

Universitätsstadt [Campinas], den 16. Dezember 2020

Bericht VIRUZIDIEPRÜFUNG

1) Produkt: Bacoban DL

Desinfektionsmittel mit Langzeitwirkung - bis zu 10 Tagen
Produkt für Oberflächen
Wirkstoff: Benzalkoniumchlorid

2) Getestete Viren: Coronavirus (Stamm MHV-03)

Virus	Zelllinien
Coronavirus MHV-3	Zelle L929 NCTC Klon 929 [L-Zelle, L-929, Derivat des Stammes L] (ATCC® CCL-1™)

3) Versuchsdurchführung:

a) Die Tests wurden im Labor NB-2 (Biosicherheitsstufe 2) entsprechend den Empfehlungen der ANVISA, Art. 1 und Art. 3 der Durchführungsverordnung IN 04/13 und IN 12/16, entsprechend den in den Normen beschriebenen Methoden (EN14476:2019, ASTM E1053 - 11 und die des Robert-Koch-Instituts - RKI) sowie entsprechend den Grundsätzen der „Guten Laborpraxis“ (GLP) durchgeführt.

Als Kulturmedium für Viren und Zelllinien wurde das Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 2 % bis 10 % fötalem Rinderserum verwendet.

b) Die Virustitrationen wurden nach der TCID₅₀ Methode (Median Tissue Culture Infectious Dose 50%) durchgeführt. Sequentielle Verdünnungen des Virus zur Basis 10 erfolgten in vierfacher Ausführung auf sterilen Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen. Anschließend wurde die jeweilige Zelle (Punkt 2) mit einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro Vertiefung zugegeben.



Universitätsstadt [Campinas], den 16. Dezember 2020

Nach 48 Stunden wird der für eine Virusinfektion charakteristische zytopathische Effekt (CPE) im Vergleich zur zellulären Kontrolle und zur viralen Kontrolle nachgewiesen.

- c) Zunächst wurde das Produkt **Bacoban DL** in der Zelllinie auf die „Bestimmung der maximalen nicht-toxischen Dosis (MNTD)“ getestet, um die Konzentration zu definieren, die keine Zelltoxizität verursacht.
- d) Die **Bacoban DL**-Probe wurde mit dem Virus gemischt, später verschiedenen Kontaktzeiten (**Long Lasting**: 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden, 7 Tage und 10 Tage) unterzogen und dann auf permissive Zellen beimpft.
- e) Die Mikrotiterplatten mit dem **Produkt** (unterschiedlicher Zeiten), den Viren und den zellulären Systemen wurden für 48 Stunden bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert.
- f) Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Platten mit einem Umkehrmikroskop abgelesen, um nach dem charakteristischen zytopathischen Effekt (oder Abwesenheit) des Virus zu suchen, und die Titer wurden nach der Reed-Muench-Methode berechnet, 1938. Die Ergebnisse werden als Prozentsatz der Virusinaktivierung (Tabelle 1) im Vergleich zur unbehandelten Viruskontrolle (Virustiter) ausgedrückt.

Zusammenfassung/Kontrollen:

- Negativ: Zellkontrolle (2x10⁵ Zellen/ml) im DMEM-Medium, ohne Virus und ohne Testprobe;
- Viruskontrolle: Virustitration (10¹ zu 10¹²) und Zellkultur im DMEM-Medium;
- Positiver Test: Vorhandensein von Virus, **Bacoban DL** und Zelllinie im DMEM-Medium.

Tabelle 1 - Die Ergebnisse werden als Prozentsatz der Virusinaktivierung im Vergleich zur unbehandelten Viruskontrolle ausgedrückt:

Log-Reduktion	Reduktionsfaktor	Prozentsatz der Inaktivierung/Reduktion
1	10	90%
2	100	99%
3	1000	99,9%
4	10.000	99,99%
5	100.000	99,999%
6	1.000.000	99,9999%

<https://microchemlab.com/information/log-and-percent-reductions-microbiology-and-antimicrobial-testing>

Universitätsstadt [Campinas], den 16. Dezember 2020

4) Ergebnisse:**Tabelle 2** - Ergebnisse für das Produkt „**Bacoban DL**“, getestet bei verschiedenen Kontaktzeiten mit dem Coronavirus MHV-3.

Produkt	Zeit	Ergebnisse in Prozent (Tabelle 1) Coronavirus MHV-3
Bacoban DL	24 Stunden	99,99% Virusinaktivierung
	48 Stunden	99,99% Virusinaktivierung
	72 Stunden	99,999% Virusinaktivierung
	7 Tage	99,999% Virusinaktivierung
	10 Tage	99,99% Virusinaktivierung

5) Schlussfolgerungen:

- Da eine Inaktivierung von bis zu 99,999% und eine Verringerung der Virusinfektiosität von $> \log 5$ vorlag, kann man schlussfolgern, dass das Produkt „**Bacoban DL**“ bis zu 10 Tage nach dem Kontakt wirksam war. Daher empfehlen wir seine Verwendung bei der Bekämpfung der Coronavirus-Gruppe einschließlich COVID-19.



Prof. Dr. Clarice Weis Arns (Lattes ID: 8635038112182716)

(verantwortlich für den Bericht)



Universitätsstadt [Campinas], den 16. Dezember 2020

Quellen:

ANVISA - Gesundheitsministerium / Nationale Agentur für Gesundheitsüberwachung [Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária]

Durchführungsverordnung [INSTRUÇÃO NORMATIVA, IN] Nr. 4 VOM 2. JULI 2013

http://bvsm.sau.gov.br/bvs/saualegis/anvisa/2013/int0004_02_07_2013.html

ANVISA - Durchführungsverordnung [INSTRUÇÃO NORMATIVA, IN] Nr. 12 VOM 11. OKTOBER 2016 - ANVISA.

<https://alimentusconsultoria.com.br/instrucao-normativa-no-12-2016-anvisa/>

<https://alimentusconsultoria.com.br/instrucao-normativa-in-no-50-de-3-de-dezembro-de-2019-anvisa/>

BS EN 16777:2018: Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area

BS EN 14476:2013+A2:2019

Incorporating corrigendum August 2019

Chemical disinfectants and antiseptics -Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area - Test method and requirements (Phase 2/Step 1)

BS EN 16777:2018: *Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area*

DIN EN 14476:2015. Chemical disinfectants and antiseptics. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine. Test method and requirements [phase 2, step 1]. Brussels 2015, CEN-Comité Européen de Normalisation.

Britta Becker, Lars Henningsen, Dajana Paulmann, Birte Bischoff, Daniel Todt, Eike Steinmann, Joerg Steinmann, Florian H. H. Brill and Jochen Steinmann

Evaluation of the virucidal efficacy of disinfectant wipes with a test method simulating practical conditions

Antimicrobial Resistance and Infection Control (2019) 8:121

<https://doi.org/10.1186/s13756-019-0569-4>

G. Kampf D., Todt, S. Pfaender, E. Steinmann

Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents

Journal of Hospital Infection 104 (2020) 246 und 251

<https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022> 0195-6701

Rabenau HF, Schwebke I, Blumel J, Eggers M, Glebe D, Rapp I, Sauerbrei A, Steinmann E, Steinmann J, Willkommen H, Wutzler P.

Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e. V. (DVV) und des **Robert Koch-Instituts (RKI)** zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin. Fassung vom 1. Dezember 2014.

Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. 2015;58: 493-504

Reed LJ, Muench H.

A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am J Hyg. 1938; 27:493-497.