

H. F. Rabenau<sup>1</sup> · I. Schwebke<sup>2</sup> · J. Blümel<sup>3</sup> · M. Eggers<sup>4</sup> · I. Rapp<sup>5</sup> · J. Steinmann<sup>6</sup> · H. Willkommen<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Institut für Med. Virologie, Universitätsklinikum Frankfurt, Frankfurt/Main, Deutschland

<sup>2</sup> Robert Koch-Institut, Berlin, Deutschland

<sup>3</sup> Paul-Ehrlich-Institut, Langen, Deutschland

<sup>4</sup> Labor Prof. G. Enders & Partner, Stuttgart, Deutschland

<sup>5</sup> Labor Dr. Merk & Kollegen, Ochsenhausen, Deutschland

<sup>6</sup> Dr. Brill + Dr. Steinmann Institut für Hygiene und Mikrobiologie, GmbH, Bremen, Deutschland

<sup>7</sup> RBS Consulting, Erzhausen, Deutschland

## 2. Mitteilung des DVV/GfV-Fachausschusses Virusdesinfektion zur DVV/RKI-Leitlinie in der Fassung vom 01.12.2014

### Erläuterung zur Bedeutung, Anwendung und Berechnung des „Large-Volume-Platings“ (LVP)

Mit der Veröffentlichung der Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e. V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin in der Fassung vom 1. Dezember 2014 [1] im Bundesgesundheitsblatt wurde erstmals die Anwendung des Large-Volume-Platings zur Ermittlung der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln beschrieben. Um daraus entstandene Fragen zu berücksichtigen, sollen im Folgenden die Anwendung und Durchführung sowie Berechnung der Ergebnisse näher erläutert werden.

#### Wann kann bzw. sollte das LVP angewendet werden?

##### Abschn. 6 „Bestimmung der Infektiosität der Proben im Suspensionsversuch“

Aus diesem Abschnitt geht hervor, dass das LVP nur unter bestimmten Bedingungen angewendet werden soll. Dieses Vorgehen spiegelt die in vielen Laboratorien praktizierte Methode der Infektiositätsbestimmung wider. Unabhängig davon sind alternative Methoden zur quantitativen Bestimmung und Berechnung der Infektiosität theoretisch möglich.

LVP wird in der Regel dann durchgeführt, wenn eine hohe Zytotoxizität und ein nicht so hoher Virustiter vorliegt (oftmals ist die korrekte Berechnung des Virustiters nach Spearman-Kärber dann nicht anwendbar, weil die erste eingesetzte Verdünnung keine hohe Reaktionsrate ergibt, d. h. nur ein Teil der Kulturen positiv sind). Die Anwendung von LVP wurde

in der Leitlinie sehr strikt ausgedrückt. Der Text sagt in Abschn. 6, Absatz 4:

*Eine weitere Methode, den Nachweis der Abnahme der Infektiosität nach Einwirkzeit des Desinfektionsmittels zu verbessern bzw. zu präzisieren, ist die Testung eines größeren Probevolumens, das sogenannte „large-volume-plating“ (LVP). Diese Methode darf nur angewendet werden, wenn in dem oben beschriebenen Testansatz (Endverdünnungsmethode ohne Maßnahmen zur Reduktion der Zytotoxizität) aus den im vorangegangenen Absatz beschriebenen Gründen nicht möglich ist, eine Titerreduktion  $\geq 4 \log_{10}$  zu erzielen. Es dient der Verbesserung der Nachweisgrenze und ist nur sinnvoll, wenn im Infektiositätstest (Endverdünnungsmethode oder Plaquetest) keine bzw. nur eine sehr geringe Infektiosität nachweisbar ist.*

Tatsächlich ist es nicht zwingend notwendig, den Virusgehalt zuerst nach der Endverdünnungsmethode oder dem Plaquetest zu prüfen und erst danach

eine größere Probenmenge durch LVP zu testen. So ist es theoretisch möglich, dass man die Infektiosität der Probe ausschließlich durch LVP bestimmen kann. Das in der Leitlinie empfohlene Vorgehen, den Virusgehalt zuerst nach der Endverdünnungsmethode oder dem Plaquetest zu prüfen und erst danach eine größere Probenmenge durch LVP zu testen, entspricht der gängigen Praxis, den Endverdünnungsbereich der Probe einzugrenzen. Eine Bestimmung der Viruskonzentrationen mittels LVP ist grundsätzlich möglich, wenn die Infektiosität der Probe im Endverdünnungsbereich liegt. Es wird kein Ergebnis erreicht, wenn alle Kavitäten der eingesetzten Mikrotestplatten positiv sind. Wird die Infektiosität der Probe ausschließlich durch LVP bestimmt, ist eine statistische Auswertung erforderlich.

## Berechnung der Infektiosität aus dem LVP

Zur Berechnung der Infektiosität aus dem LVP wird in der Leitlinie ausgeführt:

*Die Anzahl der Platten und somit das für die Prüfung verwendete Volumen bestimmt die Nachweisgrenze*

Das Probevolumen, d. h. die aus dem Versuchsansatz entnommene Probe, die in der Regel verdünnt eingesetzt wird, bestimmt die Nachweisgrenze. Werden beispielsweise 3,5 ml entnommen, diese 1:20 verdünnt und dieses Volumen (70 ml) auf 700 Zellkulturen in 96-well Mikrotestplatten getestet (100 µl/well), so wird eine bessere Nachweisgrenze erreicht als wenn nur 1 ml entnommen und die aus der Verdünnung resultierenden 20 ml getestet worden wären.

Ferner wird in der Leitlinie ausgeführt (Abschn. 6, Absatz 4 und Abschn. 8.3):

*Nach Inkubation unter den für die Titration mit dem jeweiligen Virus spezifischen Bedingungen, werden die Zellkulturen unter dem Mikroskop auf zytopathische Effekte untersucht. Aus der Zahl der infizierten Zellkulturen bzw. aus dem insgesamt verwendeten Probenvolumen, das keine Infektiosität zeigt, wird die Viruskonzentration bzw. Nachweisgrenze berechnet und diese für die Berechnung des Reduktionsfaktors verwendet (s. 8).*

*Werden noch einige Viruspartikel beim LVP gefunden, kann die Viruskonzentration gemäß der nachfolgenden Formel berechnet werden. Die Formel ist von der Taylor-Reihe abgeleitet, die eine Annäherung an exponentielle Funktionen darstellt (Taylor-Formel). Das Ergebnis, umgerechnet in den logarithmischen Wert, ist der Titer  $b$  und wird für die Berechnung des Reduktionsfaktors eingesetzt. Eine  $TCID_{50}/ml$  entspricht 0,69 infektiösen Viruspartikeln.*

$$c = \frac{D}{V_w} \left( -\ln \frac{n - n_p}{n} \right)$$

*Dabei ist*

- $c$  = Konzentration der infektiösen Viruspartikel
- $D$  = Verdünnung
- $V_w$  = Volumen pro well
- $n$  = Anzahl inokulierter wells
- $n_p$  = Anzahl Virus-positiver wells

Die Berechnung nach Lycke et al. [2] liefert äquivalente Ergebnisse (zur Formel nach Taylor), so dass auch die Lycke-Formel für die Berechnung eingesetzt werden kann. Bereits vorliegende Gutachten, deren Ergebnisse auf der Basis der Formel nach Lycke vorgenommen wurden, behalten somit ihre Gültigkeit. Jedoch wird eine einheitliche Berechnungsgrundlage angestrebt; d. h. dass die Berechnung vorzugsweise mit der in der Leitlinie genannten Formel nach Taylor durchzuführen ist.

## Berechnung wenn kein Restvirus nachweisbar ist: Ist die Anwendung einer alternativen Formel zur Berechnung der Nachweisgrenze bei negativem Testergebnis möglich?

In der Leitlinie ist für den Fall, dass keine infizierten Zellkulturen beim LVP festgestellt werden, vorgesehen, die Poisson-Formel einzusetzen. Im Text der Leitlinie heißt es unter Abschn. 8.3:

*Wird beim LVP kein Virus gefunden, ist die Taylor-Formel nicht gültig und deshalb muss die Poisson-Formel angewendet werden. Sie berücksichtigt die*

*statistische Verteilung weniger Viruspartikel in einem großen Volumen. Es ist die Berechnung der Virusmenge, die vorliegen müsste, um bei einem gegebenen Probevolumen mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % ein positives Ergebnis zu erhalten. Nach folgender Formel wird die Zahl der Viruspartikel berechnet, die, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors und umgewandelt in den logarithmischen Wert den Titer  $b$  darstellt und für die Berechnung des Reduktionsfaktors eingesetzt wird:*

$$p = e^{-cv} \text{ und abgeleitet nach } c \\ c = \ln p / -V$$

*Dabei ist*

- $p$  = die Wahrscheinlichkeit mit der kein Virus nachgewiesen wird; die Wahrscheinlichkeit, kein Virus zu finden, soll nicht größer als 5 % sein ( $p = 0,05$ ), so dass die Zahl der Viruspartikel berechnet wird, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % nachgewiesen werden kann.
- $c$  = Konzentration der infektiösen Viruspartikel
- $V$  = Testvolumen

Alternativ könnte auch die folgende Formel verwendet werden, die neben dem im Test eingesetzten Volumen das Gesamtvolumen berücksichtigt:

$$\text{Titer/ml} = \ln p / V \times \ln(1 - v/V)$$

*Dabei ist*

- $p = 0,05$
- $v$  = getestetes Volumen
- $V$  = Volumen der Probe

Diese Formel ist eine Ableitung der in der Leitlinie genannten Formel. Ebenso wie die einfachere, in der Leitlinie angegebene Formel resultiert aus dieser Berechnung die Konzentration von Viruspartikeln, die in der aus dem Testansatz entnommenen und für den Test gegebenenfalls verdünnten Probe aus statistischer Sicht vorhanden sein müsste, um mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit nachgewiesen zu werden.

Hierbei ist die richtige Definition des ‚Volumens der Probe‘ wichtig. Korrekt eingesetzt handelt es sich um das Volu-

men der aus dem Ansatz entnommenen Probe und nicht um das Volumen der verdünnten, im Test eingesetzten Probe.

Richtig angewendet können beide Formeln für die Berechnung verwendet werden. Aus Gründen der Vergleichbarkeit bzw. Bewertung der Ergebnisse sollte jedoch die in der Leitlinie angegebene Formel angewendet werden.

---

### Korrespondenzadresse

**Prof. Dr. H. F. Rabenau**

Institut für Med. Virologie,  
Universitätsklinikum Frankfurt  
Paul-Ehrlich-Str. 40, 60596 Frankfurt/Main,  
Deutschland  
Rabenau@em.uni-frankfurt.de

---

### Literatur

1. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin in der Fassung vom 1. Dezember 2014. (2015) Bundesgesundheitsbl 58:493–504, DOI 10.1007/s00103-015-2131-8
2. Lycke E, Melen B, Wrange G (1957) Studies of the inactivation of poliomyelitis virus by formaldehyde. Arch Gesamte Virusforsch 7(4):378–383