

**Test virucidní aktivity u
„Liquid Guard“**

Testování nosičů kontaminovaných vrstvou virů nosičovou metodou v podmínkách napodobujících praktické použití podle směrnice RKI (1995) a ISO 21702:2019 proti viru *Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV-Coronavirus)* – provedení zkoušek S2 ze dne 11./12.03.2020

Souhrnná zpráva ke screeningovému testu S2

zpracovali:

PD Dr. Olaf Thraenhart a Dr. Christian Jursch

Testování: březen 2020

Zadavatel: Nano-Care Deutschland AG
Alfred Nobel-Straße 10
D-66793 Saarwellingen

Dr. Christian Jursch

Eurovir Hygiene-Labor GmbH

Im Biotechnologiepark 9

D-14943 Luckenwalde

Eurovir® Hygiene-Labor

Antivirální validace & vzteklina

Zadavatel: Nano-Care Deutschland AG
Alfred Nobel-Straße 10
D-66793 Saarwellingen

Produkty:

- Testovací plochy: fólie *Leneta*®, testovací plochy zastřížené na rozměry 1,6 cm x 6 cm
- 1. produkt: na jednu stranu testovací plochy byl nanesen produkt *Liquid Guard* (s obsahem účinné látky/účinných látek)
- 2. produkt: testovací plochy bez produktu (příp. s produktem bez účinné látky/účinných látek)

Parametry testování:

- podmínky působení: T = 25°C a 90% relativní vlhkost vzduchu
- bílkovinné zatížení: bez (dalšího) zatížení
virový materiál (suspenze viru) byl nanesen beze změn
- poměr objem/plocha: cca 25 µL/cm²
- virová suspenze přikrytá fólií (LDPE, 50 µm) a rozměry nařezány na cca 1,2 x 5 cm (6 c m²)
- inkubace po dobu 1 h, 8 h a 24 h v klimatizační komoře KBF 115 (firma Binder)

Systém testování:

- Transmissible Gastroenteritis Virus of Swine (TGEV coronavirus), kmen: Toyama 36 [použitý jako modelový virus pro SARS CoV]
(původ: národní sbírka kultur Institutu Friedricha Löfflera, ostrov Riems)
- ST75/2 cells (foetal testis cells of swine)
(původ: Institut Roberta Kocha v Berlíně)

Testovací metody:

- Zkoušky byly provedeny podle směrnice Institutu Roberta Kocha - RKI (1995) a ISO 21702:2019 kvantitativním virucidním nosičovým testem při teplotě T = 25°C a 90% relativní vlhkosti vzduchu (v klimatické komoře).
- Testy byly provedeny bez dodatečného zatížení.

Tab. č. 1: Testované vzorky produktu (získané 08.03.2020)

Poř. č.	Produkt	Skladování ¹
# 1	nosič / s vrstvou <i>Liquid Guard</i> (s obsahem účinné látky/účinných látek / „účinný vzorek“)	při pokojové teplotě
# 2	nosič / bez vrstvy (příp. s vrstvou bez účinné látky/účinných látek / „vzorek nulové kontroly“)	při pokojové teplotě

¹ = omezený přístup

Výsledky:**Pozorování:**

- Testovací plochy byly z velké části smáčitelné. Díky použití skleněných špachtlí bylo možné vytvořit více méně rovnoměrnou vrstvu kapaliny.
- Poté, co byla vrstva kapaliny zakryta fólií, zůstal virový materiál po celou dobu trvání jako vrstva stabilní a během sledované doby nikdy úplně nevyschl. Došlo ovšem k viditelné redukci objemu.

Tab. 2.1: Virová kontrola (určení titru viru pomocí konečného bodu titrace)

Č. vzorku	VK-1a	VK-1b	VK-2a	VK-2b	VK-3a	VK-3b
metoda	virová kontrola / 1 hod.		virová kontrola / 8 hod.		virová kontrola / 24 hod.	
titr / test. objem ($I_g ID_{50}$)	4,2	4,8	4,05	3,9	2,25	2,85
prům. redukce titru viru $\pm K$ (95%) ¹	5,50 \pm 0,37 / 1 mL		4,98 \pm 0,35 / 1 mL		3,55 \pm 0,37 / 1 mL	

¹ = hodnota titru a jeho 95 % interval spolehlivosti jsou vypočítány podle směrnice DVV / RKI

Tab. č. 2.2: Inaktivace viru (určení virového titru pomocí konečného bodu titrace)

Č. vzorku	In-1a	In-1b	In-2a	In-2b	In-3a	In-3b
metoda	inaktivace / 1 hod.		inaktivace / 8 hod.		inaktivace / 24 hod.	
titr / test. objem ($I_g ID_{50}$)	3,6	3,45	1,35	1,2	\leq 0,30	\leq 0,30
prům. redukce titru viru $\pm K$ (95%) ¹	4,53 \pm 0,22 / 1 mL		2,28 \pm 0,29 / 1 mL		\leq 1,30 / 1 mL	
redukce ² ($I_g ID_{50} \pm K$ [95%])	0,97 \pm 0,43		2,70 \pm 0,46		\geq 2,25 \pm 0,37	

¹ = hodnota titru a jeho 95 % interval spolehlivosti jsou vypočítány podle směrnice DVV / RKI

² = redukce viru: $I_g ID_{50}$ virové kontroly mínus $I_g ID_{50}$ vzorku, podle směrnice DVV / RKI

Výsledky: (srov. tabulka č. 2)

- I když byl virový materiál překryt LDPE fólií, snížilo se množství viru schopného rozmnožování i bez (dodatečného) působení na materiál nosiče o určitou hodnotu (po 8 hodinách o cca 0,5 log a po 24 hodinách o 2 log).
- Aby bylo možné hodnotit vlastnosti testované vrstvy inaktivující virus, byla u každé doby působení zjištěna daná výchozí hodnota viru (virová kontrola/virové kontroly). Výchozí hodnota viru v daném okamžiku proto představuje referenční hodnotu pro stanovení inaktivace viru produktem (redukce titru viru) (srov. tabulka č. 2.1.).

Dr. Christian Jursch

Eurovir Hygiene-Labor GmbH

Im Biotechnologiepark 9

D-14943 Luckenwalde

Eurovir® Hygiene-Labor

Antivirální validace & vzteklina

- Po uplynutí doby expozice ($t = 1, 8$ a 24 hodin) a za výše zmíněných testovacích podmínek byly ve spojení s produktem zjištěny tyto faktory redukce titru viru: po $t = 1$ hodina: $RF = 0,97 \pm 0,43$. Po $t = 8$ hodin: $RF = 2,70 \pm 0,46$. Po $t = 24$ hodin již nebyl zjištěn žádný zbytkový virus a redukce titru viru činila $RF \geq 2,25 \pm 0,37$.
- V okamžiku $t = 24$ hodin se množství viru u virové kontroly snížilo již o cca 2 log. Tím byl doložitelný redukční faktor z technických důvodů v okamžiku $t = 24$ hodin zdánlivě nižší než po $t = 8$ hodin.

Závěr:

- Vrstva kapaliny nanesená na testovací plochy byla po dobu pozorování stabilní, tzn. ani na konci nejdelší doby působení virový materiál zcela nevyschnul. Tím byl po dobu pozorování zajištěn neustálý kontakt mezi virovým materiálem a povrchem nosiče a byla umožněna distribuce virového materiálu pomocí difuze v tekuté fázi.
- Po $t = 1$ h již byla zaznamenána redukce titru viru $0,97$ log (odpovídá 90 %) a po $t = 8$ h činil redukční faktor $RF = 2,7$ (odpovídá 99,8 %). Z technických důvodů činil doložitelný redukční faktor titru viru po $t = 24$ h $RF \geq 2,25$.
- Konstatujeme, že příčinou doložené redukce titru viru je účinná složka (obsažená ve vrstvě) a že byla zaznamenána dobrá účinnost proti koronaviru TGEV (jako modelového viru pro SARS CoV).
- Je nutno ještě zmínit, že podmínky normy ISO 21702 počítají s vyšší inkubační teplotou, než byla teplota použitá u S1 (25 oproti 21 °C).
- Redukce titru viru po $t = 8$ h naznačuje, že po inkubační době $t = 24$ h byla redukce titru viru zjevně vyšší, než bylo možné prokázat metodou konečného bodu titrace. Zde by možná mělo vyšší vypovídací hodnotu určení virového titru metodou Large Volume Plating (LVP).

Luckenwalde, 20.03.2020

[nečitelný podpis]

Dr. Ch. Jursch

(jednatel a vedoucí laboratoře Eurovir)

TLUMOČNICKÁ DOLOŽKA

Tlumočnický úkon jsem provedla jako tlumočnice jmenovaná rozhodnutím předsedy Krajského soudu v Ostravě ze dne 29.03.2010, č.j. Spr 939/2010, pro jazyk německý, zapsaná v seznamu znalců a tlumočnicků vedeném Městským soudem v Praze.

Stvrzuji, že překlad souhlasí s textem připojené listiny. V překladu jsem provedla tyto opravy:
.....

Tlumočnický úkon je zapsán v tlumočnickém deníku pod pořadovým číslem 798.

V Praze, 20.05.2020



.....
Lenka Martinková



DOLMETSCHERKLAUSEL

Diese Dolmetschleistung habe ich als Dolmetscherin der deutschen Sprache erbracht, die durch die Entscheidung des Vorsitzenden des Bezirksgerichts Ostrava am 29.03.2010, GZ Spr 939/2010, bestellt wurde und in das Register der Sachverständigen und Dolmetscher des Stadtgerichts Praha eingetragen ist.

Ich bestätige, dass die Übersetzung mit dem Text der beiliegenden Urkunde übereinstimmt. Ich habe in der Übersetzung folgende Korrekturen vorgenommen:

Diese Dolmetschleistung wurde unter der Ordnungsnummer 798 ins Dolmetscherbuch eingetragen.

Prag, 20.05.2020



.....
Lenka Martinková



Überprüfung der viruziden Eigenschaften von „Liquid Guard“

Testung von viruzid beschichteten Keimträgern im praxisnahen Carriertest in Anlehnung an die
RKI-Richtlinie (1995) sowie der ISO 21702:2019 gegenüber dem
Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV-Coronavirus) - Testdurchgang S2 vom 11./12.03.2020

Kurzbericht zum Screeningtest S2

von

PD Dr. Olaf Thraenhart und Dr. Christian Jursch

Untersuchung: im März 2020

Auftraggeber: Nano-Care Deutschland AG
Alfred Nobel-Straße 10
D-66793 Saarwellingen

Auftraggeber: Nano-Care Deutschland AG
Alfred Nobel-Straße 10
D-66793 Saarwellingen

Produkte:

- Testflächen: *Leneta*[®] Folie, auf die Maße 1,6 cm x 6 cm zugeschnittene Testflächen
- 1. Produkt: Testflächen einseitig beschicht mit Liquid Guard (beinhaltend die Wirksubstanz[en])
- 2. Produkt: unbeschichtete Testflächen (bzw. beschichtet ohne die Wirksubstanz[en])

Testparameter:

- Einwirkbedingungen: T = 25 °C und 90 % r.LF (
- Proteinbelastung: ohne (weitere) Belastung; das Virusmaterial (Zellkulturüberstand) wurde unverändert aufgetragen
- Volumen/Flächenverhältnis: ca. 25 µL/cm²
- Virussuspension abgedeckt mit Folie (LDPE, 50 µm) und zugeschnitten auf ca. 1,2 x 5 cm (6 cm²)
- Inkubation für 1h, 8h und 24h im Klimaschrank KBF 115 (Fa Binder)

Testsystem:

- Transmissible Gastroenteritis Virus of Swine (TGEV-Coronavirus), Stamm: Toyama 36 [eingesetzt als Modellvirus für das SARS-CoV] (Herkunft: Virusbank des Friedrich Löffler-Instituts, Insel Riems)
- ST75/2 cells (foetal testis cells of swine) (Herkunft: Robert Koch-Institut, Berlin)

Testverfahren:

- Die Versuche wurden in Anlehnung an die RKI-Richtlinie (1995) sowie der ISO 21702:2019 im quantitativen viruziden Carriertest bei T = 25 °C und 90 % r.LF (im Klimaschrank) durchgeführt.
- Die Tests wurden ohne zusätzliche Belastung durchgeführt.

Tab. 1: Getestete Produktmuster (erhalten: 08.03.2020)

Lfd. Nr.	Produkt (e)	Lagerung ¹
#1	Keimträger / beschichtet mit <u>Liquid Guard</u> (beinhaltend die Wirkkomponente(n) / „Wirkprobe“)	bei RT
#2	Keimträger / unbeschichtet (bzw. beschichtet ohne die Wirkkomponente(n) / „Nullprobe“)	bei RT

¹ = zugangsbeschränkt

Ergebnisse:

Beobachtungen:

- Die Testflächen waren weitgehend benetzbar. Durch die Verwendung von Glasspateln konnte ein mehr oder weniger gleichmäßiger Flüssigkeitsfilm erzeugt werden.
- Nach der Abdeckung des Flüssigkeitsfilms mit der Folie blieb das Virusmaterial über die gesamte Standzeit als Film stabil und trocknete innerhalb des Beobachtungszeitraum nicht vollständig aus. Eine Volumenreduktion war jedoch sichtbar.

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. / 8 Std.		Viruskontr. / 24 Std.	
Titer/Testvol. (lg ID ₅₀)	4,2	4,8	4,05	3,9	2,25	2,85
mittl. Virustiter ± K (95%)¹	5,50 ± 0,37 / 1 mL		4,98 ± 0,35 / 1 mL		3,55 ± 0,37 / 1 mL	

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

Tab. 2.2: Virusinaktivierung (Virustiterbestimmung mittels Endpunkttitration)

³ Probe Nr.	In-1a	In-1b	In-2a	In-2b	In-3a	In-3b
Ansatz	Inaktivierung / 1 Std.		Inaktivierung / 8 Std.		Inaktivierung / 24 Std.	
Titer/Testvol. (lg ID ₅₀)	3,6	3,45	1,35	1,2	≤ 0,30	≤ 0,30
mittl. Virustiter ± K (95%) ¹	4,53 ± 0,22 / mL		2,28 ± 0,29 / mL		≤ 1,30 / mL	
Reduktion² (lg ID₅₀ ± K [95%])	0,97 ± 0,43		2,70 ± 0,46		≥ 2,25 ± 0,37	

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

² = Virusreduktion: lg ID₅₀ der Viruskontrolle minus lg ID₅₀ der Probe; nach der DVV/RKI-Leitlinie

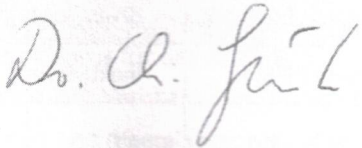
Ergebnisse: (cf. Tab. 2)

- Trotz Bedeckung des Virusmaterials durch die LDPE-Folie wurde die Menge an vermehrungsfähigem Virus bereits ohne eine (zusätzliche) Einwirkung auf dem Trägermaterial um einen gewissen Betrag reduziert (nach 8 h um ca. 0,5 Log und nach 24 h um ca. 2 Log).
- Deshalb wurde zur Beurteilung der virusinaktivierenden Eigenschaft der zu testenden Beschichtung zu jeder Einwirkzeit der entsprechende Virusausgangswert bestimmt (Viruskontroll[en]). Der Virusausgangswert zum jeweiligen Zeitpunkt stellt somit den Bezugspunkt zur Ermittlung der produktassoziierten Virusinaktivierung (Virusreduktion) dar (cf. Tab. 2.1).
- Nach Ablauf der Expositionszeit (t = 1, 8 und 24 Stunden) und unter den o.a. Testbedingungen wurden folgende produktassoziierte Reduktionsfaktoren bestimmt: nach t = 1 Stunde: RF = 0,97 ± 0,43 und nach t = 8 Stunden: RF = 2,70 ± 0,46. Nach t = 24 Stunden war kein Restvirus mehr nachweisbar und die Virusreduktion betrug RF ≥ 2,25 ± 0,37.
- Zum Zeitpunkt t = 24 Stunden war die Virusmenge bei der Viruskontrolle bereits um ca. 2 Log reduziert. Damit war der nachweisbare Reduktionsfaktor aus technischen Gründen für den Zeitpunkt t = 24 h scheinbar geringer als nach t = 8 h.

Fazit:

- Der auf die Testflächen aufgebrachte Flüssigkeitsfilm war über den Beobachtungszeitraum stabil d.h. auch am Ende der längsten Einwirkzeit war das Virusmaterial noch nicht vollständig eingetrocknet. Damit sollte ein fortwährender Kontakt zwischen dem Virusmaterial und der Keimträger-Oberfläche über den Beobachtungszeitraum hinweg gegeben gewesen sein und eine Verteilung des Virusmaterials per Diffusion in der flüssigen Phase war möglich.
- Nach $t = 1$ h war bereits eine Virusreduktion von 0,97 Log zu verzeichnen (entspr. 90 %) und nach $t = 8$ h betrug der Reduktionsfaktor $RF = 2,7$ (entspr. 99,8 %). Aus technischen Gründen betrug der nachweisbare Virusreduktionsfaktor nach $t = 24$ h $RF \geq 2,25$.
- Es bleibt festzuhalten, dass die nachgewiesene Virusreduktion ursächlich der Wirkkomponente (innerhalb der Beschichtung) zugeschrieben werden kann und das eine gute Wirksamkeit gegenüber dem TGEV-Coronavirus (als Modellvirus für das SARS-CoV) verzeichnet werden konnte.
- Es sollte noch erwähnt werden, dass die Bedingungen der ISO 21702 eine höhere Inkubationstemperatur vorsehen als in S1 zur Anwendung kam (25 vs. 21 °C).
- Die Virusreduktion nach $t = 8$ h legt nahe, dass bei der Inkubationszeit $t = 24$ h eine höhere Virusreduktion evident ist als mit der Endpunktitationsmethode nachgewiesen werden konnte. Hier kann möglicherweise die Virustiterbestimmung mittels Large Volume Plating (LVP) eine bessere Aussage liefern.

Luckenwalde, den 20.03.2020



Dr. Ch. Jursch
(GF und Laborleiter Eurovir)