

Prof. Dr. med. Gert Frösner
Arbeitsgruppe Klinische Virologie
im Max von Pettenkofer-Institut
für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Pettenkoferstr. 9a
8000 München 2
Tel. (089) 5160-5260
Labor: -5227
Fax (089) 5380584

3. Oktober 1992

GUTACHTEN ZUR HEPATITIS-B-WIRKSAMKEIT VON

F S 3 6

I. PROBLEMATIK DER PRÜFUNG VON DESINFEKTIONSMITTELN GEGEN HEPATITIS B

Die Hepatitis B ist die häufigste und auch schwerwiegendste Berufserkrankung des medizinischen und zahnmedizinischen Personals. Neben der Immunprophylaxe (Gabe von Hepatitis-B-Immunglobulin, Hepatitis-B-Impfung) und neben organisatorischen Maßnahmen (z.B. Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Blut) kommt deshalb der Desinfektion eine entscheidende Bedeutung bei der Verhinderung der Übertragung der Hepatitis B im Krankenhaus und in der ärztlichen und zahnärztlichen Praxis zu. Leider kann das Hepatitis-B-Virus bisher nicht in der Gewebekultur gezüchtet werden, und das einzige nur sehr begrenzt verfügbare Versuchstier ist der Schimpanse. Es konnten deshalb bis heute nur sehr wenige Desinfektionsmittel oder Desinfektionsverfahren im direkten Infektionsversuch auf Wirksamkeit gegen HBV untersucht werden.

In dieser Situation werden drei indirekte Verfahren diskutiert, um zumindest Anhaltspunkte über eine Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegenüber HBV zu erhalten (Bundesgesundheitsbl. 26, Juli 1983). Diese Verfahren sind:

1. Die "Inaktivierung der im HBV vorhandenen DNA-Polymerase" (Nath, Fang and Dodd: Inactivation of DNA polymerase associated with hepatitis B virus. J. Med. Virol. 10: 131, 1982).
2. Der "Morphologische Alterations- und Desintegrationstest (MADT)", der die elektronenoptisch sichtbare Veränderung der HBV-Partikel nach der Einwirkung des Desinfektionsmittels beschreibt (Kuwert, Thraenhart, Dermietzel und Scheiermann: Zur Hepatitis B Viruswirksamkeit und Hepatoviruzidie von Desinfektionsverfahren auf der Grundlage des MADT. mhp Verlag, Mainz, 1981).
3. Der "Nachweis der Zerstörung des Oberflächenantigens des HBV (HBsAg)" durch Desinfektionsmittel (Frösner, Jentsch und Uthemann: Zerstörung der Antigenität und Beeinflussung der immunochemischen Reaktivität von Antigenen des Hepatitis B Virus (HBsAg, HBcAg und HBeAg) durch Desinfektionsmittel - ein Prüfmodell. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B 176: 1, 1982).

Das erste Verfahren dürfte keine ausreichende Empfindlichkeit besitzen, da auch DNA-Polymerase negative Seren HBV-Partikel positiv und infektiös sein können. Die prinzipiellen Einwendungen gegen das besser geeignete zweite und dritte Verfahren sind diskutiert worden (Frösner: Präventivmaßnahmen bei der Hepatitis B. Zbl. Arbeitsmed. 33: 124, 1983). Beide Verfahren sind geeignet, um zuverlässige Hinweise auf die HBV-Wirksamkeit von Desinfektionsmittel und Desinfektionsverfahren zu gewinnen. Wir geben dabei dem Antigeninaktivierungstest den Vorzug vor dem MADT, weil er:

- a) einfacher und schneller durchzuführen ist und
- b) in der Regel höhere Anforderungen an die Konzentration oder Einwirkzeit des Mittels stellt.

Sowohl bei Peressigsäure als auch bei Formaldehyd werden anhand der definierten Prüfkriterien im Antigeninaktivierungstest höhere Konzentrationen des Wirkstoffes gefordert als im MADT (siehe die vorher zitierten Arbeiten von Kuwert und Mitarb. und Frösner und Mitarb.). Selbst die Verfechter des MADT haben gezeigt, daß nach Einwirkung eines aldehydischen Händedesinfektionsmittels und nach Einwirkung eines natriumhypochlorit-haltigen Desinfektionsmittels für Instrumente noch geringe Mengen des HBsAg nachweisbar blieben (im Radioimmuntest 5-32% der Ausgangs-Cpm bei 3-15% der Cpm in der HBsAg-freien Kontrolle), obwohl im MADT die Alterationsphase 3 (gute HBV-Wirksamkeit) erzielt wurde (Thraenhart und Kuwert: Zur Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegenüber dem Hepatitis-B-Virus unter besonderer Berücksichtigung des MADT. Hyg. + Med. 9: 385, 1984). Obwohl angenommen werden kann, daß bei attestierter Wirksamkeit in beiden Testsystemen ein vielfacher "Overkill" stattfindet, erscheint somit der Sicherheitsspielraum bei Anwendung des Antigeninaktivierungstestes größer.

Eine HBV-Wirksamkeit des Desinfektionsmittels wird im Antigeninaktivierungstest nur dann angenommen, wenn es zu einer völligen Zerstörung der Antigenität des HBsAg kommt. Der Zerstörung des Oberflächenantigens des Hepatitis-B-Virus wird dabei eine besondere Bedeutung beigemessen, weil Viren sich nur bei intakten Oberflächenrezeptoren an die Zielzelle anheften und dieselbe infizieren können. Die selektive Bindung des HBsAg an die menschliche Leberzelle (Lutwick, Hebert and Sklamberg: Specificity of hepatitis B

virus affinity for human hepatic tissue. *J. Med. Virol.* 9: 101, 1982) legt nahe, daß es sich beim S-Protein um den Rezeptor handelt, der die selektive Infektion der Leberzelle ermöglicht. Eine Zerstörung des S-Proteins würde damit auch zu einer Zerstörung der Infektiosität für die Leberzelle führen.

Deshalb werden Modifikationen des Antigeninaktivierungstestes auch von anderen Arbeitsgruppen eingesetzt (Schulster, Hollinger, Dreesman and Melnick: Immunological and biophysical alteration of hepatitis B virus antigens by sodium hypochlorite disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 762, 1981; Adler-Storthz, Schulster, Dreesman and Melnick: Effect of alkaline glutaraldehyde on hepatitis B virus antigens. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 2: 316, 1983; Kobayashi, Takahashi, Tsuzuki, Yoshihara and Toyama. Sterilization of hepatitis B surface antigen contaminated materials. *Med. Instrum.* 12: 171, 1978).

II. GEPRÜFTES DESINFEKTIONSMITTEL

FS 36 ist ein Desinfektionsmittel der Firma Joesf Heimgartner, Labor für Galenik und Kosmetik, Wettwil/Schweiz. Eine am 28.8.1992 zugeschickte Probe des Desinfektionsmittels mit der Labor-Nr. 2112/A (Produktionsdatum 29.7.1992) wurde geprüft.

Das Desinfektionsmittel wurde 1,0%ig bei Zimmertemperatur im Suspensionsversuch geprüft. Die Einwirkzeiten betragen 10, 30 und 60 Minuten.

III. METHODIK DER DESINFEKTIONSMITTELPRÜFUNG IM HBsAg- INAKTIVIERUNGSTEST

Die Prüfung der Zerstörung der immunologischen Reaktivität des HBsAg erfolgt anhand der "Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren" (Bundesgesundheitsbl. 25: 397, 1982). An Stelle des direkten Infektionsnachweises tritt dabei der Nachweis der Zerstörung der Antigenität des HBsAg.

Die Prüfung von FS 36 erfolgte im Suspensionsversuch bei Zimmertemperatur mit und ohne zusätzlicher Eiweißbelastung. Zu 1 Teil eines HBsAg-haltigen Serums (1 : 4 in PBS vorverdünnt) wurden 1 Teil Aqua bidest., bzw. 1 Teil 2%iges Serumalbumin, bzw. 1 Teil fetales Kälberserum und 8 Teile der 1,25-fachen Prüfkonzentration (hier 1%ig) des Desinfektionsmittels gegeben.

Nach Beendigung der Einwirkzeit wurde die Wirkung des Mittels durch eine 1 : 100 Verdünnung der Mischung mit PBS, das 10% fetales Kälberserum enthielt, unterbrochen. Sodann wurde jede Probe im Doppelansatz mit einem höchstempfindlichen Festphasenradioimmuntest auf HBsAg untersucht (Ausria II, Abbott Lab., North Chicago/USA). Aus beiden Ansätzen wurde ein Mittelwert der gebundenen Radioaktivität (Cpm ^{125}J -anti-HBs) errechnet.

Als Ausgangswert (100 %-Wert) für die Berechnung der prozentualen Abnahme der Bindung von ^{125}J -anti-HBs diene der Mittelwert von Vierfachansätzen mit der längsten im Test verwendeten Prüfzeit, denen an Stelle von 8 Teilen des Desinfektionsmittels 8 Teile Aqua bidest. beigemischt worden waren. Dieser betrug im Ansatz mit Aqua bidest. 5315 Cpm, im Ansatz mit Serumalbumin 5057 Cpm und im Ansatz mit fetalem Kälberserum 5535 Cpm. Als 0%-Werte für die Berechnung der Antigeninaktivierung diene der Mittelwert von 10 Versuchsansätzen mit den 1 : 100 in PBS mit 10% fetalem Kälberserum verdünnten Prüfkonzentration des Desinfektionsmittels. Dieser Mittelwert betrug bei 1%igem Mittel 212 CPM. Er lag damit im Bereich des Mittelwerts von vier mit dem negativen Kontrollserum des Tests durchgeführten Ansätzen (155 Cpm) und des Mittelwerts von zwei Testansätzen mit dem als Verdünnungsmittel verwendeten PBS mit 10% fetalem Kälberserum (238 Cpm). Eine das Testergebnis verfälschende

Wirkung des Desinfektionsmittels auf das HBsAg-Testsystem liegt deshalb nicht vor ("Toxizitätskontrolle").

Eine völlige Inaktivierung des HBsAg wurde dann angenommen, wenn die nach der Desinfektionsmittelbehandlung gemessenen Cpm unter dem 2,1-fachen der Cpm der negativen Kontrollen lagen (hier weniger als 445 Cpm). Dies entspricht dem vom Testhersteller angegebenen Grenzwert der Positivität. Als negative Kontrolle galt der obige Mittelwert der 10 Ansätze mit der 1 : 100 in PBS mit 10% fetalem Kälberserum weiter verdünnten Prüfkonzentration des Desinfektionsmittels.

IV. WIRKUNG AUF DIE IMMUNOLOGISCHE REAKTIVITÄT DES HBsAg

1. Wirkung von 1%igem FS 36

Bereits nach 10 Minuten Einwirkung von 1%igem FS 36 war HBsAg selbst im Ansatz mit hoher Eiweißbelastung (Ansatz mit fetalem Kälberserum) nicht mehr nachweisbar (Tabelle 1). Im HBsAg-Test konnte keine über dem Grenzwert der Positivität liegende Bindung von ^{125}J -anti-HBs festgestellt werden. Es war zu einer völligen Zerstörung der immunologischen Reaktivität des HBsAg gekommen.

V. BEURTEILUNG DER HBV-INKTIVIERENDEN WIRKUNG

Aufgrund der gewählten Prüfkriterien wird einem Desinfektionsmittel im Antigeninaktivierungstest eine HBV-inaktivierende Wirkung attestiert, wenn es unter der Einwirkung desselben zu einer völligen Zerstörung der immunologischen Reaktivität des HBsAg gekommen ist. Dies ist selbst bei hoher Eiweißbelastung nach 10 Minuten Einwirkung des 1%igen FS 36 der Fall.

Dies ist ein ausgezeichnetes Prüfergebnis. Vergleichende Untersuchungen haben gezeigt, daß die Hürde, die ein Desinfektionsmittel im Antigeninaktivierungstest zu nehmen hat, außerordentlich hoch ist. Bei der Prüfung von anderen Desinfektionsmitteln fanden Thraenhard und Kuwert unter Bedingungen, die im MADT eine gute HBV-Wirksamkeit zeigten, geringe Restmengen des HBsAg im Antigeninaktivierungstest (siehe I.).

Diese Aussage erscheint auch deshalb gerechtfertigt, weil das HBV wesentlich weniger resistent ist als bisher angenommen wurde. Obwohl die viruzide Wirkung von alkoholischen Desinfektionsmitteln als begrenzt angesehen wird, konnte gezeigt werden, daß 10^6 für den Schimpansen infektiöse HBV-Dosen durch Einwirkung von 70%igem Isopropylalkohol für 10 Minuten bei Zimmertemperatur inaktiviert wurden. Dabei bestanden für das Desinfektionsmittel erschwerte Wirkbedingungen, weil das infektiöse Serum auf einer Kunststoffoberfläche angetrocknet war (Bond, Favero, Petersen and Ebert. Inactivation of hepatitis B virus by intermediate-to-high level disinfectant chemicals. J. Clin. Microbiol. 18: 535, 1983). Dieselbe Arbeitsgruppe konnte unter diesen Bedingungen auch mit einem jodhaltigen Detergens im Schimpansenversuch eine völlige Inaktivierung des HBV zeigen.

Unter Berücksichtigung aller Fakten kann deshalb 1%igem FS 36 nach 10 Minute Einwirkzeit eine ausgezeichnete HBV-inaktivierende Wirkung attestiert werden. Besonders wichtig erscheint dabei, daß diese gute Wirksamkeit auch bei hoher Eiweißbelastung vorhanden ist.

In neuerer Zeit wurde wiederholt die Frage aufgeworfen, ob die nach den Richtlinien des Bundesgesundheitsamts und der DVV erfolgreich überprüfte Desinfektionsmittel auch gegenüber dem Erreger von AIDS (Acquired Immuno Deficiency Syndrome) wirksam sind. Dem kann vorbehaltlos zugestimmt werden,

weil es sich beim HIV (ältere Bezeichnungen des Virus sind LAV oder HTLV-III) um einen der empfindlichsten viralen Erreger handelt die wir kennen. Bereits Erhitzen auf 56 °C für 30 Minuten inaktiviert das Virus (Spire et al., Inactivation of lymphadenopathy-associated virus by heat, gama rays, and ultraviolet light. Lancet 1985 I: 188-189). Auch wird das Virus schnell bei pH-Werten unter 7 und über 10 zerstört. Schon die Einwirkung von pH 5,7 für 10 Minuten reduziert die Viruskonzentration auf ein Tausendstel der Ausgangsmenge (Martin et al., Disinfection and inactivation of human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. J. Infect. Dis 152: 400-403, 1985). Eine gesonderte Überprüfung von Desinfektionsmitteln mit der Frage der HIV-Wirksamkeit erscheint deshalb bei erfolgreicher Prüfung gegen die hochresistenten Testviren (Polio-, Adeno-, Papova- und Pockenvirus) nicht notwendig.

Auch die Prüfung der HBV-Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels erlaubt einen guten Rückschluß auf die HIV-Wirksamkeit. Beide Viren besitzen eine Lipoproteinhülle und weisen auch sonst viele weitere strukturelle und biologische Ähnlichkeiten auf. Bereits nach Einwirkung von 19%igem Äthanol ist das für die HIV-Vermehrung notwendige virale Enzym Reverse Transkriptase nicht mehr nachweisbar (Spire et al., Inactivation of lymphadenopathy-associated virus by chemical disinfectants. Lancet 1984 II: 899-901). Die Einwirkung von 50%igem Äthanol bei 23 °C für 10 Minuten zerstört mit und ohne zusätzliche Proteinbelastung die Infektiosität des Virus (Piszkiwicz et al., Inactivation of HTLV-III/LAV during plasma fractionation. Lancet 1985 II: 1188-1189). Vermutlich wirkt dabei das milde Lipidlösungsmittel Äthanol über eine Zerstörung der Lipoproteinhülle des Virus. Die AIDS-Sicherheit von mit kaltem 20%igem Äthanol gefällten Gerinnungsfaktorenpräparaten (Einwirkzeit 10 Stunden) konnte klinisch unter Beweis gestellt werden (Gazengel and Larrieu. Lack of seroconversion for LAV/HTLV-III in patients exclusively given unheated activated prothrombin complex prepared with ethanol step. Lancet 1985 II: 1189).

Auch aus einer neueren Zusammenstellung der verfügbaren Inaktivierungsdaten (Zeichhardt et al., Stabilität und Inaktivierung des Humanen Immunodeficiency Virus (HIV). Dt. Ärztebl. 84: 874-879, 1987) geht hervor, daß das HIV relativ leicht zerstört werden kann. Peters und Spicher (Zur Auswahl der Desinfektionsmittel bei AIDS. Bundesgesundheitsbl. 30: 1-5, 1987) kommen deshalb

zu dem Schluß, daß "für die Desinfektion bei AIDS alle Desinfektionsmittel und -verfahren brauchbar (sind), die sich bei Hepatitis B bewährt haben".

Da das hier geprüfte Desinfektionsmittel FS 36 eine gute HBV-zerstörende Wirkung besitzt kann davon ausgegangen werden, daß unter den gleichen Bedingungen auch das weniger stabile HIV mit Sicherheit inaktiviert wird.



Prof. Dr. G. Frösner

Summary

Efficacy against Hepatitis B virus (HBV) of FS 36 has been evaluated in the HBsAg inactivation test. Complete destruction of the immunological reactivity of HBsAg was present after 10 minutes incubation with the 1 % dilution of the disinfectant, even in the presence of high protein concentration. Good efficacy of the disinfectant against hepatitis B virus is certified for the above conditions. Because human immunodeficiency virus (HIV) has a similar structure and is less stable than hepatitis B virus, the disinfectant can be considered to be highly efficient against HIV, too.

Tabelle 1: Wirkung von 1%igem FS 36 auf die Antigenität des HBsAg.

Zu einem Teil HBsAg-haltigem Serum wurden 1 Teil Aqua bidest. bzw. 1 Teil 2%iges Serumalbumin bzw. 1 Teil fetales Kälberserum und 8 Teile der 1,25-fachen Prüfkonzentration des Desinfektionsmittels gegeben.

Einwirkzeit (Minuten)	Cpm im HBsAg-Test nach Beendigung der Einwirkzeit			
	mit einem Teil Aqua bidest.	mit einem Teil 2%igem Serumalbumin	mit einem Teil fetalem Kälberserum	mit einem Teil fetalem Kälberserum
0				
Antigenkontrolle ohne Desinfektionsmittel	5 315 (100 %)	5 057 (100 %)	5 535 (100 %)	5 535 (100 %)
10	363 negativ	293 negativ	233 negativ	233 negativ
30	261 negativ	196 negativ	185 negativ	185 negativ
60	254 negativ	209 negativ	177 negativ	177 negativ
Desinfektionsmittel ohne HBsAg		212 (0 %)*		

* Die Nachweisgrenze des HBsAg beträgt im Ausria II-Test laut Herstellerangabe das 2,1-fache der Cpm der negativen Kontrolle (hier 445 Cpm).