

# DR. JOCHEN STEINMANN

Wiss. techn. Leiter der  
MikroLab GmbH

Norderoog 2  
D-28259 Bremen

Tel.: +49 (421) 27819102  
Fax: +49 (421) 2760283  
<http://www.mikrolab-gmbh.de>  
E-Mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

2005-01-31  
Dr. St/sbe

B. Braun Medical AG  
Seesatz

CH-6203 Sempach Station

vacciniavirus efficacy of SOFTASEPT N in a quantitative suspension test at 20°C

## EXPERT OPINION

The virus-inactivating properties of the skin disinfectant SOFTASEPT N of B. Braun Medical AG against vacciniavirus strain Elstree was investigated by a quantitative suspension test published as a guideline of the Bundesgesundheitsamt (BGA, now Robert Koch-Institut) and the Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV, German Association for the Control of Virus Diseases). According to this suspension test, a disinfectant or a disinfectant solution at a particular concentration is considered as having virucidal efficacy if within the recommended exposure period the titre is reduced by 4 logs<sub>10</sub>.

SOFTASEPT N was examined as 80.0% solution at 20°C. The exposure times were 15, 30 and 60 seconds. After an exposure time of 15 seconds virus reduction exceeded 4 log<sub>10</sub>-steps in all assays. Therefore, it can be recommended to use the skin disinfectant SOFTASEPT N for the inactivation of vacciniavirus as follows:

**undiluted      15 sek.**

  
Dr. J. Steinmann

# DR. JOCHEN STEINMANN

Wiss. techn. Leiter der  
MikroLab GmbH

Norderoog 2  
D-28259 Bremen

Tel.: +49 (421) 27819102  
Fax: +49 (421) 2760283  
<http://www.mikrolab-gmbh.de>  
E-Mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

31.01.2005  
Dr. St/sbe

B. Braun Medical AG  
Seesatz

CH-6203 Sempach Station

Vacciniavirus-Wirksamkeit von SOFTASEPT N im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C

## GUTACHTERLICHE BEURTEILUNG

Das Hautdesinfektionsmittel SOFTASEPT N der B. Braun Medical AG wurde gemäß Auftrag auf seine virusinaktivierenden Eigenschaften gegenüber dem Vacciniavirus Stamm Elstree nach der Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes (BGA, jetzt Robert Koch-Institut) und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) untersucht.

In der Richtlinie des BGA und der DVV wird dann von einer Virus-Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels im Suspensionstest ausgegangen, wenn nach einer bestimmten Einwirkzeit eine Reduktion des initialen Virustiters von vier  $\log_{10}$ -Stufen (Inaktivierung  $\geq 99,99\%$ ) erfolgt ist.

Das Hautdesinfektionsmittel SOFTASEPT N wurde als unverdünnte Lösung bei 20°C untersucht. Die Einwirkzeiten betrugen 15, 30 und 60 Sekunden. Nach 15 Sekunden Einwirkzeit konnte kein Virus mehr detektiert werden, und die Reduktion des Virustiters erreichte in allen Ansätzen vier  $\log_{10}$ -Stufen. Nach diesen Untersuchungsergebnissen kann deshalb empfohlen werden, das Hautdesinfektionsmittel SOFTASEPT N zur Inaktivierung des Vacciniavirus Stamm Elstree wie folgt einzusetzen:

**unverdünnt      15 Sekunden**



Dr. J. Steinmann

# DR. JOCHEN STEINMANN

Wiss. techn. Leiter der  
MikroLab GmbH

Norderoog 2  
D-28259 Bremen

Tel.: +49 (421) 27819102  
Fax: +49 (421) 2760283  
<http://www.mikrolab-gmbh.de>  
E-Mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

31.01.2005  
Dr. St/sbe

B. Braun Medical AG  
Seesatz

CH-6203 Sempach Station

Vacciniavirus-Wirksamkeit von SOFTASEPT N im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C

## UNTERSUCHUNGSBERICHT

Das Hautdesinfektionsmittel SOFTASEPT N der B. Braun Medical AG wurde gemäß Auftrag auf seine virusinaktivierenden Eigenschaften gegenüber dem Vacciniavirus Stamm Elstree im quantitativen Suspensionsversuch geprüft. Die Prüfung erfolgte nach der Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes (BGA, jetzt Robert Koch-Institut) und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren (1,2). Hierbei handelt es sich um Suspensionsversuche, bei denen die Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln unter definierten Bedingungen wie Präparate-Konzentration, Einwirkzeit, Temperatur und Eiweißbelastung, ermittelt werden kann.

Die Prüfrichtlinie des BGA und der DVV existiert seit 1982 und hat sich in der Vergangenheit als eine gut reproduzierbare Methode bewährt. Nach dieser Richtlinie und auch nach dem europäischen Entwurf (prEN 14476:2004 E) einer phase 2/step 1-Viruzidieprüfung (3) wird ein chemisches Desinfektionsmittel immer dann als virusinaktivierend angesehen, wenn eine Titerreduktion von vier  $\log_{10}$ -Stufen (Inaktivierung  $\geq 99,99\%$ ) darstellbar ist.

Die Ergebnisse dieser Suspensionsversuche führen zu konkreten Anwendungsempfehlungen, doch sollte beachtet werden, dass ohne entsprechende praxisnahe Versuche die Resultate lediglich eine virusinaktivierende Wirksamkeit in vitro demonstrieren.

1.     **Laboratorium**

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

2.     **Identifizierung der Probe**

Produktbezeichnung	SOFTASEPT N
Hersteller	B. Braun Medical AG
Chargennummer	1323M12
Anwendungsbereich	Hautdesinfektion
Aussehen und Geruch	klare, farblose Flüssigkeit alkoholisch
pH-Wert (Glaselektrode)	unverdünnt: 8,54 (20°C)
Lieferdatum	21.07.2004
Lagerbedingungen	Raumtemperatur, dunkel (Aufbewahrungs- bereich nicht frei zugänglich)
Aktive Substanz(en) und ihre Konzentration(en) in 100 g	74.1 g Ethanol 10.0 g Propan-2-ol

3.     **Prüfbedingungen**

Zeitraum der Prüfung	06.12.2004 - 17.01.2005
Prüftemperatur	20°C ± 1°C
Produktprüfkonzentration	konz. (80,0%)
Einwirkzeiten	15, 30 und 60 Sekunden
Eiweißbelastung	0,2% Serumalbumin (BGA/DVV) 10,0% foetales Kälberserum (BGA/DVV)
Aufhebung der Desinfektions- mittelwirkung	unmittelbare Verdünnung
Verdünnungsmittel	entfällt
Virusstamm	Vacciniavirus Stamm Elstree

## **4. Material und Methoden**

### **4.1 Herstellung der Virussuspension**

Das Vacciniavirus Stamm Elstree stammte vom Institut für Med. Virologie und Immunologie der Universität Essen. Das Virus war vor den Inaktivierungsversuchen 10 mal in GMK AH-1 Zellkulturen (green monkey kidney, permanente Affennierenzelllinie) und dreimal in HeLa-Zellen (menschliches Zervix-Karzinom) passagiert worden.

Zur Herstellung der Virussuspension wurden Vero-Zellen (african green monkey kidney cells = permanente Affennierenzellkultur), die in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Nunc GmbH & Co. KG, D-65203 Wiesbaden) mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Cambrex Bio Science Verviers s.p.r.l., B-4800 Verviers, Belgien) unter Zusatz von L-Glutamin, nicht essentiellen Aminosäuren, Natriumpyruvat und foetalem Kälberserum (Biochrom AG, D-12247 Berlin) gehalten wurden, mit dem Vacciniavirus beimpft. Nach Ausbildung des cytopathischen Effekts erfolgte ein dreifacher Einfrier-/Auftauvorgang und eine niedertourige Zentrifugation bei 800 x g, um den Zelldetritus zu entfernen. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### **4.2 Inaktivierungsansätze**

Die Ansätze wurden entsprechend der Richtlinie des BGA und der DVV bei 20°C durchgeführt. Acht Volumenteile des Desinfektionsmittels wurden mit einem Volumenteil Virussuspension und einem Volumenteil Aqua bidest. vermischt. Bei den Versuchen mit Eiweißbelastung wurde anstelle von Aqua bidest. ein Volumenteil einer 2%igen Rinderalbumin-Lösung (bovine serum albumin = BSA, Cohn Fraktion V, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82024 Taufkirchen) bzw. ein Volumenteil foetales Kälberserum (FKS) zugegeben.

Eine Kontrolle bestand aus einem Volumenteil Virussuspension, vier Volumenteilen PBS und fünf Volumenteilen einer 1,4%igen Formaldehyd-Lösung. Die Bestimmung der Formaldehyd-Konzentration wurde mit der Hydroxylammoniumchlorid-Methode vorgenommen. Ferner sind Kontrollansätze für die Bestimmung des Virustiters nach der längsten der geprüften Einwirkzeiten mitgeführt worden.

Die Inaktivierungsversuche wurden in geschlossenen Plastikröhrchen (Sarstedt AG, D-51588 Nümbrecht) in einem Wasserbad bei 20°C durchgeführt. Nach den einzelnen Einwirkzeiten wurden Teilmengen entnommen, und die Restinfektiosität ist bestimmt worden. Die Wirksamkeit des Desinfektionsmittels ist durch unmittelbare Verdünnung aufgehoben worden.

#### **4.3 Bestimmung der Infektiosität**

Die Bestimmung der Infektiosität geschah mit Hilfe der Endverdünnungstitration im Mikroverfahren. Dabei wurden die Stichproben, die unmittelbar nach ihrer Entnahme mit eiskaltem DMEM und 1% Kälberserum in ganzzahligen Potenzen von 10 verdünnt waren, jeweils zu 100 µL in acht Kavitäten einer sterilen Polystyrolplatte (Nunc GmbH & Co. KG) überführt. Dann erfolgte die Zugabe von 100 µL einer frisch trypsinisierten Vero-Zellkultur, die so eingestellt war, dass sich ca.  $2,7 \times 10^4$  Zellen pro Kavität befanden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank (5% CO<sub>2</sub>-Gehalt). Nach acht Tagen wurde abgelesen, und die Berechnung des Infektionstiters ( $\log_{10} ID_{50}$ ) ist nach der Methode von Spearman (4) und Kärber (5) vorgenommen worden.

#### **4.4 Bestimmung der Cytotoxizität**

Für die Bestimmung der Cytotoxizität des Desinfektionsmittels wurden zwei Volumenteile PBS mit acht Volumenteilen des Desinfektionsmittels bzw. der Desinfektionsmittellösung gemischt und nach serieller Verdünnung in die Mikrotiter-Platte überführt. Dieser Ansatz wurde ferner zusätzlich zu der in der Richtlinie vorgesehenen Kontrolle in Gegenwart der interferierenden Substanzen vorgenommen. Anschließend folgte die Zugabe der Zellsuspension.

Die Berechnung der cytotoxischen Dosis geschah als  $\log_{10} CD_{50}/mL$  (in Analogie zum  $ID_{50}$ -Wert).



#### 4.5 Berechnung der virusinaktivierenden Wirksamkeit

Die Beurteilung der virusinaktivierenden Wirkung des zu prüfenden Desinfektionsmittels erfolgte durch Berechnung der Titerreduktion gegenüber den jeweils parallel durchgeführten Kontrolltitrationen ohne Desinfektionsmittel. Die Differenz wird als Reduktionsfaktor (RF) angegeben.

### 5. Ergebnisse

Parallel zu den Inaktivierungsversuchen wurde die Cytotoxizität von SOFTASEPT N (80,0%) und der 0,7%igen Formaldehyd-Lösung ermittelt. Die als Kontrolle mitgeführte Formaldehyd-Lösung wirkte toxisch auf die eingesetzten Vero-Zellen bei Anwendung der 0,1%igen Verdünnung (1 : 1000). Dies bedeutet rechnerisch einen  $\log_{10}$   $CD_{50}$ /mL-Wert (in Analogie zum  $ID_{50}$ -Wert) von 4,5 (Tabelle 1).

Demgegenüber ergab sich bei der Überprüfung des Hautdesinfektionsmittels SOFTASEPT N als unverdünnte Lösung eine  $\log_{10}$   $CD_{50}$ /mL von  $\leq 1,5$ . Damit ist in der 1 : 10-Verdünnung keine Cytotoxizität nachgewiesen worden.

Diese Versuche zur Ermittlung der Cytotoxizität sind unbedingt erforderlich, um auf diese Weise die untere Nachweisbarkeitsschwelle für nichtinaktiviertes Vacciniavirus zu determinieren.

Die Untersuchungsergebnisse der Inaktivierungsversuche finden sich in der Tabelle 2 (Rohdaten siehe Appendix). Auf eine graphische Darstellung der Resultate ist aufgrund der fehlenden Kinetik der Virusinaktivierung verzichtet worden.

Die 0,7%ige Formaldehyd-Lösung reduzierte den Vacciniavirus-Titer nach fünf bzw. 15 Minuten Einwirkzeit bei 20°C um  $\geq 2,75$  bzw.  $\geq 3,38$   $\log_{10}$ -Stufen. Nach 30 und 60 Minuten betrug der RF ebenfalls  $\geq 3,38$ .

Das Hautdesinfektionsmittel SOFTASEPT N wurde als unverdünnte Lösung bei 20°C eingesetzt. Bedingt durch die Zugabe der Virussuspension und der interferierenden Substanzen resultierte eine 80,0%ige Prüfkonzentration. Die Einwirkzeiten betrugen 15, 30 und 60 Sekunden.

Die Tabelle 2 zeigt, dass das geprüfte Hautdesinfektionsmittel SOFTASEPT N als unverdünnte Lösung in allen Ansätzen in der Lage war, den initialen Virustiter nach 15 Sekunden Einwirkzeit entscheidend zu senken. Die Reduktionsfaktoren betrugen  $\geq 6,38$  (Ansatz ohne Belastung),  $\geq 6,25$  (Ansatz mit BSA) bzw.  $\geq 6,13$  (Ansatz mit FKS). Dies entspricht in allen Ansätzen einer Inaktivierung von  $\geq 99,9999\%$  und bedeutet damit eine Vacciniavirus-Wirksamkeit. Bekanntlich wird in der Richtlinie des BGA und der DVV immer dann von einer Virus-Wirksamkeit ausgegangen, wenn eine Titerreduktion von gleich oder größer vier  $\log_{10}$ -Stufen (Inaktivierung  $\geq 99,99\%$ ) darstellbar ist.



Dr. J. Steinmann



## Literatur

1. Richtlinien des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren.  
Bundesgesundheitsblatt 25, 1982, 397-398
2. Kommentar zur Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren.  
Bundesgesundheitsblatt 26, 1983, 413-414
3. prEN 14476:2004 E: Chemical disinfectants and antiseptics - virucidal quantitative suspension test - Test method and requirements (phase 2, step 1)
4. Spearman, C.: The method of 'right or wrong cases' (constant stimuli) without Gauss's formulae.  
Brit J Psychol 1908; 2: 227-242
5. Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.  
Arch Exp Path Pharmac 1931; 162: 480-487

**Tabelle 1: Cytotoxizität von SOFTASEPT N (80,0%) und der 0,7%igen Formaldehyd-Lösung.**

Konzentration	Belastung	Verdünnungsstufen				
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
80,0%	ohne	-	-	-	-	-
80,0%	0,2% BSA	-	-	-	-	-
80,0%	10,0% FKS	-	-	-	-	-
Formaldehyd-Konzentration						
0,7%	ohne	+	+	+	-	-

**Tabelle 2: Inaktivierung des Vacciniavirus Stamm Elstree durch SOFTASEPT N (80,0%) und Formaldehyd (0,7%) im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C ± 1°C.**

Produkt	Konz.	Belastung	log <sub>10</sub> ID <sub>50</sub> /mL nach				≥ 4 log <sub>10</sub> Reduktion nach
			15 Sek.	30 Sek.	60 Sek.	120 Sek.	
Prüfpräparat	80,0%	ohne	≤ 1,50	≤ 1,50	≤ 1,50	n.d.	15 Sek.
Prüfpräparat	80,0%	0,2% BSA	≤ 1,50	≤ 1,50	≤ 1,50	n.d.	15 Sek.
Prüfpräparat	80,0%	10,0% FKS	≤ 1,50	≤ 1,50	≤ 1,50	n.d.	15 Sek.
Formaldehyd	0,7%	ohne	5 Min.	15 Min.	30 Min.	60 Min.	
			≤ 5,13	≤ 4,50	≤ 4,50	≤ 4,50	≥ 15 Min.
Virus-Kontrollprobe	n.a.	ohne	n.d.	n.d.	n.d.	7,88	n.a.
Virus-Kontrollprobe	n.a.	0,2% BSA	n.d.	n.d.	n.d.	7,75	n.a.
Virus-Kontrollprobe	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	7,63	n.a.

n.d. = nicht durchgeführt  
n.a. = nicht anwendbar

Produkt	Konzentration	Interferierende Substanz	Einwirkzeit (sec)	Verdünnungen (log <sub>10</sub> )											
				1	2	3	4	5	6	7	8	9			
Softasept N	80,0%	Aqua bidest.	15	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.		
			30	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	
			60	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	
			120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
		0,2% BSA	15	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
			30	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
			60	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
			120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		10,0% FKS	15	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
			30	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
			60	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.
			120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Softasept N Cytotoxizität	80,0%	PBS	n.a.	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
		0,2% BSA	n.a.	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
		10,0% FKS	n.a.	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
Viruskontrolle	n.a.	Aqua bidest.		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 3041	0000 0000	0000 0000	0000 0000		
		0,2% BSA		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 0300	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000		
		10,0% FKS		4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4444	4444 4004	0040 2000	0000 0003	0000 0000	0000 0000	0000 0000		

n.a. = nicht anwendbar  
n.d. = nicht durchgeführt

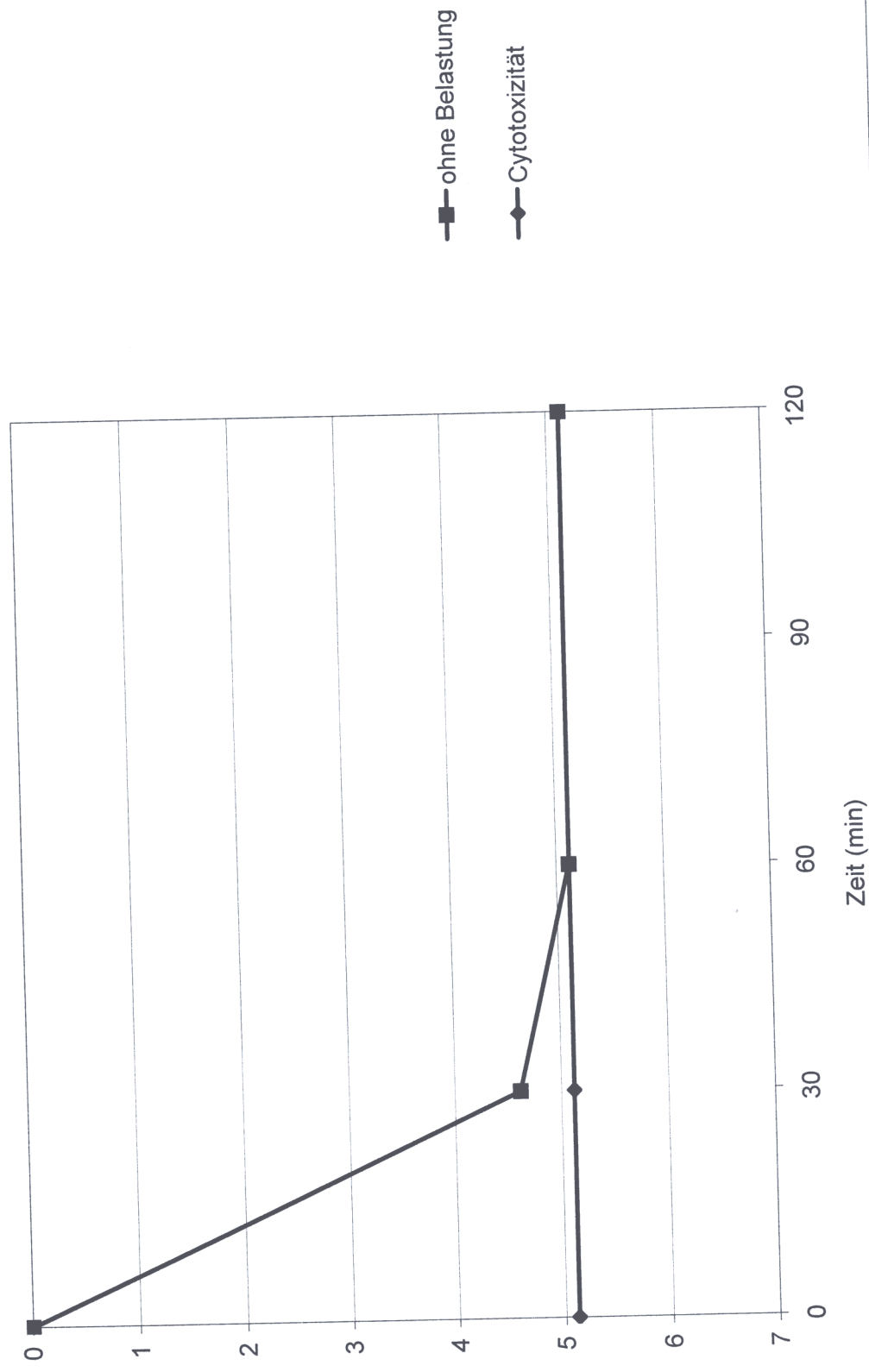
CT = cytotoxisch

0 = kein Virus vorhanden

1 bis 4 = Virus vorhanden (Grad des CPE in 8 Wells einer Mikrotiterplatte)

Titerreduktion  
 $\Delta \log_{10} \text{ID}_{50}$

**Abb. 2: Poliovirus-Wirksamkeit von Ultraseptin FF (2,0%)**



Appendix Tabelle 2: Rohdaten für die Formaldehyd-Kontrolle

Produkt	Konzentration	Interferierende Substanz	Einwirkzeit (min)	Verdünnungen (log <sub>10</sub> )								
				1	2	3	4	5	6	7	8	9
Formaldehyd	0,7% (m/V)	PBS	5	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	3004 0333	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d. n.d.
			15	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d. n.d.
			30	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d. n.d.
			60	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	0000 0000	n.d. n.d.
Formaldehyd Cytotoxizität	0,7% (m/V)	PBS	n.a.	tttt tttt	tttt tttt	tttt tttt	0000 0000	0000 0000	n.d. n.d.	n.d. n.d.	n.d. n.d.	

n.a. = nicht anwendbar  
n.d. = nicht durchgeführt

t = cytotoxisch

0 = kein Virus vorhanden

1 bis 4 = Virus vorhanden (Grad des CPE in 8 Wells einer Mikrotiterplatte)



Titerreduktion

$\Delta \log_{10} \text{ID}_{50}$

**Abb. 1: Poliovirus-Wirksamkeit von Formaldehyd (0,7 %) bei 20°C**

