Dr. Christian Jursch
Eurovir Hygiene-Labor GmbH
Im Biotechnologiepark 9
D-14943 Luckenwalde

Eurovir® Hygiene-Labor
Antivirale Validierung & Rabies

Testung der viruziden Eigenschaften von 3 Produktmustern

(Shieldex® Bonn, Shieldex® Kiel-SK-96 sowie einer Korrosionsprobe)

Screeningtest mit Durchführung in Anlehnung an die ISO 18184:2019 vs. dem *Bovinen Coronavirus* (BoCV-Coronavirus) - Testdurchgang S2 vom 12.06.2020

Kurzbericht zum Screeningtest S2

von
PD Dr. Olaf Thraenhart und Dr. Christian Jursch

Untersuchung:	im Juni 2020
Auftraggeber:	STATEX Produktions- und Vertriebs GmbH Kleiner Ort 11 D-28357 Bremen

Dr. Christian Jursch
Eurovir Hygiene-Labor GmbH
Im Biotechnologiepark 9
D-14943 Luckenwalde

Auftraggeber: STATEX Produktions- und Vertriebs GmbH
Kleiner Ort 11
D-28357 Bremen

Produkte:

- Kontrollproben: Shieldex® PBN II Rohware 1,5 Oz
- Wirkproben: a). Shieldex® Bonn
  b). Korrosionsprobe
  c). Shieldex® Kiel SK 96

Testparameter:

- Einwirkbedingungen: T = 25 °C (nach ISO 18184) und 90 % r.LF
- Proteinbelastung: ohne (weitere) Belastung;
  das Virusmaterial (Zellkulturüberstand) wurde unverändert aufgetragen
- Volumen/Flächenverhältnis: 157 µL auf einer Fläche von 3,14 cm² (Scheibe, d = 2 cm)
- Inkubation für die Muster a). Shieldex® Bonn und b). die Korrosionsprobe für i). 1 Std., ii). 2 Std. sowie iii). 4 Std. im Klimaschrank KBF 115 (Fa Binder)
- Inkubation für das Muster c). Shieldex® Kiel SK 96 für i). 7 Min., ii). 15 Min. sowie iii). 30 Min. im Klimaschrank KBF 115 (Fa Binder)
- Die Probenscheiben wurden jeweils in die Vertiefung einer 12-well Zellkulturplatte (TPP) eingelegt. Die Inkubation erfolgte anschließend mit geschlossenem Deckel.
- Die Resupendierung des Virusmaterials erfolgt in den jeweiligen Vertiefungen. Nach Zugabe von 5 mL Zellkulturmedium in die Vertiefung wurde die Probenscheibe unter Verwendung einer Pipette repetetiv (15x) mit V = 1 mL Medium bespült.

Testsystem:

- Bovines Coronavirus (Beta-Coronavirus); Stamm: S379 Riems
  (Herkunft: Friedrich Löffler-Institut, Insel Riems)
- HRT-18 Zellen
  (Herkunft: Inst. f. Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Giessen)

Testverfahren:

- Die Versuche wurden in Anlehnung an die ISO 18184:2019 im quantitativen viruziden Keimträgertest bei T = 25 °C (im Klimaschrank) durchgeführt.
- Die Tests wurden ohne zusätzliche Belastung durchgeführt.

***Tab. 1:* Getestete Produktmuster**

Lfd. Nr.	Produkt (e)	Lagerung [1]
#1	textiles Grundmaterial / Shieldex PBN II (Nullprobe)	bei RT
#2	textiles Keimträgermaterial / Shieldex Bonn (Wirkprobe 1)	bei RT
#3	textiles Keimträgermaterial / Korrosionsprobe (Wirkprobe 3)	bei RT
#4	textiles Keimträgermaterial / Shieldex Kiel SK 96 (Wirkprobe 2)	bei RT

[1] = *zugangsbeschränkt*

Ergebnisse:

Beschichtung der Keimträger

- Die Ausrüstung des textilen Testmaterials (Wirk- und Kontrollprobe) erfolgte durch den Auftraggeber, der dieses Material zur Verfügung gestellt hat.
- Bei Eurovir wurden aus diesem Probenmaterial unter Verwendung eines Schlageisens runde Probenscheiben (Testscheiben) mit d = 2 cm herausgetrennt.

Zur Testdurchführung

- Diese Testscheiben wurden in eine 12-Zellkulturplatte eingelegt (jeweils separat), worin auch die Inokulation mit dem Virusmaterial und auch die Resuspendierung nach Ablauf der Kontaktzeit durchgeführt wurde. Der Deckel der 12-Platte war dabei aufgelegt.
- Vor der Verwendung wurden die Testproben nicht mittels Autoklavieren sterilisiert. Das Testmaterial besteht aus einer Kunstfaser, welches diese Prozedur nicht übersteht.

Beobachtungen

- Mit der Probenscheiben „VK“ (Probenmaterial ohne Ausrüstung) wurde nicht das gesamte Material vom Textil aufgesaugt. Es verblieb ein Rest bzw. die Scheibe „schwamm“ in der Virussuspension.
- Bei den mit dem Produkt beschichteten Probenscheiben blieb das Virusmaterial zunächst als kleine Tröpfchen auf der Oberfläche stehen. Mit fortschreitender Zeit wurde das Material aufgesaugt.
- Die ausgerüsteten Probenscheiben waren z.T. auf der Rückseite mit einem selbstklebenden Material nebst Schutzfolie versehen.
- Innerhalb des Beobachtungszeitraums (bis 4 h) war keine Eintrocknung des Materials zu beobachten.
- Die Resuspendierung des Virusmaterials war augenscheinlich unauffällig.
- Bei den Proben „Korrosionsprobe“ wurde sichtbar Material von der Oberfläche in den Überstand abgegeben.
- Weitere Beobachtungen / unvorhergesehene Ereignisse wurden nicht verzeichnet

Ergebnisse der Virustitrationen

Tab. 2.1: Viruskontrolle *(Virustiterbestimmung mittels Endpunkttitration)*

Probe Nr.	VK-1a	VK-1b	VK-2a	VK-2b	VK-3a	VK-3b
Ansatz	Viruskontr. / 1 Std.		Viruskontr. / 2 Std.		Viruskontr. / 4 Std.	
Titer/Testvol. (lg ID_{50})	5,1	5,1	5,1	4,95	4,65	4,65
mittl. Virustiter ± K (95%) [1]	**5,10 ± 0,29 / 100 µL**		**5,03 ± 0,29 / 100 µL**		**4,65 ± 0,31 / 100 µL**	

[1] = Berechnung des Titerwertes sowie dessen 95 % Konfidenzintervalls nach der DVV/RKI-Leitlinie

Dr. Christian Jursch
Eurovir Hygiene-Labor GmbH
Im Biotechnologiepark 9
D-14943 Luckenwalde

Tab. 2.2: Virusinaktivierung *(Virustiterbestimmung mittels Endpunkttitration)*

Probe Nr.	In-1a	In-1b	In-2a	In-2b	In-3a	In-3b
Ansatz	Shieldex Bonn / 1 Std.		Shieldex Bonn / 2 Std.		Shieldex Bonn / 4 Std.	
Titer/Testvol. ($lg\ ID_{50}$)	≤ 0,30	≤ 0,30	≤ 0,30	≤ 0,30	≤ 0,30	≤ 0,30
mittl. Virustiter ± K (95%) [1]	≤ 0,30		≤ 0,30		≤ 0,30	
Reduktion [2] ($lg\ ID_{50}$ ± K [95%])	**≥ 4,80 ± 0,29**		**≥ 4,73 ± 0,29**		**≥ 4,35 ± 0,31**	

Probe Nr.	In-4a	In-4b	In-5a	In-5b	In-6a	In-6b
Ansatz	Korrosionsprobe / 1 Std.		Korrosionsprobe / 2 Std.		Korrosionsprobe / 4 Std.	
Titer/Testvol. ($lg\ ID_{50}$)	≤ 0,90	≤ 0,90	≤ 0,90	≤ 0,90	≤ 0,90	≤ 0,90
mittl. Virustiter ± K (95%) [1]	≤ 0,90		≤ 0,90		≤ 0,90	
Reduktion [2] ($lg\ ID_{50}$ ± K [95%])	**≥ 4,20 ± 0,29**		**≥ 4,13 ± 0,29**		**≥ 3,75 ± 0,31**	

Probe Nr.	In-7a	In-7b	In-8a	In-8b	In-9a	In-9b
Ansatz	Shieldex Kiel SK 96 / 7 Min.		Shieldex Kiel SK 96 / 15 Min.		Shieldex Kiel SK 96 / 30 Min.	
Titer/Testvol. ($lg\ ID_{50}$)	≤ 0,30	≤ 0,30	≤ 0,30	≤ 0,30	≤ 0,30	≤ 0,30
mittl. Virustiter ± K (95%) [1]	≤ 0,30		≤ 0,30		≤ 0,30	
Reduktion [2] ($lg\ ID_{50}$ ± K [95%])	**≥ 4,80 ± 0,29**		**≥ 4,80 ± 0,29**		**≥ 4,80 ± 0,29**	

[1] = Berechnung des Titerwertes sowie dessen 95 % Konfidenzintervalls nach der DVV/RKI-Leitlinie
[2] = Virusreduktion: lg ID_{50} der Viruskontrolle minus lg ID_{50} der Probe; nach der DVV/RKI-Leitlinie

Ergebnisse: (cf. Tab. 2)

- Die Menge an vermehrungsfähigem Virus wurde innerhalb der Beobachtungszeit bis 4 Std. auch ohne eine (zusätzliche) Einwirkung um einen geringen Betrag reduziert (RF = 0,45).
- Dass die Virusmenge zu den Zeitpunkten unterschiedlich sein würde, wurde erwartet, weshalb zur Beurteilung der virusinaktivierenden Eigenschaft der Proben zu jeder Einwirkzeit der entsprechende Virusausgangswert bestimmt wurde (Viruskontroll[en]). Der Virusausgangswert zum jeweiligen Zeitpunkt (cf. Tab. 2.1) stellt somit den Bezugspunkt zur Ermittlung der produktassoziierten Virusinaktivierung (Virusreduktion) dar (cf. Tab. 2.2).
- ***Probenmuster Shieldex Bonn:*** bereits nach t = 1 Std. war in allen Proben kein Restvirus mehr nachweisbar. Unter den o.a. Testbedingungen wurden folgende produktassoziierte Reduktionsfaktoren bestimmt: nach t = 1 Std.: RF ≥ 4,80 ± 0,29, nach t = 2 Std.: RF ≥ 4,73 ± 0,29 und nach t = 4 Stunden: RF ≥ 4,35 ± 0,31.

Dr. Christian Jursch
Eurovir Hygiene-Labor GmbH
Im Biotechnologiepark 9
D-14943 Luckenwalde

- ***Probenmuster „Korrosionsprobe“:*** bei diesem Material ging von den Proben eine gewisse zytotoxische Wirkung auf die Nachweiszellen aus (lg TD_{50} = 0,9). Oberhalb dieser Zytotoxizitätsgrenze war auch mit diesem Material bereits nach t = 1 Std. in allen Proben kein Restvirus mehr nachweisbar. Die produktassoziierte Reduktionsfaktoren bestimmten sich nach t = 1 Std. zu RF $\geq$ 4,20 ± 0,29, nach t = 2 Std. zu RF $\geq$ 4,13 ± 0,29 und nach t = 4 Stunden zu RF $\geq$ 3,75 ± 0,31.
- ***Probenmuster Shieldex Kiel SK 96:*** Dieses Produktmuster wurde bei kürzeren Kontaktzeiten getestet (t = 7, 15 und 30 Min.). Als Bezugspunkt zur Bestimmung der Virusreduktion wurde die Viruskontrolle VK-1 verwendet.

  Bereits nach der kurzesten Kontaktzeit von t = 7 Min. war bei beiden Proben kein Restvirus mehr nachweisbar. Auch bei den beiden längeren Kontaktzeiten (t = 15 und 30 Min.) wurde kein Restvirus mehr detektiert. Die produktassoziierte Virusreduktion bestimmt sich somit zu RF $\geq$ 4,80 ± 0,29 für alle drei Kontaktzeiten.

Fazit:

- Bei allen drei getesteten Produktmustern war eine signifikante Virusreduktion nachweisbar.
- Bei allen drei Materialien war bereits nach der jeweils kürzesten Kontaktzeit kein Restvirus mehr nachweisbar. Die Virusreduktion betrug. mehr als 4 Zehnerlogstufen (RF $\geq$ 4), entsprechend einer Virusinaktivierungsrate von mehr als 99,99 %.
- Es bleibt somit festzuhalten, dass unter den Testbedingungen gegenüber dem *Bovinen Coronavirus* eine hochgradige virusinaktivierende Wirkung belegt werden konnte, die ursächlich der Beschichtung zugeschrieben werden kann.
- Die beobachtete virusinaktivierende Wirkung der Beschichtung wurde mit dem *Bovinen Coronavirus* erhoben. Die Coronaviren gehören zu den behüllten Viren. Diese gelten im Allgemeinen als vergleichsweise leicht inaktivierbar. Das bedeutet, dass die beobachtete Viruswirksamkeit nicht auf andere Viren übertragen werden kann. Dieses gilt u.U. auch für andere behüllte Viren.

Anmerkung:

- Die oben beschriebenen Daten wurden in einem sog. Screeningtest erhoben. Dieser Test ist ein Basistest, durchgeführt in Anlehnung an das zugrundeliegende Regelwerk und unter Weglassung von Validitätskontrollen. Dieser Test entspricht somit nicht einer umfänglichen Produktvalidierung gemäß der ISO 18184.

Luckenwalde, den 24.06.2020

Dr. Ch. Jursch
(GF und Laborleiter Eurovir)