

**Gutachten zur Wirkung von**

**Desinfektant "FS 36"**

**bei der Inaktivierung des Humanen  
Immundefizienzvirus  
Typ 1 (HIV-1)**

## **I. Probe**

Das Desinfektionsmittel "FS 36" lag als gelbliche Flüssigkeit vor. Die Probe mit der Labor-Nr.: 2112/A vom 29.7.92 wurde für die Inaktivierungsstudien wie vom Hersteller erhalten verwendet.

## **II. Inaktivierungsmethode**

Die Prüfung der viruziden Wirkung von "FS 36" gegenüber HIV-1 erfolgte in Anlehnung an die "Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren" (Bundesgesundheitsblatt 25, 397-398, 1982). Aus Gründen der Testvereinfachung wurde jedoch bei dem relativ aufwendig zu züchtenden Virus auf eine Dokumentation der Inaktivierungskinetik verzichtet. Die HIV-zerstörende Wirkung des 1 %igen Desinfektionsmittels wurde nach 30 Minuten Einwirkzeit überprüft. Auf eine zusätzliche Eiweißbelastung wurde verzichtet, weil die ungereinigt verwendete Virussuspension des Testansatzes bereits 10 % fetales Kälberserum enthielt.

## **III. Testvirus**

Als Virusquelle wurde zellfreier Kulturüberstand (RT-Aktivität:  $1 \times 10^6$  cpm/ ml) von HIV-1 (HTLV-IIIB) infizierten menschlichen T-Lymphomzellen (KE37-1) verwendet, der 10% fetales Kälberserum enthielt. Um den Titer der nach der Desinfektion noch verbliebenen infektiösen Partikel zu bestimmen, wurden die Pellets aus den Verdünnungen des virushaltigen Kulturüberstandes und dem Desinfektionsmittel nach der Zentrifugation zu frischen, HIV-1 empfänglichen T-Lymphomzellen (c8166) gegeben. Eine Infektion der Zielzellen wurde durch Synzytienbildung und anschließender indirekter Immunperoxidasefärbung der viralen Proteine nachgewiesen.

#### **IV. Nachweis der Infektion der Zielzellen**

##### **Synzytienbildung bei c8166-Zellen**

Die Infektion der c8166-Zellen (Salahuddin et al., Virology 129, 51, 1983) wurde durch Synzytienbildung nachgewiesen. Die humanen T-Lymphomzellen der Linie c8166 reagieren mit Synzytien- (Riesenzell-) bildung auf die Infektion mit HIV-1 (Weiss et al., Nature 324, 572-575, 1986). Die Synzytienbildung wird lichtmikroskopisch ausgewertet und ist in unserem Versuchsansatz bereits nach 2 Tagen zu beobachten. Da - selten - auch eine nicht HIV-spezifische Synzytienbildung mit c8166-Zellen beobachtet werden kann, wurde die Spezifität der Synzytienbildung nach Versuchsende mit einer indirekten Immunperoxidasefärbung (IPF) der viralen Proteine (Mellert et al. AIFO 1, 105-107, 1986) bestätigt. Dazu wurden Aliquots der Zellen (jeweils 15 µl Zellsuspension) nach Versuchsende aus den Kulturgefäßen entnommen, in Terasaki-Mikrotiterplatten transferiert und mit Methanol/ Aceton fixiert. Der Nachweis der HIV-1-Proteine erfolgte mittels eines HIV-1-Antikörper positiven humanen Referenzserums (1:200 in PBS verdünnt). Die Bindung dieser Antikörper an virale Antigene wurde durch nachfolgende Inkubation mit an Meerrettichperoxidase gekoppeltem Kaninchen-anti-human IgG unter Verwendung von 3-amino-9-ethylcarbazol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Substrat sichtbar gemacht.

#### **V. Durchführung des Inaktivierungsversuches**

Für die Versuche wurden 50 µl des Desinfektionsmittels in 3,95 ml Phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) resuspendiert und zu 1 ml HIV-Suspension gegeben. Diese Mischung wurde nach Viruszugabe für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Beendigung der Einwirkzeit wurde die Wirkung des Desinfektionsmittels durch eine 1:6 Verdünnung mit PBS gestoppt und anschließend bei 25 000 Upm für 90 Minuten zentrifugiert. Das Viruspellet wurde in RPMI/10% FKS resuspendiert. Diese Mischung sowie weitere log<sub>10</sub>-Verdünnungen (bis 10<sup>-7</sup>) wurden auf das Vorhandensein von HIV-1 geprüft. Zur Kontrolle der eingesetzten Virusmenge wurden an Stelle des Desinfektionsmittels 50 µl Kulturmedium gegeben und die Probe entsprechend behandelt.

Zur Testung der verbliebenen HIV-1-Infektiosität wurden den Proben HIV-1-empfindliche Lymphomzellen (c8166) zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, in RPMI 1640 unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum aufgenommen und 6 Tage bei 37°C kultiviert. Dabei

wurden die Zellen nach 2, 4 und 6 Tagen auf Synzytienbildung infolge einer HIV-1-Infektion überprüft und anschließend eine indirekte Immunperoxidasefärbung durchgeführt.

Alle Versuche wurden im 4-fach Ansatz durchgeführt.

## **VI. Ergebnisse der Desinfektion**

Nach 6 Tagen waren bei den nicht mit Desinfektionsmittel behandelten Kontrollansätzen in keiner der vier Kulturen der  $10^{-6}$  Verdünnung, aber in allen vier Kulturen der  $10^{-5}$  Verdünnung Synzytien und in der Immunperoxidasefärbung positive Zellen zu beobachten. Dies entspricht einer Ausgangsmenge des Virus von  $10^{5,5}$  für die Gewebekultur infektiösen Einheiten (TCID 50). Nach 30-minütiger Einwirkung zeigte sich in den Ansätzen  $10^0$  und  $10^{-1}$  eine toxische Wirkung des verbliebenen Desinfektionsmittels auf die Zielzellen. Bei der Verdünnung  $10^{-2}$  wurden weder Synzytien noch in der Immunperoxidasefärbung positive Zellen nachgewiesen. Dies entspricht einer Virusmenge von gleich oder kleiner  $10^{1,5}$  TCID 50.

Somit führte die Behandlung der Virusprobe mit "FS 36" (1 %ig) für 30 Minuten zu einer Inaktivierung des HIV-1 um mindestens 4 log 10-Stufen.

## **VII. Beurteilung der HIV-1-inaktivierenden Wirkung**

Die vorliegenden Prüfergebnisse zeigen, daß eine Behandlung der Virusprobe mit "FS 36" über 30 Minuten bei Raumtemperatur den Infektionstiter von zugegebenem HIV-1 um mindestens 4 log 10-Stufen reduziert. Eine in fast allen Situationen ausreichende HIV-1-inaktivierende Wirkung des Desinfektionsmittels erscheint somit gegeben.

Das HIV ist wesentlich schwerer übertragbar als das Hepatitis B-Virus. Selbst im Blut von anti-HIV-positiven Personen wurden nur selten mehr als 1000 Viruspartikel pro Milliliter gefunden. Da nur etwa eine von 250 Nadelstichverletzungen mit HIV-positivem Blut zur HIV-Übertragung führt, befindet sich die vorhandene Infektionsdosis meist im Grenzbereich. Bereits eine geringfügige Reduzierung der vorhandenen Virusmenge erscheint in der Lage, die meisten Infektionsübertragungen zu verhindern. **Die hier nachgewiesene Reduzierung der Virusmenge um mindestens Faktor 10 000 zeigt, daß "FS 36" (1 %ig)**

**(Labor-Nr.: 2112/A vom 29.7.92) bei 30 Minuten Einwirkzeit gut geeignet zur Inaktivierung des HIV ist.**

Neuherberg, den 23.11.92



Prof. Dr. V. Erfle  
GSF  
Institut für Molekulare Virologie  
Ingolstädter Landstr. 1  
D-8042 Neuherberg



Prof. Dr. G. G. Frösner  
Max-von-Pettenkofer-Institut  
der Universität München  
Pettenkoferstr. 9a  
D-8000 München 2