

**Viruzide Aktivität einer
antiviral ausgerüsteten Lackprobe gegenüber
Influenza A Virus (H1N1)**

Kurzbericht zum Screening S1

von

PD Dr. Olaf Thraenhart und Dr. Christian Jursch

Untersuchung: im September 2015

Eurovir Hygiene-Labor GmbH
Im Biotechnologiepark TGZ I
D-14943 Luckenwalde
Geschäftsführer: Dr. Christian Jursch
Hauptgesellschafter: PD Dr. Olaf Thraenhart

Amtsgericht Potsdam
Handelsregister-Nr.: HRB 26128 P
Steuer-Nr.: 050/108/05610
USt-IdNr.: DE 288 863 508

Mittelbrandenburgische Sparkasse in Potsdam
Konto-Nr.: 1000 993 937
BLZ: 160 500 00
SWIFT/BIC: WELA DE D1 PMB
IBAN: DE14 1605 0000 1000 9939 37

Auftraggeber:

Produkte:

Produkt 1:

**Lackprobe auf Edelstahlträger / ohne Wirkstoff
 (Nullprobe)** [Eingang am 04.09.2015, Lagerung: vor Licht geschützt
 bei RT]

Produkt 2:

Lackprobe auf Edelstahlträger / mit Wirkstoff (Wirkprobe)
 [Eingang am 04.09.2015, Lagerung: vor Licht geschützt bei RT]

Testparameter:

- bei T = 20° C (im Klimaschrank) und einer Standzeit von 2, 8 und 24 Stunden

Testsystem:

- Influenza A Virus (H1N1), Stamm: New Caledonia
 (Herkunft: Chiron Behring (ehem. Behringwerke), Marburg/Lahn)
- Madin Darby Canine Kidney Cells (MDCK)
 (Herkunft: Robert Koch-Institut, Berlin)

Testverfahren:

- Die Versuche wurden in Anlehnung an die DVV-Leitlinie (2012) bzw. der RKI-Richtlinie (1995) zum quantitativen viruziden Carriertest (QCT) durchgeführt.

Tab. 1: Zusammensetzung der Proben:

Probe Nr.	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4
Ansatz	Wirkprobe / 2 Std.		Wirkprobe / 8 Std.		Wirkprobe / 24 Std.		Tox.-Kontr.
Virussusp.	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	
Medium							50 µL
Titration	nach S&K (VF = 4)						nach S&K

Probe Nr.	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b
Ansatz	Virusinput		VK auf Nullprobe		VK auf Nullprobe		VK auf Nullprobe	
	ohne		VK / 2 Std.		VK / 8 Std.		VK / 24 Std.	
Virussusp.	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Titration	nach S&K (VF = 4)		nach S&K (VF = 4)		nach S&K (VF = 4)		nach S&K (VF = 4)	

Tab. 2: Ergebnisse der Virustiterbestimmung (nach Spearman & Kärber)

Probe Nr.	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b
Ansatz	Virusinput (0 h)		VK / 2 h		VK / 8 h		VK / 24 h	
Titer/Testvol. (lg ID ₅₀)	4,35	4,2	3,6	3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3
Mittelwert ± K (95%) ¹	4,28 ± 0,27/100 µL (≈ 5,28 lg ID ₅₀ /mL)		3,30 ± 0,29/100 µL		≤ 0,3/100 µL		≤ 0,3/100 µL	
Reduktion ² (lg ID ₅₀ ± K [95%])	-		0,98 ± 0,40		≥ 3,98 ± 0,27		≥ 3,98 ± 0,27	

Probe Nr.	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4
Ansatz	Wirkprobe / 2 h		Wirkprobe / 8 h		Wirkprobe / 24 h		Tox.-Kontr.
Titer/Testvol. (lg ID ₅₀)	1,95	1,8	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3/100 µL
Mittelwert ± K (95%) ¹	1,88 ± 0,31		≤ 0,3		≤ 0,3		-
Reduktion ² (lg ID ₅₀ ± K [95%])	1,42 ± 0,42 (vs. VK/2h)	2,40 ± 0,41 (vs. VK/0h)	3,0 ± 0,29 (vs. VK/2h)	3,98 ± 0,27 (vs. VK/0h)	3,0 ± 0,29 (vs. VK/2h)	3,98 ± 0,27 (vs. VK/0h)	-

¹ = Berechnung des Titerwertes bzw. des 95 % Konfidenzintervalls nach der DVV/RKI-Leitlinie

² = Virusreduktion: Titerwert der Viruskontrolle minus Titerwert der Probe

Ergebnisse: (cf. Tab. 2)

- Ohne Standzeit (t = 0) wurde von den beaufschlagten Kontrollkeimträgern (Virusinput) eine Virusmenge von lg ID₅₀ = 4,28 ± 0,27 pro 100 µL Resuspendierungslösung zurückgewonnen.
- Nach einer Standzeit von 2 Stunden bei 20° C betrug die Virusmenge in der Resuspendierungslösung lg ID₅₀ = 3,30 ± 0,29 pro 100 µL, entsprechend der Virusreduktion von RF = 0,98 ± 0,40.
- Nach 8 Stunden konnte von den Kontrollkeimträgern auch ohne den Einfluss der Wirksubstanz kein Virus mehr zurückgewonnen werden. Mit lg ID₅₀ ≤ 0,3 pro 100 µL bestimmt sich die Virusreduktion zu RF ≥ 3,98 ± 0,27. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch nach t = 24 h.
- Nach einer Verweildauer von 2 Std. auf den Keimträgern mit Wirksubstanz (Proben 1) konnte eine geringe Virusmenge nachgewiesen werden (lg ID₅₀ = 1,88 ± 0,31). Setzt man diese Virusmenge in Bezug zur Kontrollprobe/2 Stunden (Proben 6) bestimmt sich die Virusreduktion zu RF = 1,42 ± 0,42. Diese Virusreduktion kann allein der Wirksubstanz zugeordnet werden.
- Nach einer Verweildauer von 8 Stunden und mehr war kein Restvirus mehr nachweisbar (Proben 2 und 3). Da jedoch bei den entsprechenden Kontrollproben (Proben 7 und 8) ebenfalls kein Restvirus mehr nachgewiesen werden konnte, kann der Einfluss der Wirksubstanz bei den längeren Standzeiten nicht beurteilt werden.

Luckenwalde, den 23.09.2015



Dr. Ch. Jursch
 (GF und Laborleiter Eurovir)

Angaben zur Testung Auftraggeber:

Produkt(e): Edelstahlträger mit antiviralem Lack
 Testsystem: Influenza A (New Caledonia) + MDCK-Zellen
 Testdurchgang: S1
 Durchführung: 15.09.2015
 Auswertung: 22.09.2015 (7 p.i.)

Testmethodik und Testparameter

Testmethodik: quantitativer viruzider Carriertest in Anlehnung an die DVV-Leitlinie (Stand 2012)
 Kontamination: 10 VT Virussuspension (bzw. Medium) ohne zusätzl. Belastung
 Testfläche: Edelstahl-Keimträger mit einer Größe von 1,6 x 6 cm
 Testparameter: Einwirktemperatur: 20° C (Klimaschrank) / Einwirkzeit(en): 2, 8 und 24 Std.

Getestete Produktmuster

1. Produkt: Nullprobe [Eingang: am 04.09.2015. Lagerung: vor Licht geschützt bei RT]
2. Produkt: Produkt [Wirkprobe: Eingang: am 04.09.2015. Lagerung: vor Licht geschützt bei RT]

Tab. 1: Zusammensetzung der Proben:

Probe Nr.	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4
Ansatz	Wirkprobe / 2 Std.		Wirkprobe / 8 Std.		Wirkprobe / 24 Std.		Tox.-Kontr.
Virussusp.	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	
Medium							50 µL
Titration	nach S&K (VF = 4)						nach S&K

Probe Nr.	5a	5b	6a	6b	7a	7b	8a	8b
Ansatz	Virusinput		VK auf Nullprobe		VK auf Nullprobe		VK auf Nullprobe	
	ohne		VK / 2 Std.		VK / 8 Std.		VK / 24 Std.	
Virussusp.	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
Titration	nach S&K (VF = 4)		nach S&K (VF = 4)		nach S&K (VF = 4)		nach S&K (VF = 4)	

Zur Testdurchführung:

1. Probenherstellung

- Pro Konzentrations-/Zeitrelation wurden 2 parallele Testansätze hergestellt.
- Kontamination: 50 µL Virussuspension bzw. Medium
- Lackmuster: Vor der Testung erfolgte eine Desinfektion mit Ethanol (80% (v/v))

2. Resuspendierung der Proben und Virustiterbestimmung

- **Stopp der Reaktion:** nach Ablauf der Einwirkzeit wurden 1000 µL Medium zu den Carriern gegeben. Anschließend erfolgte sofort die Resuspendierung des Virusfilms unter Verwendung von Glasspateln (vergl. RKI-Richtlinie [1994]) in das zugegebene Medium hinein.
- **Viruskontrolle** (bzw. der Zytotoxizitätskontrolle): die Titerbestimmung erfolgte nach Spearman & Kärber mit VF = 4.
- **Proben zur Inaktivierung:** die Titerbestimmung erfolgte nach Spearman & Kärber mit VF = 4.

3. Beurteilung der Zellen und Virusnachweis

- Am Tag 7 p.i. wurden die Zellkulturen bei 100facher Vergrößerung begutachtet. Zur Detektion des Virus wurde ein Hämagglutinationstest (HA-Test) durchgeführt.

Tab. 2.1: Titerbestimmung der Viruskontrolle (Virustiterbestimmung nach Spearman & Kärber)

Probe Nr.	5a	5b	Ø	6a	6b	Ø	7a	7b	Ø	8a	8b	Ø
Ansatz	Virusinput (0 h)			VK / 2 h			VK / 8 h			VK / 24 h		
1 / -0,6	4/4 ¹	4/4	8/8	4/4	4/4	8/8	0/4	0/4	0/8	0/4	0/4	0/8
2 / -1,2	4/4	4/4	8/8	4/4	4/4	8/8						
3 / -1,8	4/4	4/4	8/8	4/4	4/4	8/8						
4 / -2,4	4/4	4/4	8/8	4/4	4/4	8/8						
5 / -3,0	4/4	4/4	8/8	4/4	2/4	6/8						
6 / -3,6	4/4	4/4	8/8	1/4	0/4	1/8						
7 / -4,2	3/4	1/4	4/8	0/4		0/8						
8 / -4,8	0/4	1/4	1/8	1/4		1/8						
9 / -5,4		0/4	0/8	0/4		0/8						
10 / -6,0												
11 / -6,6												
ZK	0/4	0/4	0/8	0/4	0/4	0/8	0/4	0/4	0/8	0/4	0/4	0/8
Titer/Testvol. (lg ID ₅₀)	4,35	4,2	4,28	3,6	3	3,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3
Mittelwert ± K (95%) ²	4,28 ± 0,27/100 µL (≈ 5,28 lg ID ₅₀ /mL)			3,30 ± 0,29/100 µL			≤ 0,3/100 µL			≤ 0,3/100 µL		
Reduktion ³ (lg ID ₅₀ ± K [95%])	-			0,98 ± 0,40			≥ 3,98 ± 0,27			≥ 3,98 ± 0,27		

Tab. 2.2: Virusinaktivierung (Virustiterbestimmung nach Spearman & Kärber)

Probe Nr.	1a	1b	Ø	2a	2b	Ø	3a	3b	Ø	4
Ansatz	Wirkprobe / 2 h			Wirkprobe / 8 h			Wirkprobe / 24 h			Tox.-Kontr.
1 / -0,6	4/4 ¹	4/4	8/8	0/4	0/4	0/8	0/4	0/4	0/8	0/4
2 / -1,2	4/4	4/4	8/8							
3 / -1,8	2/4	1/4	3/8							
4 / -2,4	0/4	1/4	1/8							
5 / -3,0	1/4	0/4	1/8							
6 / -3,6	0/4		0/8							
7 / -4,2										
8 / -4,8										
9 / -5,4										
10 / -6,0										
11 / -6,6										
ZK	0/4	0/4	0/8	0/4	0/4	0/8	0/4	0/4	0/8	0/4
Titer/Testvol. (lg ID ₅₀)	1,95	1,8	1,88	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3	≤ 0,3/100 µL
Mittelwert ± K (95%) ²	1,88 ± 0,31			≤ 0,3			≤ 0,3			-
Reduktion ³ (lg ID ₅₀ ± K [95%])	1,42 ± 0,42 (vs. VK/2h)			3,0 ± 0,29 (vs. VK/2h)			3,0 ± 0,29 (vs. VK/2h)			-

¹ = Anzahl der viruspositiven Zellkultureinheiten zu Gesamtzahl der Zellkultureinheiten (bzw. Replikate) der entspr. Verdünnung

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

³ = Virusreduktion: Titerwert der Viruskontrolle minus Titerwert der Probe

Verwendete Materialien und Reagenzien:

• **Testvirus**

Testvirus	Influenza A Virus, Subtyp H1N1
Stamm	A/New Caledonia/20/99, IVR-116
Herkunft	Chiron Behring, Marburg/Lahn; Deutschland
verwendetes Virusmaterial	Saatvirus-Material; Ch.-Bez.: A 04/03; Ankunft bei Eurovir am 18.03.2003 Virus-Passage: originales Virusmaterial; Chiron Behring +0 Das originale Saatvirus wurde 10fach mit MEM verdünnt; Lagerung: bei -80° C

• **Zellsystem**

Zellen	MDCK/63 (Madin Darby canine kidney cells)
Herkunft	Nationales Referenzzentrum für Influenza; Robert Koch-Institut, Berlin, Germany Zellen in der 73. Passage erhalten am 09.07.2001 (entsprechend RKI +0)
verwendete Zellpassage	RKI + 3 / + 9 / + 4

• **sonstiges Material bzw. Reagenzien**

<i>Material</i>	<i>Hersteller / Lieferant</i>	<i>Art. Nr.</i>	<i>Ch.-B.</i>	<i>Verfallsdatum</i>
DMEM	Biochrom	F 0435	0030 D	01/2017
Glutamin	Biochrom	K 0283	0951 C	08/2017
Pen./Strept.	Biochrom	A 2213	1211 C	10/2017
FKS	Biochrom	S 0115	0677 B	06/2019
PBS	Biochrom	L 1820	0080 D	-
Trypsin	Invitrogen	25300-096	1437736	09/2015
Hühnererythrozyten	Labor Merck & Koll.	E-200	E200/1538	23.09.2015

• **Versuchsdurchführung und Verantwortlichkeiten**

Versuchsteil	Durchgeführt von (Position)
Versuchsleitung	Dr. Ch. Jursch (Laborleiter)
Versuchsdurchführung	Fr. S. Sachs (Biologielaborantin) und Fr. I. Grund (Biologielaborantin)
Zuarbeit: Zellkultur	Fr. I. Grund (Biologielaborantin)
HA-Test	Fr. S. Sachs (Biologielaborantin)
Ableseung & Rohdatenprotokoll	Fr. S. Sachs (Biologielaborantin)
Dateneingabe & Auswertung	Dr. Ch. Jursch (Laborleiter)
Protokollerstellung	Dr. Ch. Jursch (Laborleiter)