

**Viruzide Aktivität des  
chemothermischen Wäschedesinfektionsverfahrens  
„*BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren*“  
gegenüber dem bovinen Parvovirus bei 60° C**

von

PD Dr. Olaf Thraenhart und Dr. Christian Jursch

**Untersuchung:** April - Juni 2010  
**Hersteller:** CHT R. Beitlich GmbH  
Bismarkstrasse 102  
D-72072 Tübingen

---

**Haupt-Eurovir-Aktivitäten:**

**Serologische Untersuchung der Tollwutimmunität als EU zertifiziertes Labor** im grenzüberschreitenden weltweiten Reiseverkehr von Tieren.

**Virologische Validierung von Desinfektionsmitteln**, anderen Produkten und Verfahren zur Wirksamkeit, Virussicherheit, Sterilisation, Therapie, Impfung zur Vorbeugung von Virusinfektionen. F&E, Beratung Beratung in human- und veterinärmedizinischen Fragen zur Tollwut, Tollwut-Exposition nach Biß. Tollwutserologie beim Menschen.

## A. Prüfbericht

### Präambel:

Die vorliegende Untersuchung wurde in Übereinstimmung mit der **DVV/RKI-Leitlinie** (*Bundesgesundhbl.* (2008); 51 (8):937-945) durchgeführt:

*Leitlinie der deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Institutes (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin - Fassung v. 1. August 2008*

### Ziel der Untersuchung:

Diese Prüfung wurde durchgeführt, um eine spezifische antivirale Wirksamkeit des **BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahrens** gegenüber dem *bovinen Parvovirus* zur chemothermischen Desinfektion von Wäsche nachzuweisen.

Alle Experimente sowie die anschließende Bewertung der Versuchsergebnisse wurden im **Eurovir Hygiene-Institute** (Luckenwalde, Deutschland) durchgeführt.

### Desinfektionsmittel bzw. geprüfte Produktmuster

**Hersteller:** CHT R. Beitlich GmbH  
Bismarkstrasse 102  
D-72072 Tübingen

### geprüftes Verfahren: **BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren**

bestehend aus **BEICLEAN NFG** (1. Produkt [von dreien])  
Ch.-Bez.: 0001034642 (Produkt erhalten: 11.03.2010)

Inhaltsstoffe: (nach Angaben des Herstellers)  
Modifizierte Fettalkoholethoxylate, nichtionogen

in Kombination mit: **BEIPUR PKS** (2. Produkt [von dreien])  
Ch.-Bez.: 0001034595 (Produkt erhalten: 11.03.2010)

Inhaltsstoffe: (nach Angaben des Herstellers)  
Alkalisierende Komponente (Kaliumhydroxid)

in Kombination mit: **BEIBLEACH POWER ACTIVE** (3. Produkt [von dreien])  
Ch.-Bez.: 0001034756 (Produkt erhalten: 08.03.2010)

Inhaltsstoffe: (nach Angaben des Herstellers)  
Mischung aus Wasserstoffperoxid und Peressigsäure in wässriger Lösung

### Experimentelle Prüfbedingungen

|   |  |
|---|--|
| <b>Methodologie:</b>  | quantitativer viruzider Suspensionstest (QST)  |
| <b>Prüfdatum:</b>   | April - Juni 2010 ( <i>weitere Angaben: siehe Anhang</i> )   |
| <b>Prüftemperatur:</b>  | 60° C ( <i>nach Vorgaben des Herstellers zur Listung vorgesehen</i> )  |
| <b>Produktkonzentration:</b><br>( <i>zur Listung vorgesehen</i> ) | 0,4 mL/L <u>BEICLEAN NFG</u> zusammen mit<br>1,2 mL/L <u>BEIPUR PKS</u> zusammen mit<br>0,8 mL/L <u>BEIBLEACH POWER ACTIVE</u>   |
| <b>Kontaktzeit:</b>   | 12 Min. ( <i>zur Listung vorgesehen</i> )  |
| <b>2. Prüf- bzw. Messpunkt:</b>                                   | wie Prüfpunkt 1 jedoch für t = 6 Min. bei 60° C  |
| <b>Proteinbelastung:</b>  | Ohne ( <i>A. bidest</i> ) oder 10 % foetales Kälberserum ( <i>FKS</i> )  |
| <b>Testvirus:</b>   | Bovines Parvovirus ( <i>BPV</i> ); Virusstamm: Haden<br>Herkunft: Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland  |
| <b>Zellen:</b>  | FKL ( <i>foetale Kälberlungenzellen</i> )<br>Herkunft: Robert Koch-Institut, Berlin; Deutschland   |
| <b>Stop der Reaktion und Reduktion der Toxizität:</b>             | Gelfiltration mittels MicroSpin S-400 HR Säulchen (GE Healthcare) ( <i>cf. EN 14476, annex A. 2</i> ). Um die produktassoziierte Zytotoxizität zu reduzieren, wurden alle Proben mittels Gelfiltration behandelt und anschließend sofort in eiskaltem Medium verdünnt.   |
| <b>Bestimmung d. Virusmenge:</b>                                  | Quantale Titration, Bestimmung der TCID <sub>50</sub> nach der Methode v. Spearman & Kärber ( <i>cf. auch EN 14476; annex B</i> ). 4 Zellkultureinheiten einer Mikrotiterplatte wurden mit 0,1 mL einer jeden Virusverdünnung inokuliert (Verdünnungsfaktor: 5fach).<br><br>FKL-Zellen dienten als Substrat für das Testvirus. Die Zellkulturen wurden bei 37° C und 5 % CO <sub>2</sub> für 12-14 Tage inkubiert. Die viruspositiven Zellkulturen wurden anschließend anhand des CPE unter Verwendung eines Mikroskops identifiziert. |
| <b>Virustiterberechnung:</b>                                      | Die Berechnung der Virustiter erfolgte nach der Methode v. Spearman & Kärber. Die Reduktionsfaktoren, deren Standardabweichungen sowie deren 95 %-Konfidenzintervall wurden in Übereinstimmung mit der Methodik der DVV/RKI-Leitlinie berechnet ( <i>cf. Anhang A 6.1 - A 6.4</i> ).   |
| <b>Ergebnisse:</b>  | Die Ergebnisse der vorliegenden Prüfung sind in den Tabellen 1 bis 10 dargestellt (Anhang 1). Die Versuchsprotokolle befinden sich im Anhang 2 am Ende dieses Berichts. Darüber hinaus sind die Resultate in Form von Abbildungen dargestellt (Abb. 1 und 2).<br><br>Auf Basis der Versuchsergebnisse können wir eine <b>gute viruzide Wirksamkeit</b> des chemothermischen <b>POWER ACTIVE-Verfahrens</b> nach einer Einwirkzeit von <b>12 Min.</b> bei <b>60° C</b> bestätigen.  |

### **Anmerkungen zur Methodik**

#### ***Quantitativer viruzider Suspensionstest (QST)***

Alle QST-Experimente wurden in Übereinstimmung mit der DVV/RKI-Leitlinie zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin durchgeführt (*Bundesgesundhbl.* (2008); 51 (8):937-945). Für den zusätzlich durchzuführenden zweiten Prüfpunkt (zusätzlich zu dem zur Listung vorgesehenen) wurde die Einwirkzeit halbiert.

#### ***Anmerkungen zur Beeinflussung des Testverlaufs durch das Produkt (allgemein)***

Eine Beeinträchtigung der Zellkulturen, hervorgerufen beispielsweise durch Desinfektionsmittelreste, kann einen Virusnachweis stören oder ganz verhindern. Deshalb ist es erforderlich, einen zellschädigenden Einfluss wenn möglich zu verhindern, zumindest aber im Empfänglichkeitstest zu erfassen.

#### ***Empfänglichkeitstest***

Hierbei wird eine Virustitration vergleichend a) in durch das Produkt „gegerbten“ und b) in unbehandelten Zellen bestimmt. Geprüft wird die Verdünnung der Produkt-Virusgemischs, die in der Zellkultur keine mikroskopisch sichtbare toxische Veränderung mehr induziert. Wenn sich beide Virustitrationen nicht oder höchstens um  $\Delta \lg ID_{50} = 0,5$  unterscheiden, gilt die Zellkultur durch das Produkt nicht signifikant verändert bzw. für das Testvirus voll empfänglich.

#### ***Verminderung der Zytotoxizität***

Eine viruzide Wirksamkeit ist dann gegeben, wenn die Differenz der Viruskonzentration in der unbehandelten Viruskontrolle minus dem Restwert nach Einwirkung des Produkts mehr als 4 Zehnerlogstufen beträgt. Häufig wird dieser Wert nicht erreicht, da einzelne Verdünnungen des Virus-Produktgemisches wegen der toxischen Veränderungen der Zellen nicht gewertet werden können. Deshalb werden bei Desinfektionsmitteluntersuchungen häufig Verfahren eingesetzt, die diese Zytotoxizität vermindern können.

Eine Methode ist die so genannte chemische Neutralisation der Produktradikale. Eine weitere sehr wirkungsvolle Methode ist die Molekularsiebfiltration (vergl. EN 14476), bei der das Produkt-Virusgemisch durch die Filtration von den Bestandteilen des Produkts befreit wird, ohne die Viruskonzentration signifikant zu reduzieren.

Die zu filtrierende Probe wird zunächst auf eine in einer kleinen Säule (z.B. MicroSpin columns) befindlichen Matrix aus mikroporösem Material (Gel) gegeben. Die Trennung der Viruspartikel vom Desinfektionsmittel erfolgt nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie, wobei die Viren im Ausschluss eluieren und das Desinfektionsmittel in die Gelperlen eindringen kann. Der für die Reinigung der Probe erforderliche Flüssigkeitsstrom wird bei dieser Technik mittels Zentrifugation erzeugt. Dabei wird das Reaktionsgemisch durch das gesamte Gelbett transportiert und die Viren erscheinen im Eluat wohingegen das Desinfektionsmittel im Gelbett verbleibt.

#### ***Virustitration nach Spearman und Kärber und Berechnung der Virusmenge***

Nach Ablauf der Kontaktzeit wurden die Virus-Produktgemische sofort in einer Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von 5 in eiskaltem Medium verdünnt. Pro Verdünnung wurden je 4 Zellkultureinheiten beimpft. Die Kulturen wurden für 14 Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde der zytopathische Effekt (CPE) mikroskopisch abgelesen.

Die Werte für den Virusgehalt der Virus-Produktgemische, ausgedrückt als  $\lg ID_{50}$ , wurden nach der Methode von *Spearman & Kärber* ermittelt. Durch Subtraktion dieser Werte vom Ausgangswert (identisch behandelte Probe ohne Wirkstoffzusatz = Viruskontrolle) wurde der Reduktionsfaktor (RF) erhalten.

### Darstellung und Bewertung der Prüfergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Prüfung sind in den Tabellen 1 bis 10 dargestellt (Anhang 1). Die Versuchsprotokolle befinden sich im Anhang 2 am Ende dieses Berichts. Darüber hinaus sind die Resultate in Form von Abbildungen dargestellt (Abb. 1 und 2).

### Untersuchte Produkte

In der ersten Tabelle (Tab. 1) sind die wesentlichen Informationen bezüglich der geprüften Produkte zusammengestellt.

### Prüfparameter

Entsprechend der Vorgaben des Herstellers ist das folgende Verfahren zur Listung beim RKI vorgesehen: BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren, bestehend aus 0,4 mL/L BEICLEAN NFG plus 1,2 mL/L BEIPUR PKS plus 0,8 mL/L BEIBLEACH POWER ACTIVE, bei einer Einwirktemperatur von 60° C für eine Einwirkzeit von 12 Min. (1. Prüfpunkt). Für den zweiten Prüfpunkt (Kontrollwert) wurde die Einwirkzeit auf 6 Min. verkürzt bzw. halbiert. Die Produktkonzentrationen wurden hierbei unverändert beibehalten (cf. Tab. 2).

### Abschnitt 1 - Ergebnisse der Validierungsexperimente

#### pH-Wert der Prüfansätze

Die Gebrauchslösung, bestehend aus den drei Komponenten, wies einen pH von 10,16 auf (cf. Tab. 3). Dieser pH-Wert veränderte sich nach Zugabe der Belastung (*1 VTA. bidest* bzw. *FKS*) sowie von Zellkulturmedium (*IVT*) geringfügig auf einen Wert von pH 9,62 bzw. pH 9,37 (cf. Tab. 4).

Der höhere Wert (pH 9,62) gab gleichzeitig denjenigen pH-Wert vor, der in der nachfolgenden Prüfung als sog. pH-Kontrolle dargestellt wurde. Mit diesem Ansatz kann der Einfluss des pH des geprüften Verfahrens auf das Testvirus als Einzelgröße bestimmt werden (vergl. Tab. 7).

#### Sichtbare produktassoziierte Zytotoxizität

Die Tabelle 5 zeigt, dass von den Prüfansätzen bestehend aus BEICLEAN NFG zusammen mit BEIPUR PKS und BEIBLEACH POWER ACTIVE plus Belastung und Zellkulturmedium in den auf die Zellkulturen verimpften Verdünnungen nach Gelfiltration keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen ausging, entsprechend  $\lg TD_{50} \leq 0,35$ .

Die Waschmittelkomponenten ohne Desinfektionsmittelzusatz wiesen nach Gelfiltration ebenfalls keine sichtbare Zytotoxizität auf ( $\lg TD_{50} \leq 0,35$ ).

#### Einfluss des Desinfektionsmittels auf die Empfänglichkeit der Zellkulturen

Erfahrungsgemäß kann eine Beurteilung der ersten beiden Verdünnungsstufen ( $\lg -0,7$  bzw.  $\lg -1,4$ ) in der Zellkultur aufgrund von Desinfektionsmittelresten erschwert sein. Deshalb wurden diese beiden Verdünnungsstufen im Empfänglichkeitstest geprüft (cf. Tab. 6a).

Die entsprechenden Kontrollversuche bei den beiden Hauptversuchen (V1 und V2) ergaben, dass die Zellen der zweiten Verdünnungsstufe ( $\lg -1,4$ ) vollumfänglich suszeptibel für das Testvirus waren und demnach zur Ermittlung der Virustiter herangezogen werden konnten.

Für die erste Verdünnungsstufe ( $\lg -0,7$ ) waren die Ergebnisse weniger einheitlich. Im

ersten Versuchsdurchgang und auch in V3 wurde keine Veränderung der Empfänglichkeit festgestellt bzw. die Werte für  $\Delta \lg ID_{50}$  waren kleiner als der Grenzwert von  $\Delta \lg ID_{50} = 0,5$ . Im zweiten Versuchsdurchgang wurde ohne Belastung eine gewisse Steigerung der Sensitivität der betroffenen Zellkulturen gegenüber BPV beobachtet ( $\Delta \lg ID_{50} = -0,52$ ). Im Ansatz mit 10 % FKS waren keine Auffälligkeiten zu verzeichnen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass im Empfänglichkeitstest die Zellen der Verdünnungsstufen lg -0,7 sowie lg -1,4 bei allen Versuchsdurchgängen für das bovine Parvovirus empfänglich waren. Diese Verdünnungsstufen wurden demzufolge zur Ermittlung der Virustiter und zur Berechnung der Virusreduktion herangezogen. Dass dabei im Einzelfall eine gesteigerte Virusempfänglichkeit der Zellen gegeben gewesen sein könnte, erscheint hinnehmbar.

#### ***Prüfung der Prozedur zur Beendigung der viruziden Aktivität nach Ablauf der Kontaktzeit***

Nach Durchführung der Gelfiltration war keine weitergehende viruzide Aktivität des untersuchten Produktes mehr zu beobachten (cf. Tab. 6b).

#### ***Prüfung der Temperatur- sowie pH-Stabilität des verwendeten Testvirus***

Wie aus der Tabelle 7 hervorgeht, war das eingesetzte Testvirus sowohl ohne als auch mit Proteinzusatz stabil gegenüber dem thermischen Einfluss der Prüftemperatur (Temperaturkontrolle:  $\emptyset \lg ID_{50} = 6,31$  bzw. 6,42 bei 60° C gegenüber  $\emptyset \lg ID_{50} = 6,34$  bzw. 6,55 bei 20° C).

Auch gegenüber demjenigen pH-Wert, welcher durch das Produkt induziert wurde, erwies sich das eingesetzte Testvirus bei T = 60° C mit und ohne Belastung als stabil (pH-Kontrolle:  $\emptyset \lg ID_{50} = 6,48$  bzw. 6,30 bei 60° C).

Dieses Ergebnis zeigt, dass das Testvirus weder durch die Temperatur allein, noch durch die Kombination aus Temperatur und pH 9,62 beeinflusst wurde.

#### ***Virustiter der Testvirussuspension (Virusausgangstiter bzw. Virus-input)***

Der Virustiter der unbehandelten Parvovirus-Virussuspension betrug unter den Prüfbedingungen (T = 60° C; nach Gelfiltration) ohne Proteinzusatz in V1  $\lg ID_{50} = 6,83$  mit einem 95%igem Vertrauensbereich von  $\pm 0,36$  bzw. in V2  $\lg ID_{50} = 5,78$  mit einem 95%igem Vertrauensbereich von  $\pm 0,26$ . Bei T = 20° C (V3) betrug der Virusausgangswert  $\lg ID_{50} = 6,31$  mit einem 95%igem Vertrauensbereich von  $\pm 0,41$  (cf. Tab. 8).

Mit Proteinzusatz (10 % FKS) betrug der Virustiter der unbehandelten Parvovirus-Virussuspension unter den Prüfbedingungen in V1  $\lg ID_{50} = 6,77$  mit einem 95%igem Vertrauensbereich von  $\pm 0,43$  bzw. in V2  $\lg ID_{50} = 6,07$  mit einem 95%igem Vertrauensbereich von  $\pm 0,33$ . Bei T = 20° C (V3) betrug der Virusausgangswert  $\lg ID_{50} = 6,48$  mit einem 95%igem Vertrauensbereich von  $\pm 0,40$  (cf. Tab. 8).

#### ***Darstellung der maximal nachweisbaren Virusinaktivierung***

Die maximal nachweisbare Virusinaktivierung ist sehr stark abhängig vom Ausmaß der produktassoziierten Zytotoxizität.

In der entsprechenden Kontrolle wurde die Virusempfänglichkeit der Nachweiszellen sowohl für die erste Verdünnungsstufe als auch für die zweite Verdünnungsstufe geprüft. Dabei wurde deutlich, dass beide Verdünnungsstufen (lg -0,7 bzw. lg -1,4) zur Ermittlung der Virustiter

herangezogen werden konnten, solange keine produktassoziierten morphologischen Veränderungen der Zellen zu Erkennen waren.

Damit bestimmt sich die maximal nachweisbare Virusinaktivierung bei  $T = 60^{\circ} \text{C}$  zu 6,48 bzw. 6,42 Zehnerlogstufen in V1 und zu 5,43 bzw. 5,72 Zehnerlogstufen in V2 (cf. Tab. 8).

Bei der Einwirktemperatur von  $T = 20^{\circ} \text{C}$  (V3) betrug die maximal nachweisbare Virusinaktivierung 5,96 bzw. 6,13 Zehnerlogstufen (cf. Tab. 8).

In der Zusammenfassung lässt sich sagen, dass in allen Versuchen eine Verfolgung der Virusinaktivierung deutlich über die geforderten 4 Zehnerlogstufen hinaus gewährleistet war.

#### **Bewertung der Ergebnisse der Kontrollexperimente/Testvalidierung**

Die beobachteten **antiviralen Effekte**, die unter den **beschriebenen Prüfbedingungen** beobachtet werden konnten, können **ursächlich** dem geprüften **BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren**, bestehend aus 0,4 mL/L BEICLEAN NFG plus 1,2 mL/L BEIPUR PKS plus 0,8 mL/L BEIBLEACH POWER ACTIVE im Zusammenwirken mit der Temperatur zugeschrieben werden.

## Abschnitt 2 - Ergebnisse der Prüfung zur Virusinaktivierung

Die entsprechenden Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 9 und 10 sowie in den Abbildungen 1 und 2 zusammengefasst.

### Messpunkt 1: Verfahren wie zur Listung vorgesehen

Das vorgestellte Verfahren ist vom Hersteller mit folgenden Parametern zur Listung beim Robert Koch-Institut nach § 18 IfSG (RKI-Liste) vorgesehen: BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren, bestehend aus 0,4 mL/L BEICLEAN NFG plus 1,2 mL/L BEIPUR PKS plus 0,8 mL/L BEIBLEACH POWER ACTIVE bei der Einwirktemperatur von 60° C für eine Einwirkzeit von 12 Min.

### **Virusinaktivierung bei T = 60° C**

#### **a. Virusinaktivierung ohne Proteinzusatz (A. bidest)**

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem Empfänglichkeitstest ( $\lg TD_{50} \leq 0,35$ ) wurde der Virustiter mit dem BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren innerhalb der Beobachtungszeitraums von 12 Min. bei T = 60° C im ersten Versuchsdurchgang auf einen mittleren Wert von  $\lg ID_{50} = 0,93 \pm 0,22$  und im zweiten Versuchsdurchgang auf einen mittleren Wert von  $\lg ID_{50} = 0,58 \pm 0,28$  reduziert.

Dies entspricht einer Virusreduktion von  $RF = 5,90 \pm 0,42$  (V1) bzw.  $RF = 5,19 \pm 0,39$  (V2). Daraus ergibt sich ein **Mittelwert [RF<sub>(mi)</sub>] von 5,55 ± 0,29** (cf. Tab. 9).

Die Prüfung der Waschmittelkomponenten (BEICLEAN NFG plus BEIPUR PKS) ergab, dass diese ohne Desinfektionsmittelzusatz keine ausreichende viruzide Wirksamkeit aufwiesen (cf. Tab. 10).

#### **b. Virusinaktivierung mit Proteinzusatz (10 % FKS)**

Mit Proteinzusatz war nach Ablauf von 12 Min. mit dem BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren in beiden Versuchsdurchgängen ebenfalls gewisse Mengen Restvirus nachweisbar. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem Empfänglichkeitstest ( $\lg TD_{50} \leq 0,35$ ) betrug die Titerwerte im Mittel  $\lg ID_{50} = 1,98 \pm 0,28$  in V1 und im Mittel  $\lg ID_{50} = 1,46 \pm 0,30$  in V2.

Die Virusinaktivierungsrate betrug  $RF = 4,44 \pm 0,57$  in V1 bzw.  $RF = 4,09 \pm 0,43$  in V2. Daraus ergibt sich ein **Mittelwert [RF<sub>(mi)</sub>] von 4,27 ± 0,36** (cf. Tab. 9).

Die Waschmittelkomponenten (BEICLEAN NFG plus BEIPUR PKS) ergaben ohne Desinfektionsmittelzusatz wiederum keine ausreichende viruzide Wirksamkeit (cf. Tab. 10).

### **Virusinaktivierung bei T = 20° C**

Die entsprechenden Vergleichsversuche bei einer Einwirktemperatur von T = 20° C, ergaben, dass sowohl mit der vollständigen Produktkombination als mit den Waschmittelkomponenten alleine, keine viruzide Wirksamkeit gegeben war (cf. Tab. 9 und 10).

Die viruzide Wirksamkeit des BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahrens wurde demnach **nur in der Kombination und nur im Zusammenwirken** mit der Einwirktemperatur von **T = 60° C** erzielt.



### **Messpunkt 2: Kontrollwert**

Als Kontrollwert wurde das Verfahren mit folgenden Parametern untersucht: *BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren*, bestehend aus 0,4 mL/L BEICLEAN NFG plus 1,2 mL/L BEIPUR PKS plus 0,8 mL/L BEIBLEACH POWER ACTIVE bei einer Einwirktemperatur von 60° C für die Zeitdauer von 6 Min.

Gegenüber dem zur Listung vorgesehenen Verfahren stellt dieses eine Halbierung der Einwirkzeit dar, bei gleicher Produktkonzentration und Einwirktemperatur.

### ***Virusinaktivierung bei T = 60° C***

#### ***a. Virusinaktivierung ohne Proteinzusatz (A. bidest)***

Mit *BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren* ohne Proteinzusatz wurde der Virustiter innerhalb der Beobachtungszeitraums von 6 Min. bei T = 60° C auf die folgenden mittleren Werte reduziert: lg ID<sub>50</sub> = 2,80 ± 0,34 (V1) bzw. lg ID<sub>50</sub> = 2,33 ± 0,31 (V2).

Dieses entspricht einer Virusreduktion von RF = 4,03 ± 0,49 (V1) bzw. RF = 3,44 ± 0,41 (V2). Daraus ergibt sich ein **Mittelwert [RF<sub>(mi)</sub>] von 3,74 ± 0,32** (cf. Tab. 9).

Die Prüfung der Waschmittelkomponenten (*BEICLEAN NFG plus BEIPUR PKS*) ergab, dass diese ohne Desinfektionsmittelzusatz keine ausreichende viruzide Wirksamkeit aufwiesen (cf. Tab. 10).

#### ***b. Virusinaktivierung mit Proteinzusatz (10 % FKS)***

Nach Ablauf von 6 Min. waren mit dem *BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren* mit 10 % FKS als Proteinlast folgende Restvirusmengen nachweisbar: lg ID<sub>50</sub> = 3,73 ± 0,31 in V1 bzw. lg ID<sub>50</sub> = 3,38 ± 0,31 in V2.

Die Viruswirksamkeit betrug entsprechend RF = 3,04 ± 0,53 in V1 bzw. RF = 2,69 ± 0,45 in V2. Daraus ergibt sich ein **Mittelwert [RF<sub>(mi)</sub>] von 2,87 ± 0,35** (cf. Tab. 9).

Die Waschmittelkomponenten (*BEICLEAN NFG plus BEIPUR PKS*) wiesen ohne Desinfektionsmittelzusatz wiederum keine ausreichende viruzide Wirksamkeit auf (cf. Tab. 10).

### ***Virusinaktivierung bei T = 20° C***

Die entsprechenden Vergleichsversuche bei einer Einwirktemperatur von T = 20° C und t = 6 Min. ergaben, dass ebenfalls keine viruzide Wirksamkeit gegeben war (cf. Tab. 9 und 10).

## Zusammenfassung der Ergebnisse

### Abschnitt 1 - Testvalidierung

Die beobachteten **antiviralen Effekte**, die unter den **beschriebenen Prüfbedingungen** beobachtet werden konnten, können **ursächlich** dem geprüften Verfahren, bestehend aus **BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren** sowie der **Temperatur** zugeschrieben werden.

### Abschnitt 2 - Virusinaktivierung

#### Messpunkt 1: Verfahren wie zur Listung vorgesehen

Das **BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren** war unter den Prüfbedingungen **bei 60° C** und nach einer Einwirkzeit von **12 Min.** unabhängig von der Eiweißbelastung ausreichend **viruzid wirksam** gegenüber dem **bovinen Parvovirus**.

Sowohl ohne Belastung als auch mit 10 % FKS betrug die Virusreduktion in **allen** Testansätzen **mehr als 4 Zehnerlogstufen**.

#### Messpunkt 2: Kontrollwert

Das **BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren** war unter den Prüfbedingungen **bei 60° C** und bei der auf die Hälfte verkürzten Einwirkzeit von **6 Min.** sowohl ohne Eiweißbelastung als auch mit hoher Eiweißbelastung **nicht** ausreichend viruzid wirksam gegenüber dem bovinen Parvovirus.

Luckenwalde, 11. Juni 2010



Dr. Christian Jursch  
(Laborleiter und Wissenschaftler)

## **B. Gutachten**

### **Ziel der Untersuchung**

Es wird eine viruzide Aktivität des *BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahrens* zur chemothermischen Wäschedesinfektion bei 60° C beansprucht und das Verfahren soll entsprechend nach § 18 IfSG zur Listung beim Robert Koch-Institut angemeldet werden. Um diesen Anspruch zu untermauern, wurde die vorliegende antivirale Prüfung in Übereinstimmung mit der DVV/RKI-Leitlinie (Stand 2008) durchgeführt.

### **Experimentelle Ergebnisse**

#### ***Validierungsexperimente***

Die Ergebnisse der Kontrollexperimente belegen, dass das Nachweissystem valide war. Insbesondere die Empfänglichkeit der Nachweiszellen für das Testvirus wurde geprüft und entsprechend berücksichtigt (cf. Tab. 6a). Eine Nachwirkung des Desinfektionsmittels wurde nicht beobachtet (cf. Tab. 6b).

Unter Berücksichtigung der Nachweisgrenzen bzw. der produktassoziierten Zytotoxizität, konnte ein Reduktionsfaktor von mindestens 5,43 Zehnerlogstufen nachgewiesen werden (cf. Tab. 8).

#### ***Virusinaktivierung***

##### ***Verfahren wie zur Listung vorgesehen (bzw. Messpunkt 1)***

Unter den oben angegebenen Prüfbedingungen war das vorgestellte Desinfektionsverfahren nach einer Einwirkzeit von 12 Min. mit und ohne Eiweißbelastung viruzid wirksam. Ohne Belastung (A. bidest) betrug die Virusinaktivierung  $RF_{[mi]} = 5,55 \pm 0,29$  und mit 10 % FKS  $RF_{[mi]} = 4,27 \pm 0,36$  (cf. Tab. 9).

##### ***Kontrollwert (bzw. Messpunkt 2)***

Bei der halben Einwirkzeit (6 Min.) war das vorgestellte Desinfektionsverfahren ohne Belastung (A. bidest) mit  $RF_{[mi]} = 3,74 \pm 0,32$  nicht ausreichend viruzid wirksam. Mit Eiweißbelastung (10 % FKS) betrug die Virusinaktivierung  $RF_{[mi]} = 2,87 \pm 0,35$  (cf. Tab. 9). Damit war das Verfahren jedoch bereits nach der Hälfte der vorgesehenen Einwirkzeit mit etwa 3 Zehnerlogstufen signifikant viruswirksam.

### **Bewertung der Ergebnisse**

Für die Zertifizierung ist wichtig, dass eine viruzide Aktivität weitgehend unabhängig von der Proteinbelastung besteht und  $RF \geq 4$  beträgt.

In den entsprechenden Versuchen zur Virusinaktivierung konnte dieses für das zur Listung vorgesehene Verfahren bestätigt werden. Mit einem  $RF = 5,55$  bzw.  $4,27$  wurde eine signifikante Viruswirksamkeit belegt, die den geforderten Mindestwert von  $RF = 4$  überschreitet.

**Beurteilung**

Das chemothermische Wäschedesinfektionsverfahren

**BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren**

**bei einer Einwirktemperatur von 60° C und  
einer Einwirkzeit von 12 Min.**

hat seine **viruzide Aktivität** unter den Prüfbedingungen mit Bezug auf die **DVV/RKI-Leitlinie** ohne und mit Eiweißbelastung gegenüber dem **bovinen Parvovirus** unter Beweis gestellt.

Das o.a. Verfahren ist viruzid wirksam und erfüllt meines Erachtens die Kriterien für die Eintragung in die Liste des RKI gemäß § 18 IfSG.

Luckenwalde, 11. Juni 2010



Dr. Christian Jursch  
(Stellvertretender Leiter Eurovir)

**- Anhang 1: Tabellen und Abbildungen -**

**Tab. 1:** Geprüfte Produktmuster

| Bezeichnung d. Produkte       | geprüfte Charge ( <i>Ch.-Bez.</i> ) | Produktmuster erhalten |
|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| <i>BEICLEAN NFG</i>           | 0001034642                          | am 11.03.2010          |
| <i>BEIPUR PKS</i>             | 0001034595                          | am 11.03.2010          |
| <i>BEIBLEACH POWER ACTIVE</i> | 0001034756                          | am 08.03.2010          |

**Tab. 2:** Prüfparameter

| Prüf- bzw. Messpunkt                  | Produkt(e)                    | Dosierung | Temperatur | Einwirkzeit |
|---------------------------------------|-------------------------------|-----------|------------|-------------|
| # 1 ( <i>zur Listung vorgesehen</i> ) | <i>BEICLEAN NFG</i>           | 0,4 mL/L  | 60° C      | 12 Min.     |
|                                       | <i>BEIPUR PKS</i>             | 1,2 mL/L  |            |             |
|                                       | <i>BEIBLEACH POWER ACTIVE</i> | 0,8 mL/L  |            |             |
| # 2 ( <i>Kontrollwert</i> )           | <i>BEICLEAN NFG</i>           | 0,4 mL/L  | 60° C      | 6 Min.      |
|                                       | <i>BEIPUR PKS</i>             | 1,2 mL/L  |            |             |
|                                       | <i>BEIBLEACH POWER ACTIVE</i> | 0,8 mL/L  |            |             |

**Tab. 3:** Gebrauchslösung (*in der 1,25fachen Konzentration*)

| Produkt(e)                    | Produktmenge ( <i>für 5 L</i> ) <sup>1</sup> | pH der Gebrauchslösung |
|-------------------------------|--|------------------------|
| <i>BEICLEAN NFG</i>           | 2,5 mL                                       | pH 10,16               |
| <i>BEIPUR PKS</i>             | 7,5 mL                                       |                        |
| <i>BEIBLEACH POWER ACTIVE</i> | 5,0 mL                                       |                        |

<sup>1</sup> = hartes Wasser (nach der DVV/RKI-Leitlinie)

**Tab. 4:** pH der Testansätze: Produktverdünnungen in 1facher Konzentration  
*(nach Zugabe von Zellkulturmedium<sup>1</sup> und Proteinbelastung)*

| Produkt(e)  | pH des Testansatzes |              |
|---|---------------------|--------------|
|   | ohne Belastung      | mit 10 % FKS |
| <i>BEICLEAN NFG plus BEIPUR PKS plus BEIBLEACH POWER ACTIVE</i> | 9,62 <sup>2</sup>   | 9,37         |
| <i>BEICLEAN NFG plus BEIPUR PKS</i>                             | 10,66               | 10,26        |
| <i>BEIBLEACH POWER ACTIVE</i>                                   | 6,44                | 6,58         |

<sup>1</sup> = Zellkulturmedium (2% FKS) anstatt Virussuspension

<sup>2</sup> = gelb unterlegt: Ziel-pH der pH-Kontrolle zur Virusinaktivierung (im Testansatz; vergl. Tab. 7)

**Tab. 5:** Zytotoxischer Effekt der Produkte auf die Zellkulturen (*relative Toxizität*)

| Produkte  | Proteinbelastung | Verdünnung (lg)   |      |      |      |      | max. Toxizität [lg TD <sub>50</sub> ] |
|---|------------------|-------------------|------|------|------|------|---------------------------------------|
|   |                  | -0,7              | -1,4 | -2,1 | -2,8 | -3,5 |                                       |
| <i>BEICLEAN NFG plus BEIPUR PKS plus BEIBLEACH POWER ACTIVE</i> | ohne             | 0/24 <sup>1</sup> | 0/24 | 0/24 | 0/24 | 0/24 | ≤ 0,35                                |
|   | FKS              | 0/24              | 0/24 | 0/24 | 0/24 | 0/24 | ≤ 0,35                                |
| <i>BEICLEAN NFG plus BEIPUR PKS</i>                             | ohne             | 0/24              | 0/24 | 0/24 | 0/24 | 0/24 | ≤ 0,35                                |
|   | FKS              | 0/24              | 0/24 | 0/24 | 0/24 | 0/24 | ≤ 0,35                                |

<sup>1</sup> = erste Zahl = Anzahl der Zellkultureinheiten, welche einen zytotoxischen Effekt aufwiesen; zweite Zahl = Gesamtzahl der Zellkultureinheiten

**Tab. 6a:** Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen: Empfänglichkeitstest

| Verd. des Testansatzes [Verdünnungsstufe]             | Experiment V1 [60° C] |           |                   |           | Experiment V2 [60° C] |           |                   |           |
|---|-----------------------|-----------|-------------------|-----------|-----------------------|-----------|-------------------|-----------|
|   | lg -0,7 [Verd. 1]     |           | lg -1,4 [Verd. 2] |           | lg -0,7 [Verd. 1]     |           | lg -1,4 [Verd. 2] |           |
| Proteinbelastung                                      | ohne                  | FKS       | ohne              | FKS       | ohne                  | FKS       | ohne              | FKS       |
| Δ Titerwert (lg ID <sub>50</sub> )                    | -0,04                 | 0,13      | -0,04             | -0,22     | -0,52                 | 0,35      | -0,17             | 0,17      |
| <b>Empfänglichkeit d. Zellen gegeben <sup>1</sup></b> | <b>ja</b>             | <b>ja</b> | <b>ja</b>         | <b>ja</b> | <b>Steigerung</b>     | <b>ja</b> | <b>ja</b>         | <b>ja</b> |

<sup>1</sup> = Empfänglichkeit der Zellen gilt als gegeben, wenn Δ Titerwert ≤ lg 0,5 ist

**Tab. 6b:** Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen: Nachwirkungstest

| Verd. des Testansatzes [Verdünnungsstufe] | Experiment V1 [60° C] |             | Experiment V2 [60° C] |             |
|---|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|
|   | lg -0,7 [Verd. 1]     |             | lg -0,7 [Verd. 1]     |             |
| Proteinbelastung                          | ohne                  | FKS         | ohne                  | FKS         |
| Δ Titerwert (lg ID <sub>50</sub> )        | 0,35                  | 0,35        | 0,18                  | -0,17       |
| <b>Nachwirkung gegeben <sup>1</sup></b>   | <b>nein</b>           | <b>nein</b> | <b>nein</b>           | <b>nein</b> |

<sup>1</sup> = Nachwirkung gilt als nicht gegeben, wenn Δ Titerwert ≤ lg 0,5 ist

**Tab. 7:** Prüfung der Temperatur- sowie der pH-Stabilität des Parvovirus im QST für 12 Minuten

| Versuchsbedingungen |         |                |               | Ergebnisse aus den jeweiligen Versuchen |  |                |                |             |   |
|---------------------|---------|----------------|---------------|---|--|----------------|----------------|-------------|---|
| An-satz             | pH-Lsg. | Protein-Zusatz | Einwirk-Temp. | Result. pH                              | lg ID <sub>50</sub> /Testvol.<br>(± 95 % Konfidenzintervall) |                |                | Ø           | n |
|                     |         |                |               |   | V1   | V2             | V3             |             |   |
| Temperaturkontrolle | ohne    | ohne           | 20°C          | n.d.                                    | 6,48<br>± 0,50   | 6,30<br>± 0,71 | 6,31<br>± 0,41 | <b>6,34</b> | 5 |
|                     |         | FKS            |               | n.d.                                    | 6,83<br>± 0,87   | 6,48<br>± 0,50 | 6,48<br>± 0,40 | <b>6,55</b> | 5 |
|                     |         | ohne           | 60°C          | n.d.                                    | 6,83<br>± 0,36   | 5,78<br>± 0,26 | n.d.           | <b>6,31</b> | 6 |
|                     |         | FKS            |               | n.d.                                    | 6,77<br>± 0,43   | 6,07<br>± 0,33 | n.d.           | <b>6,42</b> | 6 |
| pH-Kontrolle        | ja      | ohne           | 20°C          | 9,62 <sup>1</sup>                       | n.d.   | n.d.           | 6,48<br>± 0,76 | n.d.        | - |
|                     |         | FKS            |               | n.d.                                    | n.d.   | n.d.           | 6,30<br>± 0,58 | n.d.        | - |
|                     |         | ohne           | 60°C          | n.d.                                    | 6,65<br>± 0,0  | 6,30<br>± 0,50 | n.d.           | <b>6,48</b> | 2 |
|                     |         | FKS            |               | n.d.                                    | 6,65<br>± 0,0  | 6,30<br>± 0,58 | n.d.           | <b>6,48</b> | 2 |

<sup>1</sup> = gelb unterlegt: resultierender pH-Wert des Testansatzes „pH-Kontrolle“ (im Testansatz; vergl. Tab. 3)

**Tab. 8:** Virusmenge der Virussuspension (Virusausgangsmenge) sowie maximal nachweisbare Virusinaktivierung bei der Virustiterbestimmung nach Spearman & Kärber

| Viruskontrolle [Versuch]   | V1 [T = 60°C]  |                | V2 [T = 60°C]  |                | V3 [T = 20°C]  |                |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Proteinbelastung   | ohne           | FKS            | ohne           | FKS            | ohne           | FKS            |
| Ø Titer/Testvolumen<br>(lg ID <sub>50</sub> ) ± KI (95%)                               | 6,83<br>± 0,36 | 6,77<br>± 0,43 | 5,78<br>± 0,26 | 6,07<br>± 0,33 | 6,31<br>± 0,41 | 6,48<br>± 0,40 |
| Nachweisgrenze <sup>1</sup> [lg TD <sub>50</sub> ]<br>(verursacht durch Zytotoxizität) | ≤ 0,35         | ≤ 0,35         | ≤ 0,35         | ≤ 0,35         | ≤ 0,35         | ≤ 0,35         |
| <b>Maximal nachweisbare<br/>Virusinaktivierung<sup>1</sup></b>                         | <b>6,48</b>    | <b>6,42</b>    | <b>5,43</b>    | <b>5,72</b>    | <b>5,96</b>    | <b>6,13</b>    |

<sup>1</sup> = basierend auf dem Ergebnis der Empfänglichkeitskontrolle

**Tab. 9:** Prüfung des Wäsche-Desinfektionsverfahrens auf Wirksamkeit gegenüber Parvovirus bei 60° bzw. 20° C für 12 Minuten sowie für 7,5 Minuten im QST

| Parameter  |       | Ergebnisse aus den jeweiligen Versuchen |   |                                  |   |  |   |
|--|-------|---|---|----------------------------------|---|--|---|
| Protein-Zusatz   | Temp. | Versuch                                 | lg ID <sub>50</sub> /Testvol.<br>[lg ID <sub>50</sub> ± KI <sub>95%</sub> ] |                                  | Reduktionsfaktor [± KI <sub>95%</sub> ] |  | viruzid<br>Wirksam<br>(≥ 4 Zehner-<br>logstufen) <sup>3</sup> |
|  |       |   | Virus-<br>kontrolle   | Rest-<br>virusmenge <sup>1</sup> | Virus-<br>reduktion                     | Mittelwert<br>[RF <sub>(mi)</sub> ] <sup>2</sup> |   |
| <b>1. Prüf- bzw. Messpunkt (mit t = 12 Min.; wie zur Listung vorgesehen)</b> |       |   |   |                                  |   |  |   |
| ohne   | 60° C | V1                                      | 6,83 ± 0,36   | 0,93 ± 0,22                      | 5,90 ± 0,42                             | 5,55 ± 0,29                                      | ja  |
|  |       | V2                                      | 5,78 ± 0,26   | 0,58 ± 0,28                      | 5,19 ± 0,39                             |  |   |
| FKS  |       | V1                                      | 6,77 ± 0,43   | 1,98 ± 0,28                      | 4,44 ± 0,57                             | 4,27 ± 0,36                                      | ja  |
|  |       | V2                                      | 6,07 ± 0,33   | 1,46 ± 0,30                      | 4,09 ± 0,43                             |  |   |
| ohne   | 20° C | V3                                      | 6,31 ± 0,41   | 5,66 ± 0,34                      | 0,65 ± 0,53                             | n.d.   | nein  |
| FKS  |       |   | 6,48 ± 0,40   | 5,25 ± 0,24                      | 1,23 ± 0,46                             | n.d.   | nein  |
| <b>2. Prüf- bzw. Messpunkt (mit t = 6 Min.; Kontrollwert)</b>                |       |   |   |                                  |   |  |   |
| ohne   | 60° C | V1                                      | 6,83 ± 0,36   | 2,80 ± 0,34                      | 4,03 ± 0,49                             | 3,74 ± 0,32                                      | nein  |
|  |       | V2                                      | 5,78 ± 0,26   | 2,33 ± 0,31                      | 3,44 ± 0,41                             |  |   |
| FKS  |       | V1                                      | 6,77 ± 0,43   | 3,73 ± 0,31                      | 3,04 ± 0,53                             | 2,87 ± 0,35                                      | nein  |
|  |       | V2                                      | 6,07 ± 0,33   | 3,38 ± 0,31                      | 2,69 ± 0,45                             |  |   |
| ohne   | 20° C | V3                                      | 6,31 ± 0,41   | 5,83 ± 0,37                      | 0,48 ± 0,55                             | n.d.   | nein  |
| FKS  |       |   | 6,48 ± 0,40   | 5,89 ± 0,39                      | 0,58 ± 0,56                             | n.d.   | nein  |

<sup>1</sup> = Restvirustiter der Probe (lg ID<sub>50</sub>); ggf. unter Beachtung der Zytotoxizität

<sup>2</sup> = Virustiter der Viruskontrolle (lg ID<sub>50</sub>) minus Virustiter der Probe (lg ID<sub>50</sub>); Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen

<sup>3</sup> = Viruzide Aktivität gilt als gegeben, wenn RF ≥ lg 4,0 und der 95 % Vertrauensbereich ≤ 0,5 ist

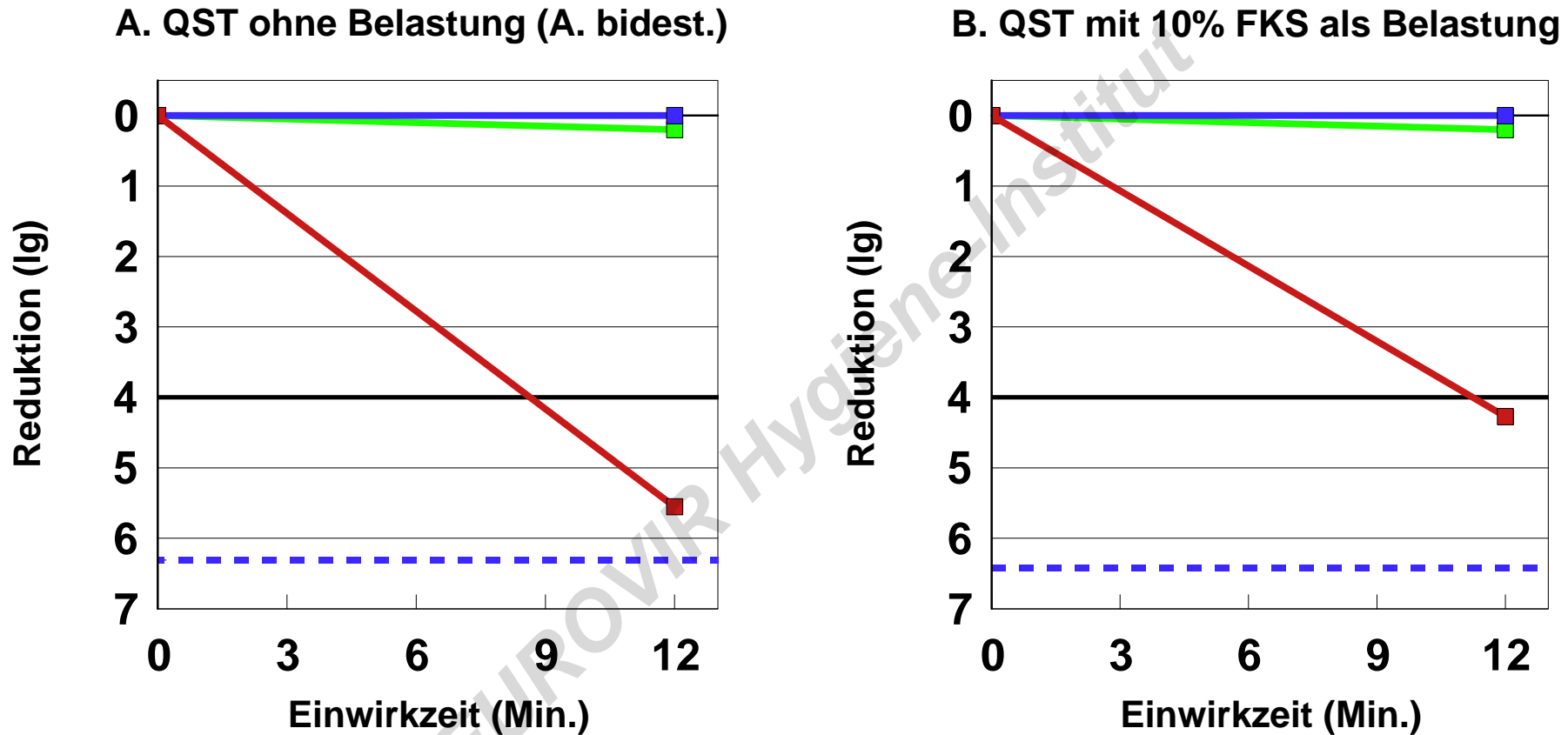
**Tab. 10:** Prüfung der Waschmittelkomponente auf Wirksamkeit gegen Parvovirus bei 60° und 20° C im quantitativen viruziden Suspensionstest (QST)

| Wirkstoff<br>/Reagenz                   | Einwirk-<br>zeit | Protein-<br>Zusatz | lg ID <sub>50</sub> /Testvol. |      |      | RF   |       |       | viruzid Wirksam <sup>1</sup> |      |
|---|------------------|--------------------|-------------------------------|------|------|------|-------|-------|------------------------------|------|
|   |                  |                    | 60°C                          | 20°C | 60°C | 20°C | 60°C  | 20°C  |                              |      |
| <i>BEICLEAN NFG<br/>plus BEIPUR PKS</i> | 12 Min.          | ohne               | 6,48                          | 5,95 | 6,83 | 0,36 | -0,17 | -0,52 | nein                         | nein |
|   |                  | FKS                | 6,3                           | 6,48 | 6,48 | 0,47 | -0,41 | 0,09  | nein                         | nein |
|   | 6 Min.           | ohne               | 6,65                          | 6,48 | 6,65 | 0,18 | -0,7  | -0,34 | nein                         | nein |
|   |                  | FKS                | 6,65                          | 6,48 | 6,3  | 0,12 | -0,41 | 0,17  | nein                         | nein |

<sup>1</sup> = Viruzide Aktivität gilt als gegeben, wenn RF ≥ lg 4,0 und der 95 % Vertrauensbereich ≤ 0,5 ist.



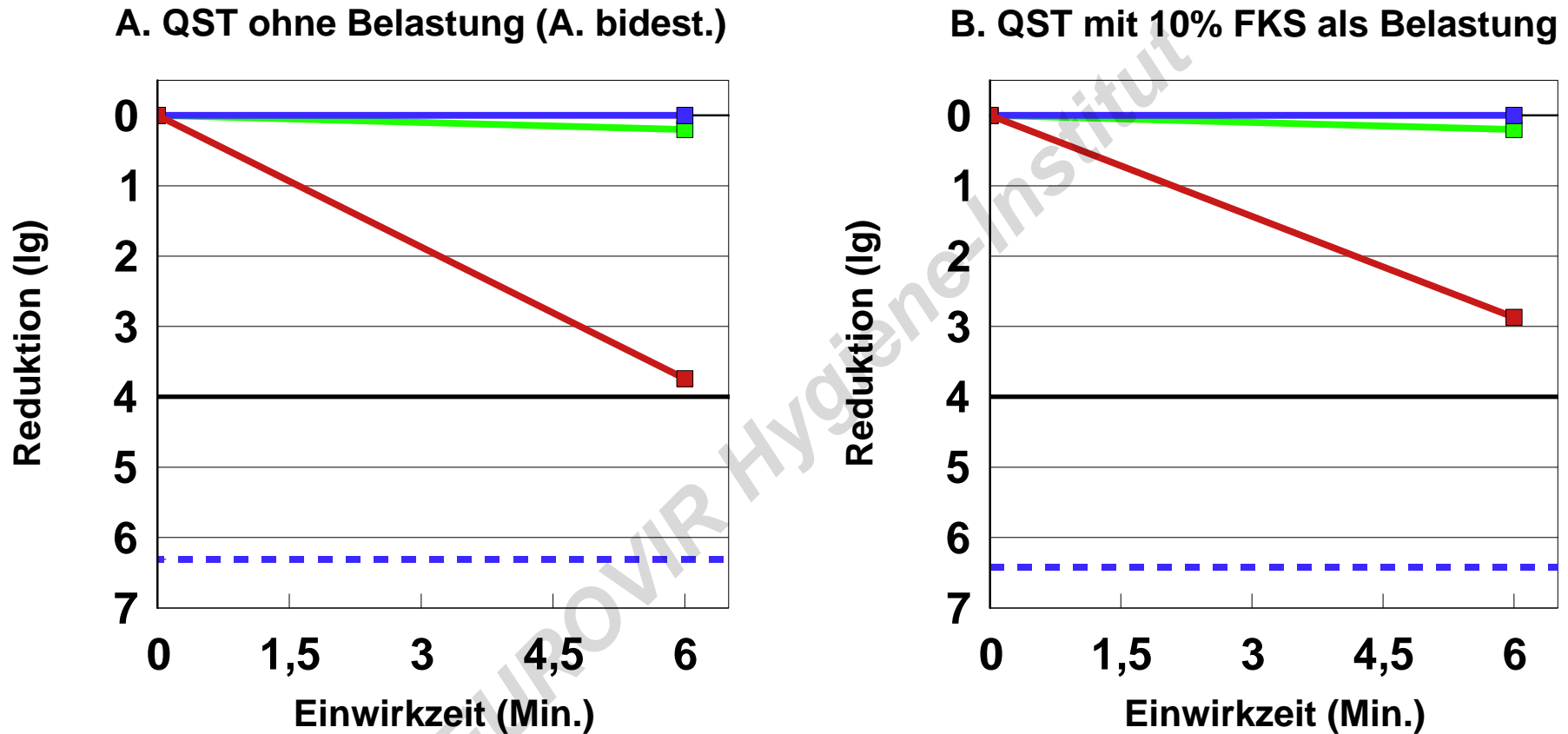
# Chemothermische Wäschedesinfektion: Inaktivierung von Parvovirus durch das BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren bei T = 60° C und t = 12 Min.



## Legende:

- — BEICLEAN NFG + BEIPUR PKS + BEIBLEACH POWER ACTIVE
- — BEICLEAN NFG + BEIPUR PKS
- — Viruskontrolle
- Mindestanforderung 4 lg Reduktion
- - - Nachweisgrenze d. Testsystems

# Chemothermische Wäschedesinfektion: Inaktivierung von Parvovirus durch das BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren bei T = 60° C und t = 6 Min.



## Legende:

- — BEICLEAN NFG + BEIPUR PKS + BEIBLEACH POWER ACTIVE
- — BEICLEAN NFG + BEIPUR PKS
- — Viruskontrolle
- Mindestanforderung 4 lg Reduktion
- Nachweisgrenze d. Testsystems

**Erläuterungen zu den Abbildungen:**

**zur Abb. 1: Inaktivierung von bovinem Parvovirus durch das BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren bei T = 60° C im quantitativen viruziden Suspensionstest (QST) - 1. Prüf- bzw. Messpunkt (t = 12 Min.)**

In Abb. 1 ist die Virusreduktion (lg ID<sub>50</sub>) gegen die Einwirkzeit (Min.) aufgetragen. Die Viruskontrolle bzw. die Virusausgangsmenge ist ebenfalls dargestellt (lila Linie). Die Virusinaktivierungsraten sind für die einzelnen Proteinbelastungen (A. bidest bzw. 10 % FKS) separat dargestellt (Teilabbildungen A und B).

Das Testsystem (repräsentiert durch die gestrichelte lila Linie) erlaubte eine Erfassung der Virusreduktion von im Mittel etwa 6,3 Zehnerlogstufen. Die erforderliche Mindestanforderung von RF = 4 ist durch eine fett gedruckte schwarze Linie hervorgehoben.

Nach einer Einwirkzeit von **12 Min.** war bei dem untersuchten Verfahren, bestehend aus **BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren** bei **T = 60° C** ohne Proteinzusatz noch eine gewisse Menge Restvirus nachweisbar. Die Virusreduktion betrug insgesamt **RF<sub>[mi]</sub> = 5,55 ± 0,29** (rote Linie; in A).

Mit 10 % FKS als Belastung war ebenfalls noch **Restvirus** zu beobachten. Die Virusinaktivierung betrug insgesamt **RF<sub>[mi]</sub> = 4,27 ± 0,36** (rote Linie; in B).

Eine Prüfung der Waschmittelkomponenten alleine ergab, dass keine ausreichende viruzide Wirksamkeit gegeben war (grüne Linie).

**zur Abb. 2: Inaktivierung von bovinem Parvovirus durch das BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren bei T = 60° C im quantitativen viruziden Suspensionstest (QST) - 2. Prüf- bzw. Messpunkt (t = 6 Min.)**

Die Art der Darstellung ist identisch mit der in Abb. 1.

Nach einer Einwirkzeit von **6 Min.** war bei dem untersuchten Verfahren ohne Proteinzusatz **Restvirus** nachweisbar. Die Virusreduktion betrug nach der Hälfte der vorgesehenen Einwirkzeit insgesamt **RF<sub>[mi]</sub> = 3,74 ± 0,32** (rote Linie; in A).

Mit Belastung (10 % FKS) war ebenfalls noch Restvirus nachweisbar. Die Virusinaktivierung betrug nach der Hälfte der vorgesehenen Einwirkzeit **RF<sub>[mi]</sub> = 2,87 ± 0,35** (rote Linie; in B).

**- Anlage 2: Versuchsprotokolle -**

- BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren; pH-Werte
- BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren; Versuch V1 (60° C)
- BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren; Versuch V2 (60° C)
- BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren; Versuch V3 (20° C)

EUROVIR Hygiene-Institut

**Wäschedesinfektionsverfahren: BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren / pH-Werte**  
**CHT R. Beitlich GmbH**

Durchführung: 20.04.10      Temperatur der Lösungen: 22,0 °C      Steilheit pH-Meter: -57,0 mV/pH

Wäschedesinfektionsverfahren: **BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren** bestehend aus

Produkt 1: **Beiclean NFG** (Ch.-Bez.: 0001034642; Muster erhalten: 11.03.2010; Lagerung: bei RT)

Produkt 2: **Beipur PKS** (Ch.-Bez.: 0001034595; Muster erhalten: 11.03.2010; Lagerung: bei RT)

Produkt 3: **Beibleach Power Active** (Ch.-Bez.: 0001034756; Muster erhalten: 08.03.2010; Lagerung: bei RT)

Belastung(en): ohne Belastung und 10 % FKS

Versuchsmethodik: quantitativer viruzider Suspensionstest (DVV/RKI-Leitlinie; Stand 08/08)

Testgemisch: 1 Teil Belastung + 1 Teil Virussuspension + 8 Teile 1,25fache Desinfektionsmittellösung

**Zubereitung der Gebrauchslösung:** (in der angegebenen Reihenfolge)

- **Beiclean NFG** und **Beipur PKS** wurden unter Rühren in vortemperierten hartem Wasser (20° C) für 2 Min. gelöst.
- Nachfolgend wurde **Beibleach Power Active** zugegeben. Nach 2 min. intensivem Mischen wurde ein Aliquot entnommen und sofort in den Testansatz gegeben

**Tab. 1: Dosierung der Komponenten**

| Produkte  | Produkt (1x) | Gebrauchslg.<br>(x 1,25) | Produkt<br>(pro 5 L) | pH d.<br>Gebrauchslg. |
|---|--------------|--------------------------|----------------------|-----------------------|
| <b>Beiclean NFG</b><br>[Ch.-Bez.: 0001034642]           | 0,4 mL/L     | 0,5 mL                   | 2,5 mL               | <b>pH 10,16</b>       |
| <b>Beipur PKS</b><br>[Ch.-Bez.: 0001034595]             | 1,2 mL/L     | 1,5 mL                   | 7,5 mL               |                       |
| <b>Beibleach Power Active</b><br>[Ch.-Bez.: 0001034756] | 0,8 mL/L     | 1,0 mL                   | 5,0 mL               |                       |

**Tab. 2: Zusammensetzung der Proben sowie deren pH-Werte**

| Mittel                      | A) <b>Beiclean NFG</b> plus<br><b>Beipur PKS</b> plus<br><b>Beibleach Power Active</b> |        | B) <b>Beiclean NFG</b> plus<br><b>Beipur PKS</b> |        | C) <b>Beibleach Power Active</b> |        |
|-----------------------------|--|--------|--|--------|----------------------------------|--------|
| a. bidest                   | 50 µl  |        | 50 µl  |        | 50 µl                            |        |
| FKS <sup>1</sup>            |  | 50 µl  |  | 50 µl  |                                  | 50 µl  |
| Med. <sup>2</sup>           | 50 µl  | 50 µl  | 50 µl  | 50 µl  | 50 µl                            | 50 µl  |
| Produkt(e) <sup>3</sup>     | 400 µl   | 400 µl | 400 µl   | 400 µl | 400 µl                           | 400 µl |
| <b>pH-Wert</b> <sup>4</sup> | 9,62   | 9,37   | 10,66  | 10,26  | 6,44                             | 6,58   |

<sup>1</sup> = foetales Kälberserum; Endkonzentration in der Testmischung: 10 %

<sup>2</sup> = DMEM mit 5 % FKS

<sup>3</sup> = jeweilige Lösung in 1,25facher Konzentration (vergl. Tab.1); Endkonzentration: 1fach

<sup>4</sup> = pH-Wert der Testmischung; Endvolumen: 500 µL

**CHT R. Beitlich GmbH**

Virus: BPV (Konz. 53)

Temperatur: 60° C

Zeit: 12 bzw. 6 Min.

Durchführung: 22.04.10

Auswertung: 06.05.10 (14 p.i.)

Zellen: FKL-RKI (# 14)

Medium: DMEM (+1% Peni./Strep; + 5 % FKS)

Wäschedesinfektionsverfahren: **BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren** bestehend aus

Produkt 1: **Beiclean NFG** (Ch.-Bez.: 0001034642; Muster erhalten: 11.03.2010; Lagerung: bei RT)

Produkt 2: **Beipur PKS** (Ch.-Bez.: 0001034595; Muster erhalten: 11.03.2010; Lagerung: bei RT)

Produkt 3: **Beibleach Power Active** (Ch.-Bez.: 0001034756; Muster erhalten: 08.03.2010; Lagerung: bei RT)

Belastung(en): ohne Belastung oder 10 % FKS

Prüfansätze: # 1. mit t = 12 Min. sowie # 2. mit t = 6 Min.

Versuchsmethodik: quantitativer viruzider Suspensionstest (DVV/RKI-Leitlinie; Stand 08/08)

Testgemisch: 1 Teil Belastung + 1 Teil Virussuspension + 8 Teile 1,25fache Desinfektionsmittellösung

**Zubereitung der Gebrauchslösung:** (in der angegebenen Reihenfolge)

- **Beiclean NFG** und **Beipur PKS** wurden unter Rühren in vortemperierten hartem Wasser (60° C) für 2 Min. gelöst.
- Nachfolgend wurde **Beibleach Power Active** zugegeben. Nach 2 min. intensivem Mischen wurde ein Aliquot entnommen und sofort in den Testansatz gegeben

**Tab. 1: Dosierung der Komponenten**

| Produkte  | Produkt (1x) | Gebrauchslg. (x 1,25) | Produkt (pro 5 L) | pH d. Gebrauchslsg. |
|---|--------------|-----------------------|-------------------|---------------------|
| <b>Beiclean NFG</b><br>[Ch.-Bez.: 0001034642]           | 0,4 mL/L     | 0,5 mL                | 2,5 mL            | <b>pH 10,17</b>     |
| <b>Beipur PKS</b><br>[Ch.-Bez.: 0001034595]             | 1,2 mL/L     | 1,5 mL                | 7,5 mL            |                     |
| <b>Beibleach Power Active</b><br>[Ch.-Bez.: 0001034756] | 0,8 mL/L     | 1,0 mL                | 5,0 mL            |                     |

**Tab. 2: Zusammensetzung der Proben:**

| Probe Nr.        | 1   | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ansatz           | Prüfansatz # 1 / WM + DM (komplett) mit t = 12 Min. |       |       |       |       |       |
| Belastung        | ohne  |       |       | FKS   |       |       |
| A. bidest        | 15µL  | 15µL  | 15µL  |       |       |       |
| FKS <sup>1</sup> |   |       |       | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| BPV              | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| WM/DM # 1        | 120µL   | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL |
| Gelfiltration    | +   | +     | +     | +     | +     | +     |

| Probe Nr.        | 7  | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ansatz           | Prüfansatz # 2 / WM + DM (komplett) mit t = 6 Min. |       |       |       |       |       |
| Belastung        | ohne   |       |       | FKS   |       |       |
| A. bidest        | 15µL   | 15µL  | 15µL  |       |       |       |
| FKS <sup>1</sup> |  |       |       | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| BPV              | 15µL   | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| WM/DM # 2        | 120µL  | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL |
| Gelfiltration    | +  | +     | +     | +     | +     | +     |

|                   |                          |       |       |       |       |       |
|-------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Probe Nr.         | 13                       | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    |
| Ansatz            | Viruskontrolle / 12 Min. |       |       |       |       |       |
| Belastung         | ohne                     |       |       | FKS   |       |       |
| A. bidest         | 15µL                     | 15µL  | 15µL  |       |       |       |
| FKS <sup>1</sup>  |                          |       |       | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| BPV               | 15µL                     | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| hH <sub>2</sub> O | 120µL                    | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL |
| Gelfiltration     | +                        | +     | +     | +     | +     | +     |

|                      |              |       |             |       |                     |       |                    |       |
|----------------------|--------------|-------|-------------|-------|---------------------|-------|--------------------|-------|
| Probe Nr.            | 19           | 20    | 21          | 22    | 23                  | 24    | 25                 | 26    |
| Ansatz               | WM / 12 Min. |       | WM / 6 Min. |       | pH-Kontr. / 12 Min. |       | VK 20° C / 12 Min. |       |
| Belastung            | ohne         | FKS   | ohne        | FKS   | ohne                | FKS   | ohne               | FKS   |
| A. bidest            | 15µL         |       | 15µL        |       | 15µL                |       | 15µL               |       |
| FKS <sup>1</sup>     |              | 15µL  |             | 15µL  |                     | 15µL  |                    | 15µL  |
| BPV                  | 15µL         | 15µL  | 15µL        | 15µL  | 15µL                | 15µL  | 15µL               | 15µL  |
| WM #1                | 120µL        | 120µL |             |       |                     |       |                    |       |
| WM #2                |              |       | 120µL       | 120µL |                     |       |                    |       |
| pH-Lsg. <sup>2</sup> |              |       |             |       | 120µL               | 120µL |                    |       |
| hH <sub>2</sub> O    |              |       |             |       |                     |       | 120µL              | 120µL |
| Gelfiltration        | +            | +     | +           | +     | +                   | +     | +                  | +     |

|                   |                |       |        |       |           |       |        |       |                    |                |       |       |       |
|-------------------|----------------|-------|--------|-------|-----------|-------|--------|-------|--------------------|----------------|-------|-------|-------|
| Probe Nr.         | 27             | 28    | 29     | 30    | 31        | 32    | 33     | 34    | 35-39              | 40-44          | 45    | 46    | 47    |
| Ansatz            | WM + DM / Tox. |       |        |       | WM / Tox. |       |        |       | Tox. f. Empf.-test | Tox. f. Nachw. | VK/N  |       |       |
|                   | 12 Min.        |       | 6 Min. |       | 12 Min.   |       | 6 Min. |       |                    |                |       |       |       |
| Belastung         | ohne           | FKS   | ohne   | FKS   | ohne      | FKS   | ohne   | FKS   | ohne               | FKS            | ohne  | FKS   | ohne  |
| A. bidest         | 15 µl          |       | 15 µl  |       | 15 µl     |       | 15 µl  |       | 15 µl              |                | 15 µl |       | 15 µl |
| FKS <sup>1</sup>  |                | 15 µl |        | 15 µl |           | 15 µl |        | 15 µl |                    | 15 µl          |       | 15 µl |       |
| Medium            | 15 µl          | 15 µl | 15 µl  | 15 µl | 15 µl     | 15 µl | 15 µl  | 15 µl | 15 µl              | 15 µl          | 15 µl | 15 µl |       |
| BPV               |                |       |        |       |           |       |        |       |                    |                |       |       | 15 µl |
| (WM+DM) #1        | 120µl          | 120µl |        |       |           |       |        |       | 120µl              | 120µl          | 120µl | 120µl |       |
| (WM+DM) #2        |                |       | 120µl  | 120µl |           |       |        |       |                    |                |       |       |       |
| WM #1             |                |       |        |       | 120µl     | 120µl |        |       |                    |                |       |       |       |
| WM #2             |                |       |        |       |           |       | 120µl  | 120µl |                    |                |       |       |       |
| hH <sub>2</sub> O |                |       |        |       |           |       |        |       |                    |                |       |       | 120µl |
| Gelfiltration     | +              | +     | +      | +     | +         | +     | +      | +     | +                  | +              | +     | +     | -     |

<sup>1</sup> = foetales Kälberserum; Endkonzentration in der Testmischung: 10 %

<sup>2</sup> = pH-Lösung; ergibt mit A. bidest als Belastung (1+1+8) pH = 9,62 im Testansatz (vergl. pH-Werte)

- **Detoxifikation:** die Reinigung der Proben mittels Gelfiltration erfolgte mit MikroSpin S-400HR (*GE Healthcare*), die zuvor mit je 200 µL einer 0,25% igen BSA-Lösg. gewaschen wurden.

**Ergebnisse:** Verdünnung 1:5 (auf Zellen: 100 µL)

| Probe Nr.                                   | 1   | 2    | 3    | Ø     | 4                  | 5    | 6    | Ø     |
|---|---|------|------|-------|--------------------|------|------|-------|
| Ansatz                                      | Prüfansatz # 1 / WM + DM (komplett) mit t = 12 Min. |      |      |       |                    |      |      |       |
| Belastung                                   | ohne  |      |      |       | FKS                |      |      |       |
| 1 / -0,7                                    | 3/4 <sup>1</sup>                                    | 4/4  | 3/4  | 10/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 2 / -1,4                                    | 0/4   | 0/4  | 0/4  | 0/12  | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 3 / -2,1                                    |   |      |      |       | 3/4                | 1/4  | 4/4  | 8/12  |
| 4 / -2,8                                    |   |      |      |       | 1/4                | 0/4  | 0/4  | 1/12  |
| 5 / -3,5                                    |   |      |      |       | 0/4                |      | 1/4  | 1/12  |
| 6 / -4,2                                    |   |      |      |       |                    |      | 0/4  | 0/12  |
| 7 / -4,9                                    |   |      |      |       |                    |      |      |       |
| 8 / -5,6                                    |   |      |      |       |                    |      |      |       |
| 9 / -6,3                                    |   |      |      |       |                    |      |      |       |
| 10 / -7,0                                   |   |      |      |       |                    |      |      |       |
| 11 / -7,7                                   |   |      |      |       |                    |      |      |       |
| ZK  | 0/4   | 0/4  | 0/4  | 0/12  | 0/4                | 0/4  | 0/4  | 0/12  |
| Titer/Testvol.<br>(lg ID <sub>50</sub> )    | 0,88  | 1,05 | 0,88 | 0,93  | 2,45               | 1,93 | 2,63 | 2,33  |
| mittl. Virustiter<br>± K (95%) <sup>2</sup> | 0,93 ± 0,22   |      |      |       | 2,33 ± 0,37        |      |      |       |
| <b>RF</b><br>± K (95%) <sup>3</sup>         | <b>5,90 ± 0,42</b>                                  |      |      |       | <b>4,44 ± 0,57</b> |      |      |       |

| Probe Nr.                                   | 7  | 8    | 9    | Ø     | 10                 | 11  | 12   | Ø     |
|---|--|------|------|-------|--------------------|-----|------|-------|
| Ansatz                                      | Prüfansatz # 2 / WM + DM (komplett) mit t = 6 Min. |      |      |       |                    |     |      |       |
| Belastung                                   | ohne   |      |      |       | FKS                |     |      |       |
| 1 / -0,7                                    | 4/4  | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 |
| 2 / -1,4                                    | 4/4  | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 |
| 3 / -2,1                                    | 4/4  | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 |
| 4 / -2,8                                    | 2/4  | 3/4  | 0/4  | 5/12  | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 |
| 5 / -3,5                                    | 0/4  | 0/4  | 1/4  | 1/12  | 3/4                | 2/4 | 4/4  | 9/12  |
| 6 / -4,2                                    |  |      | 0/4  | 0/12  | 1/4                | 0/4 | 0/4  | 1/12  |
| 7 / -4,9                                    |  |      |      |       | 0/4                |     |      | 0/12  |
| 8 / -5,6                                    |  |      |      |       |                    |     |      |       |
| 9 / -6,3                                    |  |      |      |       |                    |     |      |       |
| 10 / -7,0                                   |  |      |      |       |                    |     |      |       |
| 11 / -7,7                                   |  |      |      |       |                    |     |      |       |
| ZK  | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/12  | 0/4                | 0/4 | 0/4  | 0/12  |
| Titer/Testvol.<br>(lg ID <sub>50</sub> )    | 2,8  | 2,98 | 2,63 | 2,8   | 3,85               | 3,5 | 3,85 | 3,73  |
| mittl. Virustiter<br>± K (95%) <sup>2</sup> | 2,80 ± 0,34  |      |      |       | 3,73 ± 0,31        |     |      |       |
| <b>RF</b><br>± K (95%) <sup>3</sup>         | <b>4,03 ± 0,49</b>                                 |      |      |       | <b>3,04 ± 0,53</b> |     |      |       |

<sup>1</sup> = Anzahl der viruspositiven Zellkultureinheiten zu Gesamtzahl der Zellkultureinheiten (bzw. Replikate) der entspr. Verdünnung

<sup>2</sup> = Berechnung des 95 % Konfidenzintervalls des Titerwertes bzw. des Reduktionsfaktors nach der DVV/RKI-Leitlinie

<sup>3</sup> = Virusreduktion: lg ID<sub>50</sub> der Viruskontrolle minus lg ID<sub>50</sub> der Probe; bei gleicher Belastung; nach der DVV/RKI-Leitlinie



| Probe Nr.  | 13                 | 14  | 15   | Ø     | 16                 | 17  | 18   | Ø     |
|--|--------------------|-----|------|-------|--------------------|-----|------|-------|
| Ansatz   | Viruskontrolle     |     |      |       |                    |     |      |       |
| Belastung  | ohne               |     |      |       | FKS                |     |      |       |
| 1 / -0,7   | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 |
| 2 / -1,4   | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 |
| 3 / -2,1   | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 |
| 4 / -2,8   | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 |
| 5 / -3,5   | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 |
| 6 / -4,2   | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 |
| 7 / -4,9   | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 |
| 8 / -5,6   | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4  | 12/12 |
| 9 / -6,3   | 4/4                | 4/4 | 3/4  | 11/12 | 4/4                | 3/4 | 2/4  | 9/12  |
| 10 / -7,0  | 0/4                | 1/4 | 1/4  | 2/12  | 0/4                | 2/4 | 1/4  | 3/12  |
| 11 / -7,7  |                    | 1/4 | 1/4  | 2/12  |                    | 1/4 | 1/4  | 2/12  |
| ZK   | 0/4                | 0/4 | 0/4  | 0/12  | 0/4                | 0/4 | 0/4  | 0/12  |
| Titer/Testvol.<br>(lg ID <sub>50</sub> )           | 6,65               | 7   | 6,83 | 6,83  | 6,65               | 7   | 6,65 | 6,77  |
| <b>mittl. Virustiter<br/>± K (95%)<sup>2</sup></b> | <b>6,83 ± 0,36</b> |     |      |       | <b>6,77 ± 0,43</b> |     |      |       |

| Probe Nr.  | 19                     | 20                     | 21                     | 22                     | 23                     | 24                     | 25                     | 26                      |
|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Ansatz   | Virusinaktivierung     |                        |                        |                        |                        |                        | Viruskontrolle         |                         |
|  | WM #1                  |                        | WM #2                  |                        | pH-Kontrolle           |                        | VK 20 °C               |                         |
| Belastung  | ohne                   | FKS                    | ohne                   | FKS                    | ohne                   | FKS                    | ohne                   | FKS                     |
| 1 / -0,7   | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                     |
| 2 / -1,4   | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                     |
| 3 / -2,1   | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                     |
| 4 / -2,8   | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                     |
| 5 / -3,5   | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                     |
| 6 / -4,2   | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                     |
| 7 / -4,9   | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                     |
| 8 / -5,6   | 4/4                    | 4/4                    | 3/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 4/4                     |
| 9 / -6,3   | 1/4                    | 1/4                    | 4/4                    | 3/4                    | 4/4                    | 4/4                    | 3/4                    | 3/4                     |
| 10 / -7,0  | 2/4                    | 1/4                    | 1/4                    | 0/4                    | 0/4                    | 0/4                    | 0/4                    | 1/4                     |
| 11 / -7,7  | 0/4                    | 0/4                    | 0/4                    | 1/4                    |                        |                        |                        | 1/4                     |
| ZK   | 0/4                    | 0/4                    | 0/4                    | 0/4                    | 0/4                    | 0/4                    | 0/4                    | 0/4                     |
| Titer/Testvol.<br>lg ID <sub>50</sub> ± K (95%) <sup>2</sup> | 6,48<br>± 0,76         | 6,3<br>± 0,71          | 6,65<br>± 0,71         | 6,65<br>± 0,71         | 6,65<br>± 0,0          | 6,65<br>± 0,0          | 6,48<br>± 0,50         | 6,83<br>± 0,87          |
| <b>RF<br/>± K (95%)<sup>3</sup></b>                          | <b>0,36<br/>± 0,84</b> | <b>0,47<br/>± 0,83</b> | <b>0,18<br/>± 0,79</b> | <b>0,12<br/>± 0,83</b> | <b>0,18<br/>± 0,36</b> | <b>0,12<br/>± 0,43</b> | <b>0,36<br/>± 0,62</b> | <b>-0,06<br/>± 0,97</b> |

<sup>1</sup> = Anzahl der viruspositiven Zellkultureinheiten zu Gesamtzahl der Zellkultureinheiten (bzw. Replikate) der entspr. Verdünnung

<sup>2</sup> = Berechnung des 95 % Konfidenzintervalls des Titerwertes bzw. des Reduktionsfaktors nach der DVV/RKI-Leitlinie

<sup>3</sup> = Virusreduktion: lg ID<sub>50</sub> der Viruskontrolle minus lg ID<sub>50</sub> der Probe; bei gleicher Belastung; nach der DVV/RKI-Leitlinie

| Probe Nr.                                       | 27                  | 28     | 29         | 30     | 31     | 32     | 33     | 34     |
|---|---------------------|--------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Ansatz  | Toxizitätskontrolle |        |            |        |        |        |        |        |
|   | WM + DM #1          |        | WM + DM #2 |        | WM #1  |        | WM #2  |        |
| Belastung                                       | ohne                | FKS    | ohne       | FKS    | ohne   | FKS    | ohne   | FKS    |
| 1 / -0,7  | 0/4                 | 0/4    | 0/4        | 0/4    | 0/4    | 0/4    | 0/4    | 0/4    |
| 2 / -1,4  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| 3 / -2,1  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| 4 / -2,8  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| 5 / -3,5  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| 6 / -4,2  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| ZK  | 0/4                 | 0/4    | 0/4        | 0/4    | 0/4    | 0/4    | 0/4    | 0/4    |
| Titer/Testvol.<br>lg ID <sub>50</sub> ± K (95%) | ≤ 0,35              | ≤ 0,35 | ≤ 0,35     | ≤ 0,35 | ≤ 0,35 | ≤ 0,35 | ≤ 0,35 | ≤ 0,35 |

| Empfänglichkeitskontrolle                          |                |                |                |                |                | Nachwirkungskontrolle |                |                |
|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Probe Nr.  | 35-37          | 40-42          | 38-39          | 43-44          | -              | 45                    | 46             | 47 a,b         |
| Produktkonz.                                       | lg -0,7 (v1)   |                | lg -1,4 (v2)   |                | VK             | lg -0,7 (v1)          |                | VK             |
| Ansatz   | ohne           | FKS            | ohne           | FKS            | -              | ohne                  | FKS            | -              |
| 1 / -0,7   | 4/4            | 4/4            | 4/4            | 4/4            | 16/16          | 4/4                   | 4/4            | 8/8            |
| 2 / -1,4   | 4/4            | 4/4            | 4/4            | 4/4            | 16/16          | 4/4                   | 4/4            | 8/8            |
| 3 / -2,1   | 4/4            | 4/4            | 4/4            | 4/4            | 16/16          | 4/4                   | 4/4            | 8/8            |
| 4 / -2,8   | 4/4            | 4/4            | 4/4            | 4/4            | 16/16          | 4/4                   | 4/4            | 8/8            |
| 5 / -3,5   | 4/4            | 4/4            | 4/4            | 4/4            | 16/16          | 4/4                   | 4/4            | 8/8            |
| 6 / -4,2   | 4/4            | 4/4            | 4/4            | 4/4            | 16/16          | 4/4                   | 4/4            | 8/8            |
| 7 / -4,9   | 4/4            | 3/4            | 4/4            | 3/4            | 16/16          | 2/4                   | 2/4            | 8/8            |
| 8 / -5,6   | 2/4            | 2/4            | 2/4            | 2/4            | 6/16           | 1/4                   | 1/4            | 2/8            |
| 9 / -6,3   | 0/4            | 0/4            | 0/4            | 1/4            | 1/16           | 0/4                   | 0/4            | 0/8            |
| 10 / -7,0  | 0/4            | 0/4            |                | 1/4            | 0/16           |                       |                |                |
| 11 / -7,7  |                |                |                | 0/4            |                |                       |                |                |
| ZK   | 0/4            | 0/4            | 0/4            | 0/4            | 0/16           | 0/4                   | 0/4            | 0/8            |
| Titer/Testvol.<br>[lg ID <sub>50</sub> ] ± K (95%) | 5,60<br>± 0,58 | 5,43<br>± 0,76 | 5,60<br>± 0,58 | 5,78<br>± 1,04 | 5,56<br>± 0,28 | 5,08<br>± 0,76        | 5,08<br>± 0,76 | 5,43 ±<br>0,33 |
| Δ Titerwert <sup>1</sup>                           | -0,04          | 0,13           | -0,04          | -0,22          | -              | 0,35                  | 0,35           | -              |
| <b>Empfänglich</b> <sup>2</sup>                    | <b>ja</b>      | <b>ja</b>      | <b>ja</b>      | <b>ja</b>      | -              |                       |                |                |
| <b>Nachwirkung</b> <sup>3</sup>                    |                |                |                |                |                | <b>nein</b>           | <b>nein</b>    | -              |

<sup>1</sup> = lg ID<sub>50</sub> der Viruskontrolle minus lg ID<sub>50</sub> der Probe; nach der DVV/RKI-Leitlinie (08/08)

<sup>2</sup> = Empfänglichkeit gilt nach der DVV/RKI-Leitlinie (08/08) als gegeben wenn Δ Titerwert ≤ lg 0,5 ist

<sup>3</sup> = Nachwirkung gilt nach der DVV/RKI-Leitlinie (08/08) als nicht gegeben wenn Δ Titerwert ≤ lg 0,5 ist

**Anhang zum Protokoll - Verwendete Materialien und Reagenzien:**

• **Testvirus**

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Testvirus                 | Bovines Parvovirus (BPV)   |
| Stamm                     | Haden  |
| Herkunft                  | Robert Koch-Institut, Berlin<br>Virusmaterial (Zellkulturüberstand) v. 01.02.1999 überlassen von Dr. Kao (AG Pauli)<br>keine weiteren Angaben zur Viruspassage (entsp. Viruspassage RKI +0)  |
| verwendetes Virusmaterial | <b>Ausgangsmaterial:</b> Zellkulturüberstand von BPV-infizierten FKL-Zellen<br>Virusanzucht #53 v. 08.05.2009; Viruspassage Impfvirus: RKI +1<br><b>Virusmaterial:</b> am 23.02.2010 mittels Ultrazentrifugation (45 Ti) angereichert;<br>Lagerung seit dem bei -20 °C; Bez.: „Konz. 53“ |

• **Zellsystem**

|                        |   |
|------------------------|---|
| Zellen                 | foetale Kälberlungenzellen (FKL)  |
| Herkunft               | Robert Koch-Institut, Berlin<br>erhalten als KL-Zellen; Zellpassage: 2 / 3 v. 05.12.1997 (entsp. Zellpassage RKI +0)<br>ab dem 14.09.2000 im Institut als FKL-RKI verwendet |
| verwendete Zellpassage | RKI + 3 / + 8 / + 14  |

• **sonstiges Material bzw. Reagenzien**

| <i>Material</i>                        | <i>Lieferant</i>  | <i>Bst. Nr.</i> | <i>Ch.-B.</i> | <i>Verfallsdatum</i> |
|--|-------------------|-----------------|---------------|----------------------|
| DMEM                                   | Biochrom          | F 0435          | 0990 T        | 03/2011              |
| Glutamin                               | Biochrom          | K 0283          | 0063 T        | 01/2012              |
| Pen./Strept.                           | Biochrom          | A 2213          | 0010 T        | 01/2012              |
| FKS                                    | Biochrom          | S 0115          | 0121 K        | 02/2011              |
| PBS                                    | Biochrom          | L 1820          | 0526 T        | 06/2012              |
| BSA                                    | Roth              | T844.2          | 22571370      | -                    |
| MicroSpin S-400 HR                     | GE Healthcare/VWR | 27-5140-01      | 383416        | 12/2011              |
| MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O | Roth              | 2189.1          | 21896698      | Lsg. A: 27.04.10     |
| CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | Roth              | 5239.1          | 01888370      |                      |
| NaHCO <sub>3</sub>                     | Roth              | 6885.1          | 129101324     | Lsg. B: 29.04.10     |

• **Versuchsdurchführung und Verantwortlichkeiten**

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Versuchsteil                 | Durchgeführt von (Position)   |
| Versuchsleitung              | Dr. Ch. Jursch (Laborleiter)  |
| Kontr. Produkteinwaage       | Fr. I. Grund (Biologielaborantin) und Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) |
| Versuchsdurchführung         | Fr. I. Grund (Biologielaborantin) und Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) |
| Zuarbeit: Zellkultur         | Fr. I. Grund (Biologielaborantin)                                       |
| Zuarbeit: Laborservice       | Fr. I. Grund (Biologielaborantin) und Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) |
| Ablesung & Rohdatenprotokoll | Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) und Dr. Ch. Jursch (Laborleiter)      |
| Dateneingabe & Auswertung    | Dr. Ch. Jursch (Laborleiter)  |

**CHT R. Beitlich GmbH**

Virus: BPV (Konz. 53)

Temperatur: 60° C

Zeit: 12 bzw. 6 Min.

Durchführung: 17.05.10

Auswertung: 31.05.10 (14 p.i.)

Zellen: FKL-RKI (# 10)

Medium: DMEM (+1% Peni./Strep; + 5 % FKS)

Wäschedesinfektionsverfahren: **BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren** bestehend aus

Produkt 1: **Beiclean NFG** (Ch.-Bez.: 0001034642; Muster erhalten: 11.03.2010; Lagerung: bei RT)

Produkt 2: **Beipur PKS** (Ch.-Bez.: 0001034595; Muster erhalten: 11.03.2010; Lagerung: bei RT)

Produkt 3: **Beibleach Power Active** (Ch.-Bez.: 0001034756; Muster erhalten: 08.03.2010; Lagerung: bei RT)

Belastung(en): ohne Belastung oder 10 % FKS

Prüfansätze: # 1. mit t = 12 Min. sowie # 2. mit t = 6 Min.

Versuchsmethodik: quantitativer viruzider Suspensionstest (DVV/RKI-Leitlinie; Stand 08/08)

Testgemisch: 1 Teil Belastung + 1 Teil Virussuspension + 8 Teile 1,25fache Desinfektionsmittellösung

**Zubereitung der Gebrauchslösung:** (in der angegebenen Reihenfolge)

- **Beiclean NFG** und **Beipur PKS** wurden unter Rühren in vortemperierten hartem Wasser (60° C) für 2 Min. gelöst.
- Nachfolgend wurde **Beibleach Power Active** zugegeben. Nach 2 min. intensivem Mischen wurde ein Aliquot entnommen und sofort in den Testansatz gegeben

**Tab. 1: Dosierung der Komponenten**

| Produkte  | Produkt (1x) | Gebrauchslg. (x 1,25) | Produkt (pro 10 L) | pH d. Gebrauchslsg. |
|---|--------------|-----------------------|--------------------|---------------------|
| <b>Beiclean NFG</b><br>[Ch.-Bez.: 0001034642]           | 0,4 mL/L     | 0,5 mL                | 5,0 mL             | <b>pH 10,17</b>     |
| <b>Beipur PKS</b><br>[Ch.-Bez.: 0001034595]             | 1,2 mL/L     | 1,5 mL                | 15,0 mL            |                     |
| <b>Beibleach Power Active</b><br>[Ch.-Bez.: 0001034756] | 0,8 mL/L     | 1,0 mL                | 10,0 mL            |                     |

**Tab. 2: Zusammensetzung der Proben:**

| Probe Nr.        | 1   | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ansatz           | Prüfansatz # 1 / WM + DM (komplett) mit t = 12 Min. |       |       |       |       |       |
| Belastung        | ohne  |       |       | FKS   |       |       |
| A. bidest        | 15µL  | 15µL  | 15µL  |       |       |       |
| FKS <sup>1</sup> |   |       |       | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| BPV              | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| WM/DM # 1        | 120µL   | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL |
| Gelfiltration    | +   | +     | +     | +     | +     | +     |

| Probe Nr.        | 7  | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ansatz           | Prüfansatz # 2 / WM + DM (komplett) mit t = 6 Min. |       |       |       |       |       |
| Belastung        | ohne   |       |       | FKS   |       |       |
| A. bidest        | 15µL   | 15µL  | 15µL  |       |       |       |
| FKS <sup>1</sup> |  |       |       | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| BPV              | 15µL   | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| WM/DM # 2        | 120µL  | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL |
| Gelfiltration    | +  | +     | +     | +     | +     | +     |

|                   |                          |       |       |       |       |       |
|-------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Probe Nr.         | 13                       | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    |
| Ansatz            | Viruskontrolle / 12 Min. |       |       |       |       |       |
| Belastung         | ohne                     |       |       | FKS   |       |       |
| A. bidest         | 15µL                     | 15µL  | 15µL  |       |       |       |
| FKS <sup>1</sup>  |                          |       |       | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| BPV               | 15µL                     | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| hH <sub>2</sub> O | 120µL                    | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL |
| Gelfiltration     | +                        | +     | +     | +     | +     | +     |

|                      |              |       |             |       |                     |       |                    |       |
|----------------------|--------------|-------|-------------|-------|---------------------|-------|--------------------|-------|
| Probe Nr.            | 19           | 20    | 21          | 22    | 23                  | 24    | 25                 | 26    |
| Ansatz               | WM / 12 Min. |       | WM / 6 Min. |       | pH-Kontr. / 12 Min. |       | VK 20° C / 12 Min. |       |
| Belastung            | ohne         | FKS   | ohne        | FKS   | ohne                | FKS   | ohne               | FKS   |
| A. bidest            | 15µL         |       | 15µL        |       | 15µL                |       | 15µL               |       |
| FKS <sup>1</sup>     |              | 15µL  |             | 15µL  |                     | 15µL  |                    | 15µL  |
| BPV                  | 15µL         | 15µL  | 15µL        | 15µL  | 15µL                | 15µL  | 15µL               | 15µL  |
| WM #1                | 120µL        | 120µL |             |       |                     |       |                    |       |
| WM #2                |              |       | 120µL       | 120µL |                     |       |                    |       |
| pH-Lsg. <sup>2</sup> |              |       |             |       | 120µL               | 120µL |                    |       |
| hH <sub>2</sub> O    |              |       |             |       |                     |       | 120µL              | 120µL |
| Gelfiltration        | +            | +     | +           | +     | +                   | +     | +                  | +     |

|                   |                |       |        |       |           |       |        |       |                    |                |       |       |       |
|-------------------|----------------|-------|--------|-------|-----------|-------|--------|-------|--------------------|----------------|-------|-------|-------|
| Probe Nr.         | 27             | 28    | 29     | 30    | 31        | 32    | 33     | 34    | 35-39              | 40-44          | 45    | 46    | 47    |
| Ansatz            | WM + DM / Tox. |       |        |       | WM / Tox. |       |        |       | Tox. f. Empf.-test | Tox. f. Nachw. | VK/N  |       |       |
|                   | 12 Min.        |       | 6 Min. |       | 12 Min.   |       | 6 Min. |       |                    |                |       |       |       |
| Belastung         | ohne           | FKS   | ohne   | FKS   | ohne      | FKS   | ohne   | FKS   | ohne               | FKS            | ohne  | FKS   | ohne  |
| A. bidest         | 15 µl          |       | 15 µl  |       | 15 µl     |       | 15 µl  |       | 15 µl              |                | 15 µl |       | 15 µl |
| FKS <sup>1</sup>  |                | 15 µl |        | 15 µl |           | 15 µl |        | 15 µl |                    | 15 µl          |       | 15 µl |       |
| Medium            | 15 µl          | 15 µl | 15 µl  | 15 µl | 15 µl     | 15 µl | 15 µl  | 15 µl | 15 µl              | 15 µl          | 15 µl | 15 µl |       |
| BPV               |                |       |        |       |           |       |        |       |                    |                |       |       | 15 µl |
| (WM+DM) #1        | 120µl          | 120µl |        |       |           |       |        |       | 120µl              | 120µl          | 120µl | 120µl |       |
| (WM+DM) #2        |                |       | 120µl  | 120µl |           |       |        |       |                    |                |       |       |       |
| WM #1             |                |       |        |       | 120µl     | 120µl |        |       |                    |                |       |       |       |
| WM #2             |                |       |        |       |           |       | 120µl  | 120µl |                    |                |       |       |       |
| hH <sub>2</sub> O |                |       |        |       |           |       |        |       |                    |                |       |       | 120µl |
| Gelfiltration     | +              | +     | +      | +     | +         | +     | +      | +     | +                  | +              | +     | +     | -     |

<sup>1</sup> = foetales Kälberserum; Endkonzentration in der Testmischung: 10 %

<sup>2</sup> = pH-Lösung; ergibt mit A. bidest als Belastung (1+1+8) pH = 9,62 im Testansatz (vergl. pH-Werte)

- **Detoxifikation:** die Reinigung der Proben mittels Gelfiltration erfolgte mit MikroSpin S-400HR (*GE Healthcare*), die zuvor mit je 200 µL einer 0,25% igen BSA-Lösg. gewaschen wurden.

**Ergebnisse:** Verdünnung 1:5 (auf Zellen: 100 µL)

| Probe Nr.                                   | 1   | 2    | 3   | Ø    | 4                  | 5   | 6   | Ø     |
|---|---|------|-----|------|--------------------|-----|-----|-------|
| Ansatz                                      | Prüfansatz # 1 / WM + DM (komplett) mit t = 12 Min. |      |     |      |                    |     |     |       |
| Belastung                                   | ohne  |      |     |      | FKS                |     |     |       |
| 1 / -0,7                                    | 1/4 <sup>1</sup>                                    | 1/4  | 2/4 | 4/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4 | 12/12 |
| 2 / -1,4                                    | 0/4   | 0/4  | 0/4 | 0/12 | 4/4                | 4/4 | 4/4 | 12/12 |
| 3 / -2,1                                    |   |      |     |      | 0/4                | 2/4 | 2/4 | 4/12  |
| 4 / -2,8                                    |   |      |     |      |                    | 0/4 | 0/4 | 0/12  |
| 5 / -3,5                                    |   |      |     |      |                    |     |     |       |
| 6 / -4,2                                    |   |      |     |      |                    |     |     |       |
| 7 / -4,9                                    |   |      |     |      |                    |     |     |       |
| 8 / -5,6                                    |   |      |     |      |                    |     |     |       |
| 9 / -6,3                                    |   |      |     |      |                    |     |     |       |
| 10 / -7,0                                   |   |      |     |      |                    |     |     |       |
| 11 / -7,7                                   |   |      |     |      |                    |     |     |       |
| ZK  | 0/4   | 0/4  | 0/4 | 0/12 | 0/4                | 0/4 | 0/4 | 0/12  |
| Titer/Testvol.<br>(lg ID <sub>50</sub> )    | 0,53  | 0,53 | 0,7 | 0,58 | 1,75               | 2,1 | 2,1 | 1,98  |
| mittl. Virustiter<br>± K (95%) <sup>2</sup> | 0,58 ± 0,28   |      |     |      | 1,98 ± 0,28        |     |     |       |
| <b>RF</b><br>± K (95%) <sup>3</sup>         | <b>5,19 ± 0,39</b>                                  |      |     |      | <b>4,09 ± 0,43</b> |     |     |       |

| Probe Nr.                                   | 7  | 8    | 9    | Ø     | 10                 | 11   | 12  | Ø     |
|---|--|------|------|-------|--------------------|------|-----|-------|
| Ansatz                                      | Prüfansatz # 2 / WM + DM (komplett) mit t = 6 Min. |      |      |       |                    |      |     |       |
| Belastung                                   | ohne   |      |      |       | FKS                |      |     |       |
| 1 / -0,7                                    | 4/4  | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 |
| 2 / -1,4                                    | 4/4  | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 |
| 3 / -2,1                                    | 1/4  | 4/4  | 4/4  | 9/12  | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 |
| 4 / -2,8                                    | 1/4  | 0/4  | 0/4  | 1/12  | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 |
| 5 / -3,5                                    | 0/4  |      |      | 0/12  | 2/4                | 0/4  | 1/4 | 3/12  |
| 6 / -4,2                                    |  |      |      |       | 0/4                |      | 1/4 | 1/12  |
| 7 / -4,9                                    |  |      |      |       |                    |      | 0/4 | 0/12  |
| 8 / -5,6                                    |  |      |      |       |                    |      |     |       |
| 9 / -6,3                                    |  |      |      |       |                    |      |     |       |
| 10 / -7,0                                   |  |      |      |       |                    |      |     |       |
| 11 / -7,7                                   |  |      |      |       |                    |      |     |       |
| ZK  | 0/4  | 0/4  | 0/4  | 0/12  | 0/4                | 0/4  | 0/4 | 0/12  |
| Titer/Testvol.<br>(lg ID <sub>50</sub> )    | 2,1  | 2,45 | 2,45 | 2,33  | 3,5                | 3,15 | 3,5 | 3,38  |
| mittl. Virustiter<br>± K (95%) <sup>2</sup> | 2,33 ± 0,31  |      |      |       | 3,38 ± 0,31        |      |     |       |
| <b>RF</b><br>± K (95%) <sup>3</sup>         | <b>3,44 ± 0,41</b>                                 |      |      |       | <b>2,69 ± 0,45</b> |      |     |       |

<sup>1</sup> = Anzahl der viruspositiven Zellkultureinheiten zu Gesamtzahl der Zellkultureinheiten (bzw. Replikate) der entspr. Verdünnung

<sup>2</sup> = Berechnung des 95 % Konfidenzintervalls des Titerwertes bzw. des Reduktionsfaktors nach der DVV/RKI-Leitlinie

<sup>3</sup> = Virusreduktion: lg ID<sub>50</sub> der Viruskontrolle minus lg ID<sub>50</sub> der Probe; bei gleicher Belastung; nach der DVV/RKI-Leitlinie

| Probe Nr. | 13 | 14 | 15 | Ø | 16 | 17 | 18 | Ø |
|-----------|----|----|----|---|----|----|----|---|
|-----------|----|----|----|---|----|----|----|---|

| Ansatz   | Viruskontrolle     |      |      |       |                    |      |      |       |
|--|--------------------|------|------|-------|--------------------|------|------|-------|
| Belastung  | ohne               |      |      |       | FKS                |      |      |       |
| 1 / -0,7   | 4/4 <sup>1</sup>   | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 2 / -1,4   | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 3 / -2,1   | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 4 / -2,8   | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 5 / -3,5   | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 6 / -4,2   | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 7 / -4,9   | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 8 / -5,6   | 4/4                | 4/4  | 1/4  | 9/12  | 4/4                | 3/4  | 4/4  | 11/12 |
| 9 / -6,3   | 0/4                | 0/4  | 0/4  | 0/12  | 1/4                | 1/4  | 0/4  | 2/12  |
| 10 / -7,0  |                    |      |      |       | 0/4                | 1/4  |      | 1/12  |
| 11 / -7,7  |                    |      |      |       |                    | 0/4  |      | 0/12  |
| ZK   | 0/4                | 0/4  | 0/4  | 0/12  | 0/4                | 0/4  | 0/4  | 0/12  |
| Titer/Testvol.<br>(lg ID <sub>50</sub> )           | 5,95               | 5,95 | 5,43 | 5,78  | 6,13               | 6,13 | 5,95 | 6,07  |
| <b>mittl. Virustiter<br/>± K (95%)<sup>2</sup></b> | <b>5,78 ± 0,26</b> |      |      |       | <b>6,07 ± 0,33</b> |      |      |       |

| Probe Nr.  | 19                      | 20                      | 21                      | 22                      | 23                      | 24                      | 25                      | 26                      |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Ansatz   | Virusinaktivierung      |                         |                         |                         |                         |                         | Viruskontrolle          |                         |
|  | WM #1                   |                         | WM #2                   |                         | pH-Kontrolle            |                         | VK 20 °C                |                         |
| Belastung  | ohne                    | FKS                     | ohne                    | FKS                     | ohne                    | FKS                     | ohne                    | FKS                     |
| 1 / -0,7   | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     |
| 2 / -1,4   | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     |
| 3 / -2,1   | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     |
| 4 / -2,8   | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     |
| 5 / -3,5   | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     |
| 6 / -4,2   | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     |
| 7 / -4,9   | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     |
| 8 / -5,6   | 3/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 4/4                     | 3/4                     | 4/4                     |
| 9 / -6,3   | 1/4                     | 3/4                     | 3/4                     | 3/4                     | 1/4                     | 2/4                     | 3/4                     | 3/4                     |
| 10 / -7,0  | 0/4                     | 0/4                     | 0/4                     | 0/4                     | 0/4                     | 0/4                     | 0/4                     | 0/4                     |
| 11 / -7,7  |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |                         |
| ZK   | 0/4                     | 0/4                     | 0/4                     | 0/4                     | 0/4                     | 0/4                     | 0/4                     | 0/4                     |
| Titer/Testvol.<br>lg ID <sub>50</sub> ± K (95%) <sup>2</sup> | 5,95<br>± 0,71          | 6,48<br>± 0,50          | 6,48<br>± 0,50          | 6,48<br>± 0,50          | 6,30<br>± 0,50          | 6,30<br>± 0,58          | 6,30<br>± 0,71          | 6,48<br>± 0,50          |
| <b>RF<br/>± K (95%)<sup>3</sup></b>                          | <b>-0,17<br/>± 0,75</b> | <b>-0,41<br/>± 0,60</b> | <b>-0,70<br/>± 0,56</b> | <b>-0,41<br/>± 0,60</b> | <b>-0,53<br/>± 0,56</b> | <b>-0,23<br/>± 0,66</b> | <b>-0,53<br/>± 0,75</b> | <b>-0,41<br/>± 0,60</b> |

<sup>1</sup> = Anzahl der viruspositiven Zellkultureinheiten zu Gesamtzahl der Zellkultureinheiten (bzw. Replikate) der entspr. Verdünnung

<sup>2</sup> = Berechnung des 95 % Konfidenzintervalls des Titerwertes bzw. des Reduktionsfaktors nach der DVV/RKI-Leitlinie

<sup>3</sup> = Virusreduktion: lg ID<sub>50</sub> der Viruskontrolle minus lg ID<sub>50</sub> der Probe; bei gleicher Belastung; nach der DVV/RKI-Leitlinie

| Probe Nr.                                       | 27                  | 28     | 29         | 30     | 31     | 32     | 33     | 34     |
|---|---------------------|--------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Ansatz  | Toxizitätskontrolle |        |            |        |        |        |        |        |
|   | WM + DM #1          |        | WM + DM #2 |        | WM #1  |        | WM #2  |        |
| Belastung                                       | ohne                | FKS    | ohne       | FKS    | ohne   | FKS    | ohne   | FKS    |
| 1 / -0,7  | 0/4                 | 0/4    | 0/4        | 0/4    | 0/4    | 0/4    | 0/4    | 0/4    |
| 2 / -1,4  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| 3 / -2,1  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| 4 / -2,8  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| 5 / -3,5  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| 6 / -4,2  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| ZK  | 0/4                 | 0/4    | 0/4        | 0/4    | 0/4    | 0/4    | 0/4    | 0/4    |
| Titer/Testvol.<br>lg ID <sub>50</sub> ± K (95%) | ≤ 0,35              | ≤ 0,35 | ≤ 0,35     | ≤ 0,35 | ≤ 0,35 | ≤ 0,35 | ≤ 0,35 | ≤ 0,35 |

| Empfänglichkeitskontrolle                       |                   |                |                |               |                | Nachwirkungskontrolle |               |                |
|---|-------------------|----------------|----------------|---------------|----------------|-----------------------|---------------|----------------|
| Probe Nr.                                       | 35-37             | 40-42          | 38-39          | 43-44         | -              | 45                    | 46            | 47 a,b         |
| Produktkonz.                                    | lg -0,7 (v1)      |                | lg -1,4 (v2)   |               | VK             | lg -0,7 (v1)          |               | VK             |
| Ansatz  | ohne              | FKS            | ohne           | FKS           | -              | ohne                  | FKS           | -              |
| 1 / -0,7  | 4/4               | 4/4            | 4/4            | 4/4           | 16/16          | 4/4                   | 4/4           | 8/8            |
| 2 / -1,4  | 4/4               | 4/4            | 4/4            | 4/4           | 16/16          | 4/4                   | 4/4           | 8/8            |
| 3 / -2,1  | 4/4               | 4/4            | 4/4            | 4/4           | 16/16          | 4/4                   | 4/4           | 8/8            |
| 4 / -2,8  | 4/4               | 4/4            | 4/4            | 4/4           | 16/16          | 4/4                   | 4/4           | 8/8            |
| 5 / -3,5  | 4/4               | 4/4            | 4/4            | 4/4           | 16/16          | 4/4                   | 4/4           | 8/8            |
| 6 / -4,2  | 4/4               | 4/4            | 4/4            | 4/4           | 16/16          | 4/4                   | 4/4           | 8/8            |
| 7 / -4,9  | 4/4               | 3/4            | 3/4            | 4/4           | 15/16          | 2/4                   | 4/4           | 5/8            |
| 8 / -5,6  | 2/4               | 0/4            | 1/4            | 0/4           | 4/16           | 0/4                   | 0/4           | 1/8            |
| 9 / -6,3  | 2/4               | 0/4            | 2/4            | 0/4           | 1/16           |                       |               | 0/8            |
| 10 / -7,0                                       | 0/4               | 0/4            | 0/4            | 0/4           | 0/16           |                       |               |                |
| 11 / -7,7                                       |                   |                |                |               |                |                       |               |                |
| ZK  | 0/4               | 0/4            | 0/4            | 0/4           | 0/16           | 0/4                   | 0/4           | 0/8            |
| Titer/Testvol.<br>lg ID <sub>50</sub> ± K (95%) | 5,95<br>± 0,82    | 5,08<br>± 0,50 | 5,60<br>± 0,91 | 5,25<br>± 0,0 | 5,43<br>± 0,29 | 4,90<br>± 0,58        | 5,25<br>± 0,0 | 5,08<br>± 0,44 |
| Δ Titerwert <sup>1</sup>                        | -0,52             | 0,35           | -0,17          | 0,17          | -              | 0,18                  | -0,17         | -              |
| <b>Empfänglich<sup>2</sup></b>                  | <b>Steigerung</b> | <b>ja</b>      | <b>ja</b>      | <b>ja</b>     | -              |                       |               |                |
| <b>Nachwirkung<sup>3</sup></b>                  |                   |                |                |               |                | <b>nein</b>           | <b>nein</b>   | -              |

<sup>1</sup> = lg ID<sub>50</sub> der Viruskontrolle minus lg ID<sub>50</sub> der Probe; nach der DVV/RKI-Leitlinie (08/08)

<sup>2</sup> = Empfänglichkeit gilt nach der DVV/RKI-Leitlinie (08/08) als gegeben wenn Δ Titerwert ≤ lg 0,5 ist

<sup>3</sup> = Nachwirkung gilt nach der DVV/RKI-Leitlinie (08/08) als nicht gegeben wenn Δ Titerwert ≤ lg 0,5 ist



**Anhang zum Protokoll - Verwendete Materialien und Reagenzien:**

• **Testvirus**

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Testvirus                 | Bovines Parvovirus (BPV)   |
| Stamm                     | Haden  |
| Herkunft                  | Robert Koch-Institut, Berlin<br>Virusmaterial (Zellkulturüberstand) v. 01.02.1999 überlassen von Dr. Kao (AG Pauli)<br>keine weiteren Angaben zur Viruspassage (entsp. Viruspassage RKI +0)  |
| verwendetes Virusmaterial | <b>Ausgangsmaterial:</b> Zellkulturüberstand von BPV-infizierten FKL-Zellen<br>Virusanzucht #53 v. 08.05.2009; Viruspassage Impfvirus: RKI +1<br><b>Virusmaterial:</b> am 23.02.2010 mittels Ultrazentrifugation (45 Ti) angereichert;<br>Lagerung seit dem bei -20 °C; Bez.: „Konz. 53“ |

• **Zellsystem**

|                        |   |
|------------------------|---|
| Zellen                 | foetale Kälberlungenzellen (FKL)  |
| Herkunft               | Robert Koch-Institut, Berlin<br>erhalten als KL-Zellen; Zellpassage: 2 / 3 v. 05.12.1997 (entsp. Zellpassage RKI +0)<br>ab dem 14.09.2000 im Institut als FKL-RKI verwendet |
| verwendete Zellpassage | RKI + 3 / + 8 / + 10  |

• **sonstiges Material bzw. Reagenzien**

| <i>Material</i>                        | <i>Lieferant</i>  | <i>Bst. Nr.</i> | <i>Ch.-B.</i> | <i>Verfallsdatum</i> |
|--|-------------------|-----------------|---------------|----------------------|
| DMEM                                   | Biochrom          | F 0435          | 0990 T        | 03/2011              |
| Glutamin                               | Biochrom          | K 0283          | 0063 T        | 01/2012              |
| Pen./Strept.                           | Biochrom          | A 2213          | 0010 T        | 01/2012              |
| FKS                                    | Biochrom          | S 0115          | 0121 K        | 02/2011              |
| PBS                                    | Biochrom          | L 1820          | 0526 T        | 06/2012              |
| BSA                                    | Roth              | T844.2          | 22571370      | -                    |
| MicroSpin S-400 HR                     | GE Healthcare/VWR | 27-5140-01      | 385093        | 03/2012              |
| MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O | Roth              | 2189.1          | 21896698      | Lsg. A: 24.05.10     |
| CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | Roth              | 5239.1          | 01888370      |                      |
| NaHCO <sub>3</sub>                     | Roth              | 6885.1          | 129101324     | Lsg. B: 18.05.10     |

• **Versuchsdurchführung und Verantwortlichkeiten**

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Versuchsteil                 | Durchgeführt von (Position)   |
| Versuchsleitung              | Dr. Ch. Jursch (Laborleiter)  |
| Kontr. Produkteinwaage       | Fr. I. Grund (Biologielaborantin) und Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) |
| Versuchsdurchführung         | Fr. I. Grund (Biologielaborantin) und Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) |
| Zuarbeit: Zellkultur         | Fr. I. Grund (Biologielaborantin)                                       |
| Zuarbeit: Laborservice       | Fr. I. Grund (Biologielaborantin) und Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) |
| Ablesung & Rohdatenprotokoll | Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) und Dr. Ch. Jursch (Laborleiter)      |
| Dateneingabe & Auswertung    | Dr. Ch. Jursch (Laborleiter)  |

CHT R. Beitlich GmbH

Virus: BPV (Konz. 53)

Temperatur: 20° C

Zeit: 12 bzw. 6 Min.

Durchführung: 26.04.10

Auswertung: 10.05.10 (14 p.i.)

Zellen: FKL-RKI (# 4)

Medium: DMEM (+1% Peni./Strep; + 5 % FKS)

Wäschedesinfektionsverfahren: **BEIBLEACH POWER ACTIVE-Verfahren** bestehend aus

Produkt 1: **Beiclean NFG** (Ch.-Bez.: 0001034642; Muster erhalten: 11.03.2010; Lagerung: bei RT)

Produkt 2: **Beipur PKS** (Ch.-Bez.: 0001034595; Muster erhalten: 11.03.2010; Lagerung: bei RT)

Produkt 3: **Beibleach Power Active** (Ch.-Bez.: 0001034756; Muster erhalten: 08.03.2010; Lagerung: bei RT)

Belastung(en): ohne Belastung oder 10 % FKS

Prüfansätze: # 1. mit t = 12 Min. sowie # 2. mit t = 6 Min.

Versuchsmethodik: quantitativer viruzider Suspensionstest (DVV/RKI-Leitlinie; Stand 08/08)

Testgemisch: 1 Teil Belastung + 1 Teil Virussuspension + 8 Teile 1,25fache Desinfektionsmittellösung

**Zubereitung der Gebrauchslösung:** (in der angegebenen Reihenfolge)

- **Beiclean NFG** und **Beipur PKS** wurden unter Rühren in vortemperierten hartem Wasser (20° C) für 2 Min. gelöst.
- Nachfolgend wurde **Beibleach Power Active** zugegeben. Nach 2 min. intensivem Mischen wurde ein Aliquot entnommen und sofort in den Testansatz gegeben

**Tab. 1: Dosierung der Komponenten**

| Produkte  | Produkt (1x) | Gebrauchslg. (x 1,25) | Produkt (pro 5 L) | pH d. Gebrauchslsg. |
|---|--------------|-----------------------|-------------------|---------------------|
| <b>Beiclean NFG</b><br>[Ch.-Bez.: 0001034642]           | 0,4 mL/L     | 0,5 mL                | 2,5 mL            | <b>pH 10,17</b>     |
| <b>Beipur PKS</b><br>[Ch.-Bez.: 0001034595]             | 1,2 mL/L     | 1,5 mL                | 7,5 mL            |                     |
| <b>Beibleach Power Active</b><br>[Ch.-Bez.: 0001034756] | 0,8 mL/L     | 1,0 mL                | 5,0 mL            |                     |

**Tab. 2: Zusammensetzung der Proben:**

| Probe Nr.        | 1   | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
|------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ansatz           | Prüfansatz # 1 / WM + DM (komplett) mit t = 12 Min. |       |       |       |       |       |
| Belastung        | ohne  |       |       | FKS   |       |       |
| A. bidest        | 15µL  | 15µL  | 15µL  |       |       |       |
| FKS <sup>1</sup> |   |       |       | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| BPV              | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| WM/DM # 1        | 120µL   | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL |
| Gelfiltration    | +   | +     | +     | +     | +     | +     |

| Probe Nr.        | 7  | 8     | 9     | 10    | 11    | 12    |
|------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|
| Ansatz           | Prüfansatz # 2 / WM + DM (komplett) mit t = 6 Min. |       |       |       |       |       |
| Belastung        | ohne   |       |       | FKS   |       |       |
| A. bidest        | 15µL   | 15µL  | 15µL  |       |       |       |
| FKS <sup>1</sup> |  |       |       | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| BPV              | 15µL   | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| WM/DM # 2        | 120µL  | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL |
| Gelfiltration    | +  | +     | +     | +     | +     | +     |

|                   |                          |       |       |       |       |       |
|-------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Probe Nr.         | 13                       | 14    | 15    | 16    | 17    | 18    |
| Ansatz            | Viruskontrolle / 12 Min. |       |       |       |       |       |
| Belastung         | ohne                     |       |       | FKS   |       |       |
| A. bidest         | 15µL                     | 15µL  | 15µL  |       |       |       |
| FKS <sup>1</sup>  |                          |       |       | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| BPV               | 15µL                     | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  | 15µL  |
| hH <sub>2</sub> O | 120µL                    | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL | 120µL |
| Gelfiltration     | +                        | +     | +     | +     | +     | +     |

|                      |              |       |             |       |                     |       |
|----------------------|--------------|-------|-------------|-------|---------------------|-------|
| Probe Nr.            | 19           | 20    | 21          | 22    | 23                  | 24    |
| Ansatz               | WM / 12 Min. |       | WM / 6 Min. |       | pH-Kontr. / 12 Min. |       |
| Belastung            | ohne         | FKS   | ohne        | FKS   | ohne                | FKS   |
| A. bidest            | 15µL         |       | 15µL        |       | 15µL                |       |
| FKS <sup>1</sup>     |              | 15µL  |             | 15µL  |                     | 15µL  |
| BPV                  | 15µL         | 15µL  | 15µL        | 15µL  | 15µL                | 15µL  |
| WM #1                | 120µL        | 120µL |             |       |                     |       |
| WM #2                |              |       | 120µL       | 120µL |                     |       |
| pH-Lsg. <sup>2</sup> |              |       |             |       | 120µL               | 120µL |
| hH <sub>2</sub> O    |              |       |             |       |                     |       |
| Gelfiltration        | +            | +     | +           | +     | +                   | +     |

|                   |                |       |        |       |           |       |        |       |                    |       |                |       |        |
|-------------------|----------------|-------|--------|-------|-----------|-------|--------|-------|--------------------|-------|----------------|-------|--------|
| Probe Nr.         | 25             | 26    | 27     | 28    | 29        | 30    | 31     | 32    | 33-34              | 35-36 | 37             | 38    | 39 a,b |
| Ansatz            | WM + DM / Tox. |       |        |       | WM / Tox. |       |        |       | Tox. f. Empf.-test |       | Tox. f. Nachw. |       | VK/N   |
|                   | 12 Min.        |       | 6 Min. |       | 12 Min.   |       | 6 Min. |       |                    |       |                |       |        |
| Belastung         | ohne           | FKS   | ohne   | FKS   | ohne      | FKS   | ohne   | FKS   | ohne               | FKS   | ohne           | FKS   | ohne   |
| A. bidest         | 15 µl          |       | 15 µl  |       | 15 µl     |       | 15 µl  |       | 15 µl              |       | 15 µl          |       | 15 µl  |
| FKS <sup>1</sup>  |                | 15 µl |        | 15 µl |           | 15 µl |        | 15 µl |                    | 15 µl |                | 15 µl |        |
| Medium            | 15 µl          | 15 µl | 15 µl  | 15 µl | 15 µl     | 15 µl | 15 µl  | 15 µl | 15 µl              | 15 µl | 15 µl          | 15 µl |        |
| BPV               |                |       |        |       |           |       |        |       |                    |       |                |       | 15 µl  |
| (WM+DM) #1        | 120µl          | 120µl |        |       |           |       |        |       | 120µl              | 120µl | 120µl          | 120µl |        |
| (WM+DM) #2        |                |       | 120µl  | 120µl |           |       |        |       |                    |       |                |       |        |
| WM #1             |                |       |        |       | 120µl     | 120µl |        |       |                    |       |                |       |        |
| WM #2             |                |       |        |       |           |       | 120µl  | 120µl |                    |       |                |       |        |
| hH <sub>2</sub> O |                |       |        |       |           |       |        |       |                    |       |                |       | 120µl  |
| Gelfiltration     | +              | +     | +      | +     | +         | +     | +      | +     | +                  | +     | +              | +     | -      |

<sup>1</sup> = foetales Kälberserum; Endkonzentration in der Testmischung: 10 %

<sup>2</sup> = pH-Lösung; ergibt mit A. bidest als Belastung (1+1+8) pH = 9,62 im Testansatz (vergl. pH-Werte)

- **Detoxifikation:** die Reinigung der Proben mittels Gelfiltration erfolgte mit MikroSpin S-400HR (*GE Healthcare*), die zuvor mit je 200 µL einer 0,25%igen BSA-Lösg. gewaschen wurden.

**Ergebnisse:** Verdünnung 1:5 (auf Zellen: 100 µL)

| Probe Nr.                                   | 1   | 2    | 3    | Ø     | 4                  | 5    | 6    | Ø     |
|---|---|------|------|-------|--------------------|------|------|-------|
| Ansatz                                      | Prüfansatz # 1 / WM + DM (komplett) mit t = 12 Min. |      |      |       |                    |      |      |       |
| Belastung                                   | ohne  |      |      |       | FKS                |      |      |       |
| 1 / -0,7                                    | 4/4 <sup>1</sup>                                    | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 2 / -1,4                                    | 4/4   | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 3 / -2,1                                    | 4/4   | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 4 / -2,8                                    | 4/4   | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 5 / -3,5                                    | 4/4   | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 6 / -4,2                                    | 4/4   | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 7 / -4,9                                    | 4/4   | 4/4  | 4/4  | 12/12 | 4/4                | 3/4  | 4/4  | 11/12 |
| 8 / -5,6                                    | 2/4   | 3/4  | 1/4  | 6/12  | 0/4                | 0/4  | 1/4  | 1/12  |
| 9 / -6,3                                    | 1/4   | 0/4  | 0/4  | 1/12  |                    |      | 0/4  | 0/12  |
| 10 / -7,0                                   | 0/4   |      |      | 0/12  |                    |      |      |       |
| 11 / -7,7                                   |   |      |      |       |                    |      |      |       |
| ZK  | 0/4   | 0/4  | 0/4  | 0/12  | 0/4                | 0/4  | 0/4  | 0/12  |
| Titer/Testvol.<br>(lg ID <sub>50</sub> )    | 5,78  | 5,78 | 5,43 | 5,66  | 5,25               | 5,08 | 5,43 | 5,25  |
| mittl. Virustiter<br>± K (95%) <sup>2</sup> | 5,66 ± 0,34   |      |      |       | 5,25 ± 0,24        |      |      |       |
| <b>RF</b><br>± K (95%) <sup>3</sup>         | <b>0,65 ± 0,53</b>                                  |      |      |       | <b>1,23 ± 0,46</b> |      |      |       |

| Probe Nr.                                   | 7  | 8    | 9   | Ø     | 10                 | 11   | 12   | Ø     |
|---|--|------|-----|-------|--------------------|------|------|-------|
| Ansatz                                      | Prüfansatz # 2 / WM + DM (komplett) mit t = 6 Min. |      |     |       |                    |      |      |       |
| Belastung                                   | ohne   |      |     |       | FKS                |      |      |       |
| 1 / -0,7                                    | 4/4  | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 2 / -1,4                                    | 4/4  | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 3 / -2,1                                    | 4/4  | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 4 / -2,8                                    | 4/4  | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 5 / -3,5                                    | 4/4  | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 6 / -4,2                                    | 4/4  | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 7 / -4,9                                    | 4/4  | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4  | 12/12 |
| 8 / -5,6                                    | 4/4  | 3/4  | 1/4 | 8/12  | 3/4                | 2/4  | 3/4  | 8/12  |
| 9 / -6,3                                    | 0/4  | 0/4  | 1/4 | 1/12  | 1/4                | 1/4  | 1/4  | 3/12  |
| 10 / -7,0                                   | 1/4  |      | 0/4 | 1/12  | 0/4                | 0/4  | 0/4  | 0/12  |
| 11 / -7,7                                   | 0/4  |      |     | 0/12  |                    |      |      |       |
| ZK  | 0/4  | 0/4  | 0/4 | 0/12  | 0/4                | 0/4  | 0/4  | 0/12  |
| Titer/Testvol.<br>(lg ID <sub>50</sub> )    | 6,13   | 5,78 | 5,6 | 5,83  | 5,95               | 5,78 | 5,95 | 5,89  |
| mittl. Virustiter<br>± K (95%) <sup>2</sup> | 5,83 ± 0,37  |      |     |       | 5,89 ± 0,39        |      |      |       |
| <b>RF</b><br>± K (95%) <sup>3</sup>         | <b>0,48 ± 0,55</b>                                 |      |     |       | <b>0,58 ± 0,56</b> |      |      |       |

<sup>1</sup> = Anzahl der viruspositiven Zellkultureinheiten zu Gesamtzahl der Zellkultureinheiten (bzw. Replikate) der entspr. Verdünnung

<sup>2</sup> = Berechnung des 95 % Konfidenzintervalls des Titerwertes bzw. des Reduktionsfaktors nach der DVV/RKI-Leitlinie

<sup>3</sup> = Virusreduktion: lg ID<sub>50</sub> der Viruskontrolle minus lg ID<sub>50</sub> der Probe; bei gleicher Belastung; nach der DVV/RKI-Leitlinie

| Probe Nr.  | 13                 | 14   | 15  | Ø     | 16                 | 17   | 18  | Ø     |
|--|--------------------|------|-----|-------|--------------------|------|-----|-------|
| Ansatz   | Viruskontrolle     |      |     |       |                    |      |     |       |
| Belastung  | ohne               |      |     |       | FKS                |      |     |       |
| 1 / -0,7   | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 |
| 2 / -1,4   | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 |
| 3 / -2,1   | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 |
| 4 / -2,8   | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 |
| 5 / -3,5   | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 |
| 6 / -4,2   | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 |
| 7 / -4,9   | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 |
| 8 / -5,6   | 4/4                | 4/4  | 3/4 | 11/12 | 4/4                | 4/4  | 4/4 | 12/12 |
| 9 / -6,3   | 1/4                | 3/4  | 1/4 | 5/12  | 3/4                | 2/4  | 1/4 | 6/12  |
| 10 / -7,0  | 0/4                | 0/4  | 2/4 | 2/12  | 1/4                | 1/4  | 1/4 | 3/12  |
| 11 / -7,7  |                    |      | 0/4 | 0/12  | 0/4                | 0/4  | 0/4 | 0/12  |
| ZK   | 0/4                | 0/4  | 0/4 | 0/12  | 0/4                | 0/4  | 0/4 | 0/12  |
| Titer/Testvol.<br>(lg ID <sub>50</sub> )           | 6,13               | 6,48 | 6,3 | 6,31  | 6,65               | 6,48 | 6,3 | 6,48  |
| <b>mittl. Virustiter<br/>± K (95%)<sup>2</sup></b> | <b>6,31 ± 0,41</b> |      |     |       | <b>6,48 ± 0,40</b> |      |     |       |

| Probe Nr.  | 19                      | 20                     | 21                      | 22                     | 23                      | 24                     |
|--|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| Ansatz   | Virusinaktivierung      |                        |                         |                        |                         |                        |
|  | WM #1                   |                        | WM #2                   |                        | pH-Kontrolle            |                        |
| Belastung  | ohne                    | FKS                    | ohne                    | FKS                    | ohne                    | FKS                    |
| 1 / -0,7   | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    |
| 2 / -1,4   | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    |
| 3 / -2,1   | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    |
| 4 / -2,8   | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    |
| 5 / -3,5   | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    |
| 6 / -4,2   | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    |
| 7 / -4,9   | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    |
| 8 / -5,6   | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    | 4/4                     | 4/4                    |
| 9 / -6,3   | 3/4                     | 2/4                    | 4/4                     | 2/4                    | 2/4                     | 2/4                    |
| 10 / -7,0  | 0/4                     | 1/4                    | 0/4                     | 0/4                    | 1/4                     | 0/4                    |
| 11 / -7,7  | 2/4                     | 0/4                    |                         |                        | 0/4                     |                        |
| ZK   | 0/4                     | 0/4                    | 0/4                     | 0/4                    | 0/4                     | 0/4                    |
| Titer/Testvol.<br>lg ID <sub>50</sub> ± K (95%) <sup>2</sup> | 6,83<br>± 0,76          | 6,48<br>± 0,76         | 6,65<br>± 0,0           | 6,30<br>± 0,58         | 6,48<br>± 0,76          | 6,30<br>± 0,58         |
| <b>RF<br/>± K (95%)<sup>3</sup></b>                          | <b>-0,52<br/>± 0,87</b> | <b>0,09<br/>± 0,86</b> | <b>-0,34<br/>± 0,41</b> | <b>0,17<br/>± 0,70</b> | <b>-0,17<br/>± 0,87</b> | <b>0,17<br/>± 0,70</b> |

<sup>1</sup> = Anzahl der viruspositiven Zellkultureinheiten zu Gesamtzahl der Zellkultureinheiten (bzw. Replikate) der entspr. Verdünnung

<sup>2</sup> = Berechnung des 95 % Konfidenzintervalls des Titerwertes bzw. des Reduktionsfaktors nach der DVV/RKI-Leitlinie

<sup>3</sup> = Virusreduktion: lg ID<sub>50</sub> der Viruskontrolle minus lg ID<sub>50</sub> der Probe; bei gleicher Belastung; nach der DVV/RKI-Leitlinie

| Probe Nr.                                       | 25                  | 26     | 27         | 28     | 29     | 30     | 31     | 32     |
|---|---------------------|--------|------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Ansatz  | Toxizitätskontrolle |        |            |        |        |        |        |        |
|   | WM + DM #1          |        | WM + DM #2 |        | WM #1  |        | WM #2  |        |
| Belastung                                       | ohne                | FKS    | ohne       | FKS    | ohne   | FKS    | ohne   | FKS    |
| 1 / -0,7  | 0/4                 | 0/4    | 0/4        | 0/4    | 0/4    | 0/4    | 0/4    | 0/4    |
| 2 / -1,4  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| 3 / -2,1  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| 4 / -2,8  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| 5 / -3,5  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| 6 / -4,2  |                     |        |            |        |        |        |        |        |
| ZK  | 0/4                 | 0/4    | 0/4        | 0/4    | 0/4    | 0/4    | 0/4    | 0/4    |
| Titer/Testvol.<br>lg ID <sub>50</sub> ± K (95%) | ≤ 0,35              | ≤ 0,35 | ≤ 0,35     | ≤ 0,35 | ≤ 0,35 | ≤ 0,35 | ≤ 0,35 | ≤ 0,35 |

| Empfänglichkeitskontrolle                          |                |                |                | Nachwirkungskontrolle |                |                |
|--|----------------|----------------|----------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Probe Nr.  | 33-34          | 35-36          | -              | 37                    | 38             | 39 a,b         |
| Produktkonz.                                       | lg -1,4 (v2)   |                | VK             | lg -0,7 (v1)          |                | VK             |
| Ansatz   | ohne           | FKS            | -              | ohne                  | FKS            | -              |
| 1 / -0,7   | 4/4            | 4/4            | 16/16          | 4/4                   | 4/4            | 8/8            |
| 2 / -1,4   | 4/4            | 4/4            | 16/16          | 4/4                   | 4/4            | 8/8            |
| 3 / -2,1   | 4/4            | 4/4            | 16/16          | 4/4                   | 4/4            | 8/8            |
| 4 / -2,8   | 4/4            | 4/4            | 16/16          | 4/4                   | 4/4            | 8/8            |
| 5 / -3,5   | 4/4            | 4/4            | 16/16          | 4/4                   | 4/4            | 8/8            |
| 6 / -4,2   | 4/4            | 4/4            | 16/16          | 4/4                   | 4/4            | 8/8            |
| 7 / -4,9   | 3/4            | 4/4            | 10/16          | 2/4                   | 2/4            | 4/8            |
| 8 / -5,6   | 1/4            | 0/4            | 2/16           | 1/4                   | 0/4            | 1/8            |
| 9 / -6,3   | 0/4            | 1/4            | 0/16           | 0/4                   |                | 0/8            |
| 10 / -7,0  |                | 0/4            |                |                       |                |                |
| 11 / -7,7  |                |                |                |                       |                |                |
| ZK   | 0/4            | 0/4            | 0/16           | 0/4                   | 0/4            | 0/8            |
| Titer/Testvol.<br>[lg ID <sub>50</sub> ] ± K (95%) | 5,25<br>± 0,71 | 5,43<br>± 0,50 | 5,08<br>± 0,30 | 5,08<br>± 0,76        | 4,90<br>± 0,58 | 4,99<br>± 0,45 |
| Δ Titerwert <sup>1</sup>                           | -0,17          | -0,34          | -              | -0,08                 | 0,09           | -              |
| <b>Empfänglich<sup>2</sup></b>                     | <b>ja</b>      | <b>ja</b>      | -              |                       |                |                |
| <b>Nachwirkung<sup>3</sup></b>                     |                |                |                | <b>nein</b>           | <b>nein</b>    | -              |

<sup>1</sup> = lg ID<sub>50</sub> der Viruskontrolle minus lg ID<sub>50</sub> der Probe; nach der DVV/RKI-Leitlinie (08/08)

<sup>2</sup> = Empfänglichkeit gilt nach der DVV/RKI-Leitlinie (08/08) als gegeben wenn Δ Titerwert ≤ lg 0,5 ist

<sup>3</sup> = Nachwirkung gilt nach der DVV/RKI-Leitlinie (08/08) als nicht gegeben wenn Δ Titerwert ≤ lg 0,5 ist

**Anhang zum Protokoll - Verwendete Materialien und Reagenzien:**

• **Testvirus**

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Testvirus                 | Bovines Parvovirus (BPV)   |
| Stamm                     | Haden  |
| Herkunft                  | Robert Koch-Institut, Berlin<br>Virusmaterial (Zellkulturüberstand) v. 01.02.1999 überlassen von Dr. Kao (AG Pauli)<br>keine weiteren Angaben zur Viruspassage (entsp. Viruspassage RKI +0)  |
| verwendetes Virusmaterial | <b>Ausgangsmaterial:</b> Zellkulturüberstand von BPV-infizierten FKL-Zellen<br>Virusanzucht #53 v. 08.05.2009; Viruspassage Impfvirus: RKI +1<br><b>Virusmaterial:</b> am 23.02.2010 mittels Ultrazentrifugation (45 Ti) angereichert;<br>Lagerung seit dem bei -20 °C; Bez.: „Konz. 53“ |

• **Zellsystem**

|                        |   |
|------------------------|---|
| Zellen                 | foetale Kälberlungenzellen (FKL)  |
| Herkunft               | Robert Koch-Institut, Berlin<br>erhalten als KL-Zellen; Zellpassage: 2 / 3 v. 05.12.1997 (entsp. Zellpassage RKI +0)<br>ab dem 14.09.2000 im Institut als FKL-RKI verwendet |
| verwendete Zellpassage | RKI + 3 / + 8 / + 4   |

• **sonstiges Material bzw. Reagenzien**

| <i>Material</i>                        | <i>Lieferant</i>  | <i>Bst. Nr.</i> | <i>Ch.-B.</i> | <i>Verfallsdatum</i>              |
|--|-------------------|-----------------|---------------|-----------------------------------|
| DMEM                                   | Biochrom          | F 0435          | 0990 T        | 03/2011                           |
| Glutamin                               | Biochrom          | K 0283          | 0063 T        | 01/2012                           |
| Pen./Strept.                           | Biochrom          | A 2213          | 0010 T        | 01/2012                           |
| FKS                                    | Biochrom          | S 0115          | 0121 K        | 02/2011                           |
| PBS                                    | Biochrom          | L 1820          | 0526 T        | 06/2012                           |
| BSA                                    | Roth              | T844.2          | 22571370      | -                                 |
| MicroSpin S-400 HR                     | GE Healthcare/VWR | 27-5140-01      | 383416        | 12/2011                           |
| MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O | Roth              | 2189.1          | 21896698      | Lsg. A: 27.04.10<br>bzw. 24.05.10 |
| CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | Roth              | 5239.1          | 01888370      |                                   |
| NaHCO <sub>3</sub>                     | Roth              | 6885.1          | 129101324     | Lsg. B: 29.04.10                  |

• **Versuchsdurchführung und Verantwortlichkeiten**

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Versuchsteil                 | Durchgeführt von (Position)   |
| Versuchsleitung              | Dr. Ch. Jursch (Laborleiter)  |
| Kontr. Produkteinwaage       | Fr. I. Grund (Biologielaborantin) und Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) |
| Versuchsdurchführung         | Fr. I. Grund (Biologielaborantin) und Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) |
| Zuarbeit: Zellkultur         | Fr. I. Grund (Biologielaborantin)                                       |
| Zuarbeit: Laborservice       | Fr. I. Grund (Biologielaborantin) und Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) |
| Ablesung & Rohdatenprotokoll | Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) und Dr. Ch. Jursch (Laborleiter)      |
| Dateneingabe & Auswertung    | Dr. Ch. Jursch (Laborleiter)  |