
16.09.2021

PRÜFBERICHT

Reduktion ausgewählter Viren durch physikalische Verfahren von Textilien

Laboridentifikation	<ul style="list-style-type: none">• LI-021-101-1
Studieninhalt	<ul style="list-style-type: none">• Funktionelle Prüfung unter praxisnahen Bedingungen eines thermischen Verfahrens zur Reduktion von Viren
Prüfgerät	<ul style="list-style-type: none">• Miele Professional FashionMaster PIB 100
Testmethode	<ul style="list-style-type: none">• Praxisversuch unter Anwendungsbedingungen - Reduktion von ausgewählten Viren unter Verwendung von Prüfkörper
Auftraggeber	Miele & Cie. KG Herrn Dr. Jan Busch Carl-Miele-Straße 29 D – 33332 Gütersloh
Prozessparameter	<ul style="list-style-type: none">• Temperatur• Temperaturhaltezeit
Referenzdokumente	<ul style="list-style-type: none">• SOP-ST-VIR.M.0083.01• SOP-ST-VIR.M.0048.26• SOP-ST-VIR.M.0076.01

1. Material, Medien und Reagenzien

1.1. Abkürzungen

RF	Reduktionsfaktor
WSH	Wasser standardisierter Härte
E-MEM	minimum essential Medium with Earl's salts
FKS	bovines Serum
NEA	Non-essential amino acids
PBS	Phosphat – Puffer (Dulbecco A pH 7.3)
RT	Raumtemperatur

1.2. Apparatus

Brutschrank 36 ± 1 °C + 5 % CO₂
Kühlschrank 2 – 8 °C
Laminar Air Flow
Vortexer
Thermometer
Pipettierhilfe (Pipet-Boy)
5 ml Pipetten
Eppendorfpipette variabel 0,5 µl – 10 µl
Eppendorfpipette variabel 10 µl – 100 µl
Eppendorfpipette variabel 100 µl – 1000 µl
sterile Pipettenspitzen (blau, gelb, weiß)
sterile Einmalpipetten (1 ml, 5 ml, 10 ml)
Telid Thermologger

1.3. Materialien

Testanschmutzung (0,3 % BSA)
96 Well – Platten
Antibiotika
E-MEM Minimum Essential Medium with Earl`s salts
FKS Fötale Kälberserum
NEA Non-essential amino acids
PBS Phosphat – Puffer
Baumwollhandtuch EN 60456
Miele Professional FashionMaster mit Bügeleisen

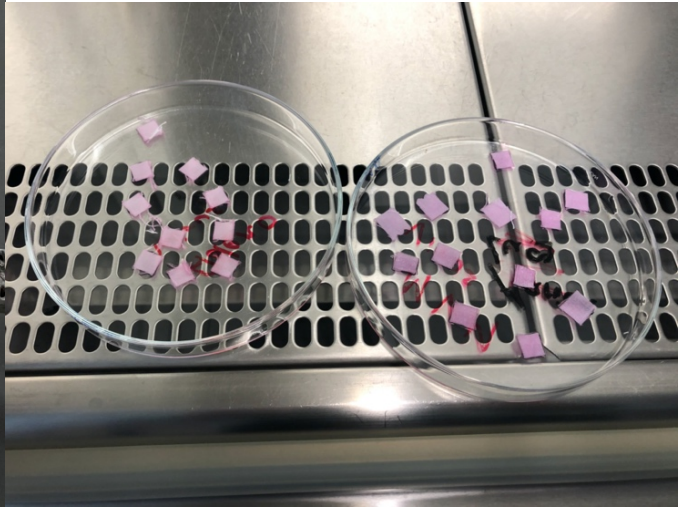
2. Testmethoden

Die Tests wurden durchgeführt gemäß:

- SOP-ST-VIR.M.0083.01
- SOP-ST-VIR.M.0048.26
- SOP-ST-VIR.M.0076.01
- Methode 20 Labor Performance und Hygiene HSAS

Die Tests wurden in Anlehnung durchgeführt:

- EN 14476
- EN 16777
- EN 16616



2.1 Prüfung und Deklaration der Reduktion von Viren:

Zur Prüfung der Viruswirksamkeit wurden das europäische Modellvirus Vacciniavirus (MVA) stellvertretend für behüllte Viren sowie das Adenovirus Typ 5 Stamm Adenoid 75 im praxisnahen Prüfverfahren untersucht.

Prüfmethode	Virus
Praxisnaher Versuch mit Textil-Prüfkörpern	Vacciniavirus (MVA)
	Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75

Prüfung	Bügeln von Textilien einlagig und doppellagig Adeno
Prüftemperatur	22.0 °C
Belastungen	clean conditions (0,3 g/l BSA)
Prüfoberfläche	Baumwollhandtuch EN 60456
Bezugsquelle	WFK-Testgewebe Krefeld
Füllung des Wassertanks	Wasser standardisierter Härte (WSH)
Virusstamm	Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75
Herkunft des Virus	DVV-Virusbank (Prof. Dr. A. Sauerbrei/Universitätsklinikum Jena)
Chargen-Nr. / Passage	120920 n+5/2
Zelllinie	A549-Zellen
Herkunft der Zelllinie	ATCC (American Type Culture Collection)

Prüfung	Bügeln von Textilien einlagig und doppellagig MVA
Prüftemperatur	22.0 °C
Belastungen	Clean conditions (0,3 g/l BSA)
Prüfoberfläche	Baumwollhandtuch EN 60456
Bezugsquelle	WFK-Testgewebe Krefeld
Füllung des Wassertanks	Wasser standardisierter Härte (WSH)
Virusstamm	Modified Vacciniavirus Ankara
Herkunft des Virus	Institut für Tierhygiene und öffentliches Veterinärwesen, Universität Leipzig
Chargen-Nr. / Passage	201219 / n+4
Zelllinie	BHK-21
Herkunft der Zelllinie	Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts

2.2 Durchführung des Verfahrens:

Trägermaterial aus 100% Baumwolle wird mit einer definierten Menge an Viren unter geringer organischer Belastung künstlich kontaminiert und einem thermischen Verfahren für 5 Sekunden unterzogen.

Die kontaminierten und getrockneten Baumwollprüfkörper werden auf ein trockenes Baumwolltuch als Unterlage gelegt und das Bügeleisen entsprechend den Vorgaben des Auftraggebers mit höchster Leistungsstufe angewandt. Nach der Anwendung werden die Prüfkörper in Verdünnungslösung mit Glasperlen gegeben und die jeweiligen Prüforganismen quantitativ zurückgewonnen.

Die Reduktion des Testorganismus wurde dabei für jeden eingesetzten Prüfkörper separat bestimmt. Die Reduktion der Prüforganismen musste dabei mindestens 4 Log-stufen erreichen.

Der Deckel der Gerätesteckverbindung wurde aufgeklappt und der Dampfstecker/Stromanschluss fest in das Gerät gesteckt bis die Nasen des Steckers am Deckel der Gerätesteckverbindung einrasteten. Anschließend wurde Bügeleisen (Stufe 3 Punkte) aufgeheizt. Das funktionsbereite Gerät wurde nur eingesetzt, wenn die Kontrollanzeige auf "Bereit" war. Um im Gerät und dem Zubehör befindliches Kondensat abzulassen wurde zunächst die Dampf-Funktion für 20 s betätigt. Erst als die Dampfmenge gleichmäßig, ohne Tröpfchenbildung ausströmte, wurde mit der Prüfung begonnen.

Herstellung der Virussuspension

Das Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75 wurde uns von der DVV-Virusbank (Prof. Dr. A. Sauerbrei/Universitätsklinikum Jena) zur Viruzidie-Prüfung entsprechend der DVV/RKI Leitlinie, zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der Virussuspension wurden konfluente Monolayer von A549-Zellen (humane Lungenepithel-Zelllinien) eingesetzt, die in 175-cm²-Roux-Flaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit Minimum Essential Medium (MEM) unter Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS), Natriumpyruvat, Glutamin und nicht essentiellen Aminosäuren (Biochrom AG, Berlin) gehalten worden sind. Die A549-Zellen wurden uns von ATCC (American Type Culture Collection) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden mit dem Impfvirus in einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 0,1 infiziert und nach Ausbildung eines zytopathischen Effekts (CPE) wurden die Viren durch einmaliges Einfrieren und Auftauen der Zellen geerntet. Zur Herstellung der Arbeitvirussuspension wurde das Zelllysate für 10 min bei 2.500 rpm zentrifugiert, das Zellpellet mittels Douncen (20-mal) aufgeschlossen, mit dem Überstand vereinigt und nochmals zentrifugiert. Die Lagerung der aliquotierten Arbeitsvirussuspension erfolgte bei -70,0 °C. Die Infektiosität der Virussuspension wurde wie unten beschrieben bestimmt.

Das Modified Vacciniavirus Ankara stammte aus dem Institut für Tierhygiene und öffentliches Veterinärwesen der Universität Leipzig. Zur Herstellung der Virussuspension wurden konfluente Monolayer von BHK-21-Zellen (embryonale Hamsternieren Fibroblasten) eingesetzt, die in 175-cm²-Roux-Flaschen

(Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) mit Dulbeccos Minimum Essential Medium (D-MEM) unter Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS), Natriumpyruvat, Glutamin und nicht essentiellen Aminosäuren (Biochrom AG, Berlin) gehalten worden sind. Die BHK-21-Zellen wurden uns von der Zellbank des Friedrich-Loeffler-Instituts zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden mit dem Impfvirus in einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 0,1 ml infiziert. Nach Ausbildung eines zytopathischen Effekts (CPE) wurden die Viren durch einmaliges Einfrieren und Auftauen der Zellen geerntet. Zur Herstellung der Arbeitvirussuspension wurde das Zelllysat für 10 min bei 2500 rpm zentrifugiert, das Zellpellet mittels Douncen (20-mal) aufgeschlossen, mit dem Überstand vereinigt und nochmals zentrifugiert. Die Lagerung der aliquotierten Arbeitvirussuspension erfolgte bei - 70,0 °C. Die Infektiosität der Virussuspension wurde wie unten beschrieben bestimmt.

Bestimmung der Infektiosität Adenovirus

Die Infektiosität wurde im Quantalversuch (Endpunkttitration) bestimmt: Für diesen Versuch wurden 96-Loch-Platten mit konfluierenden von A549-Zelllagen verwendet. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe in 10er-Schritten der zu untersuchenden Virussuspensionen hergestellt (20 µl Virussuspension + 180 µl D-MEM). Je sechs Vertiefungen wurden mit 100 µl der Verdünnungsreihen beimpft und nach einer Bebrütungsdauer von 1 h bei 37 °C mit 0,1 ml frischem Zellkulturerhaltungsmedium überschichtet. Danach wurden die Zellkulturplatten für 7 Tage bei 37 °C im CO₂-Brutschrank mit 5 % CO₂-Gehalt in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach der Bebrütung wurde das Medium von den Zellkulturplatten abgesaugt und der Zellrasen mit 50 µl Kristallviolett pro Vertiefung angefärbt. Anschließend wurde die Virusverdünnung ermittelt, bei der 50 % der beimpften Kulturen eines Verdünnungsansatzes infiziert waren (TCID₅₀/25cm²).

Die Berechnung der TCID₅₀/25cm² erfolgte nach dem Spearman-Kärber-Verfahren [Br. J. Psychol. 2: 227–42, 1908; Arch. exp. Path. Pharmacol. 162: 480–7, 1931].

Bestimmung der Infektiosität

Die Infektiosität wurde im Quantalversuch (Endpunkttitration) bestimmt: Für diesen Versuch wurden 96-Loch-Platten mit konfluierenden von Zellen verwendet. Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe in 10er-Schritten der zu untersuchenden Virussuspensionen hergestellt (20 µl Virussuspension + 180 µl Zellkulturmedium). Je sechs Vertiefungen wurden mit 100 µl der Verdünnungsreihen beimpft und nach einer Bebrütungsdauer von 1 h bei 37 °C mit 0,1 ml frischem Zellkulturerhaltungsmedium überschichtet. Danach wurden die Zellkulturplatten für 5 Tage bei 37 °C im CO₂-Brutschrank mit 5 % CO₂-Gehalt in einer feuchten Kammer inkubiert.

Nach der Bebrütung wurde das Medium von den Zellkulturplatten abgesaugt und der Zellrasen mit 50 µl Kristallviolett pro Vertiefung angefärbt. Anschließend wurde die Virusverdünnung ermittelt, bei der 50 % der beimpften Kulturen eines Verdünnungsansatzes infiziert waren (TCID₅₀/ml).

Die Berechnung der TCID₅₀/25cm²/ml erfolgte nach dem Spearman-Kärber-Verfahren [Br. J. Psychol. 2: 227–42, 1908; Arch. exp. Path. Pharmac. 162: 480–7, 1931].

Bestimmung der Tenazität des Prüfvirus über eine Zeitkinetik zur Überprüfung der thermischen Inaktivierung nach punktueller Bedampfung

Auf einer Testfläche von 2 cm² pro Prüfkörper (Baumwolle) wurde 100 µl Virus-Belastungsgemisch (9 Teile Virussuspension + 1 Teil Belastung) mit der Pipette aufgetragen. Nach der Trocknung wurde jedes Feld mit folgender Kontaktzeit bedampft: 5 s, und 10 s. Die Prüfung erfolgte im Doppelansatz.

Berechnung der viruziden Wirksamkeit

Die Beurteilung der viruziden Wirkung erfolgte durch die Berechnung des Titerabfalls ($\Delta \log_{10} \text{TCID}_{50}$) gegenüber der jeweils parallel mitgeführten Trocknungskontrolle T_x.

Kontrollen

Jeder Versuch wurde von folgenden Kontrollen begleitet:

1. Suspensionskontrolle:

Diese Kontrolle diente zur Überprüfung des Ausgangsvirustiters.

2. Bestimmung der Zytotoxizität:

– entfällt –

3. Nachweis des rückgewinnbaren Virusinokulums nach Trocknung (T_x):

Um die Rückgewinnbarkeit der Testviren quantitativ erfassen zu können, wurde bei jedem Testansatz eine Trocknungskontrolle mitgeführt. Hierzu wurden auf einem separaten Prüfkörper Virus aufgebracht, die als Trocknungskontrolle, T_x, dienten. Die Prüfkörper wurden zeitgleich im Testansatzes kontaminiert. Je 100 µl Virus-Belastungsgemisch mit niedriger organischer Belastung wurden auf den Prüfkörper aufgetragen.

Der Prüfkörper wurde bis zur sichtbaren Antrocknung bzw. bis Ablauf der längsten Kontaktzeit (15 min, T_x) in der Sterilwerkbank gelagert. Die Prüfkörper wurden in 5 ml eisgekühlten D-MEM mit 2 % FCS ausgewaschen, um eine vollständige Rückgewinnung des Testvirus zu erreichen.

Zur Bestimmung des Virustiters wurde eine Verdünnungsreihe in 10er-Schritten der zu untersuchenden Virussuspensionen hergestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Tab. 1 Reduktion MVA

Test	Titre of the virus control (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) with 95.0% confidence interval	Titre of the “residual virus” inactivation (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) with 95.0% confidence interval	Reduction factor with 95.0% confidence interval
		5 sec	5 sec
Bügeleisen Stufe 3 einlagiges Gewebe	4.50 +/- 0.45	0.50 +/- 0.00 Kein Restvirus	4.00 +/- 0.45
Bügeleisen Stufe 3 doppelagiges Gewebe	4.50 +/- 0.45	0.50 +/- 0.00 Kein Restvirus	4.00 +/- 0.45
Bügeleisen Stufe 3 einlagiges Gewebe	4.50 +/- 0.45	0.50 +/- 0.00 Kein Restvirus	4.00 +/- 0.45
Bügeleisen Stufe 3 doppelagiges Gewebe	4.50 +/- 0.45	0.50 +/- 0.00 Kein Restvirus	4.00 +/- 0.45

3.2 Tab. 2 Reduktion Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75

Test	Titre of the virus control (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) with 95.0% confidence interval	Titre of the “residual virus” inactivation (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) with 95.0% confidence interval	Reduction factor with 95.0% confidence interval
		5 sec	5 sec
Bügeleisen Stufe 3 einlagiges Gewebe	5.83 +/- 0.42	≥ 1.50 +/- 0.00 Kein Restvirus	4.33 +/- 0.42
Bügeleisen Stufe 3 doppelagiges Gewebe	5.83 +/- 0.42	≥ 1.50 +/- 0.00 Kein Restvirus	4.33 +/- 0.42

Bewertung der Ergebnisse:

Das neue Coronavirus (SARS-CoV-2), das Dezember 2019 zum ersten Mal in China auftrat, wurde am 11. März 2020 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) offiziell zur Pandemie erklärt. Das neue SARS-CoV-2 vermehrt sich vor allem im Rachenraum, aber auch in den tieferen Atemwegen. Die Übertragung erfolgt überwiegend per Tröpfchen- oder Kontaktinfektion und die Inkubationszeit beträgt bis zu 14 Tagen. Genau wie bei einer Infektion mit Influenzaviren sind insbesondere ältere Personen besonders gefährdet. Die Verabreichung von Impfstoffen und die Entwicklung von Virostatika und wird einige Zeit in Anspruch nehmen – auch wenn daran aktuell intensiv und mit Hochdruck geforscht wird. Daher sind bei der Prävention von SARS-CoV-2-Coronavirus-bedingten Erkrankungen (COVID-19) vor allem Nicht pharmazeutische Maßnahmen der Infektionsprävention wie Hygienemaßnahmen wichtig.

Bei der Untersuchung des Miele FashionMaster wurden die Virusreduktion auf sichtbar sauberen Textilien untersucht. Dabei konnte mit dem Bügeleisen (höchste Stufe) nach einer 5 - sekundigenpunktuellen Behandlung eine Virusreduktion um ≥ 4 lg-Stufen nachgewiesen werden. Dies entspricht auch der Literaturübersicht zur Hitzestabilität von Coronaviren von Kampf et al [1]. Es wurden insgesamt 10 Studien mit Originaldaten begutachtet und eine thermische Behandlung von 60 °C über 30 min bzw. 65 °C für 15 min und 80 °C für 1 min reduzierte die Coronavirus-Infektiosität um mindestens 4 lg-Stufen [1].

Zur Hitzetoleranz von Viren gibt es in der Literatur nur sehr wenige Daten. Laut WHO wird das SARSCoV-2 bei einer Temperatur von 56 °C um ca. 10.000 Einheiten per 15 min reduziert [2]. Zum Vergleich: Das Modellvirus Vacciniavirus wird nach 10 min bei 50 °C um 100 Einheiten und nach 10 min bei 60 °C um 100.000 Einheiten reduziert (persönliche Daten, PD Dr. Maren Eggers). Eine andere Inaktivierungsstudie konnte Viruspartikeln, die in Tropfen enthalten sind, nach folgenden Zeiten und Temperaturen inaktivieren [3]:

- das Influenzavirus H1N1 war nach 14s bei 70 °C und 1s bei 110 °C nicht mehr infektiös,
- das Herpesvirus HSV-1 nach 7s bei 70 °C und 1s bei 100 °C nicht mehr infektiös
- das unbehüllte Enterovirus Coxsackie-Virus B4 wurde in 5s bei 70 °C und in 1s bei 100 °C inaktiviert.

Diese vorliegende Untersuchung sowie die zitierten wissenschaftliche Studien können nur als Simulation einer Umgebungskontamination gewertet werden, da es sich bei der Kontamination um ein in Zellkultur angezüchtetes Virus handelt – wenn auch in einer sehr hohen Konzentration – und nicht um ein in Schleim und Sekret eingebettetes Viruspartikel, welches in Tröpfchen ausgehustet wurde. Des Weiteren wurde in dieser Studie das europäische Modellvirus Vacciniavirus stellvertretend für behüllte Viren untersucht [4]. Diese Modellvirus wurde gewählt, da gemäß der Guidance on the Biocidal Products Regulation, Volume II, Parts B & C vom April 2018 eine Wirksamkeit gegen das Modifizierten Vacciniavirus Ankara einer Wirksamkeit gegen alle behüllten Viren entspricht. Dies basiert allerdings auf der Chemoresistenz des Vacciniavirus, das sich als wesentlich stabiler als Coronaviren oder Influenzaviren erwiesen hat.

Die Anwendungsempfehlung für die viruswirksame Anwendung von Miele FashionMaster kann wie folgt zusammengefasst werden: Bügeln und bedampfen von Textilien bei punktueller Anwendung von 5 sec Reduktion 99,99% der Prüfviren MVA und Adenovirus. Das Hepatitis B Virus ist auf seiner herausragenden Thermoresistenz [5] von dieser Auslobung ausgenommen.

Datum

Literatur

- 1 Kampf G., Voss A., Scheithauer S. (2020). Inactivation of coronaviruses by heat. DOI: 10.13140/RG.2.2.35050.26564/1)
- 2 https://www.who.int/csr/sars/survival_2003_05_04/en/
- 3 Firquet, S., Beaujard, S., Lobert, P. É., Sané, F., Caloone, D., Iazard, D., & Hober, D. (2014). Viruses contained in droplets applied on warmed surface are rapidly inactivated. *Microbes and environments*, 29(4), 408–412.
- 4 Eggers Maren, Schwebke Ingeborg, Suchomel Miranda, Fotheringham Valerie, Gebel Jürgen, Meyer Bernhard, Morace Graziella, Roedger Hans Joachim, Roques Christine, Visa Pilar, Steinhauer Katrin. The European tiered approach for virucidal efficacy testing – rationale for rapidly selecting disinfectants against emerging and re-emerging viral diseases. *Euro Surveill.* 2021;26(3):pii=2000708. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.3.2000708>
- 5 König A., Than T. T., Todt D., Yoon S. K., Steinmann J., Steinmann E., et al. . (2019). High tolerance of hepatitis B virus to thermal disinfection. *J. Hepatol.* 71, 1249–1251