- Virus als Testvirus

3.2.5.1 Auswahl der Desinfektionsmittel

Die in der Liste der DVG für den Lebensmittelbereich aufgeführten und nach Wirkstoffgruppen zusammengefassten Desinfektionsmittel sind in **Tabelle 13** aufgeführt. Wie aus der Aufstellung ersichtlich, dominieren in der Häufigkeit Desinfektionsmittel mit diesen Wirkstoffen. Aus diesen am häufigsten vertretenen Wirkstoffen wurden je Gruppe ein Desinfektionsmittel zufällig für die Viruzidieprüfung mit dem etablierten Keimträgermodell ausgewählt. Bei diesen Präparaten handelte es sich um die unter **Punkt 3.1.3.2** im Kapitel "Material und Methoden" aufgeführten Desinfektionsmittel.

Tabelle 13: Anzahl der in der DVG- Liste für den Lebensmittelbereich aufgeführten Desinfektionsmittel mit übereinstimmenden Hauptwirkstoffen

Wirkstoff	Desinfektionsmittel* [n]
Quat. Ammoniumverbindungen	133
Alkylamin	30
Natriumhypochlorit, Tenside	23
Alkohol	21
Peressigsäure, Wasserstoffperoxid	16
Activchlor	7
Peroxidverbindungen, Organ.Säure, Oberflächenactive Substanzen	3
Alkohol, Aldehyde	3
Amphotenside	3
Anorgan.u. organ.Säure	1
Säure, anionische Tenside	1

* 6. Desinfektionsmittelliste der DVG für den Lebensmittelbereich 2003

3.2.5.2 Viruzide Wirksamkeit von Steril[®], HM3000[®], Divodes FG[®] und neoquat s[®]

Die Bestimmung der viruziden Wirksamkeit der o.a. Desinfektionsmittel für den Lebensmittelbereich diene vornehmlich zur Eignungsprüfung der etablierten Methodik an Desinfektionsmitteln mit unterschiedlichen Wirkstoffen.

In Ergänzung der unter **Punkt 3.2.3.3** aufgeführten Ergebnisse wurde in einem Fall die Inaktivierung des Virus durch das auf den Träger pipettierte Desinfektionsmittel wie nachfolgend skizziert (**Punkt 3.2.5.2.1**) vorgenommen.

3.2.5.2.1 Restvirusgehalt auf der V₂ A-Stahlträgeroberfläche und in dem zur Desinfektion verwendeten Desinfektionsmittel nach Anwendung von Steril[®]

Die Prüfung der viruziden Wirksamkeit von Steril[®] erfolgte zunächst lediglich unter Verwendung des V₂ A-Stahlträgers. In Ergänzung zum **Punkt 3.2.3.3** wurde jedoch nach Anwendung von Steril[®] die Menge an reisolierbarem Restvirusgehalt getrennt nach dessen Gehalt auf dem Keimträger und im Desinfektionsmittelüberstand bestimmt.

Wie aus **Abb. 28** zu entnehmen ist, führte das Desinfektionsmittel in der Suspension (Infektiositätstiter des desorbierten Virus) bereits bei Anwendung niedriger Konzentration und geringer Einwirkzeit zu einer vollständigen Reduktion der Infektiosität des Testvirus. Bei der Bestimmung des Restvirusgehalts auf dem Keimträger wurde dagegen eine um durchschnittlich ein bis 2 Zehnerpotenzen niedrigere Titerreduktion nachgewiesen.

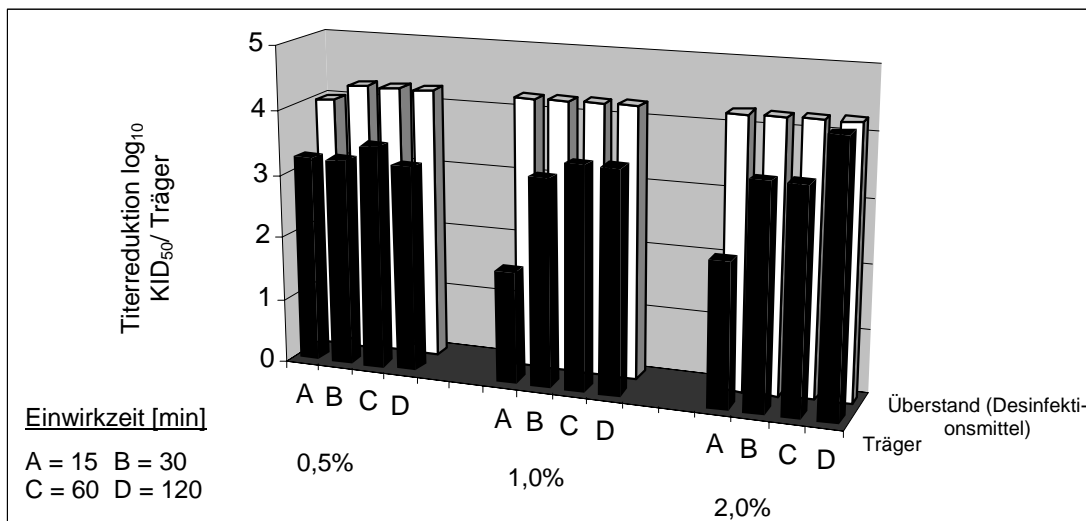


Abb. 28: Viruzide Wirksamkeit von "Steril[®]" im Keimträgermodell mit ECBO- Virus als Testvirus bei 10 °C

3.2.5.2.2 Steril® (Hauptwirkstoff: Natriumhypochlorit)

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse zum Nachweis des gesamten Restvirus konnten beide verwendeten Keimträger mit Steril® ausreichend sicher desinfiziert werden. Bereits mit 0,5% Steril® war auf dem Keimträger aus V₂ A-Stahl nach 30 min und auf beiden Keimträgern unter Verwendung der 1%igen Lösung bereits nach 15 min eine Titerreduktion von 4 Zehnerpotenzen nachweisbar (**Abb. 29 und Tabelle 40 und 41**).

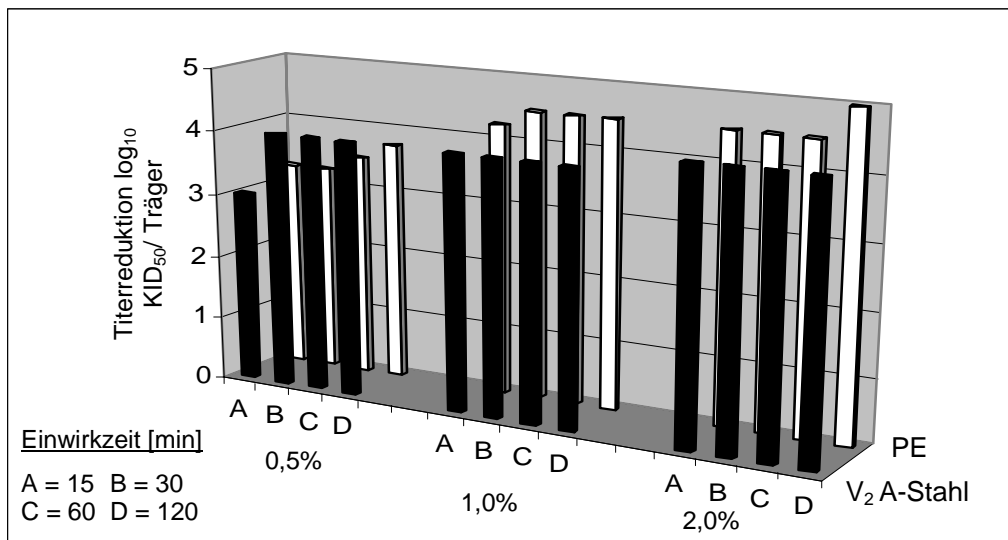


Abb. 29: Viruzide Wirksamkeit von "Steril®" im Keimträgermodell mit ECBO- Virus als Testvirus bei 10 °C

3.2.5.2.3 HM 3000® (Hauptwirkstoff: Alkylamin)

Das Präparat mit der Bezeichnung "HM 3000®" führte sowohl auf dem PE- als auch dem V₂ A-Stahlträger nur zu minimalen Reduktionsraten des an die Träger adsorbierten Testvirus. Auch mit einer Konzentration von 5% des Desinfektionsmittels betrug die Titerreduktion nach einer Einwirkzeit in 2 h lediglich nur durchschnittlich 1 Zehnerpotenz. Bedeutende Unterschiede zwischen den Keimträgern lagen nicht vor (**Siehe Abb. 30 Tabelle 42 und 43**).

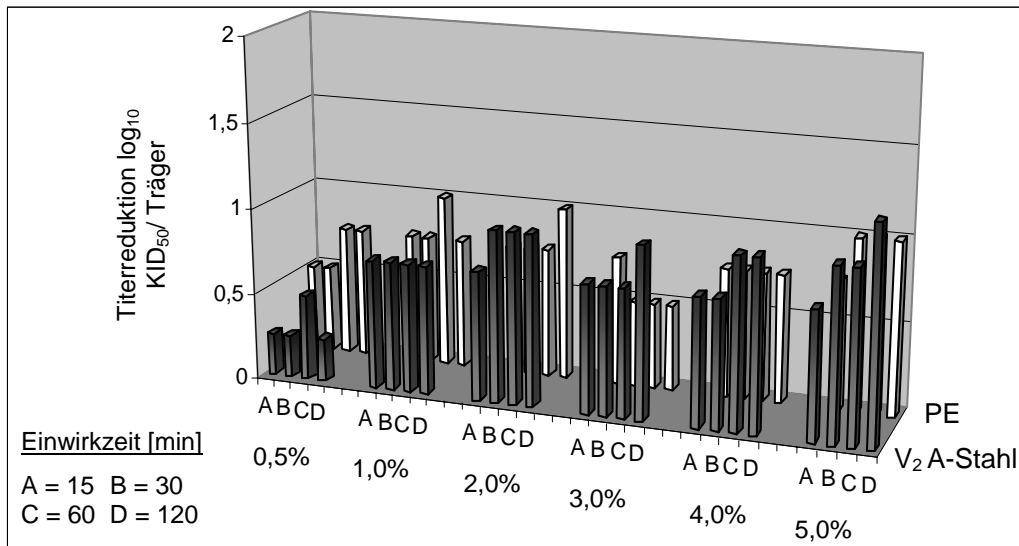


Abb. 30: Viruzide Wirksamkeit von „HM 3000®“ im Keimträgermodell mit ECBO- Virus als Testvirus bei 10 °C

3.2.5.2.4 Divodes FG® (Hauptwirkstoff: Alkohol)

Divodes FG® mit Alkohol als Hauptwirkstoff ist gebrauchsfertig auf dem Markt. Weder auf dem Stahl- noch dem PE- Träger war in dieser Konzentration eine virusdesinfizierende Wirkung vorhanden. Die Reduktionstiter erreichten auch bei 2- stündiger Einwirkzeit lediglich 0,5 Zehnerpotenzen. (Siehe Abb. 31 Tabelle 44 und 45).

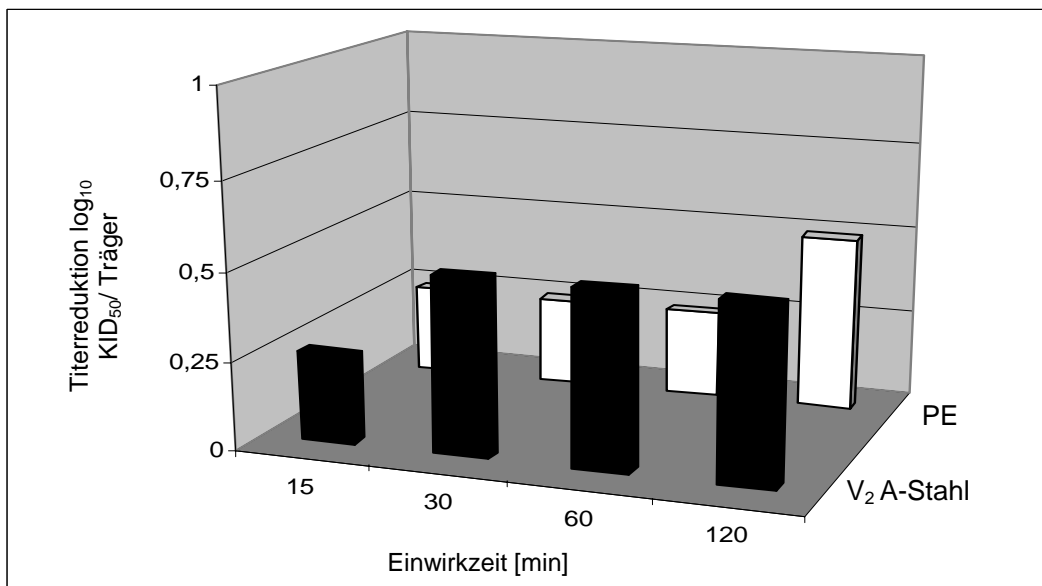


Abb. 31: Viruzide Wirksamkeit von „Divodes FG®“ im Keimträgermodell mit ECBO- Virus als Testvirus bei 10 °C

3.2.5.2.5 Neoquat s® (Hauptwirkstoff: Qua. Ammoniumverbindungen)

Quaternäre Ammoniumverbindungen stellen den Hauptwirkstoff von „neoquat s®“ dar. Wie aus der **Abb. 32** ersichtlich ist, besitzt auch dieser Wirkstoff keine nennenswerten viruziden Eigenschaften. Die gemessene Titerreduktion überschreitet auch hier nicht den Wert von 0,5 Zehnerpotenzen (**Siehe Tabelle 46 und 47**).

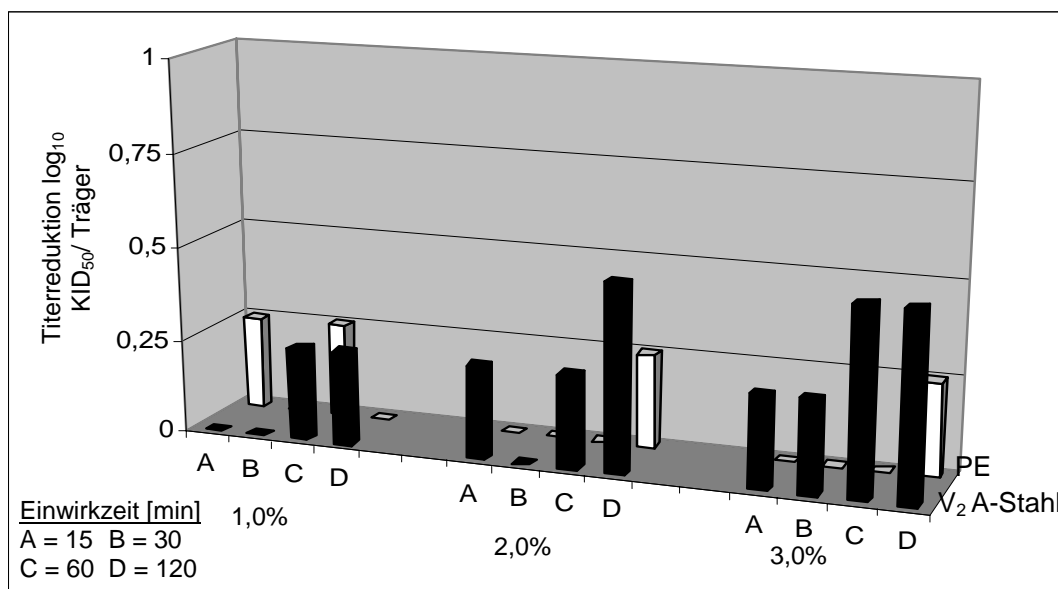


Abb. 32: Viruzide Wirksamkeit von „neoquat s®“ im Keimträgermodell mit ECBO-Virus als Testvirus bei 10 °C

4 Diskussion

4.1 Kriterien für die Auswahl eines Testvirus und der Keimträger

Eine Prüfung von Desinfektionsmitteln auf ihre viruzide Wirksamkeit wird ganz entscheidend von der Wahl der Testorganismen bestimmt. Die Auswahl dieser als „Testviren“ bezeichneten Viren unterliegt diversen Anforderungen. Von Seiten der Vertreter von Desinfektionsmitteln wird die Meinung vertreten, dass als Testvirus nur ein bedeutsamer Krankheitserreger in Frage kommen kann. Als Begründung wird der Wunsch nach einem realen Bezug zwischen den Zielobjekten (Mikroorganismen) bei der Prüfung und der Anwendung (Infektionsprophylaxe gegenüber bedeutenden Krankheitserregern) angeführt. Eine ähnliche Philosophie wird auch bei der Prüfung von Desinfektionsmitteln in Nordamerika vertreten. Die „Testviren“ sollten möglichst das gleiche Spektrum von Erregern repräsentieren, gegen die das Desinfektionsmittel in der Praxis vorgesehen ist. Diese Vorgehensweise beschränkt jedoch die Anwendung des Desinfektionsmittels lediglich auf solche Fälle, die von dem Prüfumfang abgedeckt sind. Mit dem Ziel der Abgabe einer allgemeinen Anwendungsempfehlung wird in Deutschland und im Zuge der EU-weiten Harmonisierungsbestrebungen der Desinfektionsmittelprüfung ein anderer Weg bei der Auswahl von Testviren beschritten. Von der sicherlich auch emotional gelenkten Forderung, dass es sich bei den Prüfviren um bedeutende Krankheitserreger handeln müsse, wird abgesehen. Die auszuwählenden Testviren sollten jedoch hinsichtlich ihrer Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einflüsse den Erregern oder pathogenen Mikroorganismen entsprechen, bzw. eine höhere Widerstandsfähigkeit aufweisen. Sie dienen als ein Modell, das stellvertretend für die Prüfung mit Erregern verwendet wird. Von einem derartigen „Keimmodell“ lässt sich somit eine breiter gefächerte Anwendungsempfehlung ableiten. Weitere Anforderungen beziehen sich auf die potentielle Gefährlichkeit der Erreger und ihre Vermehr- und Nachweisbarkeit. Es sollte sich weder um Erreger von anzeigepflichtigen Tierseuchen noch um Zoonoseerreger handeln (WEINHOLD und KÖHLER, 1972). Des Weiteren sollten die Teststämme unter Laborbedingungen einfach und mit hohen Titern vermehrbar, sicher und mit einfachen Techniken nachweisbar sein (BÖHM, 1996). Entsprechende und darüberhinausgehende Anforderungen wurden auch bereits von anderen Untersuchern formuliert (SPRINGTHORPE et al., 1986). Bezogen auf die Prüfung an Viren bedeutet dies, dass die Testorganismen hohe Titer in permanenten Zellkulturen erzeugen und einen ausgeprägten zytopathischen Effekt induzieren müssen. Aus Sicht der Akzeptanz eines Modells wäre sicherlich noch zu fordern, dass die Erreger bekannt und in der Population aktuell verbreitet sind.

Durch eine vergleichende experimentelle Untersuchung und Zusammenstellung bekannter biologischer Eigenschaften von den in Frage kommenden Viren konnte das als Testvirus geeignete Virus bestimmt werden. Besondere Bedeutung kam hierbei als Kriterium für die Auswahl eines Testvirus zweifellos die Widerstandsfähigkeit des Erregers gegenüber chemischen Einflüssen zu (ANONYM, 1998). Da aus dem Schrifttum entsprechende Daten in einer für eine objektive Beurteilung notwendigen Vergleichbarkeit nicht zu entnehmen waren, sollten eine begrenzte Anzahl unbehüllter und behüllter animaler Viren vergleichend auf ihre Widerstandsfähigkeit gegenüber verschiedenen chemischen Wirkstoffen bei 20 °C mit und ohne Eiweißbelastung untersucht werden. Darüberhinaus wurden gleichzeitig weitere biologische Eigenschaften der Testviren ermittelt werden, z.B. Vermehrung in Zellkulturen, Titerhöhen, Ausprägung des ZPE, etc.

In Übereinstimmung mit zahlreichen Angaben aus der Literatur erwies sich das bovine Parvovirus (BPV) von den untersuchten Virusarten als widerstandsfähigstes Virus gegenüber den verwendeten bioziden Substanzen (HERBST und STRAUCH, 1991; NASSER et al., 2002; SCOTT, 1980; BROWN, 1981; McGAVIN, 1987; KENNEDY et al., 1995).

Was die Auswahl eines geeigneten Testvirus anbetrifft, ist die Höhe der Widerstandsfähigkeit jedoch nicht ein ausschließliches Kriterium. Gemessen an weiteren Kriterien, insbesondere der Vermehrbarkeit und dem Nachweis in Zellkulturen, besitzt das geringfügig weniger widerstandsfähige ECBO-Virus entscheidende Vorteile. ECBO-Virus vermehrte sich sehr gut in kurzer Zeit mit einem ausgeprägten zytopathischen Effekt in permanenten Zellkulturen, wohingegen der Untersucher zur Replikation des BPV auf primäre Zellkulturen angewiesen ist. Weiterhin war der Reproduktionszyklus des BPV in Zellkulturen sehr viel länger und die durchschnittlich erhaltenen Titerhöhen waren niedriger als beim ECBO-Virus. Von Seiten der Tenazität und der Vermehrbarkeit zu hohen Titern in permanenten Zellkulturen wies Reo-Virus nach den vorliegenden Untersuchungen mit ECBO-Virus vergleichbare Eigenschaften auf. Wegen der bestehenden Empfänglichkeit des Menschen für Reovirus kommt dieser Erreger als Testvirus jedoch weniger in Frage (WEINHOLD und KÖHLER, 1972). Felines Calicivirus genügte zwar von Seiten der biologischen Eigenschaften in Zellkulturen vollkommen den Anforderungen an ein Testvirus, besaß jedoch eine verglichen mit den anderen unbehüllten Viren niedrigere Widerstandsfähigkeit, was der Verwendung als Testvirus entgegensteht. Was die behüllte Viren anbetrifft, besitzen sie generell eine niedrigere Tenazität gegenüber Bioziden als unbehüllte Viren (SCHLIESSER, 1981; MAHNEL, 1983; LIESS und KAADEN, 2003; ROLLE und MAYER 2002). Dennoch wurden in Zellkulturen vermehrbare behüllten Viren in die vergleichenden Tenazitätsstudien mit einbezogen. Dabei konnte weitgehend die niedrigere Widerstandsfähigkeit der behüllten im Vergleich zu den unbehüllten Viren bestätigt werden. Ausnahmen hiervon, z.B. die hohe Tenazität des equinen Arteritisvirus gegenüber Formaldehyd und Ameisensäure, bestätigten jedoch die Richtigkeit einer Einbe-

ziehung auch der behüllten, nach allgemeiner Auffassung wenig widerstandsfähigen Virusarten in die vergleichenden Untersuchungen zur Tenazität (SOULIER, 2005). Über diese im Vergleich zu anderen behüllten Virusarten besondere Tenazität des EAV gegenüber bestimmten bioziden Substanzen wurde bereits schon früher berichtet (BREMER, 2003). Die Kenntnis dieser Beobachtung hat für die mit der Abgabe von Anwendungsempfehlungen betrauten Personenkreise und damit für die Desinfektionspraxis große Bedeutung. Auch für den Lebensmittelbereich sollten daher Anwendungsempfehlungen über die mit der in der vorliegenden Arbeit etablierten Methodik ermittelte Mindestwirksamkeit von Desinfektionsmitteln hinausgehen, da n.a. das Testvirus nicht unbedingt das widerstandsfähigste Virus repräsentiert.

Insgesamt fiel entsprechend den formulierten Forderungen die Wahl auf das unbehüllte bovine Enterovirus (ECBO-Virus). Das Virus ist in der Rinderpopulation weit verbreitet und beinhaltet mit Sicherheit ein geringes Gefährdungspotential. Es ist weder ein Zoonoseerreger noch ein Erreger einer anzeigepflichtigen Tierseuche und führt in seinem Wirt ausschließlich zu klinisch inapparent verlaufenden Infektionen (ROLLE und MAYER, 2002). Wie die vorliegenden Untersuchungen belegten, kann das Virus ferner in permanenten Zelllinien mit hohen Titern vermehrt und anhand seines bei der Vermehrung entstehenden ausgeprägten ZPE sicher nachgewiesen und in Mikrosystemen quantifiziert werden. Diese Eigenschaften machen das ECBO-Virus prinzipiell zu einem idealen Testvirus. Gleichzeitig erfüllt es die Forderung nach einer ausreichend hohen Tenazität u. a. auch gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln, was durch vergleichende experimentelle Untersuchungen belegt wurde.

Als Materialien für die Keimträger kamen in der vorliegenden Arbeit Polyethylen (PE) und V₂A-Stahl zur Anwendung. Im Bereich der Lebensmittelindustrie besteht ein großer Teil von Gegenständen mit glatten Oberflächen aus diesen Materialien. Neben der glatten Oberfläche besitzen diese Stoffe zudem den Vorteil, dass sie sich chemisch inert verhalten und autoklavierbar sind. Damit entsprechen die Trägermaterialien weitgehend den Forderungen von MAHNEL und KUNZ (1976). Nach den Vorstellungen dieser Autoren sollten die Keimträger aus jenem Material sein, das im Feld auch tatsächlich häufig kontaminiert wird. Weiterhin sollten die Träger möglichst chemisch inert sein. Ein Nachteil des PE - Trägers für die Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln war die mangelnde Benetzbarkeit der Oberfläche. Auch durch Entfetten mit Alkohol oder Aceton ließ sich dieser Nachteil nicht beseitigen. Bei metallischen Trägern wurden ebenfalls entsprechende Effekte beschrieben (REUTER, 1976). Dies konnte in den eigenen Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden. Die Unterschiede in der Benetzbarkeit der Materialien stehen sehr wahrscheinlich eher im Zusammenhang mit dem chemisch – physikalischen Verhalten der Materialien als mit ihrer Oberflächenstruktur. Nach rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen waren beide dieser augenscheinlich glatten Materialien von einer eher rauhen Oberflächenstruktur, was

bereits durch frühere Untersuchungen belegt worden war (BANSEMIR et al., 1975). Beide Keimträgerarten wurden vor Verwendung autoklaviert. Die Anwendung von thermischen Verfahren zur Sterilisierung wurde zur Behandlung von Trägermaterialien vor einer experimentellen Untersuchungen favorisiert. Ob hiermit eine Veränderung der Materialeigenschaft einhergeht, die eine Auswirkung auf das Prüfergebnis hat, kann nicht beantwortet werden. Eine über 10 Minuten andauernde Erhitzung des PE – Trägers auf 121 °C (Autoklav) sollte jedoch wegen möglicher Verformungen des Keimträgers vermieden werden. Korrekterweise trifft daher der Begriff “ sterile Keimträger“ nur auf die V₂A-Stahl Träger zu.

Eine wichtige Frage war auch die zu konzipierende Größe der Keimträger. Von anderen Arbeitsgruppen verwendete Träger reichten von 1 x 1 cm bis 25 x 25 cm. Kleine Keimträger bergen den Nachteil, dass die Erregersuspensionen oft nicht gleichmäßig auf dem Träger verteilt werden können. Bei größeren Keimträgern ist sowohl ein höherer Arbeitsaufwand als auch ein größerer Verbrauch an Kulturmedien erforderlich.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher 2 x 2 cm große Trägermaterialien verwendet. Die vorgesehene Menge an Virussuspension war auf diesen Trägern gut und gleichmäßig aufzubringen. Weiterhin hatte diese Größe den Vorteil, dass die Träger in ein 50 ml Kunststoffröhrchen überführt werden konnten und lediglich 10 ml MEM ausreichten, um den Träger im Rahmen der Rückgewinnung von Virus vollständig zu bedecken.

4.2 Etablierung eines quantitativen Keimträgertests zum Nachweis der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln im Lebensmittelbereich

Suspensions- und Lösungsmittel

Die Effektivität von Desinfektionsmitteln wird in der Praxis bzw. in den verschiedensten Anwendungsbereichen durch die Wasserhärte des Verdünnungswassers (°dH) beeinflusst. (VAN KLINGEREN, 1982). Wegen der geographisch sehr unterschiedlichen Wasserhärte war es erforderlich, Wasser mit standardisierter Härte (WSH) zu verwenden. Die Zusammensetzung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten WSH war konform mit den CEN Richtlinien (ANONYM, 2003a).

Einfluß verschiedener Suspensionsansätze auf die Infektiosität des Testvirus während der Ad- und Desorption vom Träger

Die Adsorption des Testvirus an den Keimträger erfolgte durch eine Antrocknung der Testvirussuspension auf dem Träger. Diese Trocknung des Testvirus kann zu irreparablen Schäden am Mikroorganismus führen und damit u. U. einen je nach Erregerspezies unterschiedlich hohen Infektiositätsverlust bedingen. Im Zusammenhang mit der Beurteilung des verbleibenden Risikos sowie im Hinblick auf die zu etablierende Prüfmethodik stand die Frage, in welchem Umfang das ECBO-Virus einer Trocknung widersteht. Nach den hierzu durchgeführten Versuchen verlor das Virus in wässriger Suspension durchschnittlich eine Zehnerpotenz (entspricht 90 %) an Infektiosität. Dieser Verlust konnte durch den Zusatz von Eiweiß zum Zweck der Simulierung der unter Praxisverhältnissen vorliegenden „Verschmutzung“ reduziert werden. Hypothetisch könnte somit das Eiweiß einen zusätzlichen Schutz des Virus vor Infektiositätsverlusten durch Austrocknung bewirken. Auf Praxisverhältnisse übertragen besteht somit nach Trocknung kontaminierter Oberflächen, insbesondere bei gleichzeitig vorliegender starker Verschmutzung, nach wie vor ein hohes Gefährdungspotential. Für die Etablierung der Prüfmethodik war entscheidend, dass die Infektiositätsverluste des Testvirus durch Trocknung das Studium des für die Wirksamkeitsprüfung der Desinfektion erforderlichen Inaktivierungsumfangs nur unwesentlich negativ beeinflussten.

Gleichzeitig beeinträchtigt der Zusatz von Eiweiß zu der Erregersuspension die biozide Wirksamkeit aller Desinfektionsmittel, jedoch je nach Substanz in unterschiedlichem Ausmaß. Im Feld werden Eiweiße durch Schmutzstoffe wie z.B. Kot, Urin, Blut, Speichel, Milch und Fett repräsentiert. Diese Substanzen bilden zum einem eine mechanische Schutzwirkung, auch können eiweißhaltige Verschmutzungen mit Desinfektionswirkstoffen Komplexe bilden, die nicht mehr antimikrobiell wirken (WALLHÄUSSER, 1984). Diesen Kenntnissen wird bei Desinfektionsmittelpfahrungen in aller Regel Rechnung getragen, um praxisnahe Bedingungen zu simulieren und damit für die Feldbedingungen zutreffende Empfehlungen abgeben zu können (BEST, 1994). Im Schrifttum wurden verschiedenste Eiweißzusätze empfohlen wie z.B. Organverreibungen (GILDEMEISTER et al., 1930; BINGEL, 1953; HARMS, 1963), Eialbumin (GRAFE und HAUSSMANN, 1956), Blutserum (WEINHOLD und KÖHLER, 1972), Allantoisflüssigkeit (ALBRECHT et al., 1957; ALBRECHT et al., 1958; HORN, 1960; NEUMANN, 1971), Tryptose- Phosphat- Bouillon (SATTAR, 1983), antikörperfreies bovines Serum (FKS) (DVG, 1988), Blut (BUERREN et al., 1995; SPICHER, 1997), Rinderserum (HENNEMANN, 1968), Hefe (SLAVIN, 1973), Hefeextrakt + Bovines Serumalbumin (ANONYM, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl eine Mischung von Hefeextrakt (HE) und Bovinem Serumalbumin (BSA), als auch Bovines Serumalbumin allein verwendet.

Die Entscheidung für BSA und HE beruhte auf dem Bestreben, möglichst den CEN - Vorgaben konforme Bedingungen zu etablieren. Mit dem Zusatz einer Eiweißlösung aus HE und BSA zu der Virussuspension vor Antrocknung an den Träger konnten somit gleichzeitig 2 verschiedene Forderungen erfüllt werden. Zum Einen war wie o. a. angeführt ein derartiger Zusatz zur Verhinderung von Trocknungsverlusten ratsam und zum Anderen erfüllte dieser Zusatz die Forderungen nach einer Eiweißbelastung für die zu etablierende Prüfmethodik. Leztendlich war in diesem Stadium der Untersuchungen somit lediglich noch zu ermitteln, in welcher Konzentration BSA und/ oder HE in der Virussuspension vorliegen sollten. Als Orientierung dienten wiederum Vorgaben der CEN, da wie oben angeführt eine Kompromisslösung zu finden war zwischen Forderungen nach einem möglichst hohen Schutz bei Trocknung und einer den Umständen entsprechend ausreichenden Eiweißbelastung. In den CEN – Vorgaben wird unterschieden zwischen einer geringen Eiweißbelastung, die für Prüfbedingungen von Desinfektionsmitteln für einen wenig verschmutzten Bereich (z.B. Lebensmittelbereich) vorgesehen ist und einer hohen Eiweißbelastung bei der Prüfung von Desinfektionsmitteln für verschmutzte Bereiche (z.B. Tierhaltungsbereich).

Für die vorliegenden Versuche kamen daher niedrigere Konzentrationen an Eiweißzusätzen für die Belastung zur Anwendung, da hier größere Mengen an Virus nach der Antrocknungsphase zurückgewonnen werden konnten als bei Virussuspensionen mit höherem Eiweißgehalt. Auch die ausschließliche Verwendung von BSA als Zusatz zu der Virussuspension ergab von Seiten der Resultate keine Unterschiede zu den Ergebnissen der Versuche, die mit der Mischung von HE und BSA durchgeführt wurden.

Die nach diesen Versuchen favorisierte Eiweißlösung, eine Mischung aus HE und BSA in einer Konzentration von jeweils 0,1% in der Virussuspension, besitzt besondere Vorzüge:

- HE + BSA ist eine leicht herstellbare kombinierte Belastungssubstanz, die aus Proteinen, Kohlenhydraten und Zuckern besteht und somit in der Lage ist, eine Vielzahl an organischen Verschmutzungen zu imitieren (SOULIER, 2005). BSA allein besteht zu 100 % aus reinem, gereinigtem Eiweiß (Albuminfraktion) und enthält keine Lipide, Kohlenhydrate und Zucker. Eine Supplementierung mit Hefeextrakt und Bovinem Serumalbumin erscheint zur Simulierung der unter Praxisverhältnissen zu erwartenden Verschmutzung als sinnvoll.

Volumen der je Träger verwendeten Testvirussuspension

Mit der Zunahme des Volumens der zur Antrocknung an die Träger vorgesehenen Testvirussuspension verlängert sich in der Regel die Antrocknungszeit (HANEKE, 1991). Dies konnte durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Je nach verwendeten Volumen (0,1 – 0,3 ml) reichte die Trocknungszeit von 2,5 h bis 5,5 h (Glasröhrchen). Bei wenig widerstand-

fähigen Testviren ist mit Zunahme der Antrocknungszeit auch eine Abnahme der Infektiosität zu erwarten. In den eigenen Versuchen mit dem sehr widerstandsfähigen ECBO – Virus war dies jedoch nicht zu befürchten. Der Verlust an Infektiosität entsprach zu allen Zeiten dem trocknungsbedingten Verlust von ca. 1 Zehnerpotenz. Dennoch fiel die Entscheidung auf ein Volumen von 0,1 ml. Hierbei war der Zeitaufwand für die Trocknung der Suspension an die Keimträger mit 70 min tolerierbar und gleichzeitig reichte die Menge vollständig aus, um eine Fläche von ca. 80 % des Trägers gleichmäßig zu bedecken. Auch in anderen Normenwerken wird ein Volumen von 0,1 ml Keimsuspension bei Keimträgerversuchen favorisiert (DGHM, 1984).

Desorption des Testvirus von den Keimträgeroberflächen

Die weiteren Versuche galten der Frage, ob das Testvirus nach Trocknung/Adsorption an die für die Versuche vorgesehenen Keimträgern aus Stahl und Kunststoff in ausreichend hoher Infektiosität, die eine Beurteilung der Inaktivierung über vier Zehnerpotenzen ermöglicht, von den Trägern zu eluieren ist.

Als Methoden der Wahl für die Keimrückgewinnung standen ein sogenanntes Abschwemmverfahren (SCHMIDTHOFER et al., 1972; AFNOR, 1989; HINGST et al., 1990) und ein Abstrichverfahren (SPICHER und PETERS, 1976; BORNEFF, 1977) für die beiden Trägermaterialien PE und V₂ A-Stahl zur Verfügung. Zwischen den zur Rückgewinnung des Testvirus verwendeten unterschiedlichen Techniken ergaben sich keine auf die Eignung einer bestimmten Methode hinweisenden Unterschiede. Von Seiten der Praktikabilität wird jedoch der Abschwemmtechnik mit einer anschließenden Behandlung mit Vortexer und Ultraschall für jeweils 30 s der Vorrang gegeben. Insgesamt lagen die Wiedergewinnungsraten aber deutlich unter 10 % und erreichten nur in Einzelfällen einen Wert von maximal 10 %. Denkbar ist, dass Viren während der Antrocknung inaktiviert werden oder am Keimträger haften bleiben. Nur bei einer ausreichend hohen Wiederfindungsrate können die für die Beurteilung der Desinfektionsmittelwirkung notwendigen Reduktionsfaktoren gewährleistet werden.

In Anbetracht der Höhe des Infektiositätstiter des für die Adsorption verwendeten Testvirus sind als Endergebnis jedoch die absoluten Titerhöhen als ausreichend hoch (in allen Versuchen $> 4 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{Träger}$) zu beurteilen. Somit steht für die Prüfung der Desinfektion gegenüber Viren an Flächen ein Modell zur Verfügung, das die für die Wirksamkeit eines Desinfektionsverfahrens geforderte Reduktion der Virusinfektiosität über vier Zehnerpotenzen ermöglicht.

Volumen des je Träger verwendeten Desinfektionsmittels

Die während der Kontaktzeit je Träger verwendete Menge an Desinfektionsmittel hat entscheidenden Einfluß auf das Ergebnis. Zu geringe Mengen könnten zu einer nicht ausreichenden Benetzung und damit fehlenden Wirksamkeit führen. Bei geringen Desinfektionsmittelmengen führt die zu erwartende Eiweißkonzentration im Desinfektionsmittel zu einer geringeren Einstufung der Wirksamkeit des Präparates. Die in den vorliegenden Versuchen verwendete Menge von 160 µl je Träger orientierte sich an den Richtlinien der DVG, 1990, nach deren Vorgaben 400 ml Desinfektionsmittel je m² Fläche verwendet werden sollten. Wenn man davon ausgeht, dass die Desinfektion von Oberflächen im Prinzip in der Suspension stattfindet und damit der Keimträgerversuch einen modifizierten Suspensionsversuch darstellt, betrug im vorliegenden Versuch die definitive Eiweißbelastung 0,2 %, sofern das an den Träger angetrocknete Eiweiß aus der Testvirussuspension schnell und vollständig in Lösung ging. Hinweise für die Richtigkeit dieser Hypothese ergaben sich aus der Tatsache, dass bereits kurze Zeit nach Überschichtung der Keimträger mit Desinfektionsmittel hohe Infektiositätstiter im Desinfektionsmittel nachweisbar waren. Das Virus desorbiert daher bereits während der Kontaktzeit des Desinfektionsmittels mit dem Träger und wird anschließend in der Suspension aus desorbiertem Virus, Desinfektionsmittel und Eiweiß inaktiviert. So schnell wie das Virus in Suspension geht, dürfte auch das angetrocknete Eiweiß in Lösung gehen. Auf Grund dieser mit hoher Wahrscheinlichkeit vorliegenden Situation diene zum Nachweis möglicher Restvirusmenge nach der vorgesehenen Kontaktzeit des Desinfektionsmittels nicht nur der Träger selbst, sondern neben dem Träger auch das den Träger benetzende Desinfektionsmittel.

Restvirusgehalt auf der V₂ A-Stahlträgeroberfläche und im Überstand nach Anwendung von Steril®

Nach den Ergebnissen unter **Punkt 3.2.3.3** stellte sich die Frage, ob die quantitative Bestimmung des Infektiositätstiter auf dem Keimträger nach Ablauf der Kontaktzeit der Desinfektion allein ausreichen würde oder aber noch auf dem Träger vorhandene Desinfektionsmittellösung in diese Untersuchung miteinbezogen werden sollte. Deshalb wurde diese Bestimmung getrennt durchgeführt, um herauszufinden, ob es tatsächlich einen Unterschied gibt.

Der Infektiositätstiter betrug im Überstand der Kontrollen mit WSH immer über 4 Zehnerpotenzen, wobei dies auf der Trägeroberfläche nicht immer der Fall war. Bezogen auf den gesamten Träger (Überstand und Oberfläche) lag der Infektiositätstiter insgesamt über 5,0

Zehnerpotenzen. Diese Menge war ausreichend zur Beurteilung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln für die Keimträgerversuche. Nach der Verwendung von Steril® als Desinfektionsmittel gegenüber ECBO- Virus auf dem V₂ A-Stahlträger war die Titerreduktion in der Desinfektionsmittellösung höher als auf der Trägeroberfläche. Die Viren in der Desinfektionsmittellösung sind wie im Suspensionsversuch dem Desinfektionsmittel zugänglich, wobei die an der Oberfläche haftenden Viren möglicherweise durch die raue Oberflächenstruktur von Einflüssen des Desinfektionsmittels eher geschützt sind. Daher war sehr wahrscheinlich die Titerreduktion im Überstand höher als auf der Trägeroberfläche. Auch auf Grund dieser Ergebnisse wurde für die Prüfung kommerziell erhältlicher Desinfektionsmittel auf ihre viruzide Wirksamkeit der Infektiositätstiter des gesamten Keimträgers (Desinfektionsmittellösung mit Trägeroberfläche) quantitativ bestimmt.

4.3 Praktikabilität der etablierten Testmethodik

Mit dem letzten o.a. Punkt sind im Wesentlichen alle Fragen, die zur Etablierung des quantitativen Keimträgerversuchs führten, beantwortet. **Abbildung 28 bis 32** stellen die konsequente Umsetzung des durch eigene Vorversuche abgesicherten methodischen Prozederes des Keimträgerversuchs dar. Im Rahmen des letzten Abschnitts der Untersuchungen waren mittels der etablierten Technik kommerziell erhältliche Desinfektionsmittel auf ihre viruzide Wirksamkeit zu prüfen. Im Vordergrund dieser Untersuchungen stand weniger die Frage nach der tatsächlich vorhandenen Wirksamkeit, sondern eher die Absicht, die etablierte Methodik auf ihre Praktikabilität zu untersuchen. Als Desinfektionsmittel kamen Präparate zur Anwendung, die von Seiten ihres Wirkstoffgehaltes den am häufigsten in der Liste der DVG für den Lebensmittelbereich vertretenen Desinfektionsmitteln entsprachen. Bei allen untersuchten Präparaten war von Seiten der etablierten Methodik eine Verfolgung der Virusinaktivierung über mindestens 4 Zehnerpotenzen möglich.

Was die Ergebnisse im Hinblick auf die viruzide Wirksamkeit der geprüften Substanzen anbetrifft, konnte nur bei dem Präparat auf der Wirkstoffbasis Natriumhypochlorit eine sichere viruzide Wirksamkeit auf Flächen nachgewiesen werden. Alle anderen geprüften Desinfektionsmittel mit den Hauptwirkstoffen Alkohol, Alkylamin und Quaternäre Ammoniumverbindungen besaßen keine ausreichende viruzide Wirkung. Da es sich bei allen Desinfektionsmitteln auf ihre bakterizide und fungizide Wirkung geprüfte und von Seiten der DVG für den Lebensmittelbereich empfohlene Präparate handelte, ist bei Verwendung dieser Mittel prinzipiell eine viruzide Wirksamkeit nicht unbedingt zu erwarten. Die Ergebnisse zeigen aber eindrucksvoll, dass von den meisten auf dem Markt befindlichen Desinfektionsmitteln für den Lebensmittelbereich auch keine viruzide Wirkung auf Flächen ausgeht. Mit der

Eingliederung der vorliegenden Methodik in die Sammlung der von dem Desinfektionsmittelausschuss der DVG herausgegebenen Richtlinien dürften aber in Zukunft für den Anwender Desinfektionsmittel für den Lebensmittelbereich zur Verfügung stehen, die auch auf viruzide Wirksamkeit geprüft wurden.

5 Zusammenfassung

Im Bereich der Lebensmittelhygiene sind Prüfmethode für Desinfektionsmittel gegen Bakterien, Pilze und Bakteriophagen gut etabliert. Vom Tier stammende Viren, die Oberflächen im Bereich der Lebensmittelproduktion kontaminieren können, stellen jedoch ein zusätzliches Hygienierisiko dar. Deshalb war es Ziel dieser Arbeit, eine Methode zur Prüfung der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Pathogene dieser Gruppe zu etablieren.

Zur Auswahl eines geeigneten Testvirus wurden verschiedene unbehüllte Virusarten, wie bovinen Enterovirus Typ 1 (ECBO (Enteric Cytopathogenic Bovine Orphan) Virus), Reovirus Typ 1, felines Calicivirus (FCV) und bovinen Parvovirus (BPV), sowie behüllte Virusarten, wie equines Arteritisvirus (EAV), bovinen Herpesvirus Typ 1 (BHV1), Newcastle Disease Virus (NDV) und Vaccinia-Virus, auf ihre Tenazität gegenüber verschiedenen bioziden Substanzen (Formaldehyd, Ameisensäure, Peressigsäure und Natriumhypochlorit) im Suspensionsversuch bei 20°C untersucht. Die Untersuchung erfolgte in Anlehnung an die vom "Comité Européen de Normalisation" herausgegebenen „Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel“ (CEN) (ANONYM, 2003a). Weitere Auswahlkriterien umfassten Laborparameter, wie die Vermehrbarkeit der Viren in permanenten Zellkulturen und die Höhen der hierbei erreichten Virustiter, als auch Fragen zur Biologie der Erreger, besonders das Gefährdungsrisiko für Mensch und Tier bei akzidenteller Exposition. Gemessen an allen Kriterien erwies sich das ECBO- Virus als für die Fragestellung geeigneter als die übrigen o.a. Virusarten. Unter Verwendung dieses Virus wurden anschließend diverse Parameter, die zur Etablierung der Prüfmethode führten, untersucht. Darunter fielen Versuche zum Studium des Einflusses der Trocknung auf den Infektiositätstiter des Virus, der Eignung verschiedener Eiweißlösungen zur Optimierung der Rückgewinnung des ECBO-Virus von den Keimträgeroberflächen, sowie zur Reduzierung von Infektiositätsverlusten bei der Trocknung, als auch Untersuchungen zur Bestimmung der Desorption des ECBO-Virus von den Keimträgeroberflächen.

Nach den Ergebnissen dieser Versuche verlor das ECBO- Virus in wässriger Suspension nach der Antrocknung im Glasröhrchen durchschnittlich eine Zehnerpotenz (entspricht 90 %) an Infektiosität. Dieser Verlust konnte durch den Zusatz verschiedener Lösungen aus Hefeextrakt und bovinem Serumalbumin (jeweils 0,1% Endkonzentration in den Prüfansätzen) oder bovinem Serumalbumin allein mit einer Endkonzentration von 0,5% zum Zweck der Simulierung der unter Praxisbedingungen vorliegenden „Verschmutzung“ bis ungefähr $0,5 \log_{10}$ KID₅₀/ml reduziert werden. Die Unterschiede zwischen beiden Eiweißlösungen waren sehr

gering. Da die Mischung aus Hefeextrakt und bovinem Serumalbumin eher einer Belastung unter Feldbedingungen entsprach als reines BSA, wurde diese Lösung für alle weiteren Versuche verwendet.

Als Varianten für die Keimrückgewinnung von den Trägermaterialien aus Makrolon und V₂ A-Stahl dienten ein sogenanntes Abschwemmverfahren sowie auch ein sogenanntes Abstrichverfahren. Zwischen diesen zur Rückgewinnung des Testvirus verwendeten Techniken ergaben sich jedoch keine auf die Eignung einer bestimmten Methode hinweisenden Unterschiede. Von Seiten der Praktikabilität wurde der Abschwemmtechnik mit einer anschließenden Behandlung mit Vortexer und Ultraschall für jeweils 30 s der Vorrang gegeben. Insgesamt lagen die Wiedergewinnungsraten jedoch deutlich unter 10 % und erreichten nur in Einzelfällen einen Wert von maximal 10 %. Die absoluten Titerhöhen waren jedoch ausreichend hoch (in allen Versuchen > 4 log₁₀ KID₅₀/Träger). Somit steht für die Prüfung der Desinfektion von Viren an Flächen ein Modell zur Verfügung, das die für die Beurteilung der Wirksamkeit eines Desinfektionsverfahrens geforderte Reduktion der Virusinfektiosität über vier Zehnerpotenzen ermöglicht.

Unter Verwendung dieser Methodik wurden abschließend 4 kommerziell erhältliche Desinfektionsmittel aus der 6. Desinfektionsmittelliste der DVG (Lebensmittelbereich), die die 4 am häufigsten verwendeten Wirkstoffgruppen repräsentieren, auf Viruzidie geprüft. Bei allen 4 untersuchten Präparaten war eine sichere Beurteilung der viruziden Wirksamkeit (Verfolgung der Virusinaktivierung über mindestens 4 Zehnerpotenzen) möglich. Eine viruzide Wirksamkeit war jedoch nur bei dem Präparat auf der Wirkstoffbasis von Natriumhypochlorit (Steril) vorhanden. Die weiteren Desinfektionsmittel mit den Hauptwirkstoffen Alkohol (Divodes FG), Alkylamin (HM 3000) und Quaternäre Ammoniumverbindung (neoquat s) besaßen dagegen keine ausreichende oder gar keine viruzide Wirkung.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die beschriebene Methode durch ihre Praktikabilität, Genauigkeit, Schnelligkeit und Kostenneutralität auszeichnet. Sie kann daher für die Überprüfung der viruziden Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln in der Lebensmittelhygiene empfohlen werden.

6 Summary

Protocols for the efficacy testing of disinfectants against bacteria, fungi and phages are well established in food hygiene. Because animal viruses that contaminate surfaces in food processing facilities pose an additional hygienic risk, a germ carrier test was developed to assess the virucidal efficacy of disinfectants against this group of pathogens.

A suited test virus was selected based on its low implication for human and animal health, good replication in permanent cell lines, and presumptive tenacity to disinfectants. In preliminary experiments, the work was evaluated by studying the efficiency of different biocidal agents against a variety of non-enveloped viruses [bovine enterovirus type 1 (ECBO (Enteric Cytopathogenic Bovine Orphan) virus), mammalian reovirus type 1, feline calici virus (FCV), and bovine parvovirus (BPV)], as well as enveloped viruses, as equine arteritisvirus (EAV), bovine herpesvirus type 1 (BHV1), Newcastle disease virus (NDV) and vaccinia virus. Respective tests were performed as suspension tests at a temperature of 20°C according to the “Comité Européen de Normalisation” (CEN) for “Guidelines for the Examination of Chemical Disinfectants” (Anonymous, 2003a). Because of its high tenacity, harmlessness and good replication in permanent cells bovine enterovirus virus was favored as test virus.

Afterwards with use of ECBO virus was determined the loss of viral infectivity by air – drying and the suitability of different protein solutions for the optimising of the recovery of ECBO virus from the carrier surfaces, and for the reduction loss of viral infectivity by the drying, as well as the investigation to determine recovery rates of ECBO virus from the carrier surfaces.

We noticed that the drying of ECBO virus induced a loss of viral infectivity of about 1 log unit (about 90%). Adding proteins as 0,1% yeast extract (YE) plus bovine serum albumin (BSA) each as a final concentration in virus suspension or 0,5% bovine serum albumin (BSA) as a final concentration were shown to reduce the loss of viral infectivity due to the adsorption procedure to a minimum of 0,5 log unit of TCID₅₀. The mixture of BSA plus YE seems to be the most suitable soiling under field condition for virucidal testing than pure BSA, this solution was used for all other tests in this study. Different desorption techniques, like smear and submerge methods were applied in order to regain adsorbed virus from carrier surfaces (Stainless steel and polyethylene), and both techniques revealed comparable results.

An optimum was achieved after applying the submerge technique followed by vortexing and ultrasonic treatment for 30 s. The rates of recovered virus ranged below 10% in some cases and in another cases up to 10%. The absolute titre of virus recovered was always more than

10^4 TCID₅₀/carrier and was sufficient to study the decline of viral infectivity by four order of magnitude, which fullfills the requirement to evaluate the virucidal efficacy.

The optimized protocol proved suitable to assess the efficacy of disinfectants. Four representative disinfectants commonly used in the area of food hygiene were selected for this purpose from the "6. List of Disinfectants for Use in Food Hygiene" approved by the German Veterinary Association (DVG). In all four examined disinfectants was possible to evaluate the virucidal efficacy (decline of viral infectivity at least by 4 orders of magnitude).

Only sodium hypochlorite (steril[®]) was found to be highly effective while other agent such as alcohol (Divodes FG[®]), Alcyclamin (HM 3000[®]) and quaternary ammonium compounds (nequat s[®]) exhibited no virucidal efficacy in this assay.

In conclusion, the method described herein is of good practicability, accuracy, fast acting and economical and can be recommend for screening of the virucidal efficacy of chemical disinfectants in food hygiene.

7 Literaturverzeichnis

ALBRECHT, J. (1957): Vergleichende Desinfektionsmittelprüfungen an verschiedenen Virusarten. Archiv für Hygiene und Bakteriologie 141:460-468.

ALBRECHT, J., LAMMERS, T., WASIELEWSKI, E. V. (1958): Zur chemischen Wäschedesinfektion bei Viruskrankheiten. Zentralblatt Bakteriol Parasitenkd, Infekt Hyg, 1. Abteilung, Original 170:531-537.

ANONYM (1982): Bekanntmachung des Bundesgesundheitsamtes. Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren. Bundesgesundheitsbl.25:397-8.

ANONYM (1983): Kommentar zur Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren. Bundesgesundheitsbl. 1983;26:413-5.

ANONYM (1986): Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V., 2. Auflage, Gießen.

ANONYM (1997): Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension tests for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in veterinary field. Test methode and requirements (phase 2, step 1). prEN, WI216026 CEN/TC 216/WG2-N126.

ANONYM (1998): Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in veterinary field-test method and requirement (phase 2,step 1). prEN, WI 216026, CEN/TC 216/WG2-N126 July 1998.

- ANONYM (1999):** Chemical disinfectants and antiseptics- Guidelines for the application of European Standard for chemical disinfectants. CEN – TC 216.
- ANONYM (2000):** Chemical disinfectants and antiseptics- Guidelines for the application of European Standards for chemical disinfectants. CEN – TC 216.
- ANONYM (2001):** Richtlinien für die Prüfung chemischen Desinfektionsmitteln. Deutsche Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V, 4. Überarbeitete Auflage, Gießen.
- ANONYM (2003a):** Chemical disinfectants and antiseptics quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in veterinary field-test method and requirement (phase 2, step 1). prEN, 14675 TC 216/WG2-N165 REV.
- ANONYM (2003b):** Bekanntmachung des Fachausschusses "Virusdesinfektion" der deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten und des Robert Koch-Institut. Bundesgesundheitsbl. 2003b;46:619.
- ANONYM (2004):** Chemical disinfectants and antiseptics Quantitative surface test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in veterinary field on non-porous surfaces without mechanical action - Test method and requirements (phase 2, step 2) WI 216 CEN/TC216 /WG2 N 171.
- ANONYM (2005):** Chemical disinfectants and antiseptics Quantitative surface test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in veterinary field on non-porous surfaces without mechanical action - Test method and requirements (phase 2, step 2) WI 216 CEN/TC216 /WG2 N 176.
- ARNDT, J. (1983):** Desinfektion und Sterilisation in der tierärztlichen Praxis. Der prakt. Tierarzt, 64:395-401.

- ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR) (1981):** Recueil de normes françaises des antiseptiques et désinfectants édition bilingue antiseptics et désinfectants 1 re édition par l' AFNOR, Paris – La Défense, 1981
- ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION (AFNOR) (1989):** Recueil de normes françaises des antiseptiques et désinfectants versions anglaise et française 2. re édition par l' AFNOR, Paris – La Défense, 1989.
- BANSEMIR, K., MOROZEK, H., PUDERBACH, H. (1975):** Oberflächenfeinstruktur und Keimverteilung bei verschiedenen Materialien Hospital – Hyg., Gesundheitswesen und Desinfektion 12:434 – 442.
- BECK, E. G., BORNEFF, J., GRÜN, L., GUNDERMANN, K.-O., KANZ, E., LAMMERS, TH., MÜHLENS, K., PRIMAVESI, C. A., SCHMIDT, B., SCHUBERT, R., WEINHOLD, E. U. H.-P. WERNER (1977):** Empfehlungen für die Prüfung und Bewertung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsverfahren Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 165:335-380.
- BELLAMY, K. (1995):** A review of the Test methods used to establish virucidal activity. J. Hosp. Infect., 30:389-396.
- BESSEMS, E. (2003):** Desinfektionsmittel für die Lebensmittel- und Veterinärhygiene. 1. Auflage, BEHRS VERLAG, Hamburg
- BEST, M., SATTAR, S. A., SPRINGTHORPE, V. S. (1994):** Feasibility of a combined carrier test for disinfectants: Studies with a mixture of five types of microorganisms. Am. J. Infect. Control. 22:152-162.
- BINGEL, K. F., ENGELHARDT, H. (1953a):** Experimentelle Studien zur Expositionsprophylaxe der Poliomyelitis. Z. Hyg. Infektionskr. 138:101-107.

- BINGEL, K. F., ENGELHARDT, H. (1953b):** Möglichkeiten und Aussichten einer Expositionsprophylaxe bei der Poliomyelitis. Klein. Wochenschr. 31:683-686.
- BÖHM, R. (1987):** Organische Säuren als Desinfektionsmittel. Fleischwirtschaft, 66:976-979.
- BÖHM, R. (1996/2001):** Persönliche Kommunikation.
- BÖHM, R. (2002):** Grundlagen der Reinigung und Desinfektion. In: Strauch, D. und R. Böhm: Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft. 2. Aufl., Enke Verlag, 19-63.
- BORNEFF, M. (1977):** Entwicklung einer neuen Prüfmethode für Flächendesinfektionsmittel. II. Mitteilung: Vergleichsversuche mit der Abdruck- und Abspülmethode. Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. B 165:11- 19.
- BREMER, P. (2003):** Untersuchungen zur viruziden Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln bei verschiedenen Temperaturen. Vet. Med. Diss., Giessen.
- BROWN, TT Jr. (1981):** Laboratory evaluation of selected disinfectants as virucidal agents against porcine parvovirus, pseudorabies virus and transmissible gastroenteritis virus. Am. J. Vet. Res.; 42:1033-1036.
- BUEREN, VAN J. (1995):** Methodology for HIV disinfectant testing. Journal of Hospital Infection (Suppl.) 30:383-388.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE (DGHM) (1958):** Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel. Zbl Bakt Abt I Orig. 173:307-17.
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE (DGHM) (1984):** Prüfung und Bewertung chemischer Desinfektionsverfahren- Anforderungen

für die Aufnahme in die VII. Liste (Stand vom 1.2.1984) Sonderdruck, mhp-Verlag, Mainz.

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT e.V. (DVG) (1990): 7. Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung (Handelspräparate) (Stand: 1. Oktober 1990) Dtsch. Tierärztebl. 38:725-732.

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT e.V. (DVG) (1988/2000): Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel in der Veterinärmedizin. 2. und 3. Auflage, DVG, Giessen.

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT e.V. (DVG) (2003a): 12. Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung (Handelspräparate) (Stand: 1. Mai 2003).

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT e.V. (DVG) (2003b): 6. Liste der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für den Lebensmittelbereich (Handelspräparate) (Stand: 1. Juli 2003).

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT e.V. (DVG) (2007): 4. überarbeitete Auflage 2007. Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln. DVG, Giessen.

DIN-Taschenbuch 169 (1988): Sterilisation, Desinfektion, Sterilgutversorgung: Normen. 2. Auflage, Beuth Verlag, Berlin, Köln.

EDELMEYER, H. (1982): Über Eigenschaften, Wirkmechanismen und Wirkungen chemischer Desinfektionsmittel. Arch. f. Lebensmittelhyg., 33:1-11.

- EGGENSPERGER, H. (1973):** Desinfektionswirkstoffe und ihre Wirkungsmechanismen. Dtsch. Apoth.Ztg., 113:785-791.
- FLEMMING, H.-C. (1984):** Die Peressigsäure als Desinfektionsmittel. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie u. Hygiene, I. Abteilung, Originale B 179:97-111.
- GILDEMEISTER, E., HAILER, E., HEUER, G. (1930):** Das Verhalten des Vakzinevirus gegenüber keimtötenden Stoffen. Arch. Lebensmittelhyg. 10, Sonderdruck.
- GRAFE, A., HAUSSMANN, H. G. (1956):** Desinfektion des Influenza-, Mumps- und Newcastle- Virus im adsorbierenden Medium. Z. Hyg. Infektionskr. 143:304-318.
- GRANZO, H. In: WIESNER, E., RIBBECK, R. (Hrsg) (2000):** Lexikon der Veterinärmedizin. Stuttgart: Enke im Hippokrates Verlag GmbH.
- GREUFEL, E. (1963):** Die Beurteilung viruswirksamer Desinfektionsmittel im Keimträgerversuch unter Verwendung der Viruskultur im exembryonierten Ei. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 76:161-165.
- GRÖSCHEL, D. H. M. (1991):** Disinfectant testing in the USA. J Hosp Infect, Suppl. A 18:274-279.
- HANEKE, M. (1991):** Wirksamkeitsprüfungen von Desinfektionsmittel für den Lebensmittelbereich mittels eines quantitativen Keimträgerversuchs sowie vergleichende Untersuchungen zu Prüfmethode für chemische Desinfektionsmittel. Vet. Med. Diss., FU Berlin.
- HARMS, FR. (1963):** Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegenüber dem Tollwutvirus. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 76:425- 427.

- HENNEMANN, E. (1968):** Experimentelle Untersuchungen über die Tenazität von Adenovirus des Schweines. Vet. Med. Diss., LMU München.
- HERBST, W., NOACK, M., WEKERLE, J., STRAUCH, D. (1990):** Zur Wahl der Testvirren bei der Prüfung chemischer Desinfektionsmittel in der Veterinärmedizin. 3. Hohenheimer Seminar, 338-345.
- HERBST, W., STRAUCH, D. (1991):** Zur Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels auf Basis organischer Säuren gegenüber Parvovirus. Kleintierpraxis 189-192.
- HINGST, V., WURSTER, C., SONNTAG, H.-G. (1990):** A Quantitative test method for the examination of antimycobacterial disinfection procedures. Zbl. Hyg. 190: 127-140.
- HORN, H., PRIVORA, M., WEUFFEN, W. (Hrsg.) (1974):** Handbuch der Desinfektion und Sterilisation. Bd. 1 Grundlagen der Desinfektion. 9, Berlin, Verlag Volk und Gesundheit.
- HORN, I. M. (1996):** Die chemische Desinfektion des Influenzavirus unter besonderer Berücksichtigung der in der DDR gebräuchlichen Desinfektionsmittel. Z. Gesamte. Hyg. 6:643-659.
- HORZINEK, M. C. (1985):** Kompendium der allgemeinen Virologie. 2. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.
- HUNSINGER, B. (2005):** Untersuchungen über die Auswirkungen der zukünftigen Europäischen Desinfektionsmittelprüfung auf die Zulassung von Desinfektionsmitteln für die Tierseuchendesinfektion im Vergleich zu bisherigen Prüfungen nach den Richtlinien der DVG. Vet. Med. Diss., FU Berlin.
- JEFFREY, D. J. (1995):** Chemicals used as disinfectants: active ingredients and enhancing additives. Rev. Sci. Tech. 14:54-57.

- JENTSCH, G. (1978):** Pharmazie, Pharmakologie der Desinfektionswirkstoffe 9. Wirkstoffgruppe: Perverbindungen. Hyg.und Med. 3:125-127.
- KÄRBER, G. (1931):** Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie. 162:480-483.
- KENNEDY, MA., MELLON, VS., CALDWELL, G., POTGIETER, LN. (1995):** Virucidal efficacy of the newer quaternary ammonium compounds. J. Am. Anim. Hosp. Assoc.; 31: 254-258.
- KIRCHHOFF, H. (1968):** Die Wirkung quaternärer Ammoniumverbindungen auf das Newcastle Disease- Virus und das Parainfluenza- Virus. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 75:160- 165.
- KIRCHHOFF, H. (1969):** Probleme der Virusdesinfektion am praktischen Beispiel des Newcastle Disease Virus. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 76:71-74.
- KLEINER, U., TRENNER, P. (1988):** Methodische Probleme bei der bakteriologischen Laborprüfung von Desinfektionsmitteln zur Flächendesinfektion in der Veterinärmedizin. Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. B 186:138-152.
- KÖHLER, C. (2006):** Untersuchungen zur Änderung der DVG-Desinfektionsmittelrichtlinien (Viruzidie). Vet. Med. Diss., Leipzig.
- KOCH, R. (1881):** Ueber Desinfektion Mittheilung aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamt 1:234-282.
- KOCH, R. (1912):** Die Bekämpfung der Infektionskrankheiten, insbesondere der Kriegseuchen (1888). In: Schwalbe J, Gaffky G, Pfuhl E (Hrsg) Robert Koch: Gesammelte Werke, B 2.1. Thieme, Leipzig, S 277.

- LÄCHELE, R. (1990):** Untersuchungen über die bakterizide Wirkung einiger Stalldesinfektionsmittel im Suspensionsversuch und praxisnahen Sprühdesinfektionsmodell unter Berücksichtigung der Faktoren Temperatur und Wasserhärte. Vet. Diss., Ludwig-Maximilians-Universität München.
- LERNER, AM., CHERRY, JD., KLEIN, JO., FINLAND, M. (1962):** Infection with reoviruses. N Engl J. Med. 267:947-52.
- LIEBERMANN, H. (1992):** Lehrbuch der Veterinärmedizinischen Virologie. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- LIESS, B., KAADEN, O. R. (2003):** Virusinfektionen bei Haustieren, Haussäugetiere, Fische für Studium und Praxis. 2. Aufl., Vet. Kolleg Schlütersche.
- MAHNEL, H., HERLYN, M. (1976):** Stabilität von Teschen-, HCC-, ND- und Vacciniavirus gegenüber 5 Desinfektionswirkstoffen. ZBL. Vet. Med. B, 23:403-411.
- MAHNEL, H., KUNZ, W. (1976):** Eignung von Keimträgern zur Prüfung von Desinfektionsmitteln gegenüber Virusarten. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 89:138-142 und 149-152.
- MAHNEL, H. (1983):** Desinfektion von Viren. Zentralbl. Veterinarmed. B 30:81-96.
- MAHNEL, H. (1987):** Experimentelle Ergebnisse über die Stabilität von Pockenviren unter Labor- und Umweltbedingungen. Journal of Vet Medicine B 34:449-464.
- MATTSON, D. E. (1973):** Adenovirus infection in cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 163:894-896.
- MATSUURA, K., ISHIKURA, M., NAKAYAMA, T., HASEGAWA, S., MORITA, O., KATORI, K et al. (1993):** Ecological studies on reovirus pollution of rivers in To-

yama Prefecture. II Molecular epidemiological of reoviruses isolated from river water. *Microbiol. Immunol.* 37:305-10.

MCDUFF, C. R., GAUSTAD, J. W. (1976): Test method for determination of virucidal efficacy of liquid surface disinfectants. *Journal of the AOAC* 59:1150-1156.

McGAVIN, D. (1987): Inactivation of canine parvovirus by disinfectants and heat. *J. Sm. Anim. Pract.*; 28:523-535.

MODROW, S., FALKE, D. (1997): *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

MOHANTY, S. B., DUTTA, S. K. (1981): *Veterinary Virology*. Lea & Febiger, Philadelphia.

MOLDENHAUER, D. (1984): Quantitative Bewertung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren im Suspensionsversuch. *Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig. B*, 179:544-554.

MÜLLER, W., SCHLENKER, G. (2004): *Kompendium der Tierhygiene. Gesundheit-, Tier-, Umwelt- und Verbraucherschutz*. 2. Auflage, Lehmanns Media LOB.de, Berlin.

NASSER Z. ELERAKY., LEON N.D. POTGIETERE., MELISSA A. KENNEDY (2002): Virucidal Efficacy of Four New Disinfectants. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc*; 38:231-234.

NEUMANN, W. (1971): Vergleichende Untersuchungen über den viruziden Effekt des Desinfektionsmittels TEGO 51 V. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 84:48-50.

- RASCHLE, P. (1988):** Die Beurteilung von Desinfektionsmitteln zur Anwendung in Lebensmittelbetrieben in der Schweiz Prinzipien der anerkannten Prüfmethode. Schriftenreihe Schweiz. Gesellschaft für Lebensmittelhyg. (SGLH), Heft 18, S. 45-64, Eigenverlag SGLH, CH-Schwerzenbach.
- REBER, H. (1973):** Desinfektion: Vorschlag für eine Definition. Zentralbl. Bakteriologie, I. Abteilung, Originale B 157:421-438.
- REYBROUCK, G. (1986):** Uniformierung der Prüfung von Desinfektionsmitteln in Europa. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, 182:485-498
- REUTER, G. (1976):** Problematik und Aussagekraft der empfohlenen Prüfmethode für Desinfektionsmittel im Lebensmittelbereich. In: 18. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V (DVG) vom 14. -17. 9. 1976, Garmisch- Partenkirchen, 91-99.
- REUTER, G. (1978):** Anforderungen und Prüfungen für Desinfektionsmittel im Lebensmittelbereich. Arch. Lebensmittelhyg. 29:84-91.
- REUTER, G. (1988):** Anforderungen an Desinfektionsmittel für den Lebensmittelbereich 1. Liste geprüfter Desinfektionsmittel der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG). Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 101:194-199.
- REUTER, G. (1989):** Anforderungen an die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln für den lebensmittelverarbeitenden Bereich. Zbl. Bakt. Hyg. B 187:564-577.
- ROLLE- MAYER. (2002):** Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Auflage. Enke Verlag. Stuttgart.
- RUDOLPH, A.S., LEVINE, M. (1941):** Factors affecting the germicidal efficiency of hypochlorite solutions. Iowa Eng. Exp. Sta. Bull., 150.

- SATTAR, S. A., RAPHAEL, R. A., LOCHNAN, H., SPRINGTHORPE, V. S. (1983):** Rotavirus inactivation by chemical disinfectants and antiseptics used in hospitals. *Canadian Journal of Microbiology* 29:1464-1469.
- SCHLIESSER, T. (1974):** Zum Problem der Stalldesinfektion. *Tierärztliche Praxis* 2:1-8
- SCHLIESSER, T. (1975):** Tierarzt und Desinfektion. *Tierärztliche Umschau* 30:319-324.
- SCHLIESSER, T., WIEST, J.M. (1979):** Zur Temperaturabhängigkeit der bakteriziden Wirkung einiger chemischer Desinfektionsmittel. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B*, 196:560-566.
- SCHLIESSER, T., STRAUCH, D. (1981):** Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft. Enke Verlag, Stuttgart.
- SCHMIDTHOFER, TH., DIETERICH, W., RAJMON, T. (1972):** Ein Beitrag zur Prüfung und Bewertung von Desinfektionsmitteln. *Arch. Lebensmittelhyg.* 23:51-55.
- SCHWAB, H. (1988):** Die Beurteilung von Desinfektionsmitteln zur Anwendung in Lebensmittelbetrieben in der Schweiz. Der administrative Ablauf der Prüfung. *Schriftreihe Schweiz. Gesellschaft für Lebensmittelhyg. (SGLH), Heft 18*:65-74, Eigenverlag SGLH, CH-Schwerzenbach.
- SCHWARTZBROD, L., FINANCE, C., AYMARD, M., BRIGAUD, M., LUCENA, F. (1985):** Recovery of reoviruses from tap water. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene [B]*. 181:383-9.
- SCOTT, FW. (1980):** Virucidal disinfectants and feline viruses. *Am. J. Vet. Res.*; 41:410-413.
- SLAVIN, G. (1973):** A reproducible surface contamination method for disinfectant tests. *British Veterinary Journal* 129:13-18.

- SOULIER, R. (2005):** Vergleichende Untersuchungen zur Verbesserung der Methodik von Viruzidie-Prüfungen chemischer Desinfektionsmittel für den Bereich der Tierhaltung in der Veterinärmedizin. Vet. Med. Diss., Giessen.
- SPEARMAN, C. (1908):** The method of „right and wrong cases“ („constant stimuli“) without Gauss's formulae. Brit. J. Psychol. 2:227-242.
- SPICHER, G. (1970):** Desinfektionsmittel und Desinfektionsverfahren unter besonderer Berücksichtigung der Faktoren, die ihre Wirksamkeit und Brauchbarkeit beeinflussen. Pathology and Microbiology 36:259-276.
- SPICHER, G., PETERS, J. (1976):** Resistenz mikrobieller Keime gegenüber Formaldehyd. Zentralbl. Bakteriol., 1. Abteilung, Originale B 163:486-508.
- SPICHER, G., PETERS, J. (1979):** Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln an Oberflächen in Modellversuchen. II.Mitt.: Abhängigkeit der Versuchsergebnisse von der Methodik der Desinfektion (Sprühen, Verteilen, Wischen). Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, 170:431-448.
- SPICHER, G., PETERS, J. (1997):** Wirksamkeitsprüfung von Flächendesinfektionsmitteln. Hyg. und Med. 22:124-139.
- SPORKENBACH-HÖFFLER, J., WEIGERS, K.J., DERNIECK, R. (1983):** Untersuchung zum Mechanismus der Virusinaktivierung durch Persäuren. Zbl. Bakt. Hyg, I. Abt. Orig. B, 177:469.
- SPRINGTHORPE, VS., GRENIER, JL., LLOYD-EVANS, N., SATTAR, SA. (1986):** Chemical disinfection of human rotaviruses: efficacy of commercially available products in suspension tests. J. Hyg. 97:139-161.
- SPROCKHOFF, H. V., MARSCHALL, H. J. (1984):** Zur Tenazität viraler Krankheitserreger- eine Literaturstudie. Dtsch. Tierärztliche. Wschr. 91:215- 218.

- SPRÖSSIG, M. (1979):** Anwendungsmöglichkeiten der Peressigsäure für die Desinfektion und Sterilisation. Hyg.und Med. 4:294-299.
- STANLEY, NF. (1967):** Reoviruses. Br. Med. Bull. 23:150-4.
- STEIGER, A. (1986):** Desinfektion. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- STELLMACHER, W., SCHWEBS, M. (1969):** Keimträgerversuche zur Desinfektion am Beispiel Newcastle disease-Virus. Monatshefte für Veterinärmedizin 27:381-385.
- STELLMACHER, W., SCHWEBS, M., SOMNITZ, M. (1973):** Einwirkungen verschiedener Temperaturen auf Desinfektionsmittellösungen. Arch. exper. Vet. med., 27:341-347.
- STEUER, W., LUTZ-DETTINGER, U. (1983):** Leitfaden der Desinfektion, Sterilisation und Entwesung. Fischer Verlag, Stuttgart.
- STEUER, W., LUTZ-DETTINGER, U. (1990):** Leitfaden der Desinfektion, Sterilisation und Entwesung. 6. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- STRAUCH, D., BÖHM, R., PHILLIP, W., WECKERLE, J. (1987):** Zum Stand der Stall-Dung- und Gülledesinfektion, Teil 1. Tierärztl. Umschau, 42:94-102.
- STRAUCH, D., BÖHM, R. (2002):** Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft, 2. Aufl. S. 20, Stuttgart, Enke.
- TAI, JH., WILLIAMS, JV., EDWARDS, KM., WRIGHT, PF., CROWE, JE. JR., DERMO-DY, TS. (2005):** Prevalence of reovirus-specific antibodies in young children in Nashville, Tennessee. J. Infect. Dis. 191:1221-4.

- TAYLOR, M. W., CORDELL- STEWART B, R. SU., MORGAN, S., CRISP, M., HODES, M. E. (1974):** Bovine enterovirus- 1: Characterisation, replication and cytopathogenic effects. *Journal of General Virology* 23:173-178.
- THIEL, N. (1977a):** Zur Bedeutung der Temperatur bei der Desinfektion. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 84:356-364.
- THIEL, N. (1977b):** Zum Einfluss von Stallklimafaktoren auf die Desinfektion. *Tierärztl. Umschau* 4:200-204
- THIEL, N. (1977c):** Zur Bedeutung physikalischer Lufteigenschaften im Rahmen von Desinfektionsmassnahmen. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 84:190-197.
- TRAUTWEIN, K., KRÜGER, G. (1977):** Desinfektion in der Veterinärhygienetheorie und Praxis. *Tierarzt 1. Umschau*, 32:3-12, 60-74, 124-132.
- VAN KLINGEREN, B. (1982):** Standard-suspension-test: influence of bovine albumin, saline and water of standard hardness on M.E.-values. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 1. Abt. Orig. B 176:63-71.
- WALLHÄUSSER, K. H. (1984):** Praxis der Sterilisation – Desinfektion – Konservierung – Keimidentifizierung - Betriebshygiene. Thieme Verlag, Stuttgart, Newyork.
- WALLHÄUSSER, K. H. (1988):** Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Konservierung. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- WEINHOLD, E., KÖHLER, A. (1971):** Versuche am Newcastle disease-Virus zur Erstellung eines Prüfungsschemas für viruzid wirkende chemische Desinfektionsmittel. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, 72:27-32.

- WEINHOLD, E., KÖHLER, A. (1972):** Versuche am Newcastle Disease-Virus zur Erstellung eines Prüfungsschemas für viruzid wirkende chemische Desinfektionsmittel. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 85:27-32.
- WEINHOLD, E. (1973):** Bedeutung von Viren in Lebensmitteln vom Tier. Arch. Lebensmittelhyg., 237 – 243.
- WELLINGER, A. (1983):** Umfrage über den Einsatz von Stalldesinfektionsmitteln in der Schweinehaltung. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 125:545-552.
- WERNER, H. -P. (1989):** Test methods for disinfectants in the human medical field - Registration and approval by the "DGHM" In: Symposium Europeen Fougères 26 et 27 Septembre 1989 "Les Desinfectants", Eigenverlag des Centre National d Etudes Veterinaires et Alimentaires (CNEVA) - Laboratoire des Medicaments Veterinaires, Fougères, 83-89.
- WEUFFEN, W., PRIVORA, M. (1972):** Krankheitserreger in der Umwelt des Menschen – die Bedeutung der Desinfektion. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin.
- WEUFFEN, W., TIRSCHMANN, W. (1973):** Zur Anwendung der Prinzipien des antimikrobiellen Regimes in der Nahrungsgüterwirtschaft. Mh. Vet.-med. 241-245.
- WEUFFEN, H.P., REYBROUCK, G. (1976):** Zur Wertbestimmung von Desinfektionsmitteln in Europa. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Ref. Bd. 250:97-117.
- WILDBRETT, G. (Hrsg.) (2006):** Reinigung und Desinfektion in der Lebensmittelindustrie. BEHRS VERLAG. 2. Auflage, Hamburg.
- WILLINGER, H., THIEMANN, G. (1972):** Kritische Beurteilung der Desinfektionswirkstoffe im veterinärhygienischen Bereich. Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt., Originale B 156:145- 156.

8 Anhang

Tabelle 14: Tenazität des ECBO-Virus gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln im Suspensionsversuch

Chemische Wirkstoffe	Konzentration des DM [%]	Eiweißbelastung 2%*	Viruskontrolle [\log_{10} KID ₅₀ /ml]	Infektiositätstiter in \log_{10} KID ₅₀ /ml der Reaktionsgemische nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
				15	30	60	120
Formaldehyd	0,25	ohne	6,75	6,5	6,0	5,25	≤ 3,5
	0,25	mit	7,0	6,0	5,5	4,75	4,5
	0,50	ohne	6,75	5,75	5,0	4,25	≤ 3,5
	0,50	mit	7,0	6,25	5,0	4,0	3,75
	1,0	ohne	6,75	5,5	4,5	4,0	≤ 3,5
	1,0	mit	7,0	5,0	4,75	3,5	≤ 3,5
Ameisensäure	0,5	ohne	6,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,5	mit	6,25	5,75	6,0	4,75	4,25
	1,0	ohne	6,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	mit	6,25	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	2,0	ohne	6,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	2,0	mit	6,25	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
Peressigsäure	0,01	ohne	6,5	2,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,01	mit	6,5	6,5	6,5	6,0	6,0
	0,05	ohne	6,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	0,05	mit	6,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	0,1	ohne	6,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	0,1	mit	6,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
Natriumhypochlorit	0,25	ohne	6,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,25	mit	6,5	5,75	5,75	5,0	5,0
	0,50	ohne	6,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,50	mit	6,5	5,25	5,5	4,25	4,5
	1,0	ohne	6,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	mit	6,5	4,75	4,0	≤ 2,5	≤ 2,5

* 1% Hefeextrakt + 1% Bovines Serumalbumin

Tabelle 15: Tenazität des Reovirus gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln im Suspensionsversuch

Chemische Wirkstoffe	Konzentration des DM [%]	Eiweißbelastung 2%*	Viruskontrolle [\log_{10} KID ₅₀ /ml]	Infektiositätstiter in \log_{10} KID ₅₀ /ml der Reaktionsgemische nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
				15	30	60	120
Formaldehyd	0,25	ohne	6,5	6,5	5,5	5,25	4,0
	0,25	mit	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
	0,50	ohne	6,5	6,5	5,5	4,0	≤ 3,5
	0,50	mit	6,5	6,75	6,25	6,25	6,25
	1,0	ohne	6,5	5,5	5,0	3,75	≤ 3,5
	1,0	mit	6,5	6,5	6,25	5,5	5,25
Ameisensäure	0,5	ohne	7,0	6,75	6,5	6,5	6,5
	0,5	mit	7,25	7,0	7,0	6,75	6,75
	1,0	ohne	7,0	6,25	6,25	6,0	6,25
	1,0	mit	7,25	7,0	6,75	6,75	6,5
	2,0	ohne	7,0	6,0	6,0	5,75	5,5
	2,0	mit	7,25	7,25	7,5	6,75	6,5
Peressigsäure	0,01	ohne	7,5	7,25	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,01	mit	7,5	7,5	7,5	7,25	7,5
	0,05	ohne	7,5	6,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,05	mit	7,5	7,5	7,25	7,5	7,5
	0,1	ohne	7,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	0,1	mit	7,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
Natriumhypochlorit	0,25	ohne	6,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,25	mit	6,75	4,75	4,75	4,5	4,25
	0,50	ohne	6,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	0,50	mit	6,75	4,25	3,5	2,75	2,75
	1,0	ohne	6,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	mit	6,75	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5

Legende siehe Tabelle 14

Tabelle 16: Tenazität des Bovinen Parvovirus gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln im Suspensionsversuch

Chemische Wirkstoffe	Konzentration des DM [%]	Eiweißbelastung 2%*	Viruskontrolle [\log_{10} KID ₅₀ /ml]	Infektiositätstiter in \log_{10} KID ₅₀ /ml der Reaktionsgemische nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
				15	30	60	120
Formaldehyd	0,25	ohne	7,25	7,0	6,75	6,25	6,25
	0,25	mit	7,25	6,75	6,25	6,25	6,0
	0,50	ohne	7,25	7,0	6,5	6,25	6,0
	0,50	mit	7,25	6,25	6,5	6,0	5,75
	1,0	ohne	7,25	6,5	5,75	5,75	5,50
	1,0	mit	7,25	6,5	6,25	6,0	5,75
Ameisensäure	0,5	ohne	5,5	5,5	5,5	5,0	5,0
	0,5	mit	5,5	5,5	5,5	5,25	5,25
	1,0	ohne	5,5	4,5	4,5	4,25	4,5
	1,0	mit	5,5	4,5	4,5	4,5	4,5
	2,0	ohne	5,5	4,5	4,25	4,25	4,25
	2,0	mit	5,5	4,5	4,25	4,25	4,25
Peressigsäure	0,01	ohne	5,5	5,5	5,25	4,75	4,75
	0,01	mit	5,5	5,5	5,50	5,5	5,5
	0,05	ohne	5,5	4,75	4,0	3,5	3,25
	0,05	mit	5,5	5,0	4,5	4,5	4,25
	0,1	ohne	5,5	3,75	3,5	2,5	≤ 1,5
	0,1	mit	5,5	4,5	4,0	4,0	3,25
Natriumhypochlorit	0,25	ohne	5,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,25	mit	5,75	5,75	5,75	5,5	5,25
	0,50	ohne	5,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,50	mit	5,75	5,25	5,25	5,25	5,25
	1,0	ohne	5,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	1,0	mit	5,75	5,25	5,25	5,25	5,25

Legende siehe Tabelle 14

Tabelle 17: Tenazität des Fe Calicivirus gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln im Suspensionsversuch

Chemische Wirkstoffe	Konzentration des DM [%]	Eiweißbelastung 2%*	Viruskontrolle [\log_{10} KID ₅₀ /ml]	Infektiositätstiter in \log_{10} KID ₅₀ /ml der Reaktionsgemische nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
				15	30	60	120
Formaldehyd	0,25	ohne	8,5	6,5	6,25	6,25	4,75
	0,25	mit	8,5	7,5	7,25	6,75	6,5
	0,50	ohne	8,5	6,25	5,75	4,5	4,5
	0,50	mit	8,5	7,0	6,5	5,5	4,5
	1,0	ohne	8,5	5,25	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5
	1,0	mit	8,5	6,25	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5
Ameisensäure	0,5	ohne	8,75	5,5	4,75	3,75	3,5
	0,5	mit	8,75	6,75	7,0	6,5	5,5
	1,0	ohne	8,75	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	mit	8,75	3,5	2,75	≤ 2,5	≤ 2,5
	2,0	ohne	8,75	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	2,0	mit	8,75	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
Peressigsäure	0,01	ohne	9,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,01	mit	9,5	9,5	9,25	9,0	7,5
	0,05	ohne	9,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	0,05	mit	9,5	3,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	0,1	ohne	9,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	0,1	mit	9,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
Natriumhypochlorit	0,25	ohne	8,25	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,25	mit	9,25	4,25	2,75	2,5	2,5
	0,50	ohne	8,25	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	0,50	mit	9,25	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	ohne	8,25	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	mit	9,25	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5

Legende siehe Tabelle 14

Tabelle 18: Tenazität des EAV gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln im Suspensionsversuch

Chemische Wirkstoffe	Konzentration des DM [%]	Eiweißbelastung 2%*	Viruskontrolle [\log_{10} KID ₅₀ /ml]	Infektiositätstiter in \log_{10} KID ₅₀ /ml der Reaktionsgemische nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
				5	15	30	60
Formaldehyd	0,25	ohne	8,0	8,0	7,75	7,5	6,75
	0,25	mit	7,75	7,75	7,5	7,5	7,5
	0,50	ohne	8,0	7,5	7,5	7,25	6,25
	0,50	mit	7,75	7,75	7,25	6,75	6,25
	1,0	ohne	8,0	7,25	6,75	6,25	5,5
	1,0	mit	7,75	7,0	6,5	6,5	6,0
Ameisensäure	0,1	ohne	8,5	7,5	6,75	7,0	6,5
	0,1	mit	8,5	7,75	7,5	7,5	7,5
	0,5	ohne	8,5	6,0	6,25	5,5	4,25
	0,5	mit	8,5	7,25	7,5	7,0	6,25
	1,0	ohne	8,5	5,25	4,5	4,0	3,0
	1,0	mit	8,5	6,75	6,25	5,5	5,25
Peressigsäure	0,005	ohne	8,0	3,25	3,5	3,5	≤ 1,5
	0,005	mit	7,75	7,25	7,5	7,25	7,25
	0,01	ohne	8,0	2,5	2,0	2,0	1,75
	0,01	mit	7,75	6,75	7,0	7,0	6,5
	0,05	ohne	8,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,05	mit	7,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
Natriumhypochlorit	0,1	ohne	7,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,1	mit	8,0	6,5	5,75	5,5	5,5
	0,5	ohne	7,75	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	0,5	mit	8,0	4,0	2,75	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	ohne	7,75	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	mit	8,0	2,75	2,75	≤ 2,5	≤ 2,5

Legende siehe Tabelle 14

Tabelle 19: Tenazität des Newcastle Disease Virus gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln im Suspensionsversuch

Chemische Wirkstoffe	Konzentration des DM [%]	Eiweißbelastung 2%*	Viruskontrolle [\log_{10} KID ₅₀ /ml]	Infektiositätstiter in \log_{10} KID ₅₀ /ml der Reaktionsgemische nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
				5	15	30	60
Formaldehyd	0,25	ohne	6,5	6,5	5,0	≤ 3,5	≤ 3,5
	0,25	mit	6,5	6,5	6,0	4,5	4,0
	0,50	ohne	6,5	5,5	4,0	≤ 3,5	≤ 3,5
	0,50	mit	6,5	6,0	4,5	≤ 3,5	≤ 3,5
	1,0	ohne	6,5	5,0	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5
	1,0	mit	6,5	5,0	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5
Ameisensäure	0,1	ohne	6,75	6,75	6,75	6,5	6,75
	0,1	mit	7,0	7,25	7,0	7,0	6,75
	0,5	ohne	6,75	4,5	3,0	2,5	1,5
	0,5	mit	7,0	6,25	6,0	5,75	5,75
	1,0	ohne	6,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	1,0	mit	7,0	4,0	3,5	2,75	2,5
Peressigsäure	0,005	ohne	6,75	4,5	3,0	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,005	mit	7,0	7,25	7,0	7,0	7,0
	0,01	ohne	6,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,01	mit	7,0	5,0	5,0	5,0	4,75
	0,05	ohne	6,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,05	mit	7,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
Natriumhypochlorit	0,1	ohne	6,75	3,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,1	mit	7,0	7,0	7,0	6,5	6,5
	0,5	ohne	6,75	3,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,5	mit	7,0	3,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	1,0	ohne	6,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	1,0	mit	7,0	2,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5

Legende siehe Tabelle 14

Tabelle 20: Tenazität des Bovinen Herpesvirus Typ 1 gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln im Suspensionsversuch

Chemische Wirkstoffe	Konzentration des DM [%]	Eiweißbelastung 2%*	Viruskontrolle [\log_{10} KID ₅₀ /ml]	Infektiositätstiter in \log_{10} KID ₅₀ /ml der Reaktionsgemische nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
				5	15	30	60
Formaldehyd	0,25	ohne	6,5	5,75	4,0	≤ 3,5	≤ 3,5
	0,25	mit	6,5	6,5	5,5	4,5	4,25
	0,50	ohne	6,5	4,75	4,25	≤ 3,5	≤ 3,5
	0,50	mit	6,5	4,75	4,5	≤ 3,5	≤ 3,5
	1,0	ohne	6,5	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5
	1,0	mit	6,5	4,75	≤ 4,5	≤ 4,5	≤ 4,5
Ameisensäure	0,1	ohne	7,25	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,1	mit	7,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,5	ohne	7,25	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,5	mit	7,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	1,0	ohne	7,25	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	mit	7,0	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
Peressigsäure	0,005	ohne	7,0	4,50	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,005	mit	7,25	6,50	6,25	6,75	6,75
	0,01	ohne	7,0	1,75	≤ 1,5	1,75	≤ 1,5
	0,01	mit	7,25	6,50	6,75	6,50	6,50
	0,05	ohne	7,0	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	0,05	mit	7,25	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
Natriumhypochlorit	0,1	ohne	6,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,1	mit	6,75	5,0	4,5	3,75	3,75
	0,5	ohne	6,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,5	mit	6,75	2,25	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	1,0	ohne	6,75	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	mit	6,75	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5

Legende siehe Tabelle 14

Tabelle 21: Tenazität des Vacciniavirus gegenüber verschiedenen Desinfektionsmitteln im Suspensionsversuch

Chemische Wirkstoffe	Konzentration des DM [%]	Eiweißbelastung 2%*	Viruskontrolle [\log_{10} KID ₅₀ /ml]	Infektiositätstiter in \log_{10} KID ₅₀ /ml der Reaktionsgemische nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
				5	15	30	60
Formaldehyd	0,25	ohne	7,0	6,75	6,0	5,5	3,75
	0,25	mit	7,25	6,25	6,25	6,0	5,25
	0,50	ohne	7,0	5,5	5,5	3,75	≤ 3,5
	0,50	mit	7,25	5,5	5,5	4,5	≤ 3,5
	1,0	ohne	7,0	4,0	4,0	≤ 3,5	≤ 3,5
	1,0	mit	7,25	4,5	4,5	≤ 3,5	≤ 3,5
Ameisensäure	0,1	ohne	6,75	5,5	3,0	2,75	1,75
	0,1	mit	7,0	7,0	7,25	7,0	7,0
	0,5	ohne	6,75	4,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,5	mit	7,0	4,25	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	1,0	ohne	6,75	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	mit	7,0	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
Peressigsäure	0,005	ohne	7,0	6,5	6,0	1,75	≤ 1,5
	0,005	mit	7,0	6,75	7,0	5,5	5,50
	0,01	ohne	7,0	4,50	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,01	mit	7,0	5,25	5,5	4,5	4,5
	0,05	ohne	7,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,05	mit	7,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
Natriumhypochlorit	0,1	ohne	6,75	3,25	2,25	≤ 1,5	≤ 1,5
	0,1	mit	7,25	3,0	2,75	1,75	≤ 1,5
	0,5	ohne	6,75	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	0,5	mit	7,25	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	ohne	6,75	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5
	1,0	mit	7,25	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5	≤ 2,5

Legende siehe Tabelle 14

Tabelle 22: Infektiositätsverluste des in Wasser standardisierte Härte (WSH) 0,1 ml suspendierten ECBO-Virus durch Trocknung bei Zimmertemperatur

Suspensionsmedium	Zeitpunkt	Infektiositätstiter [$\log_{10}KID_{50}/ml$]		Infektiositätsverlust*	
		Kontrolle	Trocknungsversuche Vers.-Nr.		
HW	V	6,75			
	E	6,75	1	5,75	1,00
			2	5,50	1,25
			3	5,50	1,25
			4	5,75	1,00
			5	5,75	1,00

* Differenzen in $\log_{10}KID_{50}$ zwischen den Titern der Kontrolle E und den Trocknungsansätzen

V Beginn der Trocknungszeit

E Ende der Trocknungszeit

Tabelle 23: Infektiositätsverluste des in Wasser standardisierte Härte (WSH) 0,2 und 0,3 ml suspendierten ECBO-Virus durch Trocknung bei Zimmertemperatur

Suspensionsmedium	Zeitpunkt	Infektiositätstiter [$\log_{10}KID_{50}/ml$]		Infektiositätsverlust*	
		Kontrolle	Trocknungsversuche Vers.-Nr.		
HW	V	6,75			
	E	6,25	1	5,00	1,25
			2	4,75	1,50

* Differenzen in $\log_{10}KID_{50}$ zwischen den Titern der Kontrolle E und den Trocknungsansätzen

V Beginn der Trocknungszeit

E Ende der Trocknungszeit

Tabelle 24: Infektiositätsverluste des ECBO-Virus durch Trocknung bei Zimmertemperatur in Abhängigkeit vom Gehalt an Hefeextrakt (HE) und bovinem Serumalbumin (BSA) im Suspensionsmedium

Eiweißzusatz zum Suspensionsmedium	Volumenanteil der Eiweißsuspension im Medium/ Ansatz	Zeitpunkt	Infektiositätstiter [$\log_{10}KID_{50}/ml$]			Infektiositätsverlust*
			Kontrolle	Trocknungsversuche		
				Vers.-Nr.		
ohne (Kontrollen)	90%	V	6,75			
		E	6,75	1	5,75	1,00
	75%	V	7,50			
		E	7,50	1	6,25	1,25
	50%	V	7,25			
		E	7,00	1	6,00	1,00
0,4 % HE + BSA	90 % A	V	7,00			
		E	6,75	1	6,00	0,75
				2	6,25	0,50
	3			6,25	0,50	
	75 % B	V	7,25			
		E	7,25	1	6,75	0,50
				2	6,50	0,75
	3			6,75	0,50	
	50 % C	V	7,25			
		E	7,25	1	7,00	0,25
				2	6,75	0,50
	3			6,75	0,50	

Legende siehe

Tabelle 25: Infektiositätsverluste des ECBO-Virus durch Trocknung bei Zimmertemperatur in Abhängigkeit von der Eiweißzusammensetzung des Suspensionsmedium

Eiweißzusatz zum Suspensionsmedium	Volumenanteil der Eiweißsuspension im Medium/ Ansatz	Zeitpunkt	Infektiositätstiter [$\log_{10}KID_{50}/ml$]			Infektiositätsverlust*
			Kontrolle	Trocknungsversuche		
				Vers.-Nr.		
ohne (Kontrollen)	50%	V	7,50			
		E	7,50	1	6,25	1,25
	50%	V	7,50			
		E	7,50	1	6,50	1,00
0,4 % HE + BSA	50 % A	V	7,25			
		E	7,25	1	6,75	0,50
				2	7,00	0,25
				3	6,75	0,50
1,0 % BSA	50 % B	V	7,25			
		E	7,50	1	7,00	0,50
				2	7,25	0,25
				3	7,00	0,50

Legende siehe

Tabelle 26: Elution des an die Träger aus V₂A-Stahl adsorbierten Testvirus durch Benetzung der Träger mit Wasser standardisierte Härte (WSH) und anschließender Behandlung mit dem Vortexer

Behandlung mit Vortexer [s]	Infektiositätstiter [$\log_{10}KID_{50}/Träger$]		Infektiositätsverlust*	
	Eluat	Kontrolle	[$\log_{10}KID_{50}$]	[%]
0	4,25	5,75	1,5	96,83
15	5,0	5,75	0,75	82,21
30	5,0	6,25	1,25	94,37
45	5,25	6,25	1,0	90,0
60	4,75	6,5	1,75	98,22
120	5,0	6,5	1,5	96,83

* Differenz der Titer der Kontrollen und der Elutionsversuche

Tabelle 27: Elution des an die Träger aus V₂A-Stahl adsorbierten Testvirus durch Benetzung der Träger mit Wasser standardisierte Härte (WSH) und anschließender Behandlung mit Ultraschall

Behandlung mit Ultraschall [s]	Infektiositätstiter [\log_{10} KID ₅₀ /Träger]		Infektiositätsverlust*	
	Eluat	Kontrolle	[\log_{10} KID ₅₀]	[%]
0	4,75	6,0	1,25	94,37
15	5,0	6,5	1,5	96,83
30	5,0	6,75	1,75	98,22
45	4,75	6,75	2,0	99,0
60	4,75	6,25	1,5	96,83
120	5,0	6,25	1,25	94,37

* Differenz der Titer der Kontrollen und der Elutionsversuche

Tabelle 28: Elution des an die Träger aus V₂A-Stahl adsorbierten Testvirus durch Benetzung der Träger mit Wasser standardisierte Härte (WSH) und anschließender Behandlung mit dem Vortexer gefolgt von Ultraschall

Behandlung mit Vortexer + Ultraschall [s]	Versuch	Infektiositätstiter [\log_{10} KID ₅₀ /Träger]		Infektiositätsverlust*	
		Eluat	Kontrolle	[\log_{10} KID ₅₀]	[%]
0	1	4,0	6,25	2,25	99,43
	2	3,0	6,0	3,0	99,9
15	1	5,0	6,5	1,5	96,83
	2	5,25	6,25	1,0	90,0
30	1	5,25	6,5	1,25	94,37
	2	4,75	6,5	1,75	98,22
45	1	5,0	6,5	1,5	96,83
	2	5,25	6,25	1,0	90,0
60	1	5,25	6,5	1,25	94,37
	2	5,0	6,0	1,0	90,0
120	1	5,0	6,5	1,5	96,83
	2	5,0	6,25	1,25	94,37

- Differenz der Titer der Kontrollen und der Elutionsversuche

Tabelle 29: Elution des Testvirus von den zum Abtupfern der V₂A-Stahlträger verwendeten Watteträgern durch Behandlung mit dem Vortexer

Behandlung mit Vortexer [s]	Infektiositätstiter [\log_{10} KID ₅₀ /Träger]		Infektiositätsverlust*	
	Eluat	Kontrolle	[\log_{10} KID ₅₀]	[%]
0	3,5	5,75	2,25	99,43
15	5,25	6,0	0,75	82,21
30	5,0	6,5	1,5	96,83
45	5,25	6,25	1,0	90,0
60	5,0	6,25	1,25	94,37
120	5,0	6,5	1,5	96,83

* Differenz der Titer der Kontrollen und der Elutionsversuche

Tabelle 30: Elution des Testvirus von den zum Abtupfern der V₂A-Stahlträger verwendeten Watteträgern durch Behandlung mit Ultraschall

Behandlung mit Ultraschall [s]	Infektiositätstiter [\log_{10} KID ₅₀ /Träger]		Infektiositätsverlust*	
	Eluat	Kontrolle	[\log_{10} KID ₅₀]	[%]
0	3,5	4,75	1,25	94,37
15	4,0	5,5	1,5	96,83
30	4,25	6,0	1,75	94,37
45	4,0	6,5	2,5	99,68
60	4,25	6,25	2,0	99,0
120	4,5	6,5	2,0	99,0

* Differenz der Titer der Kontrollen und der Elutionsversuche

Tabelle 31: Elution des Testvirus von den zum Abtupfern der V₂A-Stahlträger verwendeten Wattträgern durch aufeinander folgende Behandlungen mit dem Vortexer und Ultraschall

Behandlung mit Vortexer + Ultraschall [s]	Versuch	Infektiositätstiter [\log_{10} KID ₅₀ /Träger]		Infektiositätsverlust*	
		Eluat	Kontrolle	[\log_{10} KID ₅₀]	[%]
0	1	3,0	5,5	2,5	99,68
	2	4,0	5,75	1,75	98,22
15	1	5,0	6,25	1,25	94,37
	2	5,0	6,5	1,5	96,83
30	1	4,75	6,5	1,75	98,22
	2	5,5	6,5	1,0	90,0
45	1	5,5	6,75	1,25	94,37
	2	4,75	6,25	1,5	96,83
60	1	5,0	6,5	1,5	96,83
	2	5,25	6,25	1,0	90,0
120	1	5,5	6,5	1,0	90,0
	2	4,75	6,25	1,5	96,83

- Differenz der Titer der Kontrollen und der Elutionsversuche

Tabelle 32: Elution des an die Träger aus Makrolon adsorbierten Testvirus durch Benetzung der Träger mit Wasser standardisierte Härte (WSH) und anschließender Behandlung mit dem Vortexer

Behandlung mit Vortexer [s]	Infektiositätstiter [\log_{10} KID ₅₀ /Träger]		Infektiositätsverlust*	
	Eluat	Kontrolle	[\log_{10} KID ₅₀]	[%]
0	3,75	6,25	2,5	99,68
15	4,5	6,5	2,0	99,0
30	4,75	5,75	1,0	90,0
45	4,75	6,25	1,5	96,83
60	4,75	6,0	1,25	94,37
120	5,0	6,0	1,0	90,0

- * Differenz der Titer der Kontrollen und der Elutionsversuche

Tabelle 33: Elution des an die Träger aus Makrolon adsorbierten Testvirus durch Benetzung der Träger mit Wasser standardisierte Härte (WSH) und anschließender Behandlung mit Ultraschall

Behandlung mit Ultraschall [s]	Infektiositätstiter [\log_{10} KID ₅₀ /Träger]		Infektiositätsverlust*	
	Eluat	Kontrolle	[\log_{10} KID ₅₀]	[%]
0	4,25	6,25	2,0	99,0
15	5,5	6,5	1,0	90,0
30	5,5	6,25	0,75	82,21
45	4,75	5,75	1,0	90,0
60	4,5	6,25	1,75	98,22
120	4,25	5,25	1,0	90,0

* Differenz der Titer der Kontrollen und der Elutionsversuche

Tabelle 34: Elution des an die Träger aus Makrolon adsorbierten Testvirus durch Benetzung der Träger mit Wasser standardisierte Härte (WSH) und anschließender Behandlung mit dem Vortexer gefolgt von Ultraschall

Behandlung mit Vortexer + Ultraschall [s]	Versuch	Infektiositätstiter [\log_{10} KID ₅₀ /Träger]		Infektiositätsverlust*	
		Eluat	Kontrolle	[\log_{10} KID ₅₀]	[%]
0	1	4,25	6,25	2,0	99,0
	2	4,0	6,5	2,5	99,68
15	1	5,25	6,0	0,75	82,21
	2	5,0	6,25	1,25	94,37
30	1	4,75	6,5	1,75	98,22
	2	4,5	6,0	1,5	96,83
45	1	5,25	6,25	1,0	90,0
	2	4,5	6,0	1,5	96,83
60	1	5,5	6,5	1,0	90,0
	2	5,0	6,0	1,0	90,0
120	1	5,5	7,0	1,5	96,83
	2	5,0	6,25	1,25	94,37

* Differenz der Titer der Kontrollen und der Elutionsversuche

Tabelle 35: Elution des Testvirus von den zum Abtupfern der Makrolon-Träger verwendeten Watteträger durch Behandlung mit dem Vortexer

Behandlung mit Vortexer [s]	Infektiositätstiter [$\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{Träger}$]		Infektiositätsverlust*	
	Eluat	Kontrolle	[$\log_{10}\text{KID}_{50}$]	[%]
0	3,25	5,25	2,0	99,9
15	5,0	6,25	1,25	94,37
30	4,75	6,5	1,75	98,22
45	4,75	6,5	1,75	98,22
60	5,0	6,5	1,5	96,83
120	4,75	6,25	1,5	96,83

* Differenz der Titer der Kontrollen und der Elutionsversuche

Tabelle 36: Elution des Testvirus von den zum Abtupfern der Makrolon-Träger verwendeten Watteträger durch Behandlung mit Ultraschall

Behandlung mit Ultraschall [s]	Infektiositätstiter [$\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{Träger}$]		Infektiositätsverlust*	
	Eluat	Kontrolle	[$\log_{10}\text{KID}_{50}$]	[%]
0	3,0	5,75	2,75	99,82
15	4,5	6,0	1,5	96,83
30	5,0	6,5	1,5	96,83
45	5,25	6,25	1,0	90,0
60	4,75	6,75	2,0	99,0
120	4,75	6,25	1,5	96,83

* Differenz der Titer der Kontrollen und der Elutionsversuche

Tabelle 37: Elution des Testvirus von den zum Abtupfern der Makrolon-Träger verwendeten Watteträger durch aufeinander folgende Behandlung mit dem Vortexer und Ultraschall

Behandlung mit Vortexer+Ultraschall [s]	Versuch	Infektiositätstiter [\log_{10} KID ₅₀ /Träger]		Infektiositätsverlust*	
		Eluat	Kontrolle	[\log_{10} KID ₅₀]	[%]
0	1	3,5	6,0	2,5	99,68
	2	2,75	4,75	2,0	99,0
15	1	5,0	6,0	2,0	90,0
	2	4,5	6,0	1,5	96,83
30	1	4,75	6,25	1,5	96,83
	2	5,5	6,5	1,0	90,0
45	1	4,75	5,75	1,0	90,0
	2	5,25	6,25	1,0	90,0
60	1	5,25	6,0	0,75	82,21
	2	4,75	6,25	1,5	96,83
120	1	4,5	6,25	1,75	98,22
	2	5,0	6,25	1,25	94,37

* Differenz der Titer der Kontrollen und der Elutionsversuche

Tabelle 38: Infektiositätsgehalt des ECBO-Virus im Überstand und auf dem Träger aus V₂ A-Stahl nach Zugabe des "Desinfektionsmittels"

Einwirkzeit [min]	Versuchsnummer	Infektiositätstiter des Überstandes [log ₁₀ KID ₅₀ /0,16 ml]	Infektiositätstiter des Trägers [log ₀ KID ₅₀]
15	1	4,45	4,0
	2	4,95	4,25
30	1	4,70	3,50
	2	4,70	4,25
60	1	4,70	3,25
	2	4,95	4,50
120	1	4,70	4,0
	2	4,70	4,0

Tabelle 39: Infektiositätsgehalt des ECBO-Virus im Überstand und auf dem Träger aus PE 500 nach Zugabe des "Desinfektionsmittels"

Einwirkzeit [min]	Versuchsnummer	Infektiositätstiter des Überstandes [log ₁₀ KID ₅₀ / 0,16 ml]	Infektiositätstiter des Trägers [log ₁₀ KID ₅₀]
15	1	4,95	4,5
	2	4,45	4,0
30	1	4,95	3,5
	2	4,95	4,5
60	1	4,45	3,5
	2	4,70	3,75
120	1	4,95	4,25
	2	4,45	4,25

Tabelle 40: Viruzide Wirksamkeit von Steril[®] gegenüber ECBO-Virus bei 10 °C, im Keimträgerversuch mit V₂ A-Stahl als Keimträger

Konzentration des DM [%]	Versuch	Versuchsstand	Viruskontrolle [log ₁₀ KID ₅₀ /0,1 ml bzw Träger]	Infektiositätstiter in log ₁₀ KID ₅₀ /0,1 ml bzw Träger der nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
				15	30	60	120
0,5	1	Überstand	4,5	1,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
		Träger	4,75	1,5	1,5	1,25	1,5
	2	Überstand	4,75	0,75	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
		Träger	3,75	1,5	1,5	1,5	1,25
1,0	1	Überstand	4,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
		Träger	4,75	3,0	1,5	1,25	1,25
	2	Überstand	4,75	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
		Träger	3,75	1,5	1,5	1,0	1,25
2,0	1	Überstand	4,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
		Träger	4,75	2,5	1,25	1,25	≤ 0,5
	2	Überstand	4,75	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5	≤ 0,5
		Träger	4,0	1,5	1,0	≤ 0,5	≤ 0,5
3,0	1	Überstand	4,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
		Träger	4,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	2	Überstand	4,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
		Träger	4,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
4,0	1	Überstand	4,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
		Träger	4,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	2	Überstand	4,75	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
		Träger	4,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5

STERIL[®]: Natriumhypochlorit

Eiweiß: 0,1% Hefeextrakt + 0,1% Bovines Serumalbumin

Tabelle 41: Viruzide Wirksamkeit von Steril[®] gegenüber ECBO-Virus bei 10 °C, im Keimträgerversuch mit PE als Keimträger

Konzentration des DM [%]	Versuch	Viruskontrolle [log ₁₀ KID ₅₀ /Träger]	Infektiositätstiter in log ₁₀ KID ₅₀ /Träger der nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
			15	30	60	120
0,25	1	5,0	3,75	3,25	3,0	2,75
	2	5,0	3,5	3,0	2,5	2,5
0,5	1	4,75	1,5	1,5	1,25	1,0
	2	5,5	1,5	1,5	1,25	1,25
1,0	1	4,75	1,25	1,0	1,0	1,25
	2	5,5	1,25	1,0	1,0	1,0
2,0	1	4,75	0,75	1,0	0,75	≤ 0,5
	2	5,5	1,0	1,0	1,0	≤ 0,5
3,0	1	5,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	2	5,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
4,0	1	5,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5
	2	5,0	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5	≤ 1,5

STERIL[®]: Natriumhypochlorit

Eiweiß: 0,1% Hefeextrakt + 0,1% Bovines Serumalbumin

Tabelle 42: Viruzide Wirksamkeit von HM 3000[®] gegenüber ECBO-Virus bei 10 °C, im Keimträgerversuch mit PE als Keimträger

Konzentration des DM [%]	Versuch	Viruskontrolle [log ₁₀ KID ₅₀ /Träger]	Infektiositätstiter in log ₁₀ KID ₅₀ /Träger der nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
			15	30	60	120
0,5	1	5,25	4,75	4,75	4,5	4,5
	2	5,0	4,25	4,25	4,25	4,25
1,0	1	5,25	4,5	4,5	4,25	4,5
	2	5,0	4,0	4,0	4,0	3,75
2,0	1	5,25	4,5	4,5	4,5	4,25
	2	5,0	4,25	4,0	4,0	4,0
3,0	1	5,25	4,50	4,75	4,75	4,75
	2	5,0	4,25	4,25	4,25	4,0
4,0	1	5,25	4,75	4,75	4,75	4,5
	2	5,0	4,25	4,25	4,25	4,25
5,0	1	5,25	4,25	4,25	4,5	4,25
	2	5,0	4,25	4,0	4,0	4,0

HM 3000[®]: Alkylamin

Eiweiß: 0,1% Hefeextrakt + 0,1% Bovines Serumalbumin

Tabelle 43: Viruzide Wirksamkeit von HM 3000® gegenüber ECBO-Virus bei 10 °C, im Keimträgerversuch mit V₂ A-Stahl als Keimträger

Konzentration Des DM [%]	Versuch	Viruskontrolle [log ₁₀ KID ₅₀ / Träger]	Infektiositätstiter in log ₁₀ KID ₅₀ / Träger der nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
			15	30	60	120
0,5	1	5,5	5,25	5,25	5,0	5,25
	2	5,25	5,25	5,25	5,0	5,0
1,0	1	5,5	4,75	4,75	4,75	4,75
	2	5,25	4,75	4,75	4,5	4,5
2,0	1	5,25	4,5	4,25	4,25	4,5
	2	5,25	4,25	4,25	4,25	4,0
3,0	1	5,5	4,75	4,75	4,75	4,5
	2	5,25	4,5	4,5	4,5	4,5
4,0	1	5,25	4,75	4,75	4,5	4,5
	2	5,25	4,5	4,5	4,25	4,25
5,0	1	5,25	4,5	4,5	4,25	4,25
	2	5,25	4,5	4,25	4,25	4,0

HM 3000®: Alkylamin

Eiweiß: 0,1% Hefeextrakt + 0,1% Bovines Serumalbumin

Tabelle 44: Viruzide Wirksamkeit von Divodes FG[®] gegenüber ECBO-Virus bei 10 °C, im Keimträgerversuch mit PE als Keimträger

Konzentration des DM [%]	Versuch	Viruskontrolle [log ₁₀ KID ₅₀ /Träger]	Infektiositätstiter in log ₁₀ KID ₅₀ /Träger der nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
			15	30	60	120
100	1	5,25	5,0	5,0	5,0	4,75
100	2	5,25	5,25	5,0	4,75	4,75

Tabelle 45: Viruzide Wirksamkeit von Divodes FG[®] gegenüber ECBO-Virus bei 10 °C, im Keimträgerversuch mit V₂A-Stahl als Keimträger

Konzentration des DM [%]	Versuch	Viruskontrolle [log ₁₀ KID ₅₀ /Träger]	Infektiositätstiter in log ₁₀ KID ₅₀ /Träger der nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
			15	30	60	120
100	1	5,0	4,75	4,5	4,5	4,5
100	2	5,0	4,5	4,75	4,75	4,75

Divodes FG[®]: Isopropanol, n-Propanol

Eiweiß: 0,1% Hefeextrakt + 0,1% Bovines Serumalbumin

Tabelle 46: Viruzide Wirksamkeit von neoquat s[®] gegenüber ECBO-Virus bei 10 °C, im Keimträgerversuch mit PE als Keimträger

Konzentration des DM [%]	Versuch	Viruskontrolle [log ₁₀ KID ₅₀ /Träger]	Infektiositätstiter in log ₁₀ KID ₅₀ /Träger der nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
			15	30	60	120
1,0	1	5,0	4,75	5,0	4,75	5,0
	2	5,0	5,0	5,0	4,75	5,0
2,0	1	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
	2	5,0	5,0	5,0	5,0	4,75
3,0	1	5,0	5,0	5,0	5,0	4,75
	2	5,0	4,75	5,0	4,5	4,75

neoquat s[®]: Quat. Amoniumverbindungen

Eiweiß: 0,1% Hefeextrakt + 0,1% Bovines Serumalbumin

Tabelle 47: Viruzide Wirksamkeit von neoquat s[®] gegenüber ECBO-Virus bei 10 °C, im Keimträgerversuch mit V₂A-Stahl als Keimträger

Konzentration des DM [%]	Versuch	Viruskontrolle [log ₁₀ KID ₅₀ /Träger]	Infektiositätstiter in log ₁₀ KID ₅₀ /Träger der nach verschiedenen Einwirkungszeiten [min]			
			15	30	60	120
1,0	1	5,0	4,75	5,0	4,75	4,75
	2	5,25	5,25	5,25	5,0	5,0
2,0	1	5,0	4,75	4,75	5,0	5,0
	2	5,25	5,0	5,25	5,0	4,75
3,0	1	5,0	5,0	5,0	4,75	4,75
	2	5,25	5,0	5,0	4,75	4,75

neoquat s[®]: Quat. Amoniumverbindungen

Eiweiß: 0,1% Hefeextrakt + 0,1% Bovines Serumalbumin

Minimal Essential Medium (MEM) Lösung

Minimal Essential Medium mit Earle' Salzen und 0,85 g/l NaHCO_3 ergänzt mit 2 mmol/l L-Glutamin, Vitaminkonzentrat und 5 % fetalem Kälberserum(Biochrom – Berlin)

NaHCO_3 2,2 g/l wird dazu gegeben

PST 1% (Stammlösung enthält 10000 IE Penicillin/ml und 10 mg Streptomycin/ml)

gelöst in Aqua bidest und PH auf 7,0 eingestellt

Herstellung der Versen-Trypsin Lösung

Für ein Liter Lösung benötigt man:

NaCL 8000 mg/l

KCL 200 mg/l

Na_2HPO_4 1150 mg/l

KH_2PO_4 200 mg/l

EDTA- Na_2 200 mg/l

Trypsin 500 mg/l

Phenolrot 7,5 ml/l

Oben aufgeführte Substanzen werden mit Aqua bidest. gelöst und pH auf 7,0 eingestellt. und anschließend durch Filtration sterilisiert.

Herstellung von PBS (Phospht buffered Saline):

NaCL-Lösung (Merck, Darmstadt) 8,00 g/l

KCl (Merck, Darmstadt) 0,20 g/l

Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt) 1,15 g/l

KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt) 0,20 g/l

gelöst in 1 Liter Aqua bidest und pH auf 7,0 eingestellt und (121 °C 15 min) autoklaviert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Herstellung der Eiweißlösung „HE/BSA“: je 100g/l:

50 g Hefeextraktgranulat (Merck, Darmstadt, Lot-Nr: 0127-01-7) in 150 ml *Aqua dest.* wurden in einem 250 ml- Kolben gelöst. Nachdem sich der Schaum gesetzt hatte, wurde bis zur Markierung mit *Aqua dest.* aufgefüllt und anschließend autoklaviert (121 °C, 15 min.). Nach Abkühlung bei Raumtemperatur wurden 25 ml dieser Lösung in einem 50 ml fassenden Meßkolben pipettiert.

Nach Zugabe von 10 ml *Aqua dest.* wurden 5 g Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V (SERVA ELECTROPHORESIS GmbH, Cat: 11930) darin gelöst und bis zur Markierung mit *Aqua dest.* aufgefüllt. Dann wurde diese Mischung durch Filter mit einer durchschnittlichen Porengröße von 0,45 µm (Schleicher und Schuell, Lot-Nr: CC 1159-1) filtriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Wasser Standardisierter Härte (WSH):

Lösung A: 19,84 g/l wasserfreies $MgCl_2$ und 46,24 g/l wasserfreies $CaCl_2$ werden mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und im Autoklaven sterilisiert.

Lösung B: 35,02 g/l $NaHCO_3$ wird in 1 Liter destillierten Wasser aufgelöst und durch einen Filter sterilfiltriert.

Gebrauchslösung:

6 ml der Lösung A werden in 600 ml destilliertem Wasser verdünnt und anschließend in einen Meßbecher überführt, 8 ml der Lösung B werden dazugegeben und mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt.

Die WSH-Lösung wird frisch hergestellt und nicht länger als ein Tag verwendet.

Der pH- Wert der Lösung auf $7,0 \pm 0,2$ eingestellt .

Herstellung einer Bovinen Serum Albumin (BSA) Lösung:

Je nach gewünschter Konzentration wurden das entsprechende Gewichtsprozent BSA (Biochrom, Berlin)in *Aqua dest.* Mit Hilfe eines Magnetrührers mit niedriger Drehgeschwindigkeit gelöst und anschließend durch durch Filter mit einer durchschnittlichen Porengröße von 0,45 µm (Schleicher und Schuell, Lot-Nr: CC 1159-1) filtriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Keimträgermaterial

1. V₂ A-Stahl: (NE – Metalle-Staufenberg-Treis) Größe: 20 x 20 x 1 mm blank poliert, Hersteller: Institutseigene Werkstatt. Sterilisiert 2 Stunden bei 160 °C im Heißluftsterilisator
2. Polyethylen 500 Größe: 20 x 20 x 5 mm (ORBILAN Kunststoffwerk GmbH – Rosendahl – Osterwick) 10 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert.

Geräte:

Co₂- Inkubator: Heraeus B 50 60 EK /Co₂ mit digitaler Anzeige, D -6450 Hanau

Ultraschallgerät: BRANSON – SONIFIER MODELL “ B - 12 / B – 15“ Schwäbisch Gmünd

Ultrazentrifuge: Beckman, L7 – 55 Ultrazentrifuge U.S.A.

Ultraschallwasserbad: LABSON 200 Ultraschallgenerator T460 / H Nr. EYH – 12848715 SINGEN

Kühlbox: (Fa. Novodirect, Kehl/ Rein), Kleine Temperierkammer (Fryka, Essingen) mit digitaler Temperaturanzeige und – einstellung . Arbeitstemperaturbereich – 20 bis + 40°C, räumliche Regelgenauigkeit +/- 1°C. Abmessungen (BxTxH): 47x58x40 cm außen, 36x35x23 cm innen.

Danksagung

Ich dank meinem Gott für seine Hilfe während meiner gesamten Arbeit.

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Dr. habil Georg Baljer für die freundliche Aufnahme am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere und für die Überlassung des Themas und für seine jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Werner Herbst möchte ich für seine nützliche und fachliche Betreuung, sowie die effektive Unterstützung bei der Abfassung meiner Dissertation danken.

Mein besonderer Dank gilt Herr Jörg Heuser für seine große Unterstützung bei zahlreichen Gelegenheiten.

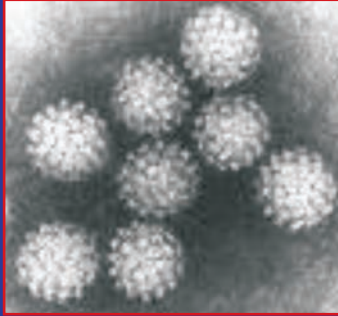
Mein Dank gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Hygiene für ihre nette Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre während der Arbeit.

Mein spezieller Dank gilt meiner Heimat, Syrien, für die Finanzierung durch ein Stipendium.

Ein herzlicher Dank geht an meine Frau und meine Kinder, Mohamad, Saadaldin und Yusuf, die mich zu jeder Zeit tatkräftig und stets geduldig unterstützt haben.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ahmad Al-Khleif



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5380-X

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de



9 17838351953802