

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

**Untersuchungen zur Eignung verschiedener animaler Viren  
zur Prüfung der Viruzidie chemischer Desinfektionsmittel  
in der Nutztierhaltung**

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

eingereicht von  
Jörg Constantin Pirschel  
aus Tübingen

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, Universität Leipzig

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

Tag der Verteidigung: 25. August 2015

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht</b> .....	<b>3</b>
2.1 Reinigung und Desinfektion .....	3
2.1.1 Begriffsbestimmung .....	3
2.1.2 Anforderungen an Desinfektionsmittel in der Tierhaltung .....	3
2.1.3 Desinfektion in der Tierhaltung .....	4
2.1.3.1 Prophylaktische Desinfektion .....	4
2.1.3.2 Amtliche Desinfektion.....	4
2.1.4 Desinfektionsverfahren.....	5
2.1.5 Einflussfaktoren auf die Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel.....	5
2.2 Chemische Desinfektionsmittel .....	6
2.2.1 Aldehyde .....	6
2.2.2 Chlor und Chlorabspalter .....	7
2.2.3 Peroxide .....	8
2.2.4 Laugen .....	8
2.2.5 Säuren .....	9
2.3 Richtlinien zur Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel in Deutschland .....	10
2.3.1 Tiermedizinisch relevante Prüfrichtlinien .....	10
2.3.1.1 DVG-Richtlinie .....	10
2.3.1.2 Entwürfe einer europäischen Richtlinie (CEN-Richtlinie) .....	11
2.3.2 Sonstige Prüfrichtlinien .....	12
2.3.2.1 DGHM.....	12
2.3.2.2 DVV.....	13
2.3.2.3 DLG.....	13
2.4 Prüfviren.....	14
2.4.1 Generelle Anforderungen an die Prüfviren .....	14
2.4.2 Prüfviren gemäß DVG-Richtlinie .....	14
2.4.2.1 Bovines Enterovirus (BEV).....	14
2.4.2.2 Respiratoric enteric orphan virus (REOV) .....	15
2.4.3 Alternativ eingesetzte Prüfviren .....	16
2.4.3.1 Bovines Virusdiarrhoe-Virus (BVDV).....	16

2.4.3.2 Equines Arteritis-Virus (EAV) .....	17
2.4.3.3 Porzines Parvovirus (PPV) .....	18
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>20</b>
3.1 Material.....	20
3.1.1 Testviren.....	20
3.1.2 Zellkultur .....	20
3.1.3 Medien .....	21
3.1.4 Grundsubstanzen .....	21
3.1.5 Geräte, Laborbedarf, Reagenzien .....	22
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Zellkulturverfahren .....	24
3.2.1.1 Kultivierung MDBK / Vero .....	24
3.2.1.2 Kultivierung SpeV .....	24
3.2.2 Virusvermehrung .....	25
3.2.3 Inkubationszeitraum und Virusaufbereitung.....	25
3.2.4 Bestimmung des Infektiositätstiters .....	25
3.2.5 Berechnung des Infektiositätstiters .....	26
3.2.6 Prüfung der Zytotoxizität .....	26
3.2.7 Behandlungsversuche .....	27
3.2.8 Keimträgertest .....	28
3.2.8.1 Vorbereitung der Keimträger.....	28
3.2.8.2 Einfluss der Trocknung auf die Stabilität der Prüfviren .....	28
3.2.8.3 Trocknungsversuche mit allen verwendeten Prüfviren.....	28
3.2.8.4 Desorption der Testviren von der Keimträgeroberfläche .....	29
3.2.8.5 Überprüfung der Viruzidie .....	29
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
4.1 Darstellung des zytopathischen Effektes .....	31
4.2 Trocknungsverluste aller Prüfviren .....	35
4.2.1 Trocknungsversuche im Brutschrank.....	35
4.2.2 Trocknungsversuche im Exsikkator .....	36
4.3 Ergebnisse der Toxizitätsprüfung.....	38
4.4 Ergebnisse der Behandlungsversuche .....	39

4.4 Ergebnisse der viruziden Wirksamkeit der Desinfektionsmittel in den Keimträgerversuchen...	39
4.4.1 Keimträgerversuche mit BEV .....	39
4.4.2 Keimträgerversuche mit BVDV .....	43
4.4.3 Keimträgerversuche mit EAV .....	46
4.4.4 Keimträgerversuche mit PPV .....	49
4.4.5 Keimträgerversuche mit REOV.....	52
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>56</b>
5.1 Anforderungen an Prüfviren .....	56
5.2 Trocknungsversuche .....	57
5.3 BEV .....	58
5.4 BVDV .....	59
5.5 EAV .....	60
5.6 PPV .....	61
5.7 REOV.....	61
5.8 Viruzide Wirksamkeit der Desinfektionsmittel im Keimträgerversuch .....	62
5.9 Abschließende Beurteilung der untersuchten Viren .....	63
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>67</b>
<b>7 Summary.....</b>	<b>69</b>
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>76</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>92</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>93</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A. dest	Aqua destillata
BEV	bovines Enterovirus
BVDV	bovines Virusdiarrhoe-Virus
CEN	Comité Européen de Normalisation
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
cpE	cytopathogenic effect (dt. zytopathischer Effekt)
DGHM	Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
DLG	Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft
DIN	Deutsches Institut für Normung
DM	Desinfektionsmittel
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DVG	Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft
EAV	Equines Arteritis-Virus
ECBO	Enteric cytopathogenic bovine orphan virus
EU	Europäische Union
FKS	Fetales Kälberserum
h	Stunde
KID <sub>50</sub>	Kulturinfektiöse Dosis 50%
KT	Keimträger
MDBK	Madin-Darby bovine kidney cells
min	Minuten
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
MOI	Multiplicity of Infection (dt. Multiplizität der Infektion)
MVA	modified vaccinia Ankara-Virus
NDV	Newcastle-Disease-Virus
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<i>p.i.</i>	<i>post infectionem</i>

## Abkürzungsverzeichnis

---

ppm	parts per million (dt. Teile von einer Million)
PPV	porzines Parvovirus
rpm	rounds per minute (dt. Umdrehungen pro Minute)
WSH	Wasser standardisierter Härte



## 1 Einleitung

Reinigung und Desinfektion sind essentiell für die Verhütung der Übertragung von Infektionserregern, zur Prophylaxe und Bekämpfung von Tierseuchen, sowie zur Qualitätssicherung in allen Bereichen und Ebenen der Nahrungsmittelproduktion. Das Bedürfnis nach gezielten Informationen über die Wirkung und die Eignung der zur Verfügung stehenden Desinfektionsmittel führte im Jahre 1970 zur Gründung des Ausschusses „Desinfektion in der Veterinärmedizin“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG). Die von diesem Ausschuss erarbeiteten „Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin“ bilden die Grundlage für die seit 1975 publizierten Listen, der „nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung“ und der seit 1987 publizierten Listen für den Lebensmittelbereich. Die Desinfektionsmittellisten der DVG werden regelmäßig aktualisiert. Insbesondere bei der anwendungsorientierten Prüfung gibt es ständige Anpassungen und Erweiterungen.

Im Jahre 1990 wurde innerhalb des Europäischen Komitees für Normung (CEN - Comité Européen de Normalisation) das Technische Komitee (TC216) zur Harmonisierung der Prüfvorschriften von chemischen Desinfektionsmitteln gegründet. Dessen Arbeit wird durch das Deutsche Institut für Normung (DIN) unterstützt, in welchem auch Experten der DVG vertreten sind. Durch den ständigen Austausch wurde bereits in der aktuellen vierten Auflage der „Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln“ der DVG die Vorgaben der europäischen Normen berücksichtigt.

Die vorliegende Arbeit soll der Weiterentwicklung der DVG-Richtlinie zur Desinfektionsmittelprüfung in der Nutztierhaltung dienen, die sich derzeit in Überarbeitung befindet. Zu diesem Zweck wurden ausgewählte Viren auf ihre potentielle Eignung als zukünftige Prüfviren gemäß DVG-Richtlinie geprüft. Die bisherigen unbehüllten Prüfviren BEV und REOV könnten durch das porzinen Parvovirus ersetzt oder durch dieses ergänzt werden. Als Ersatz für das bisher verwendete Newcastle-Disease Virus (NDV), bei dem es sich um den velogenen Stamm Montana handelt, könnten andere behüllte Viren wie das equine Arteritis-Virus oder das bovine Virusdiarrhoe-Virus in Frage kommen. Zur Anzucht und zum Nachweis von NDV frisch gewonnene Hühnerembryofibroblasten aus Bruteiern verwendet, was durch den hohen Eiweißgehalt der Allantoisflüssigkeit oft zu falschen Ergebnissen bei der Desinfektionsmittelprüfung geführt hat. Zudem geht von NDV ein gewisses zoonotisches Potential aus, das beim Menschen zu

grippeähnlichen Symptomen führen kann und in der Vergangenheit gelegentlich bei exponiertem Laborpersonal aufgetreten ist. Bei dem in den DVG-Richtlinien zur Desinfektionsmittelprüfung vorgeschriebenen Vacciniavirus handelt es sich um den Impfstamm des Pockenvirus, der eine Virulenz gegenüber nichtgeimpften Individuen besitzt. Seit der weltweiten Tilgung der Pocken und der eingestellten Impfung im Jahre 1975 hat dieses Virus wieder stark an Bedeutung gewonnen. Aus diesem Grund sollte eine weitere Verwendung dieses Virus für die Desinfektionsmittelprüfung überdacht werden. Als alternative Prüfviren wurde die Eignung des porcinen Parvovirus, des equinen Arteritis-Virus und des bovinen Virusdiarrhoe-Virus untersucht. Vor den eigentlichen Desinfektionsmittelversuchen auf Holzkeimträgern wurden Trocknungsversuche von unterschiedlicher Dauer im Exsikkator bei Raumtemperatur und, wie von der DVG vorgeschrieben, im Brutschrank bei 37°C durchgeführt. Ziel hierbei war es, die Trocknungsverluste zu bestimmen und die Tenazität der Prüfviren dem jeweiligen Trocknungsverfahren gegenüber zu untersuchen. Bei den Desinfektionsmittelversuchen wurde die Tenazität der Prüfviren gegenüber Ameisensäure, Glutaraldehyd, Natriumhypochlorit, Natronlauge und Peressigsäure untersucht. Diese Chemikalien bilden die Wirkstoffgrundlage vieler kommerziell erhältlicher Desinfektionsmittel. Aus den gewonnenen Ergebnissen der Keimträgerversuche und den daraus abgeleiteten Empfindlichkeiten soll die Eignung der untersuchten Viren als Testvirus für die Neufassung der kommenden DVG-Prüfrichtlinie abgeleitet werden.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Reinigung und Desinfektion**

#### **2.1.1 Begriffsbestimmung**

Reinigung bezeichnet die Entfernung von Verschmutzungen von Oberflächen, Fahrzeugen, Instrumenten und anderen Gebrauchsgegenständen. Mit den Verschmutzungen wird auch ein großer Teil der darin enthaltenen Mikroorganismen entfernt. Eine gründliche Reinigung ist essentiell für die Wirksamkeit der sich anschließenden Desinfektion. Eine ausreichende Reinigung ist dann erreicht, wenn das abfließende Wasser klar und die Struktur und Farbe der Oberfläche erkennbar ist (MÜLLER und SCHLENKER 2011). Der Grad der Reinheit erstreckt sich von „sensorisch sauber“ über „optisch sauber“ bis hin zu „mikroskopisch sauber“ (BÖHM 2002).

Das Deutsche Arzneibuch von 1929 schreibt „Desinfizieren heißt einen Gegenstand in einen Zustand zu versetzen, in dem er nicht mehr infizieren kann“. Definitionsgemäß bedeutet das, pathogene und fakultativ pathogene Infektionserreger abzutöten beziehungsweise zu inaktivieren. Der von REBER (1973) geprägte Begriff „Entkeimung“ differenziert zwischen „Asepsis“, „Antisepsis“, „Desinfektion“ und „Sterilisation“.

Der Begriff Antisepsis beschreibt die gezielte Vernichtung von Krankheitserregern in Wunden, auf Körperoberflächen und in Körperhöhlen am lebenden Wirt, bei dem sich eine Infektion ausgebildet hat oder sich ausbilden könnte (BÖHM 2002).

Die Asepsis definiert die Abtötung beziehungsweise Inaktivierung aller Mikroorganismen, ihrer Dauerformen, Viren und Prionen und ist das Ergebnis der Sterilisation. Die einzelnen Sterilisationsverfahren sind in Tabelle 1 unter Punkt 2.1.4 aufgelistet.

#### **2.1.2 Anforderungen an Desinfektionsmittel in der Tierhaltung**

Desinfektionsmittel, die in der Tierhaltung eingesetzt werden, sollten eine sichere und schnelle Wirksamkeit gegenüber allen pathogenen Mikroorganismen aufweisen. Sie sollten eine gute Netzfähigkeit auf glatten Oberflächen, sowie eine ausreichende Tiefenwirkung auf zerklüfteten Oberflächen besitzen. Ihre Wirkung sollte nicht durch Temperatur und Anwesenheit organischer Stoffe, wie Eiweiß oder Seifenreste, beeinträchtigt werden. Die Anwendung sollte möglichst geruchlos und völlig unschädlich für Mensch, Tier und Desinfektionsgut sein. Des Weiteren spielen die Haltbarkeit der Lösung, die einfache Herstellung und Anwendung der Gebrauchslösung, und

eine möglichst gute Wirtschaftlichkeit (niedrige Dosierung und geringer Preis) eine wichtige Rolle (HORSCH *et al.* 1968).

### **2.1.3 Desinfektion in der Tierhaltung**

#### **2.1.3.1 Prophylaktische Desinfektion**

Prophylaktische Desinfektionsmaßnahmen sind im Falle der Schweinehaltungshygiene, der Geflügelpest und der Geflügelsalmonellose durch entsprechende Verordnungen vorgeschrieben (ANON. 1999) (ANON. 2007b) (ANON. 2009). In anderen Fällen wird sie fakultativ vom Tierhalter mit Desinfektionsmitteln seiner Wahl durchgeführt (KÖHLER 2006). Sie richten sich gegen pathogene und fakultativ pathogene Krankheitserreger, die regelmäßig und unter gewöhnlichen Bedingungen in Tierbeständen nachzuweisen sind. Ihr Ziel ist es, den Infektionsdruck möglichst gering zu halten und die Seuchenfreiheit des Bestandes zu gewährleisten. Zum einen gibt es die „Gesamtdesinfektion“, die auch als „Schlussdesinfektion“ bekannt ist. Sie wird in Betrieben angewendet, die nach dem „all in-all out“ Prinzip arbeiten. Wenn während der Serviceperiode keine Tiere im Bestand sind, werden alle zuvor belegten Stallungen und deren Einrichtung, Arbeitsgeräte und alle sonstigen Utensilien, die mittelbaren oder unmittelbaren Kontakt mit den Tieren hatten, gereinigt und desinfiziert. Nach erfolgter Desinfektion kann der Stall auf die Wiederbelegung mit neuen Tieren vorbereitet werden. Bei der „umlaufenden“ oder „periodischen Desinfektion“ wird nur eine Teilreinigung und –desinfektion in nicht belegten Bereichen einer an sich belegten Stalleinheit durchgeführt. Sie erfolgt in Rotation, so dass jeder Bereich in regelmäßigen zeitlichen Abständen gereinigt und desinfiziert wird. Die besten Ergebnisse bezüglich Sauberkeit und Keimreduktion werden mit der Gesamt- oder Schlussdesinfektion erreicht, weshalb diese anzustreben ist. Mit allen anderen Desinfektionsregimen geht man Kompromisse ein, die aus den jeweiligen Betriebsabläufen resultieren (SCHLISSER und STRAUCH 1981).

#### **2.1.3.2 Amtliche Desinfektion**

Die amtliche Desinfektion ist eine staatlich angeordnete Maßnahme, die nach Ausbruch einer anzeigepflichtigen Tierseuche durchgeführt werden muss. Die zu ergreifenden Maßnahmen zur Eliminierung eines Tierseuchenerregers bei Seuchenfeststellung sind durch das Tiergesundheitsgesetz und durch die Verordnungen zur Bekämpfung der jeweiligen Tierseuche

geregelt. Dazu gehören Beschränkungen des Tierverkehrs, gegebenenfalls Entwesung, vorläufige und laufende Desinfektion, gegebenenfalls die unschädliche Beseitigung von kranken oder seuchenverdächtigen Tieren, Reinigung und Schlussdesinfektion einschließlich der Desinfektion von Festmist, Jauche, Flüssigmist und anderen potentiell kontaminierten Materialien. Die Maßnahmen werden durch den Amtstierarzt angeordnet, überwacht und nach Erlöschung oder Tilgung der Seuche aufgehoben. Im Seuchenfall dürfen Handelspräparate nur dann eingesetzt werden, wenn sie von der DVG geprüft und für wirksam befunden worden sind. Einzelheiten sind der Desinfektionsrichtlinie zu entnehmen (ANON. 2007a).

#### 2.1.4 Desinfektionsverfahren

**Tabelle 1: Verfahren zur Inaktivierung von Mikroorganismen (MÜLLER und SCHLENKER 2011)**

physikalisch	chemisch
Sterilisationsverfahren	
feuchte Hitze (Dampfsterilisation)	Gassterilisation (Formaldehyd, Ethylendioxid)
trockene Hitze (Heißluftsterilisation)	Kaltsterilisation
ionisierende Strahlung	
Sterilfiltration (bzw. Ultrafiltration für Viren)	
Tyndallisation (fraktionierte Sterilisation)	
Desinfektionsverfahren	
Pasteurisierung	Wischverfahren
Auskochen	Sprühverfahren
Dampfdesinfektion	Begasung
UV-Strahlung	Tauchbad

#### 2.1.5 Einflussfaktoren auf die Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel

Die Menge und Art der vorhandenen Mikroorganismen auf einer zu desinfizierenden Oberfläche beeinflusst die Desinfektionsmittelwirkung im Wesentlichen. Schon bei geringer Verschmutzung, besonders mit eiweißhaltigen Bestandteilen, kommt der Eiweißfehler eines Desinfektionsmittels zu tragen. Dieser bezeichnet den Wirksamkeitsverlust eines Desinfektionsmittels in Anwesenheit eiweißhaltiger Verschmutzung. Daher muss die zu desinfizierende Fläche vor der Desinfektion gründlich gereinigt worden und abgetrocknet sein. Nasse, oder noch feuchte Oberflächen führen

zu einer Verdünnung des Desinfektionsmittels und setzen dessen Wirksamkeit genauso herab, wie zu geringe Anwendungskonzentrationen und zu kurze Einwirkzeiten. Die Beschaffenheit einer Oberfläche kann die Penetration und Wirksamkeit des verwendeten Desinfektionsmittels stark herabsetzen. Der Temperaturfaktor ist besonders wichtig und beschreibt den Wirksamkeitsverlust von Desinfektionsmitteln unterhalb von 10°C. Daher sollten Desinfektionsmittel, die auf organischen Säuren, Aldehyden oder Chlorabspaltern basieren, nicht bei Temperaturen unter 10°C zum Einsatz kommen. Peressigsäure, Laugen, Kalk und Kalkmilch sind bei niedrigen Temperaturen die Mittel der Wahl. Neben der Temperatur spielt auch der pH-Wert eine wichtige Rolle, da jedes Desinfektionsmittel einen bestimmten pH-Wert-Bereich hat, bei welchem es seine optimale Wirkung entfalten kann. Je nach relativer Luftfeuchtigkeit und Luftgeschwindigkeit am Anwendungsort kann das ausgebrachte Desinfektionsmittel schneller verdunsten, was dem Effekt einer zu kurzen Einwirkzeit gleicht (MÜLLER 2007). Die notwendigen Konzentrationen und Einwirkzeiten sollten der geplanten Nutzung entsprechend angemessen sein (SATTAR *et al.* 2003).

## **2.2 Chemische Desinfektionsmittel**

### **2.2.1 Aldehyde**

Die wichtigsten Vertreter der Aldehyde sind Formaldehyd, Glutaraldehyd und Glyoxal. Sie sind sowohl gegen vegetative Bakterien, einschließlich Bazillen und Clostridien, als auch bei entsprechend hoher Konzentration gegen Bakteriensporen wirksam. Darüber hinaus wird eine Vielzahl von Viren inaktiviert (BÖHM und STRAUCH 2002). Die Wirkung gegen Hefen und Schimmelpilze ist geringer als die Wirkung gegen vegetative Bakterien. Aldehyde gehören zu den am häufigsten eingesetzten Desinfektionsmittelwirkstoffen in der Landwirtschaft. Ihr Einsatzgebiet ist sowohl die Flächendesinfektion als auch die Gülledesinfektion in der Tierhaltung. Mit speziellen Geräten lässt sich Formaldehyd auch gasförmig zur Desinfektion einsetzen. Die Wirkungsweise der Aldehyde beruht auf ihrer reaktiven Aldehydgruppe, die bevorzugt mit Amino- und Amidgruppen reagiert. Bei der Reaktion mit Bakterien bilden sich initial N-Methylolverbindungen und in einem weiteren Schritt irreversible Methylbrücken, die die Zellwand durchlässig werden lassen. Zusätzlich werden bakterielle Enzyme gehemmt, die für Stoffwechselforgänge essentiell sind. Bei Viren reagieren die Aldehydgruppen mit den Nukleinsäuren und inaktivieren diese. Da Aldehyde mit Eiweißen jeglicher Art reagieren, zeigen sie in Gegenwart von diesen einen Eiweißfehler. Von allen Aldehyden wird die Wirksamkeit von Glutaraldehyd auch bei hohen organischen Belastungen

am wenigsten beeinträchtigt. Der Temperatureinfluss auf die Desinfektionswirkung der Aldehyde ist sehr ausgeprägt. Die Wirksamkeit geht unterhalb von 10°C stark zurück und kommt bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt zum Erliegen (KÖHLER 2006). Zudem besitzen Aldehyde mit Ausnahme des Glutaraldehyds eine langsame bis sehr langsame Reaktionsgeschwindigkeit und sind in einem pH-Bereich unter 4 - 5 beziehungsweise über 8 - 9 nur schlecht wirksam (WALLHÄUßER 1996). Kontakt mit Aldehyden kann zu einer Reizung von Haut, Schleimhaut, Atemwegen und Verdauungstrakt führen (BÖHM und STRAUCH 2002). Die kanzerogene Wirkung von inhaliertem Formaldehyd wurde vom Bundesinstitut für Risikobewertung zuletzt 2006 untersucht. Dabei zeigte sich, dass Formaldehyd die Bildung von Tumoren im Nasenrachenraum bei wiederholter Inhalation von Konzentrationen größer als 0,1 ppm bzw. 124 µg/m<sup>3</sup> induzieren kann (SCHULTE 2006). Die weitere Verwendung von Aldehyden im Rahmen der Zulassung ist unsicher, da es sich bei Aldehyden, wie auch bei vielen anderen Desinfektionsmitteln, um Gefahrstoffe handelt, für die laut Gefahrstoff-Verordnung ein Substitutionsgebot gilt. Desweiteren fallen sie unter die Biostoff-Verordnung und die Biozid-Richtlinie (VALENTIN-WEIGAND 2010).

### **2.2.2 Chlor und Chlorabspalter**

Als Desinfektionsmittel dieser Gruppe werden sowohl elementares Chlor in Gasform als auch organische und anorganische Chlorverbindungen eingesetzt, die alle in wässriger Lösung unterchlorige Säure (HOCl) als eigentlichen Wirkstoff bilden. Diese zerfällt in Chlorwasserstoff und naszierenden Sauerstoff, welcher die Zellproteine und Nukleinsäuren der Mikroorganismen oxidiert. Die gemeinhin als Chlorabspalter bezeichneten Wirkstoffe sind schnell wirksam und besitzen ein breites Wirkspektrum. Eine gute Wirksamkeit wird sowohl gegen vegetative Bakterien als auch gegen Sporen und Viren erzielt, bei entsprechenden Konzentrationen auch gegen Mykobakterien, Hefen und Schimmelpilze. Einen starken Einfluss auf die Wirksamkeit der Chlorverbindungen stellt der pH-Wert dar, wodurch pH-abhängig unterschiedliche Mengen unterchloriger Säure freigesetzt werden. Die Untersuchungen von ENGELBRECHT *et al.* (1980) an Viren zeigten große Wirksamkeitsunterschiede auf, eine deutlich stärkere viruzide Wirkung war bei einem pH-Wert von 6 als bei einem pH-Wert von 10 zu beobachten. Eine erhebliche Herabsetzung der Wirksamkeit erfolgt bei organischer Belastung sowohl durch die Bindung an organisches Material als auch durch chemische Umsetzung von diesem. Dieser Effekt wird als Chlorzehrung bezeichnet. Niedrige Temperaturen führen ebenfalls zu einem Wirkungsverlust. Die

Verwendung von Chlorabspaltern ist abhängig von der Art der Verbindung. Sie erfolgt vorrangig bei der Desinfektion von Melkanlagen. Chlorverbindungen finden weiterhin als Flächendesinfektionsmittel im Lebensmittelbereich und in der Tierhaltung, als Haut- und Händedesinfektionsmittel sowie in der Wasserdesinfektion Verwendung. Bei ihrem Einsatz ist die bleichende und bleichende und korrodierende Wirkung zu berücksichtigen (KÖHLER 2006).

### **2.2.3 Peroxide**

Wasserstoffperoxid und Peressigsäure stellen die bedeutendsten Vertreter der Peroxide dar, während Benzoylperoxid, Natriumperborat, Kaliumpermanganat und Perbenzoesäure oft nur für sehr begrenzte Anwendungsgebiete geeignet sind. Die Wirkungsweise von Peroxiden beruht auf der Freisetzung von atomarem Sauerstoff, welcher die Zellproteine und Nukleinsäuren der Mikroorganismen oxidiert. Peressigsäure zerfällt in Essigsäure und Wasserstoffperoxid, wobei Letzteres den atomaren Sauerstoff freisetzt (MÜLLER und SCHLENKER 2011). Sie besitzt von allen Wirkstoffgruppen das breiteste Wirkspektrum. Eine gute Wirksamkeit wird neben vegetativen Bakterien und Sporen auch gegen Viren erzielt. Wasserstoffperoxid erfasst ein ähnlich breites Spektrum. Der Nachteil dieser Gruppe liegt in der starken Beeinflussung durch organisches Material (Eiweißfehler). Bedingt durch die Reaktionsfreudigkeit des naszierenden Sauerstoffs sind jedoch nur kurze Einwirkzeiten notwendig und es wird eine gewisse Temperaturstabilität erreicht. So kann auch bei Temperaturen unter 10°C eine wirksame Desinfektion durchgeführt werden. Eine optimale Wirkung kann Peressigsäure im sauren Bereich bei pH-Werten zwischen 2,5 und 4 entfalten. Während Wasserstoffperoxid aufgrund seiner Instabilität hauptsächlich zur Wunddesinfektion eingesetzt wird, eignet sich die Peressigsäure in fast allen Anwendungsbereichen zur Flächendesinfektion; unter anderem auch zur Aerosoldesinfektion, der Flüssigmistdesinfektion sowie zur Desinfektion von Melkanlagen (MÜCKE und SPRÖSSIG 1967) (BÖHM und STRAUCH 2002).

### **2.2.4 Laugen**

Als Vertreter der Laugen kommen zur Desinfektion vor allem die Lösungen von Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid und Calciumoxid (gebrannter Kalk) zum Einsatz. Vor allem Natronlauge wirkt schnell gegen Bakterien und Viren, nicht aber gegen Mykobakterien und Pilze. Der hohe pH-Wert dieser alkalischen Lösungen führt zur Zerstörung von Bakterienzellwänden und zur Denaturierung

von Eiweißen. Des Weiteren werden die Phosphorsäureester der Lipide verseift und die Säureamidbindungen der Peptide hydrolysiert. Bei Viren werden die Zucker-Phosphorsäurebindungen der Nukleinsäuren hydrolysiert. Die Wirkung der Laugen nimmt mit steigender Temperatur zu, wobei dieser Effekt durch die starke Wärmeentwicklung Auflösen in Wasser noch verstärkt wird. Obwohl sie einen geringen Eiweißfehler besitzen, ist die Nutzung von Laugen wegen einer mangelhaften Wirkung auf rauen Materialien wie Holz sowie der starken korrosiven Eigenschaft begrenzt. Natronlauge und gegebenenfalls auch Kalilauge werden im Molkereibereich, in der Getränkeherstellung sowie als Flächendesinfektionsmittel und zur Desinfektion von Flüssigmist in der Landwirtschaft eingesetzt. Calciumhydroxid steht ebenfalls als Kalkmilch zur Flüssigmistdesinfektion sowie zur Herstellung bakterizider Kalkanstriche beziehungsweise als Granulat zur Hygienisierung von Festmist zur Verfügung (BÖHM und STRAUCH 2002).

### **2.2.5 Säuren**

Desinfektionsmittel auf Säurebasis bestehen hauptsächlich aus organischen Säuren, wobei Phenyllessigsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Benzoesäure und Propionsäure als wirksamste Vertreter gelten (TRAUZETTEL 1993). Für Ameisensäure wird ein relativ breites Wirkspektrum angegeben, Schimmelpilze sind jedoch relativ widerstandsfähig gegen diese Säure. Im Allgemeinen sind für eine ausreichende Wirkung sehr hohe Konzentrationen notwendig. Des Weiteren wird die Wirksamkeit in Anwesenheit von organischer Belastung zusätzlich herabgesetzt. Auch bei pH-Werten, welche über dem  $pK_a$ -Wert der Säure liegen, fällt die Wirkung stark ab, da nur bei Vorliegen der Säure in undissoziierter Form die volle Wirksamkeit erreicht wird (HUGO 1992). Säuren koagulieren die proteinhaltigen Bestandteile in organischem Schmutz, so dass die Keime in darunter liegenden Schichten nicht mehr vom Desinfektionsmittel erreicht werden (MÜLLER und SCHLENKER 2011). Mit Ausnahme der Nutzung von Ameisensäure zur Flächendesinfektion werden organische Säuren nur selten als Desinfektionsmittel in der Tierhaltung verwendet. Das Haupteinsatzgebiet dieser Stoffe liegt daher in der Konservierung von Lebensmitteln und Kosmetika (KÖHLER 2007).

## **2.3 Richtlinien zur Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel in Deutschland**

### **2.3.1 Tiermedizinisch relevante Prüfrichtlinien**

#### **2.3.1.1 DVG-Richtlinie**

Im Jahre 1970 wurde der Ausschuss „Desinfektion in der Veterinärmedizin“ von der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V. (DVG) gegründet. Dieser Ausschuss legte 1974 die ersten „Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin“ vor. Sie umfassten die Prüfung von Desinfektionsmitteln an Bakterien, Pilzen, Viren und parasitären Dauerstadien. Nur drei Jahre später wurde die Richtlinie für die Bakterizidie- und Viruzidie-Prüfung überarbeitet und als 2. Fassung veröffentlicht. Die 1974 von der DVG etablierten Prüfrichtlinien bilden die Grundlage der seit 1975 veröffentlichten „Listen der nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung (Handelspräparate)“, von denen bis heute (Stand Januar 2015) 13 Ausgaben erschienen sind. Die Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln für die Tierhaltung wird auf Keimträgern aus Pappelholz untersucht. Von allen untersuchten Materialien eignen sich Pappelholzkeimträger am besten für die gegebenen Anforderungen (YILMAZ und KALETA 2003b). 1984 wurden die „Richtlinien für die Validierung von Desinfektionsmitteln für den Lebensmittelbereich“ erlassen, woraus 1987 die erste Liste geprüfter Desinfektionsmittel für den Lebensmittelbereich entstand. Auch sie erfuhr in den darauffolgenden Jahren stetige Überarbeitung. 1996 wurden die Richtlinien für die Tierhaltung hinsichtlich der Prüfung gegenüber der antiparasitären Wirkung von Desinfektionsmitteln ergänzt. Auf die notwendigen Desinfektionsmaßnahmen in der tierärztlichen Praxis wurde 2007 in der 4. Auflage der Richtlinien eingegangen. Sie behandelt die Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln gegenüber Bakterien, Pilzen und Viren, welche auf Keimträgern aus Edelstahl durchgeführt wird. Eine weitere Neuerung dieser Auflage ist die Viruzidie-Prüfung für den Lebensmittelbereich. Mit der 4. Auflage von 2007 wurde begonnen, die europäischen Normen des Technischen Komitees CEN/TC 216 in die nationalen Prüfvorschriften einfließen zu lassen. DVG- und CEN-Richtlinie wurden 2014 zusammengefasst, sodass die aktuellen Desinfektionsmittellisten für den Lebensmittelbereich und für die Tierhaltung bereits den Nachweis der CEN-Konformität enthalten (ANON. 2015a/b).

### **2.3.1.2 Entwürfe einer europäischen Richtlinie (CEN-Richtlinie)**

Erste Bestrebungen, eine gemeinsame europäische Richtlinie zur Standardisierung der Desinfektionsmittelprüfung zu schaffen, gab es bereits im Jahre 1970. Trotz einiger erfolgreicher Studien konnte man sich nicht auf eine europaweit gültige Testmethode einigen, weshalb sich das von den Mitgliedsstaaten gebildete Komitee im Jahre 1978 wieder auflöste. Nachdem sich der Europäische Rat mit diesem Problem befasste, konnte immerhin für den Lebensmittelbereich eine einheitliche Methodik zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel durchgesetzt werden (AYLIFFE 1989). Um die verschiedenen Prüfmethode aller EU-Mitgliedsstaaten zu vereinheitlichen, wurde 1990 innerhalb des Comité Européen de Normalisation (CEN) der Association Française de Normalisation das Technical Committee (TC 216) gegründet. Dieses Komitee wurde in drei verschiedene Arbeitsgruppen („working groups“) aufgeteilt, welche sich mit humanmedizinischen (WG1), veterinärmedizinischen (WG2) und Belangen des Lebensmittelbereichs (WG3) befassten (MEYER 2008). Das gemeinsame Ziel war es, europäische Standards für die Prüfung von Desinfektionsmitteln, sowie eine einheitliche terminologische Definition von Fachausdrücken und Regelungen zur Kennzeichnung von Desinfektionsmitteln zu schaffen. Aufgrund der Vielzahl an propagierten Testmethoden innerhalb der Mitgliedsstaaten ist man zu der Erkenntnis gekommen, dass nicht ein einzelnes Testergebnis allein, sondern vielmehr ein ganzes Testsystem zielführend sein kann (REYBROUCK 2007). So wird in der Phase 1-Prüfung die grundsätzliche mikrobizide Wirkung einer Substanz nachgewiesen. Diese Prüfung wird in quantitativen Suspensionsversuchen ohne Belastungssubstanzen durchgeführt, was wenig praxisbezogen ist und deswegen als „Basistest“ bezeichnet wird. In der Phase 2, Stufe 1-Prüfung wird der quantitative Suspensionsversuch mit organischer Belastung wie z.B. Hefeextrakt, Rinderalbumin oder Milch, sowie anwendungsspezifischen Prüforganismen durchgeführt. Auch dieser Test allein ist nur von begrenzter Aussagekraft bezüglich der viruziden Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels (STEINMANN 2001) (IJAZ *et al.* 2008).

Bei der Phase 2, Stufe 2-Prüfung werden quantitative Keimträgerversuche durchgeführt. Hierbei wird der jeweilige Prüforganismus mit einer Belastungssubstanz auf der Oberfläche eines Holz- oder Edelstahlkeimträgers angetrocknet und der Keimträger anschließend für die gesamte Einwirkzeit mit der Desinfektionsmittellösung benetzt. Bei der Oberflächendesinfektion wird eine mit dem jeweiligen Prüforganismus belastete Kachel oder Stahloberfläche mit einer definierten Menge des gewählten Desinfektionsmittels benetzt, die während der Einwirkzeit zu trocknen

beginnt (REYBROUCK 1998). Diese beiden Prüfmethode eignen sich derzeit am besten, um praxisnahe Versuchsbedingungen zu simulieren. So muss zur Prüfung der viruziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im Veterinärbereich gemäß EN 14675 ein quantitativer Suspensionsversuch mit lediglich einem Prüforganismus (bovines Enterovirus Typ 1) ausreichen (GABRIEL und BRILL 2011). Das Ergebnis dieser Prüfmethode ist weniger aussagekräftig als das eines Keimträgertests, da das Prüfvirus in das Desinfektionsmittel eingemischt (suspendiert) wird und dieses seine Wirkung besser entfalten kann als bei einer auf einem Keimträger getrockneten Virussuspension mit organischer Belastung (Phase 2, Stufe 2 Prüfung). Letztere liegen allerdings noch nicht für alle Gebiete vor. Die Phase 3 Prüfung stellt einen Feldversuch dar, in dem die zu prüfenden Desinfektionsmittel in-situ untersucht werden sollen. Phase 3 Prüfungen sind derzeit noch in der Entwicklung. Ihre schlechte Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit wirft die Frage auf, ob und wann diese Prüfung überhaupt umgesetzt werden kann (REYBROUCK 1998).

### **2.3.2 Sonstige Prüfrichtlinien**

#### **2.3.2.1 DGHM**

Die Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) gründete 1955 einen Ausschuss zur Erarbeitung einheitlicher Richtlinien zur Prüfung von Desinfektionsmitteln und Desinfektionsverfahren. Drei Jahre später erschien die erste Richtlinie für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel. Die gemäß dieser Richtlinie geprüften und für wirksam befundenen Desinfektionsmittel wurden ab 1959 auf Desinfektionsmittellisten zusammengestellt und publiziert, um Anwender bei der Auswahl und der Anwendung wirksamer Präparate zur Hände-, Flächen-, Instrumenten- und Wäschedesinfektion, sowie zur Hautantiseptik zu unterstützen. Da die DGHM bis dahin über kein eigenes validiertes Testverfahren zur Prüfung der Viruzidie verfügte, bediente man sich behelfsmäßig der gemeinsamen Richtlinien des Robert-Koch-Instituts (RKI) und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung von Viruskrankheiten (DVV) (ANON. 1982) (ANON. 1983). Da die Desinfektionsmittelkommission der DGHM seit 2004 an den Verbund für angewandte Hygiene (VAH) angegliedert ist, wird die bisherige Desinfektionsmittelliste der DGHM seitdem durch den VAH weitergeführt (KARNATH 2011).

### **2.3.2.2 DVV**

Die Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung von Viruskrankheiten e.V. (DVV) hat 1980 vorläufige Richtlinien zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln erlassen. Diese Richtlinien wurden hinsichtlich der Methodik und der verwendeten Prüfviren an die Anforderungen der Humanmedizin angepasst (MAHNEL 1983). Die gemeinsame Richtlinie von DVV und RKI erlaubt, wie auch die DVG-Richtlinie, eine separate Prüfung an behüllten und unbehüllten Viren. Dazu werden für die begrenzte Viruzidie die behüllten Surrogate Vacciniavirus Stamm Elstree und das bovine Virusdiarrhoe-Virus (Stamm NADL) verwendet. Zur Prüfung der viruziden Wirksamkeit werden die Surrogate Poliovirus Typ 1 (Stamm LSc-2ab), Adenovirus Typ 5 (Stamm Adenoid 75), Polyomavirus SV 40 (Stamm 777) und Vacciniavirus (Stamm Elstree) eingesetzt. Für die chemothermischen Desinfektionsverfahren (>40°C) werden sowohl von der DVV als auch von der EN unbehüllte Viren zur Viruzidieprüfung vorgeschrieben (STEINMANN und WOLFF 2007). Das bisher eingesetzte bovine Parvovirus (Stamm Haden) wurde gemäß EN 14476 von 2011 durch das murine Parvovirus (Stamm Crawford) ersetzt. Aufgrund gleichwertiger Empfindlichkeit beider Viren werden Testergebnisse mit dem bovinen Parvovirus weiterhin als gültig angesehen. Das bisher verwendete Vacciniavirus wurde im September 2010 durch das MVA-Virus zur Prüfung der begrenzten Viruzidie in der Desinfektionsmittelprüfung ersetzt (ANON. 2010). Grundlage hierfür ist, dass Laborinfektionen mit Vacciniavirus wiederholt beschrieben wurden (MACNEIL *et al.* 2009).

### **2.3.2.3 DLG**

Die Deutsche Landwirtschaftsgesellschaft e.V. (DLG) vergibt ein DLG-Gütezeichen für Stalldesinfektionsmittel, die eine biozide Wirksamkeitsprüfung nach DVG-Richtlinie und eine anschließende anwendungstechnische Prüfung durch die DLG durchlaufen haben.

Hierbei werden je nach Anwendungsbereich Material- und Korrosionstests, Prüfungen bezüglich der Grenzflächenaktivität, Anwendungstests und Verträglichkeitstests für den Anwender durchgeführt (BÖHM 2002).

## **2.4 Prüfviren**

### **2.4.1 Generelle Anforderungen an die Prüfviren**

Die zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln verwendeten Prüfviren werden nach bestimmten Kriterien ausgewählt. Dazu zählen eine hohe Tenazität, eine leichte Kultivierbarkeit auf der entsprechenden Zellkulturlinie, ein möglichst ausgeprägter virusspezifischer zytopathischer Effekt und hohe Infektiositätstiter. Darüberhinaus sollte das zoonotische Potential zum Schutz des Laborpersonals gering ausgeprägt sein oder möglichst ganz fehlen (AL-KHLEIF 2009). Aufgrund der Vielzahl viraler Infektionserreger und wegen teilweise eingeschränkter Methodik ist es nicht möglich, Desinfektionsmittel gegen jedes bekannte Virus zu testen. Die ausgewählten Prüfviren sind somit Surrogate für andere Viren mit gleichwertiger Tenazität. Die Auswahl der verwendeten Prüfviren bestimmt somit maßgeblich die Aussagekraft der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln (BODENSCHATZ 1997).

### **2.4.2 Prüfviren gemäß DVG-Richtlinie**

Bis zur Fertigstellung der neuen DVG-Richtlinien, die sich an die CEN-Normen anlehnt, wird die Desinfektionsmittelprüfung an Viren nach den Richtlinien aus dem Jahre 2000 (3. Auflage) durchgeführt. Als Vertreter der unbehüllten Viren wurden das enteric cytopathogenic bovine orphan virus (ECBO-Virus, Stamm LCR-4), heute als bovines Enterovirus Typ 1 (BEV-1) bezeichnet, und das Reovirus Typ 1 (Stamm Lang) als Prüfviren genannt. Bei den behüllten Viren kommen das Newcastle-Disease-Virus (Stamm Montana) und das Vacciniavirus (Stamm Elstree) zum Einsatz.

#### **2.4.2.1 Bovines Enterovirus (BEV)**

Das bovine Enterovirus ist ein kleines (24-30 nm), unbehülltes Virus mit einer einsträngigen RNA und gehört zum Genus Enterovirus aus der Familie *Picornaviridae* (BREMER 2003). Das Rinderenterovirus kann sowohl in gesunden Herden als auch in Herden mit unterschiedlichen Krankheitssymptomen nachgewiesen werden, wobei dann häufig mehr als ein Erreger am Krankheitsgeschehen beteiligt ist (MACLACHLAN 2011) (BLAS-MACHADO *et al.* 2007). Infektionen verlaufen bei Kälbern und adulten Tieren häufig klinisch inapparent. Durch ihren Tropismus zum Respirations- und Verdauungstrakt zeigen sich bei erkrankten Kälbern Diarrhoe und respiratorische Symptome. Einige Stämme zeigen eine Affinität gegenüber dem Genitaltrakt und embryonalem Gewebe. Diese Stämme können in seltenen Fällen auch Fruchtbarkeitsprobleme,

Vaginitis und Balanoposthitis verursachen (WELDON *et al.* 1979). BLAS-MACHADO *et al.* (2007) konnten bei einer zweijährigen Färse, die an akuter hämorrhagischer Typhlocolitis verendete, BEV-1 aus allen betroffenen Geweben isolieren. Alle anderen, differentialdiagnostisch in Frage kommenden Pathogene konnten in diesem Fall ausgeschlossen werden. Möglicherweise war dieses Tier aufgrund der fortgeschrittenen Trächtigkeit besonders empfänglich für eine Infektion mit BEV-1.

In einer neueren Studie von BLAS-MACHADO *et al.* (2011) ist es gelungen, Kälber experimentell mit dem BEV-Isolat zu infizieren, welches 2007 aus der verendeten Färse gewonnen wurde. Neben Diarrhoe und respiratorischen Symptomen zeigten zwei Tiere eine akute Enzephalitis und eine akute Entzündung der Herzkranzgefäße. Die genannten Krankheitsbilder konnten durch histopathologische und molekularbiologische Untersuchungen bestätigt werden.

### **Epidemiologie**

Bovine Enteroviren zeigen eine weltweite Verbreitung und lassen sich aus Kot, Nasensekret, Lungen, Samen, Geschlechtsorganen und von Feten isolieren. Die Übertragung erfolgt oronasal und mit den Sekreten des Geschlechtstraktes (GÜR *et al.* 2008) (HAAS 2010).

#### **2.4.2.2 Respiratoric enteric orphan virus (REOV)**

Das Reovirus Typ 1 ist ein 70-85 nm großes, unbehülltes Virion des Genus Orthoreovirus aus der Familie *Reoviridae* und besitzt eine doppelsträngige RNA als Genom (KÖHLER 2006). Die Säugerreoviren, zu denen auch der Serotyp 1 gehört, können aus dem Kot, sowie aus Spül-, Tupfer- und Organproben des Verdauungs- und Respirationstraktes gewonnen werden und kommen bei klinisch gesunden als auch bei kranken Menschen und Tieren gleichermaßen vor. Der Name *Reoviridae* wurde von der Abkürzung „respiratoric enteric orphan“ abgeleitet (SABIN 1959), da die Partikel zunächst keinem definierten Krankheitsbild zugeordnet werden konnten. Bei einer Reihe von Spezies wurde mittlerweile eine Beteiligung an akuten Erkrankungen des oberen Respirationstraktes sicher nachgewiesen. Es wird vermutet, dass Reoviren zusammen mit fakultativ pathogenen Erregern, Problemkeimen und nichtmikrobiellen Faktoren Erkrankungen auslösen können (BEER 2010). Die Säugerreoviren sind als fakultative Zoonoseerreger zu betrachten, da bei Tieren und Menschen die gleichen Serotypen nachweisbar sind (ROSEN 1962).

## **Epidemiologie**

Orthoreoviren werden von infizierten Individuen über den Verdauungs- und Respirationstrakt ausgeschieden. Die Übertragung erfolgt hauptsächlich oronasal. Eine Infektion kann sich unter anderem mit Fieber, Nasenausfluß, Husten, Niesen oder Diarrhoe bemerkbar machen. Die Infektion verläuft häufig klinisch inapparent. Orthoreoviren sind ubiquitär und haben ein breites Wirtsspektrum. An der Entstehung des Zwingerhustenkomplexes des Hundes sind neben anderen Erregern auch Reoviren beteiligt. Beim Hund kommt der Serotyp 3 am häufigsten vor. Beim Pferd sind der Serotyp 1 und 3 an der Entstehung des Hustenkomplexes beteiligt. Beim Rind sind die Serotypen 1 und 2 an der enzootischen Bronchopneumonie beteiligt (BEER 2010).

### **2.4.3 Alternativ eingesetzte Prüfviren**

#### **2.4.3.1 Bovines Virusdiarrhoe-Virus (BVDV)**

Das bovine Virusdiarrhoe-Virus ist ein 40 bis 60 nm großes, behülltes Virus, mit einer einsträngigen RNA positiver Polarität vom Genus Pestivirus aus der Familie *Flaviviridae*. Es werden zwei Genotypen des BVDV als selbständige Spezies unterschieden, bei denen jeweils cytopathogene (cp) und nichtcytopathogene (ncp) Biotypen vorkommen. Die bovine Virusdiarrhoe ist eine in Deutschland anzeigepflichtige Tierseuche, dessen Erreger weltweit verbreitet ist. Es können sich alle Paarhufer infizieren, der Hauptwirt ist jedoch das Rind. Der Erreger führt zu einer zyklisch verlaufenden Allgemeininfektion. Bei gesunden, nichttragenden Kühen verläuft diese subklinisch oder mit Rückgang der Milchleistung. Bei Kälbern können Fieber, Atemwegserkrankungen oder Diarrhoe auftreten. Speziell der Genotyp 2 kann verlustreiche Erkrankungen mit generalisierten Hämorrhagien, schwerer pulmonaler Symptomatik, blutiger Diarrhoe und Erosionen des Verdauungstraktes verursachen (METTENLEITER 2013).

Bei tragenden Tieren kommt es zu einer intrauterinen Infektion des Fetus. In der Folge können Aborte und fetale Missbildungen auftreten oder lebensschwache Kälber geboren werden. Jungtiere, die mit einem nichtcytopathogenen-BVDV-Biotyp zwischen dem 30. und dem 90. Trächtigkeitstag diaplazentar infiziert wurden, erlangen eine zentrale Immuntoleranz gegenüber BVDV, sind lebensfähig und möglicherweise sogar klinisch unauffällig. Die persistierende Infektion macht diese Tiere (PI-Tiere) zu lebenslangen Virusausscheidern. Immuntolerante Tiere können eine generalisierte und hochgradig erosive Schleimhauterkrankung (mucosal disease, MD) entwickeln, wenn das im Tier vorhandene Virus vom nichtcytopathogenen zum cytopathogenen

Biotyp mutiert. Seltener kommt es zu einer zweiten Infektion (Superinfektion) mit einem cytopathogenen BVDV-Biotyp. Die Mucosal Disease verläuft tödlich und ist von blutigen, therapieresistenten Durchfällen, Speichelfluss und Erosionen im Bereich des harten Gaumens, am Flotzmaul und Naseneingang, seltener im Zwischenklauenspalt sowie an Kronsaum und Euter gekennzeichnet (METTENLEITER 2013). BVDV wird außerdem in der Desinfektionsmittelprüfung für den humanmedizinischen Bereich als Surrogat für das Hepatitis-C-Virus eingesetzt (VAN ENGELBURG *et al.* 2002) (STEINMANN und WOLFF 2007) (SAUERBREI 2009).

### **Epidemiologie**

Die Seroprävalenz von BVDV liegt bei intensiver Rinderhaltung ohne Bekämpfungsmaßnahmen zwischen 50 und 80%. Das Virus wird von infizierten Tieren über alle Schleimhäute ausgeschieden, Blut und Sperma sind ebenfalls infektiös. Auch die indirekte Übertragung über belebte und unbelebte Vektoren ist möglich. Eine größere epidemiologische Bedeutung kommt den PI-Tieren zu, die durch eine lebenslange, teils klinisch unauffällige Ausscheidung eine Hauptrolle bei der Übertragung spielen. Dabei sind die Nachkommen eines weiblichen PI-Tieres auch immer persistent infiziert. Die Nachkommen von männlichen PI-Tieren müssen nicht zwangsläufig persistent infiziert sein. Neben infizierten Rindern kommen auch Ziegen, Schafe und Wildwiederkäuer als natürliches Erregerreservoir in Frage. Obwohl sich Schweine auch mit BVDV infizieren können, spielen diese in epidemiologischer Hinsicht keine Rolle (REBHUN 1989) (THIEL und KÖNIG 2010a).

### **2.4.3.2 Equines Arteritis-Virus (EAV)**

Die equine virale Arteritis ist eine in Deutschland meldepflichtige Tierseuche der Pferde, Esel, Zebras und deren Kreuzungen. Der Erreger ist ein etwa 50 bis 70 nm großes, behülltes Virus mit einer positiv orientierten Einzelstrang-RNA und gehört zur Familie der *Arteriviridae*. Die auch als „Pferdestaupe“, „Rotlaufseuche“ oder „epizootic cellulitis pinkeye syndrom“ bekannte Erkrankung ist eine zyklische, fieberhafte Allgemeinerkrankung, die durch die Schädigung der Media kleiner Arterien charakterisiert ist. Zum typischen Bild der Erkrankung gehören Konjunktivitiden (daher „Pinkeye“) mit Lichtscheue, Fieber, Leukopenie, respiratorische Symptome, Diarrhöe und Ödeme der Subcutis an Bauch und Gliedmaßen. Bestimmte Stämme des Virus können bei tragenden Stuten zum Abort führen, da es durch eine Myometritis zu einer Plazentarinsuffizienz kommen

kann. Dadurch kann das Virus auch die Plazentarschranke übertreten, weshalb das Abortmaterial eine wichtige Infektionsquelle darstellt. Die Erkrankung kann jedoch auch klinisch inapparent verlaufen. Serologische Untersuchungen lassen eine weltweite Verbreitung des Erregers vermuten (GLASER *et al.* 1997) (THIEL und KÖNIG 2010b) (HOLYOAK *et al.* 2008).

### **Epidemiologie**

Das equine Arteritis-Virus wird vom virämischen Tier über das Nasen- und Augensekret, über den Speichel und Kot, bei infizierten Stuten auch über das Vaginalsekret ausgeschieden. Die Feten von EAV-induzierten Aborten enthalten große Virusmengen und stellen eine wichtige Infektionsquelle dar. Eine Übertragung durch Arthropoden wird ebenfalls diskutiert. Der Erreger kann auch beim Deckakt mit dem Sperma infizierter Hengste übertragen werden, da dieser lange Zeit in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen persistiert und dann mit der Samenflüssigkeit abgegeben wird. Somit spielt auch gewonnenes Sperma zur künstlichen Besamung eine wichtige Rolle, da dieses häufig über weite Strecken transportiert wird, was die Verbreitung dieses Virus erheblich begünstigt. Chronisch erkrankte Hengste können das Virus über Jahre ausscheiden und stellen somit das natürliche Reservoir dar, was bei der Virusausbreitung und Bekämpfung von hoher Bedeutung ist. Erkrankungen treten häufig nach dem Einstellen eines neuen Tieres in den Bestand auf. In frisch infizierten Beständen beträgt die Seuchendauer 4-6 Wochen, weniger virulente Feldstämme verlängern den Seuchenverlauf. Die Ausbreitungstendenz ist jedoch sehr gering (GLASER *et al.* 1997) (THIEL und KÖNIG 2010b) (HOLYOAK *et al.* 2008).

#### **2.4.3.3 Porzines Parvovirus (PPV)**

Parvoviren sind 18 bis 26 nm kleine, unbehüllte Virionen mit einzelsträngiger DNA aus der Familie *Parvoviridae* und der Subfamilie *Parvovirinae*. Das Virus verfügt über eine äußerst hohe Tenazität, ist resistent gegenüber extremen pH-Werten von 3 – 10, Hitze und anderen Umwelteinflüssen. Infektionen mit porzinen Parvoviren führen bei seronegativen Sauen während der ersten Trächtigkeitshälfte zu intrauterinem Fruchttod mit Resorption oder Mumifikation. Ab dem 70. Trächtigkeitstag entwickeln die Feten Antikörper und die Entwicklung verläuft dadurch ungestört. Außer Fruchtbarkeitsstörungen zeigen die infizierten Sauen keine klinischen Symptome. Die große wirtschaftliche Bedeutung dieser Erkrankung beruht auf den Fruchtbarkeitsstörungen mit eventueller Unfruchtbarkeit, geringeren Wurfgrößen und der Geburt lebensschwacher Ferkel. Das

porzine Parvovirus ist der hauptsächliche Erreger des SMEDI-Syndroms (stillbirth, mummification, embryonic death, infertility) beim Schwein (TRUYEN 2010). In einer neueren Arbeit aus dem humanmedizinischen Bereich wurde die Eignung von PPV als Surrogat für das Poliovirus untersucht (RABENAU *et al.* 2014). Das porcine Parvovirus wurde 2013 von der ICTV in „ungulate protoparvovirus 1“ umbenannt (ANON. 2013).

### **Epidemiologie**

Das porcine Parvovirus hat in deutschen Schweinebeständen eine Seroprävalenz von 60 – 80%. Es wird mit dem Kot, über mummifizierte Feten und Abortmaterial übertragen. Eine Ausscheidung kann auch über den Respirationstrakt erfolgen. Der Übertragungsweg ist fäkal-oral oder über infiziertes Sperma. Auch lebendgeborene Ferkel können das Virus verbreiten. Sie stellen zusammen mit infizierten Sauen und Ebern das Virusreservoir dar. Es können sich Schweine jeden Alters infizieren (TRUYEN 2010).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Testviren

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf Testviren der Familien *Arteriviridae*, *Flaviviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae* und *Reoviridae* untersucht. Zwei dieser Viren gehören zu den durch die „Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG)“ vorgegeben Viren (ANON. 2000): das enteric cytopathogenic bovine orphan virus (ECBO-Virus, Stamm LCR 4), heute als boviner Enterovirus Typ 1 (BEV-1) bezeichnet, und das respiratory enteric orphan Virus (Reovirus Typ 1, Stamm Lang). Zusätzlich wurden das equine Arteritis-Virus (EAV, Stamm Bucyrus), das bovine Virus Diarrhoe Virus (BVDV, Stamm NADL) und das porcine Parvovirus (PPV, Stamm NADL-2) auf ihre potentielle Eignung als zukünftige Prüfviren gemäß DVG-Richtlinie untersucht.

Die Viren wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:

- BEV und REOV von Prof. Dr. E.F. Kaleta, Institut für Geflügelkrankheiten, Fachbereich Tiermedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
- EAV von Dr. Werner Herbst, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Fachbereich Tiermedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
- BVDV von Dr. W. Eichhorn, Institut für Infektionsmedizin und Zoonosen, Tiermedizinische Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München
- PPV von Dr. L.E. Carmichael, Baker-Institute, Cornell University, Ithaca, New York

#### 3.1.2 Zellkultur

Zur Vermehrung und zum Nachweis der Infektiosität der verwendeten Prüfviren dienten Einschichtzellkulturen permanenter Zelllinien. Eine gute Empfänglichkeit für die Vermehrung von EAV und REOV bieten Vero-Zellen. Dabei handelt es sich um epitheliale Nierenzellen der grünen Meerkatze (African Green Monkey). BVDV und BEV wurden in Madin Darby Bovine Kidney Zellen vermehrt. Dabei handelt es sich um adhärente epitheliale Nierenzellen adulter Rinder. PPV wurde auf SpeV-Zellen kultiviert. Diese Zelllinie wurde 1959 etabliert und stammt ursprünglich von der Russischen Akademie der medizinischen Wissenschaften in Moskau. Dabei handelt es sich um epitheloide Nierenzellen von Schweineembryonen.

Die verwendeten Zelllinien wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt von:

- MDBK (ATCC CCL-22): Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems
- SpeV: (RIE 8) Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems
- Vero (ATCC CCL-81): Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig

### 3.1.3 Medien

Als Nährmedium für die Zellkultivierung wurde Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) verwendet. Es enthält 3,7 g/l Natriumhydrogencarbonat, 4,5 g/l Glukose und 1,028 g/l Glutamin. Einer 500 ml Flasche wurden je 1% nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) und Penicillin/Streptomycin, sowie 5-10% fetales Kälberserum (FKS) zugegeben. Alle verwendeten Lösungen können von der Firma Biochrom AG, Berlin bezogen werden.

### 3.1.4 Grundsubstanzen

Bei den verwendeten Chemikalien handelt es sich um je einen Vertreter aus der Gruppe der organischen Säuren, der Peroxide, der Aldehyde, der Chlorabspalter und der Laugen. Diese Chemikalien bilden die Wirkstoffgrundlage vieler kommerziell erhältlicher Desinfektionsmittel. Die Ausgangskonzentrationen und die Bezugsquelle sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 2: verwendete chemische Grundsubstanzen**

Grundsubstanz	Konzentration (%)	Hersteller
Ameisensäure	100	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glutaraldehyd	50	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhydroxidplättchen	-	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumhypochlorit	13	AppliChem GmbH, Darmstadt
Peressigsäure	15	AppliChem GmbH, Darmstadt

### 3.1.5 Geräte, Laborbedarf, Reagenzien

**Tabelle 3: Übersicht Geräte, Laborbedarf, Reagenzien**

<b>Geräte</b>	<b>Modell, Hersteller</b>
Brutschrank	HeraCell 150i CO <sub>2</sub> Incubator , Thermo Scientific, Dreieich CO <sub>2</sub> Unitherm 150, Uniequip, Martinsried
Sterilwerkbänke	Hera Safe HS 18/2, Heraeus Instruments
Zentrifuge	Heraeus Biofuge Primo R, Thermo Scientific, Dreieich
Mikroskop	Leica DMIL, Leica Microsystems (Switzerland) Ltd., Heerbrugg, Schweiz
Kamera	Leica DFC 320, Leica Microsystems (Switzerland) Ltd., Heerbrugg, Schweiz
Trockenschrank	Function Line B12, Heraeus Instruments
Ultraschallbad	USC600D, VWR Ultrasonic Cleaner, Darmstadt
Exsikkator	Exsikkator, Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim
Vakuumpumpe	biovac 104, ILMVAC GmbH, Ilmenau Typ 2534C-02, Gardner Denver Welch Vacuum Technology Inc., Niles, USA
Vortex	Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA

<b>Laborbedarf</b>	
sterile Einmalpipetten 5 ml, 10 ml	Firma TPP AG, Schweiz
Sterile Spritzen 5 ml, 10 ml	B. Braun AG, Melsungen
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipetten	Biohit, Rosbach Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Eppendorfgefäße 1,5 ml, 2 ml	Firma TPP AG, Schweiz
Schraubröhrchen 15 ml, 50 ml (Falcons)	Firma TPP AG, Schweiz

Zellkulturflaschen	Firma TPP AG, Schweiz
96-Loch Mikrotiterplatten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
8-Loch Reagenzreservoir	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
6-Loch Platten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Keimträger, Pappelholz	Des-In-Test-Supply, Stuttgart
Chirurgische Instrumente	Henry Schein Vet GmbH, Hamburg
Petrischalen, steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Silicagel Trocknungspelern	Omnilab, München

<b>Reagenzien</b>	
WSH	Rezeptur siehe Anhang
PBS	Rezeptur siehe Anhang
NaCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
KCl	Merck GmbH, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
CaCl <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypsin-/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
FKS	Biochrom AG, Berlin
DMEM	Biochrom AG, Berlin
NEA (100x Konzentrat)	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml / 10.000 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellkulturverfahren**

#### **3.2.1.1 Kultivierung MDBK / Vero**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 bzw. 150 cm<sup>2</sup> Vent-Zellkulturflaschen. Als Nährmedium diente Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), welches mit 10% fetalem Kälberserum und mit je 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (NEA) und Penicillin/Streptomycin angereichert wurde. Zur Subkultivierung der Zellen wurde das verbrauchte Nährmedium dekantiert. Daraufhin wurde die Zellkultur mit PBS gewaschen, um das Nährmedium vollständig zu entfernen. Im Anschluss wurden 2-3 ml Trypsin mit einer sterilen Einmalpipette auf die Zellkultur gegeben, um die Zellen aus dem Zellverband zu lösen. Dieser Prozess dauerte etwa 10 Minuten und konnte im Brutschrank bei 37°C beschleunigt werden. Sobald sich alle Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 2 ml Nährmedium gestoppt. Unter dem Mikroskop wurde das Ergebnis der Trypsinierung kontrolliert, gegebenenfalls wurden Zellklumpen durch vorsichtiges Resuspendieren mit der Einmalpipette vereinzelt. Zur weiteren Kultivierung wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:4 in neue 75 bzw. 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gegeben, die mit 15 bzw. 30 ml DMEM gefüllt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden.

#### **3.2.1.2 Kultivierung SpeV**

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Vent-Zellkulturflaschen. Als Nährmedium diente DMEM, welches mit 5% FKS und mit je 1% NEA und Penicillin/Streptomycin angereichert wurde. Zur Subkultivierung der Zellen wurde das verbrauchte Nährmedium dekantiert. Daraufhin wurde die Zellkultur mit PBS gewaschen, um das Nährmedium vollständig zu entfernen. Danach wurde die Zellkultur wiederholt mit Trypsin gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden wie gewohnt 2-3 ml Trypsin auf die Zellkultur gegeben, um die Zellen aus dem Zellverband zu lösen. Selbst im Brutschrank dauerte dies 20 – 30 Minuten. Sobald sich alle Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 3 ml Nährmedium gestoppt. Unter dem Mikroskop wurde das Ergebnis der Trypsinierung kontrolliert, gegebenenfalls wurden Zellklumpen durch Resuspendierung mit der Einmalpipette vereinzelt. Zur weiteren Kultivierung wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:10 in neue 75 bzw. 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gegeben, die mit 15 bzw. 30 ml DMEM gefüllt bei 37°C und bei 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurden.

### **3.2.2 Virusvermehrung**

Zur Virusvermehrung wurden die für das jeweilige Virus empfänglichen Zellen verwendet. Besonders empfänglich zeigten sich Zellen, die frisch passagiert wurden und eine Zelldichte von etwa  $10^7$ /ml hatten. Analog zur Kultivierung der einzelnen Zelllinien wurde DMEM mit dem entsprechenden FKS-Gehalt verwendet. Die entsprechende Menge des jeweiligen Virus wurde zuvor aufgetaut und direkt ins Zellkulturmedium der passagierten Zellen gegeben. Zur Infizierung von 30 ml MDBK-Zellsuspension wurden 100 µl BEV bzw. 200 µl BVDV verwendet, was einer multiplicity of infection (MOI) von etwa 0,01 bzw. 0,03 entspricht. Zur Vermehrung von EAV wurden 300 µl Virus in 30 ml Vero-Zellsuspension gegeben (MOI  $\approx$  0,04), im Falle von REOV wurde mit der gleichen Menge Virus lediglich 20 ml Zellsuspension infiziert (MOI  $\approx$  0,05). Von PPV waren zur Infizierung von 30 ml SpeV-Zellsuspension 900 µl Virus erforderlich (MOI  $\approx$  0,01).

### **3.2.3 Inkubationszeitraum und Virusaufbereitung**

Die Zellkulturflaschen wurden nach der Infektion mit dem jeweiligen Virus täglich mikroskopisch kontrolliert. Erst beim Auftreten eines virusspezifischen, den ganzen Zellrasen betreffenden, zytopathischen Effektes (cpE) wurde die Virusvermehrung durch Einfrieren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gestoppt. Durch das Einfrieren kam es zum Zelltod mit einhergehender Zelllyse, so dass auch Virus freigesetzt wurde, das sich intrazellulär in infizierten, aber noch vitalen Zellen befand. Die tiefgefrorenen Zellkulturflaschen wurden zur Virusaufbereitung bei Raumtemperatur aufgetaut. Die infizierte Zellsuspension wurde anschließend in Röhrchen bzw. Falcons überführt. Diese wurden bei 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand der Röhrchen wurde gepoolt und in 2 ml Eppendorfgefäße aliquotiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte eine Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2.4 Bestimmung des Infektiositätstiters**

Zur Bestimmung der Kulturinfektiosen Dosis 50% ( $\text{KID}_{50}$ ) wurde eine Virustitration mit dem jeweiligen Testvirus durchgeführt. Dazu wurden die benötigten Zellen am Tag der Infektion in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät. Vor der Einsaat wurden die Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und auf eine Zelldichte von etwa  $10^4$ /ml eingestellt. Von der eingestellten Zellsuspension wurden 100 µl in jede Kavität einer 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Parallel dazu wurde zur Verdünnung der Virussuspension eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit jeweils 225 µl PBS

pro Kavität vorbereitet. Von dem zu prüfenden Virus wurden nun je 25 µl in jedes Loch der ersten Spalte der PBS-Platte gegeben. Der Inhalt der befüllten Kavitäten wurde nun mit einer 8-Kanal-Pipette und sterilen Spitzen gründlich gemischt und je 25 µl in die jeweils nachfolgende Kavität übertragen. Zur Vermeidung von Verdünnungsfehlern wurden die Pipettenspitzen zwischen jeder Verdünnungsstufe gewechselt. Die Virusverdünnung erfolgte bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-10}$ . Anschließend wurden je 25 µl der jeweiligen Virusverdünnungsstufe mit einer 8-Kanal-Pipette auf die dafür vorbereitete Zellkulturplatte übertragen. Dabei wurde mit der höchsten Verdünnung ( $10^{-11}$ ) begonnen. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Zellkulturplatte wurde täglich auf das Auftreten eines cpE in den einzelnen Vertiefungen mikroskopisch kontrolliert. Die Ergebnisse wurden protokolliert und ausgewertet.

### 3.2.5 Berechnung des Infektiositätstiters

Die Berechnung der Infektiosität in KID<sub>50</sub> erfolgte nach dem Spearman-Kaerber-Verfahren (KAERBER 1931, SPEARMAN 1908).

Berechnung nach der Formel:

$$\log_{10} \text{KID}_{50}/\text{Volumen} = (x_0 - d/2 + d \sum r/n)$$

- $x_0$  der  $\log_{10}$  des reziproken Wertes der niedrigsten Verdünnung, bei der alle Reagenten positiv sind
- $d$   $\log_{10}$  des Verdünnungsfaktors
- $n$  die Anzahl der Reagenten, die für jede Verdünnung eingesetzt wurden
- $r$  die Anzahl der positiven Reagenten pro Gruppe

### 3.2.6 Prüfung der Zytotoxizität

Hinsichtlich der zellschädigenden Wirkung der eingesetzten Desinfektionsmittel auf die verwendeten Zellkulturen wurden zunächst die Ergebnisse einer vergleichbaren Arbeit unseres Institutes verwendet. Da noch keine Versuche zur Prüfung der Zytotoxizität bei SpeV-Zellen stattgefunden haben, wurden im Zuge dieser Versuchsreihe auch alle anderen Zellen mit allen

verwendeten Chemikalien erneut untersucht. Alle ermittelten Werte stammen somit aus selbst durchgeführten Versuchsreihen.

Die Prüfung der zellschädigenden Wirkung der Desinfektionsmittel auf die verwendeten Zellkulturen wurde gemäß der DVG-Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel durchgeführt (ANON. 2000). Die Desinfektionsmittel wurden mit Wasser standardisierter Härte (WSH) auf das Zehnfache der gewünschten Anwendungskonzentration verdünnt. 200 µl der Verdünnung wurden einem Gemisch aus 1 ml DMEM und 800 µl PBS zugegeben. 100 µl dieses Reaktionsgemisches wurden in die Vertiefung eines 8-Loch Reagenzreservoirs übertragen, mit 9,9 ml PBS vermischt und davon je 100 µl in vier leere Kavitäten einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Suspension wurde bis zur Verdünnungsstufe  $10^{-4}$  mit PBS titriert. Von der höchsten Verdünnungsstufe ausgehend wurden je 25 µl auf die entsprechend vorbereitete Zellkulturplatte übertragen und über den gleichen Zeitraum wie im Keimträgertest auf zytotoxische Veränderungen der Zellen hin kontrolliert. Die Ergebnisse des Toxizitätstestes sind in **Tabelle 6** bis Tabelle 10 des Anhangs auf Seite 78 bis 82 dargestellt.

### **3.2.7 Behandlungsversuche**

Um eine mögliche Beeinträchtigung der Zellen durch die Desinfektionsmittelwirkung in Hinblick auf deren Empfänglichkeit gegenüber dem jeweiligen Prüfvirus zu untersuchen, wurden vergleichende Virustitrationen an behandelten und unbehandelten Zellen durchgeführt. Dazu wurde für jede Zelllinie die jeweils höchste, nicht toxische Konzentration eines Desinfektionsmittels ausgewählt. Diese ergab sich aus den Ergebnissen der Zytotoxizitätsprüfung. Die Verdünnung erfolgte analog zu der Beschreibung unter Punkt 3.2.6. Von dem fertigen Gemisch wurden je 25 µl in alle Vertiefungen einer 24 Stunden zuvor angelegten Zellkulturplatte gegeben und für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Zellkulturmedium aus allen Kavitäten vorsichtig abgesaugt und durch 100 µl frisches Medium ersetzt. Anschließend wurde mit den fünf behandelten und einer unbehandelten Zellkulturplatte als Kontrolle eine Virustitration (vgl. 3.2.4) durchgeführt. Die beimpften Zellkulturplatten wurden über die reguläre Beobachtungsdauer im Brutschrank inkubiert und danach mikroskopisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 auf Seite 83 dargestellt.

### **3.2.8 Keimträgertest**

#### **3.2.8.1 Vorbereitung der Keimträger**

Die kommerziell erhältlichen Pappelholzkeimträger haben eine Fläche von 2 cm<sup>2</sup> und wurden zunächst in 1x1 cm große Stücke halbiert. Die quadratischen Holzkeimträger wurden für 20 Minuten bei 121°C und 2 bar Druck autoklaviert und anschließend im Trockenschrank bei 56°C für 2 Stunden getrocknet. Diese Vorbehandlung ist in den DVG-Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln vorgeschrieben (ANON. 2008).

#### **3.2.8.2 Einfluss der Trocknung auf die Stabilität der Prüfviren**

Da die Trocknungsversuche analog zur vorgeschriebenen Trocknung bei der DM-Prüfung durchgeführt wurden, wurde die Virussuspension mit 40% antikörperfreiem bovinem Serum (Eiweißgehalt ca. 6%) vermischt, bevor sie auf die Keimträger aufgetragen wurde. Laut DVG-Richtlinie müssen vor der eigentlichen Desinfektionsmittelprüfung die mit Virus beschichteten Keimträger für 60 - 90 Minuten bei maximal 37°C getrocknet werden (ANON. 2008). Um zu untersuchen, wie hoch der Infektiositätstiter einer angetrockneten Virussuspension im Vergleich zum Ausgangstiter eines Virus nach dem Auftauen ist, wurden mit allen verwendeten Viren Trocknungsversuche von unterschiedlicher Dauer im Exsikkator und im Brutschrank durchgeführt. Damit wurde die Stabilität der Viren während der Trocknungsphase überprüft, welche eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung als Testvirus zur Desinfektionsmittelprüfung darstellt.

#### **3.2.8.3 Trocknungsversuche mit allen verwendeten Prüfviren**

Zunächst wurden 12 Holzkeimträger auf 6 sterile Petrischalen verteilt und mit serumhaltiger Virussuspension beschickt. Anschließend wurden drei dieser Petrischalen im Exsikkator mit Silicagel Trocknungspelen und mit Hilfe einer Vakuumpumpe bei Raumtemperatur und einem Unterdruck von 900-950 mbar getrocknet. Die beschichteten Keimträger in den restlichen drei Petrischalen wurden gemäß DVG-Richtlinie bei 37°C im Brutschrank getrocknet.

Nach 15, 30 und 60 Minuten wurde je eine Petrischale aus dem Exsikkator und aus dem Brutschrank entnommen und die darin getrockneten Keimträger längs zum Faserverlauf in je vier Streifen zerschnitten. Die insgesamt 8 Holzstreifen einer Trocknungszeit wurden in sterile, mit 9,9 ml PBS gefüllte Röhrchen gegeben und verschlossen für 10 Minuten ins Ultraschallbad gestellt (vgl. 3.2.8.4). Von der virushaltigen PBS-Lösung wurden je 100 µl mit einer 8-Kanal-Pipette auf die

leeren Vertiefungen der ersten Spalte einer 96-Loch-Mikrotiterplatte Platte überführt, und im Anschluss, wie unter Punkt 3.2.4 beschrieben, weiter titriert. Die beimpften Zellkulturen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und täglich bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes mikroskopisch kontrolliert. Für jedes Virus wurden drei zeitlich unabhängige Trocknungsversuche durchgeführt.

#### **3.2.8.4 Desorption der Testviren von der Keimträgeroberfläche**

Nach der Trocknung wurden die beiden Keimträger der Viruskontrolle sofort, die restlichen, in Desinfektionsmittellösung befindlichen Keimträger nach Ablauf der jeweiligen Einwirkzeit entnommen und längs zum Faserverlauf in je vier Streifen geschnitten. Die acht Holzstreifen einer jeden Konzentration wurden in sterile, mit 9,9 ml PBS gefüllte Röhrchen überführt. Anschließend wurden die mit den Keimträgern befüllten Röhrchen für 10 Minuten in ein mit Eiswasser gefülltes Ultraschallbad gegeben, um das Virus aus der Keimträgeroberfläche zu lösen.

#### **3.2.8.5 Überprüfung der Viruzidie**

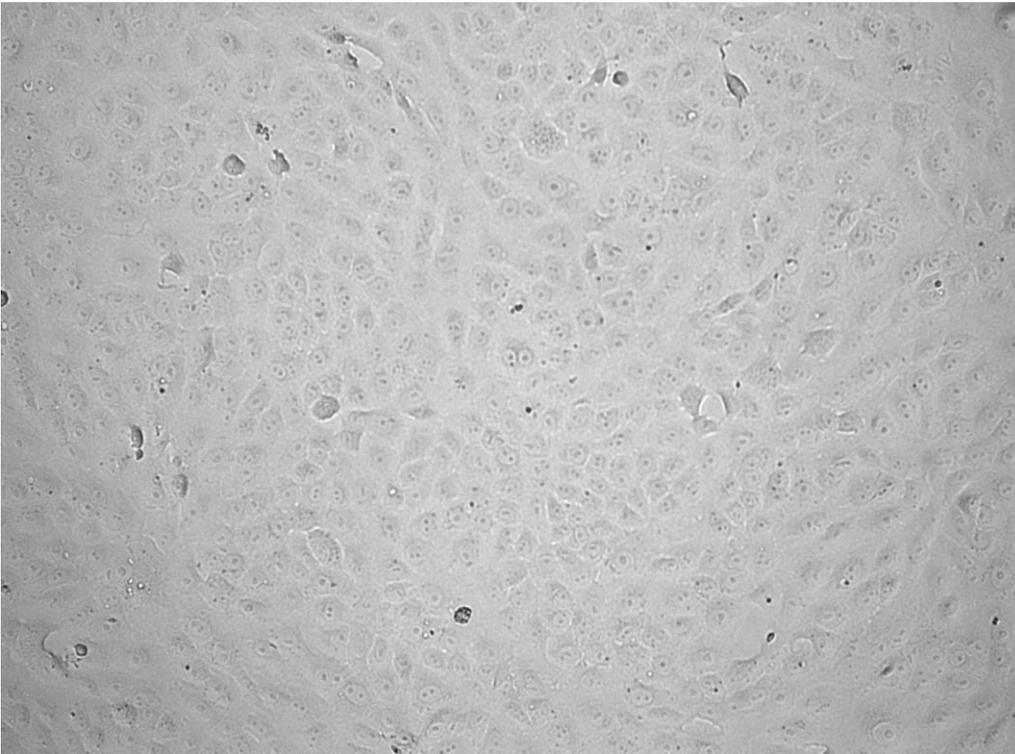
Die Pappelholzkeimträger wurden unter sterilen Bedingungen in 6-Loch-Platten platziert, so dass in jedem Loch zwei 1 cm<sup>2</sup> große Keimträger vorhanden waren. Für die Viruskontrolle wurden zwei Keimträger in eine sterile Petrischale gelegt. Im Anschluss wurden 1,8 ml des zu prüfenden Virus mit 40% (1,2 ml) FKS vermischt, was einer Eiweißbelastung von etwa 6% entspricht. Nach gründlichem Vermischen wurde die Virussuspension in ein Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gelagert. Von dort aus wurden je 50 µl serumhaltige Virussuspension auf jeden Keimträger (100 µl pro Loch) gegeben. Die beschickten 6-Loch-Platten und die Petrischale wurden in ein aerosoldichtes Transportgefäß gestellt und anschließend gemäß DVG-Richtlinie für 60 Minuten bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Nach der Trocknung wurden die beiden Keimträger der Viruskontrolle in der Sterilwerkbank längs zum Faserverlauf in je vier Streifen geschnitten. Die Desorption des Virus von der Keimträgeroberfläche erfolgte mit Ultraschall wie unter Punkt 3.2.8.4 beschrieben. Zur Bestimmung des Infektiositätstiters wurde eine Virustitration durchgeführt. Abweichend von der Beschreibung unter Punkt 3.2.4 wurde eine 96-Loch-Mikrotiterplatte zur Titration verwendet, bei der die acht Vertiefungen der ersten Spalte leer und alle anderen mit 225 µl PBS befüllt waren. Nach der Ultraschallbehandlung des Röhrchens wurde die virushaltige PBS-Lösung in ein 8-Loch Reagenzreservoir überführt und je 100 µl mit einer 8-

Kanalpipette in die acht leeren Vertiefungen der PBS-Platte überführt. Von dort aus wurden je 25 µl auf die nächste Spalte übertragen und vermischt. Zur Vermeidung von Verdünnungsfehlern wurden die Pipettenspitzen zwischen jeder Verdünnungsstufe gewechselt. Die Virusverdünnung wurde bis zur Verdünnungsstufe von  $10^{-10}$  durchgeführt. Danach wurden je 25 µl der jeweiligen Virusverdünnungsstufe mit einer 8-Kanal-Pipette auf die dafür vorbereitete Zellkulturplatte übertragen. Dabei wurde mit der höchsten Verdünnung ( $10^{-11}$ ) begonnen. Die Inkubation der beimpften Zellkulturplatte erfolgte wie gewohnt bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Im Anschluss wurden die restlichen Keimträger mit den vorbereiteten Anwendungskonzentrationen der zu prüfenden Desinfektionsmittel beschickt. Hierfür wurden je 4 ml Desinfektionsmittel im Dreifachansatz auf die getrockneten Keimträger gegeben. Nach Ablauf der Einwirkzeit von 30, 60 und 120 Minuten wurden die Keimträger aus der Desinfektionslösung entnommen und es erfolgte die Desorption des Virus von der Keimträgeroberfläche wie unter Punkt 3.2.8.4 beschrieben. Die Reaktionsgemische aus den einzelnen Röhrchen wurden getrennt voneinander in die Kavitäten eines sterilen 8-Loch Reagenzreservoirs überführt. Die Reaktionsgemische mit der Verdünnungsstufe  $10^{-2}$  wurden auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit PBS bis  $10^{-5}$  weiterverdünnt. Zur Vermeidung von Verdünnungsfehlern wurden die Pipettenspitzen zwischen jeder Verdünnungsstufe gewechselt. Von diesen drei Verdünnungsreihen wurden wie gewohnt 25 µl mit einer 8-Kanal-Pipette von der höchsten Verdünnungsstufe ausgehend auf die vorbereitete Zellkulturplatte überführt. Die Zellkulturplatten wurden täglich auf das Auftreten eines cpE in den einzelnen Vertiefungen kontrolliert und die Ergebnisse protokolliert und ausgewertet. Alle Keimträgerversuche wurden im Doppelansatz an zwei unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde die minimal benötigte Konzentration eines Desinfektionsmittels für eine vollständige Virusinaktivierung nach 30 minütiger Einwirkzeit ermittelt. Eine vollständige Inaktivierung entsprach einer Titerreduktion von mindestens 3 Logarithmusstufen gegenüber der entsprechenden Viruskontrolle.

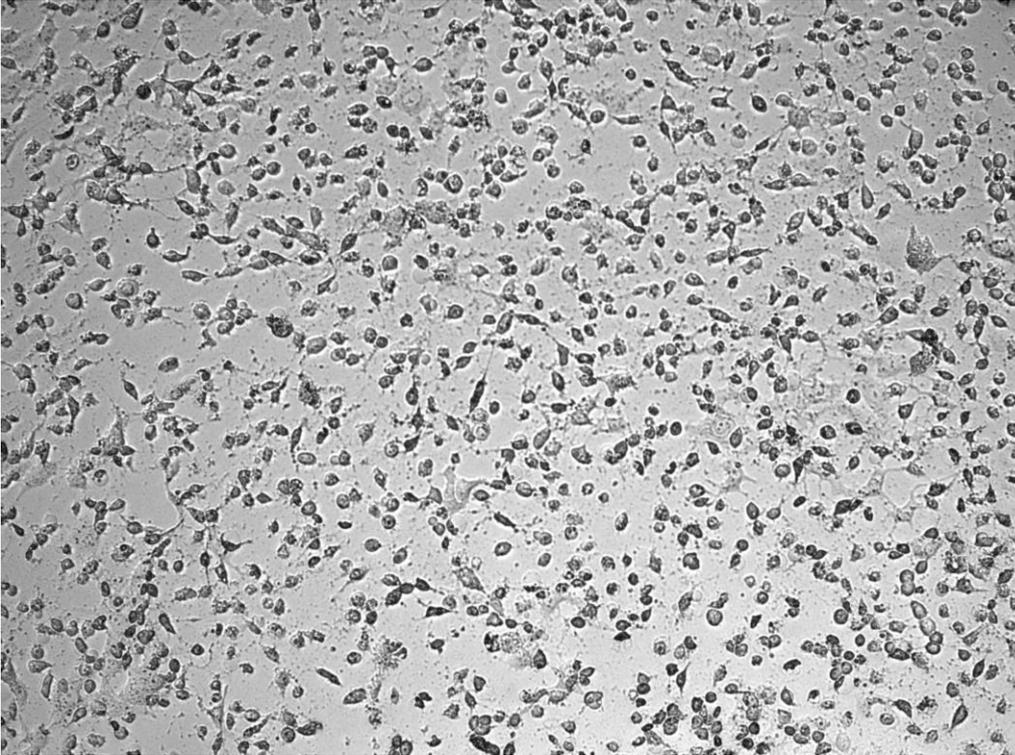
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Darstellung des zytopathischen Effektes

Die Morphologie der verwendeten Zellkulturen und der virusspezifische zytopathische Effekt (cpE) sind in den nachfolgenden Abbildungen 1 - 8 dargestellt. Die Zellkulturen wurden digital fotografiert (Mikroskop: Leica DMIL, Kamera: Leica DFC 320; Leica Microsystems (Switzerland) Ltd., Heerbrugg, Schweiz). Zur Bearbeitung und Archivierung wurde das dazugehörige Programm Leica Application Suite, Version 2.5.0 R1 verwendet.

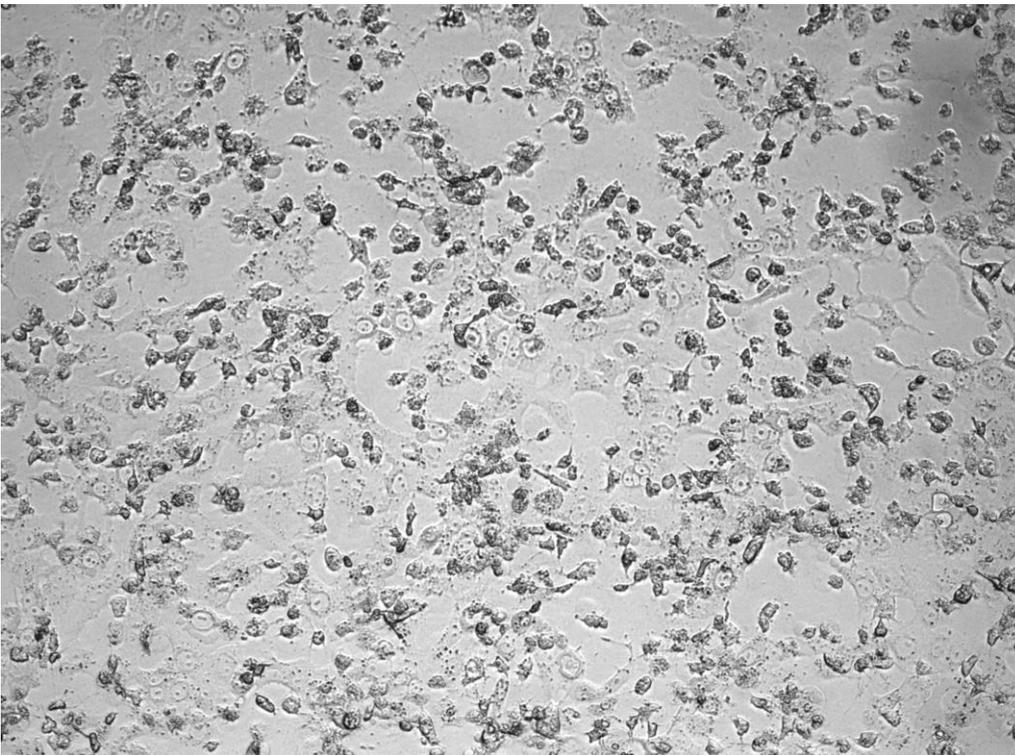


**Abbildung 1: native Vero-Zellen ohne cpE (100x Vergrößerung)**



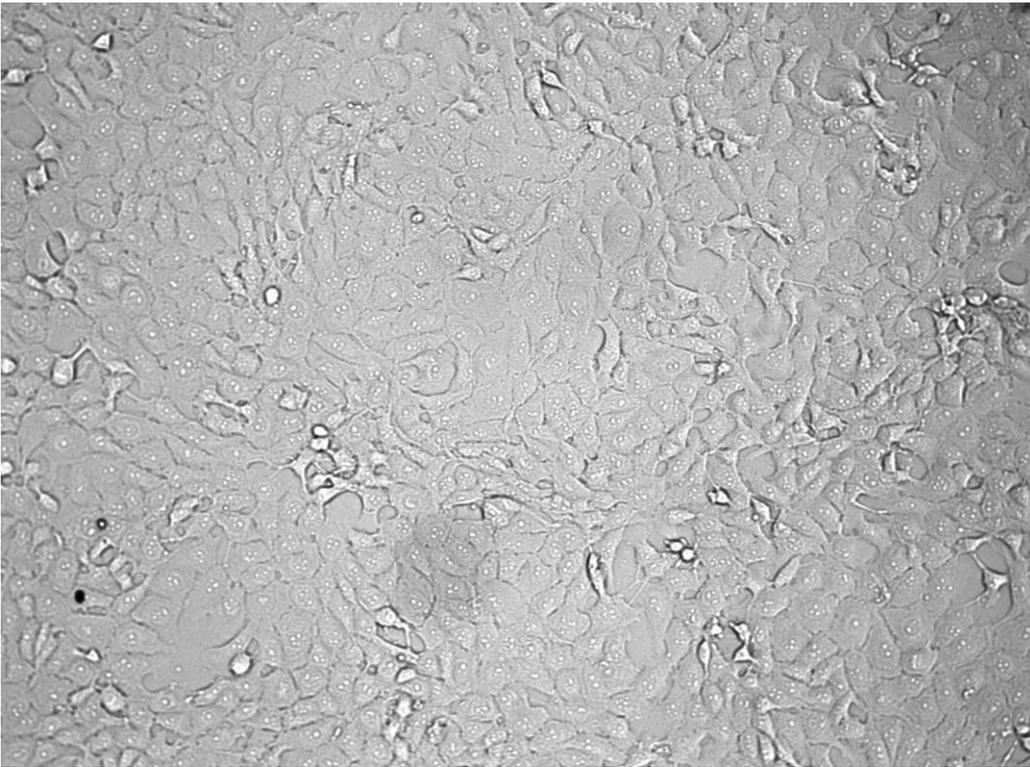
**Abbildung 2: Vero-Zellen nach Infizierung mit EAV**

**(100x Vergrößerung, 5 Tage *post infectionem*, Infektiositätstiter 7,6 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml)**

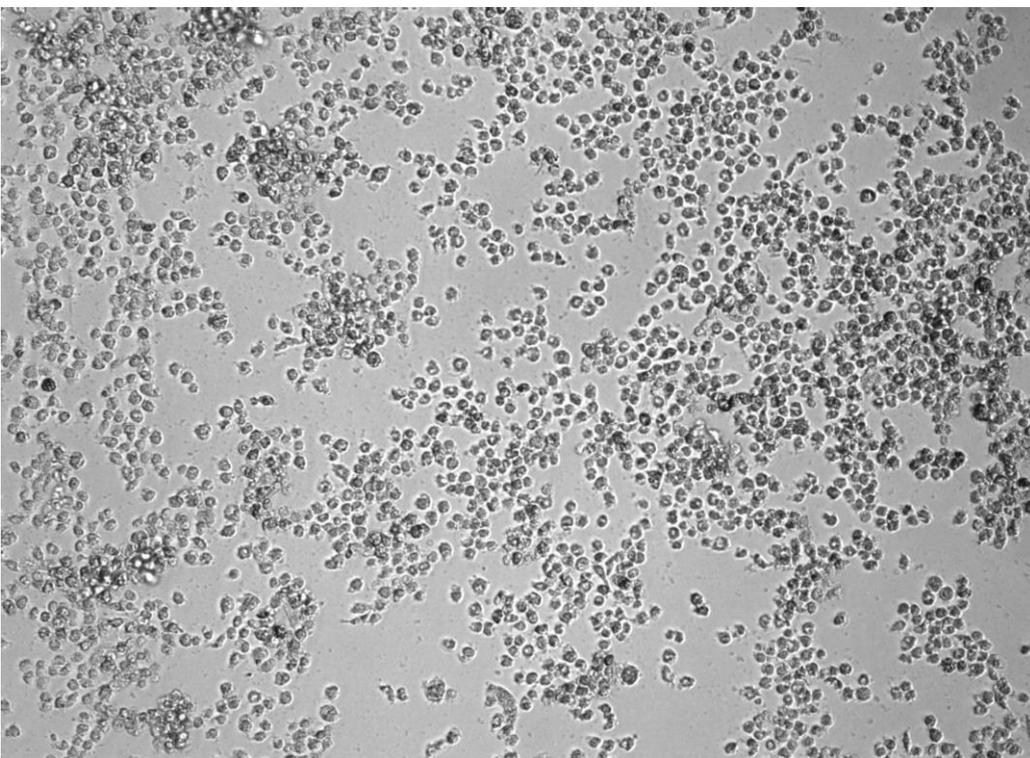


**Abbildung 3: Vero-Zellen nach Infizierung mit REOV**

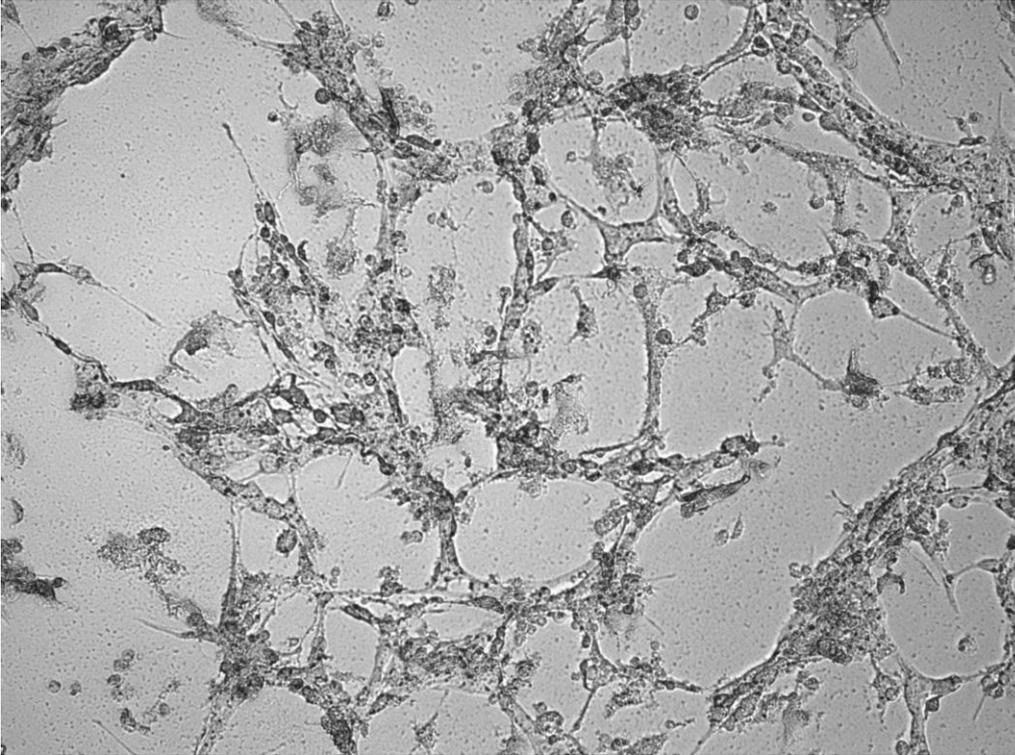
**(100x Vergrößerung, 6 Tage *post infectionem*, Infektiositätstiter 8,2 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml)**



**Abbildung 4: native MDBK-Zellen ohne cpE (100x Vergrößerung)**



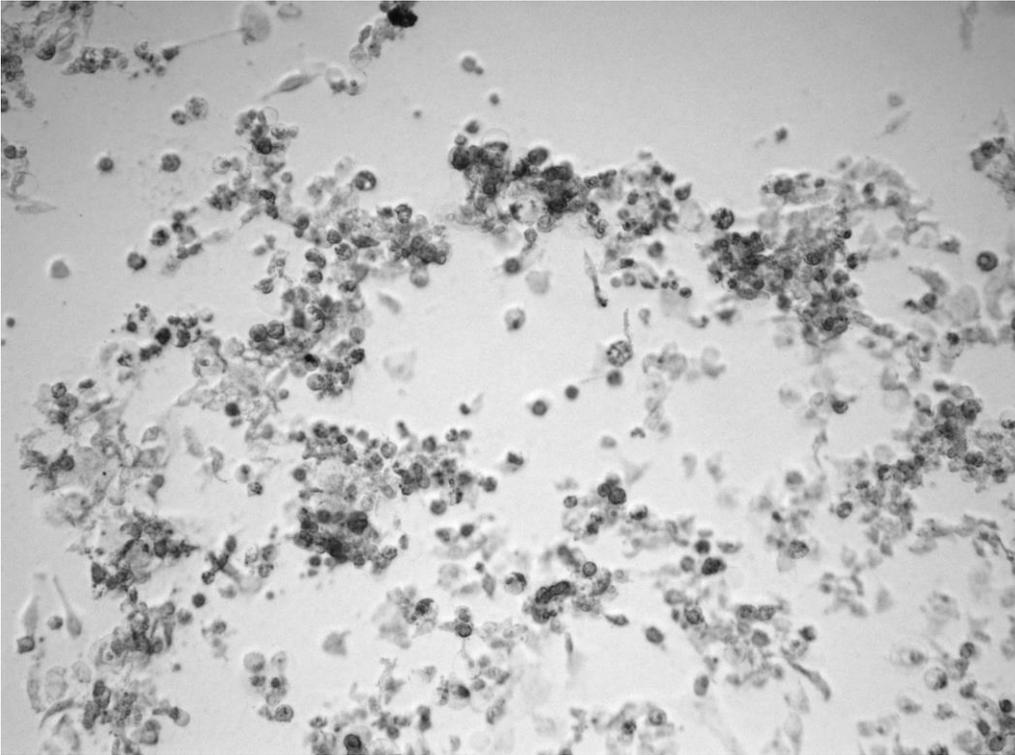
**Abbildung 5: MDBK-Zellen nach Infizierung mit BEV  
(100x Vergrößerung, 3 Tage *post infectionem*, Infektiositätstiter 7,8 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml)**



**Abbildung 6: MDBK-Zellen nach Infizierung mit BVDV**  
(100x Vergrößerung, 5 Tage *post infectionem*, Infektiositätstier 7,6 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml)



**Abbildung 7: native SpeV-Zellen ohne cpE (100x Vergrößerung)**



**Abbildung 8: SpeV-Zellen nach Infizierung mit PPV**

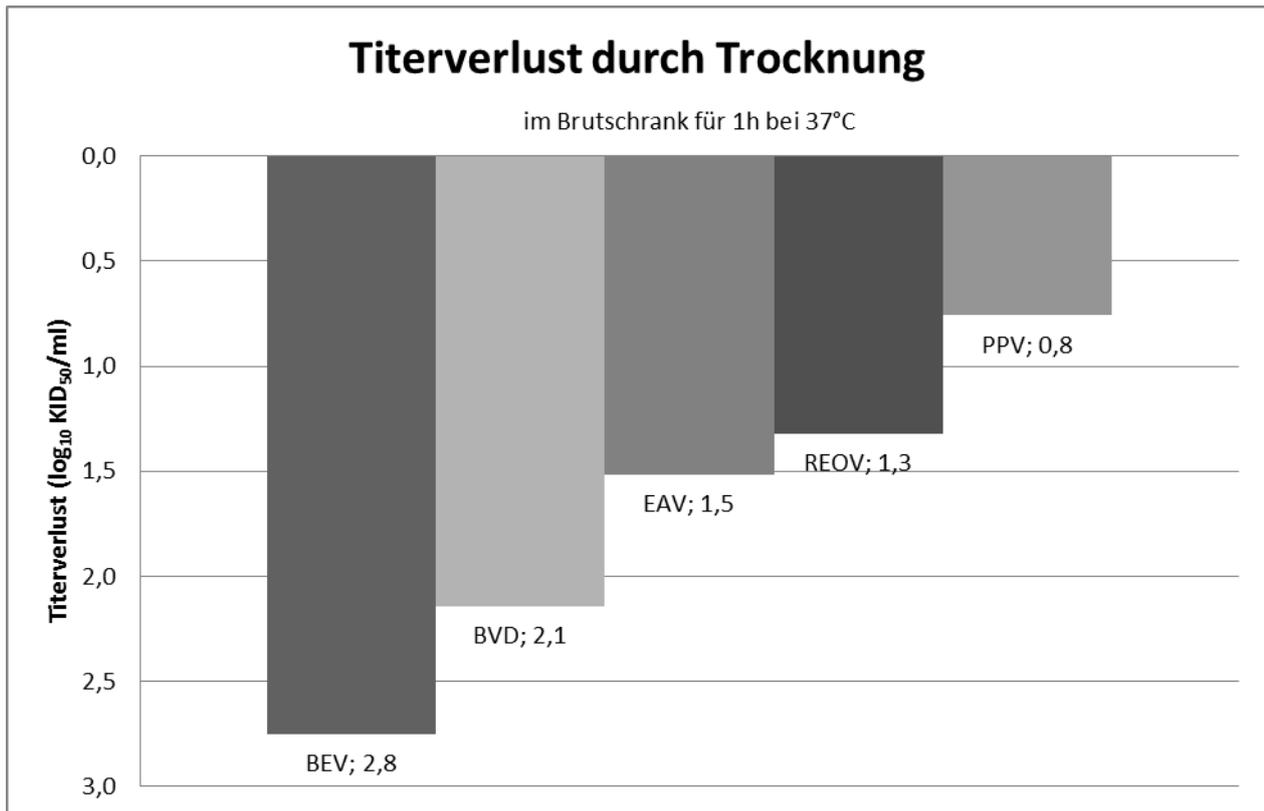
**(100x Vergrößerung, 5 Tage *post infectionem*, Infektiositätstier 6,6 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml)**

#### **4.2 Trocknungsverluste aller Prüfviren**

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen bei allen untersuchten Prüfviren einen Titerverlust durch das Trocknungsverfahren. Dieser Verlust ist abhängig von dem verwendeten Virus und der jeweiligen Trocknungsmethode verschieden stark ausgeprägt. Die genauen Titerverluste sind Tabelle 4 und Tabelle 5 auf Seite 76 und 77 zu entnehmen.

##### **4.2.1 Trocknungsversuche im Brutschrank**

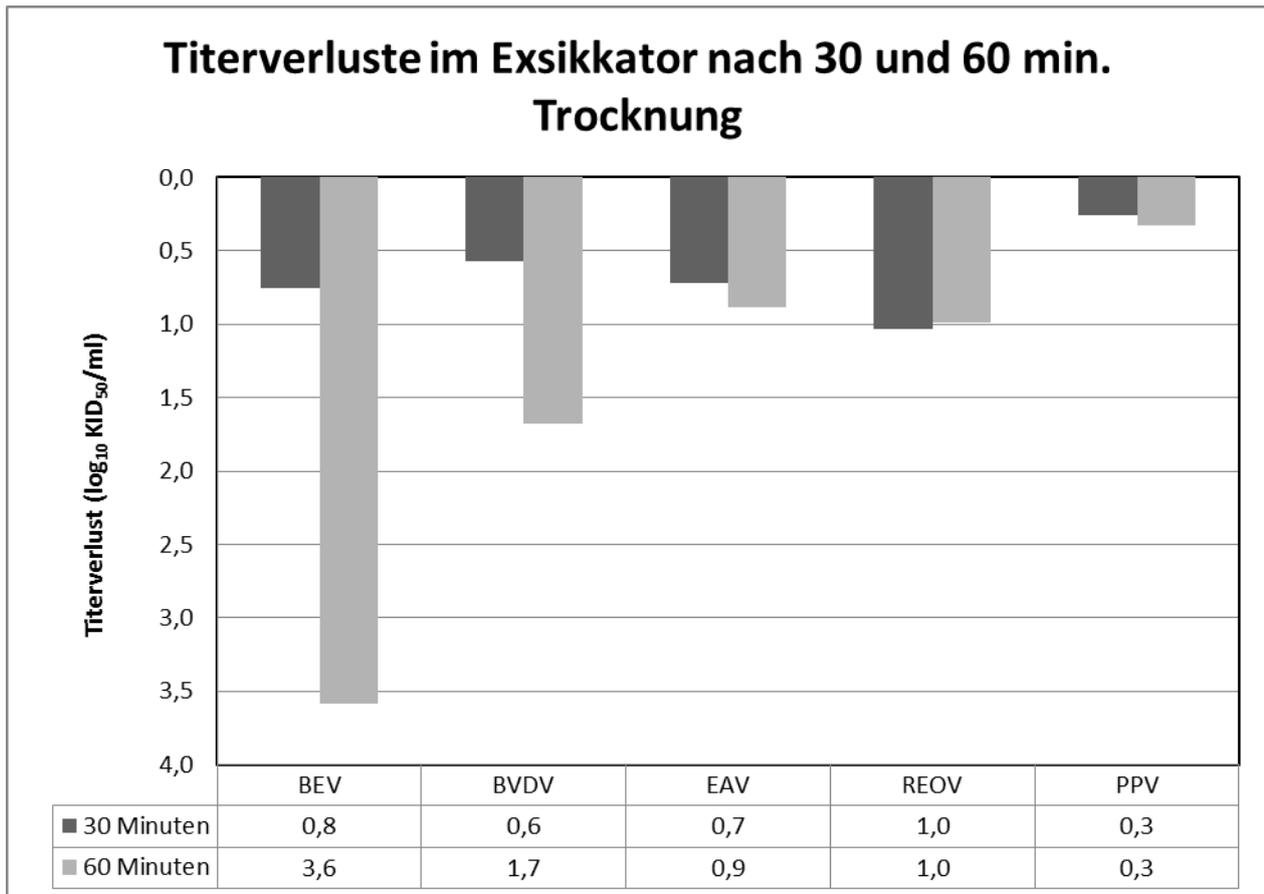
Auf die Ergebnisse der Versuche mit 15 und 30 Minuten Trocknungsdauer wird nicht eingegangen, da die Virussuspension auf den Keimträgern zu diesen Zeitpunkten noch nicht angetrocknet war. Nach 60 minütiger Trocknung betragen die Titerverluste von BEV zwischen 2,3 und 3,3 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml, die Verluste von BVDV zwischen 1,1 und 3,2 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. Bei EAV trat ein Titerverlust zwischen 0,9 und 2,2 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml auf, bei REO waren es zwischen 1,0 und 1,8 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. PPV zeigte den geringsten Titerverlust von 0,4 bis 1,5 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. Abbildung 9 zeigt den durchschnittlichen Titerverlust eines jeden Virus aus drei separat durchgeführten Versuchen.



**Abbildung 9: Titerverlust durch 60 minütige Trocknung im Brutschrank**

#### 4.2.2 Trocknungsversuche im Exsikkator

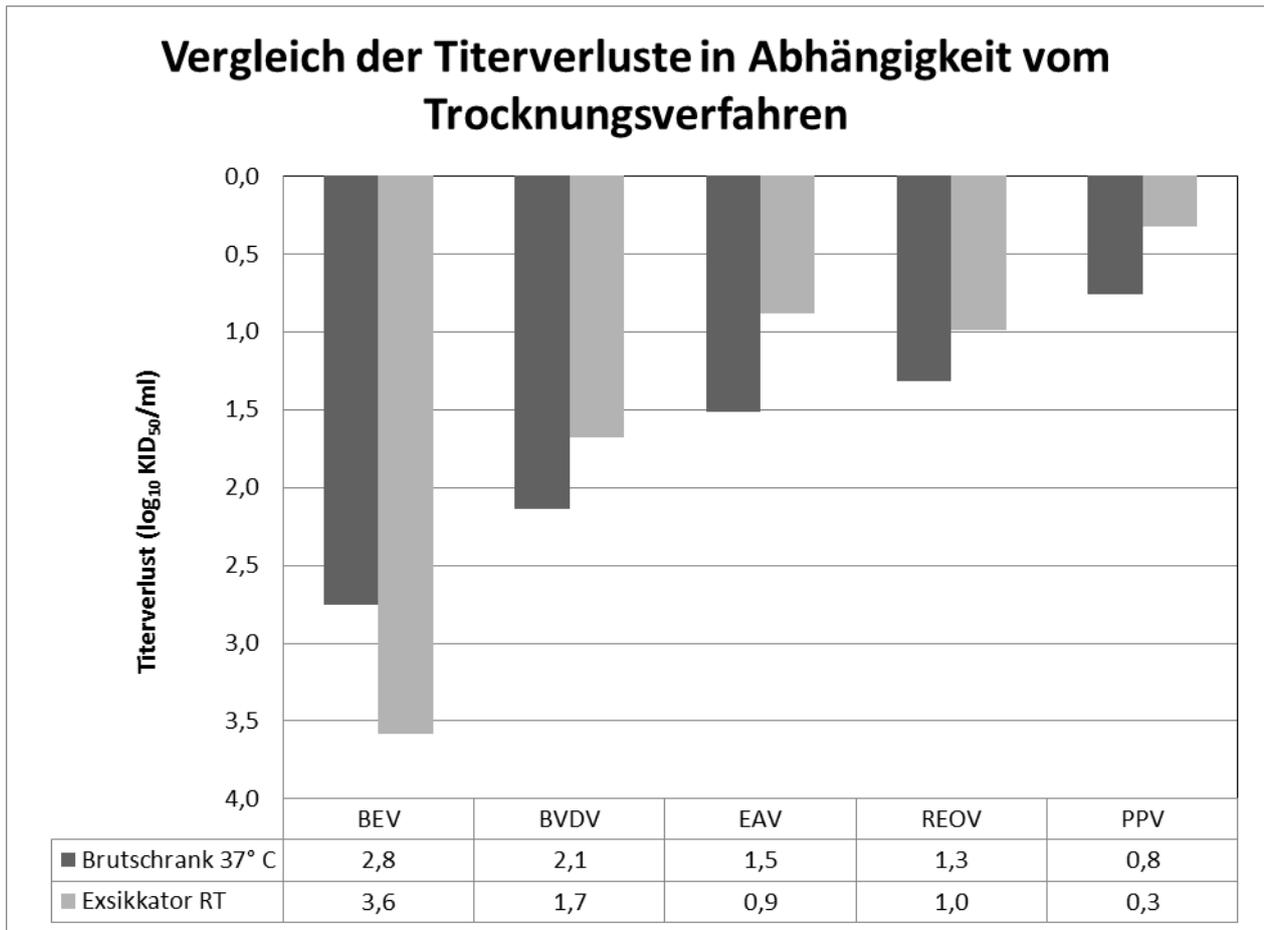
Auf die Ergebnisse nach 15 Minuten Trocknungsdauer wird nicht eingegangen, da die Virussuspension auf den Keimträgern zu diesem Zeitpunkt noch nicht angetrocknet war. Nach 30 minütiger Trocknung waren die benetzten Keimträger noch leicht feucht, allerdings wurde die Virussuspension durch den Holzkeimträger aufgesogen und es war keine freie Flüssigkeit auf der Oberfläche sichtbar. Nach einer 30 minütigen Trocknung lag die Titerreduktion von BEV zwischen 0,6 und 0,9 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. BVDV zeigte einen Titerverlust zwischen 0,4 und 0,7 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. Im Falle von EAV lag die Titerreduktion zwischen 0,3 und 1,0 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml, bei REOV zwischen 0,8 und 1,2 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. PPV zeigte den geringsten Verlust zwischen 0,1 und 0,5 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. Nach 60 Minuten Trocknung lag die Titerreduktion von BEV zwischen 3,1 und 4,2 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. BVDV zeigte einen Titerverlust zwischen 0,9 und 2,6 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. Bei EAV lag die Titerreduktion zwischen 0 und 1,4 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml, bei REOV zwischen 0,5 und 1,4 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. PPV zeigte wieder den geringsten Verlust zwischen 0,1 und 0,5 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. Tabelle 5 auf Seite 77 zeigt den durchschnittlichen Titerverlust eines jeden Virus aus drei separat durchgeführten Versuchen.



**Abbildung 10: Titerverluste im Exsikkator nach 30 und 60 minütiger Trocknung**

#### 4.2.3 Vergleich der Titerverluste in Abhängigkeit vom Trocknungsverfahren

Der Titerverlust der Prüfviren fällt bei der Trocknung im Exsikkator geringer als bei der Trocknung im Brutschrank aus. Die einzige Ausnahme ist BEV, bei welchem der Titerverlust mit durchschnittlich 3,6  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  nach der Trocknung im Exsikkator deutlich höher ist als nach der Trocknung im Brutschrank mit 2,8  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ . Ein Vergleich über die durchschnittlichen Titerverluste ist getrennt für jedes Virus und beide Trocknungsverfahren aus Abbildung 11 zu entnehmen.



**Abbildung 11: Titerverluste nach 60 minütiger Trocknung im Brutschrank und im Exsikkator**

### 4.3 Ergebnisse der Toxizitätsprüfung

Die Ergebnisse der Toxizitätsprüfung sind in den **Tabelle 6** bis **Tabelle 10** des Anhangs auf Seite 78 bis 82 dargestellt und dienen als Grundlage für die Bestimmung der viruziden Wirkung der Desinfektionsmittel. Hierbei wurde untersucht, ab welcher Konzentration das jeweilige Desinfektionsmittel zytotoxische Effekte auf die entsprechende Zellkultur bewirkt. Die Ergebnisse der Toxizitätsprüfung wurden bei der Planung und Auswertung der Keimträgerversuche berücksichtigt. Dabei zeigte sich, dass lediglich Glutaraldehyd einen zytotoxischen Effekt auf alle drei untersuchten Zelllinien besitzt. Die Konzentration, die zytotoxische Effekte hervorrief, war abhängig von der verwendeten Zelllinie unterschiedlich hoch. Bei SpeV-Zellen rief bereits eine Konzentration von 0,25% Glutaraldehyd zytotoxische Effekte hervor. Bei MDBK-Zellen zeigten sich Veränderungen ab 0,5%. Vero-Zellen zeigten sich am wenigsten empfindlich gegenüber Glutaraldehyd. Hier traten erst ab einer Konzentration von 0,75% zytotoxische Effekte auf. Peressigsäure rief in den untersuchten Konzentrationen nur bei MDBK-Zellen (ab 0,1%) und bei

SpeV-Zellen (ab 0,25%) zytotoxische Effekte hervor. Natriumhypochlorit erzeugte nur bei SpeV-Zellen zytotoxische Effekte ab einer Konzentration von 0,5%. Die untersuchten Konzentrationen von Ameisensäure und Natronlauge riefen bei keiner der drei Zelllinien zytotoxische Effekte hervor.

#### **4.4 Ergebnisse der Behandlungsversuche**

Nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes wurden die behandelten und unbehandelten Zellkulturplatten mikroskopisch ausgewertet und der Infektiositätstiter des verwendeten Virus bestimmt (vgl. 3.2.4 und 3.2.5). Nach der Berechnung konnten so Vergleiche zwischen der unbehandelten Kontrollplatte und den behandelten Zellkulturplatten angestellt werden. Bei BEV und BVDV lag die größte Abweichung des Infektiositätstiters zwischen behandelten und unbehandelten Zellen bei  $0,3 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ . Bei EAV, PPV und REOV lag die größte Differenz bei  $0,4 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ . Alle Ergebnisse sind in Tabelle 11 auf Seite 83 dargestellt.

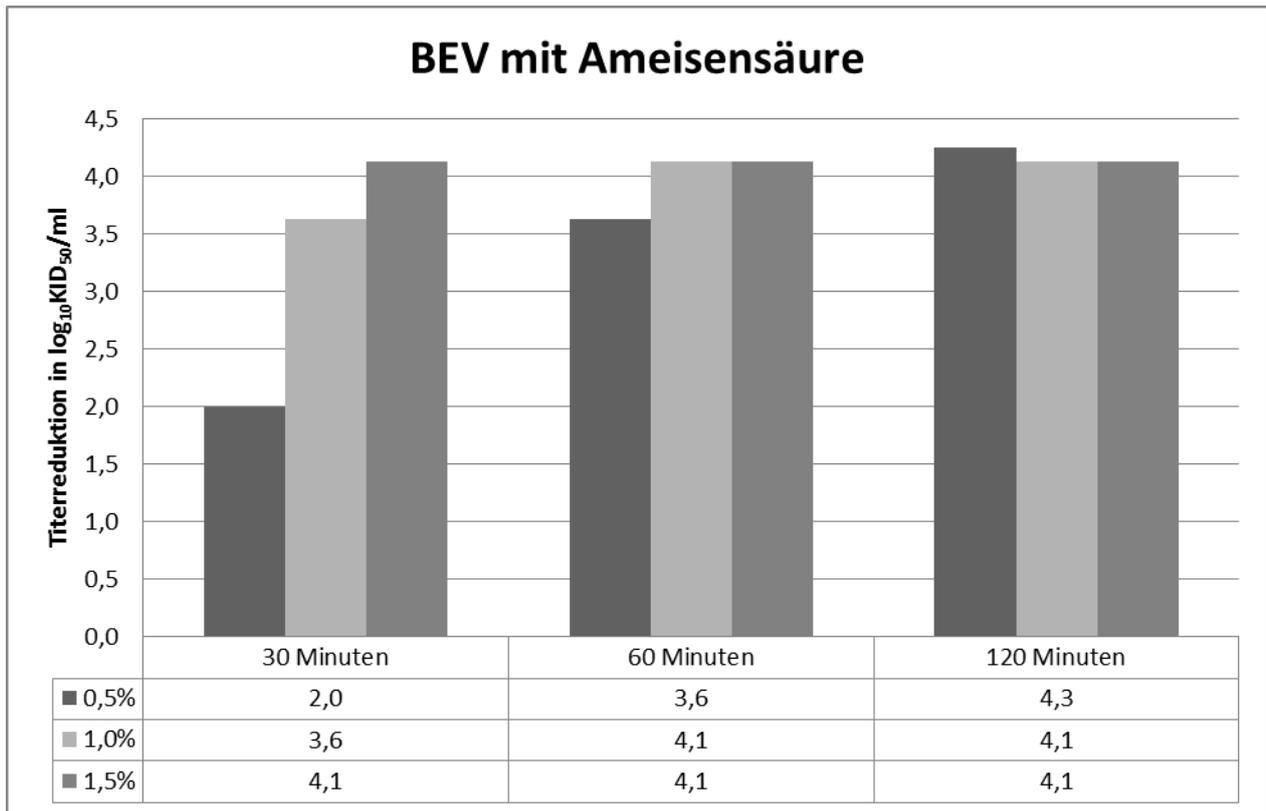
#### **4.4 Ergebnisse der viruziden Wirksamkeit der Desinfektionsmittel in den Keimträgerversuchen**

In den nachfolgenden Punkten 4.4.1 – 4.4.5 wurden alle Prüfviren hinsichtlich der minimal benötigten Konzentration eines Desinfektionsmittels für eine vollständige Virusinaktivierung nach 30 minütiger Einwirkzeit beschrieben und abgebildet. Eine vollständige Inaktivierung entsprach einer Titerreduktion von mindestens 3 Logarithmusstufen gegenüber der entsprechenden Viruskontrolle. Die Ausgangstiter nach dem Auftauen betrugen  $7,8 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  bei BEV,  $7,6 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  bei BVDV und EAV,  $8,2 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  im Falle von REOV und  $6,6 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  bei PPV.

##### **4.4.1 Keimträgerversuche mit BEV**

BEV zeigte bei den Keimträgerversuchen eine hohe Tenazität, was sich in den benötigten Konzentrationen der verwendeten Desinfektionsmittel widerspiegelte. Eine Ausnahme war die Peressigsäure, von der deutlich niedrigere Konzentrationen von 0,05% bei 30 minütiger Einwirkzeit wirksam waren. Bei den Desinfektionsmittelversuchen mit Glutaraldehyd konnte keine vollständige Virusinaktivierung bestätigt werden, da bei den untersuchten Konzentrationen zytotoxische Veränderungen an der verwendeten Zelllinie auftraten. Da bei der Ablesung und Berechnung des Infektiositätstiters nicht zwischen einem viruspezifischen cpE und einem

zytotoxischen cpE unterschieden werden konnte, erhöht sich die Nachweisgrenze bei den Versuchen mit Glutaraldehyd um eine Logarithmusstufe. Bei den Versuchen mit Ameisensäure und Natriumhypochlorit waren Konzentrationen jeweils 1% notwendig. Für eine vollständige Inaktivierung bei der Verwendung von Natronlauge war eine Konzentration von 1,5% nötig. Alle weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 12 auf Seite 84 dargestellt.



**Abbildung 12: Viruzide Wirkung von Ameisensäure im Holzkeimträgerversuch mit BEV**

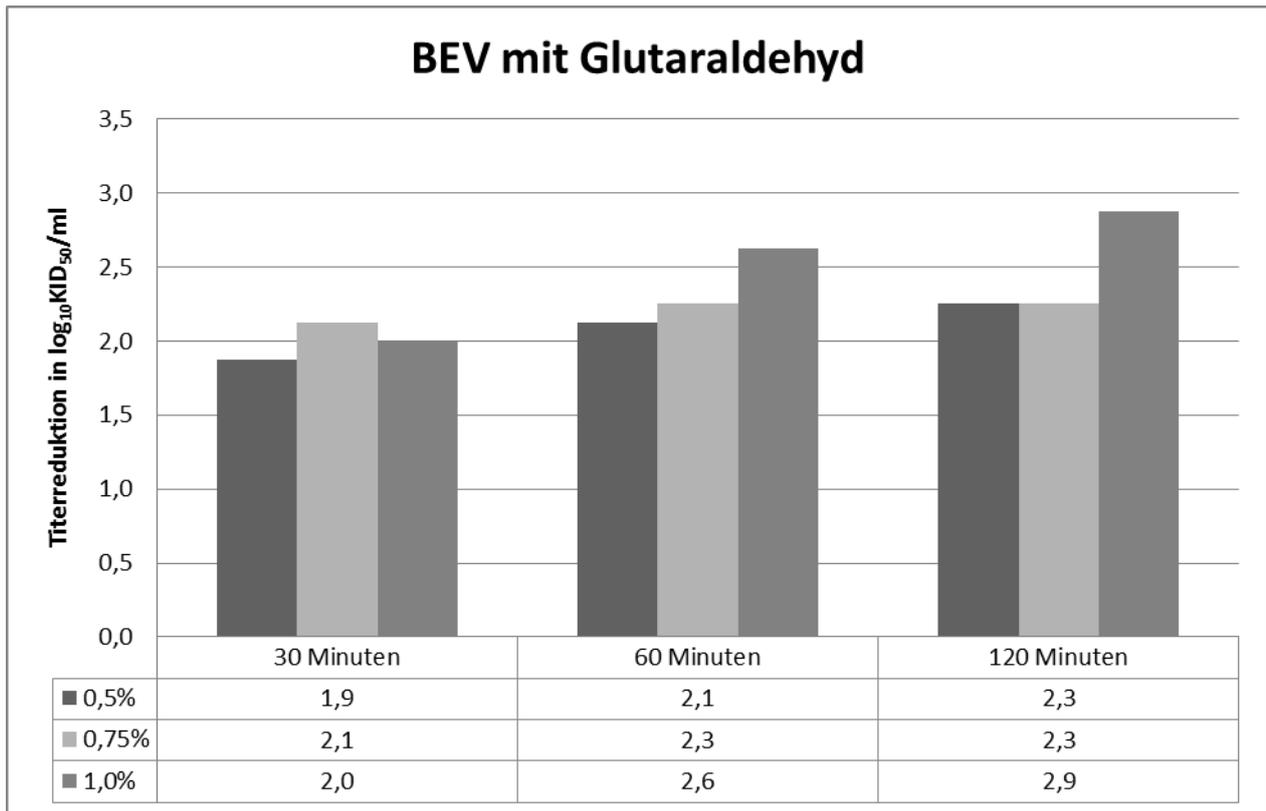


Abbildung 13: Viruzide Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch mit BEV

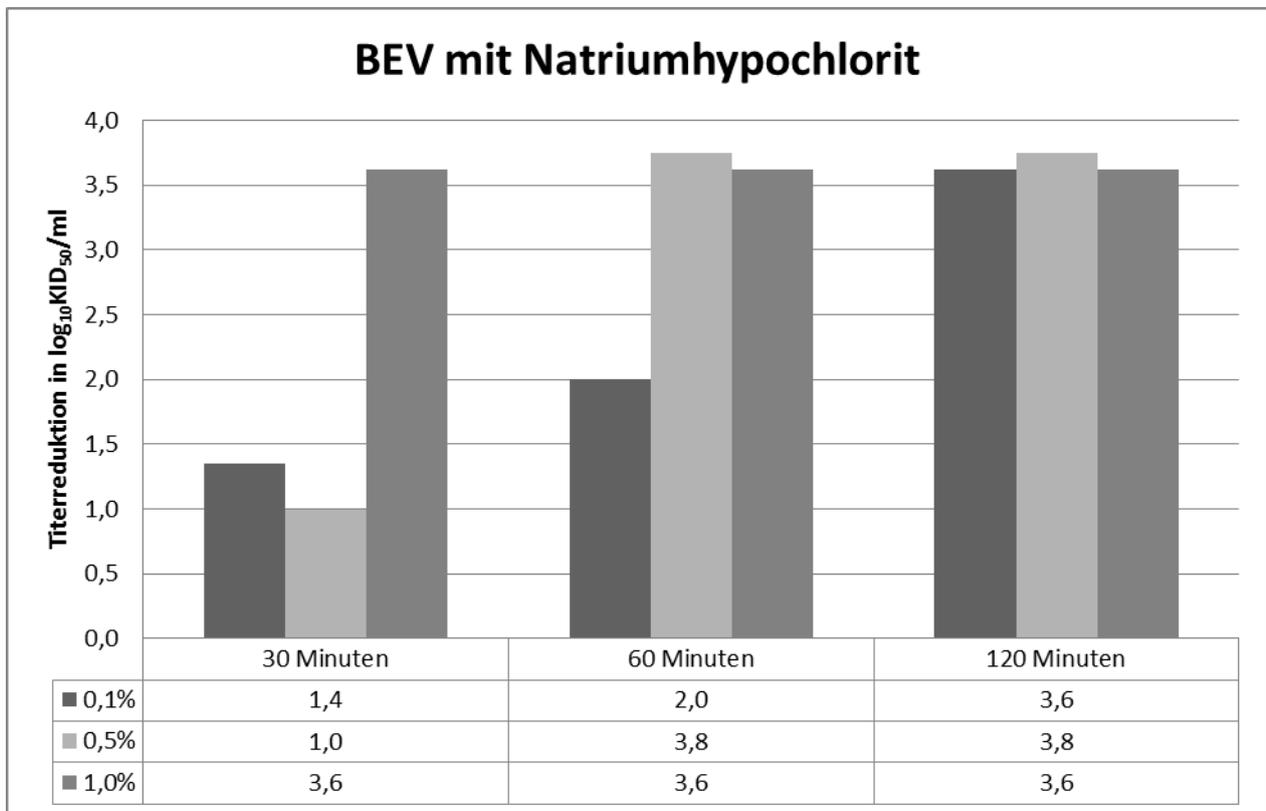


Abbildung 14: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Holzkeimträgerversuch mit BEV

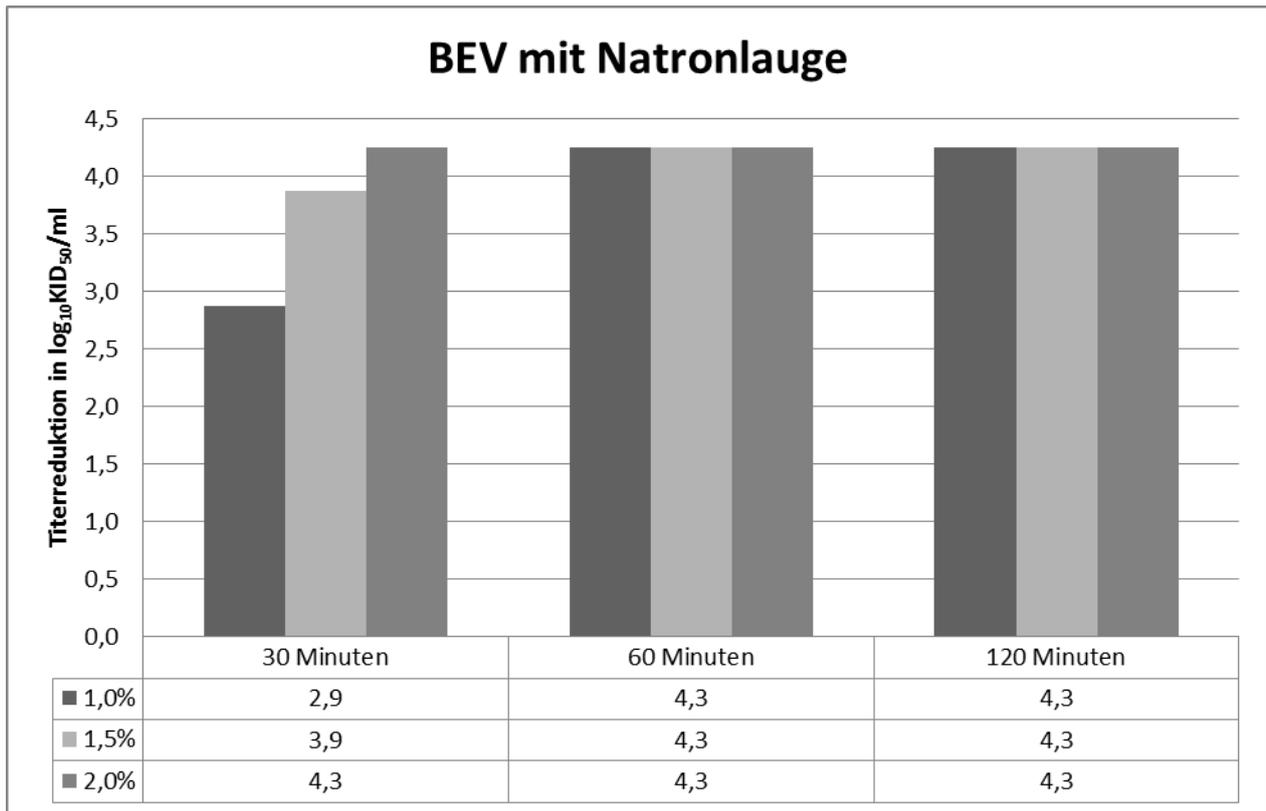


Abbildung 15: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Holzkeimträgerversuch mit BEV

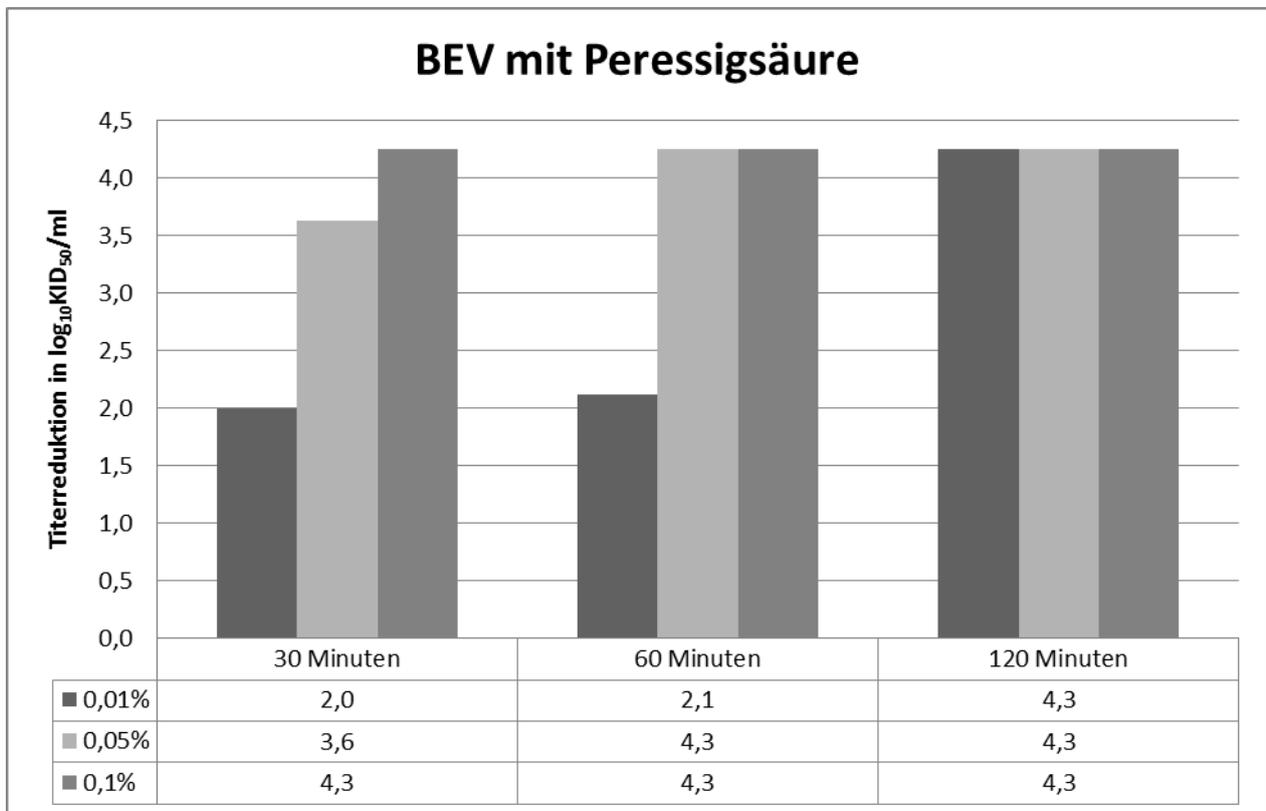
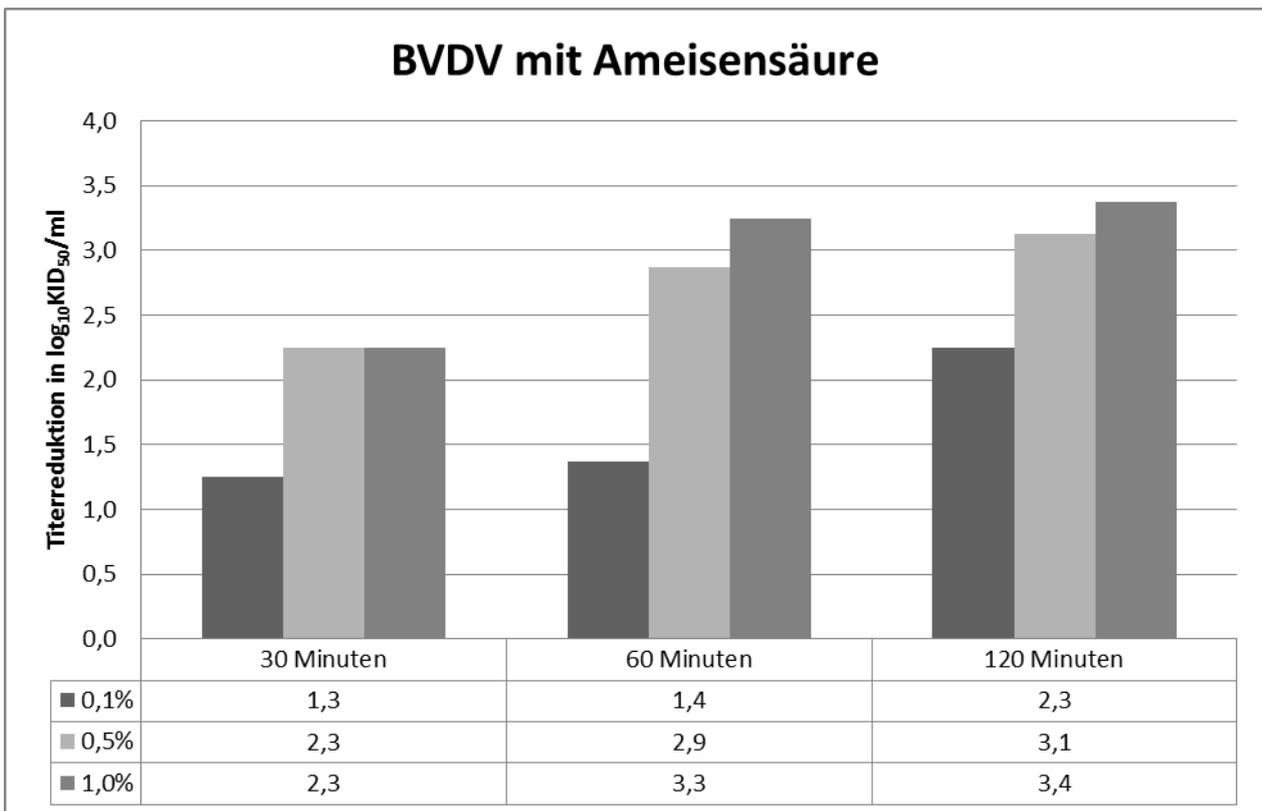


Abbildung 16: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Holzkeimträgerversuch mit BEV

#### 4.4.2 Keimträgerversuche mit BVDV

BVDV zeigte als Vertreter der behüllten Viren eine niedrige Tenazität gegenüber den verwendeten Desinfektionsmitteln. Problematisch waren bei den Versuchen mit BVDV die niedrigen Titer der Viruskontrollen (vgl. Tabelle 13 auf Seite 85), die zwischen 5,2 und 5,8  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  lagen, durch welche die angestrebte Titerreduktion von 3 Logarithmusstufen nicht eingehalten werden konnte. Die höchste Titerreduktion bei den Versuchen mit Glutaraldehyd und Natriumhypochlorit betrug 2,8  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ . Bei einer 0,05%igen Peressigsäurelösung waren es 2,5  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  und bei einer 1%igen Natronlauge 2,4  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ . Lediglich bei den Versuchen mit 1%iger Ameisensäure konnte nach 60 minütiger Einwirkzeit, bzw. mit 0,5%iger Ameisensäure nach 120 minütiger Einwirkzeit eine Reduktion von mehr als 3 Logarithmusstufen erzielt werden. Alle weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 13 auf Seite 85 dargestellt.



**Abbildung 17: Viruzide Wirkung von Ameisensäure im Holzkeimträgerversuch mit BVDV**

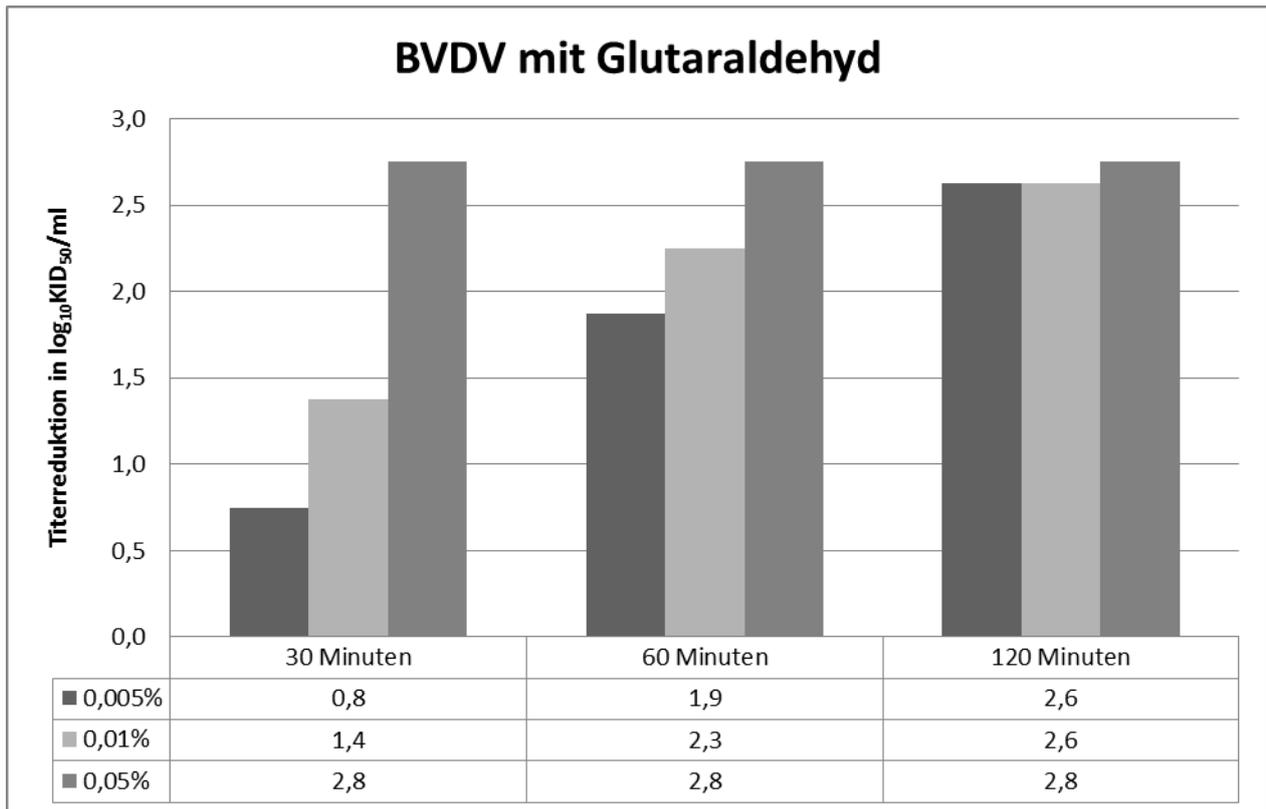


Abbildung 18: Viruzide Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch mit BVDV

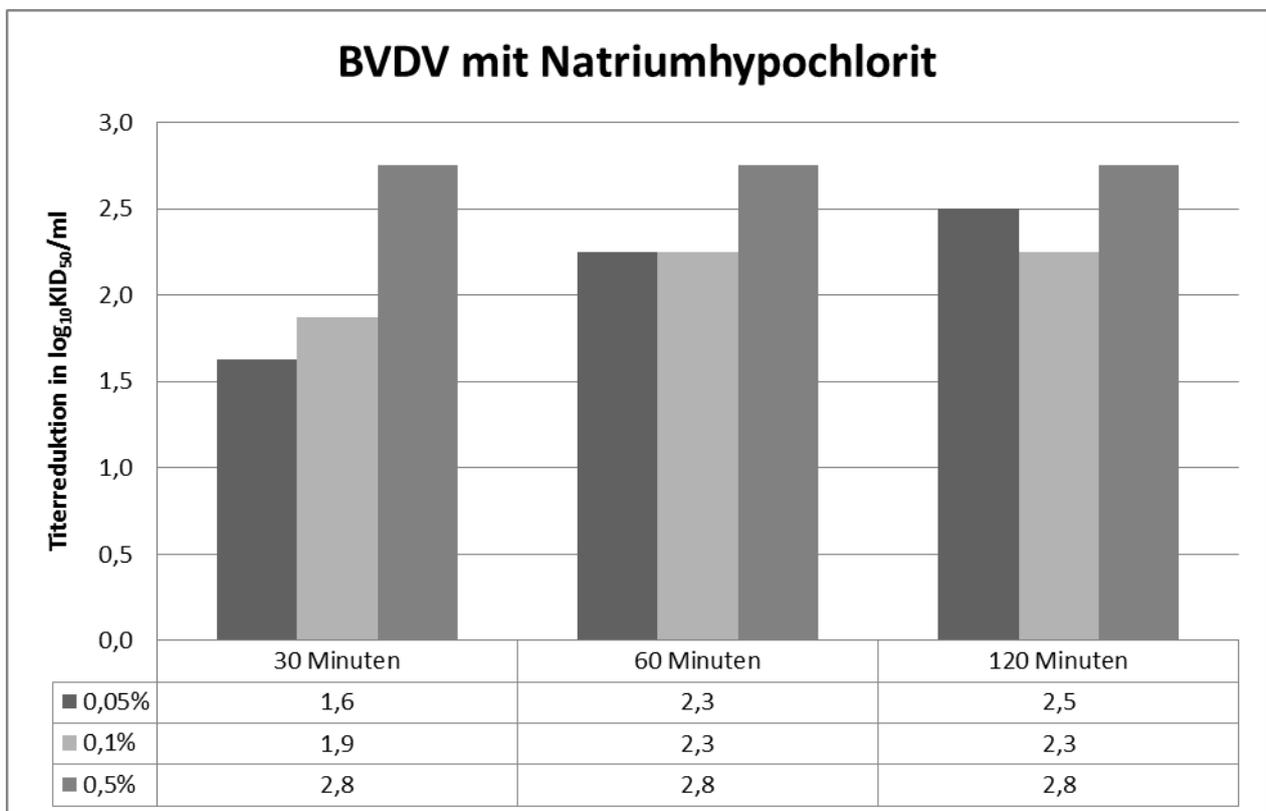


Abbildung 19: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Holzkeimträgerversuch mit BVDV

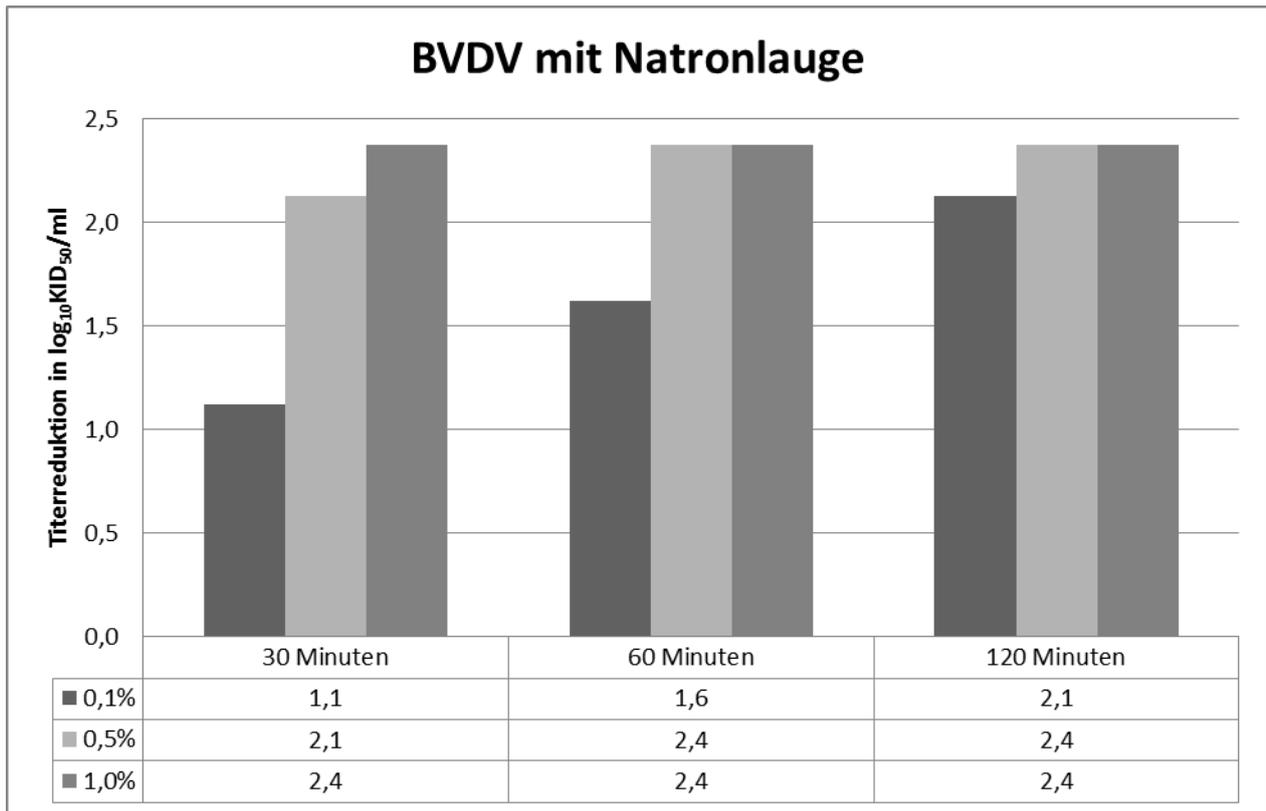


Abbildung 20: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Holzkeimträgerversuch mit BVDV

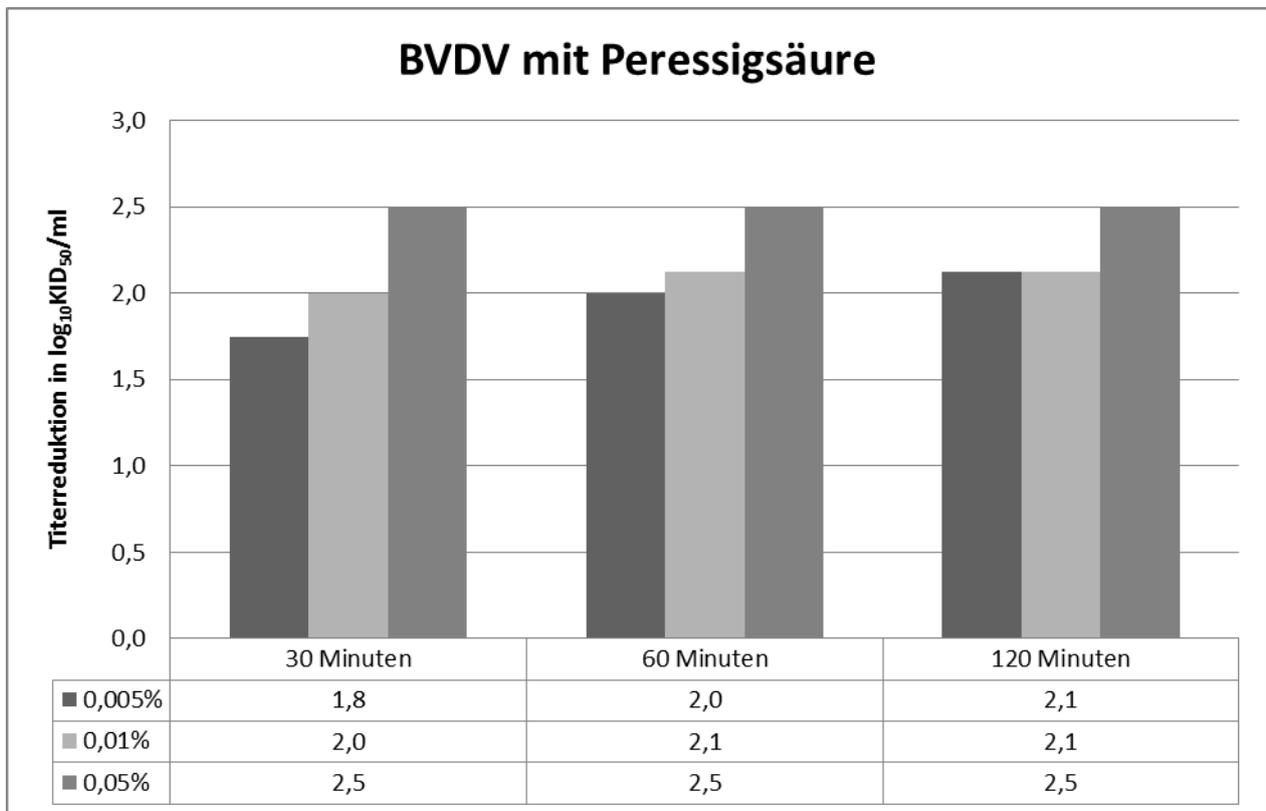


Abbildung 21: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Holzkeimträgerversuch mit BVDV

#### 4.4.3 Keimträgerversuche mit EAV

EAV zeigte als zweiter Vertreter der behüllten Viren eine ebenfalls niedrige Tenazität gegenüber den verwendeten Desinfektionsmitteln. Problematisch waren, wie auch bei den Versuchen mit BVDV, die niedrigen Titer der Viruskontrollen (vgl. Tabelle 14 auf Seite 86), die zwischen 5,4 und 5,7  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  lagen, durch welche die angestrebte Titerreduktion von 3 Logarithmusstufen nicht eingehalten werden konnte. Mit 1%iger Ameisensäure konnte eine Titerreduktion von 2,5  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  erreicht werden. Das gleiche Resultat ergab sich durch die Verwendung von 0,005%iger Peressigsäure oder 0,5%iger Natriumhypochloritlösung. Eine 0,5%ige Natronlauge reduzierte den Infektiositätstiter um 2,7  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ . Lediglich mit einer 0,005%igen Glutaraldehydlösung konnte eine vollständige Inaktivierung mit einer Titerreduktion von 3,1  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  nach 120 minütiger Einwirkzeit erzielt werden. Alle weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 14 auf Seite 86 dargestellt.

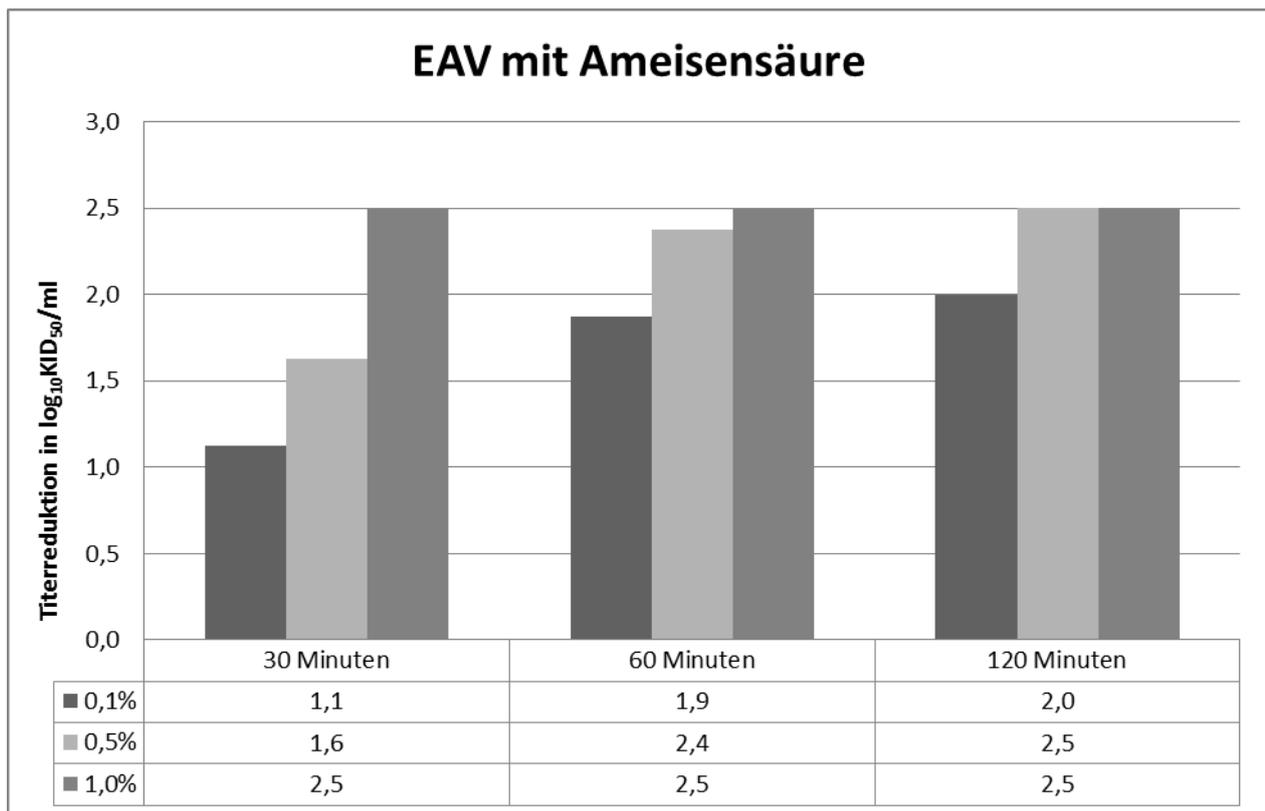


Abbildung 22: Viruzide Wirkung von Ameisensäure im Holzkeimträgerversuch mit EAV

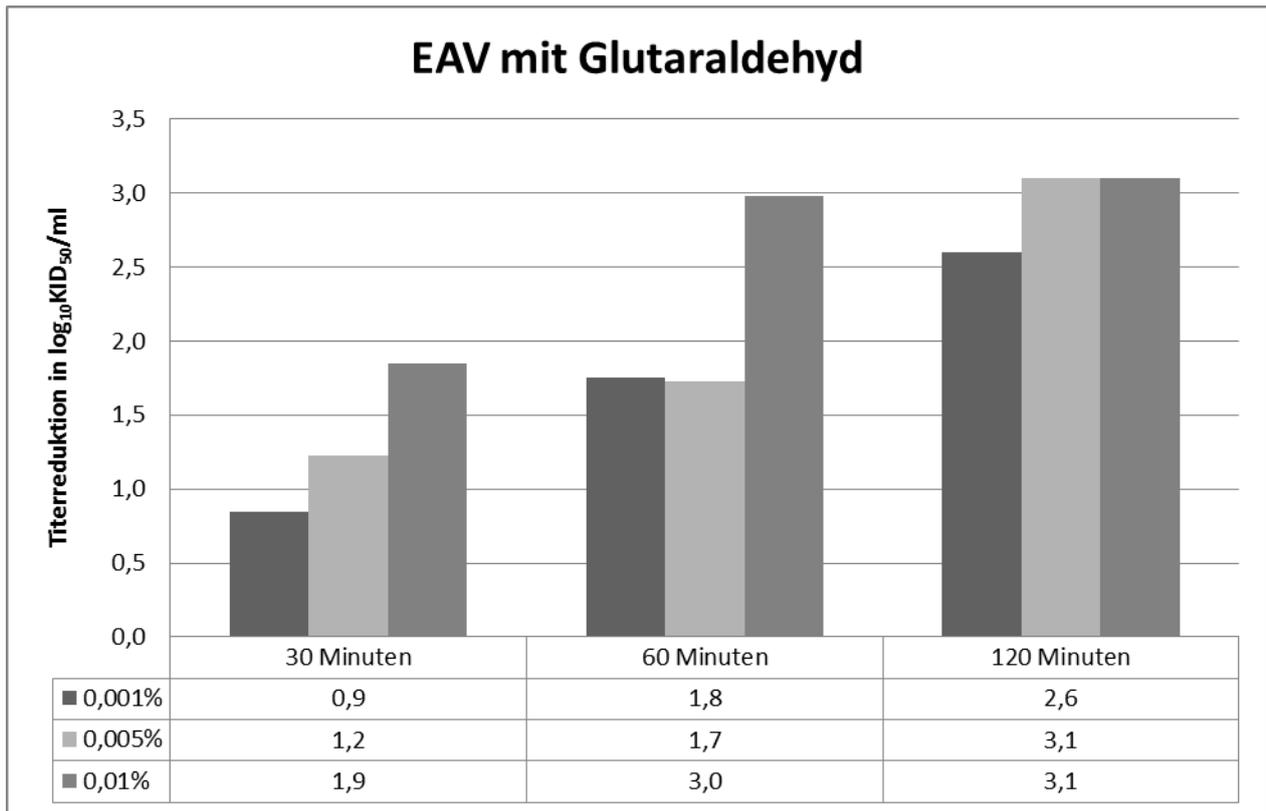


Abbildung 23: Viruzide Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch mit EAV

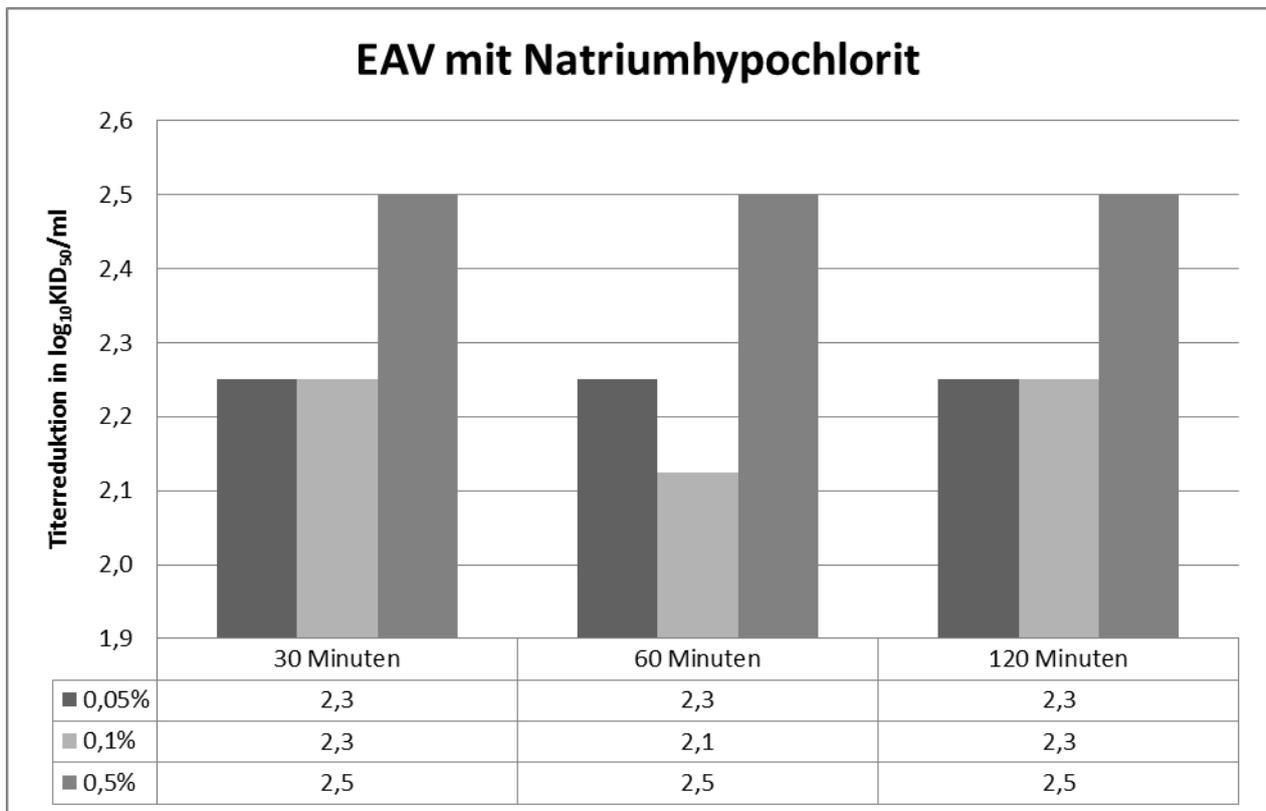


Abbildung 24: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Holzkeimträgerversuch mit EAV

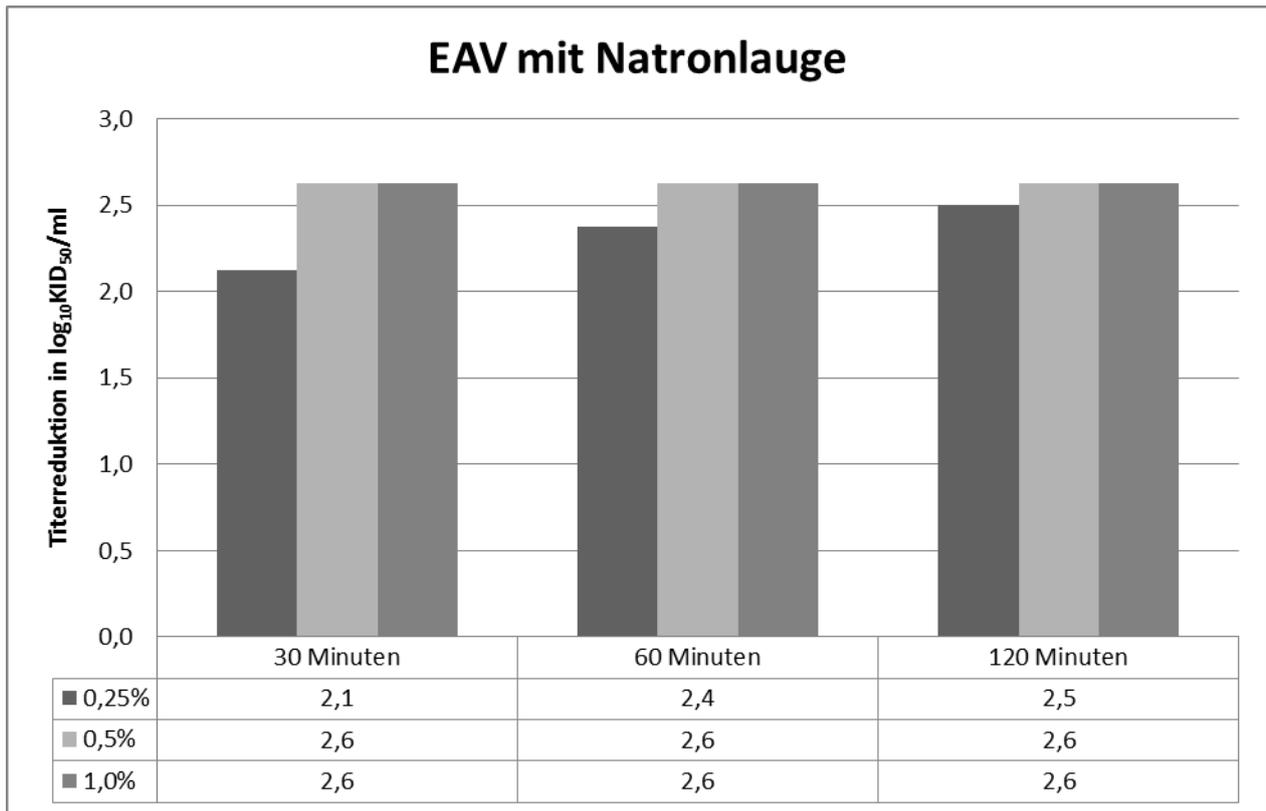


Abbildung 25: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Holzkeimträgerversuch mit EAV

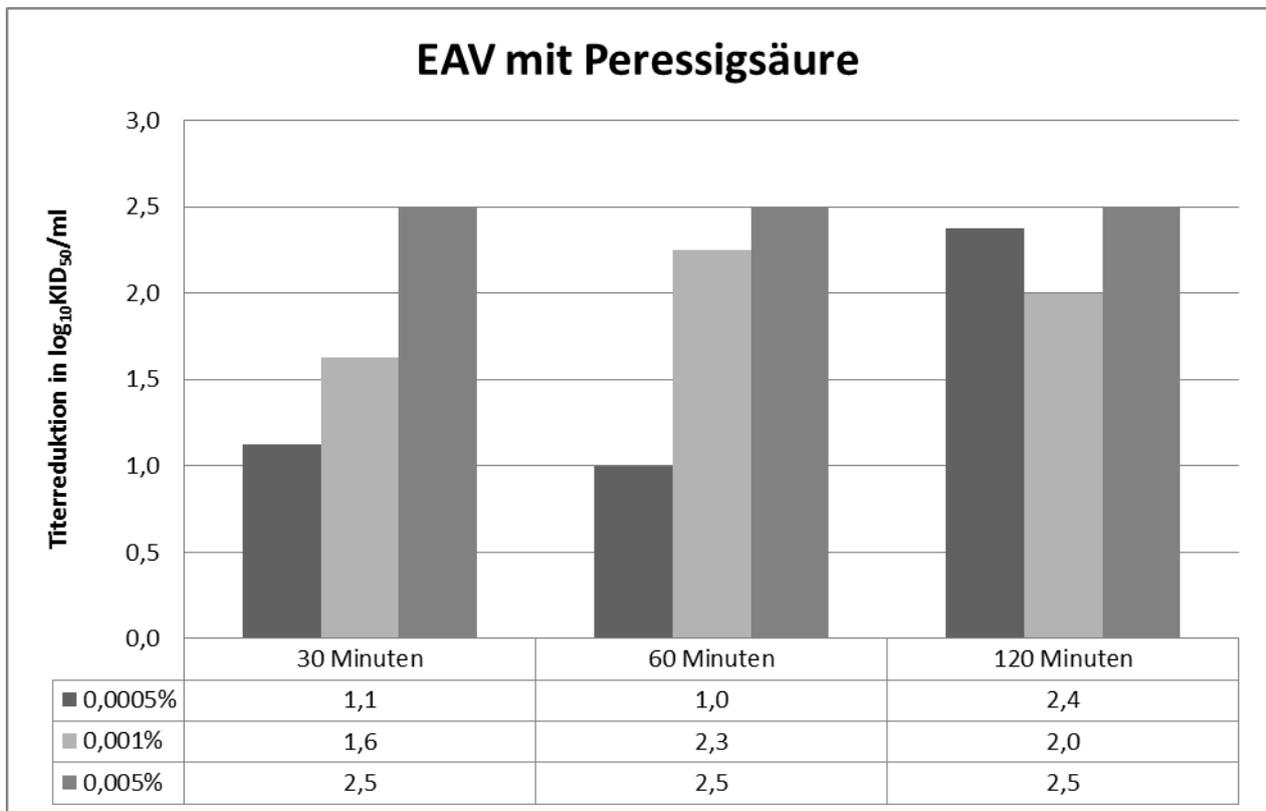


Abbildung 26: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Holzkeimträgerversuch mit EAV

#### **4.4.4 Keimträgerversuche mit PPV**

PPV zeigte in den Keimträgerversuchen die höchste Tenazität gegenüber den verwendeten Chemikalien. So wurde mit 10%iger Ameisensäure keine vollständige Inaktivierung erreicht. Versuche mit Konzentrationen von mehr als 10% Ameisensäure wurden als nicht zielführend und praktikabel erachtet und daher nicht durchgeführt. Bei der Verwendung von Peressigsäure genügten Anwendungskonzentrationen von 0,1% für eine vollständige Inaktivierung innerhalb von 30 Minuten. Bei Natriumhypochlorit war dazu eine 1%ige Lösung erforderlich. Bei den Versuchen mit 2%iger Natronlauge und 0,75%iger Glutaraldehydlösung wurde erst nach 60 Minuten eine vollständige Virusinaktivierung erreicht. Mit 0,25%igen und 0,5%igen Glutaraldehydlösungen waren dazu 120 Minuten Einwirkzeit notwendig. Bei Konzentrationen größer als 1% zeigten sich im Keimträgerversuch toxische Veränderungen an der verwendeten Zelllinie. Da bei der Ablesung und Berechnung des Infektiositätstiter nicht zwischen einem virusspezifischen cpE und einem zytotoxischen cpE unterschieden werden kann, erhöht sich die Nachweisgrenze bei den Versuchen mit mehr als 1% Glutaraldehyd um eine Logarithmusstufe. Die weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 15 auf Seite 87 dargestellt.

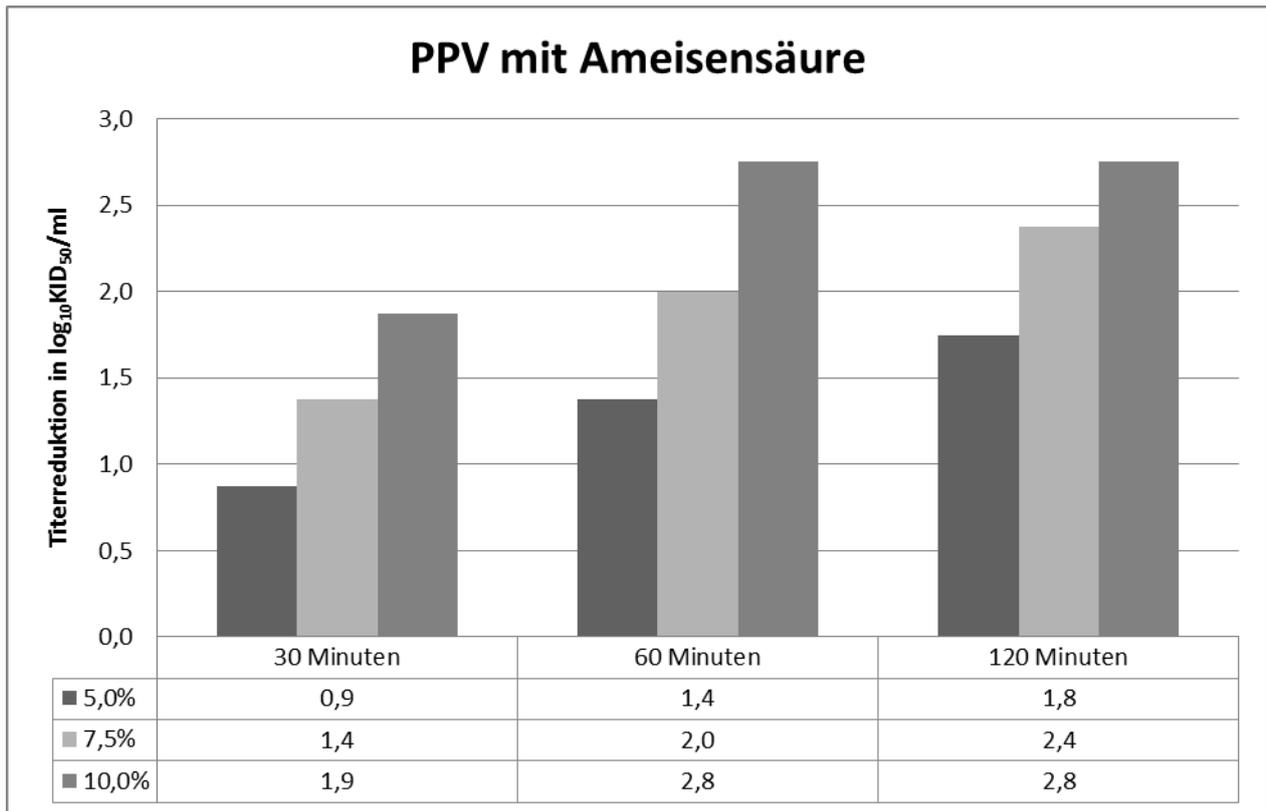


Abbildung 27: Viruzide Wirkung von Ameisensäure im Holzkeimträgerversuch mit PPV

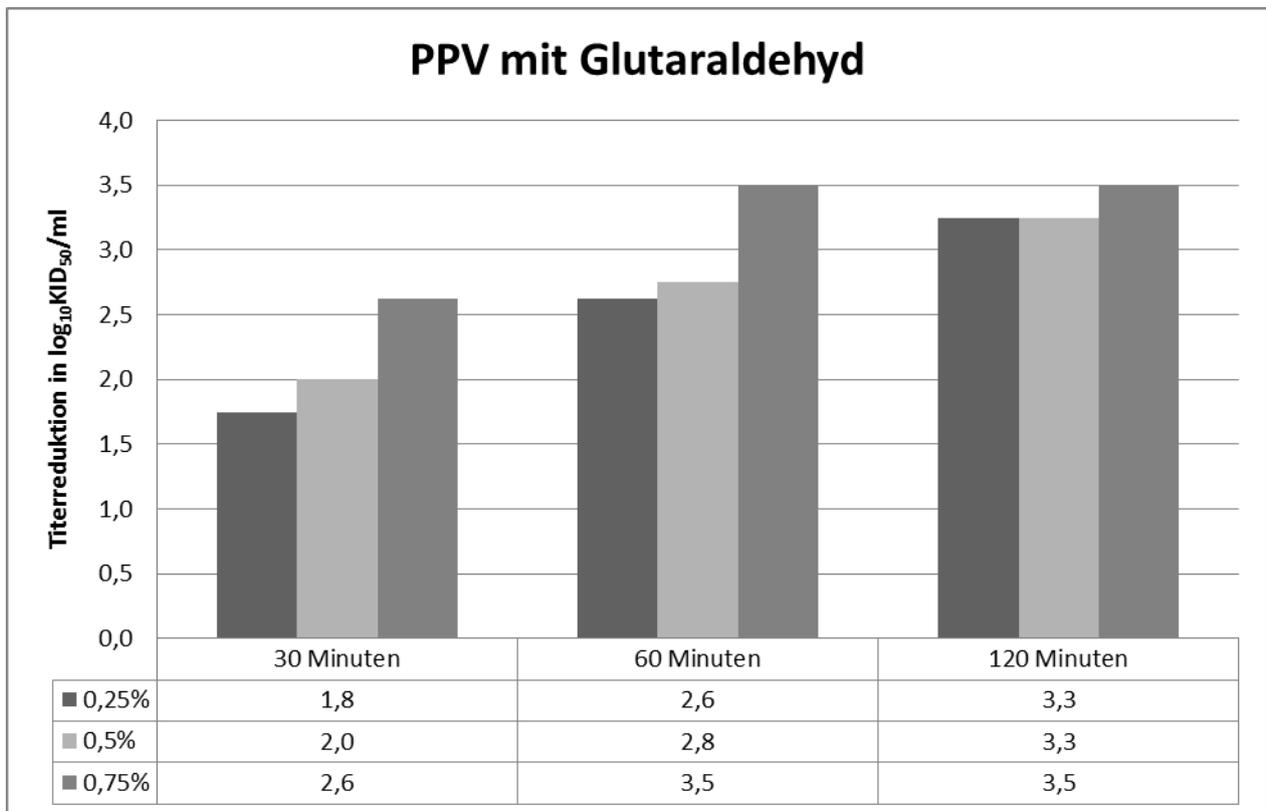


Abbildung 28: Viruzide Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch mit PPV

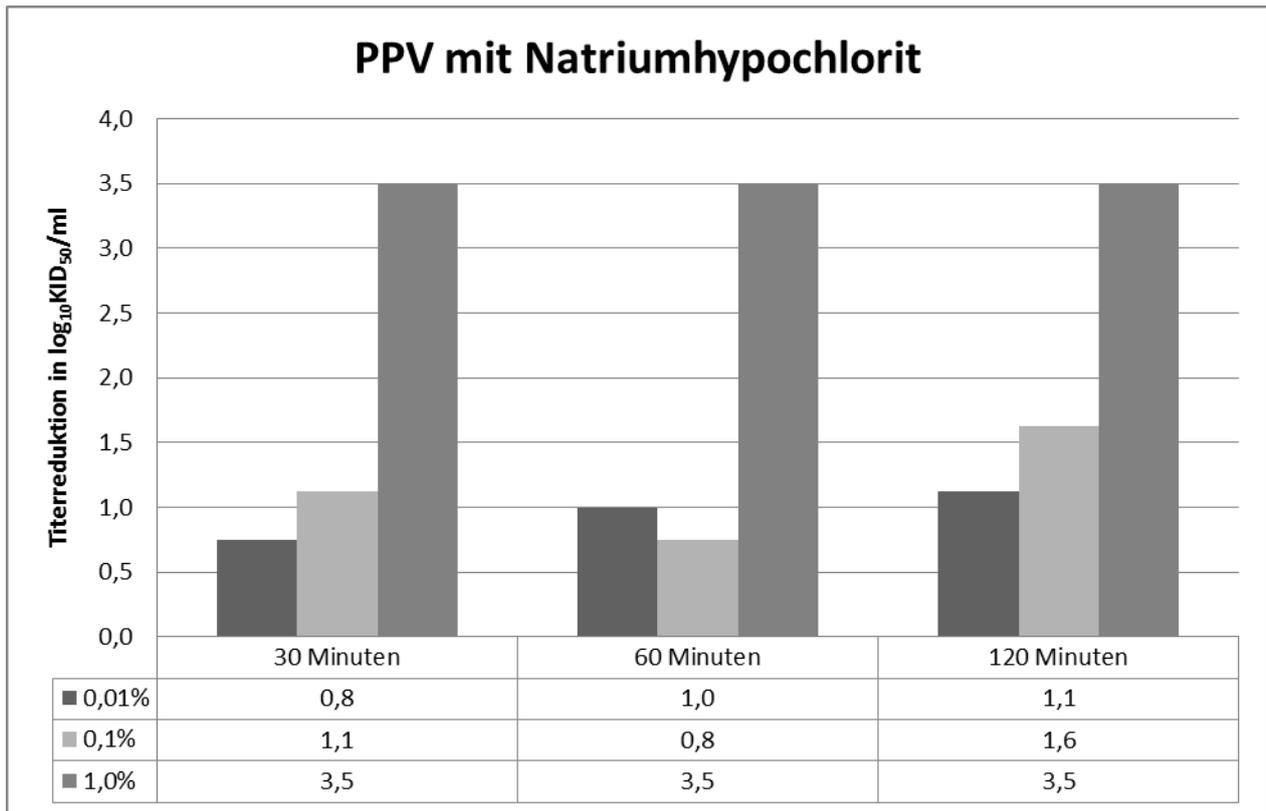


Abbildung 29: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Holzkeimträgerversuch mit PPV

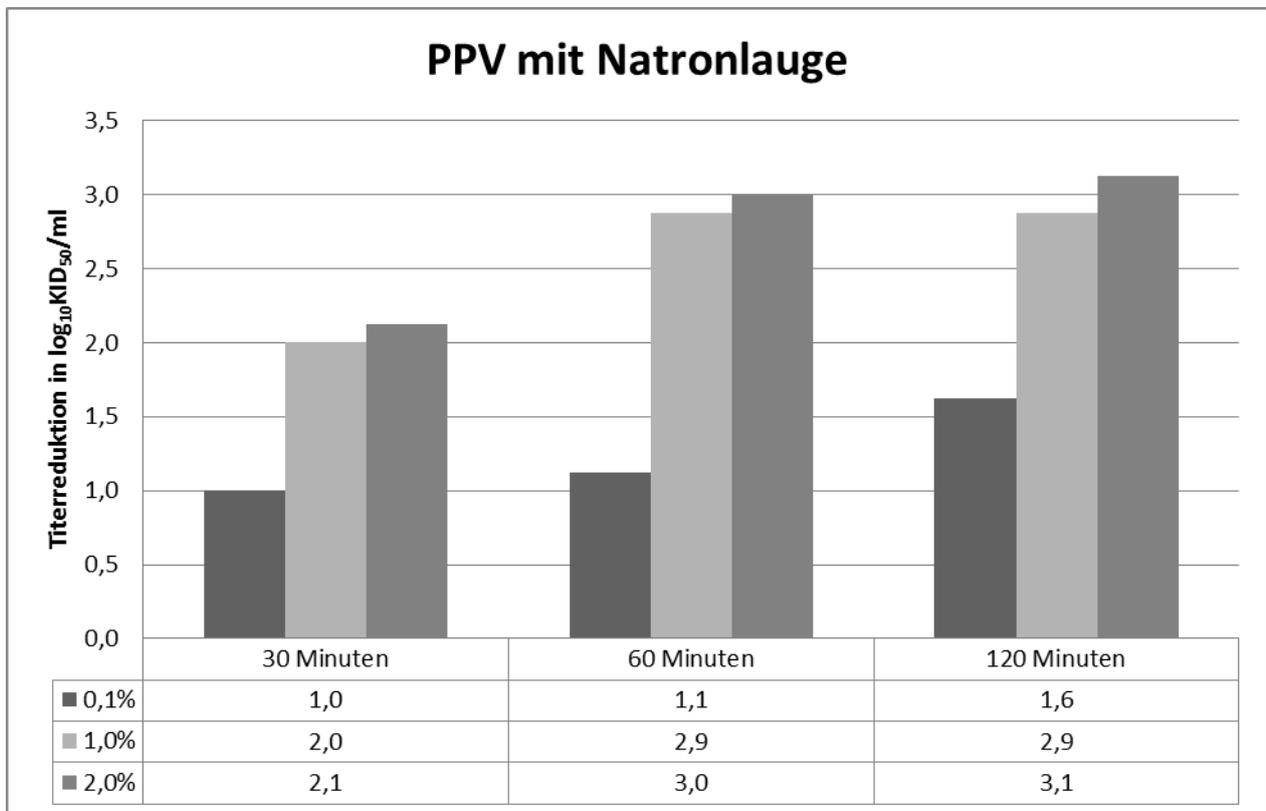
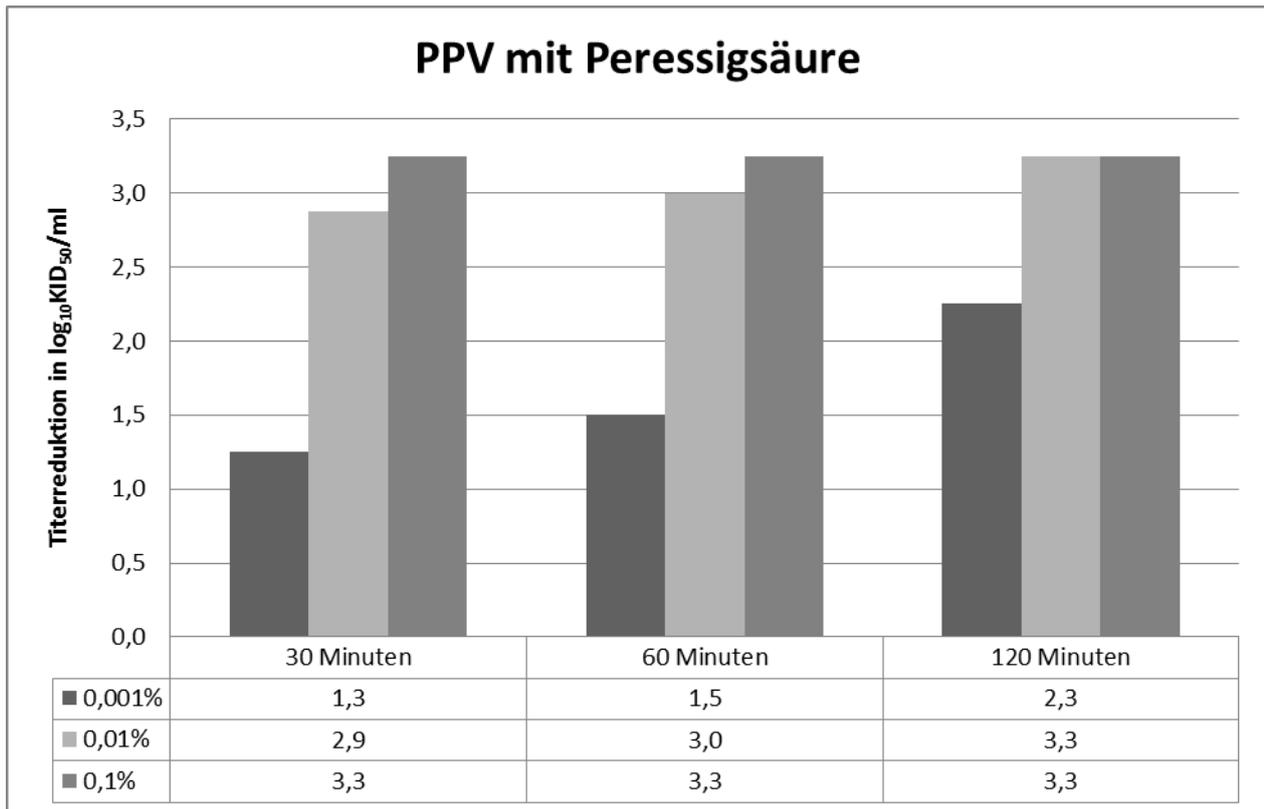


Abbildung 30: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Holzkeimträgerversuch mit PPV



**Abbildung 31: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Holzkeimträgerversuch mit PPV**

#### 4.4.5 Keimträgerversuche mit REOV

Das unbehüllte Reovirus wurde von Natriumhypochlorit in einer Anwendungskonzentration von 1% innerhalb von 30 Minuten, bzw. 0,5% innerhalb von 60 Minuten vollständig inaktiviert. Bei 1%iger Natronlauge waren ebenfalls 30 Minuten Einwirkzeit erforderlich, bei einer 0,5%igen Lösung verlängerte sich die Einwirkzeit auf 60 Minuten. Bei der Verwendung von Peressigsäure waren 0,05% für eine vollständige Virusinaktivierung nach 30 Minuten erforderlich. Bei geringeren Konzentrationen verlängerte sich auch hier die Einwirkzeit entsprechend. Die Ameisensäure hatte nur eine begrenzte Wirkung gegen das Reovirus. So konnte erst ab einer Konzentration von 6% in Verbindung mit einer 60 minütigen Einwirkzeit, oder mit einer 4%igen Lösung und einer 120 minütigen Einwirkzeit eine ausreichende Virusinaktivierung erreicht werden. Mit einer 0,5%igen Glutaraldehydlösung wurde eine vollständige Inaktivierung nach 60 Minuten erreicht. Mit Konzentrationen von 0,1% und 0,25% waren Einwirkzeiten von 120 Minuten erforderlich. Alle weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 16 auf Seite 88 dargestellt.

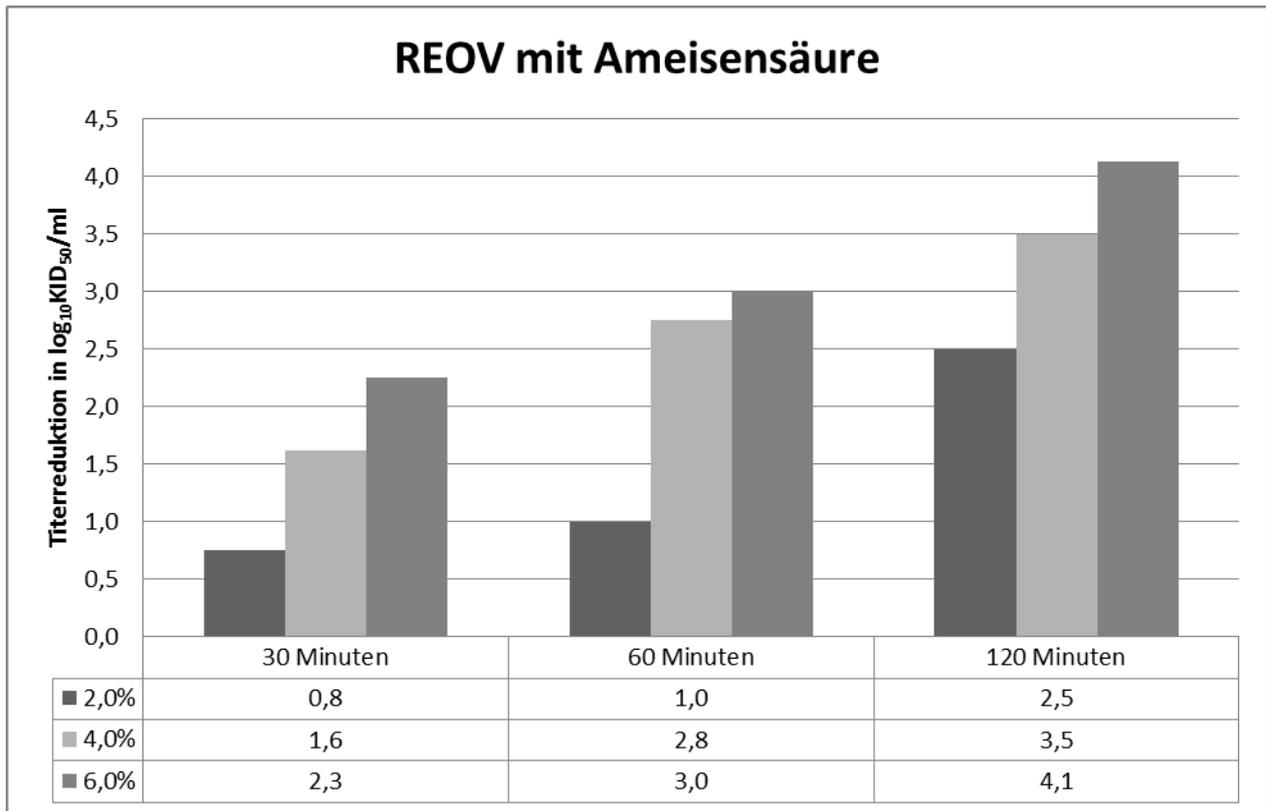


Abbildung 32: Viruzide Wirkung von Ameisensäure im Holzkeimträgerversuch mit REOV

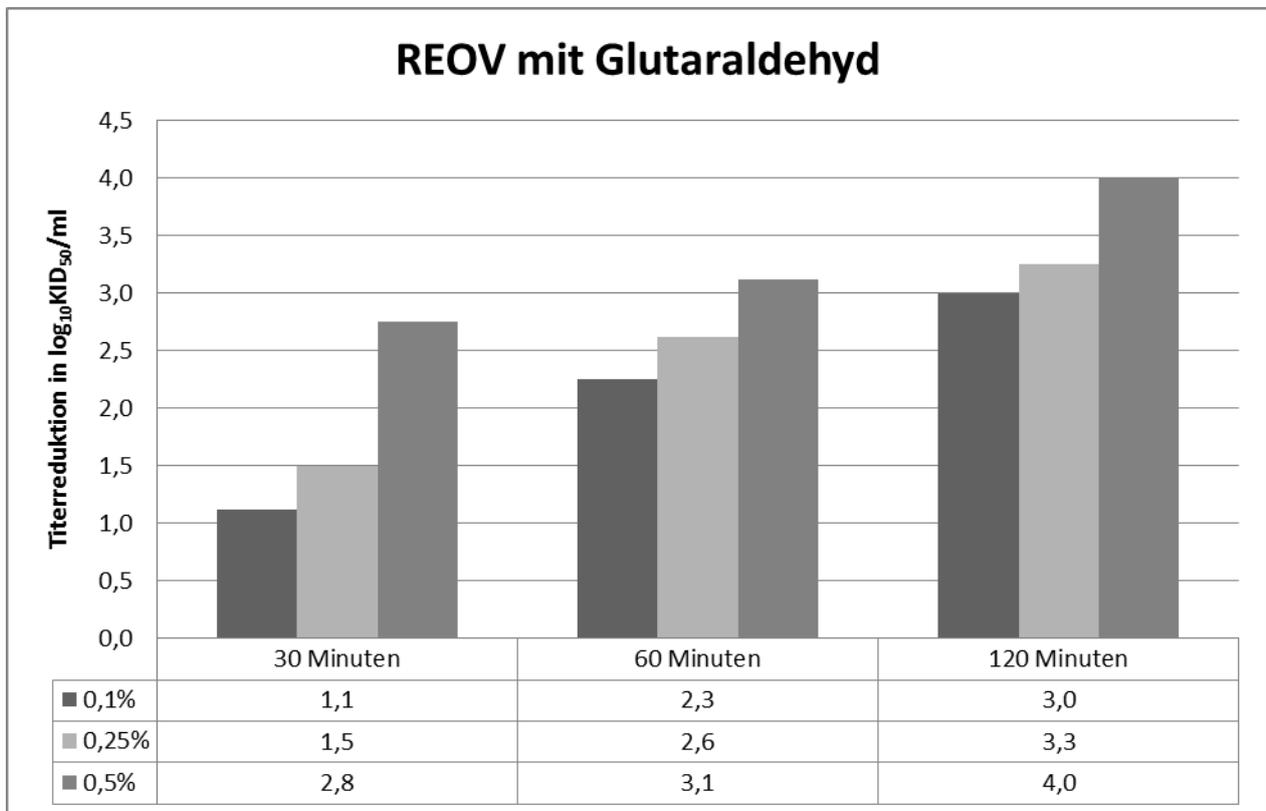


Abbildung 33: Viruzide Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch mit REOV

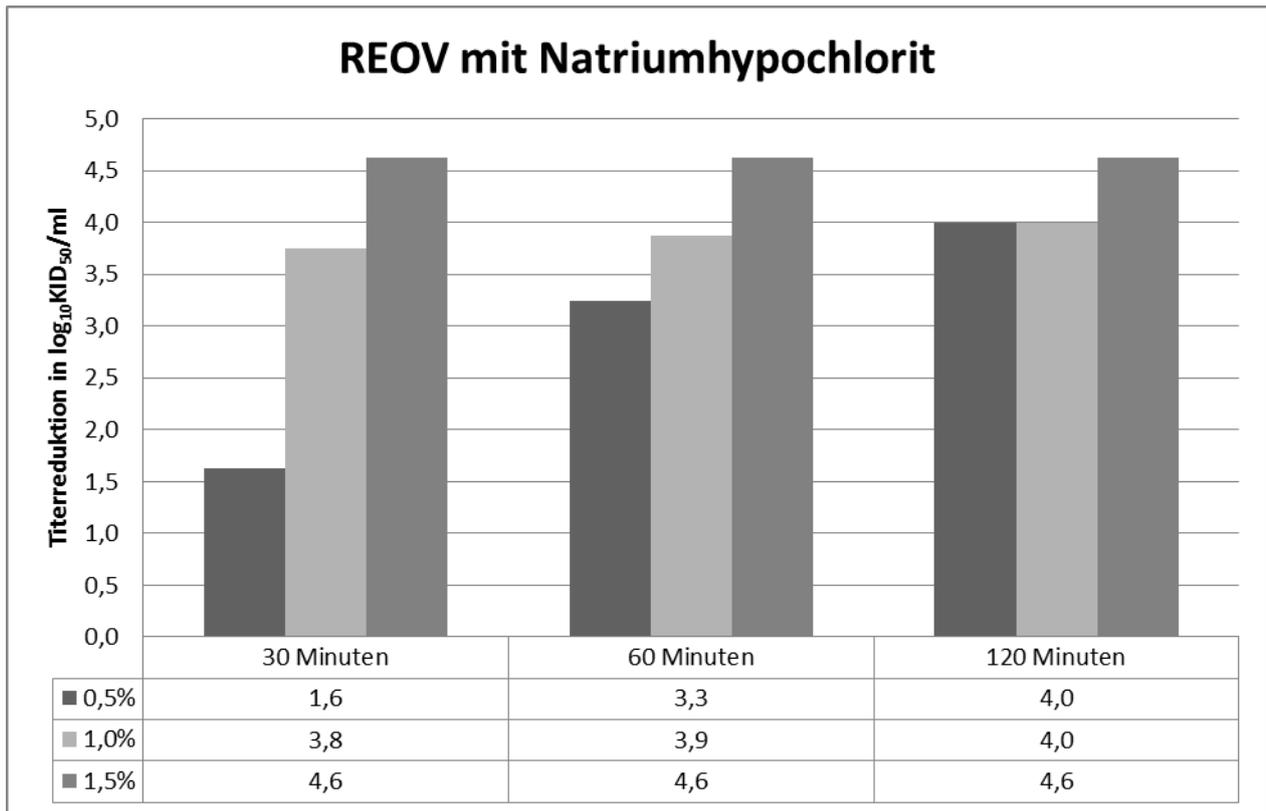


Abbildung 34: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Holzkeimträgerversuch mit REOV

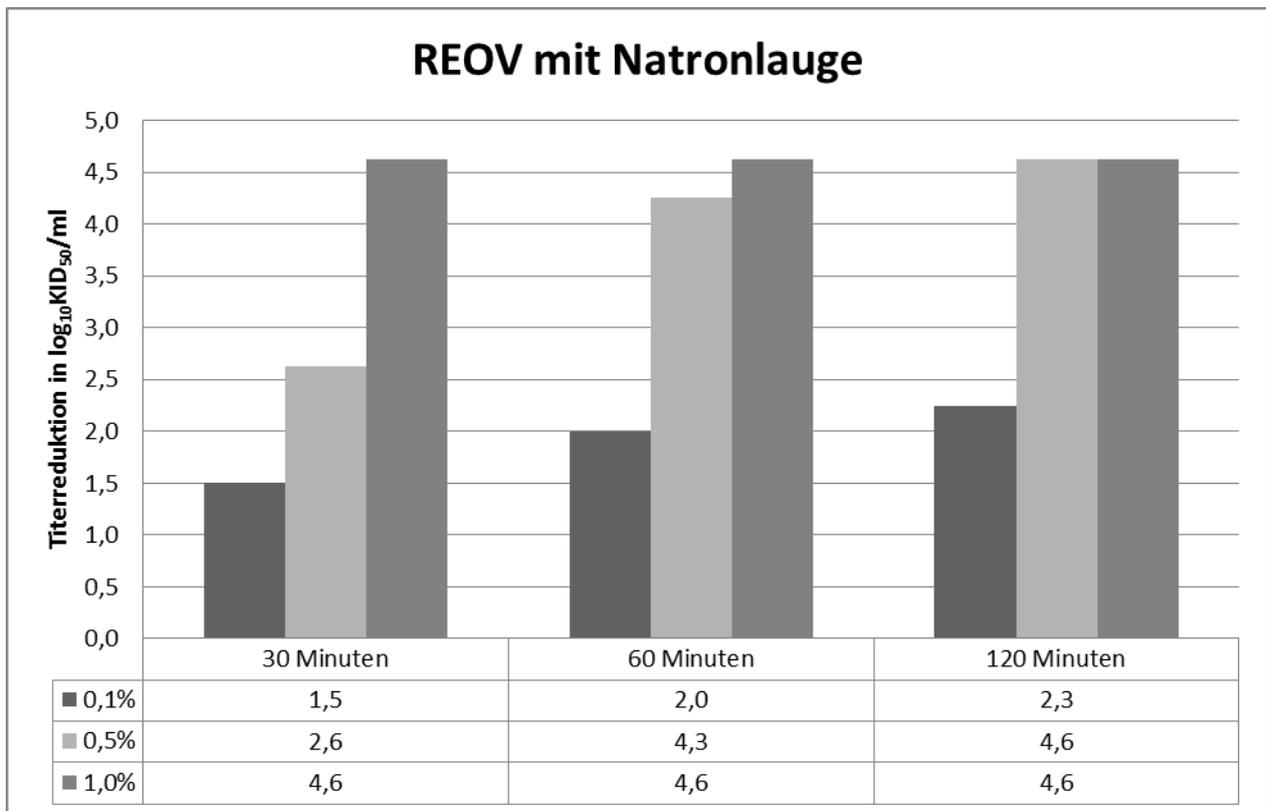
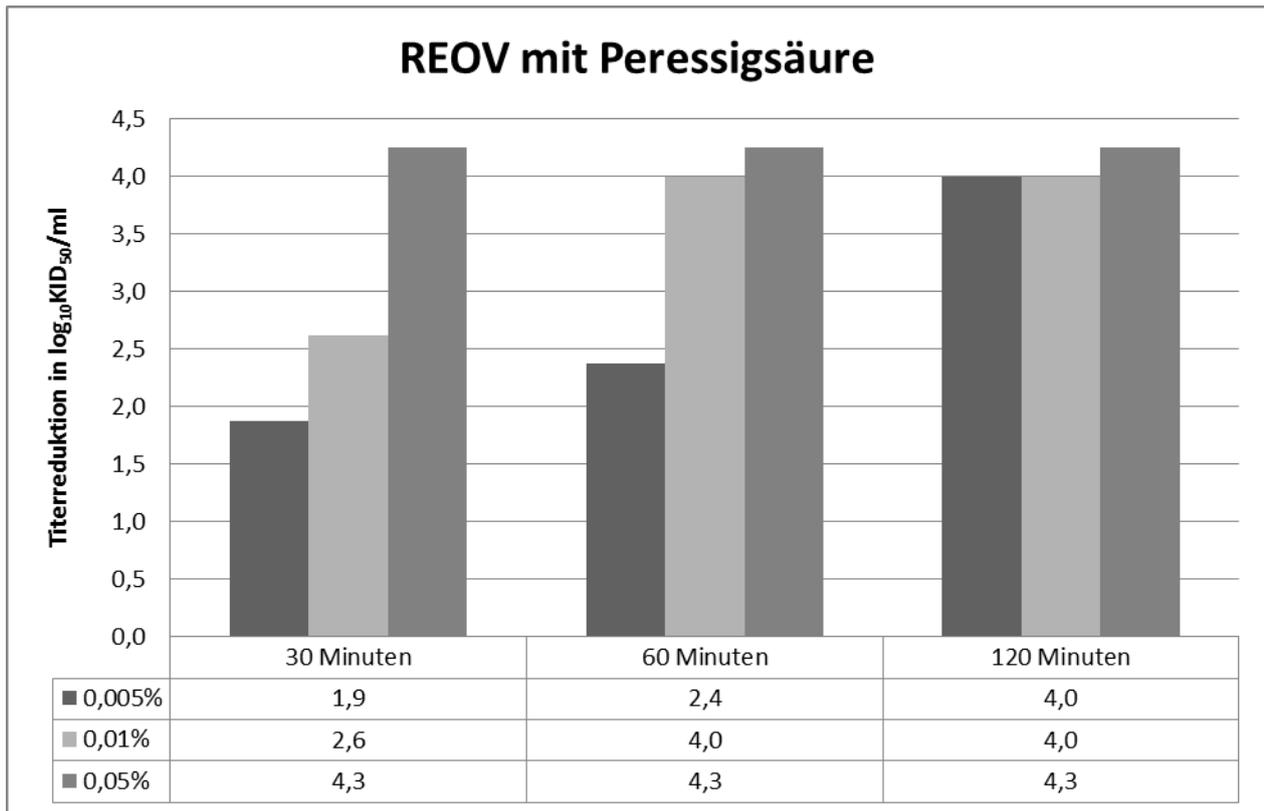


Abbildung 35: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Holzkeimträgerversuch mit REOV



**Abbildung 36: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Holzkeimträgerversuch mit REOV**

## 5 Diskussion

### 5.1 Anforderungen an Prüfviren

Die Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln wird maßgeblich von den verwendeten Testorganismen beeinflusst. Aus diesem Grund werden repräsentative Testviren mit charakteristischen Eigenschaften ausgewählt (ANON. 2004) (BODENSCHATZ 2009). Die Tenazität eines Testvirus sollte anderen vergleichbaren Erregern mindestens gleichwertig sein, damit das zur Desinfektionsmittelprüfung eingesetzte Testvirus als Modellkeim für andere Erreger gelten kann. Des Weiteren sollten Prüfviren eine einfache Handhabung im Labor besitzen, die Vermehrung in Monolayer-Zellkulturen erfolgen, sowie hohe Infektiositätstiter aufweisen. Darüber hinaus erleichtert ein virus-spezifischer zytopathischer Effekt, der ohne Anwendung weiterer Arbeitsschritte mikroskopisch ablesbar ist, die vorbereitende Arbeit im Labor. Des Weiteren sollte es sich bei den Prüfviren nicht um Zoonoseerreger oder um im Tierseuchenrecht relevante Erreger handeln. Das in den DVG-Richtlinien zur Desinfektionsmittelprüfung vorgeschriebene Vacciniavirus ist ein Erreger mit Restvirulenz, auch wenn dieses nur gegenüber nichtgeimpftem Individuen besteht. Seit der weltweiten Tilgung der Pocken und der eingestellten Schutzimpfung im Jahre 1975 hat dieses Virus wieder stark an Bedeutung gewonnen (MAYR 2006). Aus diesem Grund sollte eine weitere Verwendung dieses Virus für die Desinfektionsmittelprüfung überdacht werden. Der Studie von HARTNACK *et al.* (2008) zufolge ist das attenuierte modifizierte-Vaccinia-Ankara-Virus (MVA) als Ersatz für das klassische Vacciniavirus in jeder Hinsicht geeignet. Zum gleichen Ergebnis kommt auch die Arbeit von RABENAU *et al.* (2010).

Eine ähnliche Problematik besteht auch bei dem zweiten, in der DVG-Richtlinie vorgeschriebenen Testvirus. Mit dem Newcastle-Disease-Virus ist ein velogener Stamm als Erreger einer anzeigepflichtigen Tierseuche für die Desinfektionsmittelprüfung vorgesehen, dessen Restvirulenz darüber hinaus ein gewisses zoonotisches Potential darstellt. Die Vermehrung dieses Stammes gelingt nur im bebrüteten Hühnerei und ist nicht standardisierbar. Zudem kann der höhere Eiweißgehalt von derart vermehrtem NDV zu verfälschten Ergebnissen in der Desinfektionsmittelprüfung führen. Die zum Nachweis von NDV benötigten Hühnerembryofibroblasten sind sehr empfindlich und führen häufig zu falschen Differenzierungen zwischen virusspezifischem cpE und zytotoxischen Veränderungen und somit zu einer relativ geringen Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse (KÖHLER 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden das bovine Virusdiarrhoe-Virus, das equine Arteritis-Virus und das porcine Parvovirus als potentieller Ersatz für NDV und Vacciniavirus untersucht. Die Eignung von BVDV und EAV wurde neben anderen Viren bereits in der Arbeit von SCHMIDT (2015) untersucht, während mit dem porcinen Parvovirus bisher noch keine Desinfektionsmittelversuche durchgeführt worden sind. Die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit sollen helfen, zukünftige Anpassungen und Weiterentwicklungen der „Richtlinien für die Prüfung von Desinfektionsverfahren und chemischen Desinfektionsmitteln“ der DVG im Bereich der Nutztierhaltung zu ermöglichen.

## 5.2 Trocknungsversuche

In den DVG-Prüfrichtlinien werden keine Referenzwerte oder Vorgaben bezüglich der Titer der eingesetzten Prüfviren vorgegeben. Nach der bereits erfolgten Anpassung (ANON. 2015a/b) ist auch in Zukunft eine weitere Harmonisierung der Prüfrichtlinien zu erwarten. Anders als die DVG verlangen die CEN-Richtlinien eine Titerreduktion von mindestens 4 Logarithmusstufen als Voraussetzung für eine vollständige Virusinaktivierung. Die verwendete Formel zur Berechnung der Virustiter nach SPEARMAN und KAERBER hat eine rechnerische Nachweisgrenze von  $3,1 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ . Aus der Nachweisgrenze und der geforderten Titerreduktion von 4 Logarithmusstufen ergibt sich ein Kontrolltiter von mindestens  $7,1 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ , den jedes Testvirus für die Desinfektionsmittelprüfung nach der vorgeschriebenen Trocknung aufweisen muss. BEV und REOV hatten nach der Trocknung entsprechend hohe Titer von  $7,1 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$  oder mehr, bei BVDV und EAV konnten entsprechende Titer durch die hohen Trocknungsverluste nicht erreicht werden. Bei PPV lagen sowohl der Ausgangstiter als auch der Titer nach der Trocknung zwischen  $6,0$  und  $6,5 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ , und damit deutlich unter dem erforderlichen Mindestwert von  $7,1 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$ .

Viele vorangehende Arbeiten haben einen Verlust an Infektiosität der verwendeten Viren durch das Trocknungsverfahren festgestellt (AL-KHLEIF 2008) (SCHMIDT 2015). Dieser Verlust ist einerseits abhängig von der Tenazität des untersuchten Virus, andererseits von der Beschaffenheit der verwendeten Keimträger, Belastungssubstanzen, Trocknungstemperatur, Trocknungsdauer, Luftfeuchtigkeit und anderen Faktoren. Um die Trocknungsverluste der zu untersuchenden Viren zu bestimmen und die Fragestellung von SCHMIDT (2015) nach einem schonenden, alternativen Trocknungsverfahren aufzugreifen, wurden vor der eigentlichen Desinfektionsmittelprüfung

Trocknungsversuche von verschiedener Dauer im Exsikkator bei Raumtemperatur und, wie von der DVG vorgeschrieben, im Brutschrank bei 37°C durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die Titerverluste der potentiellen Prüfviren bei der Trocknung im Exsikkator geringer waren als bei der Trocknung im Brutschrank. Sinngemäß waren die Titerverluste im Exsikkator nach 30 minütiger Trocknung weniger stark ausgeprägt als nach 60 Minuten. Bemerkenswert waren die Ergebnisse für BEV, das von allen untersuchten Viren die stärksten Trocknungsverluste zeigte. Nach 60 Minuten Trocknung im Exsikkator waren diese sogar höher als nach 60 Minuten Trocknung im Brutschrank. Welche Ursache diesem Phänomen zugrunde liegt, ließ sich durch die vorliegenden Untersuchungen nicht ableiten. Mögliche Gründe könnten der dabei verwendete Unterdruck im Exsikkator oder eine ungenügende Rückgewinnung von der Oberfläche der Holzkeimträger sein. Unabhängig vom gewählten Trocknungsverfahren zeigte das porcine Parvovirus die geringsten Trocknungsverluste. Obwohl mit BVDV und EAV höhere Ausgangstiter erzielt werden konnten als mit PPV, zeigten diese unabhängig vom gewählten Verfahren deutlich höhere Titerverluste bei der Trocknung. Die vorliegenden Ergebnisse aus den vergleichenden Trocknungsversuchen zeigen, dass die Trocknung im Exsikkator bei Raumtemperatur die Trocknungsverluste minimieren kann. Hiermit konnte auch bei einer kürzeren Trocknungsdauer von 30 Minuten eine akzeptable Trocknung der benetzten Keimträger erzielt werden, so dass diese für zukünftige Arbeiten und die routinemäßige Desinfektionsmittelprüfung empfohlen werden kann. Die Titerverluste waren dabei deutlich geringer, als bei 60 minütiger Trocknung im Exsikkator oder im Brutschrank. Eine Trocknung im Brutschrank von mehr als einer Stunde bei weniger als 37°C wäre ebenfalls denkbar und könnte in zukünftigen Arbeiten untersucht werden.

### **5.3 BEV**

Das bovine Enterovirus ist in den aktuellen „Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin“ der DVG als unbehülltes Prüfvirus vorgeschrieben. Desinfektionsmittel, die sowohl BEV als auch REOV vollständig inaktivieren, werden in den Listen der „nach den Richtlinien der DVG geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für die Tierhaltung“ in der Spalte 7a als viruzid deklariert. In der EN 14675 wird ausschließlich BEV im quantitativen Suspensionsversuch zur Prüfung der viruziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im Veterinärbereich vorgeschrieben (GABRIEL und BRILL 2011).

Die Vermehrung von BEV auf MDBK-Zellen gestaltete sich einfach, und es konnten Ausgangstitere von  $7,6 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  erreicht werden. Bei den durchgeführten Trocknungsversuchen zeigte sich, dass bei BEV von allen untersuchten Viren mit  $2,8 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  die höchsten Titerverluste bei 60 minütiger Trocknung im Brutschrank zu verzeichnen waren. Bei 60 minütiger Trocknung im Exsikkator bei Raumtemperatur waren die Titerverluste mit durchschnittlich  $3,6 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  noch ausgeprägter. Das verwundert insofern, da alle anderen untersuchten Viren bei der Trocknung im Exsikkator einen geringeren Titerverlust zeigten als bei der Trocknung im Brutschrank. Als mögliche Ursache kommt der beim Betrieb des Exsikkators verwendete Unterdruck oder eine deutlich verringerte Rückgewinnung von der Keimträgeroberfläche in Frage. Beim Vergleich der einzelnen Trocknungsversuche im Exsikkator zeigte sich allerdings, dass bei 30 minütiger Trocknungsdauer der durchschnittliche Titerverlust von BEV bei nur  $0,8 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  lag. In den durchgeführten Keimträgerversuchen waren die Titer der Viruskontrollen dennoch ausreichend hoch, um eine vollständige Virusinaktivierung zu erreichen. In einigen Versuchen konnte sogar eine Titerreduktion von mehr als 4 Logarithmusstufen erreicht werden. Dies war unter anderem im Keimträgerversuch mit 1%iger Ameisensäure und 60 minütiger Einwirkzeit der Fall, dessen Ergebnisse mit denen von YILMAZ und KALETA (2003a) übereinstimmen. Nur bei Konzentrationen von mehr als 0,5% Glutaraldehyd konnte eine vollständige Virusinaktivierung nicht bestätigt werden, da die verwendete Zellkultur aufgrund zytotoxischer Veränderungen nicht auswertbar war. Die Tenazität von BEV im Vergleich zu REOV wurde nach Auswertung der Ergebnisse der Keimträgerversuche als ungefähr gleichwertig beurteilt. Je nach eingesetztem Desinfektionsmittel ergaben sich geringfügige Abweichungen bezüglich der notwendigen Konzentrationen und Einwirkzeiten. Die erwartungsgemäß höhere Tenazität von BEV im Vergleich zu den behüllten Viren BVDV und EAV hat sich in den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt.

#### **5.4 BVDV**

BVDV wurde für die Untersuchungen dieser Arbeit ausgewählt, da es als behülltes Virus einen potentiellen Ersatz für NDV darstellt. BVDV ist der Erreger einer weit verbreiteten und wirtschaftlich relevanten Tierseuche, und wird in der Verordnung über anzeigepflichtige Tierseuchen aufgeführt, allerdings handelt es sich bei dem hier verwendeten BVDV um den attenuierten Stamm NADL, wohingegen die DVG den velogenen NDV-Stamm Montana zur Desinfektionsmittelprüfung vorschreibt. Zudem geht von BVDV kein bekanntes zoonotisches

Potential aus, was für die Arbeit im Labor von Nutzen ist. Für das Virus spricht außerdem die einfache Kultivierung auf MDBK-Zellen und das Erkennen infizierter Zellen unter dem Lichtmikroskop. Bei der Virusvermehrung konnten Ausgangstitern von  $7,6 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  erreicht werden. Allerdings zeigte sich das Virus empfindlich gegenüber starken Temperaturänderungen, was sich vor allem beim Auftauen von tiefgefrorenem Virus und bei der Trocknung im Exsikkator bzw. im Brutschrank bemerkbar machte. Bei drei separat durchgeführten Trocknungsversuchen von 60 Minuten Dauer traten im Brutschrank Titerverluste von durchschnittlich  $2,1 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  auf. Bei den Trocknungsversuchen von 60 Minuten Dauer im Exsikkator betrug der Titerverlust durchschnittlich  $1,7 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ . Ein geringerer Titerverlust wurde mit einer Trocknungsdauer von 30 Minuten im Exsikkator erreicht. Die durchschnittliche Titerreduktion betrug dabei  $0,6 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ . Die Ergebnisse der Keimträgerversuche mit BVDV ergaben äußerst geringfügige Abweichungen in den notwendigen Konzentrationen der verwendeten Desinfektionsmittel im Vergleich zu EAV.

## 5.5 EAV

Mit EAV wurde ein weiteres behülltes Virus in die Untersuchungen einbezogen, um dessen Eignung als Ersatz für NDV zu prüfen. Bei EAV handelt es sich um den Erreger einer in Deutschland meldepflichtigen Tierkrankheit mit weiter Verbreitung im europäischen und nordamerikanischen Raum. Ebenso wie bei BVDV ist bei EAV kein zoonotisches Potential bekannt. Von weiterem Vorteil ist die einfache Vermehrung auf Vero-Zellen und das Erkennen infizierter Zellen mit dem Lichtmikroskop. Bei der Anzucht konnten Ausgangstitern von  $7,6 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  erreicht werden. Ähnlich wie BVDV ist EAV empfindlich gegenüber starken Temperaturschwankungen. Bei 60 minütiger Trocknung im Brutschrank traten Titerverluste von durchschnittlich  $1,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  auf. Bei den Trocknungsversuchen im Exsikkator wurden nach 60 Minuten Titerverluste von durchschnittlich  $0,9 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  festgestellt. Nach 30 minütiger Trocknung im Exsikkator lag der Titerverlust bei durchschnittlich  $0,7 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ . Wie bereits im letzten Punkt genannt, waren die Ergebnisse der Keimträgerversuche von EAV und BVDV sehr ähnlich. Äußerst geringfügige Abweichungen ergaben sich bei den notwendigen Konzentrationen der eingesetzten Desinfektionsmittel.

## 5.6 PPV

Mit PPV wurde ein weiteres unbehülltes Virus im Keimträgertest untersucht, um die Desinfektionsmittelprüfungen an einem Erreger mit besonders hoher Tenazität durchzuführen. Die für die Viruzidieprüfung aktuell vorgeschriebenen Viren BEV und REOV haben zwar eine höhere Tenazität als die behüllten Testviren NDV und Vacciniavirus, allerdings haben sowohl BEV als auch REOV kaum Praxisrelevanz. Dagegen ist PPV, ein Erreger des SMEDI-Syndroms, ein in der Schweinezucht weit verbreiteter und wirtschaftlich relevanter Erreger hoher Tenazität, von dem ebenfalls kein zoonotisches Potential bekannt ist. Die Vermehrung gelang auf SpeV-Zellen relativ einfach und infizierte Zellen konnten ohne weitere Arbeitsschritte unter dem Lichtmikroskop identifiziert werden. Bei der Anzucht wurden Ausgangstitere von maximal  $6,6 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$  erreicht, allerdings zeigte sich PPV von allen untersuchten Viren am wenigsten empfindlich gegenüber dem jeweiligen Trocknungsverfahren. Die festgestellten Titerverluste in den vergleichenden Trocknungsversuchen waren von allen untersuchten Viren sowohl im Brutschrank als auch im Exsikkator am niedrigsten. In den durchgeführten Desinfektionsversuchen wurde offensichtlich, dass die Tenazität von PPV dem BEV gleichwertig, wenn nicht sogar überlegen ist. In einer derzeit durchgeführten Studie von NEBLUNG wurde gezeigt, dass sich PPV auch als potentiell Testvirus für die Desinfektionsmittelprüfung im Bereich der tierärztlichen Praxis eignet. Die Ergebnisse der Desinfektionsmittelversuche von PPV in der vorliegenden Arbeit und von NEBLUNG unterschieden sich trotz verschiedener Keimträgermaterialien nicht nennenswert. PPV könnte somit auch als Surrogat für das canine Parvovirus (CPV) für die Desinfektionsmittelprüfung im Bereich der tierärztlichen Praxis eingesetzt werden. In der Arbeit von KARNATH (2011) stellte sich CPV als weniger geeignetes Modellvirus für die Desinfektionsmittelprüfung im Bereich der tierärztlichen Praxis dar, da die Bestimmung des Infektiositätstiters mangels eines sichtbaren zytopathischen Effektes und der daher erforderlichen Verwendung eines indirekten Immunfluoreszenzverfahrens zeitaufwändiger und kostenintensiver als bei anderen Prüfviren war, die einen sichtbarem cpE in Zellkultur hervorrufen.

## 5.7 REOV

Das unbehüllte REOV ist neben BEV das zweite, in den „Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin“ der DVG vorgeschriebene, Prüfvirus für die Desinfektionsmittelprüfung. Die Vermehrung von REOV auf Vero-Zellen gestaltete sich einfach und

es konnten Infektionstiter von  $8,2 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  erreicht werden. Bei den durchgeführten Trocknungsversuchen zeigten sich kleinere Differenzen in den Titerverlusten im Vergleich zu den anderen untersuchten Viren. So verlor REOV nach 60 minütiger Trocknung im Brutschrank durchschnittlich  $1,3 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  an Infektiositätstiter, bei gleich langer Trocknung im Exsikkator waren es  $1,0 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ . Eine Verringerung des Titerverlustes konnte durch Halbierung der Trocknungsdauer im Exsikkator nicht erreicht werden. Die Titer der Viruskontrollen waren in den durchgeführten Keimträgerversuchen dennoch ausreichend hoch, um eine vollständige Virusinaktivierung zu erreichen. In den meisten Versuchen konnte sogar eine Titerreduktion von mehr als 4 Logarithmusstufen erreicht werden. Nach Auswertung der Ergebnisse der Keimträgerversuche wurde die Tenazität von REOV im Vergleich zu BEV als ungefähr gleichwertig beurteilt. Je nach verwendetem Desinfektionsmittel ergaben sich kleinere Abweichungen hinsichtlich der notwendigen Konzentrationen.

### **5.8 Viruzide Wirksamkeit der Desinfektionsmittel im Keimträgerversuch**

Bei den verwendeten Chemikalien handelte es sich um Grundsubstanzen kommerziell erhältlicher Desinfektionsmittel, deren Wirkungsweise in zahlreichen Studien nachgewiesen worden und einschlägiger Literatur zu entnehmen ist (SCHLIESSER und STRAUCH 1981) (BÖHM und STRAUCH 2002) (MÜLLER 2007). PPV zeigte in den Keimträgerversuchen die höchste Tenazität aller untersuchten Testviren. Je nach untersuchtem Virus und verwendetem Desinfektionsmittel wurden unterschiedliche Konzentrationen für eine vollständige Virusinaktivierung benötigt.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der viruziden Wirksamkeit zu ermöglichen, wurde aufgrund der unterschiedlichen Ausgangstiter der Prüfviren eine vollständige Inaktivierung durch eine Reduktion um mindestens 3 Logarithmusstufen definiert.

Von der Ameisensäure wurden unterschiedliche Konzentrationen für eine ausreichende Wirksamkeit benötigt. Analog zur Arbeit von KÖHLER (2006) war bei REOV erst in Konzentrationen von 4% nach 120 Minuten, bzw. von 6% nach 60 Minuten eine vollständige Inaktivierung nachweisbar. Eine andere Studie bewertet Ameisensäure als unwirksam gegenüber REOV, weshalb Präparate, die hauptsächlich diesen Wirkstoff enthalten nicht zur Desinfektion von REOV zu empfehlen sind (YILMAZ und KALETA 2003a). Bei PPV konnte auch mit 10%iger Ameisensäure keine vollständige Inaktivierung erzielt werden. Bei den Versuchen mit EAV war aufgrund der niedrigen Kontrolltiter eine Reduktion von mehr als drei Logarithmusstufen nicht möglich.

Analog zu der Arbeit von WALLHÄUßER (1996) zeigte Glutaraldehyd eine gute, wenn auch langsame Wirksamkeit gegenüber den geprüften Viren. Zur vollständigen Inaktivierung von REOV waren eine 0,5%ige Lösung und 60 Minuten Einwirkzeit notwendig. PPV erforderte 0,75% und ebenfalls 60 Minuten Einwirkzeit. Von Nachteil waren die zytotoxischen Effekte, die bei der Verwendung höherer Konzentrationen in allen verwendeten Zelllinien auftraten. Dies war bei BEV auf MDBK-Zellen ab 1% Glutaraldehyd der Fall, wodurch die Auswertung und Beurteilung der veränderten Zellen nicht möglich war. Bei den Versuchen mit BVDV und EAV war wegen der niedrigen Kontrolltiter eine Reduktion von mehr als drei Logarithmusstufen nicht möglich.

In 1%iger Lösung zeigte Natriumhypochlorit eine gute Wirksamkeit innerhalb von 30 Minuten gegenüber BEV, REOV und PPV. Bei den Versuchen mit BVDV und EAV war erneut keine Reduktion von mehr als drei Logarithmusstufen möglich. Obwohl BÖHM *et al.* (2002) Laugen eine mangelhafte Wirkung auf rauen Materialien wie Holz attestieren, konnten mit Natronlauge gute Ergebnisse im Holzkeimträgertest erzielt werden. Eine 1%ige Lösung erzielte eine vollständige Inaktivierung von REOV innerhalb von 30 Minuten. Bei BEV waren dazu 1,5% notwendig. Eine 2%ige Natronlauge konnte PPV vollständig, allerdings erst nach 60 Minuten inaktivieren. Bei BVDV und EAV wurde keine Reduktion von mehr als drei Logarithmusstufen erreicht. Peressigsäure führte selbst in sehr geringen Konzentrationen von 0,05% bis 0,1% innerhalb von 30 Minuten zur vollständigen Inaktivierung von BEV, REOV und PPV. Durch die hohen Trocknungsverluste von BVDV und EAV konnte bei diesen wiederholt keine Titerreduktion von mehr als drei Logarithmusstufen erreicht werden.

### **5.9 Abschließende Beurteilung der untersuchten Viren**

Die Eignung von BEV zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin konnte auch in dieser Arbeit erneut belegt werden. Es ließ sich einfach auf MDBK-Zellen kultivieren und zu Titern von  $7,6 \log_{10} \text{KID}_{50}/\text{ml}$  vermehren. Ein zoonotisches Potential für den Anwender besteht beim Umgang mit diesem Virus nicht. Obwohl für BEV mit den durchgeführten Trocknungsversuchen relativ hohe Titerverluste nachgewiesen werden konnten, lagen die Kontrolltiter in den Keimträgerversuchen hoch genug, um eine Titerreduktion von mindestens 3 Logarithmusstufen durch das verwendete Desinfektionsmittel zu gewährleisten. Nach der Beurteilung der Ergebnisse aus den Keimträgerversuchen ist die Tenazität von BEV etwa mit der des REOV gleichzusetzen. Für eine weitere Verwendung als Prüfvirus gemäß DVG-Richtlinie wird

eine kürzere Trocknung von 30 Minuten Dauer im Exsikkator bei Raumtemperatur empfohlen, um so die Titerverluste zu minimieren und höhere Kontrolltiter zu ermöglichen.

Bei BVDV und EAV sprechen die einfache Virusvermehrung, die lichtmikroskopische Ablesbarkeit des cpE und die ausreichende Stabilität gegenüber den eingesetzten Desinfektionsmitteln für die Verwendung als Testvirus. Von Nachteil waren die hohen Trocknungsverluste, die bei der 60 minütigen Trocknung im Brutschrank bei 37°C auftraten. Die von der CEN-Richtlinie geforderte Titerreduktion von mindestens 4 Logarithmusstufen war bei den Keimträgerversuchen mit BVDV und EAV nicht zu erreichen, da die Titer der getrockneten Viruskontrollen bei 7,1  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  oder höher hätten liegen müssen, um eine Titerreduktion von mindestens vier Logarithmusstufen bis zur Nachweisgrenze von 3,1  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  gewährleisten zu können. Bei den gegebenen Trocknungsverlusten hätten die Ausgangstiter beider Viren bei etwa 9  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  liegen müssen, was bei der Anzucht und Vermehrung beider Viren nicht gelungen ist. Sollte im Zuge weiterer Harmonisierung die DVG die Anforderungen der CEN-Richtlinien übernehmen, wäre eine Nutzung von BVDV und EAV unter diesen Voraussetzungen nicht mehr möglich. Möglicherweise können mit der Verwendung anderer Zelllinien beide Viren zu höheren Ausgangstitern vermehrt werden.

Die Ergebnisse der Trocknungsverluste zeigen allerdings, dass durch die Verwendung eines Exsikkators die Titerverluste während der Trocknungsphase bei Raumtemperatur deutlich verringert werden können. Eine Trocknung der benetzten Holzkeimträger im Exsikkator von 30 Minuten Dauer ist daher für zukünftige Untersuchungen und für die Neufassung der DVG-Richtlinien zur Prüfung von Desinfektionsmitteln für die Nutztierhaltung ausdrücklich zu empfehlen. Eine frühere Arbeit hat gezeigt, dass BVDV im Vergleich zu NDV in vier von fünf Fällen als signifikant resistenter zu bezeichnen ist. Außerdem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass sich NDV und BVDV im Holzkeimträgertest identisch verhalten (KÖHLER 2006). Für das Erlangen der BVDV-Freiheit in Deutschland wäre es sinnvoll, BVDV als Prüfvirus zu verwenden, um die Wirksamkeit der zu prüfenden und eingesetzten Desinfektionsmittel nachzuweisen. Unter Berücksichtigung der gleichwertigen Ergebnisse in den Suspensions- und Keimträgerversuchen und der Möglichkeit, durch eine kürzere Trocknung im Exsikkator höhere Kontrolltiter von BVDV zu erreichen, wäre der Ersatz von NDV durch BVDV möglich und als sinnvoll zu erachten. Diese Empfehlung geht auch aus der Arbeit von KÖHLER (2006) hervor. Ob EAV ein adäquater Ersatz für das bisher verwendete Vacciniavirus darstellt, wurde wegen des Infektionsrisikos von letzterem

nicht untersucht und kann daher nicht bewertet werden. Die Ergebnisse der Arbeit von HARTNACK *et al.* (2008) und RABENAU *et al.* (2010) zeigen jedoch, dass das modifizierte Vaccinia Ankara-Virus ein gut geeigneter Ersatz für das Vacciniavirus darstellt. Die gemeinsame Richtlinie von DVV und RKI zur Prüfung von Desinfektionsmitteln wurde in diesem Zusammenhang bereits geändert (ANON. 2010).

PPV war ebenfalls relativ einfach zu kultivieren, der auftretende cpE konnte ohne weitere Arbeitsschritte unter dem Lichtmikroskop abgelesen werden. Lediglich die erreichten Ausgangstiter lagen mit  $6,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  etwa eine Logarithmusstufe niedriger als die von BVDV und EAV. Im Gegensatz dazu waren die Trocknungsverluste von PPV derart gering, dass damit der etwas niedrigere Ausgangstiter kompensiert werden konnte. Trotzdem konnte bei den Versuchen mit PPV die von der CEN-Richtlinie geforderte Titerreduktion von mindestens 4 Logarithmusstufen nicht eingehalten werden. Anders als bei BVDV und EAV, die nach 30 minütiger Trocknung im Exsikkator deutlich geringere Titerverluste zeigten, konnte bei PPV auch damit nicht der gewünschte Effekt erreicht werden. Für die zukünftige Verwendung als Prüfvirus müssen mit PPV deutlich höhere Ausgangstiter von mindestens  $7,5 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  erreicht werden, um die gegebenen Titerverluste bei der Trocknung im Exsikkator zu kompensieren. Sollte an der 60 minütigen Trocknung im Brutschrank festgehalten werden, so wären zur Kompensation der höheren Trocknungsverluste Ausgangstiter von mindestens  $7,9 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  erforderlich. Erst wenn diese Voraussetzung erfüllt ist, kann mit PPV eine rechnerische Titerreduktion von 4 Logarithmusstufen in der Desinfektionsmittelprüfung erreicht werden, so wie es in den CEN-Richtlinie verlangt wird.

In den durchgeführten Keimträgerversuchen zeigte PPV eine deutlich höhere Tenazität als alle anderen untersuchten Viren. Da die limitierenden Viren bei der Desinfektionsmittelprüfung die unbehüllten Vertreter BEV und REOV waren, könnte mit PPV ein weiteres Prüfvirus höchster Tenazität in die Desinfektionsmittelprüfung eingebunden werden, sofern die notwendige Vermehrung von PPV zu deutlich höheren Ausgangstitern gelingen sollte.

Bei REOV handelt es sich um das zweite unbehüllte, von der DVG vorgeschriebene Prüfvirus. Erwartungsgemäß gab es bei der Arbeit mit diesem Virus keine Probleme. Es ließ sich einfach auf Vero-Zellen kultivieren und zu hohen Titern von  $8,2 \log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  vermehren. Ein zoonotisches Potential für den Anwender liegt nicht vor. Bei den durchgeführten Trocknungsversuchen zeigte sich, dass zukünftig eine Trocknung von 30 Minuten im Exsikkator vor den Keimträgerversuchen

anzuraten ist. Die Titerverluste können damit geringfügig vermindert werden, was sich in höheren Kontrolltitern der sich anschließenden Versuche manifestiert. Die Tenazität von REOV war erwartungsgemäß höher als die der beiden unbehüllten Viren BVDV und EAV und etwa gleichwertig wie die von BEV. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen einer weiteren Verwendung von REOV als Prüfvirus nicht entgegen.

Nach Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit ist eine Verwendung von BVDV, EAV und PPV als Prüfviren für die Desinfektionsmittelprüfung der DVG im Nutztierbereich grundsätzlich zu empfehlen. Alle drei Viren sind relevante Tierseuchenerreger ohne bekanntes zoonotisches Potential. BVDV ist als Ersatz für das NDV gut geeignet. Das klassische Vacciniavirus sollte ebenfalls durch ein anderes Prüfvirus ersetzt werden, hier bietet sich die Verwendung von MVA an. PPV ist als Vertreter der Parvoviren ein potentielles Prüfvirus von höchster Tenazität. Für eine Verwendung müssen allerdings höhere Ausgangstiter erzielt werden. Die Vermehrung von PPV zu höheren Infektionstitern sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Die Ergebnisse und Erkenntnisse dieser Arbeit sind für zukünftige Überarbeitungen und Neufassungen der Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin bestimmt.

## 6 Zusammenfassung

Jörg Constantin Pirschel

Untersuchungen zur Eignung verschiedener animaler Viren zur Prüfung der Viruzidie chemischer Desinfektionsmittel in der Nutztierhaltung

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

Eingereicht im Februar 2015

70 Seiten, 16 Tabellen, 36 Abbildungen, 72 Literaturstellen, Anhang

Schlüsselwörter:

Desinfektionsmittelprüfung, DVG-Richtlinie, Desinfektion, bovines Enterovirus, bovines Virusdiarrhoe-Virus, equines Arteritis-Virus, respiratoric enteric orphan virus, porcines Parvovirus

Im Zuge der Überarbeitung der DVG-Richtlinie zur Prüfung der Viruzidie chemischer Desinfektionsmittel in der Nutztierhaltung wurden BVDV, EAV und PPV auf ihre Eignung als potentielle Prüfviren getestet.

Das bisher vorgeschriebene Newcastle-Disease-Virus und das Vacciniavirus sollen mit anderen behüllten Viren wie BVDV oder EAV verglichen werden. Beweggründe für einen möglichen Austausch sind die derzeitige Situation in der Tierseuchenbekämpfung, die Erhöhung der Anwendersicherheit durch Wegfall des zoonotischen Potentials, die einfachere Kultivierung und Handhabung der Prüfviren sowie speziell bei NDV die höhere Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse.

Die Desinfektionsmittelversuche wurden gemäß DVG-Richtlinie auf Pappelholzkeimträgern durchgeführt, wobei das jeweilige, mit fetalem Kälberserum vermischte, Virus auf die Keimträger aufgetragen und angetrocknet wurde. Die DVG schreibt eine Trocknung im Brutschrank von 60 Minuten bei 37°C vor. Um die Trocknungsverluste der eingesetzten Viren zu untersuchen, wurden vergleichende Trocknungsversuche wie vorgeschrieben im Brutschrank und im Exsikkator bei Raumtemperatur durchgeführt. Die nach der Trocknung im Brutschrank durchgeführten Desinfektionsmittelversuche wurden mit chemischen Grundsubstanzen kommerziell erhältlicher Desinfektionsmittel durchgeführt. Dabei kamen verschiedene Anwendungskonzentrationen von Ameisensäure, Glutaraldehyd, Natriumhypochlorit, Natronlauge und Peressigsäure zum Einsatz. Bei der vorgeschriebenen Trocknung im Brutschrank kam es zu Titerverlusten von 0,8 bis zu 2,75  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$ . Durch eine Trocknung der Holzkeimträger von 30 Minuten bei Raumtemperatur im Exsikkator konnten die Titerverluste auf 0,3 bis 1,0  $\log_{10}\text{KID}_{50}/\text{ml}$  reduziert werden. In den nachfolgenden Desinfektionsversuchen zeigte sich die besonders hohe Tenazität von PPV. Es war den eingesetzten Desinfektionsmitteln gegenüber deutlich resistenter als alle anderen untersuchten Viren. In den Trocknungsversuchen zeigte PPV mit Abstand die niedrigsten Titerverluste. Mit BVDV und EAV konnten zwar ausreichend hohe Titer erzielt werden, allerdings waren die Trocknungsverluste beider Viren sehr hoch. In den Keimträgerversuchen konnte nur in wenigen Versuchen eine Titerreduktion von mehr als 3 Logarithmusstufen erreicht werden.

Hier könnte zukünftig die Trocknung im Exsikkator Abhilfe schaffen, um die Trocknungsverluste zu minimieren und eine höhere Titerreduktion zu ermöglichen. Die Ergebnisse einer früheren Arbeit zeigen identische Ergebnisse von NDV und BVDV im Keimträgertest. Ein Ersatz von NDV durch BVDV ist somit zu empfehlen. Eine Verwendung der untersuchten Viren gemäß den derzeitigen DVG-Richtlinien ist möglich, allerdings müssten im Zuge der weiteren Harmonisierung von CEN- und DVG-Richtlinie die Kontrolltiter entsprechend erhöht werden, um die von der CEN geforderte Titerreduktion von vier Logarithmusstufen für eine vollständige Virusinaktivierung einzuhalten. Die Vermehrung der untersuchten Viren zu höheren Ausgangs-, bzw. Kontrolltitern sollte daher Gegenstand weiterer Forschungsarbeit sein. Einer weiteren Verwendung der bisherigen Prüfviren BEV und REOV steht nichts im Wege. Aufgrund der Ergebnisse der vergleichenden Trocknungsversuche wird für alle untersuchten Viren zukünftig eine 30 minütige Trocknung im Exsikkator empfohlen.

## 7 Summary

Jörg Constantin Pirschel

Examination of the suitability of animal viruses for testing the virucidal activity of chemical disinfectants determined for livestock husbandry

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

Submitted in February 2015

70 pages, 16 tables, 36 figures, 72 references, appendix

keywords:

disinfectant testing, DVG guideline, disinfectant, bovine enterovirus, bovine viral diarrhea virus, enteric cytopathogenic bovine orphan virus, equine arteritis-Virus, respiratoric enteric orphan virus, porcine parvovirus

Due to the amendment of the DVG's guidelines for testing the virucidal activity of chemical disinfectants determined for the use in livestock husbandry, BVDV, EAV and PPV were examined for their suitability as candidate test viruses.

The former viral species stipulated for the testing procedure, NDV and the Vacciniavirus were compared with BVDV and EAV. Reasons for the potential replacement are the current situation in the fight against epizootic diseases, the potential thread of viruses' laboratory staff is faced with, a better replication and handling of candidate test viruses and the higher validity of test results particularly in the case of NDV.

As requested in the DVG-guideline, poplar wood germ-carriers were used for the disinfectant testing. The examined viruses were mixed with 40% fetal bovine serum and applied on the germ-

carriers. Drying the germ-carriers was performed in the incubator for 60 minutes at a temperature of 37°C. To compare the loss of virus titer caused by the drying process, tests were performed both in an incubator, as requested by the DVG, and in an exsiccator at room temperature. The following disinfectant testing were done with chemical matrixes of commercially available disinfectants, such as formic acid, glutaraldehyde, sodium hypochlorite, sodium hydroxide solution and peracetic acid.

Drying the germ-carriers in the incubator at 37°C for 60 minutes caused sometimes high loss of virus titer from 0.8 to 2.75 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. Drying in the exsiccator at room temperature for 30 minutes reduced the loss of virus titer to 0.3 to 1.0 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml. The results of the disinfectant testing demonstrate the highest tenacity of PPV against all biocidal agents used in the study. All other viruses were of lower resistance. PPV also showed the least loss of virus titer caused by the drying process, irrespective of the drying method. Both BVDV and EAV were replicated to sufficient high titers, but drying losses of both viruses resulted in virus titer which were too low to ensure a titer reduction of at least 4 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml requested by the CEN-guidelines.

Drying the germ-carriers in an exsiccator could help to minimize drying losses and maintain the requested reduction of virus titer in prospective studies. A prior study shows identically results of NDV and BVDV in germ-carrier tests, so that a replacement of NDV by BVDV is advisable. The use of the examined viruses as future test viruses corresponding to the DVG guideline is possible, but in the course of the further harmonization between the CEN and the DVG guideline virus titer has to be increased to maintain the reduction of at least 4 log<sub>10</sub>KID<sub>50</sub>/ml required by the CEN. Prospective studies could help to increase the titer of all examined viruses. The current test viruses BEV and REOV are accurate for further disinfectant testing. Drying the loaded germ-carriers for 30 minutes in an exsiccator at room temperature is highly recommended for all viruses examined in this study.

## 8 Literaturverzeichnis

- 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.
- ANON. Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren. *Bundesgesundheitsblatt.* 1982;(25):397–8.
- ANON. Kommentar zur Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren. *Bundesgesundheitsblatt.* 1983;(26):413–5.
- ANON. Verordnung über hygienische Anforderungen beim Halten von Schweinen (Schweinehaltungshygieneverordnung - SchHaltHygV): BMELV; 1999.
- ANON. Prüfung und Deklaration der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz.* 2004;47(1):62–6.
- ANON. Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen: BMELV; 2007a.
- ANON. Verordnung zum Schutz gegen die Geflügelpest (Geflügelpest-Verordnung): BMELV; 2007b.
- ANON. Verordnung zum Schutz gegen bestimmte Salmonelleninfektionen beim Haushuhn und bei Puten (Geflügel-Salmonellen-Verordnung - GfISalmoV): BMELV; 2009.
- ANON. Aktualisierung des Beschlusses des Fachausschusses Virusdesinfektion der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) vom 1. September 2010 zum Austausch von Vacciniavirus, Stamm Elstree gegen MVA (Modifiziertes Vacciniavirus Ankara) als Testvirus im Rahmen der Viruzidieprüfung entsprechend der DVV / RKI-Leitlinie in der Fassung vom 01.08.2008: DVV/RKI; 2010.
- ANON. Rationalization and extension of the taxonomy of the family Parvoviridae: ICTV; 2013.
- ANON. 13. Liste der nach den Richtlinien der DVG (4. Auflage sowie 3. Auflage für Übergangszeit) geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für den Tierhaltungsbereich (Handelspräparate): DVG; 2015a.
- ANON. 8. Liste der nach den Richtlinien der DVG (4. Auflage) geprüften und als wirksam befundenen Desinfektionsmittel für den Lebensmittelbereich (Handelspräparate): DVG; 2015b.
- Ayliffe GA. Standardization of disinfectant testing. *J Hosp Infect.* 1989;13(3):211–6.
- Bachofen C, Vogt H, Stalder H, Mathys T, Zanoni R, Hilbe M, Schweizer M, Peterhans E. Persistent infections after natural transmission of bovine viral diarrhoea virus from cattle to goats and among goats. *Vet Res.* 2013;44:32.
- Beer M. Familie Reoviridae. In: Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* 9. Aufl. Stuttgart: Enke; 2010. p. 511–27 .
- Bisping W. *Kompendium der Staatlichen Tierseuchenbekämpfung.* Stuttgart: Enke; 1999.

- Blas-Machado U, Saliki JT, Boileau MJ, Goens SD, Caseltine SL, Duffy JC, Welsh RD. Fatal ulcerative and hemorrhagic typhlocolitis in a pregnant heifer associated with natural bovine enterovirus type-1 infection. *Vet Pathol.* 2007;44(1):110–5.
- Blas-Machado U, Saliki JT, Sanchez S, Brown CC, Zhang J, Keys D, Woolums A, Harvey SB. Pathogenesis of a bovine enterovirus-1 isolate in experimentally infected calves. *Vet Pathol.* 2011;48(6):1075–84.
- Bodenschatz W. *Kompaktwissen Desinfektion; Das Handbuch für Ausbildung und Praxis.* 3. Aufl. Hamburg: Behr; 2009.
- Böhm R. *Die Entwicklung der DVG-Richtlinien - Historie und Zukunft.* Monsheim: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (Gießen); 2011.
- Bremer P. *Untersuchungen zur viruziden Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln bei verschiedenen Temperaturen.* Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2003.
- Engelbrecht RS, Weber MJ, Salter BL, Schmidt CA. Comparative inactivation of viruses by chlorine. *Appl Environ Microbiol.* 1980;40(2):249–56.
- Eterpi M, McDonnell G, Thomas V. Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J Hosp Infect.* 2009;73(1):64–70.
- Fraise AP. Choosing disinfectants. *J Hosp Infect.* 1999;43(4):255–64.
- Gabriel H, Brill Florian. *Wirksamkeitsprüfung chemischer Desinfektionsmittel im Lebensmittel- und Veterinärbereich nach Europäischen Normen (EN).* Monsheim: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (Gießen); 2011.
- Glaser AL, Chirside ED, Horzinek MC, Vries AA de. Equine arteritis virus. *Theriogenology.* 1997;47(6):1275–95.
- Gür S, Yapkiç O, Yilmaz A. Serological survey of bovine enterovirus type 1 in different mammalian species in Turkey. *Zoonoses Public Health.* 2008;55(2):106–11.
- Haas L. Familie Picornaviridae. In: Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* 9. Aufl. Stuttgart: Enke; 2010. p. 640–51 .
- Hartnack S, Essbauer S, Truyen U. Substitution of vaccinia virus Elstree by modified vaccinia virus Ankara to test the virucidal efficacy of chemical disinfectants. *Zoonoses Public Health.* 2008;55(2):99–105.
- Hohenheimer Seminar; Internationale Gesellschaft für Tierhygiene; Tagung der Fachgruppe Hygiene gemeinsam mit der Internationalen Gesellschaft für Tierhygiene. *Aktuelle Probleme der Desinfektion von Nutztierställen sowie von Fest- und Flüssigmist; Bericht des 3. Hohenheimer Seminar, 18. - 19.09.1996, Stuttgart-Hohenheim ; Tagung der Fachgruppe Hygiene.* Gießen: DVG; 1990.
- Holah JT, Lavaud A, Peters W, Dye KA. Future techniques for disinfectant efficacy testing. *Hygiene and Disinfection.* 1998;41(3–4):273–9.
- Holyoak GR, Balasuriya UBR, Broaddus CC, Timoney PJ. Equine viral arteritis: current status and prevention. *Theriogenology.* 2008;70(3):403–14.

- Horsch W, Naumann G, Schmidt J, Hrsg. Sterilisation, Desinfektion und Entwesung; in der medizinischen und pharmazeutischen Praxis einschließlich Herstellung von Injektionsarzneien. Leipzig: VEB Georg Thieme; 1968.
- Ijaz MK, Rubino J. Should test methods for disinfectants use vertebrate viruses dried on carriers to advance virucidal claims? *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(2):192–4.
- Karnath C. Etablierung eines Keimträgermodells zur Prüfung der viruziden Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln. Leipzig: Universität Leipzig; 2011.
- Köhler C. Untersuchungen zur Änderung der DVG-Desinfektionsmittelrichtlinien (Viruzidie). Leipzig: Universität Leipzig; 2006.
- Maclachlan NJ, Dubovi EJ, Fenner F. *Veterinary Virology*. 4. Aufl. Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press; 2011.
- MacNeil A, Reynolds MG, Damon IK. Risks associated with vaccinia virus in the laboratory. *Virology.* 2009;385(1):1–4.
- Mahnel H. Studies on inactivation of viruses in drinking and surface water. A contribution to the decontamination of water by field methods (author's transl). *Zentralbl Bakteriol Orig B.* 1977;165(5-6):527–38.
- Mahnel H. Desinfektion von Viren. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B.* 1983;30(1-10):81–96.
- Mayr A. Eradikation und Tilgung von Seuchen. *Dtsch Arztebl International.* 2006;103(46):A3115-A3118.
- Mettenleiter TC. Bekanntmachung der amtlichen Methodensammlung für die Untersuchung anzeigepflichtiger Tierseuchen, Kapitel Bovine Virusdiarrhoe: Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit; 2013.
- Meyer B. Europäische und deutsche Testmethoden zur Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln. *Aseptica.* 1/2008:19–21.
- Mücke H, Sprössig M. On the antimicrobial effect of peracetic acid. 1. Preparation, analysis and properties of peracetic acid. *Pharmazie.* 1967;22(8):444–5.
- Müller W, Schlenker G. *Kompendium der Tierhygiene; Gesundheitsschutz, Verbraucherschutz, Umweltschutz, Tierschutz.* 3. Aufl. Berlin; 2007.
- Rabenau HF, Rapp I, Steinmann J. Can vaccinia virus be replaced by MVA virus for testing virucidal activity of chemical disinfectants? *BMC Infect Dis.* 2010;10:185.
- Rabenau HF, Steinmann J, Rapp I, Schwebke I, Eggers M. Evaluation of a virucidal quantitative carrier test for surface disinfectants. *PLoS One.* 2014;9(1):e86128.
- Rebhun WC, French TW, Perdrizet JA, Dubovi EJ, Dill SG, Karcher LF. Thrombocytopenia associated with acute bovine virus diarrhea infection in cattle. *J Vet Intern Med.* 1989;3(1):42–6.
- Reybrouck G. International standardization of disinfectant testing: is it possible? *J Hosp Infect.* 1991;18:280–8.
- Reybrouck G. The testing of disinfectants. *Hygiene and Disinfection.* 1998;41(3–4):269–72.

- Reybrouck G. Milestones in the testing of surface disinfectants: from Robert Koch to CEN TC 216. *GMS Krankenhhyg Interdiszip.* 2007;2(1):Doc08.
- Sattar SA, Springthorpe VS, Adegbunrin O, Zafer AA, Busa M. A disc-based quantitative carrier test method to assess the virucidal activity of chemical germicides. *J Virol Methods.* 2003;112(1-2):3–12.
- Sauerbrei A, Wutzler P. Testing thermal resistance of viruses. *Arch Virol.* 2009;154(1):115–9.
- Schliesser T, Strauch D. *Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft.* Stuttgart: Enke; 1981.
- Schwartzbrod L, Finance C, Aymard M, Brigaud M, Lucena F. Recovery of reoviruses from tap water. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B.* 1985;181(3-5):383–9.
- Songserm T, van Roozelaar D, Kant A, Pol J, Pijpers A, ter Huurne A. Enteropathogenicity of Dutch and German avian reoviruses in SPF white leghorn chickens and broilers. *Vet Res.* 2003;34(3):285–95.
- Steinmann J. Some principles of virucidal testing. *J Hosp Infect.* 2001;48:S15-7.
- Steinmann J, Wolff MH. Testing virucidal activity in Germany: an update. *GMS Krankenhhyg Interdiszip.* 2007;2(1):Doc04.
- Strauch D, Böhm R. *Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft.* 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2002.
- Taylor LF, Janzen ED, Ellis JA, van den Hurk JV, Ward P. Performance, survival, necropsy, and virological findings from calves persistently infected with the bovine viral diarrhea virus originating from a single Saskatchewan beef herd. *Can Vet J.* 1997;38(1):29–37.
- Thiel H, König M. Familie Arteriviridae. In: Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* 9. Aufl. Stuttgart: Enke; 2010b. p. 598–603 .
- Thiel H, König M. Familie Flaviviridae. In: Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* 9. Aufl. Stuttgart: Enke; 2010a. p. 604–16 .
- Truyen U. Familie Parvoviridae. In: Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* 9. Aufl. Stuttgart: Enke; 2010. p. 477–86 .
- Truyen U. *Viruzidieprüfung für die Tierhaltung.* Monsheim: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (Gießen); 2011.
- Vahlenkamp T. *Anforderungen an Desinfektionsmittel in der Tierseuchenbekämpfung.* Monsheim: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V. (Gießen); 2011.
- Valentin-Weigand P. Desinfektion und Sterilisation. In: Selbitz H, Truyen U, Valentin-Weigand P, Hrsg. *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.* 9. Aufl. Stuttgart: Enke; 2010. p. 10–3 .
- van Engelenburg FAC, Terpstra FG, Schuitemaker H, Moorer WR. The virucidal spectrum of a high concentration alcohol mixture. *J Hosp Infect.* 2002;51(2):121–5.
- Wallhäuser KH. *Praxis der Sterilisation Desinfektion - Konservierung - Keimidentifizierung - Betriebshygiene.* 5. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 1995.

Weldon SL, Blue JL, Wooley RE, Lukert PD. Isolation of picornavirus from feces and semen from an infertile bull. *J Am Vet Med Assoc.* 1979;174(2):168–9.

Yilmaz A, Kaleta EF. Evaluation of virucidal activity of three commercial disinfectants and formic acid using bovine enterovirus type 1 (ECBO virus), mammalian orthoreovirus type 1 and bovine adenovirus type 1. *Vet J.* 2003a;166(1):67–78.

Yilmaz A, Kaleta EF. Investigations on suitability of different materials for carriers to be used for virucidal testing of chemical disinfectants in the veterinary field. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2003b;50(9):461–5.

Yilmaz M, Wöckener A, Müller E. Gesetzliche Vorschriften zur Untersuchung auf equine Virusarteritis beim Pferd. *pferde spiegel.* 2011;14(04):164-167

## Anhang

Tabelle 4: Titerverluste durch Trocknung im Brutschrank

Trocknung bei 37°C im Brutschrank							
Virus	Ausgangstiter (log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /ml)	Titer nach 15 Minuten (log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /ml)	Titerverlust	Titer nach 30 Minuten (log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /ml)	Titerverlust	Titer nach 60 Minuten (log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /m)	Titerverlust
<b>BEV</b>	7,4	6,6	0,8	7,1	0,3	4,6	2,8
	7,4	7,1	0,3	6,8	0,6	5,1	2,3
	7,4	6,9	0,4	6,9	0,4	4,1	3,3
							<b>Ø 2,8</b>
<b>BVDV</b>	6,0	5,3	0,7	4,8	1,2	4,9	1,1
	7,0	6,1	0,9	5,4	1,6	3,8	3,2
	7,0	6,3	0,7	6,9	0,1	4,8	2,2
							<b>Ø 2,1</b>
<b>EAV</b>	6,9	6,3	0,6	6,1	0,8	5,9	0,9
	7,3	6,3	1,0	6,4	0,9	5,1	2,2
	7,3	6,9	0,4	6,4	0,9	5,9	1,4
							<b>Ø 1,5</b>
<b>REOV</b>	8,5	7,4	1,1	7,6	0,9	7,3	1,2
	8,2	7,1	1,1	7,9	0,3	6,4	1,8
	8,2	7,9	0,3	7,8	0,5	7,3	1,0
							<b>Ø 1,3</b>
<b>PPV</b>	6,5	6,1	0,4	6,2	0,3	6,1	0,4
	6,6	6,4	0,2	6,6	0,0	5,1	1,5
	6,6	5,9	0,7	6,4	0,2	6,2	0,4
							<b>Ø 0,8</b>

**Tabelle 5: Titerverluste durch Trocknung im Exsikkator**

Trocknung bei RT im Exsikkator							
Virus	Ausgangstiter	Titer nach 15 Minuten		Titer nach 30 Minuten		Titer nach 60 Minuten	
	(log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /ml)	(log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /m)	Titerverlust	(log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /ml)	Titerverlust	(log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /m)	Titerverlust
<b>BEV</b>	7,4	6,8	0,6	6,4	0,9	3,2	4,2
	7,4	6,8	0,6	6,6	0,8	3,8	3,6
	7,4	6,4	0,9	6,8	0,6	4,3	3,1
					<b>Ø 0,8</b>		<b>Ø 3,6</b>
<b>BVDV</b>	6,0	5,3	0,7	5,3	0,7	5,1	0,9
	7,0	6,6	0,4	6,3	0,7	5,4	1,6
	7,0	5,9	1,1	6,6	0,4	4,4	2,6
					<b>Ø 0,6</b>		<b>Ø 1,7</b>
<b>EAV</b>	6,9	6,1	0,8	6,6	0,3	6,8	0,0
	7,3	6,3	1,0	6,3	1,0	5,9	1,4
	7,3	6,3	1,0	6,4	0,9	6,1	1,2
					<b>Ø 0,7</b>		<b>Ø 0,9</b>
<b>REOV</b>	8,5	7,6	0,9	7,3	1,2	7,1	1,4
	8,2	7,1	1,1	7,1	1,1	7,1	1,1
	8,2	7,6	0,6	7,4	0,8	7,8	0,5
					<b>Ø 1,0</b>		<b>Ø 1,0</b>
<b>PPV</b>	6,5	6,4	0,1	6,4	0,1	6,4	0,1
	6,6	5,9	0,7	6,4	0,2	6,1	0,5
	6,6	5,9	0,7	6,1	0,5	6,2	0,4
					<b>Ø 0,3</b>		<b>Ø 0,3</b>

Tabelle 6: Toxizität von Ameisensäure

Ameisensäure		Zelllinie		
Konzentration [%]	Verdünnungsstufe	MDBK	SpeV	Vero
0,25	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,5	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,75	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
1,0	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
1,5	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
2,0	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
2,5	10 <sup>-2</sup>	n.u.	-	-
	10 <sup>-3</sup>	n.u.	-	-
	10 <sup>-4</sup>	n.u.	-	-
3,0	10 <sup>-2</sup>	n.u.	-	-
	10 <sup>-3</sup>	n.u.	-	-
	10 <sup>-4</sup>	n.u.	-	-
4,0	10 <sup>-2</sup>	n.u.	-	-
	10 <sup>-3</sup>	n.u.	-	-
	10 <sup>-4</sup>	n.u.	-	-
5,0	10 <sup>-2</sup>	n.u.	-	-
	10 <sup>-3</sup>	n.u.	-	-
	10 <sup>-4</sup>	n.u.	-	-
6,0	10 <sup>-2</sup>	n.u.	-	-
	10 <sup>-3</sup>	n.u.	-	-
	10 <sup>-4</sup>	n.u.	-	-
7,5	10 <sup>-2</sup>	n.u.	-	n.u.
	10 <sup>-3</sup>	n.u.	-	n.u.
	10 <sup>-4</sup>	n.u.	-	n.u.
10,0	10 <sup>-2</sup>	n.u.	-	n.u.
	10 <sup>-3</sup>	n.u.	-	n.u.
	10 <sup>-4</sup>	n.u.	-	n.u.

Zeichenerläuterung: + toxisch, - nicht toxisch, n.u. nicht untersucht

Tabelle 7: Toxizität von Glutaraldehyd

Glutaraldehyd		Zelllinie		
Konzentration [%]	Verdünnungsstufe	MDBK	SpeV	Vero
0,05	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,1	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,25	10 <sup>-2</sup>	-	+/-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,5	10 <sup>-2</sup>	+/-	+	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,75	10 <sup>-2</sup>	+/-	+	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
1,0	10 <sup>-2</sup>	+	+	+
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
1,5	10 <sup>-2</sup>	n.u.	+	+
	10 <sup>-3</sup>	n.u.	-	-
	10 <sup>-4</sup>	n.u.	-	-
2,0	10 <sup>-2</sup>	n.u.	n.u.	+
	10 <sup>-3</sup>	n.u.	n.u.	-
	10 <sup>-4</sup>	n.u.	n.u.	-

Zeichenerläuterung: +/- leicht toxisch, aber auswertbar,  
+ toxisch, - nicht toxisch, n.u. nicht untersucht

Tabelle 8: Toxizität von Natriumhypochlorit

Natriumhypochlorit		Zelllinie		
Konzentration [%]	Verdünnungsstufe	MDBK	SpeV	Vero
<b>0,01</b>	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
<b>0,1</b>	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
<b>0,25</b>	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
<b>0,5</b>	10 <sup>-2</sup>	-	+/-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
<b>0,75</b>	10 <sup>-2</sup>	-	+/-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
<b>1,0</b>	10 <sup>-2</sup>	-	+/-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
<b>1,5</b>	10 <sup>-2</sup>	-	+	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
<b>2,0</b>	10 <sup>-2</sup>	-	+	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-

Zeichenerläuterung: +/- leicht toxisch, aber auswertbar,  
+ toxisch, - nicht toxisch, n.u. nicht untersucht

Tabelle 9: Toxizität von Natronlauge

Natronlauge		Zelllinie		
Konzentration [%]	Verdünnungsstufe	MDBK	SpeV	Vero
0,25	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,5	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,75	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
1,0	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
1,5	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
2,0	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
3,0	10 <sup>-2</sup>	n.u.	-	n.u.
	10 <sup>-3</sup>	n.u.	-	n.u.
	10 <sup>-4</sup>	n.u.	-	n.u.

Zeichenerläuterung: +/- leicht toxisch, aber auswertbar,  
+ toxisch, - nicht toxisch, n.u. nicht untersucht

Tabelle 10: Toxizität von Peressigsäure

Peressigsäure		Zelllinie		
Konzentration [%]	Verdünnungsstufe	MDBK	SpeV	Vero
0,001	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,005	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,01	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,05	10 <sup>-2</sup>	-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,1	10 <sup>-2</sup>	+/-	-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,25	10 <sup>-2</sup>	+/-	+/-	-
	10 <sup>-3</sup>	-	-	-
	10 <sup>-4</sup>	-	-	-
0,5	10 <sup>-2</sup>	+	+	n.u.
	10 <sup>-3</sup>	-	-	n.u.
	10 <sup>-4</sup>	-	-	n.u.

Zeichenerläuterung: +/- leicht toxisch, aber auswertbar,  
+ toxisch, - nicht toxisch, n.u. nicht untersucht

**Tabelle 11: Ergebnisse der Behandlungsversuche**

<b>BEV</b>				
<b>Desinfektionsmittel</b>	Konzentration [%]	Viruskontrolle	Virustiter in vorbehandelten Zellen	Abweichung
Ameisensäure	2	6,9	6,8	-0,1
Glutaraldehyd	0,25	6,9	6,9	0,0
Natriumhypochlorit	2	6,9	6,9	0,0
Natronlauge	2	6,9	6,6	-0,3
Peressigsäure	0,05	6,9	7,0	0,1
<b>BVDV</b>				
<b>Desinfektionsmittel</b>	Konzentration [%]	Viruskontrolle	Virustiter in vorbehandelten Zellen	Abweichung
Ameisensäure	2	7,0	7,0	0,0
Glutaraldehyd	0,25	7,0	7,1	0,1
Natriumhypochlorit	2	7,0	6,8	-0,3
Natronlauge	2	7,0	7,0	0,0
Peressigsäure	0,05	7,0	6,8	-0,3
<b>EAV</b>				
<b>Desinfektionsmittel</b>	Konzentration [%]	Viruskontrolle	Virustiter in vorbehandelten Zellen	Abweichung
Ameisensäure	6	6,4	6,1	-0,3
Glutaraldehyd	0,5	6,4	6,1	-0,3
Natriumhypochlorit	2	6,4	6,0	-0,4
Natronlauge	2	6,4	6,1	-0,3
Peressigsäure	0,25	6,4	6,0	-0,4
<b>PPV</b>				
<b>Desinfektionsmittel</b>	Konzentration [%]	Viruskontrolle	Virustiter in vorbehandelten Zellen	Abweichung
Ameisensäure	10	6,0	6,0	0,0
Glutaraldehyd	0,1	6,0	6,4	0,4
Natriumhypochlorit	0,1	6,0	6,1	0,1
Natronlauge	3	6,0	6,0	0,0
Peressigsäure	0,1	6,0	6,1	0,1
<b>REOV</b>				
<b>Desinfektionsmittel</b>	Konzentration [%]	Viruskontrolle	Virustiter in vorbehandelten Zellen	Abweichung
Ameisensäure	6	6,9	6,6	-0,3
Glutaraldehyd	0,5	6,9	7,1	0,3
Natriumhypochlorit	2	6,9	6,6	-0,3
Natronlauge	2	6,9	6,5	-0,4
Peressigsäure	0,25	6,9	6,8	-0,1

Tabelle 12: Keimträgerversuch mit BEV

Desinfektionsmittel	Konzentration [%]	Viruskontrolle	Virustiter in log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /ml nach					
			30 Minuten	Titerreduktion	60 Minuten	Titerreduktion	120 Minuten	Titerreduktion
Ameisensäure	0,100	7,2	6,9	0,4	6,5	0,8	6,6	0,6
	0,100	7,4	6,4	1,0	6,2	1,1	6,2	1,1
	0,500	7,2	5,2	2,0	3,1	4,1	3,1	4,1
	0,500	7,4	5,4	2,0	3,7	3,6	3,1	4,3
	1,000	7,2	3,6	3,6	3,1	4,1	3,1	4,1
	1,000	7,4	3,7	3,6	3,1	4,3	3,1	4,3
	1,500	7,2	3,1	4,1	3,1	4,1	3,1	4,1
	1,500	7,2	3,1	4,1	3,1	4,1	3,1	4,1
Glutaraldehyd	0,500	6,4	4,5	1,9	4,2	2,1	4,1	2,3
	0,500	6,9	5,0	1,9	4,0	2,9	3,5	3,4
	0,750	6,4	4,2	2,1	4,1	2,3	4,1	2,3
	0,750	6,9	4,9	2,0	4,1	2,8	3,3	3,5
	1,000	6,9	4,9	2,0	4,2	2,6	4,0	2,9
	1,000	6,4	4,4	2,0	4,2	2,1	4,1	2,3
	1,500	6,9	4,2	2,6	4,1	2,8	4,1	2,8
	1,500	6,4	4,1	2,3	4,1	2,3	4,1	2,3
	2,000	6,9	4,2	2,6	4,1	2,8	4,1	2,8
	2,000	6,4	4,1	2,3	4,1	2,3	4,1	2,3
Natriumhypochlorit	0,100	6,9	5,5	1,4	4,9	2,0	3,2	3,6
	0,100	6,7	5,4	1,4	5,9	0,9	5,0	1,8
	0,500	6,9	5,9	1,0	3,1	3,8	3,1	3,8
	0,500	6,7	4,9	1,9	5,1	1,6	4,4	2,4
	1,000	6,9	4,9	2,0	3,1	3,8	3,1	3,8
	1,000	6,7	3,1	3,6	3,1	3,6	3,1	3,6
	1,500	6,6	3,1	3,5	3,1	3,5	3,1	3,5
	1,500	6,6	3,1	3,5	3,1	3,5	3,1	3,5
Natronlauge	1,000	7,4	4,5	2,9	3,1	4,3	3,1	4,3
	1,000	7,4	4,1	3,3	3,1	4,3	3,1	4,3
	1,500	7,4	3,5	3,9	3,1	4,3	3,1	4,3
	1,500	7,4	3,1	4,3	3,1	4,3	3,1	4,3
	2,000	7,4	3,1	4,3	3,1	4,3	3,1	4,3
	2,000	7,4	3,1	4,3	3,1	4,3	3,1	4,3
Peressigsäure	0,010	7,4	5,4	2,0	5,2	2,1	3,1	4,3
	0,010	7,0	4,9	2,1	3,2	3,8	3,1	3,9
	0,050	7,4	3,7	3,6	3,1	4,3	3,1	4,3
	0,050	7,0	4,0	3,0	3,1	3,9	3,1	3,9
	0,100	7,4	3,1	4,3	3,1	4,3	3,1	4,3
	0,100	7,0	3,1	3,9	3,1	3,9	3,1	3,9

Tabelle 13: Keimträgerversuch mit BVDV

Desinfektionsmittel	Konzentration [%]	Viruskontrolle	Virustiter in log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /ml nach					
			30 Minuten	Titerreduktion	60 Minuten	Titerreduktion	120 Minuten	Titerreduktion
Ameisensäure	0,010	5,4	5,1	0,3	4,4	1,0	4,9	0,5
	0,025	5,4	4,7	0,6	4,5	0,9	4,7	0,6
	0,050	5,4	4,5	0,9	4,4	1,0	3,9	1,5
	0,075	5,4	4,2	1,1	4,2	1,1	4,1	1,3
	0,100	6,5	5,2	1,3	5,1	1,4	4,2	2,3
	0,250	5,4	3,9	1,5	3,7	1,6	3,5	1,9
	0,500	6,5	4,2	2,3	3,6	2,9	3,4	3,1
	1,000	6,5	4,2	2,3	3,2	3,3	3,1	3,4
	1,000	5,9	3,4	2,5	3,2	2,6	3,2	2,6
	1,500	5,9	3,1	2,8	3,1	2,8	3,1	2,8
	1,500	5,5	3,1	2,4	3,1	2,4	3,1	2,4
	2,000	5,9	3,1	2,8	3,1	2,8	3,1	2,8
2,000	5,5	3,1	2,4	3,1	2,4	3,1	2,4	
Glutaraldehyd	0,005	5,9	5,1	0,8	4,0	1,9	3,2	2,6
	0,005	5,6	3,9	1,8	3,2	2,4	3,1	2,5
	0,010	5,9	4,5	1,4	3,6	2,3	3,2	2,6
	0,010	5,6	3,2	2,4	3,2	2,4	3,1	2,5
	0,050	5,9	3,1	2,8	3,1	2,8	3,1	2,8
	0,050	5,6	3,1	2,5	3,1	2,5	3,1	2,5
Natriumhypochlorit	0,010	5,9	4,6	1,3	4,2	1,6	3,5	2,4
	0,010	5,4	5,2	0,1	4,6	0,8	4,2	1,1
	0,050	5,9	4,2	1,6	3,6	2,3	3,4	2,5
	0,050	5,4	4,5	0,9	4,9	0,5	4,0	1,4
	0,100	5,9	3,4	2,5	3,1	2,8	3,1	2,8
	0,100	5,4	3,5	1,9	3,1	2,3	3,1	2,3
	0,500	5,6	3,1	2,5	3,1	2,5	3,1	2,5
	0,500	5,9	3,1	2,8	3,1	2,8	3,1	2,8
Natronlauge	0,100	5,5	4,4	1,1	3,9	1,6	3,4	2,1
	0,100	5,1	4,4	0,8	3,6	1,5	3,2	1,9
	0,500	5,5	3,4	2,1	3,1	2,4	3,1	2,4
	0,500	5,1	3,1	2,0	3,1	2,0	3,1	2,0
	1,000	5,5	3,1	2,4	3,1	2,4	3,1	2,4
	1,000	5,1	3,1	2,0	3,1	2,0	3,1	2,0
Peressigsäure	0,001	5,9	4,2	1,6	4,5	1,4	3,5	2,4
	0,001	5,2	5,2	0,0	4,5	0,8	3,6	1,6
	0,005	5,9	3,2	2,6	3,1	2,8	3,1	2,8
	0,005	5,2	3,5	1,8	3,2	2,0	3,1	2,1
	0,010	5,9	3,2	2,6	3,1	2,8	3,1	2,8
	0,010	5,2	3,2	2,0	3,1	2,1	3,1	2,1
	0,050	5,6	3,1	2,5	3,1	2,5	3,1	2,5
	0,050	5,6	3,1	2,5	3,1	2,5	3,1	2,5

Tabelle 14: Keimträgerversuch mit EAV

Desinfektionsmittel	Konzentration [%]	Viruskontrolle	Virustiter in log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /ml nach					
			30 Minuten	Titerreduktion	60 Minuten	Titerreduktion	120 Minuten	Titerreduktion
Ameisensäure	0,0500	6,6	5,1	1,5	5,1	1,5	4,7	1,9
	0,0500	5,6	5,4	0,3	5,4	0,3	5,0	0,6
	0,1000	6,6	5,2	1,4	4,5	2,1	3,9	2,8
	0,1000	5,6	4,5	1,1	3,7	1,9	3,6	2,0
	0,5000	5,6	4,0	1,6	3,2	2,4	3,1	2,5
	0,5000	6,6	3,2	3,4	3,1	3,5	3,1	3,5
	1,0000	5,4	3,1	2,3	3,1	2,3	3,1	2,3
	1,0000	5,6	3,1	2,5	3,1	2,5	3,1	2,5
	1,5000	5,4	3,1	2,3	3,1	2,3	3,1	2,3
	2,0000	5,4	3,1	2,3	3,1	2,3	3,1	2,3
Glutaraldehyd	0,0010	6,2	5,4	0,9	4,5	1,8	3,6	2,6
	0,0010	6,0	4,0	2,0	3,2	2,8	3,1	2,9
	0,0050	6,2	5,0	1,2	4,5	1,7	3,1	3,1
	0,0050	6,0	3,4	2,7	3,1	2,9	3,1	2,9
	0,0100	6,2	4,4	1,9	3,2	3,0	3,1	3,1
	0,0100	6,0	3,3	2,7	3,1	2,9	3,1	2,9
	0,0500	5,6	3,1	2,5	3,1	2,5	3,1	2,5
	0,0500	5,6	3,1	2,5	3,1	2,5	3,1	2,5
Natriumhypochlorit	0,0100	6,6	4,5	2,1	3,7	2,9	4,0	2,6
	0,0100	5,4	3,5	1,9	3,4	2,0	3,2	2,1
	0,0500	6,6	4,5	2,1	3,5	3,1	3,1	3,5
	0,0500	5,4	3,1	2,3	3,1	2,3	3,1	2,3
	0,1000	6,6	3,1	3,5	3,2	3,4	3,1	3,5
	0,1000	5,4	3,1	2,3	3,2	2,1	3,1	2,3
	0,5000	5,6	3,1	2,5	3,1	2,5	3,1	2,5
	0,5000	5,6	3,1	2,5	3,1	2,5	3,1	2,5
Natronlauge	0,2500	5,7	3,6	2,1	3,4	2,4	3,2	2,5
	0,2500	5,5	3,6	1,9	3,1	2,4	3,2	2,3
	0,5000	5,7	3,1	2,6	3,1	2,6	3,1	2,6
	0,5000	5,5	3,1	2,4	3,1	2,4	3,1	2,4
	1,0000	5,7	3,1	2,6	3,1	2,6	3,1	2,6
	1,0000	5,5	3,1	2,4	3,1	2,4	3,1	2,4
Peressigsäure	0,0005	5,6	4,5	1,1	4,6	1,0	3,2	2,4
	0,0005	5,4	4,1	1,3	3,1	2,3	3,1	2,3
	0,0010	5,6	4,0	1,6	3,4	2,3	3,6	2,0
	0,0010	5,4	3,2	2,1	3,1	2,3	3,1	2,3
	0,0050	5,6	3,1	2,5	3,1	2,5	3,1	2,5
	0,0050	5,4	3,1	2,3	3,1	2,3	3,1	2,3

Tabelle 15: Keimträgerversuch mit PPV

Desinfektionsmittel	Konzentration [%]	Viruskontrolle	Virustiter in log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /ml nach					
			30 Minuten	Titerreduktion	60 Minuten	Titerreduktion	120 Minuten	Titerreduktion
Ameisensäure	5,000	5,9	5,0	0,9	4,5	1,4	4,1	1,8
	5,000	5,6	4,2	1,4	4,4	1,3	4,2	1,4
	7,500	5,9	4,5	1,4	3,9	2,0	3,5	2,4
	7,500	5,6	4,1	1,5	3,6	2,0	3,6	2,0
	10,000	5,9	4,0	1,9	3,1	2,8	3,1	2,8
	10,000	5,6	3,6	2,0	3,2	2,4	3,1	2,5
Glutaraldehyd	0,100	5,9	4,6	1,3	4,0	1,9	3,4	2,5
	0,100	6,4	4,6	1,8	4,2	2,1	3,1	3,3
	0,250	6,6	4,5	2,1	3,4	3,3	3,1	3,5
	0,250	6,4	4,6	1,8	3,7	2,6	3,1	3,3
	0,500	6,6	3,1	3,5	3,1	3,5	3,1	3,5
	0,500	6,4	4,4	2,0	3,6	2,8	3,1	3,3
	0,750	6,6	4,0	2,6	3,1	3,5	3,1	3,5
	0,750	6,2	3,6	2,6	3,1	3,1	3,1	3,1
	1,000	6,2	4,1	2,1	3,1	3,1	3,1	3,1
	1,000	6,2	4,1	2,1	3,1	3,1	3,1	3,1
	1,500	6,5	4,1	2,4	4,1	2,4	4,1	2,4
	1,500	6,5	4,1	2,4	4,1	2,4	4,1	2,4
	2,000	6,5	4,1	2,4	4,1	2,4	4,1	2,4
	2,000	6,5	4,1	2,4	4,1	2,4	4,1	2,4
2,500	6,5	4,1	2,4	4,1	2,4	4,1	2,4	
2,500	6,5	4,1	2,4	4,1	2,4	4,1	2,4	
Natriumhypochlorit	0,010	6,0	5,4	0,6	4,7	1,3	4,9	1,1
	0,010	6,0	5,2	0,8	5,0	1,0	4,9	1,1
	0,100	6,0	4,6	1,4	4,9	1,1	5,0	1,0
	0,100	6,0	4,9	1,1	5,2	0,8	4,4	1,6
	1,000	6,6	3,1	3,5	3,1	3,5	3,1	3,5
	1,000	6,2	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1
	1,500	6,6	3,1	3,5	3,1	3,5	3,1	3,5
	1,500	6,2	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1
	2,000	6,6	3,1	3,5	3,1	3,5	3,1	3,5
2,000	6,2	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	
Natronlauge	0,050	6,2	5,6	0,6	5,2	1,0	4,9	1,4
	0,100	6,2	5,2	1,0	5,1	1,1	4,6	1,6
	0,500	6,2	5,1	1,1	4,6	1,6	4,4	1,9
	0,500	6,0	4,2	1,8	3,2	2,8	3,2	2,8
	1,000	6,2	4,2	2,0	4,7	1,5	3,2	3,0
	1,000	6,0	4,0	2,0	3,1	2,9	3,1	2,9
	1,500	6,2	4,6	1,6	4,1	2,1	3,1	3,1
	1,500	6,0	4,1	1,9	3,1	2,9	3,1	2,9
	2,000	6,2	4,1	2,1	3,2	3,0	3,1	3,1
	2,000	6,0	3,1	2,9	3,1	2,9	3,1	2,9
	2,500	6,0	3,1	2,9	3,1	2,9	3,1	2,9
	2,500	6,0	3,1	2,9	3,1	2,9	3,1	2,9
	3,000	6,0	3,1	2,9	3,1	2,9	3,1	2,9
	3,000	6,0	3,1	2,9	3,1	2,9	3,1	2,9
Peressigsäure	0,001	6,0	5,2	0,8	4,7	1,3	5,0	1,0
	0,001	6,4	5,1	1,3	4,9	1,5	4,1	2,3
	0,010	6,0	4,2	1,8	3,4	2,6	3,1	2,9
	0,010	6,4	3,5	2,9	3,4	3,0	3,1	3,3
	0,100	6,0	3,1	2,9	3,1	2,9	3,1	2,9
	0,100	6,4	3,1	3,3	3,1	3,3	3,1	3,3

Tabelle 16: Keimträgerversuch mit REOV

Desinfektionsmittel	Konzentration [%]	Viruskontrolle	Virustiter in log <sub>10</sub> KID <sub>50</sub> /ml nach					
			30 Minuten	Titerreduktion	60 Minuten	Titerreduktion	120 Minuten	Titerreduktion
Ameisensäure	1,000	7,0	6,4	0,6	6,6	0,4	5,5	1,5
	1,500	7,0	6,2	0,8	6,1	0,9	5,6	1,4
	2,000	7,1	6,4	0,8	6,1	1,0	4,6	2,5
	2,500	7,1	6,4	0,8	5,9	1,3	5,0	2,1
	3,000	7,1	5,4	1,8	5,5	1,6	4,6	2,5
	3,500	7,5	5,6	1,9	5,5	2,0	4,6	2,9
	3,500	7,2	5,9	1,4	5,4	1,9	5,2	2,0
	4,000	7,5	5,9	1,6	4,7	2,8	4,0	3,5
	4,000	7,2	5,5	1,8	5,4	1,9	5,4	1,9
	4,500	7,5	4,5	3,0	4,7	2,8	4,0	3,5
	4,500	7,2	5,5	1,8	4,9	2,4	5,2	2,0
	5,000	7,5	5,9	1,6	4,6	2,9	4,7	2,8
	5,000	7,2	5,1	2,1	5,4	1,9	4,7	2,5
	5,500	7,5	5,5	2,0	5,2	2,3	4,9	2,6
	5,500	7,2	5,5	1,8	5,4	1,9	4,5	2,8
	6,000	7,5	5,2	2,3	4,5	3,0	3,4	4,1
	6,000	7,2	5,4	1,9	5,1	2,1	3,4	3,9
Glutaraldehyd	0,010	7,9	6,6	1,3	6,2	1,6	5,2	2,6
	0,050	7,9	6,5	1,4	5,9	2,0	4,7	3,1
	0,100	7,2	6,1	1,1	5,0	2,3	4,2	3,0
	0,100	7,9	6,0	1,9	5,9	2,0	4,9	3,0
	0,250	7,2	5,7	1,5	4,6	2,6	4,0	3,3
	0,250	7,2	6,0	1,3	4,9	2,4	3,7	3,5
	0,500	7,2	5,1	2,1	3,9	3,4	3,9	3,4
	0,500	7,9	5,1	2,8	4,7	3,1	3,9	4,0
	0,750	7,2	5,5	1,8	3,7	3,5	3,2	4,0
	0,750	7,2	5,2	2,0	4,5	2,8	3,1	4,1
	1,000	7,6	4,2	3,4	4,1	3,5	4,1	3,5
	1,000	7,6	4,1	3,5	4,1	3,5	4,1	3,5
	1,500	7,6	4,5	3,1	4,1	3,5	4,1	3,5
	1,500	7,6	4,1	3,5	4,1	3,5	4,1	3,5
	2,000	7,6	4,2	3,4	4,1	3,5	4,1	3,5
	2,000	7,6	4,1	3,5	4,1	3,5	4,1	3,5
	Natriumhypochlorit	0,100	7,1	6,1	1,0	5,7	1,4	5,4
0,100		7,0	6,1	0,9	5,9	1,1	5,1	1,9
0,500		7,1	5,5	1,6	3,9	3,3	3,1	4,0
0,500		7,0	4,5	2,5	3,1	3,9	3,1	3,9
1,000		7,1	3,4	3,8	3,2	3,9	3,1	4,0
1,000		7,0	3,1	3,9	3,1	3,9	3,1	3,9
1,500		7,7	3,1	4,6	3,1	4,6	3,1	4,6
1,500		7,5	3,1	4,4	3,1	4,4	3,1	4,4
Natronlauge	0,100	7,5	6,2	1,3	5,5	2,0	5,6	1,9
	0,100	7,7	6,2	1,5	5,7	2,0	5,5	2,3
	0,500	7,5	4,7	2,8	3,1	4,4	3,1	4,4
	0,500	7,7	5,1	2,6	3,5	4,3	3,1	4,6
	1,000	7,5	3,1	4,4	3,1	4,4	3,1	4,4
	1,000	7,7	3,1	4,6	3,1	4,6	3,1	4,6
	1,500	7,5	3,1	4,4	3,1	4,4	3,1	4,4
Peressigsäure	0,005	7,1	5,2	1,9	4,7	2,4	3,1	4,0
	0,005	7,7	5,5	2,3	3,4	4,4	3,1	4,6
	0,010	7,1	4,5	2,6	3,1	4,0	3,1	4,0
	0,010	7,7	4,6	3,1	3,1	4,6	3,1	4,6
	0,050	7,4	3,1	4,3	3,1	4,3	3,1	4,3
	0,050	7,7	3,1	4,6	3,1	4,6	3,1	4,6

## Chemikalien und Reagenzien

### Rezeptur zur PBS-Herstellung

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

pH 7,4

Die Lösung wurde im Autoklaven bei 121°C für 20 min sterilisiert.

### Rezeptur zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte (WSH)

Lösung A: 1,984 g MgCl<sub>2</sub>, 4,624 g CaCl<sub>2</sub> werden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt  
Membranfiltration oder Autoklavieren. Lagerung bei 2-8°C für maximal einen Monat.

Lösung B: 3,5 g NaHCO<sub>3</sub> wird mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt  
Membranfiltration. Lagerung bei 2-8°C für maximal eine Woche

### Gebrauchslösung:

6 ml der Lösung A und 8 ml der Lösung B zu 700 ml Aqua dest. geben und auf 1000 ml auffüllen.  
pH-Wert 7,0 ± 0,2 bei 20°C ± 1°C. Falls notwendig muss der pH-Wert 1 mol/l NaOH bzw. 1 mol/l  
HCl eingestellt werden.

Das Wasser standardisierter Härte muss unter sterilen Bedingungen hergestellt und binnen 12  
Stunden verwendet werden

---

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: native Vero-Zellen ohne cpE (100x Vergrößerung).....	31
Abbildung 2: Vero-Zellen nach Infizierung mit EAV.....	32
Abbildung 3: Vero-Zellen nach Infizierung mit REOV.....	32
Abbildung 4: native MDBK-Zellen ohne cpE (100x Vergrößerung).....	33
Abbildung 5: MDBK-Zellen nach Infizierung mit BEV.....	33
Abbildung 6: MDBK-Zellen nach Infizierung mit BVDV.....	34
Abbildung 7: native SpeV-Zellen ohne cpE (100x Vergrößerung).....	34
Abbildung 8: SpeV-Zellen nach Infizierung mit PPV.....	35
Abbildung 9: Titerverlust durch 60 minütige Trocknung im Brutschrank.....	36
Abbildung 10: Titerverluste im Exsikkator nach 30 und 60 minütiger Trocknung.....	37
Abbildung 11: Titerverluste nach 60 minütiger Trocknung im Brutschrank und im Exsikkator.....	38
Abbildung 12: Viruzide Wirkung von Ameisensäure im Holzkeimträgerversuch mit BEV.....	40
Abbildung 13: Viruzide Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch mit BEV.....	41
Abbildung 14: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Holzkeimträgerversuch mit BEV.....	41
Abbildung 15: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Holzkeimträgerversuch mit BEV.....	42
Abbildung 16: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Holzkeimträgerversuch mit BEV.....	42
Abbildung 17: Viruzide Wirkung von Ameisensäure im Holzkeimträgerversuch mit BVDV.....	43
Abbildung 18: Viruzide Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch mit BVDV.....	44
Abbildung 19: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Holzkeimträgerversuch mit BVDV.....	44
Abbildung 20: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Holzkeimträgerversuch mit BVDV.....	45
Abbildung 21: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Holzkeimträgerversuch mit BVDV.....	45
Abbildung 22: Viruzide Wirkung von Ameisensäure im Holzkeimträgerversuch mit EAV.....	46
Abbildung 23: Viruzide Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch mit EAV.....	47
Abbildung 24: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Holzkeimträgerversuch mit EAV.....	47
Abbildung 25: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Holzkeimträgerversuch mit EAV.....	48
Abbildung 26: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Holzkeimträgerversuch mit EAV.....	48
Abbildung 27: Viruzide Wirkung von Ameisensäure im Holzkeimträgerversuch mit PPV.....	50
Abbildung 28: Viruzide Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch mit PPV.....	50
Abbildung 29: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Holzkeimträgerversuch mit PPV.....	51

Abbildung 30: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Holzkeimträgerversuch mit PPV ..... 51

Abbildung 31: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Holzkeimträgerversuch mit PPV ..... 52

Abbildung 32: Viruzide Wirkung von Ameisensäure im Holzkeimträgerversuch mit REOV..... 53

Abbildung 33: Viruzide Wirkung von Glutaraldehyd im Holzkeimträgerversuch mit REOV ..... 53

Abbildung 34: Viruzide Wirkung von Natriumhypochlorit im Holzkeimträgerversuch mit REOV..... 54

Abbildung 35: Viruzide Wirkung von Natronlauge im Holzkeimträgerversuch mit REOV ..... 54

Abbildung 36: Viruzide Wirkung von Peressigsäure im Holzkeimträgerversuch mit REOV ..... 55

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verfahren zur Inaktivierung von Mikroorganismen.....	5
Tabelle 2: verwendete chemische Grundsubstanzen.....	21
Tabelle 3: Übersicht Geräte, Laborbedarf, Reagenzien.....	22
Tabelle 4: Titerverluste durch Trocknung im Brutschrank.....	76
Tabelle 5: Titerverluste durch Trocknung im Exsikkator.....	77
Tabelle 6: Toxizität von Ameisensäure.....	78
Tabelle 7: Toxizität von Glutaraldehyd.....	79
Tabelle 8: Toxizität von Natriumhypochlorit.....	80
Tabelle 9: Toxizität von Natronlauge.....	81
Tabelle 10: Toxizität von Peressigsäure.....	82
Tabelle 11: Ergebnisse der Behandlungsversuche.....	83
Tabelle 12: Keimträgerversuch mit BEV.....	84
Tabelle 13: Keimträgerversuch mit BVDV.....	85
Tabelle 14: Keimträgerversuch mit EAV.....	86
Tabelle 15: Keimträgerversuch mit PPV.....	87
Tabelle 16: Keimträgerversuch mit REOV.....	88

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während meiner Promotion in jeglicher Form unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Uwe Truyen für die Bereitstellung des Themas und die wissenschaftliche Betreuung dieser Promotionsarbeit.

Herrn Prof. Dr. Martin Pfeffer und Herrn Prof. Dr. Johannes Kauffold für die Ermöglichung einer befristeten Finanzierung.

Frau Dr. Stephanie Speck für die wissenschaftliche Betreuung und die Hilfe bei der Abfassung meiner Dissertation.

Frau Dr. Carolin Karnath für ihre konstruktive Unterstützung, motivierenden Worte und für die Hilfe bei der Abfassung meiner Dissertation.

Frau Nadja Leinecker für die intensive Einarbeitung und unermüdliche Unterstützung im Labor.

Weiterhin danke ich:

allen Mitarbeiterinnen, Mitarbeitern und Mitdoktoranden des Institutes für das kollegiale Miteinander, die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Motivation und Aufmunterung.

meinen Eltern für die Unterstützung und Motivation während des Studiums und der Promotion.