

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Etablierung neuer Richtlinien für die Desinfektionsmittelprüfung im
Bereich Tierhaltung sowie für die tierärztliche Praxis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr.med.vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Franziska Schmidt
aus Dresden

Leipzig, 2015

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Manfred Coenen

Betreuer: Prof. Dr. Uwe Truyen

Gutachter: Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches
Veterinärwesen, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Uwe Rösler, Institut für Tier- und Umwelthygiene,
Freie Universität Berlin

Tag der Verteidigung: 17.03.2015

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Desinfektion	3
2.1.1	Begriffsbestimmungen	3
2.1.2	Desinfektionsverfahren	4
2.1.3	Anforderungen an die Desinfektion in der Tierhaltung.....	5
2.1.4	Anforderungen an die Desinfektion in der tierärztlichen Praxis.....	6
2.1.5	Desinfektionsmittel.....	6
2.1.5.1	Wirkmechanismen	6
2.1.5.2	Einflussgrößen auf Desinfektionsmittelwirkung	8
2.1.5.3	Anforderungen an Desinfektionsmittel	12
2.1.6	Chemische Desinfektionsmittel - Wirkstoffgruppen.....	13
2.1.6.1	Aldehyde	13
2.1.6.2	Alkohole	13
2.1.6.3	Chlor- und Chlorabspalter	14
2.1.6.4	Jod und Jodverbindungen.....	14
2.1.6.5	Laugen	15
2.1.6.6	Phenolderivate	15
2.1.6.7	Quartäre Verbindungen	16
2.1.6.8	Sauerstoffabspalter	16
2.1.6.9	Säuren	17
2.2	Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmittel gegen Viren	17
2.2.1	Richtlinien der DVG	18
2.2.1.1	Entwicklung	18
2.2.1.2	Prüfmethoden.....	18
2.2.2	Europäische Normen.....	19
2.2.3	Weitere Richtlinien.....	21
2.2.3.1	DGHM und VAH.....	21

Inhaltsverzeichnis

2.2.3.2	DLG.....	21
2.3	Prüfviren.....	22
2.3.1	Bovines Virusdiarrhoe-Virus.....	22
2.3.1.1	Taxonomie und Morphologie.....	22
2.3.1.2	Epidemiologie.....	23
2.3.1.3	Tenazität.....	24
2.3.2	Equines Arteritis-Virus.....	24
2.3.2.1	Taxonomie und Morphologie.....	24
2.3.2.2	Epidemiologie.....	24
2.3.2.3	Tenazität.....	25
2.3.3	Felines Coronavirus.....	25
2.3.3.1	Taxonomie und Morphologie.....	25
2.3.3.2	Epidemiologie.....	27
2.3.3.3	Tenazität.....	27
2.3.4	Murines Parvovirus.....	27
2.3.4.1	Taxonomie und Morphologie.....	27
2.3.4.2	Epidemiologie.....	28
2.3.4.3	Tenazität.....	29
2.3.5	Newcastle-Disease-Virus.....	29
2.3.5.1	Taxonomie und Morphologie.....	29
2.3.5.2	Epidemiologie.....	30
2.3.5.3	Tenazität.....	31
3	Material und Methoden.....	32
3.1	Material.....	32
3.1.1	Testviren.....	32
3.1.1.1	Tierhaltung.....	32
3.1.1.2	Tierärztliche Praxis.....	33
3.1.1.3	Alternatives Nachweissystem für NDV.....	33
3.1.2	Zellkultur.....	33
3.1.3	Bruteier.....	34
3.1.4	Medien.....	34
3.1.5	Grundsubstanzen, Reagenzien, Geräte, Laborbedarf.....	34
3.2	Methoden.....	36
3.2.1	Zellkulturverfahren.....	36

Inhaltsverzeichnis

3.2.1.1	Besonderheiten zur Kultivierung von NDV	37
3.2.2	Kryokonservierung und Auftauen	37
3.2.3	Virusvermehrung.....	38
3.2.4	Bestimmung Infektiösitätstiter	39
3.2.5	Berechnung des Infektiösitätstiter	40
3.2.6	Bestimmung des Eiweißgehalts	40
3.2.7	Vorbereitung der Keimträger.....	40
3.2.8	Herstellung und Verwendung der Eiweißbelastung	41
3.2.8.1	Rinderalbumin	41
3.2.8.2	Fetales Kälberserum.....	41
3.2.9	Trocknungsverluste	41
3.2.9.1	Edelstahlkeimträger.....	41
3.2.9.2	Holzkeimträger	42
3.2.10	Zytotoxische Wirkung der Prüflösungen.....	43
3.2.10.1	Toxizität.....	43
3.2.10.2	Behandlung	43
3.2.11	Inaktivierungs-Bezugsprüfung	44
3.2.12	Keimträgerversuche Stahl	44
3.2.13	Keimträgerversuche Holz	45
4	Ergebnisse	47
4.1.	Darstellung des zytopathischen Effektes auf der Zellkultur	47
4.2.	Ergebnisse der Eiweißgehaltsprüfung	49
4.2.	Ergebnisse der Toxizitätsprüfung.....	50
4.3.	Ergebnisse der Behandlungsprüfung	50
4.4.	Ergebnisse der Inaktivierungs-Bezugsprüfung	50
4.5.	Einfluss der Trocknung auf die Infektiösität der Testviren.....	51
4.5.1	Vergleich der auf Stahlkeimträgern getesteten Viren.....	51
4.5.2	Vergleich der auf Holzkeimträgern getesteten Viren.....	51
4.5.3	Vergleich der auf Stahl- und Holzkeimträgern getesteten Viren hinsichtlich ihrer Titerreduktion.....	52
4.6.	Viruzide Wirksamkeit der Desinfektionsmittel im Keimträgereinst	53
4.6.1	Vergleich der auf Stahlkeimträgern geprüften Testviren	53
4.6.2	Vergleich der auf Holzkeimträgern geprüften Testviren	59
4.6.3	Vergleich von in Allantoisflüssigkeit vermehrtem NDV (All) mit in Zellkultur vermehrtem NDV (ZK)	65

Inhaltsverzeichnis

5	Diskussion.....	68
5.1	Auswahlkriterien Prüfviren.....	68
5.1.1	Tierhaltung.....	68
5.1.1.1	Bovines Virusdiarrhoe-Virus	69
5.1.1.2	Equines Arteritis-Virus	70
5.1.2	Tierärztliche Praxis	71
5.1.2.1	Murines Parvovirus.....	71
5.1.2.2	Felines Coronavirus	72
5.2	Viruzide Wirksamkeit der Desinfektionsmittel	72
5.3	Zusammenfassende Betrachtung - Eignung als Prüfviren.....	74
5.3.1	Prüfviren für die Tierhaltung.....	74
5.3.2	Prüfviren für die tierärztliche Praxis	74
5.4	Alternatives Nachweißsystem für NDV	75
5.4.1	Newcastle-Disease-Virus.....	75
5.4.2	Vergleich der Eiweißgehalte von NDV (All) und NDV (ZK)	76
5.4.3	Vergleich der Trocknungsverluste von NDV (All) und NDV (ZK)	76
5.4.4	Vergleich der Desinfektionsmittelwirkung auf NDV (All) und NDV (ZK).....	77
5.4.5	Eignung von NDV (ZK) als Prüfvirus.....	78
6	Zusammenfassung	80
7	Summary	82
8	Literaturverzeichnis	84
	Anhang	88
	Danksagung.....	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Desinfektionsverfahren.....	4
Tabelle 2: Desinfektionsverfahren.....	5
Tabelle 3: primäre und sekundäre Einflussfaktoren.....	9
Tabelle 4: Wirkspektrum von Desinfektionsmitteln.....	10
Tabelle 5: pH-Abhängigkeit der wichtigsten Desinfektionswirkstoffe	12
Tabelle 6: Prüfung chemischer Desinfektionsmittel im Veterinärbereich.....	20
Tabelle 7: Testviren nach DVG-Richtlinien für Tierhaltung.....	22
Tabelle 8: Vertreter der Familie <i>Flaviviridae</i>	23
Tabelle 9: Nomenklatur der Virusfamilie <i>Coronaviridae</i>	26
Tabelle 10: Subfamilien, Genera und Spezies der <i>Paramyxoviridae</i>	30
Tabelle 11: Zellkulturen permanenter Zelllinien	34
Tabelle 12: Chemische Grundsubstanzen.....	35
Tabelle 13: Reagenzien.....	35
Tabelle 14: Geräte.....	35
Tabelle 15: Laborbedarf.....	36
Tabelle 16: Zellkultur der verschiedenen Zelllinien	37
Tabelle 17: Infektionsdosen für die Virusvermehrung.....	38
Tabelle 18: Beobachtungszeiträume und Ausgangstiter.....	39
Tabelle 19: Durchschnittliche Titerreduktion des FCoV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Glutaraldehyd	54
Tabelle 20: Durchschnittliche Titerreduktion des MPV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Glutaraldehyd	54
Tabelle 21: Durchschnittliche Titerreduktion des FCoV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Ethanol	55
Tabelle 22: Durchschnittliche Titerreduktion des MPV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Ethanol	55
Tabelle 23: Durchschnittliche Titerreduktion des FCoV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Peressigsäure	56
Tabelle 24: Durchschnittliche Titerreduktion des MPV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Peressigsäure	56
Tabelle 25: Durchschnittliche Titerreduktion des FCoV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natronlauge	57
Tabelle 26: Durchschnittliche Titerreduktion des MPV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natronlauge	57
Tabelle 27: Durchschnittliche Titerreduktion des FCoV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natriumhypochlorit.....	58
Tabelle 28: Durchschnittliche Titerreduktion des MPV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natriumhypochlorit.....	58
Tabelle 29: Durchschnittliche Titerreduktion des BVDV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Glutaraldehyd	60
Tabelle 30: Durchschnittliche Titerreduktion des EAV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Glutaraldehyd	60
Tabelle 31: Durchschnittliche Titerreduktion des BVDV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Ethanol	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 32: Durchschnittliche Titerreduktion des EAV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Ethanol	61
Tabelle 33: Durchschnittliche Titerreduktion des BVDV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Peressigsäure	62
Tabelle 34: Durchschnittliche Titerreduktion des EAV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Peressigsäure	62
Tabelle 35: Durchschnittliche Titerreduktion des BVDV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natronlauge	63
Tabelle 36: Durchschnittliche Titerreduktion des EAV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natronlauge	63
Tabelle 37: Durchschnittliche Titerreduktion des BVDV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natriumhypochlorit.....	64
Tabelle 38: Durchschnittliche Titerreduktion des EAV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natriumhypochlorit.....	64
Tabelle 39: Durchschnittliche Titerreduktion des NDV (All) bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Glutaraldehyd	66
Tabelle 40: Durchschnittliche Titerreduktion des NDV (ZK) bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Glutaraldehyd	66
Tabelle 41: Durchschnittliche Titerreduktion des NDV (All) bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Peressigsäure	67
Tabelle 42: Durchschnittliche Titerreduktion des NDV (ZK) bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Peressigsäure	67
Tabelle 43: Eiweißgehalte (in µg/ml) von NDV (All) und NDV (ZK).....	88
Tabelle 44: Toxizität von Glutaraldehyd	88
Tabelle 45: Toxizität von Ethanol	88
Tabelle 46: Toxizität von Peressigsäure	89
Tabelle 47: Toxizität von Natronlauge	89
Tabelle 48: Toxizität von Natriumhypochlorit	90
Tabelle 49: Behandlungsprüfung aller verwendeten Zelllinien mit Glutaraldehyd, Ethanol, Peressigsäure, Natronlauge und Natriumhypochlorit	91
Tabelle 50: Inaktivierungs-Bezugsprüfung aller untersuchter Viren in den jeweiligen Zellkulturlinien	91
Tabelle 51: Stahlkeimträger - Einfluss der Trocknung auf die Stabilität der Viren	92
Tabelle 52: Holzkeimträger - Einfluss der Trocknung auf die Stabilität der Viren	92
Tabelle 53: Viruzidieprüfung Glutaraldehyd mit MPV	92
Tabelle 54: Viruzidieprüfung Ethanol mit MPV	93
Tabelle 55: Viruzidieprüfung Peressigsäure mit MPV.....	93
Tabelle 56: Viruzidieprüfung Natronlauge mit MPV	94
Tabelle 57: Viruzidieprüfung Natriumhypochlorit mit MPV	95
Tabelle 58: Viruzidieprüfung Glutaraldehyd mit FCoV	96
Tabelle 59: Viruzidieprüfung Ethanol mit FCoV	97
Tabelle 60: Viruzidieprüfung Peressigsäure mit FCoV	98
Tabelle 61: Viruzidieprüfung Natronlauge mit FCoV	98
Tabelle 62: Viruzidieprüfung Natriumhypochlorit mit FCoV	99
Tabelle 63: Viruzidieprüfung Glutaraldehyd mit BVDV	100
Tabelle 64: Viruzidieprüfung Ethanol mit BVDV	101

Tabellenverzeichnis

Tabelle 65: Viruzidieprüfung Peressigsäure mit BVDV	102
Tabelle 66: Viruzidieprüfung Natronlauge mit BVDV	102
Tabelle 67: Viruzidieprüfung Natriumhypochlorit mit BVDV.....	103
Tabelle 68: Viruzidieprüfung Glutaraldehyd mit EAV	104
Tabelle 69: Viruzidieprüfung Ethanol mit EAV	104
Tabelle 70: Viruzidieprüfung Peressigsäure mit EAV	105
Tabelle 71: Viruzidieprüfung Natronlauge mit EAV	106
Tabelle 72: Viruzidieprüfung Natriumhypochlorit mit EAV.....	106
Tabelle 73: Viruzidieprüfung Glutaraldehyd mit NDV (All)	107
Tabelle 74: Viruzidieprüfung Glutaraldehyd mit NDV (ZK).....	107
Tabelle 75: Viruzidieprüfung Peressigsäure mit NDV (All).....	108
Tabelle 76: Viruzidieprüfung Peressigsäure mit NDV (ZK).....	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkmechanismen von Desinfektionsmitteln.....	7
Abbildung 2: unbehülltes und behülltes Virus	8
Abbildung 3: Empfindlichkeit von Mikroorganismen.....	9
Abbildung 4: Ausgangssubstanzen sowie zwischenzeitlich entstehende Verbindungen chlorabspaltender Desinfektionsmittel.....	14
Abbildung 5: BVDV Infektion.....	24
Abbildung 6: CAS Methode zur Beimpfung embryonierter Hühnereier.....	39
Abbildung 7: Exsikkator	42
Abbildung 8: Edelstahlkeimträger in 6-Well-Mikrotiterplatte	44
Abbildung 9: Holzkeimträger in 6-Well-Platte.....	45
Abbildung 10: Infektion von MDBK-Zellen mit BVDV. A) Kontrolle ohne cpE B) cpE 7 Tage nach Infektion mit BVDV.....	47
Abbildung 11: Infektion von VERO-Zellen mit EAV. A) Kontrolle ohne cpE B) cpE 3 Tage nach Infektion mit EAV	48
Abbildung 12: Infektion von CRFK-Zellen mit FCoV. A) Kontrolle ohne cpE B) beginnender cpE 3 Tage nach Infektion mit FCoV C) starker cpE 7 Tage nach Infektion mit FCoV.....	48
Abbildung 13: Infektion von A9-Zellen mit MPV. A) Kontrolle ohne cpE B) cpE 10 Tage nach Infektion mit MPV.....	49
Abbildung 14: Infektion von LMH-Zellen mit NDV. A) Kontrolle ohne cpE B) cpE 3-4 Tage nach Infektion mit NDV	49
Abbildung 15: Eiweißgehalte NDV (All) und NDV (ZK) im Vergleich.....	50
Abbildung 16: Trocknungsversuche auf Stahlkeimträgern.....	51
Abbildung 17: Holzkeimträger - Titer vor und nach der Trocknung	52
Abbildung 18: Vergleich der Titerreduktion der Testviren nach Trocknung im Stahl- und Holzkeimträgerversuch	52
Abbildung 19: Viruzide Wirksamkeit von Glutaraldehyd im Stahlkeimträgerversuch - bei MPV und FCoV.....	54
Abbildung 20: Viruzide Wirksamkeit von Ethanol im Stahlkeimträgerversuch - bei MPV und FCoV	55
Abbildung 21: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Stahlkeimträgerversuch - bei MPV und FCoV.....	56
Abbildung 22: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Stahlkeimträgerversuch - bei MPV und FCoV	57
Abbildung 23: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Stahlkeimträgerversuch - bei MPV und FCoV.....	58
Abbildung 24: Viruzide Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch - bei BVDV und EAV	60
Abbildung 25: Viruzide Wirkung von Ethanol im Holzkeimträgerversuch - bei BVDV und EAV	61
Abbildung 26: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Holzkeimträgerversuch - bei BVDV und EAV	62
Abbildung 27: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Holzkeimträgerversuch - bei BVDV und EAV	63
Abbildung 28: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Holzkeimträgerversuch - bei BVDV und EAV	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 29: NDV (All) und NDV (ZK) im Viruzidieversuch mit Glutaraldehyd.....	66
Abbildung 30: NDV (All) und NDV (ZK) im Viruzidieversuch mit Peressigsäure	67

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A9	B-Lymphozyten
A. dest.	Aqua destillata
BVDV	Bovines Virusdiarrhoe-Virus
CAS	chorioallantoic sac - Methode
CEN	Europäisches Komitee für Normung (Comité Européen de Normalisation)
CEN TC 216	Europäisches Komitee für Normung, Technisches Komitee 216: chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika
cm	Zentimeter
cpE	cytopathischer Effekt
CRFK	Crandell-Reese feline kidney cells, Feline Nierenzellen
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DLG	Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e.V.
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribo-nucleid-acid, Desoxyribonukleinsäure
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.
EAV	Equines Arteritis-Virus
ECBO	Bovines Enterovirus Typ 1
FCoV	Felines Coronavirus
FECV	Felines enterales Coronavirus
FIP	Feline infektiöse Peritonitis
FKS	Fetales Kälberserum
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
h	Stunde
kbp	kilo Basenpaare
LMH	Hepatocellular carcinoma male Leghorn, Leberkarzinomzellen
MD	Mucosal Disease
MDBK	Madin Darby bovine kidney epithelial cells, Bovine Nierenepithelzellen
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MPV	Murines Parvovirus
NDV	Newcastle-Disease-Virus
NDV (ZK)	Newcastle-Disease-Virus angezüchtet auf Zellkultur
NDV (All)	Newcastle-Disease-Virus angezüchtet in Allantoisflüssigkeit

Abkürzungsverzeichnis

nm	Nanometer
OIE	World Organisation for Animal Health
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PI	Persistent Infiziert
RNA	Ribo-nucleid-acid, Ribonukleinsäure
RKI	Robert-Koch-Institut
s	Sekunde
U	Umdrehungen
VAH	Verbund für angewandte Hygiene
VERO-B4	African green monkey kidney cells, Nierenzellen der Grünen Meerkatze
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WSH	Wasser standardisierter Härte

1 Einleitung

Desinfektionsmittel spielen sowohl in der Tierhaltung, als auch in der Tierärztlichen Praxis eine entscheidende Rolle. Sie werden neben der Tierseuchenbekämpfung auch zur Prophylaxe von Infektionskrankheiten eingesetzt. Damit nimmt die Desinfektion im Rahmen der Tierhygiene eine wichtige Stellung bei der Sicherung der Qualität von Lebensmitteln tierischer Herkunft, sowie beim Aufbau von gesunden, leistungsstarken Tierbeständen ein. Durch die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten der Desinfektionsmittel werden hohe Anforderungen an deren Leistungs- und Belastungsfähigkeit gestellt. Um die Qualität, Sicherheit und Effektivität von Desinfektionsmitteln gewährleisten zu können, wurde nach einem Verfahren zur Desinfektionsmittelprüfung gesucht. Bereits 1974 wurden die ersten Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel durch die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (DVG) erstellt. Seit der ersten Fassung sind die Richtlinien einem ständigem Prozess unterworfen, der sie den aktuellen Vorkommnissen und Bedürfnissen anpasst. Bis heute sind vier Auflagen der Richtlinien erschienen (Stand 2014). Auf europäischer Ebene begannen 1989 im Zuge der europäischen Harmonisierung die Arbeiten zur Normierung der Desinfektionsmittelprüfung. Das Europäische Komitee für Normung (Comité Européen de Normalisation) (CEN) hat die Aufgabe, die schon lange international geforderte Vereinheitlichung der Bewertungskriterien für Desinfektionsmittel innerhalb Europas zu realisieren. Das CEN wird bei seiner Arbeit unterstützt durch das Deutsche Institut für Normung e.V. (DIN), in dessen Ausschüssen wiederum die DVG vertreten ist. Somit ist der DVG eine Einflussnahme durch Experten möglich. Die europäischen Normen fließen umgekehrt unmittelbar in die Arbeiten der DVG ein.

Nur durch Verwendung wirksamer Desinfektionsmittel, kann eine effiziente Desinfektion erreicht werden. Eine Prüfung auf viruzide Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln nach europäischen Richtlinien mit dem Ziel Anwendungsempfehlungen zu geben, ist nicht möglich, da derzeit nur EU-Normen, die eine Prüfung der Desinfektionsmittel im Suspensionsversuch vorsehen, verfügbar sind. Daher ist die Anwendung nationaler Prüfrichtlinien, die in Keimträgertests die Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel praxisnah prüfen können, unumgänglich (TRUYEN, 2011a).

Das Thema dieser Studie entwickelte sich im Kontext der derzeitigen Diskussion über Verbesserungsvorschläge zu den bestehenden Richtlinien. Dabei konzentriert sich diese Arbeit darauf, in Anlehnung an die Anforderungen der europäischen Normen, die Prüfung zu vereinfachen und andere Viren als bisher auf ihre Eignung als Prüfviren zu untersuchen. Es ist vorgesehen, eine Viruzidieprüfung im Bereich tierärztliche Praxis zu etablieren. Dafür sollen verschiedene Viren auf ihre Eignung untersucht werden. Des Weiteren sollen für den Bereich Tierhaltung alternative Prüfviren getestet werden. Um diesbezüglich repräsentative Aussagen zu erhalten, wurden je zwei Testviren aufgrund ihrer Tenazität, Eignung zur Kultivierung und/oder

Einleitung

Bedeutung als Tierseuchenerreger ausgewählt. Zur Prüfung wurden fünf Desinfektionsmittel aus verschiedenen Wirkstoffklassen herangezogen und für den Bereich tierärztliche Praxis auf Stahlkeimträgern, für den Bereich Tierhaltung auf Holzkeimträgern getestet.

In einem zweiten Teil soll ein alternatives Zellkulturnachweissystem für das Newcastle-Disease-Virus (NDV) geprüft werden. Ziel war es das bisher verwendete, sehr aufwendige und empfindliche System der frisch gewonnenen Hühnerembryofibroblasten abzulösen. Das in Allantoisflüssigkeit vermehrte NDV wird mit in permanenter Zellkulturlinie vermehrtem NDV verglichen. Informationen über das Ausmaß eines möglichen Eiweißfehlers sind notwendig und sinnvoll. In diesem Zusammenhang soll die Praktikabilität, Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit des alternativen Zellkulturnachweissystems getestet werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Desinfektion

2.1.1 Begriffsbestimmungen

Desinfektion - Schon das Deutsche Arzneibuch 6 von 1926 definierte Desinfektion folgendermaßen: Totes oder Lebendes Material in einen Zustand versetzen, dass es nicht mehr infizieren kann. Später versteht (MAYR, 2006) unter dem Begriff Desinfektion die gezielte Vernichtung bestimmter, in der Regel pathogener Mikroorganismen. Dabei hat die Desinfektion immer das Ziel, neben der Vernichtung der unerwünschten Keime die natürlichen Umwelt- und Lebensbedingungen so wenig wie möglich zu beeinträchtigen. Eine dem sehr ähnliche Auffassung von Desinfektion hat die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (ANON., 2008), die im Jahr 2008 Desinfektion als eine Maßnahme zur gezielten Inaktivierung unerwünschter Mikroorganismen zu einem bestimmten Zweck definierte. Hierzu werden chemische Desinfektionsmittel mit dem Ziel eingesetzt, die Funktion, Struktur oder den Stoffwechsel dieser Mikroorganismen so zu schädigen, dass Übertragungen verhindert werden. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) (ANON., 2005a) versteht unter Desinfektion die Inaktivierung eines infektiösen Agens und stellt gleichzeitig fest, dass Desinfektion die virale und bakterielle Bürde senkt, nicht aber als Reinigung oder gar Sterilisation zu verstehen ist. Das Robert-Koch-Institut (RKI) (ANON., 2004c) fordert die Angabe eines standardisierten, quantifizierbaren Wirkungsnachweises im Desinfektionsprozess, der die Reduktion der Anzahl vermehrungsfähiger Mikroorganismen infolge Abtötung bzw. Inaktivierung darstellt. Ziel soll dabei sein, einen Gegenstand in einen solchen Zustand zu versetzen, dass von ihm keine Infektionsgefährdung mehr ausgeht. Ziel der Desinfektion ist definitionsgemäß nicht die Eliminierung nicht infektiöser Umweltkeime, sondern die definierte Verminderung der Anzahl pathogener oder fakultativ pathogener Mikroorganismen. Dieser Ausschnitt aus einer Vielzahl von Literaturbeiträgen zum Thema Desinfektion zeigt den zentralen Stellenwert, den die Desinfektion und damit auch die Desinfektionsmittelprüfung in der veterinär- und humanmedizinischen Infektionsprophylaxe einnimmt.

Reinigung - Unter Reinigung wird ein Prozess zur Entfernung von Verunreinigungen unter Verwendung von Wasser mit reinigungsverstärkenden Zusätzen verstanden, ohne dass bestimmungsgemäß eine Abtötung/Inaktivierung von Mikroorganismen stattfindet oder beabsichtigt ist (ANON., 2004c). Für BÖHM & STRAUCH (2002) ist Reinigung die möglichst vollständige, langdauernde Trennung von mindestens zwei Substanzen, die physikalisch miteinander verbunden aneinander haften. Laut MÜLLER & SCHLENKER (2011) ist Reinigung eine Grundvoraussetzung für die Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in der Tierproduktion, sowie in der Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln tierischer Herkunft.

Sterilisation - Laut BÖHM & STRAUCH (2002) ist Sterilisation die Abtötung aller Mikroorganismen einschließlich der besonders widerstandsfähigen Bakteriensporen. Sterilität kann durch thermische oder chemische Verfahren, sowie durch ionisierende Strahlen oder Hochdruck erreicht werden. Dem schließt sich auch GROETTRUP (2007) an. Er definiert Sterilisation als die Elimination (Abtrennung, Abtötung) aller Mikroorganismen, sowie Inaktivierung aller Viren, Plasmiden und DNA-Fragmenten, die sich in oder an einem Produkt oder Gegenstand befinden. Die WHO (ANON., 2005a) weist darauf hin, dass vor der Sterilisation eine fachgerechte Reinigung mit Entfernung allen organischen Materials und eine Desinfektion durchgeführt werden müssen.

2.1.2 Desinfektionsverfahren

Zur Desinfektion und Sterilisation stehen zahlreiche Verfahren zur Verfügung, welche BÖHM & STRAUCH (2002) in physikalische, chemische und biologische Verfahren einteilt. Dabei ist zu beachten, dass nicht alle Verfahren zur Inaktivierung von Viren geeignet sind. Das RKI (ANON., 2007) unterscheidet ebenfalls drei verschiedene Desinfektionsverfahren und definiert Wirkungsbereiche der Verfahren. Diese sind mit Buchstaben gekennzeichnet und sind im Nachfolgenden näher erläutert:

- A zur Abtötung von vegetativen Bakterien einschließlich Mykobakterien sowie von Pilzen einschließlich Pilzsporen geeignet
- B zur Inaktivierung von Viren geeignet
- C zur Abtötung von Sporen des Erregers des Milzbrandes geeignet
- D zur Abtötung von Sporen der Erreger von Gasödem und Wundstarrkrampf geeignet (zur Abtötung dieser Sporen müssen Sterilisationsverfahren unter Berücksichtigung der einschlägigen Normen angewendet werden)

Tabelle 1: Desinfektionsverfahren nach BÖHM & STRAUCH (2002)

Physikalische Verfahren	Chemische Verfahren	Biologische Verfahren
Abflammen	Gassterilisation	thermophile Mikroorganismen
Verbrennen	Kaltsterilisation	exotherme Abbauprozesse
Feuchte Hitze	chemische Inaktivierung	Antibiose
Trockene Hitze		Nährstoffkonkurrenz
Strahlung		Milieuveränderung
Hochdruck		
Sterilfiltration		

Tabelle 2: Desinfektionsverfahren nach Robert-Koch-Institut (ANON., 2007b)

Thermische Verfahren	Chemische Verfahren	Besondere Verfahren
Verbrennen	Instrumentendesinfektion	Wäschedesinfektion in Waschmaschinen
Kochen mit Wasser	Wäschedesinfektion	Instrumentendesinfektion in Reinigungs- und Desinfektionsgeräten
Dampfdesinfektion	Flächendesinfektion	Raumdesinfektion
	Desinfektion von Ausscheidungen	Desinfektion von Abfällen
	Hygienische Händedesinfektion	

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konzentrieren sich ausschließlich auf chemische Desinfektionsverfahren durch chemische Inaktivierung. In Praxi wird die chemische Desinfektion häufig mit physikalischen Verfahren kombiniert, um bessere Ergebnisse zu erzielen.

2.1.3 Anforderungen an die Desinfektion in der Tierhaltung

Schon in den siebziger Jahren publizierte SCHLIESSER (1975) Desinfektion in der Tierhaltung als eine besonders schwierige Aufgabe. Bedingt durch die Vereinigung aller Hindernisse, die sich einer erstrebten Eliminierung von schädlichen Mikroorganismen in den Weg stellen können (Verschmutzungsgrad, hoher Keimgehalt, niedrige Temperaturen, Verschiedenheit der Baustoffe etc.). Optimale Hygiene und damit umfassende Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen sind ein unverzichtbarer Teil des Betriebsmanagements. Hygiene dient primär dazu, den Eintrag von Krankheiten zu verhindern und die Leistungsfähigkeit der Tiere zu sichern (LAGE et al., 2010). Der Tierhalter hat die Verpflichtung, unabhängig von der Haltungsform, seine Tiere vor Schäden zu bewahren. Dazu gehört ein angemessener Infektionsschutz. Mit der Definition von Zielen für Desinfektionsmaßnahmen leitet er die zentrale Stellung von Reinigung und Desinfektion für die allgemeine und spezielle Seuchenprophylaxe im Tierbestand ab. UNSHELM & METHLING (2002) definieren folgende Ziele:

- Verhinderung der Einschleppung und Verbreitung von Tierseuchenerregern
- Unterbrechung von Infektketten
- Senkung des Infektionsdruckes
- Verhinderung des infektiösen Hospitalismus
- Verhinderung des Verderbs von Lebensmitteln
- Schutz des Verbrauchers vor Zoonosen und Lebensmittelinfektionen

Schlussfolgernd haben Reinigung und Desinfektion wegen ihrer großen Rolle im Tierseuchen- und Infektionsschutz einen die Tiergesundheit und damit die Tierhaltung insgesamt sichernden Charakter. Sie sind ebenso unverzichtbare Elemente der Sicherung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit und der Qualität von Lebensmitteln tierischer Herkunft.

2.1.4 Anforderungen an die Desinfektion in der tierärztlichen Praxis

Der Erfolg tierärztlicher Tätigkeiten ist weitgehend von einer Infektionsverhinderung abhängig. Der Tierarzt hat die weitgehende Aufgabe, Mensch und Tier vor Infektionen zu schützen. Dies geschieht mit den Methoden der Desinfektion und Sterilisation (ARNDT, 1983). Auch heute setzt die Industrie auf Prävention. In der Tiermedizin ist die vorausschauende hygienische Behandlung von entscheidender Bedeutung. Das breite Spektrum von Patienten und deren Besitzer stellt Tierarzt, Ausrüstung und Personal vor eine große Herausforderung. Das vielfältige, sich ständig wandelnde Keimspektrum stellt dabei höchste Anforderungen an das Hygienemanagement in der tierärztlichen Praxis (ANON., 2011). Der Bundesverband praktizierender Tierärzte e.V. (ANON., 2004a) geht in seinem "Kodex für die Gute Veterinärmedizinische Praxis" intensiv auf die Problematik der Praxishygiene und damit verbunden auf die optimalen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen ein:

- Hygiene in der tierärztlichen Praxis zielt darauf ab, das Infektionsrisiko für Mensch und Tier zu minimieren.
- Einhaltung der Hygiene sichert die Qualität der Dienstleistung, der tierärztlichen Praxis und fördert deren Ansehen in der Öffentlichkeit.
- Der Tierarzt verfügt über das erforderliche Wissen auf dem Gebiet der Reinigung und Desinfektion. Er hält geeignete Desinfektionsmittel vor.
- Ein Reinigungs- und Desinfektionsplan ist für alle Praxisräume vorhanden und verbindlich.
- Behandlungstische werden nach jeder Behandlung gereinigt und desinfiziert.
- Instrumente, Geräte und Hilfsmittel werden umgehend nach Gebrauch gereinigt, desinfiziert und gegebenenfalls sterilisiert.
- Reinigungs-, Desinfektions- und Sterilisationsmaßnahmen sind zu dokumentieren und regelmäßig auf Ihre Wirksamkeit zu überprüfen.

2.1.5 Desinfektionsmittel

2.1.5.1 Wirkmechanismen

Die Zahl der vorhandenen bzw. zu inaktivierenden Keime ist ein wichtiger Faktor zur Erfassung und Beschreibung der Desinfektionswirkung. Art und Eigenschaften eines Desinfektionsmittels sind weitere wichtige Einflussfaktoren. Sie bestimmen das Wirkspektrum und den Anwendungsbereich. Für die Wirksamkeit muss eine Substanz im Wesentlichen drei Voraussetzungen erfüllen: 1) Adsorption an die Oberfläche der Zielstruktur (Zelle, Viruspartikel), 2) Penetration in die Zielstruktur hinein und 3) Reaktion mit einem oder mehreren Bestandteilen der Zielstruktur (Enzym, Nukleinsäuren). Die Effekte an den Zielstrukturen sind in Abhängigkeit von Einwirkzeit und -konzentration endgültig oder reversibel. Die wichtigsten Grundmechanismen der Reaktion von Desinfektionsmitteln mit den Zielstrukturen sind chemische Reaktionen, ionische und

Literaturübersicht

physikalische Wechselwirkungen (BÖHM & STRAUCH, 2002). Vegetative Bakterienzellen bieten drei Angriffspunkte für Interaktionen mit Desinfektionsmitteln: Zellwand, Zytoplasmamembran und Zytoplasma. Die Schädigung der Bakterien erfolgt dabei durch Störung folgender Strukturen und Mechanismen (DENYER & STEWART, 1998):

- Zellwandaufbau und -struktur
- Struktur der Zytoplasmamembran
- Atmungskette
- Membranschutzproteine
- Enzymsysteme des Zellstoffwechsels und der Zellwandsynthese
- Transportmechanismen der Zytoplasmamembran
- Anabole und Katabole Reaktionen im Zytoplasma
- Nucleinsäuren

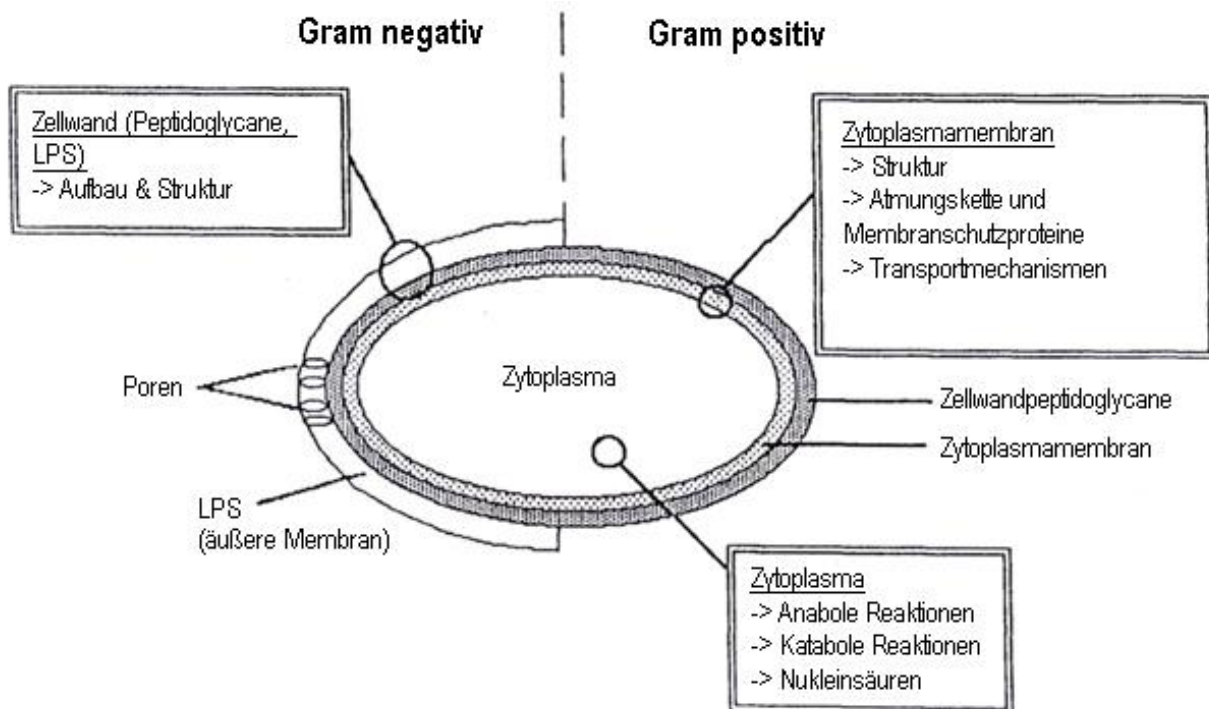


Abbildung 1: Wirkmechanismen von Desinfektionsmitteln nach DENYER & STEWART (1998)

Die Struktur von Viren unterscheidet sie von allen anderen Mikroorganismen bzw. Infektionserregern. Das Virusgenom bildet zusammen mit der es unmittelbar umgebenden Proteinhülle das Nukleokapsid. Viren werden in behüllte und unbehüllte Viren unterschieden. Bei den behüllten Viren das Nukleokapsid von einer mehr oder weniger ausgeprägten zytosolartigen Schicht (Tegument) umgeben. Außen wird das Tegument von einer Hüllmembran aus Glycoproteinen und Lipiden abgegrenzt. Bei der Inaktivierung von behüllten Viren werden meist oberflächenaktive Substanzen in die Hülle inkorporiert. Ab einer bestimmten Wirkstoffkonzentration

Literaturübersicht

des Desinfektionsmittels wird die Hülle alteriert oder zerstört. Die Hauptwirkung der chemischen Inaktivierung von unbehüllten Viren liegt in der Alteration und/oder Zerstörung oder Blockierung des Nukleokapsids und/oder der Veränderung der genetischen Information. Meist verliert die virale Nukleinsäure ihren Schutz durch das Kapsid und liegt frei vor. Nicht alle Desinfektionsmittel sind in der Lage, die freiliegende Nukleinsäure vollständig zu zerstören. In der Regel ist diese aber nicht mehr infektiös. Als Faustregeln zur Resistenz von Viren gegenüber Desinfektionsmitteln gelten (RABENAU & SCHWEBKE, 2010):

- unbehüllte Viren sind resistenter als behüllte Viren
- Viren mit eng anliegender Hülle sind stabiler als solche mit weiter Hülle
- unbehüllte Viren mit komplexen Kapsiden sind instabiler als solche mit einlagigen Kapsiden
- je kleiner und einfacher ikosaederförmige Viren gebaut sind, desto resistenter sind diese gegen chemische und physikalische Einflüsse
- je lipophiler ein Virus, desto geringer seine Stabilität
- zellgebundene behüllte Viren sind stabiler als freie, ungebundene Viren
- Art und Menge der Begleitmaterialien beeinflussen die Resistenz (Oberflächenassoziation, Schutzfunktion durch Hüllenbildung)



Abbildung 2: unbehülltes und behülltes Virus nach RHEINBABEN & WOLFF (2002)

2.1.5.2 Einflussgrößen auf Desinfektionsmittelwirkung

Die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln unterliegt zahlreichen Einflussfaktoren wie der Umgebungstemperatur, dem pH-Wert, der Oberflächenbeschaffenheit und dem Verschmutzungsgrad (SCHMEROLD, 2010). BÖHM & STRAUCH (2002) teilt die Einflussgrößen in primär und sekundär ein. Diese sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 3: primäre und sekundäre Einflussfaktoren nach Böhm & Strauch (2002)

Primäre Einflussfaktoren	Sekundäre Einflussfaktoren
Wirkspektrum des Desinfektionsmittels	Umgebungstemperatur
Konzentration und Einwirkzeit des Desinfektionsmittels	pH-Wert
Reinheitsgrad, Art und Beschaffenheit der zu desinfizierenden Oberflächen	relative Luftfeuchte und Luftgeschwindigkeit

Wirkspektrum

Generell gilt für alle chemischen Desinfektionsmittel: Es gibt kein Universalmittel, welches das gesamte Spektrum der Erreger und alle gleich gut erfasst. Je nach Zielsetzung muss deshalb immer das am besten geeignete Mittel ausgewählt werden. Die Empfindlichkeit der verschiedenen Mikroorganismen gegenüber dem Hauptwirkstoff eines Handelspräparates ist dabei besonders zu beachten. Im Allgemeinen gelten Mykoplasmen und die meisten behüllten Viren als hochempfindlich. Wenig resistent sind Bakterien und weniger empfindlich sind Pilze, Pilzsporen sowie unbehüllte Viren (MAYR, 2006). Die Widerstandsfähigkeit der Mikroorganismen gegenüber Desinfektionsmitteln ist vor allem vom Aufbau der Zellwände oder Hüllen abhängig (MÜLLER & SCHLENKER, 2011).

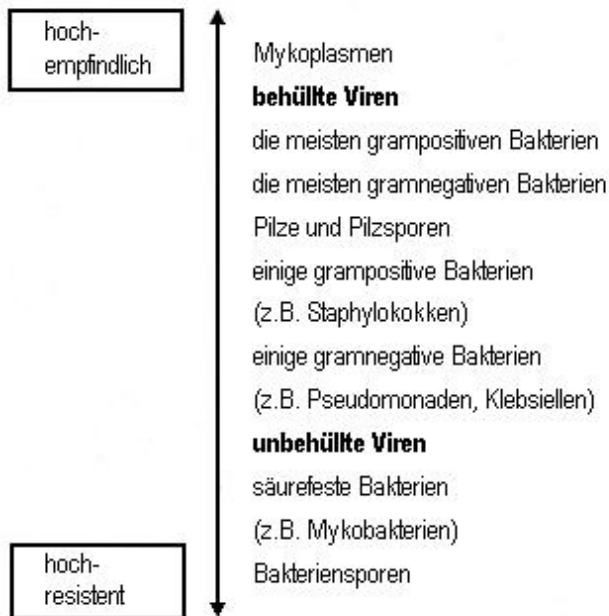


Abbildung 3: Empfindlichkeit von Mikroorganismen nach MAYR (2006)

In der nachfolgenden Tabelle sind die verschiedenen Desinfektionsmittelgruppen und ihr jeweiliges Wirkspektrum dargestellt. Das Wissen um diese Zusammenhänge spielt bei der Wahl und

Literaturübersicht

Anwendung der verschiedenen Desinfektionsmittel eine entscheidende Rolle (SCHMEROLD, 2010).

Tabelle 4: Wirkspektrum von Desinfektionsmitteln nach SCHMEROLD (2010)

Desinfektionsmittel	Bakterien		Sporenbildner	Viren		Pilze
	grampositiv	gramnegativ		behüllt	unbehüllt	
Oxidationsmittel	+++	++	++	++	++	++
halogenabspaltende Verbindungen	++	+	-	+	+	-
Aldehyde	+	++	(+)	+	+	+
Alkalien	+	+	-	++	+	-
organische Säuren	++	+	-	+	-	(+)
Alkohole	++	+	-/+	-	-	-
Phenolderivate	+	-	-	+	+	+
Schwermetalle	+	++	-/++	-	-	+/++
Detergentien	++	+	-	+	-	-
Farbstoffe	++	-/+	-	-	-	+

Zeichenerklärung: - schlechte; + gute; ++ sehr gute; +++ sehr gute und schnelle Wirkung

Konzentration und Einwirkzeit

Da viele Desinfektionsmittel aus wirtschaftlichen Gründen bis zur Grenze der Wirksamkeit verdünnt werden, spielt die genaue Einhaltung der Gebrauchsverdünnung sowie die Löslichkeit im Verdünnungsmedium eine große Rolle (GRÖSCHEL, 1973). Die Einwirkdauer ist durch das Eindringen des Desinfektionsmittels in den Mikroorganismus, die Wechselwirkung mit dem Mikroorganismus und die Verdampfungszeit des Lösungsmittels bestimmt. Wasser spielt bei der Desinfektion oft eine entscheidende Rolle. So wirkt eine 96% Alkohollösung konservierend, eine 60-80%ige Alkohollösung dagegen desinfizierend (ANON., 2001). Es ist zu beachten, dass das richtige Desinfektionsmittel zum richtigen Zweck, in der richtigen Konzentration und mit der vorgeschriebenen Einwirkzeit verwendet wird. MÜLLER & SCHLENKER (2011) führen an, dass durch die Erhöhung der Gebrauchskonzentration bzw. der Einwirkzeit diverse negative Faktoren kompensiert werden können. Zu berücksichtigen ist, dass durch eingeschränkte Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln Resistenzen gegen Desinfektionsmittelwirkstoffe entstehen können.

Reinheitsgrad, Art und Beschaffenheit der zu desinfizierenden Oberflächen

Der Reinheitsgrad, sowie Art und Beschaffenheit der zu desinfizierenden Oberflächen haben einen wesentlichen Einfluss auf den Desinfektionserfolg. Menge und Zusammensetzung von vorhandenen Verunreinigungen gefährden, insbesondere durch Absorptions- und Neutralisationseffekte die Desinfektionswirkung. Dem im Schmutz enthaltenen wasserlöslichen organischen Material kommt im Hinblick auf die Desinfektion die größte Bedeutung zu. Die Beeinträchtigung der Wirkung von Desinfektionsmitteln in Gegenwart von Eiweißen wird als

Literaturübersicht

Eiweißfehler bezeichnet. Schon geringe Mengen organischen Materials sind in der Lage, die antimikrobielle Wirkung von Desinfektionsmitteln herabzusetzen. Die Ursachen hierfür sind vielfältig und laut THIEL (1978) zurückzuführen auf:

- Schmutzpartikel absorbieren Desinfektionsmittel, dadurch tritt eine Konzentrationsminderung auf
- stark eingetrockneter Schmutz hat eine mechanische Schutzwirkung gegenüber dem Desinfektionsmittel
- Desinfektionsmittel bilden mit organischen Stoffen chemische Komplexe und verlieren damit ihre antimikrobielle Aktivität
- entstandene chemische Komplexe bilden eine Schutzhülle um die Mikroorganismen

Auch die Assoziation an Oberflächen hat laut RHEINBABEN & WOLFF (2002) einen großen Einfluss auf die Stabilität und Resistenz von Viren und damit auf die mögliche Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln. Es können sowohl Zelloberflächen als auch unbelebte Oberflächen aus Kunststoff, Glas, Holz, Keramik und anderen Materialien gemeint sein. Hier gilt im Allgemeinen die Regel, dass eine Oberflächenassoziation in den meisten Fällen zu einer höheren Resistenz, insbesondere gegenüber chemischen Einflüssen führt.

Umgebungstemperatur

Neben dem Verschmutzungsgrad spielt die Temperatur eine nicht unbeträchtliche Rolle bei der Beeinflussung von Desinfektionsmaßnahmen. Niedere Temperaturen setzen die Wirkung der meisten Desinfektionsmittel stark herab. Eine Wirksamkeitsbeeinträchtigung von Desinfektionsmitteln durch eine Herabsetzung der Temperatur wird als Kältefehler bezeichnet. Die Reduktion der Anwendungstemperatur von 20°C auf 10°C kann ohne weiteres eine Verdopplung der Anwendungskonzentration erforderlich machen (HOLZAPFEL et al., 2004). LAGE et al. (2010) beschreibt diesen Effekt als Temperaturfehler. Mit einer Konzentrationsanpassung kann dieser Fehler in gewissen Grenzen behoben werden. Nicht nur niedrige, auch hohe Temperaturen können zu einem Wirkungsverlust von Desinfektionsmitteln führen. So findet bereits bei einer Temperatur von 30°C ein Wirkstoffzerfall bei Sauerstoff- und Chlorabspaltern statt.

pH-Wert

Entsprechend ihrem natürlichem Milieu sind verschiedene Viren an unterschiedliche pH-Werte angepasst. Geringe Verschiebungen dazu werden toleriert. Stark saure und alkalische pH-Werte führen bei der Mehrzahl der Viren zur Inaktivierung. Dies kann bei der Entwicklung von viruzid wirksamen Desinfektionsmitteln genutzt werden (RABENAU & SCHWEBKE, 2010). Auch die keimtötende Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln kann vom pH-Wert beeinflusst werden.

Literaturübersicht

So sind Aldehyde und Chlorverbindungen besonders stark pH-abhängig. Die optimale Wirkung von Chlor und Chlorverbindungen liegt im sauren pH-Bereich. Bei oberflächenaktiven Stoffen ist dagegen bei niedrigen pH-Werten mit Wirkungsverlust zu rechnen (THIEL, 1978).

Tabelle 5: pH-Abhängigkeit der wichtigsten Desinfektionswirkstoffe nach STEUER & SCHUBERT (2007)

Desinfektionsmittel	optimaler pH-Bereich
Alkohole	2-10
amphotere Verbindungen	4-9
Chlor	2-7(9)*
Formaldehyd	2-10
Glutaraldehyd	2-10
Guanidine	(6)*8-10
Jod	2-7(9)*
Peressigsäure	2-4(8)*
Phenole	2-4(9)*
quartäre Verbindungen	4-9

* mit abnehmender Wirksamkeit bis maximal (x) wirksam

Relative Luftfeuchte und Luftgeschwindigkeit

Die relative Luftfeuchte und die Luftgeschwindigkeit beeinflussen das Abtrocknungsverhalten von Oberflächen. Aus diesem Grund wirken diese Faktoren besonders bei Desinfektionsmitteln, die Wasser zur Wirkung benötigen. So ist beispielsweise der Einfluss bei Phenolen und Aldehyden hoch, bei anderen Wirkstoffgruppen wie Peressigsäure oder Wasserstoffperoxid gering (BÖHM & STRAUCH, 2002).

2.1.5.3 Anforderungen an Desinfektionsmittel

Folgende Anforderungen sind laut STEUER & SCHUBERT (2007) an ein Desinfektionsmittel zu stellen:

- Das Mittel muss die gewünschten Mikroorganismen abtöten oder irreversibel schädigen.
- Das Mittel muss wirtschaftlich sein.
- Das Mittel muss licht- und sauerstoffbeständig sein.
- Das Mittel darf sich beim Stehen über längere Zeit nicht zersetzen oder in seiner Wirkung nachlassen.
- Das Mittel soll nach Möglichkeit wenig geruchsintensiv und wenig haut- und schleimhautreizend sein.
- Das Mittel soll für das Desinfektionsgut wenig aggressiv sein.
- Das Mittel soll benetzend sein, um auf Bakterien einwirken zu können.
- Das Mittel soll trotz rauer und poriger Oberfläche von Gegenständen in die Tiefe eindringen.
- Das Mittel soll keinen oder nur geringen Eiweißfehler haben.

Literaturübersicht

- Das Mittel soll möglichst einen geringen Seifenfehler haben, d.h., bei Kontakt mit Seife, z.B. über einen veränderten pH-Wert, nicht unwirksam werden.
- Das Mittel soll keinen Temperaturfehler aufweisen.
- Das Mittel soll für Anwender und Umwelt, in gewissen Grenzen ungiftig sein.
- Das Mittel soll biologisch abbaubar sein.

2.1.6 Chemische Desinfektionsmittel - Wirkstoffgruppen

2.1.6.1 Aldehyde

Aldehyde wirken als Reduktionsmittel. Übertroffene Bedeutung kommt dem Formaldehyd zu, einem stechend riechendem Gas, das als 37%ige wässrige Lösung in den Verkehr kommt. Formaldehydlösung wird als Grobdesinfektionsmittel mit bakterizider, tuberkulozider, sporozider, fungizider und antiviraler Wirkung angewendet (MEHLHORN, 1979). Ein weiterer wichtiger Vertreter der Aldehyde ist Glutaraldehyd. Glutaraldehyd ist eine ölige Flüssigkeit. In Handelsdesinfektionsmitteln wird vor allem eine Kombination von Formaldehyd, Glutaraldehyd und Glyoxal angewendet. Die Wirkung dieser Präparate ist an eine reaktive Aldehydgruppe gebunden, die vor allem mit den Amino- und Amidgruppen der Zellproteine reagiert. Durch Bildung von irreversiblen Methylbrücken werden Bestandteile der Zellwand zerstört, wodurch diese durchlässig und das osmotische Gleichgewicht gestört wird. Außerdem werden Zellenzyme inhibiert, so dass der Zellstoffwechsel behindert wird. Besonders bei Viren binden sich Aldehyde auch an die Nucleinsäuren und inaktivieren diese. Da die Reaktionen der Aldehyde nicht nur mit Proteinen der Mikroorganismen ablaufen, sondern mit allen Proteinen, verlieren die Aldehyde in Gegenwart von Eiweißen einen Teil ihrer Wirkung. Glutaraldehyd ist jedoch auch bei sehr hohen Belastungen mit organischem Material weiterhin wirksam. Aldehyde sind stark temperaturabhängig. Ihre Wirkung ist unterhalb von 10°C stark beeinträchtigt und um 0°C komplett erloschen (BÖHM & STRAUCH, 2002).

2.1.6.2 Alkohole

Alkohole fällen rasch die Eiweiße vegetativer Mikroorganismen, erheblich langsamer die Nucleinstrukturen der Viren (Mindesteinwirkzeit 1h). Die optimale Wirkung wird in der Konzentration 70-80% erreicht. Zu hohe oder zu niedrige Alkoholverdünnungen sind wirkungslos. Sporen werden nicht angegriffen (ARNDT, 1983). Alkohol wirkt besonders rasch keimtötend. Er hat die Eigenschaft, schnell in Bakterien einzudringen, auch dort wo eine Fettschicht das Eindringen anderer Mittel erschwert. Alkohole werden für die Hände- und Hautdesinfektion 70%-ig eingesetzt. Vor allem bei der Haut- und Händedesinfektion ist zu beachten, dass nicht sterilisierter und nicht filtrierter Alkohol Sporen von Tetanus- und Gasbranderregeren enthalten kann. Für die Flächen- und Gerätedesinfektion sollen alkoholische Desinfektionsmittel nur verwendet werden, wenn eine schnell wirkende Desinfektion notwendig ist oder die zu desinfizierenden Oberflächen

Literaturübersicht

für andere Desinfektionsmittel ungeeignet sind. Dafür werden vorrangig wässrige Gebrauchslösungen mit nicht mehr als 10% Alkohol verwendet. Es ist darauf zu achten, dass bei der Anwendung auf größeren Flächen sich aufsteigende Dämpfe entzünden können. Daher sind Maßnahmen zum sekundären Explosionsschutz zu treffen. Außerdem dürfen nur Mittel mit einem Flammpunkt von 24°C oder höher verwendet werden (STEUER & SCHUBERT, 2007).

2.1.6.3 Chlor- und Chlorabspalter

Die antimikrobiellen Wirkungskomponenten dieser Substanzgruppe sind Chlor, Chlorwasserstoff, unterchlorige Säure und kurzzeitig auch Sauerstoff. Chlor, Chlorwasserstoff und Sauerstoff verändern die Erregerzellmembranen durch Eiweißdenaturierung, während die unterchlorige Säure diese direkt zerstört. Intrazelluläre Effekte, in Form von Enzymblockaden werden durch Chlor und unterchlorige Säure herbeigeführt. Das Wirkungsoptimum der Chlorverbindungen liegt bei einer Temperatur von über 15°C. Vor allem die Hypochlorite zeigen eine sehr starke Temperaturabhängigkeit in ihrer Wirkung. Sie zerfallen sehr leicht durch Hydrolyse und sind deshalb vor Wasser und Luftfeuchtigkeit geschützt sowie kühl aufzubewahren (SCHMEROLD, (2010).

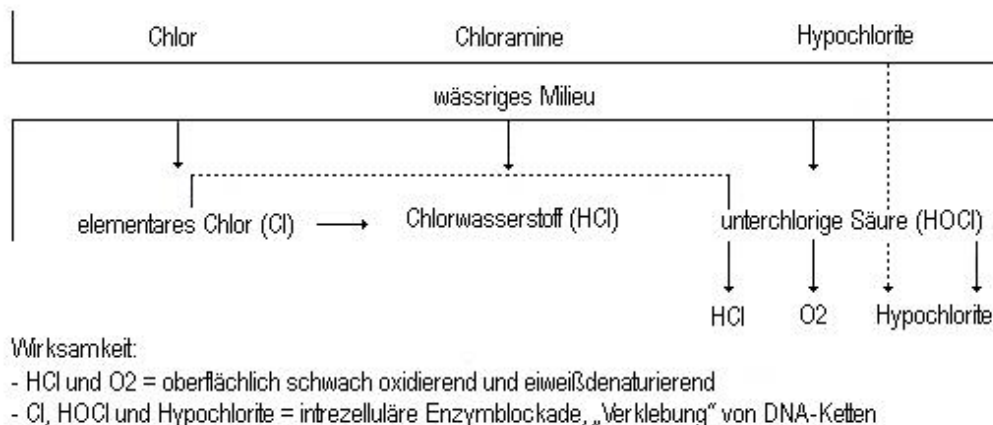


Abbildung 4: Ausgangssubstanzen sowie zwischenzeitlich entstehende Verbindungen chlorabspaltender Desinfektionsmittel (SCHMEROLD, 2010)

Der Gebrauch von Chlor und chlorabspaltenden Verbindungen als Desinfektionswirkstoffe ist weniger im Krankenhausbereich, vielmehr in der Lebensmittelindustrie verbreitet. Bedingt durch das stark korrosive Verhalten und die Empfindlichkeit gegenüber organischer Materie ist der Einsatz in der Flächen- und Instrumentendesinfektion nahezu unmöglich (HAHN, 1981).

2.1.6.4 Jod und Jodverbindungen

Die Wirkungsweise von Jod und Jodverbindungen beruht hauptsächlich auf ihrem stark oxidativen Potential. Es kommt zu einer empfindlichen Störung der Abläufe der Redox-Vorgänge des

Literaturübersicht

Stoffwechsels der Zielorganismen, außerdem zu oxidativen Veränderungen molekularer Strukturen (HAHN, 1981). Jod löst sich gut in Alkohol und schlecht in Wasser. Zur Solubilisation in Wasser werden so genannte Lösungsvermittler verwendet. Mit diesen Lösungsvermittlern lässt sich eine Jodkonzentration im Wasser von bis zu 30% erreichen. Der wirksame Bestandteil ist bei allen Lösungen das freie Jod. Jodophore sind generell sauer eingestellt. Im alkalischen Bereich entstehen das nicht mikrobiell wirksame Jodid und Jodat. Das Wirkspektrum ist sehr breit. Jodophore sind schon nach kurzer Zeit gegen fast alle Bakterienarten wirksam. Die Effektivität von Jod wird in hohen Konzentrationen wenig durch organisches Material oder den pH-Wert beeinflusst. In niedrigen Konzentrationsbereichen tritt ein starker Wirkungsverlust ein. Ferner ist zu beachten, dass Jodophore nicht bei Temperaturen über 40°C angewendet werden dürfen. Ab dieser Temperatur verdampft Jod. Dies hat einen Wirkungsverlust und Korrosionsgefahr zur Folge (BÖHM & STRAUCH, 2002).

2.1.6.5 Laugen

Die bakterizide, fungizide und virusinaktivierende Wirkung von Laugen beruht auf den OH-Ionen, welche besonders bei höheren Temperaturen die Säureamidbindung in der Mikrobenzellwand hydrolytisch spalten können. Die schlechte Haut- und Materialverträglichkeit schränkt die praktische Verwendung von Laugen erheblich ein. Nicht nur Metalle wie Zink und Aluminium, sondern auch Kunststoffe, besonders PVC und Polyester werden stark angegriffen (Eggensperger, 1973). Einsatzgebiet der Laugen ist die Grobdesinfektion von Oberflächen, das Anlegen von Seuchenschutzstreifen oder -matten, Desinfektionswannen sowie die Tierkörperbeseitigung. Natriumhydroxidlösung wird dabei am häufigsten verwendet. Entscheidend für die desinfizierenden Effekte des Natriumhydroxids ist der pH-Wert. Seine Wirksamkeit wird auch bei sinkenden Temperaturen kaum beeinflusst. Der Zusatz von geeigneten Frostschutzmitteln unter Einhaltung des nötigen pH-Wertes erbringt eine desinfizierende Wirkung bis -10°C. Das gute Durchdringungsvermögen der Natriumhydroxidlösung führt zu einer guten Tiefenwirkung bei der Desinfektion. Auch eiweiß- und fetthaltige Substanzen sowie Schmutzpartikel beeinflussen die Wirksamkeit von Natriumhydroxid kaum (SCHMEROLD, 2010).

2.1.6.6 Phenolderivate

Phenol ist ein starkes Protoplasmagift, das nach Adsorption an die Zelloberfläche rasch in die Zelle eindringt und mit Proteinen und Zytoplasma reagiert. Phenole greifen die Zellwand an (STEUER & SCHUBERT, 2007). Bereits 1865 wurde Phenol von LISTER als Desinfektionsmittel eingeführt, ist aber heute wegen geringer Wirksamkeit in nichttoxischen Gebrauchskonzentrationen nicht mehr gebräuchlich. Deutlich wirksamer sind hingegen Phenolderivate. Zur Charakterisierung ihrer antimikrobiellen Wirkungsstärke dient der Phenolkoeffizient. Dieser gibt an, wie viel stärker ein phenolhaltiges Desinfektionsmittel im Vergleich zu Phenol wirkt. Viren werden häufig nicht oder nur durch erhöhte Wirkstoffkonzentrationen inaktiviert. Die Wirksamkeit der Phenolderivate nimmt mit

Literaturübersicht

der Länge der Seitenketten und der eingebauten Halogenatome zu. Die Moleküle zeichnen sich durch eine starke Eiweißbindung aus. Mikroorganismen sterben ab, nachdem die lipophilen Desinfektionsmittelmoleküle in die Zellmembran eingedrungen sind und sie geschädigt haben. Komplexbildner und geringe Tensidmengen fördern das Eindringen, während ein Seifenüberschuss und hartes Wasser die Wirkung behindern. Die Korrosivität ist gering, Anwendung finden daher häufig Kombinationen aus Phenolderivaten mit anderen Substanzen. Phenolderivatpräparate verfügen meist über eine gute Tiefen-, Netz- und Reinigungswirkung mit länger anhaltender Nachwirkung. Diese Persistenz geht leider häufig mit einer erschwerten biologischen Abbaubarkeit einher, weshalb Phenolderivate rückstandstoxikologisch und umwelttechnisch bedenklich sind (STEIGER, 1986).

2.1.6.7 Quartäre Verbindungen

Die kationenaktiven, elektropositiv reagierenden quartären Ammoniumverbindungen führen zu einem kinetischen Ausgleich mit den elektronennegativen Ladungen von Proteinen. Während dieser Adsorptionsphase findet nur eine geringfügige Bakteriolyse statt. Wie andere grenzflächenaktive Stoffe haften auch quartäre Ammoniumverbindungen zunächst adsorptiv an Bakterienoberflächen an. Danach reagieren sie mit den Lipiden der Zellwände und verändern somit die Oberflächenstruktur der Mikroorganismen. In einem weiteren Schritt wird die Permeabilität der Zytoplasmamembran und damit deren Funktion aufgehoben. Die Membranzerstörung wird als Hauptursache für die antimikrobielle Wirksamkeit angesehen. Die Wirksamkeit von quartären Ammoniumverbindungen wird durch Art und Länge der um das elektropositive Zentralatom gelagerten Alkyl- und Arylreste wesentlich beeinflusst. Im späteren Einwirkungsverlauf findet eine Zerstörung lebenswichtiger zellulärer Enzyme und Eiweiße durch in der Zelle befindliche aktivierte autolytische Enzyme statt. Zu diesem Zeitpunkt reagieren die quartären Ammoniumverbindungen auch mit Nukleinsäuren und bewirken deren Denaturierung (EDELMEYER, 1982). Die Effektivität wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Organische Substanzen setzen sie stark herab, auch die Anwesenheit von Seifen wirkt sich negativ aus. Ebenso spielt der pH-Wert eine wichtige Rolle. Im sauren Milieu ist der desinfizierende Effekt deutlich schlechter als im alkalischen, bei einem pH-Wert unter 3 fehlt er völlig. Die Wirksamkeit erhöht sich mit steigender Temperatur. Hauptanwendungsbereich ist die Lebensmittelindustrie. (BÖHM & STRAUCH, 2002).

2.1.6.8 Sauerstoffabspalter

Sauerstoff bildet mit fast allen Elementen und Verbindungen unter Wärmeentwicklung Oxide, Säuren und Salze. Diese Oxidation verläuft besonders rasch und intensiv bei Anwesenheit atomaren Sauerstoffs. Er vermag an fast allen Molekülen der Mikroorganismen anzugreifen und sie irreversibel, bis zur Inaktivierung des Keimes zu verändern. Hieraus resultiert ein äußerst breites Wirkspektrum sauerstoffabspaltender Desinfektionsmittel gegenüber Bakterien,

Literaturübersicht

Bakteriensporen, Viren und Pilzen. Während des Zerfalls sauerstoffabspaltender Mittel müssen sich diese in unmittelbarer Nähe des Mikroorganismus befinden. Ansonsten reagiert das abgespaltene Sauerstoffatom mit einem näherliegenden Partner. Hierauf gründen sich die hohen Anforderungen an die Reinigung vor der Desinfektion mit Schaffung eines möglichst niedrigen Fremdeiweißgehalt und die Korrosionsstabilität der Materialien. In Folge der Reaktionsfreudigkeit des Sauerstoffs wird die Desinfektionswirksamkeit kaum von der Temperatur beeinflusst (STEIGER, 1986). Zu den wichtigsten Vertretern dieser Gruppe gehören Wasserstoffperoxid und Peressigsäure. Sie oxidieren durch atomaren Sauerstoff die Zellproteine und Nukleinsäuren der Mikroorganismen. Peressigsäure zerfällt in Essigsäure und Wasserstoffperoxid, wobei Letzteres den atomaren Sauerstoff freisetzt (MÜLLER & SCHLENKER, 2011).

2.1.6.9 Säuren

Abgesehen von einigen Sonderfällen werden organische Säuren vor allem zu Desinfektionszwecken eingesetzt. Hauptanwendungsgebiet der Stoffgruppe liegt allerdings bei der Konservierung von Lebensmitteln und Kosmetika. Nur einige Vertreter werden als Desinfektionsmittel verwendet, wie Phenylessig-, Ameisen-, Essig- oder Propionsäure. Säuren wirken zum Teil durch Absenkung des pH-Wertes. Die Fähigkeit Protonen abzuspalten erklärt nicht vollständig den Effekt, denn die meisten Desinfektionsmittel sind relativ schwache Säuren. Die volle Wirksamkeit wird nur erreicht, wenn ein Großteil der Säure in undissoziierter Form vorliegt. Es wird vermutet, dass die Säuren die Aufnahme von Substraten in die Zelle verhindern, die für die Zellen lebenswichtig sind. Sie benötigen für den intra- und interzellulären Stofftransport substratabhängige Protonenpumpen. Für eine gute Wirkung organischer Säuren müssen relativ hohe Konzentrationen verwendet werden. Bei Eiweißbelastung sinkt die Wirksamkeit der Säuren ab, was durch eine Verlängerung der Einwirkzeit oder eine Erhöhung der Konzentration ausgeglichen werden kann. Vor allem Ameisensäure kommt als 2-4%-ige Lösung zur Flächendesinfektion zum Einsatz (BÖHM & STRAUCH, 2002).

2.2 Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmittel gegen Viren

Die Prüfung von Desinfektionsmitteln gegen Viren unterscheidet sich wesentlich von Prüfungen gegen andere Mikroorganismen, da für den Nachweis von Viren jeweils lebende Zellen als Indikatoren erforderlich sind (RABENAU & SCHWEBKE, 2010). Die Desinfektionsmittelprüfung erstreckt sich auf die Wirksamkeit, die Anwendbarkeit und die Umweltverträglichkeit. Die Prüfung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln für die Tierhaltung und für den Lebensmittelbereich erfolgt nach einer Richtlinie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG). Nach einer Richtlinie der Deutschen Landwirtschaftsgesellschaft e.V. (DLG) werden unter anderem Korrosivität und Tierverträglichkeit getestet. Durch den Verbund für angewandte Hygiene (VAH) erfolgt eine Testung von Desinfektionsmitteln für den Klinik- und Laborbereich (MÜLLER & SCHLENKER, 2011).

Literaturübersicht

Praxisnahe Methoden zur Prüfung von Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren liegen in Deutschland bisher für Flächen- und Instrumentendesinfektionsmittel, zur Anwendung im Rahmen des Infektionsschutzgesetzes sowie zur Flächendesinfektion für den veterinärmedizinischen Bereich vor. Europäische Normen für praxisnahe Prüfungen befinden sich noch in der Entwicklung (RABENAU & SCHWEBKE, 2010).

2.2.1 Richtlinien der DVG

2.2.1.1 Entwicklung

1951 gegründet, ist die Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) die wissenschaftliche Gesellschaft der Veterinärmedizin. In relativ kurzer Zeit entwickelte sich die DVG zu einem hoch angesehenen, einflussreichen und leistungsfähigen Wissenschaftsverband, der alle Fachrichtungen der veterinärmedizinischen Wissenschaft umfasste. Ihr Zweck liegt in der Förderung der tierärztlichen Wissenschaft, sowie darin, Forschungsergebnisse so aufzubereiten und zu vermitteln, dass die in der beruflichen Praxis tätigen Tierärztinnen und Tierärzte sie für sich und ihre Patienten verwerten können.

Dem Ausschuss "Desinfektion in der Veterinärmedizin" der DVG ist 1970 die Aufgabe gestellt worden, ein weitgehend standardisiertes Verfahren zur Prüfung von Desinfektionsmitteln an Mikroorganismen zu erarbeiten. Was Bakterien und Pilze angeht, konnte der Ausschuss bei der Erarbeitung der eigenen Prüfungsgrundlagen auf die Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) zurückgreifen. Diese mussten den speziellen Erfordernissen der Veterinärmedizin angepasst werden (BISPING & KIRPAL, 1973). 1974 hatte der Fachausschuss der DVG die Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin erarbeitet, diese enthielten auch ein Prüfungsschema für Viruzidie. Die Methodik der Prüfung von viruziden Desinfektionsmitteln wurde und wird anhand der seitdem in Viruzidieprüfungen gemachten Erfahrungen weiter ausgearbeitet und verbessert (MAHNEL 1983).

2.2.1.2 Prüfmethoden

Die Basis für verlässliche Aussagen zur Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln sind valide und reproduzierbare Prüfmethoden (Suspensionsversuche und Versuche unter praxisnahen Bedingungen wie Keimträgerversuche) (ANON., 2010). Grundsätzlich können Wirksamkeitsprüfungen von Desinfektionsmitteln in Laborversuchen und in praktischen Anwendungssituationen erfolgen. Bisher am weitesten verbreitet ist die Prüfung in aussagekräftigen Laborversuchen. Eine solche komplette Prüfung setzt sich aus Vorversuchen und Hauptversuchen zusammen. Die Vorversuche sind für die Aussagen zu wirksamen Einsatzkonzentrationen außerordentlich wichtig. Dazu gehört in der Viruzidieprüfung nach DVG-Richtlinien die Ermittlung der zytotoxisch wirksamen Konzentration der Produktlösung und die Ausschaltung der Toxizität. Zu den Hauptversuchen gehören Suspensionstest und

Literaturübersicht

Keimträgerversuche als praxisnahe Laborversuche. Im Suspensionsversuch wird unter standardisierten Bedingungen die Wechselwirkung zwischen Desinfektionsmittel und den Prüfkeimen, in Gegenwart von Desinfektionsmittelwirkung beeinflussenden Faktoren (z.B. Eiweiß) erfasst. Es wurden überwiegend die wirtschaftlich günstigeren semiquantitativen Suspensionsversuche (Endpunktmethode) durchgeführt. Auf Ergebnisse dieser Suspensionsversuche sind nur für einige Einsatzgebiete Anwendungsempfehlungen zu gründen, für die meisten Bereiche sind nur sehr begrenzte oder keine Praxisempfehlungen ableitbar. Insbesondere für Desinfektionsmittel, die im Tierhaltungsbereich eingesetzt werden sollen, ist der Keimträgereinstest der wichtigste Wirksamkeitstest. Diverse Materialien werden, je nach Anwendungsgebiet als Prüfkörper herangezogen. Für den Lebensmittelbereich und die Validierung von Desinfektionsmitteln für die tierärztliche Praxis sind Keimträger aus Edelstahl angedacht, für den Bereich Tierhaltung ist Holz die limitierende Oberfläche. Die Beurteilung der Desinfektionsmittelprüfung kann quantitativ und semiquantitativ erfolgen. Bei geeigneter Auswahl der Keimträger und Prüfbedingungen sind, unabhängig von der Wahl der Auswertung aus den Keimträgerversuchen verifizierbare Anwendungsempfehlungen abzuleiten (BÖHM, 2011). Die Einführung von standardisierten Keimträgerversuchen führte zu Erprobung einer Vielzahl von Materialien als mögliche Keimträger (REUSS, 1957), (HOLZ, 1958), (KIRCHHOFF, 1975), (STELLMACHER & SCHWEBS, 1970), (KUWERT & THRAENHART, 1977). Zu den erprobten Materialien gehörten Agar, Glas, Glaspapier, Kanülen, Kunststoff, Metall, Papier, Seidenfäden, Streichhölzer und fester Zellstoff. Heute werden Verbandsmüll, Holz und Stahl für die Keimträgerversuche nach DVG-Richtlinie verwendet.

2.2.2 Europäische Normen

1989 begannen auf europäischer Ebene die Arbeiten zur Normierung der Desinfektionsmittelprüfung, die bis heute andauern (BÖHM, 2011). Die Gremien des Europäischen Komitee für Normung (CEN) sind hierarchisch aufgebaut. Das Technische Komitee (TC) ist das oberste Gremium auf fachlicher Ebene. Die Erarbeitung der Normen findet in Arbeitsgruppen statt. Beim CEN TC 216 sind drei Arbeitsgruppen (WG 1 - WG 3) angesiedelt, diese beschäftigen sich mit Normungsvorhaben für den humanmedizinischen (WG 1), veterinärmedizinischen (WG 2) und Lebensmittel- sowie institutionellen Bereich (WG 3). Die Europäischen Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika gliedern sich in Basisteste (Phase 1), quantitative Suspensionsteste (Phase 2, Stufe 1), praxisnahe Tests (Phase 2, Stufe 2) und Feldstudien (Phase 3). Im Jahr 2006 wurde für die Viruzidieprüfung im Bereich Veterinärmedizin die Norm EN 14675 "Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1)" veröffentlicht. Im Gegensatz zu den nationalen Prüfvorschriften der DVG wird nur ein Testvirus zur Prüfung

Literaturübersicht

herangezogen. Es handelt sich hierbei um das bovine Enterovirus Typ 1 (ECBO-Virus), welches ebenfalls im Rahmen der Viruzidieprüfung für die Tierhaltung nach DVG-Richtlinien verwendet wird (ANON., 2005b). Zur Bewertung der Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels nach verschiedenen Europäischen Normen sind Mindestanforderungen an die Keimzahlreduktion gesetzt. Diese werden als Reduktionsfaktor angegeben (siehe Tabelle 6). Der Reduktionsfaktor ist ein logarithmischer Ausdruck der Keimzahlreduktion.

Berechnung nach der Formel:

$$RF = \log_{10}(RKZ_{H_2O}) - \log_{10}(RKZ_{DM})$$

RF	Reduktionsfaktor
RKZ_{H_2O}	Restkeimzahlreduktion nach Versuch mit Wasser
RKZ_{DM}	Restkeimzahlreduktion nach Versuch mit Desinfektionsmittel

Ein Reduktionsfaktor von vier entspricht einer Keimzahlreduktion um vier logarithmische Stufen oder vier Zehnerpotenzen oder 99,99% (GABRIEL & BRILL, 2011).

Tabelle 6: Prüfung chemischer Desinfektionsmittel im Veterinärbereich nach GABRIEL & BRILL (2011)

Norm	Auslobung	Reduktionsfaktor [lg]	Anzahl Wiederholungsprüfungen
EN 1656	Bakterizidie	≥5,0	6
EN 1657	Fungizidie	≥4,0	1
EN 14349	Bakterizidie	≥4,0	1
EN 14204	Mykobakterizidie	≥4,0	1
EN 14675	Viruzidie	≥4,0	1

Die Europäischen Normen fließen unmittelbar in die Arbeit des Ausschuss "Desinfektion in der Veterinärmedizin" der DVG ein. Das hat den Vorteil, dass hinsichtlich der Wertung der Ergebnisse unter statistischen Aspekten auf die Erkenntnisse und Daten aus Ringversuchen von EU-finanzierten wissenschaftlichen Begleituntersuchungen zurückgegriffen werden kann. Allerdings ist der Ansatz der DVG-Richtlinien weitgehender und verbindlicher als der der DIN EN-Normen. Die Erfüllung der obligatorischen Prüfbedingungen gemäß den Europäischen Normen legen die neuen DVG-Richtlinien zwar als Grundvoraussetzung fest, geben aber über die Wahl praxisnaher Prüfbedingungen vergleichende Daten an die Hand. So erfährt der Anwender geprüfter und gelisteter Präparate wie welches Desinfektionsmittel in welcher Anwendungssituation effektiv eingesetzt werden kann. Damit werden auch in Zukunft die statistisch abgesicherten, von einem Expertengremium geprüften Desinfektionsmittellisten der DVG ihre große Praxisrelevanz behalten (BÖHM, 2011).

2.2.3 Weitere Richtlinien

2.2.3.1 DGHM und VAH

Von der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) wurde gemäß Beschluss der Mitgliederversammlung während einer Tagung in Bad Kissingen 1955 ein Ausschuss mit der Aufgabe betraut, Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel auszuarbeiten, um zu einer einheitlichen Prüfmethodik zu gelangen. Die Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel sollten zunächst nur auf einem beschränkten Gebiet der Desinfektion einheitliche Aussagen ermöglichen. Es war beabsichtigt die Richtlinien den neu gewonnenen, methodischen Erkenntnissen laufend anzupassen (KLIEWE et al., 1958). Die Richtlinie umfasste neben den allgemeinen Richtlinien die Methoden zur Prüfung von Desinfektionsmitteln mit der Bestimmung der bakteriostatischen Wirkung im Verdünnungstest und der bakteriziden, fungiziden und sporoziden Wirkung im Suspensionstest. Außerdem wurde der Eiweißfehler bestimmt und die bakterizide Wirkung im Keimträgerversuch. 1959 wurde die erste Desinfektionsmittelliste der nach den Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel der DGHM geprüften Verfahren veröffentlicht. Im Januar 2006 wurde die bis dahin gültige Desinfektionsmittelliste der DGHM durch die nun gültige Liste des Verbundes für Angewandte Hygiene abgelöst (STEUER & SCHUBERT, 2007). Der Verbund für Angewandte Hygiene (VAH) wurde 2003 gegründet um eine Bündelung der Kräfte auf dem Gebiet der Hygiene zu erreichen und den Herausforderungen auf nationaler und internationaler Ebene besser begegnen zu können. Die Weiterentwicklung der Verfahren geschah und geschieht bis heute auf einem auch im internationalen Vergleich hohem Niveau.

2.2.3.2 DLG

Bereits 1950 führte die DLG ein Gütezeichen für Reinigungs- und Desinfektionsmittel zur Anwendung in der Milchwirtschaft ein. Es wird Mitteln verliehen, welche den in den einschlägigen Prüfungsrichtlinien festgelegten Mindestanforderungen genügen. Die Prüfungen der DLG gehen über den Prüfraum der DVG insofern hinaus, als dass sie anwendungstechnische Gesichtspunkte wie Materialverträglichkeit und Schaumverhalten berücksichtigen (BÖHM & STRAUCH, 2002). Auch wenn die Wirksamkeitsprüfung für den Anwender die wichtigsten Eigenschaften eines Desinfektionsmittels beschreibt, sind doch auch andere Eigenschaften bei der Anwendung wichtig. Von Beginn an arbeitete die DVG daher mit der DLG zusammen. Die Prüfung von anwendungstechnischen Eigenschaften kann unter Laborbedingungen oder in praktischen Versuchen erfolgen. Die einzige hierfür kodifizierte Richtlinie ist die der DLG, die die Grundlage der Vergabe eines entsprechenden Gütezeichens ist. Die DVG- und DLG-Prüfung ergänzen sich gegenseitig. In der jeweiligen aktuellen Desinfektionsmittelliste der DVG sind die Mittel, die die Prüfung der DLG bestanden haben besonders gekennzeichnet. Der Anwender hat so die Möglichkeit sich umfassend über die Eigenschaften der betreffenden Desinfektionsmittel zu informieren (BÖHM, 2011).

2.3 Prüfviren

Viren, Bakterien und Parasiten gelten als bedeutende Krankheitserreger bei Mensch und Tier. Zur Absicherung der viruziden Eigenschaften eines Desinfektionsmittels dienen etablierte Prüfverfahren. Angesichts der Vielzahl bekannter viraler Krankheitserreger bzw. auch aus methodischen Gründen (z.B. fehlende Kultivierbarkeit) ist es nicht möglich, die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen alle einzelnen Viren direkt zu prüfen (ANON., 2004b). Die zur Desinfektionsmittelprüfung verwendeten Testorganismen beeinflussen die viruzide Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln entscheidend. Um die entsprechende Viruswirksamkeit zu bestimmen, finden europaweit verschiedene Virusarten als Prüfviren Anwendung. Nicht nur die Tenazität, sondern auch Parameter wie die Vermehrbarkeit der Viren in permanenten Zellkulturen, die Höhen der hierbei erreichten Virustiter und die Ausprägung des cytopathischen Effekts (cpE) sowie das Gefährdungspotential für Mensch und Tier bei akzidentieller Exposition entscheiden über die Wahl eines Virus als Testvirus (AL-KHLEIF et al., 2009). Die Prüforganismen der DVG sind mit entsprechenden biologischen Eigenschaften und in ihrer Resistenz so gewählt, dass sie die für die jeweilige Anwendung relevanten Keime mit abdecken. Momentan werden folgende Viren in der Desinfektionsmittelprüfung nach DVG-Richtlinien verwendet (TRUYEN, 2011a)

Tabelle 7: Testviren nach DVG-Richtlinien für Tierhaltung nach TRUYEN (2011a)

Eigenschaft	Virus	Kultursystem
Behüllt	Newcastle-Disease-Virus, Stamm Montana	Vermehrung in embryonierten Hühnereiern; Nachweissystem: primäre Hühnerembryozellkulturen
Behüllt	Vakziniavirus, Stamm Elstree	Vermehrung in Verozellen, Nachweissystem: Vero-Zellkulturen
Unbehüllt	Reovirus Typ 1, Stamm Lang	Vermehrung in Verozellen, Nachweissystem: Vero-Zellkulturen
Unbehüllt	ECBO-Virus (bovines Enterovirus Typ 1), Stamm LCR4	Vermehrung in subkultivierten Madin-Darby-Bovine-Kidney (MDBK) - Kulturen, Nachweissystem: MDBK-Zellkulturen

2.3.1 Bovines Virusdiarrhoe-Virus

2.3.1.1 Taxonomie und Morphologie

Bovine Virusdiarrhoe-Viren (BVDV) mit den antigenetisch unterschiedlichen Spezies 1 und 2 gehören zusammen mit dem Border Disease Virus und dem Virus der Klassischen Schweinepest zur Gattung Pestivirus, der Familie *Flaviviridae*. Beide BVDV Spezies kommen als zytopathogene und nicht zytopathogene Stämme vor. Die Unterscheidung bezieht sich auf ihr Verhalten in der Zellkultur.

Das Genom der *Flaviviridae* besteht aus einer linearen ss-RNA, positiver Polarität. Es handelt sich um sphärische Partikel mit einer Virushülle und einem Durchmesser von 40-60nm. Die Replikation

Literaturübersicht

erfolgt im Zytoplasma in Assoziation mit den Membranen und zytoplasmatischen Vesikeln. Vertreter der Familie der *Flaviviridae* sind das Genus Flavivirus, Pestivirus und Hepacivirus. Die entsprechenden Spezies werden in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (LIESS et al., 2010):

Tabelle 8: Vertreter der Familie *Flaviviridae* nach LIESS et al. (2010)

Flavivirus	Pestivirus	Hepacivirus
Gelbfieber Virus	Klassische Schweinepest Virus	Hepatitis-C Virus
Frühsommer-Meningoenzephalitis Virus	Bovines Virusdiarrhoe-Virus 1	
Dengue Virus	Bovines Virusdiarrhoe-Virus 2	
Japanisches Enzephalitis Virus	Border-Disease-Virus	
Rio-Bravo Virus	Giraffen Pestivirus	

2.3.1.2 Epidemiologie

BVDV ist weltweit verbreitet mit hoher Prävalenz und relativ niedriger Morbidität. Neben Rindern können sich auch andere Paarhufer (Schafe, Ziegen, Wildwiederkäuer, Schweine) infizieren. Alle Altersgruppen sind empfänglich (WEGMÜLLER, 2006). Die Übertragung kann horizontal oder vertikal erfolgen. Das Virus wird über Kot, Speichel und andere Körpersekrete ausgeschieden und meist oronasal aufgenommen. Eine Verbreitung kann auch über den Samen (tiefgefroren ebenfalls möglich) infizierter Bullen erfolgen. Vertikal erfolgt die Übertragung diaplazentar (KAADEN & MAYR, 2006). Die weltweite Verbreitung und der hohe Durchseuchungsgrad des BVDV basiert auf der Kombination von zwei bekannten Strategien. Zum einem kommt BVDV als transiente Infektion vor, welche symptomlos abläuft. Die Tiere entwickeln daraufhin Antikörper, welche sie vor einer BVDV-Erkrankung schützen. Zum anderen kommt es als persistente Infektion vor. Das Virus umgeht das Immunsystem des Wirts vollständig, indem es ihn vor Erreichen der Immunkompetenz infiziert. Dabei schädigt das BVDV den Fetus nicht in einer Weise, welche seine Entwicklung behindern würde. Der Wirt entwickelt eine Immuntoleranz gegenüber dem Virus. Das Immunsystem betrachtet das Virus als Teil des eigenen Körpers. Es entstehen sogenannte Persistent Infizierte (PI) Tiere. Diese PI-Tiere nehmen bei der Verbreitung von BVDV eine Schlüsselstellung ein, da sie das Virus ein Leben lang in allen Sekreten und Exkreten (Speichel, Nasensekrete, Urin, Sperma) in hoher Konzentration ausscheiden. Sie selbst bilden gegen das Virus keine nachweisbaren Antikörper, sind also immuntolerant. Ein Großteil der PI-Tiere ist klinisch unauffällig und nur durch Labortests ausfindig zu machen (WEGMÜLLER, 2006).

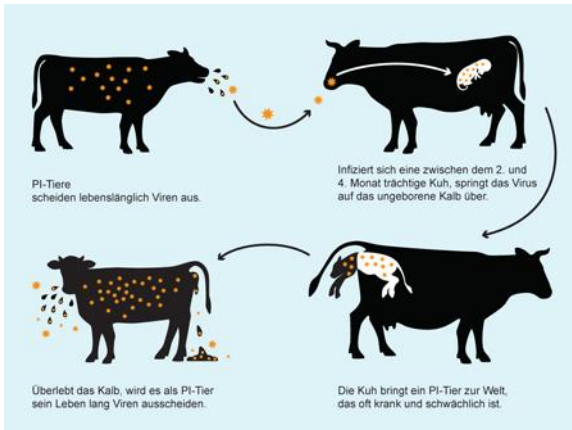


Abbildung 5: BVDV Infektion (WEGMÜLLER, 2006)

2.3.1.3 Tenazität

Flaviviren haben im Allgemeinen eine geringe Tenazität und sind durch Desinfektions- und Lipidlösungsmittel leicht zu inaktivieren (LIESS et al., 2010). BVDV im Speziellen ist gegenüber äußeren Einflüssen labil und verliert seine Infektiosität bei 37°C innerhalb von vier Tagen, bei 56°C bereits nach 45min (WEGMÜLLER, 2006).

2.3.2 Equines Arteritis-Virus

2.3.2.1 Taxonomie und Morphologie

Das Equine Arteritis-Virus (EAV) gehört zum Genus *Arterivirus* innerhalb der Familie *Arteriviridae*. Serologisch verhält sich das Virus einheitlich, es ist jedoch genetisch variabel (LIESS et al., 2010). Die Isolate variieren in ihrer Virulenz. Von den zahlreichen existierenden Virusstämmen besitzen viele eine abortogene Potenz. Bisher wurde nur ein Serotyp isoliert (ROVID SPICKLER, 2009). Es sind zwei verschiedene Biotypen bekannt, der Europäische und der Amerikanische (THEIN, 2007).

Arteriviren sind sphärisch, behüllte Viruspartikel mit einem Durchmesser von 45-60nm. Das Virus besteht aus einem isometrischen Nukleokapsid. Das Virusgenom ist eine lineare, 13kbp große, einzelsträngige RNA positiver Polarität. Arteriviren dringen durch Endozytose in empfängliche Zellen ein und vermehren sich dort im Zytoplasma. Sie verfügen über ein beschränktes Wirtsspektrum. Zu dem Genus *Arterivirus* gehören folgende Spezies (LIESS et al., 2010):

- Equines Arteritis-Virus
- Laktatdehydrogenase - Elevating Virus
- Porzines reproduktives und respiratorisches Syndrom Virus
- Simian Haemorrhagic Fever Virus

2.3.2.2 Epidemiologie

Die Equine Virale Arteritis ist eine Viruserkrankung der Pferde, Esel und Zebras und tritt in vielen Ländern, vor allem in Europa und den USA auf. Die Übertragung von EAV erfolgt durch direkten

Literaturübersicht

Kontakt mit akut infizierten Tieren vor allem über Aerosole und Sekrete des Atmungsstraktes. Eine Verbreitung des Virus über Tränenflüssigkeit, Blut, Urin und Kot ist ebenfalls möglich. Bei einem EAV-induzierten Abort stellt das stark viruslastige Abortmaterial eine wichtige Infektionsquelle dar. Ein weiterer bedeutender Übertragungsweg ist die venerische Verbreitung des Virus. Während der akuten Infektion scheiden Stuten über das Vaginalsekret EAV aus. Bei infizierten Hengsten persistiert das Virus über lange Zeiträume in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen (Prostata, Samenblase) und wird in die Samenflüssigkeit abgegeben (KÖNIG, 2010). Dies ist testosteronabhängig, weshalb das Virus nach Kastration nicht mehr nachweisbar ist (YILMAZ et al., 2011). Bei Wallachen und Stuten kommt die Virusausscheidung nach Abklingen der akuten Erkrankung zum Erliegen. Es werden jedoch 30-40 % der EAV-positiven Hengste zu chronischen Ausscheidern, wobei Kurzzeit- (2-5 Wochen), Intermediär- (3-8 Monate) und Langzeitausscheider (Jahre bis lebenslang) unterschieden werden. Diese Hengste bilden das natürliche Virusreservoir und spielen eine bedeutende Rolle bei der Virusausbreitung (KÖNIG, 2010). In frisch infizierten Beständen beträgt die Seuchendauer 4-6 Wochen, weniger virulente Feldstämme verlängern den Seuchenverlauf. Die Ausbreitungstendenz ist jedoch allgemein als sehr gering einzustufen (KAADEN & MAYR, 2006).

2.3.2.3 Tenazität

Arteriviridae besitzen bei Temperaturen von 37°C und Trockenheit eine geringe Tenazität. Bei Raumtemperatur hingegen können sie bis zu einer Woche persistieren, bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt deutlich länger. Das hierfür nötige pH-Optimum liegt zwischen 6,5 und 7,5 (REINER, 2008). Eine sichere Inaktivierung findet bei 56°C und 30min Einwirkzeit statt. Arteriviren sind gegenüber Lipidlösungsmitteln labil (THEIN, 2007).

2.3.3 Felines Coronavirus

2.3.3.1 Taxonomie und Morphologie

Das Feline Coronavirus (FCoV) gehört zur Familie der *Coronaviridae*, diese umfasst zwei Unterfamilien: *Coronavirinae* und *Torovirinae*. Innerhalb der Unterfamilie *Coronavirinae* wird in drei Genera unterschieden Alpha-, Beta- und Gammacoronavirus, wobei FCoV zu den Alphacoronaviren zählt (siehe Tabelle 9). Coronaviren infizieren insbesondere Epithelzellen des Respirations- und/ oder Gastrointestinaltraktes sowie Makrophagen. Sie besitzen eine lineare einzelsträngige RNA mit einer Größe von 27-31kbp und damit das größte bei RNA-Viren bekannte Genom. Die Virionen sind behüllt und von sphärischer Form, mit einem Durchmesser von 120-160nm. Die Virushülle besteht aus einer zellulären Lipidmembran mit drei oder vier integrierten Strukturproteinen. Die Replikation von Coronaviren findet in Zytoplasma an modifizierten intrazellulären Membranen statt. Die Infektion der Zielzellen erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose und pH-abhängige Fusion der Virushülle mit intrazellulären Membranen (KAADEN

Literaturübersicht

& MAYR, 2006). Coronaviren haben ein begrenztes Wirtsspektrum. Unter natürlichen Infektionsbedingungen infizieren sie nur ihren natürlichen Wirt oder eine sehr eng verwandte Art (MÜLLER, 2010).

Bei der Katze werden zwei Typen von Coronaviren unterschieden: das Feline enterale Coronavirus (FECV) und das Feline infektiöse Peritonitis Virus (FIPV). Es handelt sich hierbei um Biotypen. Nach der momentanen Theorie entsteht das virulente FIPV durch Mutation aus dem schwach virulenten FECV und löst in Folge eine Feline infektiöse Peritonitis (FIP) aus (KAADEN & MAYR, 2006).

Tabelle 9: Nomenklatur der Virusfamilie *Coronaviridae* nach KAADEN & MAYR (2006)

Unterfamilie	Genus	Spezies	Erkrankung	
<i>Coronavirinae</i>	Alpha-coronavirus	Canines Coronavirus	Gastroenteritis	
		Felines Coronavirus	Feline infektiöse Peritonitis (FIP), Enteritis	
		Virus der transmissiblen Gastroenteritis	transmissible Gastroenteritis	
		Porzines respiratorisches Coronavirus	respiratorische Symptome	
		Virus der porzinen epidemischen Diarrhoe	epidemische Virusdiarrhoe	
		Humanes Coronavirus 229E	respiratorische Erkrankungen	
		Enterales Coronavirus der Frettchen	Enteritis	
	Beta-coronavirus	Bovines Coronavirus	respiratorische Symptome, Enteritis	
		Porzines hämagglutinierendes Enzephalomyelitisvirus	Kümmern und Erbrechen der Ferkel	
		Canines respiratorisches Coronavirus	Zwingerhusten-komplex	
		Equines Coronavirus	Enteritis	
		Humanes Coronavirus OC34	respiratorische Symptome	
		Humanes enterales Coronavirus	Enteritis	
		Murines Hepatitisvirus	Hepatitis, Enzephalitis, Enteritis, respiratorische Symptome	
		Ratten-Coronavirus	respiratorische Symptome	
	Gamma-coronavirus	Infektiöse Bronchitis-Virus	respiratorische Symptome, Enteritis	
		Fasanen-Coronavirus	respiratorische Symptome, Enteritis	
		Truthahn-Coronavirus	Enteritis bei Puten	
	<i>Torovirinae</i>	Torovirus	Bovines Torovirus	Diarrhoe, respiratorische Symptome
			Humanes Torovirus	Gastroenteritis
			Porzines Torovirus	Gastroenteritis

2.3.3.2 Epidemiologie

FCoV kommt weltweit bei Hauskatzen vor, eine Verbreitung innerhalb von Wildkatzen wird angenommen (ADDIE et al., 2009). Circa 80-90% aller Hauskatzen in Mehrkatzenhaushalten und 10-50% in Einzelkatzenhaushalten sind seropositiv für FCoV. Diese hohe Prävalenz beruht auf der Infektion mit dem avirulenten, enteralen Biotyp FECV, die in der Regel nur zu leichten Durchfallerkrankungen führt oder inapparent bleibt (BANK et al., 2006). Insbesondere in Mehrkatzenhaushalten und Zuchten kommen seropositive Tiere vor. Demgegenüber ist die Prävalenz bei einzeln gehaltenen Tieren deutlich geringer. Eine von neun mit FCoV infizierten Katzen entwickelt eine tödlich verlaufende FIP. Einige Rassen (z.B. Bengalen) und Linien sind anfälliger eine FIP zu entwickeln als andere, auch das Alter der Tiere spielt hierbei eine Rolle. 70% der erkrankten Tiere sind jünger als ein Jahr. Stress, vor allem in größeren Katzenhaltungen, ist ein weiterer entscheidender Risikofaktor. Gewöhnlich infizieren sich die Tiere im Alter von wenigen Wochen nach Verlust der maternalen Immunität (ADDIE et al., 2009). Die Infektion wird durch direkten Kontakt sowie durch Tröpfchen effizient übertragen (LIESS et al., 2010). Wahrscheinlich ist der Faeces von symptomfreien Virusträgern die Hauptansteckungsquelle, da im Speichel von klinisch gesunden Tieren kaum Virusmaterial gefunden wurde, scheint eine Ansteckung über gemeinsame Nutzung von Futternäpfen unwahrscheinlich. Die transplazentare Übertragung bei einer Infektion des Muttertieres während der Gestation wurde beschrieben. Ist aber äußerst selten. Die Virusausscheidung mit dem Kot beginnt ca. eine Woche nach Infektion und setzt sich für Wochen oder Monate fort. Manche Tiere werden zum Dauerausscheider (ADDIE et al., 2009).

2.3.3.3 Tenazität

Coronaviren besitzen eine geringe Tenazität gegenüber Umwelteinflüssen und Desinfektionsmitteln. Wärme und UV-Strahlung führen zu einer raschen Inaktivierung. Bei Raumtemperatur kann das Virus bis zu einer Woche persistieren. In Gefrierpunktnähe vermag es seine Infektiosität bis zu einem Monat zu erhalten. Fast alle Desinfektionsmittel inaktivieren Coronaviren ausreichend. Die Empfindlichkeit gegenüber Lipidlösungsmitteln ermöglicht auch den Phenolderivaten in höheren Konzentrationen eine Wirksamkeit (STEIGER, 1986).

2.3.4 Murines Parvovirus

2.3.4.1 Taxonomie und Morphologie

Das Murine Parvovirus (MPV) gehört zur großen Familie der *Parvoviridae*. *Parvoviridae* zählen mit einem Genom von etwa 5000 Nukleotiden Länge zu den kleinsten veterinärmedizinisch relevanten Viren. Das Genom liegt als Einzelstrang DNA vor. Um im ersten Replikationsschritt den viralen Einzelstrang zu einem Doppelstrang aufzufüllen wird eine zelluläre DNA-Polymerase benötigt. Diese wird ausschließlich während der Mitosephase von der Zielzelle exprimiert. Hieraus ergibt sich die Abhängigkeit von mitotischem Gewebe als wesentliche biologische Eigenschaft der Viren.

Literaturübersicht

Neben der Abhängigkeit der Virusreplikation vom Zellzyklus ist die hohe physikalische Stabilität dieser Viren bemerkenswert (KAA DEN & MAYR, 2006). Es handelt sich bei Parvoviren um unbehüllte Partikel mit einem Durchmesser von 18-26nm und einem ikosaederförmigen Kapsid (WRZESINSKI, 2002).

Die Familie der *Parvoviridae* gliedert sich in zwei Unterfamilien. Die Parvoviren der Vertebraten werden in der Unterfamilie der *Parvovirinae* zusammengefasst, die Parvoviren der Insekten in der Unterfamilie der *Densoviridae*. Die für die Veterinärmedizin relevante Unterfamilie der *Parvovirinae* wird in die Genera *Parvovirus*, *Amdovirus*, *Bocavirus*, *Erythrovirus* und *Dependovirus* unterteilt. Zum Genus der Parvoviren gehören die feline Parvoviren, die das feline Panleukopenievirus, das canine Parvovirus und das Nerzenteritisvirus umfassen, sowie das porcine Parvovirus und eine Vielzahl an Nagerparvoviren, wie das Murine Parvovirus (KAA DEN & MAYR, 2006). Es gibt zwei relevante Biotypen des murinen Parvovirus das Minute Virus of Mice (MVM) und das Mouse Parvovirus Typ 1-3 (MPV). Sowohl MVM, als auch MPV sind wichtige Erreger für die Forschung. Beide sind häufig genutzte und vorkommende Infektionserreger in Labormäusekolonien, große Teile ihrer DNA sind bereits erforscht. (BESSELSSEN et al., 2006).

2.3.4.2 Epidemiologie

Parvoviren werden durch direkten oder indirekt durch Kontakt mit viruskontaminiertem Material übertragen (MODROW et al., 2010). Ausgeschieden werden die Viren über Urin, Kot und oronasale Sekrete (ANON., 2009a). Als häufige Übertragungsquelle gelten auch Menschen, die mit Schuhwerk oder Kleidung Virusmaterial in Bestände eintragen können. Diese indirekte Verschleppung wird durch die hohe Stabilität des Virus unterstützt. So können sie monatelang in getrocknetem Kot infektiös bleiben. Diese Eigenschaft scheint auch für die weltweite Verbreitung der Parvoviren ursächlich zu sein (MODROW et al., 2010). Das Mouse Parvovirus ist der am häufigsten vorkommende MPV-Biotyp in Mäusekolonien, mit einer in der Regel hohen Prävalenz in infizierten Beständen (FILIPOVSKA-NAUMOVSKA et al., 2010). Typischerweise verläuft die natürliche Infektion asymptomatisch und apathogen, auch bei neugeborenen und immunsupprimierten Mäusen. Bei immunkompetenten Tieren vermehrt sich das Virus in Bauchspeicheldrüse, Dünndarm, lymphatischen Organen sowie der Leber und kann für mehrere Wochen dort persistieren. MPV ist unter Labormäusen sehr weit verbreitet. Bei der Interpretation von mikrobiologischen Statistiken von Labortieren, muss daher bedacht vorgegangen werden. Eine Infektion ist nicht gleichzusetzen mit einer Erkrankung. Tiere die trotz Infektion normal und gesund erscheinen, können für Forschungsprojekte problematisch sein. Lokale oder systemische Effekte, die die Viren hervorrufen, können die Mäuse für die Forschung unbrauchbar machen (BAKER, 1998).

2.3.4.3 Tenazität

Parvoviren verfügen über eine außerordentlich hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Desinfektionsmitteln, in etwa vergleichbar mit Enteroviren und deutlich höher als Caliciviren. Parvoviren gehören damit zu den schwer desinfizierbaren Krankheitserregern. Alkalien vermögen sie erst in hohen Konzentrationen zu inaktivieren (STEIGER, 1986). Bei Trockenheit stellen hohe Temperaturen für Parvoviren kein Problem dar. Bei feuchter Umgebung und einer Temperatur von 80°C erfolgt eine Inaktivierung der Viren nach 10 Minuten (ETERPI et al., 2009). Auf kontaminierten Oberflächen und in Abprodukten können die Viren über viele Monate ihre Infektiosität behalten (STEIGER, 1986). Um murine Parvoviren effektiv zu bekämpfen, muss eine aggressive chemische Behandlung mit Detergenzien und sauerstoffabspaltenden Desinfektionsmitteln erfolgen. Außerdem sollten Materialien, die mit dem Virus in Kontakt gekommen sind, autoklaviert oder sterilisiert werden. Eine Inaktivierung erfolgt nach zwei Stunden bei 80°C oder bei 40°C nach 60 Tagen. MPV ist resistent gegenüber Trockenheit, Chloroform, Ether und Ethanol. PH-Werte zwischen 2 und 11 beeinflussen die Infektiosität von Parvoviren nicht (ANON., 2009a).

2.3.5 Newcastle-Disease-Virus

2.3.5.1 Taxonomie und Morphologie

Das Newcastle-Disease-Virus (NDV), auch als aviäres Paramyxovirus 1 bezeichnet, gehört zur Familie der *Paramyxoviridae*. Die *Paramyxoviridae* werden in zwei Subfamilien mit sieben Genera unterteilt (siehe Tabelle 10). Das NDV gehört zum Genus *Avulavirus* der Subfamilie *Paramyxovirinae* (KAADEN & MAYR, 2006). Die *Paramyxovirinae* sind pleomorphe, teils sphärische Viruspartikel, die bei Degradation filamentöse Formen bilden. Das Genom ist eine einzelsträngige, lineare RNA, mit negativer Polarität. Es sind behüllte Viren mit einem Durchmesser von 150-200nm. Auf der Oberfläche befinden sich spikeförmige Projektionen, im Inneren ein Nukleokapsid mit helikaler Symmetrie. Die Virusreplikation erfolgt im Zytoplasma, die Reifung durch Knospung an der zellulären Plasmamembran (LIESS et al., 2010). Es existiert eine beträchtliche Variation innerhalb von NDV-Stämmen und -Isolaten. Die verschiedenen Stämme weisen deutliche Virulenzunterschiede auf. Sie werden nach Erkrankungsbild in drei Pathotypen eingeteilt (ANON., 2009b):

- lentogen - milde Verlaufsform - sehr weite Verbreitung
- mesogen - moderate Verlaufsform
- velogen - schwere Verlaufsform

Tabelle 10: Subfamilien, Genera und Spezies der *Paramyxoviridae* nach KAADEN & MAYR (2006)

Subfamilie	Genera	Spezies
<i>Paramyxovirinae</i>	Respirovirus	Sendai Virus
		bovines Parainfluenzavirus
	Morbillivirus	Masernvirus
		Hundestaupe Virus (Canines Distemper Virus)
		Seehundstaupe Virus
		Cetacean Morbillivirus
		Rinderpest Virus
		Peste des petits ruminants Virus
	Henipavirus	Hendra Virus
		Nipah Virus
Rubulavirus	Mumps Virus	
Avulavirus	Newcastle-Disease-Virus (aviäres Paramyxovirus Typ1) aviäre Paramyxoviren Typ2 - 9	
<i>Pneumovirinae</i>	Pneumovirus	bovines respiratorisches Synzytial Virus
		Metapneumovirus

2.3.5.2 Epidemiologie

Bei Newcastle Disease handelt es sich um eine wirtschaftlich bedeutsame Geflügelseuche. Von Südostasien nach England (Newcastle) verschleppt, breitete sie sich vor allem im Zusammenhang mit der Entwicklung der Massentierhaltung und den damit verbundenen Haltungsbedingungen weltweit aus. Milde Formen der Erkrankung kommen heute in vielen Ländern enzootisch vor (LIEBERMANN, 1992). Laut World Organisation for Animal Health (OIE) (ANON., 2009b) ist die Erkrankung in Kanada, den USA und einigen Westeuropäischen Ländern unter Kontrolle. In Teilen Afrikas, Asiens und Südamerika breitet sich die Krankheit weiter aus. Da Wildtiere symptomlose Träger sein können, kann das Virus jederzeit erneut, in momentan als frei geltenden Gebieten auftauchen. Die hochansteckende Viruskrankheit tritt bei Hühnern und Puten auf. Aber auch andere Vogelarten wie Enten, Gänse, Straußen oder Tauben sind empfänglich für NDV, bei ihnen kann die Infektion ebenfalls symptomlos verlaufen (ANON., 2013). Die Übertragung erfolgt horizontal, vor allem aerogen (LIESS et al., 2010). Die Ausatemluft enthält schon vor dem Auftreten erster klinischer Symptome große Virusmengen als Aerosol (LIEBERMANN, 1992). Des Weiteren scheiden infizierte Vögel das Virus auch über Sekrete und Exkrete aus. Der direkte Kontakt der Tiere untereinander führt zu einer raschen Ausbreitung. Der indirekte Übertragungsweg über Fahrzeuge, Mist, Futter oder Transportkisten stellt eine weitere schnelle Verbreitungsmöglichkeit dar. Zusätzlich ist der Mensch als ein bedeutsamer Überträger der Seuche einzustufen. Ganz besonders in der Freilandhaltung stellen Wildvögel, Ratten, Mäuse und Insekten große Risiken dar, sowie der als Dünger auf die Felder aufgebrauchte Geflügelkot.

Literaturübersicht

Newcastle-Disease-Viren haben ein geringes zoonotisches Potential, sie verursachen beim Menschen Konjunktividen, die üblicherweise mild verlaufen und selbstlimitierend sind (ANON., 2013).

2.3.5.3 Tenazität

Paramyxoviren besitzen eine geringe Tenazität. Temperaturen über 70°C, aber auch Sonneneinstrahlung vernichten sie rasch. In Tierkörpern und Abwässern persistieren sie jedoch mindestens einen Monat. Im angetrockneten, geschützten Zustand vermag das Virus längere Zeit seine Infektiosität zu bewahren (STEIGER, 1986). Laut der OIE, World Organisation of Animal Health (ANON., 2009b) kann das Virus, vor allem bei niedrigen Temperaturen mehrere Wochen in der Umwelt überdauern. Fast alle Desinfektionsmittelgruppen eignen sich zur wirksamen Desinfektion von NDV, ausschließlich Phenole, Milchsäure, Natronlauge und Formalin bei Temperaturen unter 8°C vermögen das Virus nicht ausreichend zu inaktivieren (KÖHLER, 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Testviren

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Viren aus den Familien *Flaviviridae*, *Arteriviridae*, *Caliciviridae* und *Parvoviridae* auf ihre Eignung als mögliches Prüfvirus der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG) für den Bereich tierärztliche Praxis und Tierhaltung geprüft. Die Viren wurden nach den Gesichtspunkten Stabilität und Praktikabilität im Versuch, sowie Relevanz für die jeweiligen Einsatzbereiche ausgewählt. Das Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV, Stamm UG 59) und das Equine Arteritis-Virus (EAV, Stamm "Bucyrus", 4) werden für den Bereich Tierhaltung, das Murines Parvovirus (MPV, Stamm Crawford, ATCC VR-1346) und das Felines Coronavirus (FCoV) für den Bereich tierärztliche Praxis getestet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde für das, zur Familie der *Paramyxoviridae* gehörende Newcastle-Disease-Virus (NDV, Stamm Montana) ein alternatives Vermehrungs- und Zellkulturnachweissystem geprüft. Da beim bisherigen Nachweissystem der Verdacht eines hohen Eiweißfehlers nahe lag, wurde neben der Eignung hinsichtlich Praktikabilität und Stabilität der Viren im Versuch vor allem der Eiweißgehalt in Relation zu den Ergebnissen untersucht. Frau Dr. Carolin Karnath führte diesen Teil der Laborarbeiten für mich aus.

3.1.1.1 Tierhaltung

In der kommerziellen Tierhaltung ist eine der wesentlichen Grundlagen für die Gesunderhaltung von Tierbeständen ein sinnvolles und korrekt durchgeführtes Hygienemanagement. Effektive Desinfektionsmittel und -verfahren spielen dabei eine tragende Rolle. Daher ist der Einsatz von virologisch geprüften Desinfektionsmitteln unabdingbar.

BVDV - Die Bovine Virusdiarrhoe ist eine in Deutschland anzeigepflichtige Tierseuche. Laut einer Statistik des FLI (SCHIRRMEIER & STREBELOW, 2012) beherbergten 2011, trotz umfangreicher Sanierungsmaßnahmen 4,11% der deutschen Rinderbetriebe persistent infizierte Tiere.

Zur Verfügung gestellt wurde es von Dr. W. Eichhorn, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin, Tiermedizinische Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München.

EAV - Die Equine Arteritis ist eine in Deutschland meldepflichtige Krankheit des Pferdes. Eine Behandlung erkrankter Tiere ist nicht möglich, lediglich seuchenprophylaktische Maßnahmen können Pferdebestände schützen.

Material und Methoden

Zur Verfügung gestellt wurde es von Dr. Werner Herbst, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen.

3.1.1.2 Tierärztliche Praxis

Nicht nur in der Tierhaltung auch im Bereich tierärztliche Praxis ist ein optimiertes Hygienemanagement unabdingbar. Gerade in Praxen mit einem hohen Patientenaufkommen kann ein unsachgemäß angewendetes oder falsch ausgewähltes Desinfektionsmittel zu einer schnellen und unkontrollierten Ausbreitung von Viruserkrankungen führen. Die Prüfung von Desinfektionsmitteln auf ihre viruzide Wirkung ist unter diesem Gesichtspunkt unerlässlich.

FCoV - Einer der bedeutendsten Krankheitserreger in Katzenpopulationen ist das Feline Coronavirus. Eine Behandlung mit Eliminierung des Virus ist nicht möglich, einzig ein gutes Hygienemanagement im Umgang mit Katzen kann eine Verbreitung eindämmen.

Zur Verfügung gestellt wurde es von Prof. Dr. Uwe Truyen, Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen, Universität Leipzig.

MPV - Parvoviren sind in der Tierarztpraxis nicht selten vorkommende Krankheitserreger. Die schwierige Handhabung des caninen Parvovirus in der Zellkultur durch den fehlenden cpE (KARNATH, 2011) und rasche Attenuierung mit Virulenzverlust von feline Parvoviren nach mehrmaligem Passagieren (KAADEN & MAYR, 2006) ließen diese Viren als Testviren ausscheiden. MVM als Surrogatvirus wurde für den Einsatz für die Desinfektionsmittelprüfung gewählt und soll in der vorliegenden Arbeit auf seine Eignung als Testvirus geprüft werden.

Zur Verfügung gestellt wurde es vom Labor Prof. G. Enders und Partner, Stuttgart.

3.1.1.3 Alternatives Nachweissystem für NDV

NDV - Newcastle Disease ist eine hochansteckende, anzeigepflichtige Viruserkrankung an der Hühner, Puten und auch andere Vogelarten erkranken können. Die Erkrankung führt nicht nur beim Einzeltier zu Schäden, sondern hat bei Auftreten eine Tötung gesamter Bestände zur Folge und damit eine große wirtschaftliche Bedeutung für den Geflügelbetrieb und dessen Umgebung.

Zur Verfügung gestellt wurde es von Prof. Dr. Erhard F. Kaleta, Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, Justus-Liebig-Universität Gießen.

3.1.2 Zellkultur

Einschichtzellkulturen permanenter Zelllinien wurden zur Vermehrung der Viren (außer NDV vermehrt in Allantoisflüssigkeit, (NDV (All)) siehe Punkt 3.1.3) und als Virusnachweissystem genutzt.

Tabelle 11: Zellkulturen permanenter Zelllinien

Virus	Zelllinie	verwendete Passage	Herkunft Zelllinie
BVDV	MDBK (Madin Darby bovine kidney epithelial cells)	195-210	Dr. R. Riebe, Institut für Infektionsmedizin, Friedrich-Löffler-Institut, Riems
EAV	VERO-B4 (African green monkey kidney cells)	159-172	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zelllinien, Braunschweig
FCoV	CRFK (Crandell-Reese feline kidney cells)	198-214	Dr. R. Riebe, Institut für Infektionsmedizin, Friedrich-Löffler-Institut, Riems
MPV	A9 (Mus Musculus, B lymphocyte, myeloma)	20-28	Labor Prof. G. Enders und Partner, Stuttgart
NDV	LMH (hepatocellular carcinoma male Leghorn)	33-45	Dipl.-Biol. Matthias Lenk, Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Friedrich-Löffler-Institut, Riems

3.1.3 Bruteier

Die Vermehrung von NDV (All) erfolgte unter anderem in embryonierten Hühnereiern, die neun bis elf Tage, bei 37°C bebrütet wurden. Bezogen wurden die Eier von der Firma Geflügelzucht Kürbis, Freital - Wurgwitz.

3.1.4 Medien

Für die Zellkultur wurde Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (Biochrom AG, Berlin) verwendet. DMEM enthält 3,7g/l Natriumhydrogencarbonat, 4,5g/l Glukose und 1,028g/l Glutamin. Es wurden 100IE Penicillin und 100µg Streptomycin pro ml Medium (Biochrom AG, Berlin) zugesetzt. Anschließend wurde es mit 1% nichtessentiellen Aminosäuren (NEA) (Biochrom AG, Berlin) und 10%, für die Behandlungsversuche 5% fetalem Kälberserum (FKS) (Biochrom AG, Berlin) angereichert. Der Zusatz von FKS erfolgte kurz vor Verwendung des Mediums.

3.1.5 Grundsubstanzen, Reagenzien, Geräte, Laborbedarf

Die nachfolgenden Tabellen führen die verwendeten chemischen Grundsubstanzen, Reagenzien, Geräte und Laborbedarfsartikel auf. Es wurden Desinfektionsmittel aus den Gruppen der Aldehyde, Alkohole, Chlorabspalter, Laugen und Peroxide gewählt. Bei der Auswahl wurde Wert darauf gelegt, ein möglichst breites Spektrum an wirksamen Hauptbestandteilen zu erhalten. Die

Material und Methoden

gewählten chemischen Grundsubstanzen wurden mit Ausgangskonzentration und Hersteller dargestellt.

Tabelle 12: Chemische Grundsubstanzen

chemische Grundsubstanz	Ausgangskonzentration in %	Hersteller
Ethanol	96	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glutaraldehyd	50	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhypochlorit	12	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natronlauge (Natriumhydroxid Plätzchen)	-	Merck GmbH, Darmstadt
Peressigsäure	15	AppliChem GmbH, Darmstadt

Tabelle 13: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller/ Rezeptur
Albumin-Fraktion V	Appllichem GmbH, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Decon®90 Lösung	Decon Laboratories Ltd., Hove, UK
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Biochrom AG, Berlin
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin
Formaldehyd-Lösung 37%	Appllichem GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck GmbH, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Rezeptur im Anhang
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Dreieich
Trypsin-/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Wasser standardisierter Härte (WSH)	Rezeptur im Anhang

Tabelle 14: Geräte

Geräte	Produkt, Hersteller
Brutschrank Zellkultur	CO ₂ Unitherm 150, Uniequip, Martinsried
Brutschrank zum Trocknen	Heracell CO ₂ Inkubator 150i, Thermo Scientific, Dreieich
Brutschrank Eier	Hekea Brutgeräte, Rietberg
Exsikkator	Exsikkator, Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim
Mikroskop	Leica DM IL, Leica Microsystems Wetzlar GmbH
Kamera Mikroskop	Leica DFC 320; Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Schweiz
Kamera	Canon Eos600D; Canon Europe N.V., Amstelveen, Niederlande

Geräte	Produkt, Hersteller
Photometer	Multiscan Ascent, Labsystems
Schüttler	Schüttler TH25, Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Sterilwerkbank	Heraeus, Thermo Scientific, Dreieich
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner USC 600D, VWR, Darmstadt
Vakuumpumpe	biovac 104, ILMVAC GmbH, Ilmenau Typ 2534C-02, Gardner Denver Welch Vacuum Technology Inc., Niles, USA
Zentrifuge	Biofuge Stratos, Heraeus

Tabelle 15: Laborbedarf

Laborbedarf	Hersteller
Chirurgisches Instrumentarium, Schere, Pinzette	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg
Edelstahlkeimträger	GK Formblech, Berlin
Einkanalpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalpipetten, steril 5ml, 10ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Eppendorfgefäße 1,5ml, 2ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Falcon 15ml, 50ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Holzkeimträger	Des-In-Test-Supply, Stuttgart
Kryoröhrchen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Kanülen, steril 24 G x 1	Sterican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Mehrkanalpipette	Biohit, Rosbach
Mehrkanalpipette, elektrisch	Eppendorf AG, Hamburg
Petrischalen, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen 10µl, 100µl, 500µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagenzreservoir	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Silicagel Trocknungspenlen	OMNILAB, München
Zellkulturflaschen	Firma TPP AG, Schweiz
6-Well Platten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reagenzreservoir	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
8-Well Reagenzreservoir	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
96-Well Platten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturverfahren

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte mit Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) in 75 bzw. 150 cm² Vent-Zellkulturflaschen. Dem Medium wurden vor Gebrauch nichtessentielle Aminosäuren, Antibiotika und fetales Kälberserum zugesetzt. Zur Subkultivierung der Zellkultur wurde das Medium dekandiert. Anschließend wurden die Zellen einmalig mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, mit 2-3ml 0,05%-iger Trypsin-EDTA-Lösung beschichtet und bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. Ausschließlich bei den A9 Zellen wurde die Trypsin-EDTA-Lösung nach einer Einwirkzeit von einer Minute dekandiert und die Zellen erst anschließend inkubiert. Die Inkubation erfolgte bis zur überwiegenden Ablösung des Zellrasens vom Boden der Zellkulturflasche. Durch

Material und Methoden

mehrmaliges Beklopfen der Zellkulturflasche wurden die restlichen Zellen vom Boden gelöst. Um die Reaktion des Trypsins zu stoppen, wurden 3-4ml Medium hinzugefügt. Mit einer 10ml Einmalpipette wurde nun das Zell-Medium-Gemisch resuspendiert. Dies geschah unter lichtmikroskopischer Kontrolle bis zur Vereinzelung der Zellen. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen mit 15ml bzw. 25ml Medium in 75cm² bzw. 150cm² Zellkulturflaschen übertragen. Bis zur Ausbildung eines Zellrasens wurden diese im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Für die Toxizitäts- und Behandlungstests sowie die Formalinkontrolle wurden die Zellkulturen 24h vorab passagiert. Die Zellkulturen für Trocknungs- und Keimträgerversuche wurden in der Regel direkt vor den Versuchen vorbereitet. Für alle Versuche wurden die resuspendierten Zellen auf ca. 10⁵ Zellen pro ml Medium eingestellt. Jeweils 100µl des entstandenen Zell-Medium-Gemisches wurden pro Vertiefung einer 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert und bei 37°C mit 5% CO₂ bis zum Versuch inkubiert.

Tabelle 16: Zellkultur der verschiedenen Zelllinien

Zelllinie	Inkubationszeit Trypsin	Wachstumsgeschwindigkeit von 30-40% auf 100%	Verhältnis für Subkultivierung
MDBK	7-10min	3Tage	1:4 bis 1:6
VERO- B4	10min	5Tage	1:2 bis 1:3
CRFK	5-6min	2Tage	1:4 bis 1:6
A9	2min	3Tage	1:3 bis 1:5
LMH	4-5min	3Tage	1:3 bis 1:4

3.2.1.1 Besonderheiten zur Kultivierung von NDV

Für die Vermehrung und den Nachweis von NDV war man auf die Beimpfung von Bruteiern beziehungsweise auf die Anzucht primärer Hühnerembryofibroblastenkulturen angewiesen. Letztgenanntes stellt die durch die DVG vorgegebene Methode dar. Dieses arbeitsaufwändige Verfahren zeichnet sich durch eine relativ schlechte Auswertbarkeit der primären Hühnerembryofibroblastenkulturen aus, was einerseits bedingt ist durch eine teilweise vorhandene Inhomogenität der Zellen, andererseits durch die Empfindlichkeit der Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde NDV zum einen in der Allantoishöhle (NDV (All)) von elf Tage bebrüteten, embryonierten SPF-Hühnereiern vermehrt, zum anderen in Einschichtzellkulturen von LMH-Zellen (NDV (ZK)). Für die Bestimmung der Infektiositätstiter wurden für beide Varianten permanente Einschichtzellkulturen von LMH-Zellen verwendet.

3.2.2 Kryokonservierung und Auftauen

Um Zellen langfristig zu lagern, ist eine Kryokonservierung nötig. Hierfür wurden die Zellen wie unter 3.2.1 beschrieben passagiert und ein Zell-Medium-Gemisch mit einer Dichte von ca. 10⁶ Zellen/ml hergestellt. Diese Zellsuspension wurde in 50ml Falcons überführt und bei 1000

Material und Methoden

U/min für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das entstandene Zellpellet in DMEM mit 20% FKS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und anschließend in Kryoröhrchen überführt. Nach vierundzwanzigstündiger Kühlung auf eine Temperatur von -20°C wurden die Röhrchen in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff (-196°C) gegeben.

Für das Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen in körperwarmen Leitungswasser bis zur Verflüssigung inkubiert. Anschließend wurde das aufgetaute Zell-Medium-Gemisch mit frischem, vorgewärmtem Zellkulturmedium verdünnt und in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach 24h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um mögliche, durch DMSO verursachte zytotoxische Veränderungen zu vermeiden.

3.2.3 Virusvermehrung

Die Virusvermehrung erfolgte, ausgenommen für das NDV (All), in den entsprechenden Zellkulturen in 75cm²- und 150cm²-Zellkulturflaschen. Bei einer Zelldichte von mindestens 90% wurde die Kultur mit der Stammvirussuspension beimpft. Bis zum Auftreten eines nahezu 100%-igen cytopathischen Effekts (cpE) wurden die Zellen bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Zellkulturflasche bei -20°C eingefroren. Nach langsamen Auftauen bei Raumtemperatur wurde die Zellsuspension in 50ml Falcons überführt und bei 1000U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde gepoolt und anschließend aliquotiert. Die Virussuspension wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Tabelle 17: Infektionsdosen für die Virusvermehrung

Virus	Zelllinie	Zellkulturvolumen (ml)	Infektionsdosis (µl)
BVD	MDBK	30	300
EAV	VERO-B4	30	300
FCoV	CRFK	30	400
MPV	A9	30	600 - 800
NDV (ZK)	LMH	30	200

Für die Vermehrung von NDV (All) wurden zunächst Bruteier für elf Tage bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Die Infektion der embryonierten Eier erfolgte mittels einer 24x1 G Kanüle mit 200µl Stammvirus nach der chorioallantoic sac-Methode (CAS). Vor der Infizierung wurden die Eier mit Ethanol gereinigt. Die Einstichstelle wurde nach Applikation der Virussuspension mit Leim verschlossen. Nach weiteren 3-4 Tagen Bebrütung wurden die Eier für 24h bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Anschließend erfolgte die Virusernte unter der Sterilwerkbank. Nach Eröffnung der infizierten Eier am stumpfen Pol, wurde die Allantoisflüssigkeit mittels einer Einmalpipette gewonnen und im Anschluss bei 1000 U/min für 10 min zentrifugiert. Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog zu den anderen Viren.

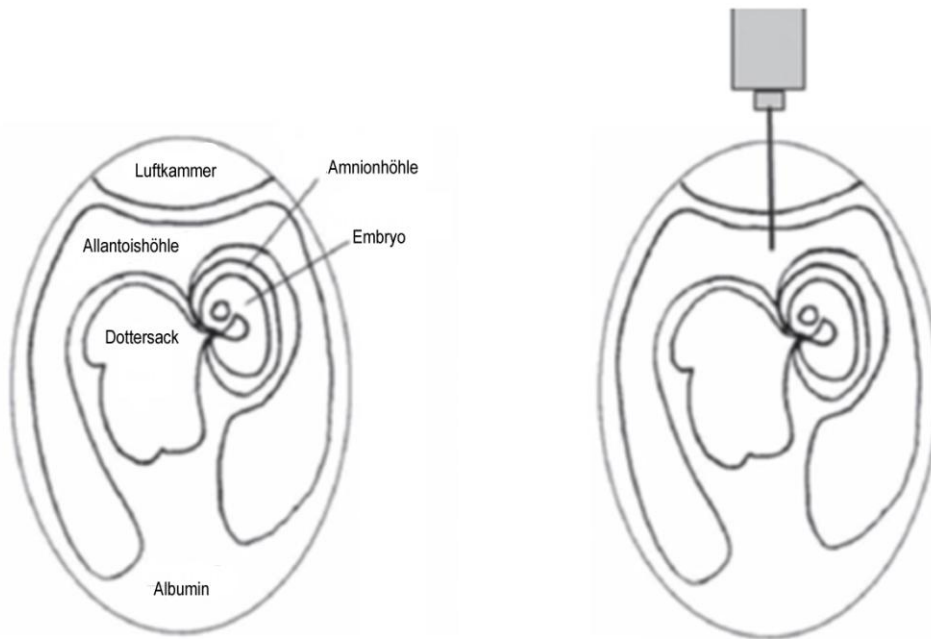


Abbildung 6: CAS Methode zur Beimpfung embryonierter Hühnereier SPACKMAN (2008)

3.2.4 Bestimmung Infektiösitätstiter

Die Virussuspension, die für die Versuche verwendet wurde, wurde auf ihre Infektiösität getestet. Dafür wurde die Suspension in einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit PBS titriert. Je Kavität waren 225µl PBS vorgelegt. In die Vertiefungen der ersten Spalte wurden 25µl Virussuspension pipettiert und mit einer Mehrkanalpipette bis 10^{-10} titriert. Dabei war darauf zu achten, nach jeder Titrationsstufe die Pipettenspitzen zu werfen um eine ungewollte Verschleppung von Virusmaterial zu vermeiden. Anschließend wurden 100µl jeder Verdünnungsstufe auf eine bereits vorbereitete Zellkulturplatte übertragen. Die Übertragung erfolgte von 10^{-11} nach 10^{-1} . Die Zellkulturplatte wurde daraufhin bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert und unter täglicher lichtmikroskopischer Beobachtung auf einen cpE hin kontrolliert.

Tabelle 18: Beobachtungszeiträume und Ausgangstiter

Virus	Beobachtungszeitraum nach Infektion	maximale Ausgangstiter für Versuche
BVD	7 Tage	$10^{7,6}$
EAV	7 Tage	$10^{7,5}$
FCoV	7 Tage	$10^{7,2}$
MPV	7-14 Tage	$10^{7,4}$
NDV (ZK)	7 Tage	$10^{8,0}$
NDV (All)	7 Tage	$10^{8,5}$

3.2.5 Berechnung des Infektiösitätstiter

Die Berechnung des Infektiösitätstiter erfolgte wie in der DIN EN 14675 empfohlen nach der Methode von SPERMAN und KAERBER (ANON., 2005b).

Berechnung nach der Formel:

$$ID50/\text{Volumen} = x_0 - d/2 + d/n * \sum x_i$$

x_0 der positive Exponent der höchsten Verdünnung, bei der alle Testobjekte positiv sind

d log10 des Verdünnungsfaktors

n die Anzahl der pro Verdünnung eingesetzten Testobjekte

$\sum x_i$ die Summe aller auf die Infektion positiv reagierenden Testobjekte, ab und einschließlich der bei x_0

3.2.6 Bestimmung des Eiweißgehalts

Der Eiweißgehalt von NDV (All) und NDV (ZK) wurde mit Hilfe des Pierce® BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific bestimmt. Die Proben und Arbeitsreagenzien wurden entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet. Der Eiweißgehalt wurde pur und in den Verdünnungen 1:3 sowie 1:10 getestet. Die Prüfung erfolgte im Doppelansatz auf einer Mikrotiterplatte. Dafür wurden je Well 25µl der Standardverdünnung bzw. Probe pipettiert. Anschließend wurde jedes Well mit 200µl der Arbeitsreagenz benetzt. Die Mikrotiterplatte wurde für 30 sec auf einem Schüttler gemixt und daraufhin abgedeckt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C wurde die Mikrotiterplatte auf Raumtemperatur abgekühlt. Mit Hilfe eines Photometer und der dazugehörigen Software erfolgte die Messung der Eiweißgehalte durch Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 562nm. Die Ergebnisse wurden dokumentiert und ausgewertet.

3.2.7 Vorbereitung der Keimträger

In den Vorversuchen, wie auch Hauptversuchen wurden Edelstahlkeimträger mit einem Durchmesser vom 20mm und einer Höhe von 1mm verwendet. Vor der Verwendung wurden die Keimträger 60 Minuten in einer 5%-igen Decon90®-Lösung gewaschen, danach unter fließendem Wasser gespült und nachfolgend mehrfach mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurden die Keimträger in 95%-igem Isopropanol entfettet. Nach einer Einwirkzeit von 15min wurde das Isopropanol abgegossen und die Keimträger unter einer Sterilwerkbank getrocknet. Die Keimträger wurden in ein Becherglas überführt und für 2h bei 160°C im Heißluftsterilisator sterilisiert. Diese Vorbehandlung richtete sich nach den Vorgaben der DVG-Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln (ANON., 2008).

Die in den Versuchen verwendeten Holzkeimträger, Pappelholz, mit einer Fläche von 20x10 mm und einer Höhe von 1 mm wurden vor Verwendung in zwei gleichgroße quadratische Teile

Material und Methoden

zerschnitten. Anschließend wurden die Keimträger in ein Becherglas überführt und bei 121°C mit zwei bar Druck für 20 Minuten im Autoklaven autoklaviert und im Trockenschrank für 2 Stunden getrocknet. Die Vorbehandlung orientiert sich an den Vorgaben der DVG Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln (ANON., 2008).

3.2.8 Herstellung und Verwendung der Eiweißbelastung

3.2.8.1 Rinderalbumin

Für alle Versuche, ausgenommen NDV wurde, orientiert an den Vorgaben der DIN EN 14675, eine niedrige Eiweißbelastung verwendet (ANON., 2005b). Die Belastungssubstanz wurde in der 10-fachen für die Prüfung verwendeten Endkonzentration hergestellt. In einem Messkolben wurden 3g Rinderalbumin (Albumin-Fraktion V) (Applichem GmbH, Darmstadt) mit 100ml doppelt destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung durch Membranfiltration sterilisiert und in Eppendorfgefäße abgefüllt. Aufbewahrt wurde die Belastungssubstanz für bis zu einem Monat bei einer Temperatur von 4°C.

Eine Mischung von neun Teilen Virussuspension und einem Teil Belastungssubstanz wurde für alle Versuche verwendet und unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestellt.

3.2.8.2 Fetales Kälberserum

Für die NDV-Versuche wurde gemäß der gültigen DVG-Richtlinie für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln (ANON., 2008) eine ca. 6%-ige Eiweißbelastung genutzt. Es wurde 40%-iges, antikörperfreies, fetales Kälberserum (FKS) zur Herstellung der Eiweißbelastung verwendet.

Eine Mischung von neun Teilen Virussuspension und einem Teil Belastungssubstanz wurde für alle NDV-Versuche verwendet und unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestellt.

3.2.9 Trocknungsverluste

Eine der wichtigsten Eigenschaften für ein potentielles Testvirus ist seine Stabilität beim Trocknungsverfahren. Hierfür wurden vor den eigentlichen Keimträgerversuchen Trocknungsversuche durchgeführt. Ziel der Untersuchung war es herauszufinden wie hoch die Trocknungsverluste waren um damit Rückschlüsse auf die Höhe der Ausgangstitel vor dem Aufbringen der Desinfektionsmittel ziehen zu können. Alle Trocknungsversuche wurden mit niedriger Eiweißbelastung durchgeführt und einmal wiederholt. Zu jedem Versuch wurde eine Viruskontrolle und eine Zellkulturkontrolle mitgeführt.

3.2.9.1 Edelstahlkeimträger

Für die Trocknung auf Edelstahlkeimträgern wurden je 50µl Virussuspension von MPV und FCoV auf jeweils einen Keimträger aufgetragen. Dabei war darauf zu achten, das Virusmaterial mittig

Material und Methoden

aufzubringen und gleichmäßig auf dem Keimträger zu verteilen. Es sollte ein Rand von ca. 2mm bestehen bleiben. Anschließend wurden die Keimträger in einem mit Trocknungspellets (Silicagel Trocknungspellets, OMNILAB, München) gefüllten Exsikkator mit Hilfe einer Vakuumpumpe (Typ 2534C-02, Gardner Denver Welch Vacuum Technology Inc., Niles, USA) bei 900-950mbar getrocknet.



Abbildung 7: Exsikkator

Nach der Trocknung wurde die Virussuspension mit 2000µl PBS abgespült. Dafür wurde eine 5ml-Pipette verwendet und zehnmals auf dem Keimträger resuspendiert. Anschließend wurde das Gemisch in ein Reagenzreservoir mit 2950µl PBS übertragen. Nach sorgfältiger Durchmischung wurden je 200µl in die Kavitäten der ersten Reihe einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und bis zu einer Verdünnung von 10^{-10} mit PBS titriert. Je 25µl wurden in eine Zellkulturplatte verimpft, dabei wurde von 10^{-10} nach 10^{-1} pipettiert.

Anschließend wurden die Zellkulturplatten bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert und über 7 Tage lichtmikroskopisch beobachtet. Bei MPV erfolgte eine Beobachtung über 14 Tage. Die Bestimmung und Dokumentation des Virustiters erfolgte am Ende der Beobachtungszeit.

3.2.9.2 Holzkeimträger

Für BVDV, EAV und NDV wurden je 100µl Virussuspension auf einen Holzkeimträger (Pappelholz) aufgetragen. Die 20x10mm großen Holzkeimträger wurden dafür in einem vorhergehenden Arbeitsschritt in zwei gleich große Quadrate geteilt, um die spätere Handhabung etwas zu erleichtern. Je Holzquadrat wurde dann 50µl Virusmaterial aufgetragen. Die Keimträger wurden anschließend bei 37°C in einem Brutschrank getrocknet. Die Trocknungszeit betrug 60min.

Nach der Trocknung wurden die Holzkeimträger in je vier gleichgroße Stücke geschnitten. Diese insgesamt acht Teile wurden in ein, mit 9,9ml PBS gefüllten Falcon gegeben und anschließend kräftig geschüttelt. Die Herauslösung des Virus aus dem Holz erfolgte in einem Ultraschallbad auf

Material und Methoden

Eis für die Dauer von 10min. Danach wurden 4ml Überstand abpipettiert und in ein Reagenzreservoir gegeben. 200µl des Virussuspension-PBS-Gemisches wurde in die erste Reihe einer 96-Well-Mikrotitrationsplatte gegeben. Es erfolgte eine Verdünnung mit PBS bis 10^{-10} und im Anschluss eine Beimpfung der entsprechenden Zellkulturplatten mit 25µl pro Kavität.

Anschließend wurden die Zellkulturplatten bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert und über 7 Tage lichtmikroskopisch beobachtet. Die Auswertung der Ergebnisse fand an Tag 7 statt.

3.2.10 Zytotoxische Wirkung der Prüflösungen

3.2.10.1 Toxizität

Die Zytotoxizität der eingesetzten chemischen Grundsubstanzen wurde in Anlehnung an die DIN EN 14675 geprüft, (ANON., 2005b). Zur Herstellung der gewünschten Prüfkonzentration wurden die Grundsubstanzen mit Wasser standardisierter Härte (WSH) verdünnt. Es wurde ein 1,25facher Ansatz hergestellt. Dazu wurden 4ml der Verdünnung mit 1ml WSH vermischt und 0,5ml dieses Reaktionsgemisches zu 4,5ml PBS pipettiert. Anschließend wurden 200µl der entstandenen Lösung in die erste Reihe einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und mit 25µl bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} mit PBS titriert.

Von jeder Verdünnungsstufe wurden nun je Kavität 25µl Reaktionsgemisch auf eine bereits vorbereitete Zellkulturplatte übertragen.

Die Zellkulturplatte wurde bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert und erstmals nach 24h kontrolliert. Nach 7 Tagen erfolgte die finale Ablesung. Bei MPV wurde nach weiteren 7 Tagen eine erneute Ablesung durchgeführt. Die Ergebnisse der Toxizitätsversuche dienten als Grundlage für die Behandlungsversuche.

3.2.10.2 Behandlung

Um mögliche Veränderungen an den Zellen und damit eine Verminderung der Empfindlichkeit des Virus zu überprüfen, wurden vergleichende Virustitrationen an behandelten und unbehandelten Zellkulturen durchgeführt. Alle Versuche wurden einmal wiederholt, eine Zellkulturkontrolle wurde stets mitgeführt.

In diesem Versuch wurden 4 ml des Desinfektionsmittels mit 1 ml WSH vermischt. Es wurde hierfür die Verdünnungsstufe mit dem geringsten, scheinbar nicht zytotoxischen Effekt genutzt, die vorab im Toxizitätstest bestimmt wurde.

Von dem entstandenen Reaktionsgemisch wurden 0,5 ml in ein 8-Well Reagenzreservoir mit 4,5ml PBS gegeben. Je 25µl dieser Lösung wurden pro Kavität in eine bereits 24h zuvor vorbereitete Zellkulturplatte übertragen und für eine Stunde bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. Anschließend

Material und Methoden

wurde der Überstand abpipettiert, verworfen und die Zellkulturplatte mit 100µl DMEM je Kavität neu bestückt. In diesem Schritt wurde das Medium mit nur 5% FKS versehen.

Aus einer bereits verdünnten Virustitrationsplatte wurden 25µl pro Kavität auf die behandelte und eine unbehandelte Zellkulturplatte übertragen. Beide wurden bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert und über 7 Tage beobachtet. Nach 7 Tagen wurde das Ergebnis abgelesen und protokolliert.

3.2.11 Inaktivierungs-Bezugsprüfung

Dieser Versuch wurde unter Verwendung von Formalin (37%-ige Formaldehydlösung) durchgeführt. Grundlage für die Durchführung war die DIN EN 14675, (ANON., 2005b).

Aus der 37%-igen Formaldehydlösung wurde unter Verwendung von destilliertem Wasser eine 1,4%-ige Lösung hergestellt. 2,5ml davon wurden mit 2ml PBS und 0,5ml Virussuspension vermischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Unmittelbar nach Ablauf der Einwirkzeit wurden 0,1ml Reaktionsgemisch entnommen und zu 0,9ml PBS in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Nach erfolgter Durchmischung wurden 0,5ml entnommen und zu 4,5ml PBS in ein Reagenzreservoir gegeben. 200µl davon wurden in die erste Spalte einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und bis 10⁻⁶ mit PBS titriert. Anschließend wurden je Kavität 25µl auf eine Zellkulturplatte übertragen.

Diese wurde bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert und über 7 Tage beobachtet. Parallel dazu wurde eine Zellkulturplatte mit einer Zell- und Viruskontrolle mitgeführt. Nach 7 Tagen wurde das Ergebnis abgelesen und dokumentiert.

3.2.12 Keimträgerversuche Stahl

Die Viruzidieprüfung für den Bereich tierärztliche Praxis erfolgte auf Edelstahlkeimträgern. Es wurden die Viren MPV und FCoV getestet. Die Bestimmung der viruziden Wirkung fand unter niedriger Eiweißbelastung (Rinderalbumin) statt und wurde in Anlehnung an die Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln der DVG (ANON., 2008) durchgeführt. Das verwendete Verhältnis von Virus zu Belastungssubstanz betrug 9:1.

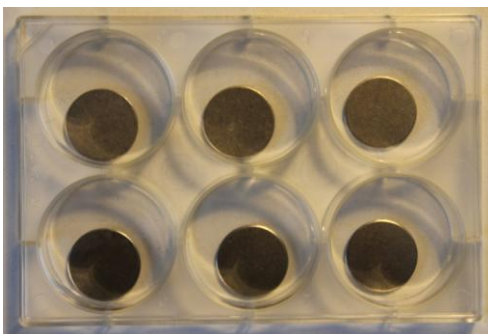


Abbildung 8: Edelstahlkeimträger in 6-Well-Mikrotiterplatte

Material und Methoden

Es wurde ein Edelstahlkeimträger unter sterilen Bedingungen in eine Kavität einer 6-Well-Platte gelegt. Dieser wurde anschließend mit 50µl eines Virus-Belastungsgemisches beschichtet. Dabei war darauf zu achten, dass zum Rand des Keimträgers ein möglichst gleichmäßiger Abstand von 2mm frei blieb.

Der Keimträger wurde für 18min in einem mit Trocknungspellets gefüllten Exsikkator mit Hilfe einer Vakuumpumpe bei 900-950mbar getrocknet. Es wurden pro Trocknungsgang maximal sechs Edelstahlkeimträger mit je 50µl Virussuspension getrocknet.

Anschließend wurden 100µl Prüfsubstanz der gewünschten Verdünnung aufgetragen. Dies geschah bis zum Rand des Keimträgers. Nach einer Einwirkzeit von 5 bzw. 30min wurden Prüfsubstanz und Virussuspension mit 2000µl PBS abgespült. Dafür wurde eine 5ml-Pipette verwendet und zehnmals auf dem Keimträger resuspendiert. Anschließend wurde das gesamte Gemisch in ein Reagenzreservoir mit 2850µl PBS übertragen. Nach gründlicher Durchmischung wurden in die erste Reihe einer 96-Well-Mikrotiterplatte 200µl Reagenz pipettiert und bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-7} mit PBS titriert.

Anschließend wurden je 25µl auf eine entsprechende Zellkulturplatte übertragen und bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. FCoV wurde über einen Zeitraum von sieben Tagen beobachtet, MPV über 14 Tage. Nach der Beobachtungszeit erfolgte die Ablesung und Dokumentation der Ergebnisse. Es wurde stets eine Zellkultur- und Viruskontrolle mitgeführt. Alle Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt und zweimal wiederholt.

3.2.13 Keimträgerversuche Holz

Die Viruzidieprüfung für den Bereich Tierhaltung erfolgte auf Holzkeimträgern. Es wurden die Viren BVDV, EAV sowie NDV (All) und NDV (ZK) getestet. Die Bestimmung der viruziden Wirkung fand unter niedriger Eiweißbelastung (für BVDV und EAV mit Rinderalbumin, für NDV (All) und NDV (ZK) mit FKS) statt und wurde in Anlehnung an die Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln der DVG (ANON., 2008) durchgeführt.

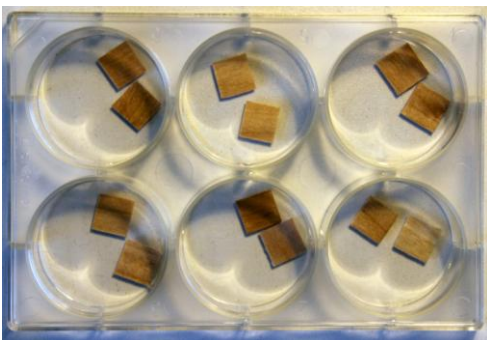


Abbildung 9: Holzkeimträger in 6-Well-Platte

Material und Methoden

Für die Prüfung wurden Holzkeimträger (2 Stück a 10x10mm) unter sterilen Bedingungen in eine Kavität einer 6-Well-Platte platziert, mit je 50µl Virus-Belastungssuspension benetzt und bei 37°C für 60min in einem Brutschrank getrocknet.

Nach der Trocknungszeit wurden die Holzkeimträger in 4ml Desinfektionsmittel der gewünschten Verdünnung für 5 bzw. 30 Minuten eingelegt. Nach Ablauf der Einwirkzeit wurden die Holzkeimträger aus der Desinfektionsmittellösung entfernt, in einer Petrischale kurz abgetropft und in je vier gleichgroße Stücke geschnitten. Diese insgesamt acht Teile wurden in ein Falcon, mit 9,9ml PBS gegeben und anschließend kräftig geschüttelt.

Ein zehnminütiges Ultraschallbad auf Eis begünstigte die Ablösung des Virus von den Holzkeimträgern. Danach wurden 4ml Überstand abpipettiert und in ein Reagenzreservoir gegeben. 200µl wurden in die erste Spalte einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben und bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-7} mit PBS titriert. Anschließend wurden je 25µl auf eine bereits vorbereitete Zellkulturplatte übertragen.

Die Zellkulturplatte wurde bei 37°C mit 5% CO₂ für sieben Tage inkubiert und beobachtet. Nach sieben Tagen erfolgte die Ablesung der Ergebnisse und deren Dokumentation. Alle Versuche wurden im Doppelansatz durchgeführt und einmal wiederholt. Eine Zell- und Viruskontrolle wurden stets mitgeführt.

4 Ergebnisse

4.1. Darstellung des zytopathischen Effektes auf der Zellkultur

Die Zellkulturen mit ihrer spezifischen Morphologie sowie der durch die jeweiligen Testviren hervorgerufene cpE sind in den Abbildungen 10 bis 14 dargestellt. Die Zellkulturen wurden digital fotografiert (Mikroskop: Leica DMIL, Kamera: Leica DFC 320; Leica Microsystems (Switzerland) Ltd., Heerbrugg, Schweiz). Für die Dokumentation und Archivierung der Aufnahmen wurde das dazugehörige Programm Leica Application Suite verwendet.

Nach der Infektion der MDBK-Zellen mit BVDV kam es innerhalb von sieben Tagen zu auffälligen morphologischen Veränderungen der Zellen. Charakteristisch für den cpE waren Merkmale wie: Pyknose sowie Lyse der Zellen und Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturplatte mit typischer "Netzbildung". Die Infizierung von VERO-Zelllinien mit EAV führte innerhalb von 3-4 Tagen zu einer Schrumpfung und Abkugelung der Zellen, teilweise mit Lyse und Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturplatte. Die morphologischen Veränderungen von CRFK-Zellen nach Infektion mit FCoV traten nach 5-7 Tagen auf. Das histologische Bild war geprägt von einer starken Abrundung der Zellen mit Vesikelbildung im Inneren. Bei den A9-Zellen kam es noch bis zu 14 Tage nach der Infektion mit MPV zur Ausbildung eines cpE. Als charakteristische Merkmale waren eine mehr oder minder starke Pyknose der Zellen sichtbar mit "Aufreißen" des Zellrasens. Nach Infektion der LMH-Zelllinie mit NDV (ZK) und NDV (All) war innerhalb von 3-4 Tagen ein cpE zu beobachten. Dieser war charakterisiert durch Vesikelbildung und Lyse der Zellen. Bei beiden Anzuchtvarianten stellte sich der cpE gleich dar.

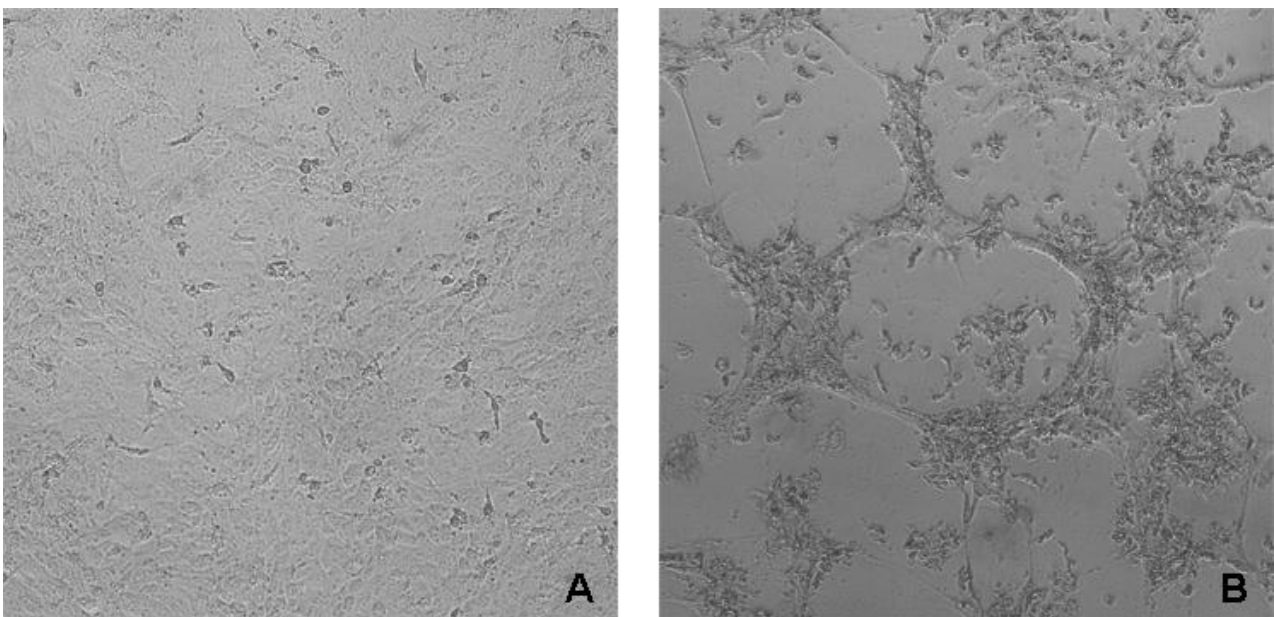


Abbildung 10: Infektion von MDBK-Zellen mit BVDV. A) Kontrolle ohne cpE B) cpE 7 Tage nach Infektion mit BVDV

Ergebnisse

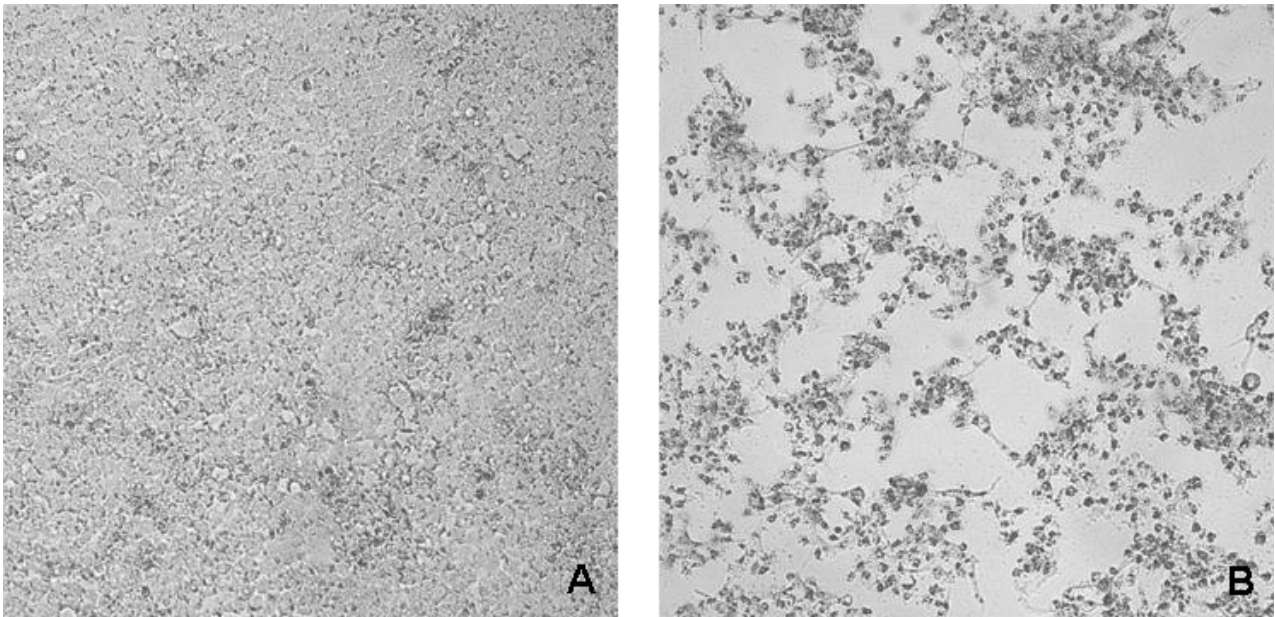


Abbildung 11: Infektion von VERO-Zellen mit EAV. A) Kontrolle ohne cpE B) cpE 3 Tage nach Infektion mit EAV

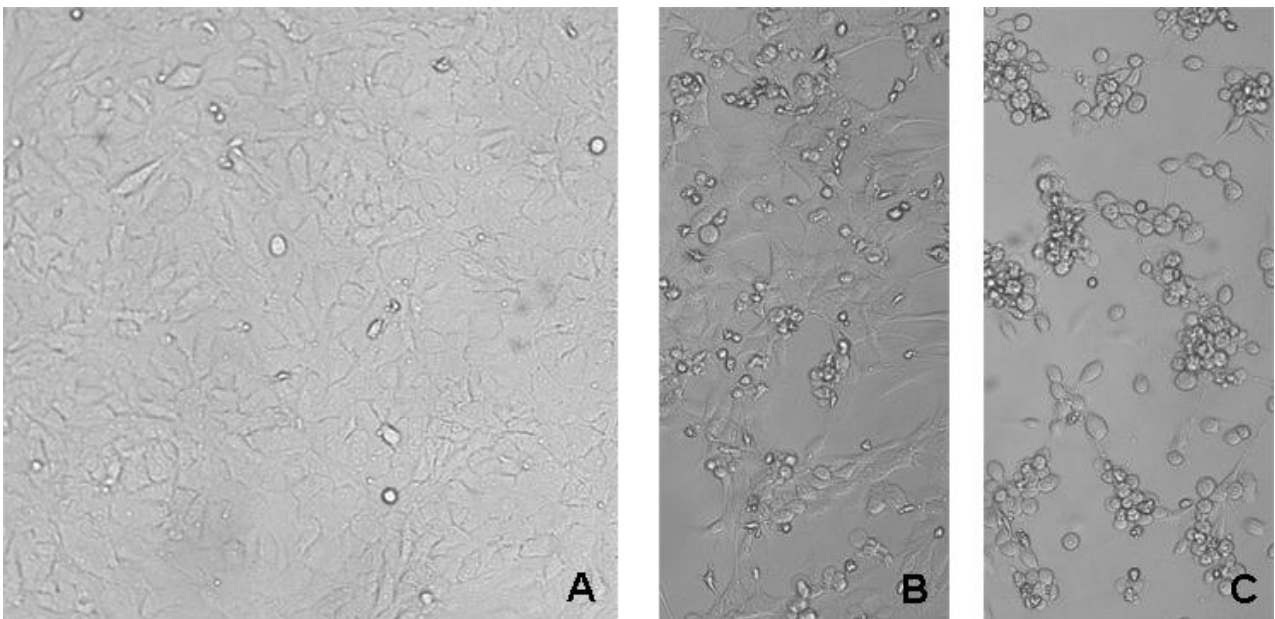


Abbildung 12: Infektion von CRFK-Zellen mit FCoV. A) Kontrolle ohne cpE B) beginnender cpE 3 Tage nach Infektion mit FCoV C) starker cpE 7 Tage nach Infektion mit FCoV

Ergebnisse

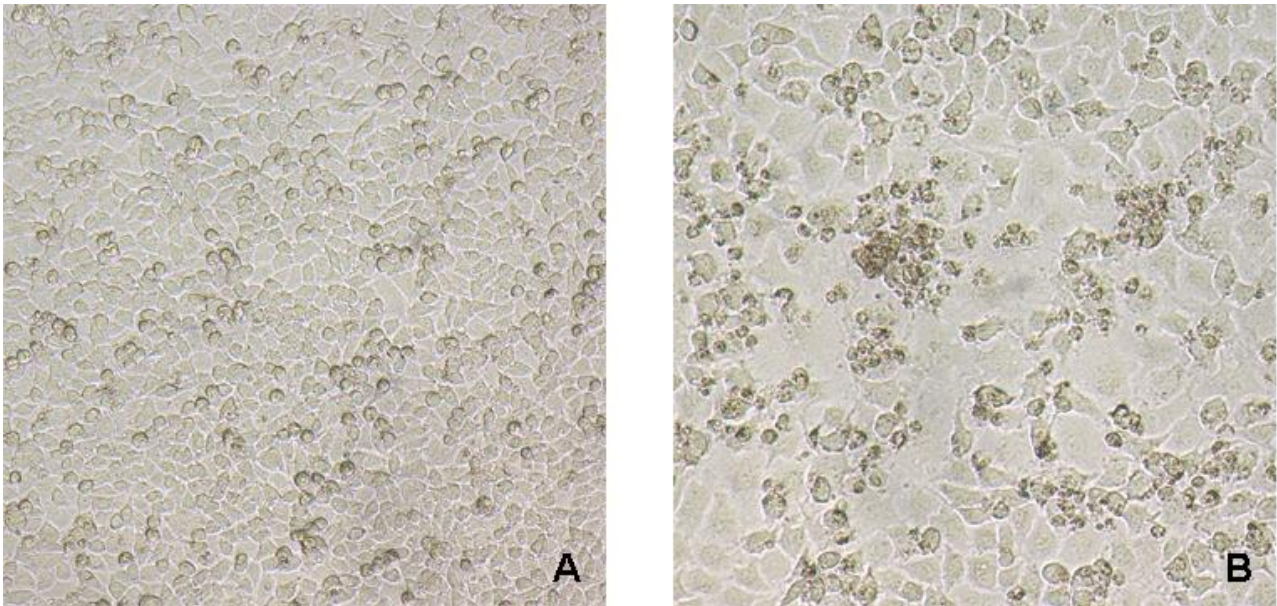


Abbildung 13: Infektion von A9-Zellen mit MPV. A) Kontrolle ohne cpE B) cpE 10 Tage nach Infektion mit MPV

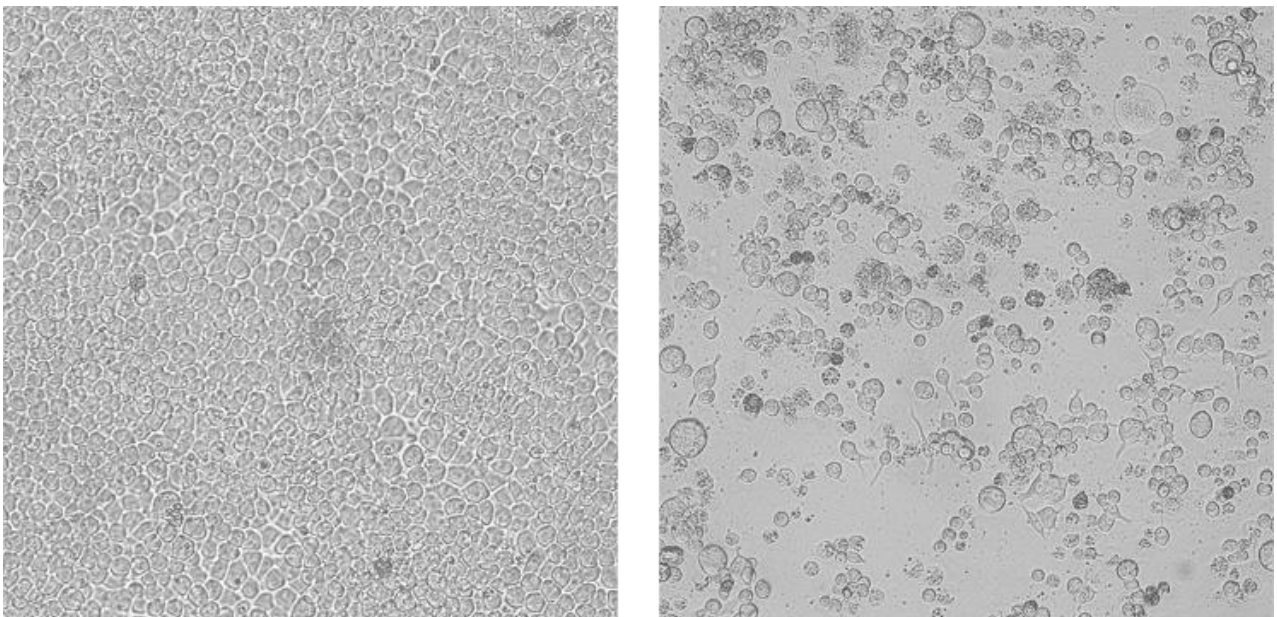


Abbildung 14: Infektion von LMH-Zellen mit NDV. A) Kontrolle ohne cpE B) cpE 3-4 Tage nach Infektion mit NDV

4.2. Ergebnisse der Eiweißgehaltsprüfung

Die Tabelle 23 des Anhangs (Seite 82) stellt die Ergebnisse der Eiweißgehaltsprüfung von NDV dar. Der Eiweißgehalt des in der Allantoisflüssigkeit vermehrten NDV (All) ist bis zu dreimal so hoch wie der Eiweißgehalt des in Zellkultur vermehrten NDV (ZK). Der Eiweißgehalt von NDV (ZK) beträgt bei 1:10 facher Verdünnung 0,6 µg/ml, bei 1:3 facher Verdünnung 1,6 µg/ml und bei purer Verwendung 3,6 µg/ml. NDV (All) hat bei purer Verwendung einen Eiweißgehalt von mindestens 6 µg/ml, bei 1:3 facher Verdünnung 4,7 µg/ml und bei 1:10 facher Verdünnung 1,9 µg/ml. Zusammenfassend zeigt sich bei allen drei getesteten Verdünnungsstufen pur, 1:3 und 1:10 ein deutlich höherer Eiweißgehalt bei NDV (All) als bei NDV (ZK). Vergleicht man die Mittelwerte der

Ergebnisse

Untersuchungen so bestätigt sich ein höherer Eiweißgehalt von NDV (All) mit durchschnittlich 4,2 µg/ml gegenüber NDV (ZK) mit durchschnittlich 1,9 µg/ml. Dies entspricht einen über doppelt so hohem Eiweißgehalt.

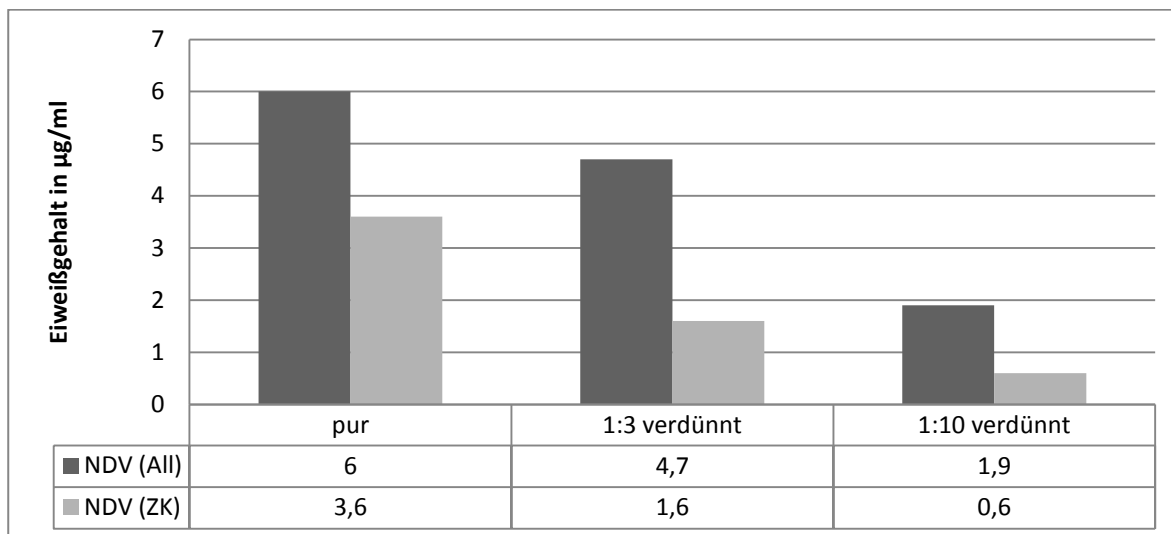


Abbildung 15: Eiweißgehalte NDV (All) und NDV (ZK) im Vergleich

4.2. Ergebnisse der Toxizitätsprüfung

In den Tabellen 24 bis 28 des Anhangs (ab Seite 82) sind die Ergebnisse der Toxizitätsprüfung im Suspensionsversuch dargestellt. Die Ergebnisse waren Grundlage für die Bestimmung der viruziden Wirksamkeit der Desinfektionsmittel im Keimträgertest. Aus den Ergebnissen wurde ersichtlich, dass die chemischen Grundsubstanzen, in den für die Keimträgerversuche notwendigen Konzentrationsbereichen keine toxischen Effekte auf die entsprechenden Zellkulturen bewirkten. Lediglich bei den, für den Versuch mit MPV notwendigen hohen Konzentrationen von 0,25% Peressigsäure und 2% Natronlauge kam es bei den A9-Zellen zu toxischen Veränderungen.

4.3. Ergebnisse der Behandlungsprüfung

Die Ergebnisse der Behandlungstests sind in der Tabelle 29 des Anhangs (Seite 85) dargestellt. Aus der Gesamtheit der Ergebnisse wird ersichtlich, dass eine mögliche Veränderungen an den Zellen und damit eine Verminderung der Empfindlichkeit des Virus in den getesteten Konzentrationen nicht stattfindet. Getestet wurden Glutaraldehyd, Ethanol, Peressigsäure, Natronlauge und Natriumhypochlorit in für die Hauptversuche relevanten Konzentrationen. Es traten bei keiner der Zelllinien nennenswerte Titerunterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellkulturen auf.

4.4. Ergebnisse der Inaktivierungs-Bezugsprüfung

In Tabelle 30 des Anhangs (Seite 85) sind die Ergebnisse der Inaktivierungs-Bezugsprüfung dargestellt. Alle in den Versuchen verwendeten Viren können durch Formalin vollständig inaktiviert werden.

4.5. Einfluss der Trocknung auf die Infektiösität der Testviren

4.5.1 Vergleich der auf Stahlkeimträgern getesteten Viren

Im Hinblick auf die Stabilität der Viren war sowohl bei MPV als auch bei FCoV nur eine geringfügige, teilweise keine Titerreduktion während der Trocknung ersichtlich. Es traten bei MPV Titerverluste bis zu einer Höhe von 0,2 $\log_{10}KID_{50}/ml$ auf. Bei FCoV traten vereinzelt Verluste bis zu 0,25 $\log_{10}KID_{50}/ml$ auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 31 des Anhangs (Seite 86) dargestellt. Es ist festzustellen, dass die zwanzigminütige Trocknung bei 20°C, im Exsikkator keinen negativen Einfluss auf die Infektiösität der Viren und damit auf den Versuchsablauf darstellt.

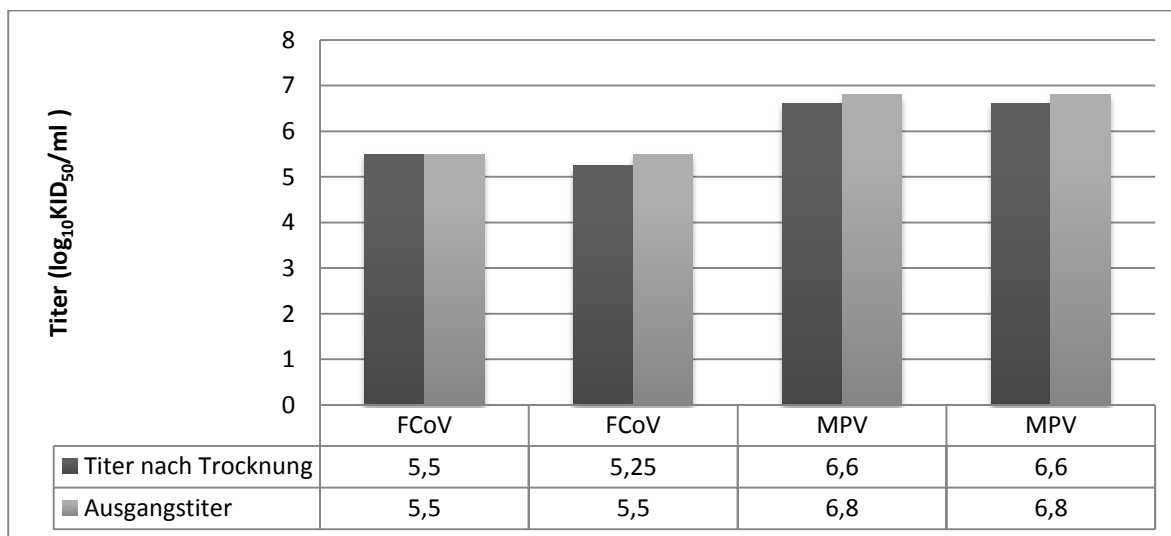


Abbildung 16: Trocknungsversuche auf Stahlkeimträgern

4.5.2 Vergleich der auf Holzkeimträgern getesteten Viren

Die Ergebnisse in Tabelle 32 des Anhangs (Seite 86) zeigen erhebliche Titerreduktionen nach sechzigminütiger Trocknung bei 37°C im Brutschrank. Die Titerverluste wurden sowohl bei BVDV als auch bei EAV und NDV festgestellt. Bei wiederholten Versuchen mit dem BVDV betrug der minimale Titerverlust 1,5 $\log_{10}KID_{50}/ml$, teilweise waren Verluste bis zu einer Höhe von 1,8 $\log_{10}KID_{50}/ml$ zu beobachten. Beim EAV waren Titerreduktionen zwischen 1,1 $\log_{10}KID_{50}/ml$ und 1,6 $\log_{10}KID_{50}/ml$ festzustellen. Auch bei NDV waren die Verluste unabhängig vom Vermehrungsverfahren hoch. So lagen bei NDV (ZK) die Titerverluste zwischen 1,3 $\log_{10}KID_{50}/ml$ und 1,6 $\log_{10}KID_{50}/ml$. Die Reduktion des Titers bei NDV (All) betrug zwischen 1,4 $\log_{10}KID_{50}/ml$ und 1,6 $\log_{10}KID_{50}/ml$.

Ergebnisse

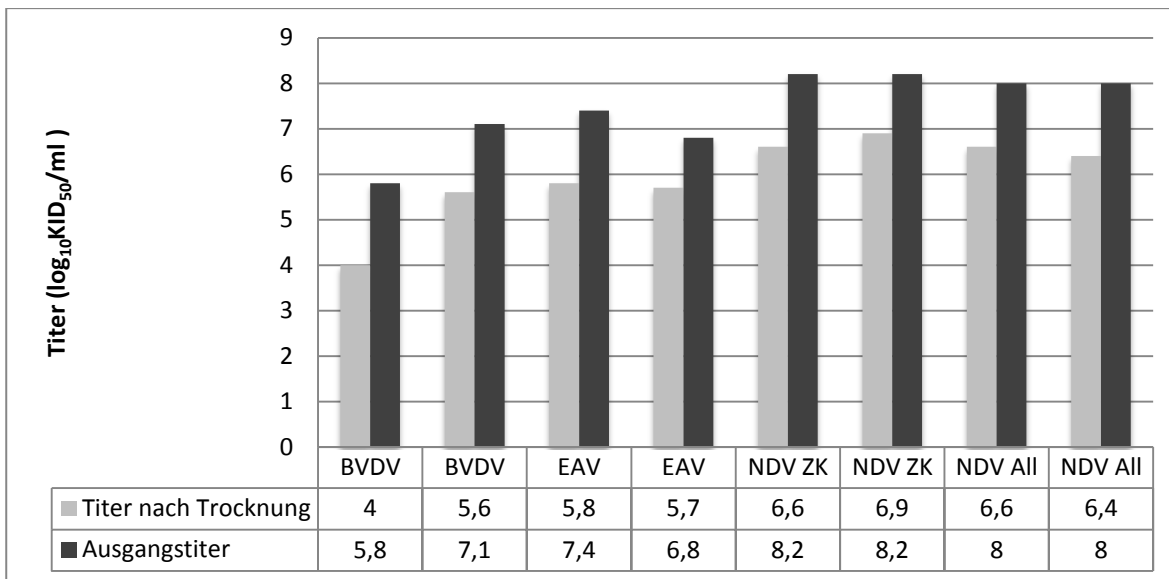


Abbildung 17: Holzkeimträger - Titer vor und nach der Trocknung

4.5.3 Vergleich der auf Stahl- und Holzkeimträgern getesteten Viren hinsichtlich ihrer Titerreduktion

Die verschiedenen Trocknungsverfahren im Stahl- und Holzkeimträgerversuch führten zu deutlich unterschiedlichen Titerreduktionen. Beim Trocknungsverfahren für den Stahlkeimträgerversuch kam es maximal zu einer Titerreduktion um 0,25 log-Stufen. Die Titerreduktion bei der Trocknung im Holzkeimträgerversuch war dagegen mit bis zu 1,8 log-Stufen deutlich höher.

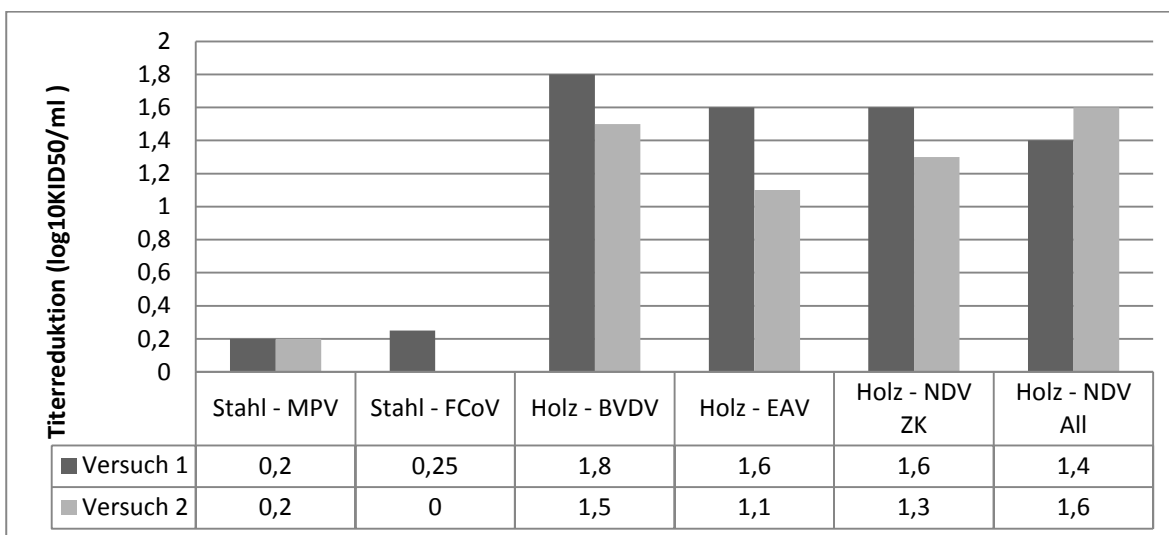


Abbildung 18: Vergleich der Titerreduktion der Testviren nach Trocknung im Stahl- und Holzkeimträgerversuch

4.6. Viruzide Wirksamkeit der Desinfektionsmittel im Keimträgertest

In den folgenden zwei Kapiteln wird näher auf die Ergebnisse der Viruzidieprüfung eingegangen. Es wurden für den Bereich tierärztliche Praxis die Viren MPV und FCoV auf Stahlkeimträgern analysiert und für den Bereich Tierhaltung die Viren BVDV und EAV auf Holzkeimträgern. Getestet wurden jeweils fünf chemische Grundsubstanzen: Glutaraldehyd, Ethanol, Peressigsäure, Natronlauge und Natriumhypochlorit.

4.6.1 Vergleich der auf Stahlkeimträgern geprüften Testviren

In den nachfolgenden Abbildungen wurden beide auf Stahlkeimträgern verwendete Prüfviren hinsichtlich der minimal benötigten Konzentrationen der chemischen Grundsubstanzen für eine vollständige Inaktivierung miteinander verglichen. Hierbei wurden Einwirkzeiten von 5 und 30min berücksichtigt. Eine vollständige Inaktivierung entspricht laut DVG-Richtlinien einer Virustiterreduktion um mindestens vier log-Stufen im Vergleich zur Viruskontrolle. Dies war in den Versuchen nicht realisierbar, so dass von einer Reduktion um drei log-Stufen zur vollständigen Inaktivierung ausgegangen wurde. Die vollständigen Auflistungen der Messwerte befinden sich in den Tabellen 33 bis 42 des Anhangs (ab Seite 86).

Ergebnisse

Glutaraldehyd

Bei der Prüfung der viruziden Wirkung von Glutaraldehyd im Stahlkeimträgerversuch waren deutlich höhere Konzentrationen für eine vollständige Inaktivierung von MPV notwendig als bei FCoV (Abbildung 19). Eine Konzentration von 0,075% bei 30min Einwirkzeit, bzw. 0,1% bei 5min Einwirkzeit führten zu einer vollständigen Inaktivierung von MPV. Eine 0,025%ige Konzentration inaktivierte FCoV innerhalb von 30min vollständig, eine 0,05% konzentrierte Lösung benötigte 5min zur vollständigen Inaktivierung.

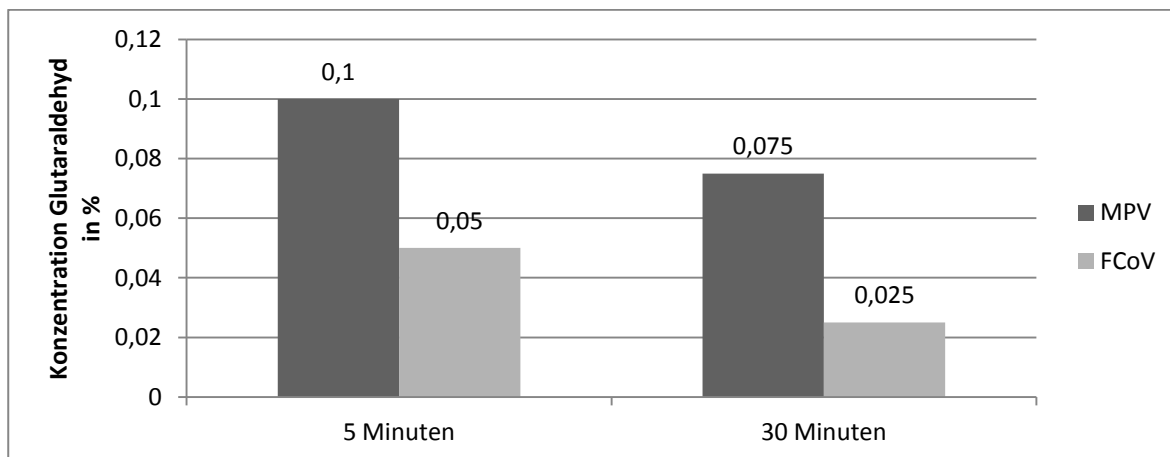


Abbildung 19: Viruzide Wirksamkeit von Glutaraldehyd im Stahlkeimträgerversuch - bei MPV und FCoV

Tabelle 19: Durchschnittliche Titerreduktion des FCoV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Glutaraldehyd

Glutaraldehyd, FCoV		
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min
0,01	1,45	3,1
0,025	3,1	>3,4
0,05	>3,4	>3,3

Tabelle 20: Durchschnittliche Titerreduktion des MPV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Glutaraldehyd

Glutaraldehyd, MPV		
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min
0,025	/	2,4
0,05	2,3	3,0
0,075	2,95	>3,4
0,1	>3,4	/

Ergebnisse

Ethanol

Bei der Prüfung der viruziden Wirksamkeit von Ethanol konnte nur bei FCoV eine vollständige Inaktivierung erreicht werden (Abbildung 20). Eine Konzentration von 30% führte unabhängig von der Einwirkzeit zu einer vollständigen Inaktivierung des Prüfvirus FCoV. Konzentrationen bis 80% führten zu keiner ausreichenden Inaktivierung von MPV unabhängig von den Einwirkzeiten.

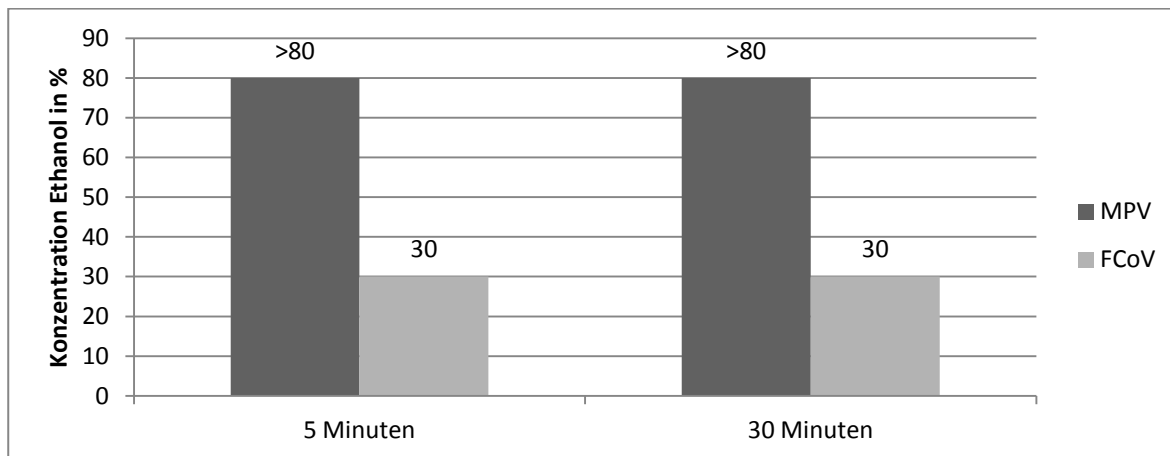


Abbildung 20: Viruzide Wirksamkeit von Ethanol im Stahlkeimträgerversuch - bei MPV und FCoV

Tabelle 21: Durchschnittliche Titerreduktion des FCoV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Ethanol

Ethanol, FCoV		
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min
25	1,3	2,3
30	3,5	>3,6
35	>3,5	>3,4

Tabelle 22: Durchschnittliche Titerreduktion des MPV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Ethanol

Ethanol, MPV		
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min
70	0,05	0,2
75	0,05	0,2
80	0,06	0,2

Ergebnisse

Peressigsäure

Eine ausreichend viruzide Wirkung von Peressigsäure wird für MPV erst bei deutlich höheren Konzentrationen erreicht als für FCoV (Abbildung 21). Eine Inaktivierung von MPV fand sowohl mit 5 als auch mit 30min Einwirkzeit erst im zytotoxischen Konzentrationsbereich bei 0,25% statt. Eine vollständige Inaktivierung von FCoV fand nach einer Einwirkzeit von 5min bei einer Konzentration von 0,075% statt. Durch Verlängerung der Einwirkzeit auf 30min ließ sich die notwendige Konzentration auf 0,05% senken.

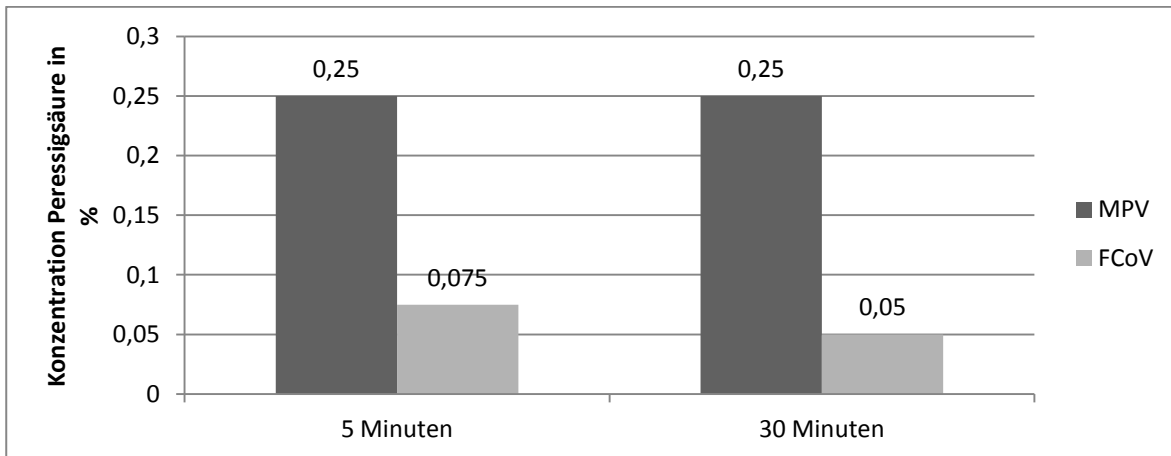


Abbildung 21: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Stahlkeimträgerversuch - bei MPV und FCoV

Tabelle 23: Durchschnittliche Titerreduktion des FCoV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Peressigsäure

Peressigsäure, FCoV		
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min
0,025	1,2	3,2
0,05	3,4	>3,7
0,075	>3,7	>3,7

Tabelle 24: Durchschnittliche Titerreduktion des MPV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Peressigsäure

Peressigsäure, MPV		
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min
0,075	1,8	2,7
0,1	2,5	3,0
0,25	Toxisch	Toxisch

Ergebnisse

Natronlauge

Unter Einwirkung von Natronlauge zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Stabilität der untersuchten Viren (Abbildung 22). Eine vollständige Inaktivierung trat bei den FCoV, unabhängig von der Einwirkzeit bei einer Konzentration von 0,5% ein. Um MPV vollständig zu inaktivieren, war bei einer Einwirkzeit von 5min eine Konzentration von 2,0% nötig. Bei verlängerter Einwirkzeit (30min) reduzierte sich die notwendige Konzentration auf 1,5%.

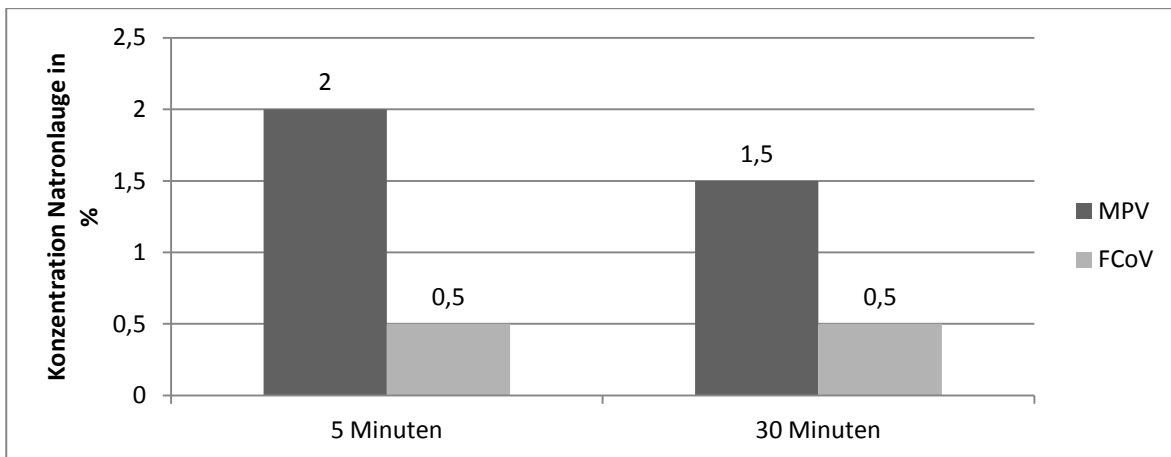


Abbildung 22: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Stahlkeimträgerversuch - bei MPV und FCoV

Tabelle 25: Durchschnittliche Titerreduktion des FCoV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natronlauge

Natronlauge, FCoV		
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min
0,1	1,1	0,9
0,25	2,2	3,2
0,5	>3,7	>3,7

Tabelle 26: Durchschnittliche Titerreduktion des MPV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natronlauge

Natronlauge, MPV		
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min
1,0	2,7	2,9
1,5	3,0	3,4
2,0	3,4	/

Ergebnisse

Natriumhypochlorit

Bei der Viruzidieprüfung von Natriumhypochlorit im Stahlkeimträgerstest mussten für eine vollständige Inaktivierung von MPV höhere Konzentrationen eingesetzt werden als für das FCoV (Abbildung 23). 5,0% waren unabhängig von der Einwirkzeit nötig um MPV vollständig zu inaktivieren. Dagegen hatte eine 4%ige Lösung eine ausreichende viruzide Wirkung auf FCoV. Mit Verringerung der Einwirkzeit war eine Erhöhung der wirksamen Konzentration bei FCoV nicht nötig.

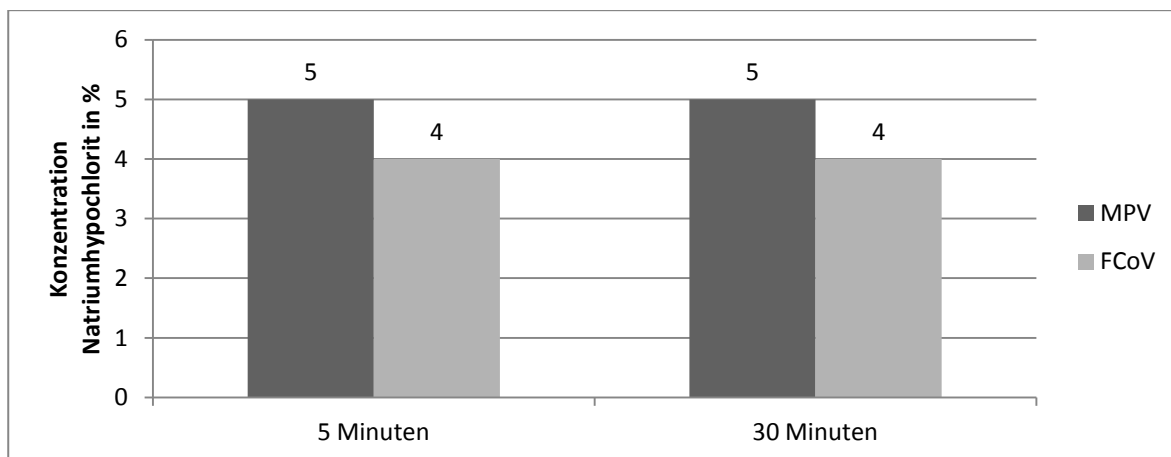


Abbildung 23: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Stahlkeimträgerversuch - bei MPV und FCoV

Tabelle 27: Durchschnittliche Titerreduktion des FCoV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natriumhypochlorit

Natriumhypochlorit, FCoV		
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min
3,0	2,5	3,3
3,5	3,1	3,5
4,0	3,4	>3,7
4,5	>3,5	/

Tabelle 28: Durchschnittliche Titerreduktion des MPV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natriumhypochlorit

Natriumhypochlorit, MPV		
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min
4,0	3,0	1,9
4,5	3,3	2,2
5,0	>3,4	>3,5

4.6.2 Vergleich der auf Holzkeimträgern geprüften Testviren

Die zwei für die Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel im Bereich Tierhaltung auf Holzkeimträgern geprüften Viren werden in den nachfolgenden Abbildungen verglichen. Der Vergleich erfolgt hinsichtlich der minimal benötigten Konzentrationen der chemischen Grundsubstanzen für eine vollständige Inaktivierung der Prüfviren. Hierbei wurden Einwirkzeiten von 5 und 30min berücksichtigt. Eine vollständige Inaktivierung entspricht einer Virustiterreduktion um mindestens 3 log-Stufen im Vergleich zur Viruskontrolle. Bedingt durch die starken Trocknungsverluste ist eine Reduktion um mindestens drei log-Stufen nur in den wenigsten Versuchen nachweisbar gewesen. Es wird daher in diesem Versuch eine Inaktivierung des Virusmaterials schon bei einer Reduktion um mindestens 2,6 log-Stufen angenommen. Die vollständigen Auflistungen der Messwerte finden sich in den Tabellen 43 bis 52 des Anhangs (ab Seite 94).

Ergebnisse

Glutaraldehyd

Bei der Prüfung der viruziden Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch war eine geringfügig höhere Konzentration für eine vollständige Inaktivierung von EAV als im Vergleich dazu für BVDV notwendig (Abbildung 24). Eine Konzentration von 0,01% bei 30min, bzw. 0,025% bei 5min Einwirkzeit führten zu einer vollständigen Inaktivierung von BVDV. Eine 0,05%-ige Konzentration inaktivierte EAV sowohl innerhalb von 5 als auch von 30min vollständig.

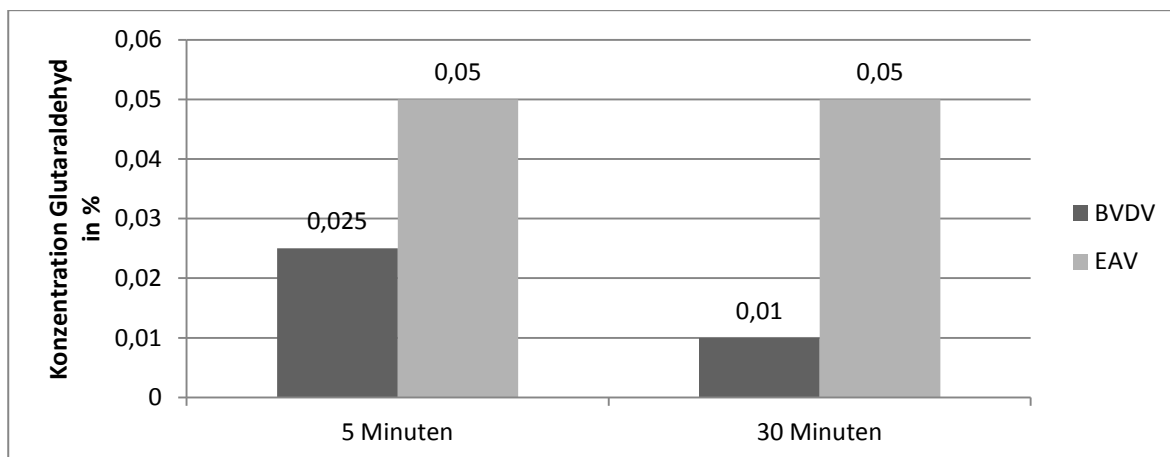


Abbildung 24: Viruzide Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch - bei BVDV und EAV

Tabelle 29: Durchschnittliche Titerreduktion des BVDV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Glutaraldehyd

Glutaraldehyd, BVDV			
Konzentration (%)	Titerreduktion ($\log_{10}KID_{50}/ml$)		Titerreduktion ($\log_{10}KID_{50}/ml$)
	5 min	30 min	
0,0075	2,1	2,8	
0,01	2,6	>2,8	
0,025	2,9	>3,0	
0,05	>2,9	/	

Tabelle 30: Durchschnittliche Titerreduktion des EAV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Glutaraldehyd

Glutaraldehyd, EAV			
Konzentration (%)	Titerreduktion ($\log_{10}KID_{50}/ml$)		Titerreduktion ($\log_{10}KID_{50}/ml$)
	5 min	30 min	
0,025	2,6	2,7	
0,05	2,7	3,0	
0,075	>2,8	/	

Ergebnisse

Ethanol

Eine ausreichend viruzide Wirkung von Ethanol wird für BVDV erst durch höhere Konzentrationen erreicht als für EAV (Abbildung 25). Eine Inaktivierung von BVDV fand mit 5min Einwirkzeit bei einer Konzentration von 35% statt, bei einer Einwirkzeit von 30min reichte ein Konzentration von 30% aus. Eine vollständige Inaktivierung von EAV fand nach einer Einwirkzeit von 5min bei einer Konzentration von 30% statt. Durch Verlängerung der Einwirkzeit auf 30min ließ sich die notwendige Konzentration auf 25% senken.

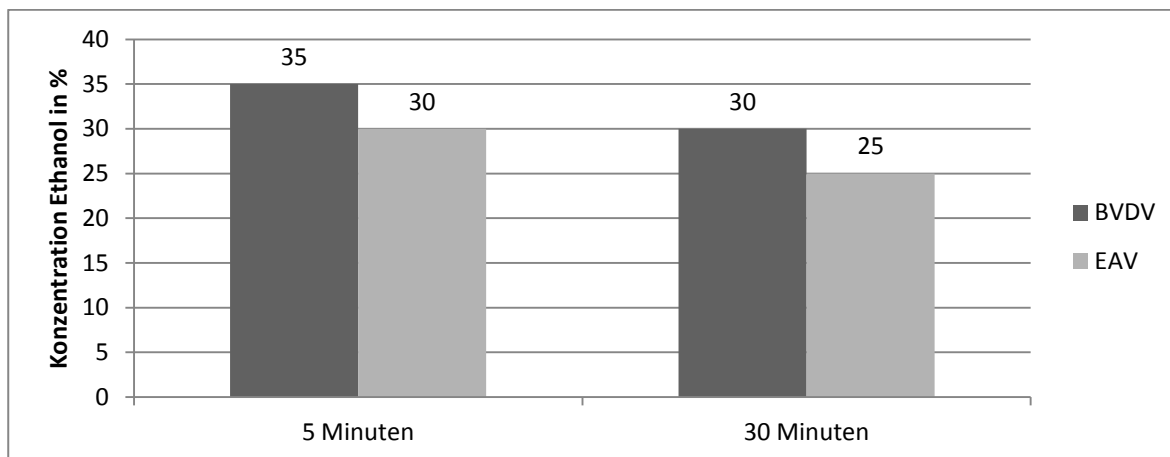


Abbildung 25: Viruzide Wirkung von Ethanol im Holzkeimträgerversuch - bei BVDV und EAV

Tabelle 31: Durchschnittliche Titerreduktion des BVDV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Ethanol

Ethanol, BVDV			
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min	
25	2,2	2,4	
30	2,7	>2,7	
35	>2,7	/	

Tabelle 32: Durchschnittliche Titerreduktion des EAV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Ethanol

Ethanol, EAV			
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min	
20	2,3	2,6	
25	2,9	>2,8	
30	>2,8	>2,8	

Ergebnisse

Peressigsäure

Unter Einwirkung von Peressigsäure zeigten sich kaum Unterschiede hinsichtlich der Stabilität der untersuchten Viren (Abbildung 26). Eine vollständige Inaktivierung nach 5min Einwirkzeit trat sowohl bei BVDV, als auch bei EAV bei Konzentrationen von 0,01% ein. Mit einer Verlängerung der Einwirkzeit auf 30min sank bei BVDV die zur vollständigen Inaktivierung notwendige Konzentration auf 0,0075%, bei EAV dagegen auf 0,005% ab.

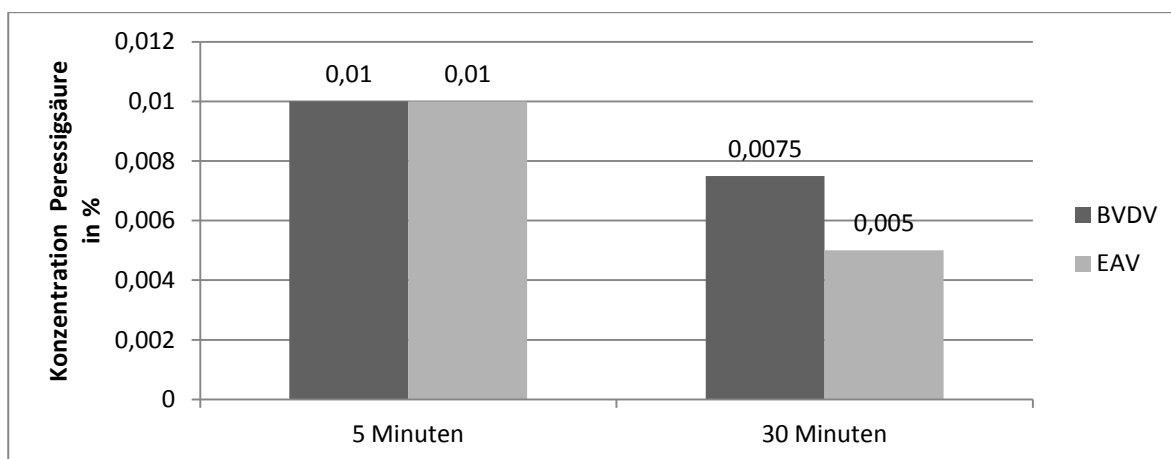


Abbildung 26: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Holzkeimträgerversuch - bei BVDV und EAV

Tabelle 33: Durchschnittliche Titerreduktion des BVDV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Peressigsäure

Peressigsäure, BVDV		
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min
0,005	2,4	2,6
0,0075	2,5	>2,7
0,01	>2,7	/

Tabelle 34: Durchschnittliche Titerreduktion des EAV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Peressigsäure

Peressigsäure, EAV		
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min
0,0025	1,8	2,6
0,005	2,4	>2,8
0,0075	2,7	>3,1
0,01	>2,8	>2,8

Ergebnisse

Natronlauge

Unterschiede in der Stabilität der untersuchten Viren konnten in der Viruzidieprüfung von Natronlauge im Holzkeimträgertest kaum festgestellt werden (Abbildung 27). Eine vollständige Inaktivierung von BVDV und EAV erfolgte nach einer Einwirkzeit von 30min bei 0,1%. Bei einer Verkürzung der Einwirkzeit auf 5min war eine Erhöhung der Konzentration auf 0,25% für BVDV nötig um eine vollständige Inaktivierung zu bewirken. Für EAV war ein Anpassung der Konzentration nicht erforderlich, hier war eine 0,1%-ige Konzentration ausreichend.

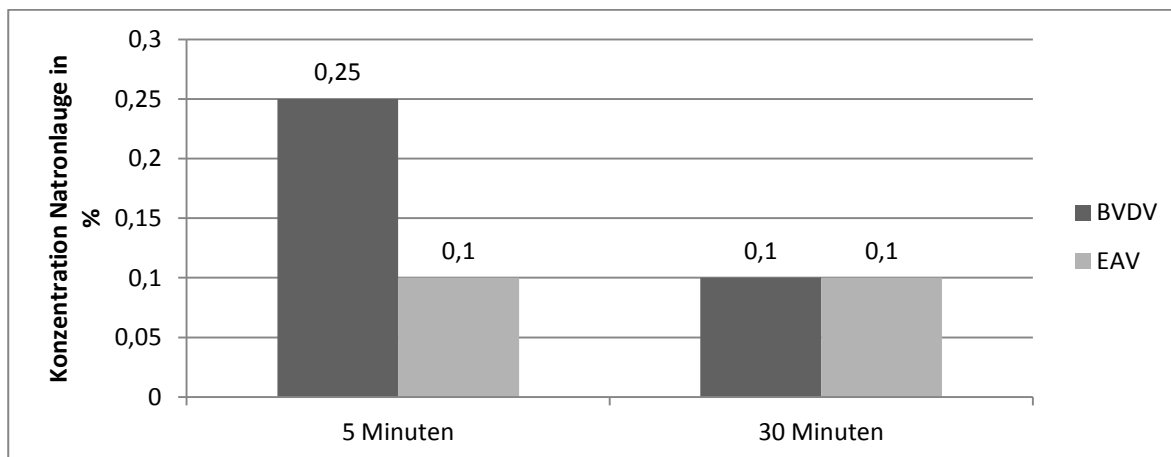


Abbildung 27: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Holzkeimträgerversuch - bei BVDV und EAV

Tabelle 35: Durchschnittliche Titerreduktion des BVDV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natronlauge

Natronlauge, BVDV			
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min	
0,075	2,6	2,8	
0,1	2,5	3,0	
0,25	2,9	>3,0	

Tabelle 36: Durchschnittliche Titerreduktion des EAV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natronlauge

Natronlauge, EAV			
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min	
0,05	1,5	1,9	
0,075	2,0	2,2	
0,1	>2,8	>2,8	

Ergebnisse

Natriumhypochlorit

Bei der Prüfung der viruziden Wirksamkeit von Natriumhypochlorit bedurfte es einer deutlich höheren Konzentration zur Inaktivierung von EAV als für BVDV (Abbildung 28). Eine vollständige Inaktivierung von BVDV konnte bei einer Einwirkzeit von 5min mit einer 2,0%-igen, bei einer Einwirkzeit von 30min mit einer 1,0%-igen Natriumhypochloritlösung erreicht werden. Für EAV waren unabhängig von der Einwirkzeit Konzentrationen von 4% nötig um das Virus ausreichend zu inaktivieren.

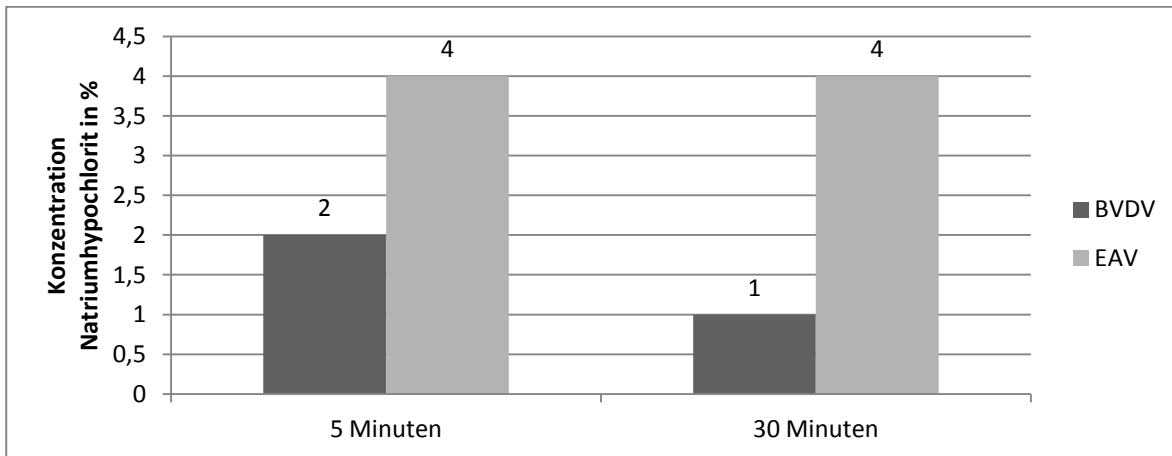


Abbildung 28: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Holzkeimträgerversuch - bei BVDV und EAV

Tabelle 37: Durchschnittliche Titerreduktion des BVDV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natriumhypochlorit

Natriumhypochlorit, BVDV			
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min	
0,75	2,6	2,8	
1,0	2,6	>2,8	
1,5	2,6	>2,7	
2,0	>2,7	>2,7	

Tabelle 38: Durchschnittliche Titerreduktion des EAV bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Natriumhypochlorit

Natriumhypochlorit, EAV			
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min	
3,0	2,7	2,6	
3,5	2,7	3,0	
4,0	>2,8	>2,8	

4.6.3 Vergleich von in Allantoisflüssigkeit vermehrtem NDV (All) mit in Zellkultur vermehrtem NDV (ZK)

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Desinfektionsmittelprüfung von NDV (All) und NDV (ZK) verglichen. Beide Varianten wurden auf Holzkeimträgern getestet. Der Vergleich erfolgt hinsichtlich der minimal benötigten Konzentrationen der chemischen Grundsubstanzen für eine vollständige Inaktivierung der Prüfviren. Um einen Unterschied hinsichtlich der Desinfektionsmittelwirkung im Zusammenhang mit dem Eiweißgehalt darstellen zu können, wurden zwei Desinfektionsmittel ausgewählt, die einen Eiweißfehler aufweisen können. Hierbei wurden Einwirkzeiten von 5 und 30min berücksichtigt. Eine vollständige Inaktivierung entspricht einer Virustiterreduktion um mindestens 3 log-Stufen im Vergleich zur Viruskontrolle. Die vollständigen Auflistungen der Messwerte finden sich in den Tabellen 53 bis 56 des Anhangs (ab Seite 101).

Ergebnisse

Glutaraldehyd

Für eine vollständige Inaktivierung von NDV (All) im Holzkeimträgerversuch war eine Konzentration von 0,5% Glutaraldehyd bei einer Einwirkzeit von 30min notwendig (Abbildung 29). Bei einer Verkürzung der Einwirkzeit auf 5min war ebenfalls eine 0,5%-ige Konzentration für eine vollständige Inaktivierung ausreichend. NDV (ZK) wurde bei einer Einwirkzeit von 30min durch eine 0,1%-ige Glutaraldehydlösung vollständig inaktiviert. Bei einer Verringerung der Einwirkzeit auf 5min reichte ebenfalls eine 0,1%-ige Lösung zur vollständigen Inaktivierung aus.

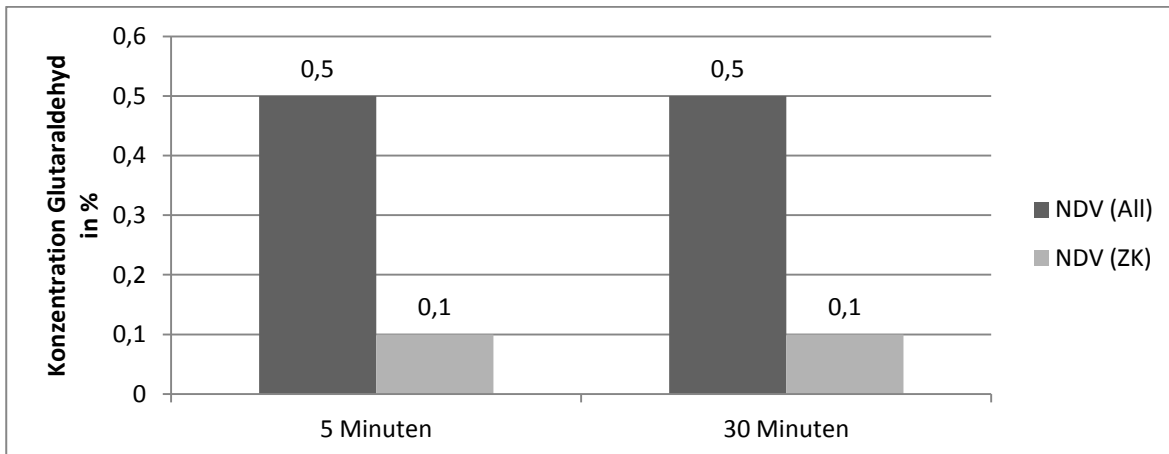


Abbildung 29: NDV (All) und NDV (ZK) im Viruzidieversuch mit Glutaraldehyd

Tabelle 39: Durchschnittliche Titerreduktion des NDV (All) bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Glutaraldehyd

Glutaraldehyd, NDV (All)			
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min	
0,1	0,7	2,4	
0,25	2,4	3,3	
0,5	3,6	3,5	

Tabelle 40: Durchschnittliche Titerreduktion des NDV (ZK) bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Glutaraldehyd

Glutaraldehyd, NDV (ZK)			
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min	
0,075	/	2,7	
0,1	3,2	3,2	
0,25	>3,6	>3,7	

Ergebnisse

Peressigsäure

Kleine Unterschiede hinsichtlich der Stabilität der beiden NDV Varianten konnten im Versuch mit Peressigsäure festgestellt werden (Abbildung 30). Sowohl für NDV (All), als auch für NDV (ZK) konnten identische Konzentrationen für eine vollständige Inaktivierung bei 5 minütiger Einwirkzeit verwendet werden. Hierfür war eine Konzentration von 0,1% notwendig. Bei Erhöhung der Einwirkzeit auf 30 Minuten reduzierte sich die Konzentration für NDV (All) auf 0,05%. Für NDV (ZK) war eine Konzentration von mindestens 0,025% nötig für eine vollständige Inaktivierung.

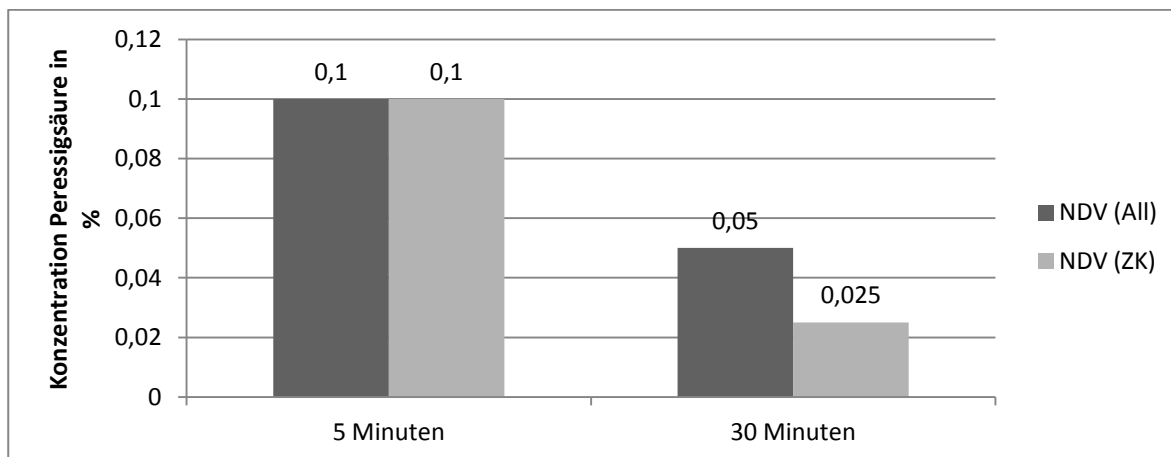


Abbildung 30: NDV (All) und NDV (ZK) im Viruzidieversuch mit Peressigsäure

Tabelle 41: Durchschnittliche Titerreduktion des NDV (All) bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Peressigsäure

Peressigsäure, NDV (All)			
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min	
0,025	/	2,5	
0,05	2,5	3,5	
0,075	3,1	>3,4	
0,1	>3,8	>3,9	

Tabelle 42: Durchschnittliche Titerreduktion des NDV (ZK) bei der Durchführung der Keimträgerversuche mit Peressigsäure

Peressigsäure, NDV (ZK)			
Konzentration (%)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 5 min	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml) 30 min	
0,01	/	2,6	
0,025	2,1	>3,6	
0,05	2,5	>3,7	
0,075	2,9	>3,8	
0,1	>3,5	/	

5 Diskussion

5.1 Auswahlkriterien Prüfviren

Es wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Viren bezüglich Ihrer Eignung als mögliches Prüfvirus im Rahmen der Erweiterung der "Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln" der DVG untersucht. Da die Ergebnisse der chemischen Desinfektionsmittelprüfung auf ihre viruzide Wirksamkeit maßgebend von der Wahl der verwendeten Testorganismen abhängt, erfolgt die Auswahl der Prüfviren anhand diverser Anforderungen. BORNEFF et al. (1975) forderten die Auswahl der Testkeime vor allem nach praktischen Gegebenheiten auszurichten. Die Testorganismen sollten möglichst das gleiche Erregerspektrum umfassen, gegen die das Desinfektionsmittel in der Praxis wirken muss. Diese Vorgehensweise führt jedoch zu einer Beschränkung des Desinfektionsmittels auf das Keimspektrum, welches vom Prüfumfang abgedeckt wurde.

Die EU-weiten Harmonisierungsbestrebungen für die Desinfektionsmittelprüfung, mit dem Ziel der Abgabe einer allgemeinen Anwendungsempfehlung berücksichtigend, wird die Auswahl der Testorganismen in dieser Arbeit von verschiedenen Gesichtspunkten aus beleuchtet. Die Testorganismen nehmen bei der Prüfung chemischer Desinfektionsmittel eine stellvertretende Position für viele andere Erreger ein. Angesichts dessen sollen die Testorganismen hinsichtlich ihrer Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen den relevanten pathogenen Erregern entsprechen oder sogar eine höhere Widerstandsfähigkeit aufweisen (KARNATH, 2011). Des Weiteren sollte es sich weder um einen Zoonoseerreger, noch um den Erreger einer anzeigepflichtigen Tierseuche handeln. Von entscheidender Bedeutung ist außerdem eine einfache Handhabung unter Laborbedingungen, wie einfache Kultivier- und Auswertbarkeit, deutliche zytopathische Effekte und hohe Ausgangstitel der Testorganismen müssen problemlos erreichbar sein.

In der vorliegenden Arbeit richtete sich die Auswahl der Viren nach letztgenannten Forderungen, sowie der besonderen Bedeutung der Prüfviren als Tierseuchenerreger.

5.1.1 Tierhaltung

Die für die Prüfung gewählten Testviren sollen die in den Tierhaltungen vorkommenden wesentlichen Viren in Ihrer Tenazität repräsentieren. Der Keimträgerversuch ist insbesondere für Desinfektionsmittel, die im Tierhaltungsbereich eingesetzt werden sollen, der wichtigste Wirksamkeitstest (TRUYEN, 2011a). Da die Desinfektionsmittelprüfung nicht an allen in Frage kommenden Materialien durchgeführt werden kann, muss eine bewusste Auswahl von möglichst praxisnahen Keimträgern getroffen werden. Gleichzeitig wird angestrebt, dass die erzielten

Diskussion

Ergebnisse auf andere Materialien übertragbar sind (BISPING & KIRPAL, 1974). Für die Validierung von Desinfektionsmittel für den Tierhaltungsbereich ist die limitierende Oberfläche Holz (BÖHM, 2011).

In Rahmen dieser Arbeit wurden das Bovine Virusdiarrhoe-Virus und das Equine Arteritis-Virus für die Viruzidieprüfung im Bereich Tierhaltung ausgewählt, diese werden im folgenden Teil näher erläutert.

5.1.1.1 Bovines Virusdiarrhoe-Virus

BVDV wurde in dieser Arbeit als Prüfvirus für den Tierhaltungsbereich ausgewählt, da es sich um einen in der Rinderpraxis relevanten und weit verbreiteten Tierseuchenerreger mit großer epidemiologischer Bedeutung handelt. Vorteilhaft ist das Fehlen jeglichen zoonotischen Potenzials, sowie die einfache Durchführung und Auswertbarkeit der Zellkulturnachweissysteme. BVDV konnte mittels der permanenten Zelllinie MDBK innerhalb kurzer Zeit zu hohen Ausgangstitern vermehrt werden. Nachteilig war die geringe Stabilität des Virus beim Auftauprozess. Um Titerverluste zu minimieren wurde ein mehrmaliges Auftauen und Einfrieren vermieden.

Im Rahmen der Vorversuche zeigte sich, dass BVDV im Trocknungsversuch instabil war. Bei der 60-minütigen Trocknung im Brutschrank traten Titerverluste von bis zu $1,8 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ und minimal $1,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ auf. Damit reduzierte sich der Ausgangstiter erheblich. Um die im Keimträgerversuch entstehenden Ergebnisse analog der DVG-Richtlinien bewerten zu können, sind allerdings sehr hohe Ausgangstitern notwendig. Die Richtlinien fordern eine minimale Reduktion um 4 log-Stufen um eine vollständige Inaktivierung erreichen zu können. Aufgrund der massiven Titerverluste beim Trocknungsvorgang konnte in der hier vorliegenden Arbeit nur eine eingeschränkte Bewertung der Ergebnisse vorgenommen werden. Für eine vollständige Inaktivierung wurde eine minimale Titerreduktion um mehr als $2,6 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ angenommen. Um die Titerverluste im Trocknungsvorgang zu verringern sollte über eine Alternative zur sechzigminütigen Brutschranktrocknung nachgedacht werden. Eine Verringerung der Trocknungszeit und der Trocknungstemperatur würde wahrscheinlich zu einer Verbesserung der Titer führen. Eventuell bietet sich eine Trocknung der Holzkeimträger im Exsikkator an.

In einer Studie von KÖHLER (2006) gelang die von der DVG geforderte Reduktion des Titers um mindestens 4 log-Stufen in zwei Holzkeimträgerversuchen mit kommerziellen Desinfektionsmitteln. Die verwendete Zelllinie und der Virusstamm stimmten mit der hier vorliegenden Studie überein. In der Arbeit von KÖHLER (2006) kommt jedoch nicht zum Ausdruck, ob ein deutlich höherer Ausgangstiter die Trocknungsverluste kompensiert, oder der Einsatz von höheren Eiweißkonzentrationen die Trocknungsverluste derart minimieren kann. In den eigenen Untersuchungen wurde die Eiweißbelastung auf die in den EN-Normen übliche Grundbelastung von 3% Rinderalbumin reduziert. Möglicherweise sind die hohen Titerverluste im

Diskussion

Trocknungsvorgang begründet durch die reduzierte Eiweißbelastung und den damit fehlenden Schutz des Virus. Auch die durch die EN-Normen geforderte Verwendung von Rinderalbumin anstelle von fetalem Kälberserum bei der Herstellung der Belastungssubstanz differiert mit der Studie von KÖHLER (2006) und darf im Vergleich nicht außer Acht gelassen werden.

Des Weiteren können mögliche Ursachen in Arbeitsabläufen schon vor der eigentlichen Versuchsdurchführung begründet sein. So würde eine Erhöhung des Ausgangstiters die Trocknungsverluste des Virus kompensieren. Eventuell führte eine fehlerbehaftete Ausführung der Virusanzucht, die Bearbeitung der Zellkultur oder die Aufbereitung der Virussuspension zu einer nachteiligen Beeinflussung des Ausgangstiters vom BVDV. Ebenso sollte die erwähnte Instabilität des Virus beim Auftau- und Einfrierprozess als mögliche Ursache in Betracht gezogen werden.

5.1.1.2 Equines Arteritis-Virus

Als weiteres Prüfvirus für den Tierhaltungsbereich wurde in dieser Studie die Eignung des EAV getestet. EAV wurde ausgewählt weil durch seine Eigenschaft als behülltes Virus eine ähnliche Tenazität wie bei NDV erwartet wurde. Als in Europa und den USA weit verbreiteter Infektionserreger der Pferde ist EAV für den Einsatz in der Desinfektionsmittelprüfung im Bereich Tierhaltung besonders geeignet. Vorteilhaft ist auch hier das Fehlen jeglichen zoonotischen Potenzials, sowie die einfache Durchführbarkeit und Auswertung der Zellkulturnachweissysteme. Innerhalb kurzer Zeit konnte EAV zu hohen Ausgangstitern mittels der permanenten VERO vermehrt werden. Mehrmaliges Auftauen und Einfrieren wurde vermieden, um Titerverluste zu minimieren.

Als nachteilig erwies sich die Instabilität des Virus im Trocknungsversuch. Nach der 60-minütigen Trocknung im Brutschrank zeigten sich Titerverluste von bis zu 1,6 $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ und minimal 1,1 $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$. Diese erhebliche Reduktion des Ausgangstiters führte zu Problemen in der Auswertung der nachfolgenden Versuche. Um die im Keimträgerversuch entstehenden Ergebnisse gemäß den DVG-Richtlinien bewerten zu können, sind sehr hohe Ausgangstitern notwendig. Die Richtlinien fordern eine minimale Reduktion des Titters um 4 log-Stufen um eine vollständige Inaktivierung erreichen zu können. Die massiven Titerverluste ließen in der vorliegenden Studie nur eine eingeschränkte Bewertung der Ergebnisse zu. Für das EAV wurde eine minimale Titerreduktion um mehr als 2,8 $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ für eine vollständige Inaktivierung angenommen. Möglicherweise kann hier die Verwendung von höheren Eiweißbelastungen Abhilfe schaffen. Es wurde die in den EN-Normen übliche Grundbelastung von 3% Rinderalbumin verwendet. Auch der Einsatz von deutlich höheren Ausgangstitern schon vor der Trocknung könnte zu einer besseren Auswertbarkeit der finalen Ergebnisse führen. Weitere Fehlerquellen können, wie bereits beim BVDV erwähnt schon in den Arbeitsabläufen vor den eigentlichen Versuchen begründet liegen (siehe 5.1.1.1).

5.1.2 Tierärztliche Praxis

Für die Desinfektionsmittelprüfung im Bereich tierärztliche Praxis wurden das Feline Coronavirus und das Murine Parvovirus als mögliches Prüfvirus ausgewählt. Da sich die zu desinfizierenden Oberflächen in der tierärztlichen Praxis erheblich von denen in der Tierhaltung unterscheiden, muss sich die Art des Keimträgers und die organische Belastung in der Prüfung nach diesen spezifischen Anforderungen richten (TRUYEN, 2011b).

Die Prüfung nach DIN EN 14675 erfolgt bei einer Temperatur von $10^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und je nach Anwendungsbedingung mit niedriger (3g/L bovines Albumin) bzw. hoher (10g/L bovines Albumin) Belastung. Die DVG-Richtlinie sieht eine Versuchstemperatur von $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ mit dem Einsatz von 40% antikörperfreiem bovinem Serum vor. Zusätzlich können in der europäischen Norm weitere Temperaturen (4°C , 20°C und 40°C) gewählt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Viruzidieprüfung im Bereich tierärztliche Praxis eine niedrige Belastung (3g/L bovines Albumin) ausgewählt. Die Versuche fanden auf Stahlkeimträgern bei einer Temperatur von $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ statt.

5.1.2.1 Murines Parvovirus

Das MPV wurde als mögliches Prüfvirus für die Viruzidieprüfung im Bereich tierärztliche Praxis ausgewählt. Es ist ein im Forschungsbereich weit verbreitetes Virus, mit hoher Stabilität aus der Familie der Parvoviren. Somit sind Rückschlüsse auf andere in der tierärztlichen Praxis häufiger vertretene Viren vergleichbarer Stabilität möglich.

In zwei vorangegangenen Studien von KARNATH (2011) und KÖHLER (2006) wurde bereits versucht die beiden häufigsten in der Veterinärmedizinischen Praxis vorkommenden Parvoviren, das canine Parvovirus und feline Panleukopenievirus, als Prüfviren zu etablieren. Beide zeigten Nachteile in der Aufbereitung und Auswertung. Als Manko beim caninen Parvovirus erwiesen sich der ungenügende Ausgangstiter und das zusätzliche Durchführen einer indirekten Immunfluoreszenz durch den fehlenden cpE. Beim feline Panleukopenievirus war die lange Beobachtungsdauer nachteilig.

Beim MPV zeigten sich nach 20-minütiger Trocknung auf Edelstahlkeimträgern im Exsikkator geringgradige Titerverluste von $0,2 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$. Die Kultivierung der für die Vermehrung des MPV notwendigen A9-Zellen war nicht unproblematisch. Die Zellen benötigten eine relative lange Erholungsphase nach der Kryokonservierung. Außerdem zeigte sich im Verlauf der Versuche, dass ausschließlich die frühen Passagen einen eindeutigen cpE zeigen konnten. Weiterhin als nachteilig erwies sich die mit bis zu 14 Tagen sehr lange Infizierungsphase von MPV, bedingt durch die sehr langsame Replikation des Virus. Nach 10-14 Tagen war eine eindeutige Unterscheidung zwischen cpE und natürlicherweise zugrunde gegangenen Zellen nicht mehr in jedem Fall möglich.

Diskussion

Da in der vorliegenden Arbeit ein Ausgangstiter von 6,8 - 7,0 $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ verwendet wurde, erfolgte die Bewertung der Titerreduktion um mindestens drei log-Stufen im Keimträgerversuch als vollständige Inaktivierung des Virus. In weiteren Versuchen könnte versucht werden durch eine optimierte Vermehrung des MPV und Ultrazentrifugation der Virussuspension die Virustiter zu verbessern und damit eine von den DVG-Richtlinien angedachte Titerreduktion um mindestens vier log-Stufen zu erreichen.

5.1.2.2 *Felines Coronavirus*

Das FCoV wurde als potentielles Prüfvirus ausgewählt, weil es sich um ein weltweit in Hauskatzenpopulationen vorkommendes Virus mit einer sehr hohen Seroprävalenz von 50-90% handelt. Mit einem dementsprechenden hohen Vorkommen in der Kleintierpraxis erscheint das Virus als ideales Referenzvirus für die Viruzidieprüfung im Bereich tierärztliche Praxis. Auch das Fehlen jeglichen zoonotischen Potentials und die einfache Handhabung der Zellkulturnachweissysteme sind von Vorteil für die Eignung als Prüfvirus. Nachteilig war die geringe Stabilität des Virus beim Auftauprozess. Um Titerverluste zu minimieren wurde ein mehrmaliges Auftauen und Einfrieren vermieden.

Nach 20-minütiger Trocknung auf Edelstahlkeimträgern im Exsikkator zeigten sich keine bis geringgradige Titerverluste von maximal 0,25 $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$. Die Kultivierung der für die Anzucht und Vermehrung von FCoV notwendigen CRFK-Zellen erwies sich als ausgesprochen anwenderfreundlich. Innerhalb kurzer Zeit erholten sich die Zellen von der Kryokonservierung, eine Auswertung des cpE war bis in hohe Passagen problemlos möglich. Der cpE war in jedem Falle charakteristisch und eindeutig nach 4 - 7 Tagen ablesbar. Ausgangstiter bis maximal 7,2 $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ führten, analog zu MPV, zur Bewertung einer Reduktion des Titers um minimal drei log-Stufen im Keimträgerversuch als vollständige Inaktivierung.

Zukünftig könnten durch intensive Bemühungen und Verbesserungen in den Arbeitsabläufen vor den eigentlichen Versuchen höhere Ausgangstiter erzielt werden und damit die von den DVG-Richtlinien gewünschte minimale Reduktion um vier log-Stufen zur vollständigen Inaktivierung erreicht werden.

5.2 Viruzide Wirksamkeit der Desinfektionsmittel

Mit Ausnahme von Ethanol führten alle im Keimträgerversuch geprüften Desinfektionswirkstoffe zu einer vollständigen Inaktivierung der Prüfviren. In den Ergebnissen wird die ausgesprochen hohe Widerstandsfähigkeit von MPV im Vergleich zu allen anderen getesteten Viren deutlich. Es musste stets, unabhängig von der Einwirkzeit, eine höhere Konzentration für eine vollständige Inaktivierung eingesetzt werden.

Diskussion

Starke Abweichungen in den Prüfergebnissen ergaben sich bei der Verwendung von Ethanol. Es zeigte sich, dass Ethanol in den geprüften Konzentrationen keine viruzide Wirkung gegenüber MPV hatte, wohl aber alle anderen getesteten Viren mit Konzentrationen von maximal 35% vollständig inaktivieren konnte. Wenngleich die schnelle und gute Wirkung der Alkohole im Allgemeinen von Vorteil ist (BÖHM & STRAUCH, 2002), so stellt doch die begrenzte Wirksamkeit auf einige Vertreter der unbehüllten Viren, wie den Parvoviren ein großes Problem dar. Einige Studien dokumentieren die geringe viruzide Wirkung des Ethanols gegenüber Parvoviren. So zeigt die Studie von KARNATH (2011) die hohe Resistenz des caninen Parvovirus gegenüber Ethanol. Auch die Arbeit von ENGELENBURG et al. (2002) kann die Stabilität des caninen Parvovirus gegenüber hochkonzentrierter Alkoholkonzentrationen bestätigen. Von ETERPI et al. (2009) wurde die Wirkung von 70%-igem Ethanol auf das porcine Parvovirus und das Minute Virus of Mice getestet und für ungenügend befunden. Der Einsatz von alkoholbasierten Desinfektionsmitteln beim Verdacht auf Kontamination mit Parvoviren muss daher immer kritisch betrachtet werden.

Glutaraldehyd zeigte eine vollständige Inaktivierung aller Viren bereits in niedrigen Konzentrationen. BVDV wurde bereits mit einer Konzentration von 0,01% bei einer Einwirkzeit von 30 min vollständig inaktiviert. Für MPV wurden die höchsten Konzentrationen mit 0,1% bei 5 min Einwirkzeit benötigt, um eine ausreichende Inaktivierung zu gewährleisten.

Auch Peressigsäure erwies sich als äußerst potentes Mittel. EAV und BVDV reagierten am stärksten auf die Wirkung von Peressigsäure, bereits eine Konzentration von 0,005% war in der Lage EAV nach 30 min Einwirkzeit vollständig zu inaktivieren. Für FCoV brauchte es immerhin die 10-fache Menge, für MPV noch höhere Konzentrationen von 0,25% um eine vollständige Inaktivierung zu erreichen. Die Verwendung von Konzentrationen ab 0,25% führte bei den für die Kultivierung von MPV genutzten A9-Zellen zu toxischen Veränderungen. Da an toxisch veränderten Zellen ein cpE nicht mehr ablesbar ist, war eine eindeutige Auswertung nicht mehr möglich.

Bei Natriumhypochlorit zeigte sich eine zeitunabhängige Inaktivierung aller Prüfviren, mit Ausnahme vom BVDV, welches schon bei einer Konzentration von 1% mit 30min Einwirkzeit bzw. 2% und 5min Einwirkzeit vollständig inaktiviert wurde. Eine ausreichende Wirkung gegen FCoV und EAV wurde mit einer Konzentration von 4%, bei MPV mit einer 5%-igen Konzentration erzielt.

Natronlauge inaktivierte BVD und EAV schon in Konzentrationen von 0,1% bei 30 min Einwirkzeit. Für FCoV waren immerhin 0,5% nötig. Für eine vollständige Inaktivierung von MPV war die höchste Konzentration von mindestens 1,5% bei 30min Einwirkzeit und 2,0% bei 5 min Einwirkzeit notwendig. Diese hohen Konzentrationen führten teilweise zu toxischen Reaktionen an den Zellen.

5.3 Zusammenfassende Betrachtung - Eignung als Prüfviren

5.3.1 Prüfviren für die Tierhaltung

Nach Auswertung der vorliegenden Ergebnisse ist eine Verwendung der beiden geprüften Viren für die Desinfektionsmittelprüfung im Bereich Tierhaltung nur eingeschränkt zu empfehlen.

Sowohl BVDV als auch EAV sind weit verbreitete Tierseuchenerreger ohne zoonotisches Potential. Die einfache Handhabung bei der Virusvermehrung und Kultivierung, die gute Ablesbarkeit des cpE, die schnell erreichten hohen Ausgangstiter sowie die ausreichende Stabilität gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln sprechen für eine Verwendung als Testvirus.

Die fehlende Stabilität gegen Einfrier- und Auftauprozesse, sowie die enormen Trocknungsverluste stehen der Nutzung als Prüfvirus im Wege. Die DVG-Richtlinien fordern für eine vollständige Inaktivierung eine Reduktion des Titers um mindestens vier log-Stufen. Um dies zu erreichen muss im Holzkeimträgerversuch ein Kontrolltiter von mehr als $7,1 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ vorliegen. Die starken Trocknungsverluste bedingen einen Ausgangstiter von mindestens $9,0 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$, um Kontrolltiter in dieser Höhe zu gewährleisten. Weder BVDV noch EAV konnten zu solch hohen Ausgangstitern vermehrt werden. Bei Beibehaltung des Trocknungsverfahrens von 60min bei 37°C im Brutschrank ist eine Nutzung der beiden Viren für die Desinfektionsmittelprüfung nach DVG-Richtlinien nicht möglich.

In einer weiteren Studie könnte versucht werden durch Optimierung der Versuchsabläufe höhere Ausgangstiter zu erzielen. Alternativ könnte darüber nachgedacht werden das Trocknungsverfahren zu ändern. Der Einsatz eines Exsikkators könnte die Trocknungszeit verkürzen und somit die Titerverluste der eingesetzten Prüfviren minimieren. Auch eine Herabsetzung der Trocknungstemperatur könnte einen positiven Effekt auf die Erhaltung der Infektiosität der Viren erzielen.

5.3.2 Prüfviren für die tierärztliche Praxis

In Anbetracht der erzielten Ergebnisse kann eine Aufnahme des FCoV in die zukünftigen Prüfrichtlinien der DVG für die Viruzidieprüfung im Bereich tierärztliche Praxis empfohlen werden.

FCoV ist ein wichtiges, in der Praxis häufig vorkommendes Virus der Katze. Es ist nicht humanpathogen und lässt sich unter Laborbedingungen leicht zu hohen Titern vermehren. FCoV zeigt einen ausgeprägten cpE, gleichzeitig erfüllt es die Forderungen nach einer ausreichend hohen Stabilität gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln. Dies sind optimale Voraussetzungen für die Eignung als Prüfvirus. Um der Forderung der DVG-Richtlinie nach einer minimalen Titerreduktion von vier log-Stufen für eine vollständige Inaktivierung nachzukommen, müssen für den Keimträgerversuch Kontrolltiter von mindestens $7,1 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ vorliegen. Als Ausgangstiter sollten Werte von $7,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ erreicht werden, um diese Kontrolltiter sicherstellen zu können.

Diskussion

MPV erfüllt zwar zum einen als Vertreter einer, für die tierärztliche Praxis bedeutsamen Erregerfamilien und zum anderen durch seine hohe Stabilität gegenüber Umwelteinflüssen und chemischen Desinfektionsmitteln zwei wichtige Anforderungen als Prüfvirus. Jedoch sprechen einige Faktoren gegen eine Aufnahme in die DVG-Richtlinie für die Viruzidieprüfung im Bereich tierärztliche Praxis.

Hauptsächlich ist hier die langsame Replikation und die damit verbundene lange Versuchszeit zu nennen. Die sich dadurch schwierig gestaltende Ablesung des cpE und die nicht einfache Handhabung der für die Kultivierung notwendigen Zellkulturnachweissysteme mit A9-Zellen sind weitere Faktoren, die eine Eignung als Prüfvirus behindern. Das Erzielen von ausreichend hohen Ausgangstitern kann sich als problematisch erweisen. Um die von den DVG-Richtlinien geforderte minimale Reduktion des Titers um vier log-Stufen zu erreichen, muss im Versuch ein Kontrolltiter von mindestens $7,1 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ mitgeführt werden und damit sollten Ausgangstitern von mindestens $7,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ vorliegen.

Auch nach Ausschöpfung aller zur Verbesserung des Nachweissystems zur Verfügung stehenden Mitteln ist MPV in Verbindung mit A9-Zellen ein schwierig zu handhabendes Prüfsystem. Aufgrund dessen ist die Aufnahme von MPV in die zukünftige DVG-Richtlinie zur Viruzidieprüfung im Bereich tierärztliche Praxis nicht empfehlenswert. Das bovine Parvovirus, welches bereits als Modellvirus in der gemeinsamen Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert-Koch-Instituts genutzt wird, könnte als Alternativvirus in Betracht gezogen werden.

5.4 Alternatives Nachweissystem für NDV

5.4.1 Newcastle-Disease-Virus

In vorangegangenen Studien von KÖHLER (2006) wurde bereits versucht ein Alternativvirus für NDV zu finden. Ursache hierfür war die aufwendige Vermehrung und Kultivierung im bis jetzt verwendeten Zellkulturnachweissystems. Hierbei wurde aus bebrüteten Hühnereiern Hühnerembryofibroblasten frisch gewonnen. Diese sind in der Handhabung sehr empfindlich und dienen zur Kultivierung und zum Nachweis von NDV. Die Empfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen und eine gewisse Inhomogenität der gewonnenen Zellen waren Ursache von fraglichen Bewertungen des cpE und damit einer nur geringen Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Vermehrung von NDV erfolgte in der Allantoisflüssigkeit von SPF-Hühnereiern.

Anstelle eines Alternativvirus wurde in dieser Studie ein alternatives Vermehrungs- und Zellkulturnachweissystem für NDV, Stamm Montana gesucht und mit dem bisherigen System auf seine Eignung für die Desinfektionsmittelprüfung verglichen.

Diskussion

Die im Vergleich verwendete permanente Zelllinie LMH ist zur Kultivierung und Vermehrung von NDV, Stamm Montana geeignet. Es wurde zum einen, gemäß den bisherigen Vorgaben der DVG, Virus in Allantoisflüssigkeit vermehrt (NDV (All)). Zum anderen erfolgte die Vermehrung in der permanenten Zelllinie LMH (NDV (ZK)). Beide Virussuspensionen wurden für die weiteren Versuche in der permanenten Zelllinie LMH kultiviert und bearbeitet.

Wichtig war nachzuweisen, ob ein Unterschied zwischen beiden Nachweisverfahren hinsichtlich der Desinfektionsmittelwirkung vorliegt. Da der Verdacht nahe lag, dass das in der Allantoisflüssigkeit vermehrte NDV (All) einen deutlich höheren Eiweißgehalt aufweist, wurden parallel zu den Versuchen in beiden Virussuspensionen die Eiweißkonzentrationen gemessen. Die Ergebnisse wurden verglichen und in Relation zueinander gesetzt.

5.4.2 Vergleich der Eiweißgehalte von NDV (All) und NDV (ZK)

Eiweißgehalte wurden für NDV (All) und NDV (ZK) in je drei Verdünnungsstufen getestet. Die Differenz zwischen NDV (All) und NDV (ZK) wurde mit steigender Verdünnung immer größer. So war bei einer 1:10 fachen Verdünnung der Eiweißgehalt in NDV (All) über dreimal so hoch wie in NDV (ZK).

Die Prüfung der Eiweißgehalte bestätigt den bereits vermuteten höheren Anteil an Eiweißen von NDV (All). Vor allem bei der Verwendung und Prüfung von Desinfektionsmitteln, die einen Eiweißfehler aufweisen können, gestaltet sich die Nutzung von NDV (All) schwierig. Zu diesen Desinfektionsmitteln gehören unter anderem folgende in der vorliegenden Arbeit geprüfte Substanzen Glutaraldehyd und Peressigsäure.

Die Eiweiße wirken als "Schutzmantel" für die Viren. Die Desinfektionsmittel reagieren mit den Eiweißen und verbrauchen sich. Für das von Eiweißen umhüllte Virus steht unter Umständen nicht mehr genügend freier Desinfektionsmittelwirkstoff zur Verfügung. Bedingt durch diesen Schutz den die Eiweiße dem Virus bieten, kann es zu falschen Ergebnissen kommen. Dies sollte in der bevorstehenden Erweiterung der "Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln" der DVG berücksichtigt werden.

5.4.3 Vergleich der Trocknungsverluste von NDV (All) und NDV (ZK)

Nach 60-minütiger Trocknung auf Holzkeimträgern, in einem Brutschrank bei 37°C, zeigte sowohl NDV (All) als auch NDV (ZK) erhebliche Trocknungsverluste. Anhand der Ergebnisse der Trocknungsversuche ist davon auszugehen, dass die Art der Virusanzucht keinen Einfluss auf die Stabilität des Virus im Trocknungsversuch hat. Bei beiden Varianten waren Titerverluste zwischen 1,3 und 1,6 $\log_{10}KID_{50}/ml$ vorhanden.

Im Hinblick auf die Stabilität der Viren ist anzunehmen, dass es durch das Trocknungsverfahren zu einer erheblichen Beeinflussung des Versuchsablaufes, mit negativem Einfluss auf die Infektiösität

Diskussion

der Prüfviren kommt. Die erhebliche Reduktion des Ausgangstiters führt zu Problemen in der Auswertung der nachfolgenden Versuche. Um die Ergebnisse der Keimträgerversuche gemäß den DVG-Richtlinien bewerten zu können, sind sehr hohe Ausgangstiters notwendig. Die Richtlinien fordern eine minimale Reduktion des Titer um vier log-Stufen um eine vollständige Inaktivierung erreichen zu können. Für beide Virusvarianten wurde eine Titerreduktion um mindestens $3 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ als vollständige Inaktivierung angenommen.

Der Einsatz von höheren Ausgangstitern vor der Trocknung könnte zu einer besseren Auswertbarkeit der finalen Ergebnisse führen. Möglichkeiten zur Erhöhung des Ausgangstiters sind eine Verbesserung der Virusanzucht, Virusaufbereitung und Bearbeitung der Zellkultur. Ebenfalls könnte durch Ultrazentrifugation versucht werden, den Ausgangstiter zu erhöhen. Als weitere Fehlerquelle, die zu einer nachteiligen Beeinflussung des Ausgangstiters geführt haben kann, ist die Instabilität des Virus beim Auftau- und Einfrierprozess zu nennen.

5.4.4 Vergleich der Desinfektionsmittelwirkung auf NDV (All) und NDV (ZK)

Im nachfolgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Desinfektionsmittelprüfung im Holzkeimträgerversuch von NDV (All) und NDV (ZK) miteinander verglichen und diskutiert.

Ziel der Untersuchung war es herauszufinden, ob sich das alternative Vermehrungs- und Zellkulturnachweissystem für die Desinfektionsmittelprüfung eignet. Hierfür wurden zwei verschiedene Desinfektionsmittel getestet: Glutaraldehyd und Peressigsäure. Beide wurden mit dem aktuellen Prüfvirus NDV (All) und dem Alternativvirus NDV (ZK) getestet. Vergleichend sollte geprüft werden, welche Konzentration notwendig ist um beide Viren vollständig zu inaktivieren. In diesem Zusammenhang sollte gezeigt werden, ob die höheren Eiweißgehalte von NDV (All) zu einer Erhöhung der Konzentration der Desinfektionsmittel für eine ausreichende Wirkung führen. Dafür wurden für die Praxis relevante Einwirkzeiten von 5 und 30 Minuten angenommen. Die Versuche fanden bei einer Temperatur von 20°C statt. Aufgrund der hohen Titerverluste im Trocknungsvorgang wird für die vollständige Inaktivierung eine Titerreduktion von mindestens $3 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ angenommen.

Glutaraldehyd

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass Glutaraldehyd sowohl für NDV (All) als auch für NDV (ZK) ein potentes Desinfektionsmittel darstellt. Wobei für NDV (ZK) deutlich geringere Konzentrationen für eine vollständige Inaktivierung nötig waren. Dies konnte bei 5 wie auch bei 30min Einwirkzeit beobachtet werden. Dieses Ergebnis belegt, den bereits im Versuch zur Bestimmung der Eiweißgehalte vermuteten Einfluss der Eiweiße auf die Desinfektionsmittelwirkung.

Peressigsäure

Peressigsäure stellt für beide, NDV (All) und NDV (ZK) ein geeignetes Desinfektionsmittel dar. Auch in diesen Versuchen zeigte sich eine geringere Empfindlichkeit von NDV (All) gegenüber dem Desinfektionsmittel. So wurde bei 30 minütiger Einwirkzeit für die vollständige Inaktivierung von NDV (All) eine 0,05%-ige Lösung benötigt. Für NDV (ZK) war eine 0,025%-ige Lösung für das gleiche Ergebnis ausreichend. Lediglich bei einer Einwirkzeit von 5 Minuten wurde für NDV (All) und NDV (ZK) die gleiche Konzentration von 0,1% für eine vollständige Inaktivierung ermittelt. Auch diese Ergebnis bestätigt die Resultate der vorangegangenen Versuche.

5.4.5 Eignung von NDV (ZK) als Prüfvirus

Das Ziel der Untersuchungen war es, eine Möglichkeit zu finden, NDV weiterhin als Prüfvirus zu nutzen. Bei den Vorarbeiten zu den Versuchen stellte sich heraus, dass NDV (ZK) zwar theoretisch deutlich einfacher in der Virusvermehrung ist, praktisch zeigten sich aber deutliche Schwierigkeiten. Das Anzuchtssystem erschien sehr instabil. Zeitweise entstanden Wartezeiten von bis zu sechs Wochen in denen kaum Wachstum in den Zellkulturen sichtbar wurde. Im Versuch selbst machten die hohen Trocknungsverluste Probleme. Es mussten sehr hohe Ausgangstitern erreicht werden um dies zu kompensieren. Für eine vollständige Inaktivierung fordern die DVG-Richtlinien eine Reduktion des Titers um mindestens vier log-Stufen. Um dies zu erreichen muss im Versuch ein Kontrolltiter von mehr als $7,1 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ mitgeführt werden. Die starken Trocknungsverluste bedingen einen Ausgangstiter von mindestens $8,8 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ um Kontrolltiter in dieser Höhe zu gewährleisten. Im Zuge dieser Arbeit gelang es weder für NDV (All) noch für NDV (ZK) solch hohe Ausgangstitern zu erzielen.

Ein ausschlaggebendes Kriterium für NDV (ZK) als Prüfvirus war der deutlich geringere Eiweißfehler von NDV (ZK) im Vergleich zu NDV (All). Dies konnte in den Versuchen bestätigt werden. Auch eine, mit dem Eiweißfehler einhergehende scheinbare höhere Widerstandskraft von NDV (All) gegen die angewendeten Desinfektionsmittel konnte nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Desinfektionsmittelprüfung mit NDV (All) sollten deshalb kritisch betrachtet werden. Vor allem beim Einsatz von Desinfektionsmitteln mit eventuellen Eiweißfehlern müssen höhere Konzentrationen für eine vollständige Inaktivierung eingesetzt werden.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass NDV (ZK) aufgrund des geringeren Eiweißfehlers für die Desinfektionsmittelprüfung besser geeignet ist als NDV (All). Allerdings gestaltet sich eine routinemäßige Nutzung von NDV (ZK) als DVG-Prüfvirus eher schwierig. Mit den bereits in den Vorbereitungsarbeiten auftretenden Problemen in der Zellkultur und den großen Trocknungsverlusten im Versuch lässt sich kein nennenswerter Vorteil in Handhabung und Durchführung gegenüber NDV (All) herausstellen.

Diskussion

Um NDV (ZK) doch als DVG-Prüfvirus standardmäßig nutzen zu können, müsste in weiteren Versuchen eine Verbesserung des Ausgangstiters angestrebt werden. Wichtiger ist es jedoch eine Möglichkeit zu finden das genutzte Zellkulturverfahren zu optimieren, oder eine alternative, verlässliche und einfache Methode zu finden, NDV zu vermehren. Ein Ansatz für weitere Versuche könnte die Arbeit von ARIFIN et al. (2010) sein. Er arbeitet mit NDV vermehrt in VERO-Zellen. Gelingt die Optimierung der Zellkultur stellt dies einen herausragenden Vorteil gegenüber NDV (All) dar.

Parallel dazu sollte die Trocknungsmethode für die Holzkeimträgerversuche nochmals überdacht werden. Sowohl NDV (All) als auch NDV (ZK) zeigten hier starke Verluste. Eine verkürzte Trocknungszeit durch Nutzung eines Exsikkators und die Absenkung der Trocknungstemperatur von bisher 37°C sollten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6 Zusammenfassung

Franziska Schmidt

Etablierung neuer Richtlinien für die Desinfektionsmittelprüfung im Bereich Tierhaltung sowie für die tierärztliche Praxis

Aus dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im Mai 2014

83 Seiten, 56 Tabellen, 30 Abbildungen, 109 Literaturstellen, Anhang

Schlüsselwörter: Bovines Virusdiarrhoe-Virus, DVG, CEN, Desinfektionsmittelprüfung, Murines Parvovirus, Felines Coronavirus, Newcastle-Disease-Virus, Equines Arteritis-Virus

Desinfektionsmittel sind ein elementarer Bestandteil der Tierseuchenbekämpfung und damit auch der Lebensmittelsicherheit. Die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel ist Voraussetzung für deren zuverlässige Wirksamkeit und zielgerichteten Einsatz. In Deutschland geschieht dies nach den Richtlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG). Seit der ersten Fassung sind die Richtlinien einem ständigen Anpassungsprozess unterworfen. Im Zuge der europäischen Harmonisierung gilt es nun, sich gesamteuropäischen Richtlinien, verfasst durch das europäische Komitee für Normung (Comité Européen de Normalisation) (CEN) anzupassen. Das Thema dieser Arbeit entwickelte sich im Kontext der derzeitigen Diskussion über Verbesserungsvorschläge zu den bestehenden Richtlinien und deren Anpassung an die europäischen Normen. Es wurden je zwei Testviren für die Bereiche Tierhaltung und tierärztliche Praxis ausgewählt, um sie auf Eignung für die Viruzidieprüfung zu testen und gegebenenfalls zu etablieren. Des Weiteren wurde in einem zweiten Teil, in Anlehnung an die Forderungen der europäischen Normen die Prüfung zu vereinfachen, ein alternatives Zellkulturnachweissystem für das Newcastle-Disease-Virus (NDV) geprüft.

Die Prüfung der viruziden Wirksamkeit erfolgte mit fünf verschiedenen Grundsubstanzen, gewählt um ein möglichst breites Spektrum an Desinfektionsmittelwirkstoffen abzudecken. Es wurden Glutaraldehyd, Ethanol, Natronlauge, Natriumhypochlorit und Peressigsäure verwendet. Die Versuche wurden mit einer niedrigen Eiweißbelastung und bei einer Temperatur von 20°C

Zusammenfassung

durchgeführt. Um eine praxisnahe Situation zu simulieren wurde auf, bereits in den DVG-Richtlinien, verankerten Stahl- und Holzkeimträgertests zurückgegriffen.

Als mögliche Prüfviren für die Tierhaltung wurden das Equine Arteritis-Virus (EAV) und das Bovine Virus Diarrhoe Virus verwendet. Bei beiden Viren handelt es sich um weit verbreitete Tierseuchenerreger mit einer großen epidemiologischen Bedeutung. Die Untersuchung von fünf verschiedenen Desinfektionsmitteln erfolgte im Keimträgertest auf Holz. Sowohl EAV als auch BVD stellen ein weniger geeignetes Prüfvirus dar, da beide Viren enorme Titerverluste im Trocknungsvorgang der Holzkeimträger zeigten. Die Viren ließen sich zwar leicht vermehren, aber die erzielten Ausgangstitel reichten nicht aus um die Trocknungsverluste zu kompensieren und aussagekräftige Ergebnisse zu produzieren.

Für den Bereich tierärztliche Praxis wurden das Feline Coronavirus (FCoV) und das Murine Parvovirus (MPV) genutzt. FCoV ist ein weltweit in Hauskatzenpopulationen vorkommendes Virus mit einer hohen Seroprävalenz und wurde daher ausgewählt. MPV wurde als Stellvertreter für die, in der Praxis häufig vorkommenden Parvovirusinfektionen gewählt. Es schien ein ideales Modellvirus aufgrund seiner weiten Verbreitung in der Forschung zu sein. Bei beiden Viren erfolgte die Prüfung auf Stahlkeimträgern. Unter Laborbedingungen konnte FCoV ohne Probleme zu hohen Titern vermehrt werden. Es gab keine nennenswerten Trocknungsverluste. FCoV erwies sich als geeignetes Prüfvirus. MPV hingegen ist bedingt durch die langen Versuchszeiten und schwierig auszuwertenden Zellkulturen, sowie wegen der niedrigen Ausgangstitel weniger geeignet als Modellvirus für die Desinfektionsmittelprüfung.

Die Anzucht von NDV in Allantoisflüssigkeit von SPF Hühnereiern erschien sehr aufwendig und mit hohem Eiweißfehler belastet. In den Versuchen konnte ein deutlich höherer Eiweißgehalt als in den vergleichend geprüften, in Zellkultur angezogenen Viren nachgewiesen werden. Infolge der Probleme mit der Kultivierung der LMH-Zelllinie und den damit verbundenen langen Wartezeiten bis zur eigentlichen Versuchsdurchführung kann nur eine teilweise Empfehlung, von auf Zellkultur vermehrtem NDV (NDV (ZK)) gegeben werden. Nach Behebung dieser Probleme ist durchaus eine Ablösung, von in Allantoisflüssigkeit angezüchtetem NDV durch NDV (ZK) zu empfehlen. Die Verfälschung der Ergebnisse durch die höheren Eiweißgehalte bei Desinfektionsmitteln mit deutlichem Eiweißfehler könnten so vermieden werden.

Summary

7 Summary

Franziska Schmidt

Establishing new guidelines for disinfectant testing in animal husbandry and veterinary office.

Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health
Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in May 2014

83 pages, 56 tables, 30 figures, 109 references, appendix

keywords: bovine viral diarrhoea virus, BVD, CEN, disinfectant testing, murine parvovirus, feline coronavirus, newcastle disease virus, equine arteritis virus

Disinfectants are a basic part of control of animal diseases and food safety. Prerequisite for reliable effects and targeted use is the testing of disinfectants. In Germany, this occurs according to the guidelines of German Veterinary Medical Society (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., DVG) and the first version of the guidelines from 1974 has been adapted constantly. In the course of European harmonization the guidelines are supposed to conform with European-wide standard procedures issued by the European Committee for Standardisation (Comité Européen de Normalisation, CEN). The issue of this paper was developed in context to the current discussion about ideas for improving guidelines and to adjust them to the European standards. For each testing field in animal husbandry and veterinary practice two viruses were chosen. They were checked for their usability and the establishment of disinfection testing. Furthermore a second part examines an alternative cell culture system for detecting newcastle disease virus (NDV) which are in accordance to the requirements of European standards for simplifying the inspection. The testing of virucidal effectiveness was done with five different biocidal agents selected to expose a wide range of disinfectant agents. Glutaraldehyde, ethanol, sodium hydroxide, sodium hypochlorite and peracetic acid were used. The experiments were performed with a low protein content and at a temperature of 20°C. To simulate a realistic situation already enriched steel and wooden germ carrier tests, which are in accordance with DVG guidelines, have been chosen.

As test viruses for animal husbandry, the Equine Arteritis Virus (EAV) and Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVD) were used. Both viruses are widespread infectious diseases with a large epidemiological significance. The investigation of five different disinfectants was done on wooden germ carriers as well. Both, EAV and BVD, are less suitable test viruses and both viruses showed

Summary

enormous loss of titer during drying the wood germ carriers. The virus was easy to multiply, but the achieved starting titer were not sufficient to compensate the loss of drying and to produce meaningful results.

Feline coronavirus (FCoV) and Murine parvovirus (MPV) were used for the field of veterinary practice. FCoV is a worldwide occurring virus with a high seroprevalence, detected in domestic cat populations. MPV was used as a surrogate for, in practice, frequently occurring infections with parvoviruses. It seems to be an ideal model virus because of the wide occurrence in research. Both viruses were tested on germ steel carriers. Under laboratory conditions, FCoV were multiplied to high titers without problems. No significant drying losses were observed and proved FCoV to be a suitable test virus. In contrast to that MPV is, due to the long experimental duration, the difficulties in evaluating cell cultures and low starting titers, less qualified for disinfectant testing.

Cultivation of NDV in allantoic fluid seemed to be very complicated and shows a high protein error. In experiments, a lower protein content in cell culture dressed virus was detected. Due to the problems of culturing LMH cells and the associated waiting periods towards the actual experimental procedure, only a partial recommendation for NDV increased in cell culture (NDV (ZK)) can be given. After correcting these problems a detachment of in allantoic fluid cultured NDV by NDV (ZK) is recommended. Distorted results by higher protein levels of disinfectants with protein effect can be avoided.

8 Literaturverzeichnis

Addie D, Belák S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hartmann K, Hosie MJ, Lloret A, Lutz H, Marsilio F, Pennisi MG, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. Feline infectious peritonitis ABCD guidelines on prevention and management. *J. Feline Med. Surg.* 2009; (11):594–604.

Al-Khleif A, Baljer G, Herbst W. Examination of biocides for their effectiveness against animal viruses according to European Union Standards with emphasis on the selection of a suitable test virus. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2009; 122(1/2):58–62.

Anonym. Hintergrundinformation zu Desinfektionsmitteln. Kontrollstelle für Chemie- und Biosicherheit, Bern 2001.

Anonym. Kodex GVP - Gute Veterinärmedizinische Praxis. Bundesverband praktizierender Tierärzte e.V.; 2004a.

Anonym. Prüfung und Deklaration der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*; 2004b.

Anonym. Anforderungen an die Hygiene bei der Reinigung und Desinfektion von Flächen. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*; 2004c.

Anonym. Best practice guidelines on emergency surgical care in disaster situations. WHO Weltgesundheitsorganisation; 2005a.

Anonym. DIN EN 14675: Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1). European Committee for Standardization (CEN); 2005b.

Anonym. Desinfektionsmittel und -verfahren. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*; 2007.

Anonym. Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. 4. Aufl., Gießen 2008.

Anonym. Mouse Parvoviruses (MPV-1, MPV-2, MPV-3, MNM). Charles River Laboratories International Inc.; 2009a.

Anonym. What is Newcastle Disease? OIE World Organisation of Animal Health; Paris 2009b.

Anonym. Zur Bedeutung von Zertifizierung und Listung geeigneter Präparate zur chemischen Desinfektion im Tierhaltungs- und Lebensmittelbereich. Gemeinsame Stellungnahme von Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG), Verbund für Angewandte Hygiene (VAH), Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) und Friedrich-Löffler-Institut (FLI). *Deutsches Tierärzteblatt.* 2010; (5):654–655.

Anonym. Hygiene in der Tierarztpraxis. Schülke&Mayr; Norderstedt 2011.

Anonym. Newcastle Disease. Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; Wardenburg 2013.

Arifin MA, Mel M, Abdul Karim MI, Ideris A. Production of Newcastle Disease Virus by vero cells grown on cytodex 1 microcarriers in a 2-Litre stirred tank bioreactor. *J Biomed. Biotechnol.* 2010; 1–8.

Arndt J. Desinfektion und Sterilisation in der tierärztlichen Praxis. *Prakt Tierarzt.* 1983; (5):395–400.

Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats and rabbits and their effects on research. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11(2):231–266.

Literaturverzeichnis

- Bank WB, Spies D, Lemmermeyer T. Identifizierung von Virulenzfaktoren des feline Coronavirus (FCoV); Gießen 2006.
- Besselsen DG, Romero MJ, Wagner AM, Henderson KS, Livingston RS. Identification of novel murine parvovirus strains by epidemiological analysis of naturally infected mice. *J. Gen. Virol.* 2006; 87: 1543-1556.
- Bisping W, Kirpal G. Untersuchungen zur Prüfmethode von Desinfektionsmitteln. 1. Mitt.: Die bakteriellen Testkeime. *Arch. Lebensmittelhyg.* 1973;157–159.
- Bisping W, Kirpal G. Untersuchungen zur Prüfungsmethode von Desinfektionsmitteln. 2. Mitt.: Keimträger und Keimträgerverfahren. *Arch. Lebensmittelhyg.* 1974; (4):84–87.
- Böhm R. Die Entwicklung der DVG-Prüfrichtlinien - Historie und Zukunft. DVG Themenheft: "Desinfektion". Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.; Gießen 2011; 34-36.
- Böhm R, Strauch D. Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft. Enke 2. Aufl., Stuttgart 2002.
- Borneff J, Werner HP, Van de Voorde H, Reybrouck G. Kritische Beurteilung der Prüfmethode für chemische Desinfektionsmittel und -verfahren. *Critical assessment of methods for testing chemical disinfectants and disinfection procedures. Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene B.* 1975; (160):590–600.
- Denyer S, Stewart G. Mechanisms of action of disinfectants. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 1998; (41):261–268.
- Edelmeyer H. Über Eigenschaften, Wirkmechanismen und Wirkungen chemischer Desinfektionsmittel. *Arch. Lebensmittelhyg.* 1982; 33(1):1–10.
- Eggensperger H. Desinfektionswirkstoffe und ihre Wirkungsmechanismen. *Dtsch Apoth Ztg.* 1973; 113(21):785–790.
- Engelenburg F, Terpstra F, Schuitemaker H, Moorer W. The virucidal spectrum of a high concentration alcohol mixture. *J. Hosp. Infect.* 2002; 51:121–125.
- Eterpi M, McDonnell G, Thomas V. Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J. Hosp. Infect.* 2009; (73):64–70.
- Filipovska-Naumovska E, Abubakar SM, Thompson MJ, Hopwood D, Pass DA, Wilcox GE. Serologic prevalence of MPV1 in mouse strains in a commercial laboratory mouse colony determined by using VP1 antigen. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2010; 49(4):437–442.
- Gabriel H, Brill F. Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel im Lebensmittel- und Veterinärbereich nach Europäischen Normen (EN). DVG Themenheft: "Desinfektion". Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.; Gießen 2011; 49–51.
- Groettrup M. Sterilisation und Desinfektion. Chair of Immunology, Universität Konstanz 2007.
- Gröschel D. Allgemeine Anforderungen an Desinfektionsmittel und an die Desinfektion aus der Sicht des Komitees für Mikrobiologische Maßstäbe der Desinfektion in Krankenhäusern der American Society for Microbiology. *Zentralbl Bakteriologie Mikrobiologie Hygiene B.* 1973; 514–516.
- Hahn W. Desinfektionsmittel - Wirkungsweise, Wirkungsspektren und toxikologische Aspekte. *Disinfectants - mode of action, ranges of action and toxicological aspects. Hyg Med.* 1981; (6): 458–475.
- Holz W. Disinfection with surface active substances in experiments with the Newcastle disease virus. *Z Hyg Infektionskr.* 1958; 144(4): 372–388.
- Kaaden OR, Mayr R. Viruskrankheiten der Tiere. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke 8. Aufl., Stuttgart 2006; 136-344.

Literaturverzeichnis

- Karnath C. Etablierung eines Keimträgermodells zur Prüfung der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln. [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2011.
- Kirchhoff H. Effect of quaternary ammonium compounds on the Newcastle disease virus and parainfluenza virus. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1968; (7): 160–165.
- Kliewe H, Heicken K, Schmidt B, Wagener K, Wüstenberg J, Ostertag H, Grün L, Lammers T, Mühlens K. Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel. Int. J. Med. Microbiol. Stuttgart 1958.
- Köhler C. Untersuchungen zur Änderung der DVG-Desinfektionsmittelrichtlinien. (Viruzidie). [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2006.
- König P. Equine Virale Arteritis. Friedrich-Löffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit; Riems 2010.
- Kuwert E, Thraenhard O. Theoretical, methodological and practical problems of virus disinfection in human medicine. Immun Infekt. 1977; 5(4): 125–137.
- Lage A, Beckert I, Niemann F. DLG-Merkblatt 364: Hygienetechnik und Managementhinweise zur Reinigung und Desinfektion von Stallanlagen. Deutsche Landwirtschafts Gesellschaft e.V.; Frankfurt/Main 2010.
- Liebermann H. Lehrbuch der veterinärmedizinischen Virologie. G. Fischer. Jena 1992.
- Liess B, Haas L, Moening V. Virusinfektionen bei Haus- und Nutztieren. Schlütersche 3. Aufl., Hannover 2010.
- Mahnel H. Desinfektion von Viren. Zbl. Vet. Med. Reihe B. 1983; 30:81 - 96.
- Mayr A. Hygienemaßnahmen. Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke 8. Aufl., Stuttgart 2006; 52-57
- Mehlhorn G. Lehrbuch der Tierhygiene. Teil 1. VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1. Aufl., Jena 1979.
- Modrow S, Falke D, Schätzl H, Truyen U. Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag 3. Aufl., Heidelberg 2010.
- Müller H. Coronaviren und das „Severe Acute Respiratory Syndrome“ (SARS). Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft; Gießen 2010.
- Müller W, Schlenker G. Kompendium der Tierhygiene. Gesundheits-, Tier-, Umwelt- und Verbraucherschutz. Lehmanns Media 4. Aufl., Berlin 2011.
- Rabenau HF, Schwebke I. Wirkmechanismus von Viren. Medizinische Virologie. Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen. Thieme 2. Aufl., Stuttgart 2010; 173-175.
- Reiner G. Porzines Reproduktives und Respiratorisches Syndrom (PRRS). Klinik für Wiederkäuer und Schweine der Justus Liebig Universität Gießen; Gießen 2008.
- Reuss U. Untersuchungen über die Methodik einer Desinfektionsmittelprüfung am Virus der atypischen Geflügelpest. Berl Munch Tierarztl Wschr. 1957; 70: 293–295.
- Rheinbaben F, Wolff MH. Handbuch der viruswirksamen Desinfektion. Springer Verlag 1. Aufl., Berlin 2002.
- Rovid Spickler A. Equine Viral Arteritis. The Center for Food Security and Public Health, Iowa 2009.
- Schirrmeier H, Strebelow G. BVD-Pflichtbekämpfung - wie ist die epidemiologische Situation in Deutschland. Friedrich-Loeffler-Institut; Riems 2012.
- Schliesser T. Tierarzt und Desinfektion. Tierarztl Umsch 1975; 30(7): 319–324.

Literaturverzeichnis

- Schmerold I. Desinfektionsmittel. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. MVS Medizinverlage Stuttgart 3.Aufl., Stuttgart 2010. 527ff.
- Spackman E. Avian influenza virus. Humana Press, Totowa NJ 2008.
- Steiger A. Desinfektion. Tierärztliche Praxis. VEB Gustav Fischer Verlag Jena 1. Aufl., Jena 1986.
- Stellmacher W, Schwebs M. Carrier tests for disinfection against Newcastle disease virus. Monatsh Veterinarmed. 1970; 25(10): 381–385.
- Steuer W, Schubert F. Leitfaden der Desinfektion, Sterilisation und Entwesung. Behr 8. Aufl., Hamburg 2007.
- Thein P. Zur Arteritis-Infektion des Pferdes: Aktuelle Probleme. Die equine Virus Arteritis (EVA) gehört zu den Infektionskrankheiten des Pferdes, die besondere Probleme in der Zucht verursachen. Prakt Tierarzt. 2007; 88(11).
- Thiel N. Bedeutung des Milieus bei der Stalldesinfektion. Prakt Tierarzt. 1978; (11): 850–862.
- Truyen U. Viruzidieprüfung für die Tierhaltung. DVG Themenheft: "Desinfektion". Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.; Gießen 2011a; 54-55
- Truyen U. Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln für die Tierärztliche Praxis, Tierheime & Tierpensionen. DVG Themenheft: "Desinfektion". Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V.; Gießen 2011b; 58.
- Unshelm J, Methling W. Umwelt- und tiergerechte Haltung von Nutz-, Heim- und Begleittieren. Parey Verlag, Berlin 2002.169ff.
- Wegmüller M. BVD-Info. Institut für Veterinär-Virologie, Vetsuisse Fakultät der Universität Bern; Bern 2006.
- Weiss M, Hertig C, Strassen M, Vogt HR, Peterhans E. Bovine Virusdiarrhoe / Mucosal Disease: eine Übersicht. Schweiz. Arch. Tierheilkd. Bern 1992.
- Wrzesinski C. Autonome Parvoviren. Entwicklung einer zweiten Generation von Vektoren für die Tumor-Gentherapie und Untersuchung des Einflusses der Infektion auf die zelluläre Genexpression. [Dissertation med. vet]. München: Ludwig-Maximilian-Univ. München; 2002.
- Yilmaz M, Wöckener A, Müller E. Gesetzliche Vorschriften zur Untersuchung auf equine Virusarteritis beim Pferd. Pferdespiegel. 2011; 164–167.

Anhang

Tabelle 43: Eiweißgehalte (in µg/ml) von NDV (AII) und NDV (ZK)

Verdünnung	NDV (AII)	NDV (ZK)
pur	6	3,6
pur	6	3,6
1:3	4,7	1,6
1:3	4,5	1,6
1:10	1,9	0,6
1:10	1,9	0,6

Tabelle 44: Toxizität von Glutaraldehyd

Glutaraldehyd		Zellkultur									
Konzentration in %	Verdünnungsstufe	CRFK	A9	MDBK	VERO	LMH					
0,05	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	10 ⁻²	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,75	10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+		
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0	10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+		
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung: - nicht toxisch + toxisch

Tabelle 45: Toxizität von Ethanol

Ethanol		Zellkultur									
Konzentration in %	Verdünnungsstufe	CRFK	A9	MDBK	VERO	LMH					
55	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anhang

Ethanol		Zellkultur									
Konzentration in %	Verdünnungsstufe	CRFK	A9	MDBK	VERO	LMH					
65	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
70	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
75	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung:- nicht toxisch + toxisch

Tabelle 46: Toxizität von Peressigsäure

Peressigsäure		Zellkultur									
Konzentration in %	Verdünnungsstufe	CRFK	A9	MDBK	VERO	LMH					
0,01	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,05	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1	10 ⁻²	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+		
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-		
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-		
0,75	10 ⁻²	+	+	+	+	+	+	+	+		
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-		
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-		

Zeichenerklärung:- nicht toxisch + toxisch

Tabelle 47: Toxizität von Natronlauge

Natronlauge		Zellkultur									
Konzentration in %	Verdünnungsstufe	CRFK	A9	MDBK	VERO	LMH					
0,05	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Anhang

Natronlauge		Zellkultur									
Konzentration in %	Verdünnungsstufe	CRFK	A9	MDBK	VERO	LMH					
0,1	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,25	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,75	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,5	10 ⁻²	/	/	-	-	/	/	/	/	/	/
	10 ⁻³	/	/	-	-	/	/	/	/	/	/
	10 ⁻⁴	/	/	-	-	/	/	/	/	/	/
2,0	10 ⁻²	/	/	+	+	/	/	/	/	/	/
	10 ⁻³	/	/	-	-	/	/	/	/	/	/
	10 ⁻⁴	/	/	-	-	/	/	/	/	/	/

Zeichenerklärung:- nicht toxisch + toxisch / nicht untersucht

Tabelle 48: Toxizität von Natriumhypochlorit

Natriumhypochlorit		Zellkultur									
Konzentration in %	Verdünnungsstufe	CRFK	A9	MDBK	VERO	LMH					
0,75	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,5	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,0	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2,5	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3,0	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Natriumhypochlorit		Zellkultur							
Konzentration in %	Verdünnungsstufe	CRFK	A9	MDBK	VERO	LMH			
3,5	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-
4,0	10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-
4,5	10 ⁻²	/	/	-	-	/	/	/	/
	10 ⁻³	/	/	-	-	/	/	/	/
	10 ⁻⁴	/	/	-	-	/	/	/	/
5,0	10 ⁻²	/	/	-	-	/	/	/	/
	10 ⁻³	/	/	-	-	/	/	/	/
	10 ⁻⁴	/	/	-	-	/	/	/	/

Zeichenerklärung:- nicht toxisch + toxisch / nicht untersucht

Tabelle 49: Behandlungsprüfung aller verwendeten Zelllinien mit Glutaraldehyd, Ethanol, Peressigsäure, Natronlauge und Natriumhypochlorit

Desinfektionsmittel		Zellkultur							
Mittel	Konzentration in %	CRFK	A9	MDBK	VERO	LMH			
Glutaraldehyd	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	50	-	-	-	-	-	-	-	-
Peressigsäure	0,005	-	-	-	-	-	-	-	-
Natronlauge	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Natriumhypochlorit	2	-	-	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung: - keine Veränderung des Infektiositätstiter

Tabelle 50: Inaktivierungs-Bezugsprüfung aller untersuchter Viren in den jeweiligen Zellkulturlinien

Formalin	Virus									
	Verdünnungsstufe	FCoV	MPV	BVDV	EAV	NDV				
10 ⁻²	t	t	t	t	t	t	t	t	t	t
10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung: t zytotoxisch für die jeweilige Zelllinie - vollständige Inaktivierung

Anhang

Tabelle 51: Stahlkeimträger - Einfluss der Trocknung auf die Stabilität der Viren

Virus	Ausgangstiter (log ₁₀ KID ₅₀ /ml)	Endtiter (log ₁₀ KID ₅₀ /ml)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml)
MPV	6,8	6,6	0,2
	6,8	6,6	0,2
FCoV	5,5	5,25	0,25
	5,5	5,5	0

Trocknungszeit: 20min, Trocknungstemperatur: 20°C, Belastung: niedrig

Tabelle 52: Holzkeimträger - Einfluss der Trocknung auf die Stabilität der Viren

Virus	Ausgangstiter (log ₁₀ KID ₅₀ /ml)	Endtiter (log ₁₀ KID ₅₀ /ml)	Titerreduktion (log ₁₀ KID ₅₀ /ml)
BVDV	5,8	4,0	1,8
	7,1	5,6	1,5
EAV	7,4	5,8	1,6
	6,8	5,7	1,1
NDV (ZK)	8,2	6,6	1,6
	8,2	6,9	1,3
NDV (All)	8,0	6,6	1,4
	8,0	6,4	1,6

Trocknungszeit: 60min, Trocknungstemperatur: 37°C, Belastung: niedrig

Tabelle 53: Viruzidieprüfung Glutaraldehyd mit MPV

MPV	Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml						
	Desin- fektions- mittel	Konzentration	Virus- kontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Glutaraldehyd		0,0025	6,7	/	/	5,7	1,0
		0,0025	6,7	/	/	5,6	1,1
		0,005	6,7	/	/	5,2	1,5
		0,005	6,7	/	/	5,6	1,1
		0,0075	6,7	/	/	4,5	2,2
		0,0075	6,7	/	/	4,6	2,1
		0,01	6,7	/	/	4,6	2,1
		0,01	6,7	/	/	4,9	1,8
		0,025	6,7	/	/	4,5	2,2
		0,025	6,7	/	/	4,6	2,1
		0,025	6,6	/	/	3,9	2,7
		0,025	6,6	/	/	4,0	2,6
		0,025	6,6	/	/	3,9	2,7
		0,025	6,6	/	/	3,9	2,7
		0,025	6,7	/	/	4,5	2,2
		0,025	6,7	/	/	4,5	2,2
		0,05	6,6	3,9	2,7	3,6	3,0
		0,05	6,6	4,0	2,6	3,5	3,1
		0,05	6,7	4,4	2,3	3,7	3,0
		0,05	6,7	4,2	2,5	3,6	3,1
	0,05	6,7	4,6	2,1	3,9	2,8	
	0,05	6,7	4,9	1,8	3,6	3,1	
	0,075	6,6	3,7	2,9	<3,2	>3,4	
	0,075	6,6	3,6	3,0	<3,2	>3,4	

MPV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Glutaraldehyd	0,075	6,7	3,6	3,1	<3,2	>3,5
	0,075	6,6	3,6	3,0	<3,2	>3,4
	0,075	6,7	4,0	2,7	3,2	3,4
	0,075	6,7	3,7	3,0	3,4	3,3
	0,1	6,6	<3,2	>3,4	/	/
	0,1	6,6	<3,2	>3,4	/	/
	0,1	6,7	<3,2	>3,5	/	/
	0,1	6,6	<3,2	>3,5	/	/
	0,1	6,7	3,4	3,3	/	/
	0,1	6,7	3,4	3,3	/	/

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 54: Viruzidieprüfung Ethanol mit MPV

MPV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Ethanol	70	6,6	6,7	0	6,5	0,1
	70	6,6	6,6	0	6,4	0,2
	70	6,7	6,6	0,1	6,6	0,1
	70	6,6	6,4	0,2	6,5	0,1
	70	6,7	6,7	0	6,7	0
	70	6,7	6,7	0	6,2	0,5
	75	6,7	6,7	0	6,4	0,3
	75	6,6	6,5	0,1	6,4	0,2
	75	6,7	6,6	0,1	6,6	0,1
	75	6,6	6,6	0	6,5	0,1
	75	6,6	6,5	0,1	6,4	0,2
	75	6,7	6,8	0	6,5	0,2
	80	6,6	6,6	0	6,2	0,4
	80	6,6	6,6	0	6,5	0,1
	80	6,7	6,4	0,3	6,4	0,3
	80	6,6	6,7	0	6,2	0,4
	80	6,7	6,6	0,1	6,7	0
	80	6,7	6,8	0	6,6	0,1

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 55: Viruzidieprüfung Peressigsäure mit MPV

MPV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Peressigsäure	0,0075	7,1	/	/	6,7	0,4
	0,0075	7,1	/	/	6,9	0,2
	0,01	7,6	/	/	6,9	0,7
	0,01	7,1	/	/	6,8	0,3
	0,025	7,1	/	/	6,9	0,2
	0,025	7,6	/	/	7,0	0,6
	0,075	6,6	4,6	2,0	3,9	2,7

MPV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Peressigsäure	0,075	6,6	4,8	1,8	3,7	2,9
	0,075	6,6	4,7	1,9	3,7	2,9
	0,075	6,6	4,8	1,8	3,7	2,9
	0,075	6,7	5,0	1,7	4,4	2,3
	0,075	6,7	4,9	1,8	4,2	2,5
	0,1	6,6	3,9	2,7	3,6	3,0
	0,1	6,6	4,1	2,5	3,6	3,0
	0,1	6,6	3,9	2,7	3,4	3,2
	0,1	6,6	3,7	2,9	3,5	3,1
	0,1	6,7	4,7	2,0	3,7	3,0
	0,1	6,7	4,4	2,3	3,7	3,0
	0,25	6,6	T	T	T	T
	0,25	6,6	T	T	T	T
	0,25	6,6	T	T	T	T
	0,25	6,6	T	T	T	T
	0,25	6,7	T	T	T	T
	0,25	6,7	T	T	T	T
	0,5	6,6	T	T	/	/
	0,5	6,6	T	T	/	/
	0,5	6,6	T	T	/	/
0,5	6,6	T	T	/	/	
0,5	6,7	T	T	/	/	
0,5	6,7	T	T	/	/	

Zeichenerklärung: / nicht untersucht T toxisch

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 56: Viruzidieprüfung Natronlauge mit MPV

MPV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Natronlauge	0,1	7,6	/	/	6,2	1,4
	0,1	7,6	/	/	6,2	1,4
	0,25	7,1	/	/	5,1	2,0
	0,25	7,1	/	/	5,1	2,0
	0,5	7,1	/	/	4,9	2,2
	0,5	7,1	/	/	5,0	2,1
	0,75	6,7	/	/	4,7	2,0
	0,75	6,7	/	/	4,5	2,2
	0,75	6,7	/	/	4,5	2,2
	0,75	6,7	/	/	4,4	2,3
	0,75	6,6	/	/	3,9	2,7
	0,75	6,6	/	/	4,0	2,6
	1,0	6,7	4,0	2,7	3,9	2,8
	1,0	6,7	4,0	2,7	3,7	3,0
	1,0	6,7	4,1	2,6	3,9	2,8
	1,0	6,7	4,1	2,6	4,0	2,7
	1,0	6,6	4,0	2,6	3,6	3,0
	1,0	6,6	3,7	2,9	3,5	3,1
	1,5	6,7	3,6	3,1	3,4	3,3
	1,5	6,7	3,9	2,8	3,2	3,5

MPV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Natronlauge	1,5	6,7	3,7	3,0	3,2	3,5
	1,5	6,7	3,7	3,0	3,2	3,5
	1,5	6,6	3,5	3,1	3,2	3,4
	1,5	6,6	3,6	3,0	3,2	3,4
	2,0	6,7	3,4	3,3	/	/
	2,0	6,7	3,2	3,5	/	/
	2,0	6,7	T	T	/	/
	2,0	6,7	T	T	/	/
	2,0	6,6	3,2	3,4	/	/
	2,0	6,6	<3,2	>3,4	/	/

Zeichenerklärung: / nicht untersucht T toxisch

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 57: Viruzidieprüfung Natriumhypochlorit mit MPV

MPV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Natriumhypochlorit	0,5	7,2	/	/	6,9	0,3
	0,5	7,2	/	/	7,0	0,2
	0,75	7,2	/	/	7,0	0,2
	0,75	7,2	/	/	7,1	0,1
	1,0	7,2	/	/	6,7	0,5
	1,0	7,2	/	/	6,7	0,5
	1,5	6,8	/	/	6,6	0,2
	1,5	6,8	/	/	6,5	0,3
	2,0	6,8	/	/	6,4	0,4
	2,0	6,8	/	/	6,4	0,4
	2,5	6,8	/	/	5,2	1,6
	2,5	6,8	/	/	5,1	1,7
	4,0	6,7	4,5	2,2	4,7	2,0
	4,0	6,7	4,2	2,5	4,9	1,8
	4,0	6,7	3,2	3,5	5,6	1,1
	4,0	6,7	3,4	3,3	4,7	2,0
	4,0	6,7	3,4	3,3	5,1	1,6
	4,0	6,7	3,5	3,2	4,9	1,8
	4,0	6,7	/	/	4,0	2,7
	4,5	6,7	3,6	3,1	5,1	1,6
	4,5	6,7	3,9	2,8	4,6	2,1
	4,5	6,7	3,2	3,5	5,0	1,7
	4,5	6,7	3,4	3,3	4,6	2,1
	4,5	6,7	3,4	3,3	4,9	1,8
	4,5	6,7	3,2	3,5	4,5	2,2
	4,5	6,7	/	/	3,7	3,0
	4,5	6,7	/	/	3,5	3,2
	5,0	6,7	3,5	3,2	3,2	3,5
	5,0	6,7	3,4	3,3	3,4	3,3
	5,0	6,7	<3,2	>3,5	<3,2	>3,5
5,0	6,7	<3,2	>3,5	<3,2	>3,5	
5,0	6,7	<3,2	>3,5	<3,2	>3,5	
5,0	6,7	<3,2	>3,5	3,5	3,5	

Anhang

MPV		Titer in log₁₀KID₅₀/ml				
Desin- fektions- mittel	Konzen- tration	Virus- kontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
	5,0	6,6	/	/	<3,2	>3,4
	5,0	6,6	/	/	<3,2	>3,4

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 58: Viruzidieprüfung Glutaraldehyd mit FCoV

FCoV		Titer in log₁₀KID₅₀/ml				
Desin- fektions- mittel	Konzen- tration	Virus- kontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Glutaraldehyd	0,001	5,9	/	/	5,4	0,5
	0,001	5,9	/	/	5,2	0,7
	0,0025	5,9	/	/	4,7	1,2
	0,0025	5,9	/	/	5,6	0,3
	0,005	5,9	/	/	4,2	1,7
	0,005	5,9	/	/	3,5	2,4
	0,0075	6,5	/	/	3,6	2,9
	0,0075	6,5	/	/	3,4	3,1
	0,0075	6,9	/	/	4,4	2,5
	0,0075	6,9	/	/	4,1	2,8
	0,0075	6,9	/	/	4,4	2,5
	0,0075	6,9	/	/	4,5	2,4
	0,01	6,5	5,1	1,4	3,4	3,1
	0,01	6,5	5,4	1,1	<3,2	>3,3
	0,01	6,5	5,1	1,4	3,6	2,9
	0,01	6,5	4,7	1,8	3,6	2,9
	0,01	6,9	5,4	1,5	3,7	3,2
	0,01	6,9	5,4	1,5	3,7	3,2
	0,025	6,9	3,5	3,4	<3,2	>3,7
	0,025	6,9	3,7	3,2	<3,2	>3,7
	0,025	6,5	3,4	3,1	<3,2	>3,3
	0,025	6,5	3,4	3,1	<3,2	>3,3
	0,025	6,5	3,5	3,0	<3,2	>3,3
	0,025	6,5	3,5	3,0	<3,2	>3,3
	0,05	6,5	<3,2	>3,3	<3,2	>3,3
	0,05	6,5	<3,2	>3,3	<3,2	>3,3
	0,05	6,5	<3,2	>3,3	/	/
	0,05	6,5	<3,2	>3,3	/	/
	0,05	6,8	<3,2	>3,6	/	/
	0,05	6,8	<3,2	>3,6	/	/
	0,075	6,2	/	/	<3,2	>3,0
	0,075	6,2	/	/	<3,2	>3,0
0,1	6,2	/	/	<3,2	>3,0	
0,1	6,2	/	/	<3,2	>3,0	
0,25	6,2	/	/	<3,2	>3,0	
0,25	6,2	/	/	<3,2	>3,0	

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 59: Viruzidieprüfung Ethanol mit FCoV

FCoV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Ethanol	15	6,7	6,7	0	6,8	0
	15	6,7	6,6	0,1	6,5	0,2
	15	6,7	6,6	0,1	6,5	0,2
	15	6,7	6,7	0	6,1	0,6
	15	6,7	6,7	0	6,6	0,1
	15	6,7	6,8	0	6,7	0
	20	6,7	6,5	0,2	5,9	0,8
	20	6,7	6,7	0	6,7	0
	20	6,7	6,2	0,5	6,4	0,3
	20	6,7	6,6	0,1	6,2	0,5
	20	6,7	6,4	0,3	5,4	1,3
	20	6,7	6,4	0,3	5,7	1,0
	25	6,7	5,9	0,8	<3,2	>3,5
	25	6,7	5,7	1,0	<3,2	>3,5
	25	6,7	5,5	1,2	5,5	1,2
	25	6,7	5,6	1,1	5,4	1,3
	25	6,7	4,9	1,8	4,4	2,3
	25	6,7	4,8	1,9	4,5	2,2
	30	6,9	3,2	3,7	<3,2	>3,7
	30	6,9	3,2	3,7	<3,2	>3,7
	30	6,9	3,4	3,5	<3,2	>3,7
	30	6,9	3,5	3,4	3,2	3,7
	30	6,9	/	/	3,2	3,7
	30	6,9	/	/	3,4	3,5
	30	6,6	<3,2	>3,4	<3,2	>3,4
	30	6,6	3,2	3,4	<3,2	>3,4
	35	6,6	<3,2	>3,4	<3,2	>3,4
	35	6,6	<3,2	>3,4	<3,2	>3,4
	35	6,7	<3,2	>3,5	/	/
	35	6,7	<3,2	>3,5	/	/
	35	6,7	<3,2	>3,5	/	/
	35	6,7	<3,2	>3,5	/	/
	40	6,6	/	/	<3,2	>3,4
	40	6,6	/	/	<3,2	>3,4
	45	6,6	/	/	<3,2	>3,4
	45	6,6	/	/	<3,2	>3,4
	50	6,6	/	/	<3,2	>3,4
	50	6,6	/	/	<3,2	>3,4
	55	6,6	/	/	<3,2	>3,4
	55	6,6	/	/	<3,2	>3,4

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 60: Viruzidieprüfung Peressigsäure mit FCoV

FCoV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Peressigsäure	0,005	6,5	/	/	6,2	0,3
	0,005	6,5	/	/	6,4	0,1
	0,0075	6,5	/	/	6,1	0,4
	0,0075	6,5	/	/	5,7	0,8
	0,0075	6,7	/	/	6,0	0,7
	0,0075	6,7	/	/	6,1	0,6
	0,0075	6,7	6,7	0	6,7	0
	0,0075	6,7	6,6	0,1	6,2	0,5
	0,01	6,7	6,6	0,1	6,2	0,5
	0,01	6,7	6,6	0,1	6,2	0,5
	0,01	6,5	/	/	5,5	1,0
	0,01	6,5	/	/	6,1	0,4
	0,01	6,7	/	/	5,4	1,3
	0,01	6,7	/	/	5,6	1,1
	0,01	6,9	/	/	6,1	0,8
	0,01	6,9	/	/	6,2	0,7
	0,025	6,5	4,7	1,8	<3,2	>3,3
	0,025	6,5	5,2	1,3	<3,2	>3,3
	0,025	6,7	5,6	1,1	3,4	3,3
	0,025	6,7	5,5	1,2	4,2	2,5
	0,025	6,7	5,7	1,0	<3,2	>3,5
	0,025	6,7	5,7	1,0	<3,2	>3,5
	0,05	6,9	3,5	3,4	<3,2	>3,7
	0,05	6,9	3,5	3,4	<3,2	>3,7
	0,05	6,9	3,6	3,3	<3,2	>3,7
	0,05	6,9	3,5	3,4	<3,2	>3,7
	0,05	6,9	/	/	<3,2	>3,7
	0,05	6,9	/	/	<3,2	>3,7
	0,05	6,7	3,5	3,2	<3,2	>3,5
	0,05	6,7	<3,2	>3,5	<3,2	>3,5
	0,075	6,9	<3,2	>3,7	/	/
	0,075	6,9	<3,2	>3,7	/	/
	0,075	6,9	<3,2	>3,7	<3,2	>3,7
	0,075	6,9	<3,2	>3,7	<3,2	>3,7
0,075	6,8	<3,2	>3,6	<3,2	>3,6	
0,075	6,8	<3,2	>3,6	<3,2	>3,6	
0,1	6,3	/	/	<3,2	>3,1	
0,1	6,3	/	/	<3,2	>3,1	

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 61: Viruzidieprüfung Natronlauge mit FCoV

FCoV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Natronlauge	0,075	6,7	/	/	5,9	0,8
	0,075	6,7	/	/	5,6	1,1
	0,075	6,7	/	/	5,9	0,8

FCoV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Natronlauge	0,075	6,7	/	/	5,9	0,8
	0,075	6,7	/	/	6,2	0,5
	0,075	6,7	/	/	6,4	0,3
	0,1	6,7	6,6	0,1	6,1	0,6
	0,1	6,7	5,5	1,2	6,1	0,6
	0,1	6,7	5,5	1,2	5,9	0,8
	0,1	6,7	5,2	1,5	5,7	1,0
	0,1	6,7	5,0	1,7	5,4	1,3
	0,1	6,7	5,7	1,0	5,4	1,3
	0,25	6,7	5,5	1,2	<3,2	>3,5
	0,25	6,7	4,2	2,5	<3,2	>3,5
	0,25	6,7	5,1	1,6	3,5	3,2
	0,25	6,7	3,6	3,1	4,4	2,3
	0,25	6,7	5,2	1,5	<3,2	>3,5
	0,25	6,7	3,7	3,0	<3,2	>3,5
	0,5	6,9	<3,2	>3,7	<3,2	>3,7
	0,5	6,9	<3,2	>3,7	<3,2	>3,7
	0,5	6,9	<3,2	>3,7	<3,2	>3,7
	0,5	6,9	<3,2	>3,7	<3,2	>3,7
	0,5	6,9	<3,2	>3,7	<3,2	>3,7
	0,5	6,9	/	/	<3,2	>3,7
	0,5	6,2	/	/	<3,2	>3,0
	0,5	6,2	/	/	<3,2	>3,0
	0,75	6,2	/	/	<3,2	>3,0
	0,75	6,2	/	/	<3,2	>3,0

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 62: Viruzidieprüfung Natriumhypochlorit mit FCoV

FCoV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Natriumhypochlorit	0,5	6,7	/	/	6,5	0,2
	0,5	6,7	/	/	6,5	0,2
	0,75	6,7	6,7	0	6,0	0,7
	0,75	6,7	6,4	0,3	6,2	0,5
	0,75	6,6	/	/	5,7	0,9
	0,75	6,6	/	/	6,0	0,6
	1,0	6,7	6,5	0,2	5,5	1,2
	1,0	6,7	6,4	0,3	5,7	2,0
	1,0	6,6	/	/	4,1	2,5
	1,0	6,6	/	/	3,7	2,9
	1,0	6,6	/	/	5,5	1,1
	1,0	6,6	/	/	5,4	1,2
	1,5	6,6	5,9	0,7	3,6	3,0
	1,5	6,6	5,9	0,7	3,8	2,8
	1,5	6,6	/	/	4,8	1,8
	1,5	6,6	/	/	5,1	1,5
	2,0	6,6	/	/	4,0	2,6
	2,0	6,6	/	/	3,4	3,2

FCoV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Natriumhypochlorit	2,0	6,7	/	/	<3,2	>3,5
	2,0	6,7	/	/	<3,2	>3,5
	2,0	6,7	/	/	<3,2	>3,5
	2,0	6,7	/	/	3,5	3,2
	2,5	6,6	/	/	4,1	2,5
	2,5	6,6	/	/	3,5	3,1
	2,5	6,9	5,4	1,5	3,5	3,4
	2,5	6,9	5,6	1,3	3,6	3,3
	2,5	6,7	3,6	3,1	4,1	2,6
	2,5	6,7	4,0	2,7	<3,2	>3,5
	3,0	6,9	3,6	3,3	3,5	3,4
	3,0	6,9	3,6	3,3	3,4	3,5
	3,0	7,0	4,6	2,4	<3,2	>3,8
	3,0	7,0	4,6	2,4	4,0	2,0
	3,0	6,7	4,7	2,0	3,2	3,5
	3,0	6,7	5,4	1,5	<3,2	>3,5
	3,5	6,9	3,4	3,5	3,5	3,4
	3,5	6,9	3,2	3,7	<3,2	>3,7
	3,5	7,0	3,6	3,4	3,5	3,5
	3,5	7,0	3,2	3,0	3,5	3,5
	3,5	6,7	4,9	1,8	<3,2	>3,5
	3,5	6,7	3,6	3,3	<3,2	>3,5
	4,0	6,9	3,7	3,2	<3,2	>3,7
	4,0	6,9	3,6	3,3	<3,2	>3,7
	4,0	6,9	3,6	3,3	<3,2	>3,7
	4,0	6,9	3,7	3,2	<3,2	>3,7
	4,0	6,9	3,4	3,5	<3,2	>3,7
	4,0	6,9	3,2	3,7	<3,2	>3,7
	4,5	6,7	<3,2	>3,5	/	/
	4,5	6,7	<3,2	>3,5	/	/
4,5	6,7	<3,2	>3,5	/	/	
4,5	6,7	<3,2	>3,5	/	/	
4,5	6,7	<3,2	>3,5	/	/	
4,5	6,7	<3,2	>3,5	/	/	

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 63: Viruzidieprüfung Glutaraldehyd mit BVDV

BVDV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Glutaraldehyd	0,0025	6,0	/	/	4,0	2,0
	0,0025	6,0	/	/	4,1	1,9
	0,0025	6,0	/	/	4,0	2,0
	0,0025	6,0	/	/	4,2	1,8
	0,005	6,0	/	/	3,4	2,6
	0,005	6,0	/	/	3,6	2,4
	0,005	5,8	/	/	3,2	2,6
	0,005	5,8	/	/	3,2	2,6
	0,005	5,8	/	/	<3,2	>2,6
	0,005	5,8	/	/	<3,2	>2,6

BVDV		Titer in log₁₀KID₅₀/ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Glutaraldehyd	0,005	5,8	/	/	3,4	2,4
	0,005	6,0	/	/	3,4	2,4
	0,005	6,0	/	/	3,2	2,6
	0,0075	5,8	3,4	2,4	/	/
	0,0075	5,8	3,7	2,1	/	/
	0,0075	5,8	4,0	1,8	3,2	2,6
	0,0075	5,8	3,7	2,1	3,2	2,6
	0,0075	6,2	/	/	<3,2	>3,0
	0,0075	6,2	/	/	<3,2	>3,0
	0,01	5,8	3,6	2,2	<3,2	>2,6
	0,01	5,8	3,4	2,4	<3,2	>2,6
	0,01	6,2	3,6	2,6	<3,2	>3,0
	0,01	6,2	3,7	2,5	<3,2	>3,0
	0,01	6,2	<3,2	>3,0	/	/
	0,01	6,2	<3,2	>3,0	/	/
	0,025	5,8	<3,2	>2,6	/	/
	0,025	5,8	<3,2	>2,6	/	/
	0,025	6,2	3,2	3,0	/	/
	0,025	6,2	3,2	3,0	/	/
	0,025	6,2	<3,2	>3,0	<3,2	>3,0
	0,025	6,2	<3,2	>3,0	<3,2	>3,0
	0,05	6,0	<3,2	>2,8	/	/
	0,05	6,0	<3,2	>2,8	/	/
	0,05	6,2	<3,2	>3,0	/	/
	0,05	6,2	<3,2	>3,0	/	/
	0,05	6,2	<3,2	>3,0	/	/
	0,05	6,2	<3,2	>3,0	/	/

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 64: Viruzidieprüfung Ethanol mit BVDV

BVDV		Titer in log₁₀KID₅₀/ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Ethanol	15	6,2	/	/	4,2	2,0
	15	6,2	/	/	4,4	1,8
	20	5,8	4,1	1,7	3,2	2,6
	20	5,8	4,2	1,6	3,7	2,1
	20	6,0	4,5	1,5	3,7	2,3
	20	6,0	4,2	1,8	3,6	2,4
	25	5,8	3,6	2,2	3,5	2,3
	25	5,8	3,4	2,4	3,7	2,1
	25	6,0	4,0	2,0	3,4	2,6
	25	6,0	3,9	2,1	3,5	2,5
	30	5,8	<3,2	>2,6	<3,2	>2,6
	30	5,8	3,2	2,6	<3,2	>2,6
	30	5,8	<3,2	>2,6	<3,2	>2,6
	30	5,8	<3,2	>2,6	<3,2	>2,6
	30	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	30	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8

BVDV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Ethanol	35	5,9	<3,2	>2,7	/	/
	35	5,9	<3,2	>2,7	/	/
	35	5,9	<3,2	>2,7	/	/
	35	5,9	<3,2	>2,7	/	/

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 65: Viruzidieprüfung Peressigsäure mit BVDV

BVDV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Peressigsäure	0,0025	6,0	/	/	3,5	2,5
	0,0025	6,0	/	/	3,5	2,5
	0,0025	5,9	/	/	3,6	2,3
	0,0025	5,9	/	/	3,4	2,4
	0,005	5,9	3,4	2,5	3,2	2,7
	0,005	5,9	3,2	2,7	3,2	2,7
	0,005	5,9	3,6	2,3	3,4	2,5
	0,005	5,9	3,7	2,2	3,4	2,5
	0,0075	5,9	3,5	2,4	<3,2	>2,7
	0,0075	5,9	3,2	2,7	<3,2	>2,7
	0,0075	5,9	3,4	2,5	<3,2	>2,7
	0,0075	5,9	3,5	2,4	<3,2	>2,7
	0,01	5,9	<3,2	>2,7	/	/
	0,01	5,9	<3,2	>2,7	/	/
	0,01	5,9	<3,2	>2,7	/	/
	0,01	5,9	<3,2	>2,7	/	/

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 66: Viruzidieprüfung Natronlauge mit BVDV

BVDV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Natronlauge	0,025	6,0	/	/	3,4	2,6
	0,025	6,0	/	/	3,5	2,5
	0,025	6,0	/	/	3,5	2,5
	0,025	6,0	/	/	3,7	2,3
	0,05	6,0	/	/	3,4	2,6
	0,05	6,0	/	/	3,6	2,4
	0,05	5,9	/	/	3,2	2,7
	0,05	5,9	/	/	3,2	2,7
	0,05	5,9	/	/	3,2	2,7
	0,05	5,9	/	/	3,5	2,4
	0,075	6,0	3,6	2,4	3,6	2,4
	0,075	6,0	3,6	2,4	3,2	2,8
	0,075	6,2	3,5	2,7	3,2	3,0
	0,075	6,2	3,2	3,0	3,4	2,8
	0,1	6,0	3,6	2,4	3,2	3,0

Anhang

BVDV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Natronlauge	0,1	6,0	3,7	2,3	<3,2	>2,8
	0,1	6,2	3,5	2,7	<3,2	>3,0
	0,1	6,2	3,5	2,7	<3,2	>3,0
	0,25	5,9	<3,2	>2,7	/	/
	0,25	5,9	<3,2	>2,7	/	/
	0,25	6,2	<3,2	>3,0	<3,2	>3,0
	0,25	6,2	<3,2	>3,0	<3,2	>3,0

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 67: Viruzidieprüfung Natriumhypochlorit mit BVDV

BVDV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Natriumhypochlorit	0,5	6,0	3,6	2,4	3,5	2,5
	0,5	6,0	3,7	2,3	3,4	2,6
	0,5	6,0	3,7	2,3	3,4	2,6
	0,5	6,0	3,9	2,1	3,5	2,5
	0,75	6,0	3,4	2,6	3,4	2,6
	0,75	6,0	3,7	2,3	3,2	2,8
	0,75	6,0	3,2	2,8	3,2	2,8
	0,75	6,0	3,4	2,6	3,2	2,8
	1,0	6,0	3,4	2,6	<3,2	>2,8
	1,0	6,0	3,5	2,5	<3,2	>2,8
	1,0	6,0	3,4	2,6	<3,2	>2,8
	1,0	6,0	3,4	2,6	<3,2	>2,8
	1,5	5,9	3,2	2,7	<3,2	>2,7
	1,5	5,9	3,4	2,5	<3,2	>2,7
	1,5	5,9	3,6	2,3	<3,2	>2,7
	1,5	5,9	3,2	2,7	<3,2	>2,7
	2,0	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	2,0	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	2,0	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	2,0	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	2,5	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	2,5	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	2,5	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	2,5	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	3,0	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	3,0	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	3,5	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	3,5	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	4,0	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7
	4,0	5,9	<3,2	>2,7	<3,2	>2,7

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 68: Viruzidieprüfung Glutaraldehyd mit EAV

EAV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Glutaraldehyd	0,0075	6,0	/	/	3,6	2,4
	0,0075	6,0	/	/	3,4	2,6
	0,0075	6,0	/	/	3,5	2,5
	0,0075	6,0	/	/	3,4	2,6
	0,01	6,0	/	/	3,2	2,8
	0,01	6,0	/	/	3,7	2,3
	0,01	6,0	/	/	3,2	2,8
	0,01	6,0	/	/	3,2	2,8
	0,025	6,3	4,0	2,3	/	/
	0,025	6,3	3,7	2,6	/	/
	0,025	6,0	3,7	2,3	3,5	2,5
	0,025	6,0	<3,2	>2,8	3,2	2,8
	0,025	6,0	3,2	2,8	3,2	2,8
	0,025	6,0	3,2	2,8	<3,2	>2,8
	0,05	6,3	3,6	2,7	<3,2	>3,1
	0,05	6,3	3,6	2,7	<3,2	>3,1
	0,05	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	0,05	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	0,05	6,0	3,4	2,6	/	/
	0,05	6,0	3,2	2,8	/	/
0,075	6,0	<3,2	>2,8	/	/	
0,075	6,0	<3,2	>2,8	/	/	
0,1	6,0	<3,2	>2,8	/	/	
0,1	6,0	<3,2	>2,8	/	/	

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 69: Viruzidieprüfung Ethanol mit EAV

EAV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Ethanol	15	5,9	/	/	4,2	1,7
	15	5,9	/	/	3,5	2,4
	15	5,9	/	/	4,0	1,9
	15	5,9	/	/	4,5	1,4
	20	6,0	3,2	2,8	3,2	2,8
	20	6,0	3,5	2,5	3,7	2,3
	20	6,0	4,1	1,9	3,7	2,3
	20	6,0	4,0	2,0	3,2	2,8
	25	6,3	3,2	3,1	/	/
	25	6,3	3,2	3,1	/	/
	25	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	25	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	25	6,0	3,2	2,8	<3,2	>2,8
	25	6,0	3,5	2,5	<3,2	>2,8
	30	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	30	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8

Anhang

EAV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
	30	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	30	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 70: Viruzidieprüfung Peressigsäure mit EAV

EAV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Peressigsäure	0,001	6,0	/	/	3,7	2,3
	0,001	6,0	/	/	3,4	2,6
	0,001	6,0	/	/	3,5	2,5
	0,001	6,0	/	/	3,4	2,6
	0,0025	6,0	4,0	2,0	3,7	2,3
	0,0025	6,0	4,4	1,6	3,4	2,6
	0,0025	6,0	4,2	1,8	3,2	2,8
	0,0025	6,0	4,2	1,8	3,4	2,6
	0,005	6,0	3,9	2,1	<3,2	>2,8
	0,005	6,0	3,9	2,1	<3,2	>2,8
	0,005	6,0	3,2	2,8	<3,2	>2,8
	0,005	6,0	3,4	2,6	<3,2	>2,8
	0,0075	6,3	3,6	2,7	<3,2	>3,1
	0,0075	6,3	3,6	2,7	<3,2	>3,1
	0,0075	6,0	3,7	2,3	/	/
	0,0075	6,0	3,4	2,6	/	/
	0,0075	6,0	<3,2	>2,8	/	/
	0,0075	6,0	<3,2	>2,8	/	/
	0,01	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	0,01	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	0,01	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,01	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,025	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,025	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,025	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,025	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,05	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,05	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,05	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,05	6,0	/	/	<3,2	>2,8

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 71: Viruzidieprüfung Natronlauge mit EAV

EAV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Natronlauge	0,025	6,0	/	/	4,7	1,3
	0,025	6,0	/	/	5,0	1,0
	0,05	6,0	4,5	1,5	4,0	2,0
	0,05	6,0	4,7	1,3	4,0	2,0
	0,05	6,0	4,4	1,6	4,0	2,0
	0,05	6,0	4,4	1,6	4,4	1,6
	0,075	6,0	4,1	1,9	4,0	2,0
	0,075	6,0	4,2	1,8	3,8	2,2
	0,075	6,0	3,9	2,1	3,7	2,3
	0,075	6,0	3,7	2,3	3,9	2,1
	0,1	6,3	3,4	2,9	/	/
	0,1	6,3	3,2	3,1	/	/
	0,1	6,0	3,2	2,8	<3,2	>2,8
	0,1	6,0	3,4	2,6	<3,2	>2,8
	0,1	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	0,1	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	0,25	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,25	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,25	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,25	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,5	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,5	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,5	6,0	/	/	<3,2	>2,8
	0,5	6,0	/	/	<3,2	>2,8

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 72: Viruzidieprüfung Natriumhypochlorit mit EAV

EAV		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Natriumhypochlorit	2,5	6,0	/	/	3,4	2,6
	2,5	6,0	/	/	3,2	2,8
	3,0	6,0	3,5	2,5	3,5	2,5
	3,0	6,0	3,4	2,6	3,4	2,6
	3,0	6,0	3,2	2,8	3,4	2,6
	3,0	6,0	3,2	2,8	3,2	2,8
	3,5	6,0	<3,2	>2,8	/	/
	3,5	6,0	<3,2	>2,8	/	/
	3,5	6,3	3,7	2,6	3,2	3,1
	3,5	6,3	3,5	2,8	3,2	3,1
	3,5	6,0	3,5	2,5	<3,2	>2,8
	3,5	6,0	3,2	2,8	3,2	2,8
	4,0	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	4,0	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	4,0	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8
	4,0	6,0	<3,2	>2,8	<3,2	>2,8

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 73: Viruzidieprüfung Glutaraldehyd mit NDV (All)

NDV (All)		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Glutaraldehyd	0,0075	6,0	/	/	5,2	0,8
	0,01	6,0	/	/	4,6	1,4
	0,025	6,0	/	/	4,9	1,1
	0,05	7,7	/	/	4,9	2,8
	0,075	7,7	/	/	5,4	2,3
	0,075	6,1	/	/	5,4	0,7
	0,1	7,7	/	/	6,1	1,6
	0,1	7,0	/	/	<3,5	>3,5
	0,1	6,1	5,6	0,5	4,0	2,1
	0,1	6,1	5,2	0,9	/	/
	0,25	6,4	/	/	<3,7	>2,7
	0,25	7,0	4,9	2,1	<3,2	>3,8
	0,25	6,1	<3,5	>2,6	/	/
	0,5	6,4	<3,2	>3,2	<3,4	>3,0
	0,5	7,1	<3,2	>3,9	<3,2	>3,9
	0,75	7,1	<3,4	>3,7	<3,2	>3,9
	0,75	7,0	<3,2	>3,8	<3,2	>3,8
	1,0	7,1	<3,2	>3,9	<3,2	>3,9
1,5	7,1	<3,2	>3,9	/	/	

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 74: Viruzidieprüfung Glutaraldehyd mit NDV (ZK)

NDV (ZK)		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Glutaraldehyd	0,0075	6,5	/	/	5,5	1,0
	0,01	6,5	/	/	4,2	2,3
	0,025	6,5	/	/	4,5	2,0
	0,05	6,7	/	/	<3,7	>3,0
	0,075	6,7	/	/	4,6	2,1
	0,075	7,0	/	/	<3,7	>3,3
	0,1	6,7	<3,7	>3,0	4,2	2,5
	0,1	6,7	/	/	<3,2	>3,5
	0,1	7,0	<3,7	>3,3	<3,5	>3,5
	0,25	7,0	<3,2	>3,8	<3,2	>3,8
	0,25	6,7	<3,4	>3,3	<3,2	>3,5
	0,5	7,0	<3,2	>3,8	<3,2	>3,8
	0,5	6,7	<3,2	>3,5	<3,2	>3,5
	0,75	6,7	<3,2	>3,5	<3,2	>3,5
	0,75	7,0	<3,2	>3,8	<3,2	>3,8
	1,0	6,7	<3,2	>3,5	/	/

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 75: Viruzidieprüfung Peressigsäure mit NDV (All)

NDV (All)		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Peressigsäure	0,01	7,0	/	/	4,1	2,9
	0,01	7,0	/	/	4,6	2,4
	0,025	6,4	/	/	5,0	1,4
	0,025	7,0	/	/	<3,2	>3,8
	0,025	6,1	/	/	3,9	2,2
	0,05	6,4	/	/	<3,4	>3,0
	0,05	7,1	/	/	<3,2	>3,9
	0,05	6,1	<3,5	>2,6	/	/
	0,05	6,1	<3,7	>2,4	/	/
	0,075	7,1	4,4	2,7	<3,2	>3,9
	0,075	6,4	/	/	<3,5	>2,9
	0,075	7,0	<3,5	>3,5	/	/
	0,1	7,1	<3,4	>3,7	<3,2	>3,9
	0,1	7,0	<3,2	>3,8	/	/
	0,25	7,0	<3,2	>3,8	/	/
	0,25	7,1	<3,2	>3,9	/	/

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Tabelle 76: Viruzidieprüfung Peressigsäure mit NDV (ZK)

NDV (ZK)		Titer in log ₁₀ KID ₅₀ /ml				
Desinfektionsmittel	Konzentration	Viruskontrolle	Einwirkzeit 5min	Reduktion	Einwirkzeit 30min	Reduktion
Peressigsäure	0,01	6,7	/	/	4,1	2,6
	0,01	6,7	/	/	4,1	2,6
	0,025	6,7	4,6	2,1	<3,2	>3,5
	0,025	6,9	/	/	<3,2	>3,7
	0,05	6,7	<4,0	>2,7	<3,2	>3,5
	0,05	7,0	4,7	2,3	<3,2	>3,8
	0,075	6,7	4,2	2,5	<3,2	>3,5
	0,075	7,0	/	/	<3,2	>3,8
	0,075	6,7	<3,4	>3,3	/	/
	0,1	6,7	<3,2	>3,5	/	/
	0,1	6,7	<3,2	>3,5	/	/
	0,25	6,7	<3,2	>3,5	/	/

Zeichenerklärung: / nicht untersucht

Temperatur: 20°C; Belastung: niedrig

Anhang

Chemikalien und Reagenzien

PBS-Herstellung - Rezeptur

Aqua dest.:	1000 ml
Natriumchlorid (NaCl):	8,00 g
Kaliumchlorid (KCl):	0,20 g
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄):	1,44 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄):	0,24 g

pH - Wert: 7,4

Die Lösung wurde 15 Minuten, bei 121°C im Autoklaven sterilisiert.

WSH-Herstellung - Rezeptur

Lösung A:

1,98 g MgCl₂ und 4,62 g CaCl₂ werden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. Die entstandene Lösung wird membranfiltriert oder autoklaviert

Lösung B:

3,5 g NaHCO₃ wird mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. Die entstandene Lösung wird membranfiltriert.

Gebrauchslösung:

3 ml der Lösung A und 4 ml der Lösung B werden in 500 ml Aqua dest. verdünnt. Es wird zur Einstellung des pH-Wertes auf $7,0 \pm 0,2$ ca. 45µl 6NHCl zugegeben.

Niedrige Belastung - Rezeptur

3 g Rinderalbumin werden in einem 100 ml Messkolben mit 90 ml Aqua dest. aufgelöst. Nach Absetzen des Schaumes wird bis zur 100 ml Marke mit Aqua dest. aufgefüllt. Anschließend wird die Lösung membranfiltriert und im Kühlschrank gelagert.

Danksagung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich während der Zeit der Durchführung und Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen für die Bereitstellung und wissenschaftliche Betreuung dieser Promotionsarbeit sowie für die Ermöglichung einer finanziellen Förderung.
- Frau Dr. Carolin Karnath für ihre wissenschaftliche Betreuung und ihre Unterstützung im Labor, sowie für ihre stete, freundliche und konstruktive Hilfe bei diversen Fragestellungen.
- Frau Dana Rüster und Frau Nadja Leinecker für die tatkräftige Einarbeitung und stets hilfreiche und engagierte Unterstützung im Labor.

Weiterhin danke ich:

- Frauke Seemann für ihre aufmunternden Worte, sowie für ihre hilfreichen Ratschläge bei allen Fragen und Problemen.
- allen Mitarbeiterinnen, Mitarbeitern und Mitdoktoranden des Instituts für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen für die freundliche Aufnahme, die tatkräftige Unterstützung und tolle Zusammenarbeit am Institut.
- meinen Eltern und meinem Opa für die aufbauenden Worte, für Rat und Tat, sowie für ihre finanzielle Unterstützung.
- und nicht zuletzt meinem Andi und meiner Esther für die liebevolle Unterstützung, für die schier unendliche Geduld und Nachsicht, vor allem aber für die motivierenden Worte und Gesten in schweren Zeiten.