

confirmation

Dr. Björn Friedrichs

We hereby confirm that the products

RHEOSEPT-hand disinfection (Wachendorff-Chemie GmbH)

RHEOSEPT-WD plus wipes (Wachendorff-Chemie GmbH)

have been successfully tested for their effectiveness against enveloped viruses by accredited test laboratories and experts. The products are therefore effective against the current virus infections Coronavirus Sars-CoV-2 and all other influenza viruses.

Datum: 19.02.2020



Dr. Björn Friedrichs
HyCo GmbH

Verbund für Angewandte Hygiene (VAH)
Association for Applied Hygiene

– Desinfektionsmittel-Kommission im VAH –
Disinfectant Commission in VAH

Zertifikat / Certificate

über die Konformität der Wirksamkeitsprüfungen für / for conformity of efficacy tests for

RHEOSEPT-Händedesinfektion

mit den Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren –
Stand 2.4.2015 - bzw. den Übergangsbestimmungen vom 2.4.2015
with the requirements and methods of VAH-certification for chemical disinfection procedures –
as per 2 April 2015 - and the transitional provisions of 2 April 2015, respectively.

ANTRAGSTELLER / APPLICANT:

Wachendorff-Chemie GmbH
Langbaughstr. 15
53842 Troisdorf

WIRKSTOFFE nach Art und Menge bezogen auf 100 g / Quantity of active substances per 100 g:
63,10 g 2-Propanol

Hiermit wird bestätigt, dass das o.g. Produkt für die prophylaktische Desinfektion in den aufgeführten Anwendungsbereichen in folgenden Konzentrations-Zeit-Relationen als wirksam eingestuft wird:
This is to confirm that the above product was found to be effective for prophylactic disinfection in the application domains listed below at the specified concentration/contact time ratios:

Händedesinfektion / Hand disinfection				
Hygienisch / Hygienic		Chirurgisch / Surgical		
Einwirkungszeit / Exposure time (min)		Einwirkungszeit / Exposure time (min)		
1/2	1	1 – 2,5	3	5
konz.*			konz.*	

*Die Hände während der gesamten Applikationszeit durch das konzentrierte Präparat feucht halten. /
Keep hands well moistened with the concentrated product during the entire application time.

Das Zertifikat ist gültig vom 16.07.2019 bis zum 16.07.2022 (3 Jahre) /
Certificate is valid from 16.07.2019 until 16.07.2022 (3 years)

Der Antragsteller hat sich mit den Bedingungen der zum Zeitpunkt der Antragstellung gültigen Geschäftsordnung der Desinfektionsmittelkommission im VAH einverstanden erklärt und rechtsverbindlich bestätigt, dass das von ihm in Handel gebrachte Präparat in seiner Zusammensetzung identisch mit den für die Erstellung der Gutachten eingereichten Mustern ist. /
The applicant has agreed to the conditions laid down in the rules of the disinfectant commission in the VAH valid at the time of application and has legally binding confirmed that the distributed product is identical with the product used for the activity testing.

Bonn, den **16.07.2019**
Place/Date

Der Vorsitzende der / The Chairman of the
Desinfektionsmittel-Kommission im VAH / Disinfectant Commission in VAH - Ident.No N18/486

Desinfektionsmittel-Kommission im VAH, c/o Institut für Hygiene, Venusberg-Campus 1, D-53127 Bonn, www.vah-online.de, info@vah-online.de, Tel. 0228 287 1 4022





MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

Tel: +49 (421) 27819102

Fax: +49 (421) 2760283

E-mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

<http://www.mikrolab-gmbh.de>

Ust-IDNr.: DE208891444

Wachendorff-Chemie GmbH

Postfach 3124

D-53831 Troisdorf

Ihre Zeichen, Ihre Nachrichten vom

Unsere Zeichen, unsere Nachricht vom

Bremen, den 2009-09-03

Summary: virus-inactivating properties of RHEOSEPT-HÄNDEDESINFEKTION of Wachendorff-Chemie GmbH for hand disinfection

This summary is based on the following expert reports of MikroLab GmbH for the hand disinfectant RHEOSEPT-HÄNDEDESINFEKTION of Wachendorff-Chemie GmbH:

Vaccinia virus expert report 2004-03-29

BVDV expert report 2004-03-19

The following concentration and exposure time are necessary for inactivation of the two test viruses:

conc. 1 min

in order to achieve a four \log_{10} reduction (inactivation $\geq 99.99\%$) in a quantitative suspension test according to the guideline of Bundesgesundheitsamt (BGA, now Robert Koch-Institute, RKI) and Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e. V. (DVV, German Association for the Control of Virus Diseases).

After evaluation with vaccinia virus and Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV, surrogate of Hepatitis C Virus) the hand disinfectant RHEOSEPT-HÄNDEDESINFEKTION can be declared as having "limited virucidal" properties according to a recommendation of an expert committee of RKI (Bundesgesundheitsbl. 2004, 47: 62-66) and is thus able to inactivate all enveloped viruses.

Therefore, after successful experiments with the above mentioned enveloped viruses the hand disinfectant RHEOSEPT-HÄNDEDESINFEKTION is also effective against the so-called blood-borne viruses including HBV, HCV and HIV as well as against members of other virus families such as orthomyxoviridae (incl. influenzaviruses with H1N1 and H5N1) and herpesviridae.


Dr. Jochen Steinmann

Bank: Bankhaus Neelmeyer, Bremen

BLZ: 29020000, Kto. 29333

BIC: NEELDE22, IBAN: DE52 2902 0000 0000 0293 33

Sitz der Gesellschaft: Bremen

Geschäftsführerin: Dorothee Steinmann

Reg.-Gericht Bremen: HRB 19445

Wachendorff-Chemie GmbH
Langbaurchstraße 15
53831 Troisdorf
DEUTSCHLAND

c/o
HygCen Austria GmbH
Werksgelände 28
Techno-Z / Bauteil 3
5500 Bischofshofen

Phone: +43 (0) 6462 5319
Fax: +43 (0) 6462 3275 3
Email: info@hygcn.at
Web: www.hygcn.at

16.11.2018

Prof.We

RHEOSEPT-Händedesinfektion
Hygienische Händedesinfektion

GUTACHTEN

Nach Prüfung der Eignung von **RHEOSEPT-Händedesinfektion** für die Hygienische Händedesinfektion nach EN 1500 (Stand: 2013) und in den in vitro-Tests nach den „Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren“ (Stand: 1. Sept. 2001) sowie den „Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren“ (Stand: 2015) gebe ich die folgende Beurteilung der Ergebnisse in den Prüfberichten B 14930 vom 07.03.2008 und B 14930 + B 21529 vom 16.11.2018:

Ergebnisse der in vitro-Tests

In den quantitativen Suspensionstests erwies sich das Präparat **RHEOSEPT-Händedesinfektion** in der 80%igen Konzentration bei einer Einwirkzeit von 15 Sekunden als bakterizid und fungizid wirksam gegenüber *S. aureus*, *E. hirae*, *P. aeruginosa* und *C. albicans*.

Ergebnisse unter praxisnahen Bedingungen


In der Prüfung nach EN 1500 zur Hygienischen Händedesinfektion – Phase 2/Stufe 2 – war das Testverfahren mit **RHEOSEPT-Händedesinfektion** dem Referenzverfahren nicht unterlegen.

Alle vorgegebenen Akzeptanzkriterien in EN 1500 wurden erfüllt, dies schließt auch die Kontrolle der Neutralisation sowie die Methodvalidierung ein.

Das Präparat ist damit geeignet für die Hygienische Händedesinfektion mit folgender Anwendungsempfehlung:

**Anwendungsempfehlung für RHEOSEPT-Händedesinfektion
zur hygienischen Händedesinfektion nach EN 1500:**

**3 ml RHEOSEPT-Händedesinfektion
in den Händen während 30 Sekunden verreiben.**



Prof. Dr. med. H.-P. Werner

PROF. DR. MED. H.-P. WERNER
FACHARZT FÜR HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE



Prof. Dr. H.-P. Werner c/o HygCen International GmbH 5500 Bischofshofen Austria

Anwendungsempfehlung für RHEOSEPT-Händedesinfektion
zur chirurgischen Händedesinfektion

Konzentriertes RHEOSEPT-Händedesinfektion unverdünnt
für 1,5 Minute einreiben und feucht halten.

Wachendorff-Chemie GmbH
Langbaorghstraße 15
D-53831 Troisdorf
DEUTSCHLAND

04.04.2008

Prof. We

Prof. Dr. med. H.-P. Werner

RHEOSEPT-Händedesinfektion
Chirurgische Händedesinfektion

GUTACHTEN

Nach Prüfung der Eignung von **RHEOSEPT-Händedesinfektion** für die Chirurgische Händedesinfektion nach EN 12791 (Stand: 2005) und in den in vitro-Tests nach den „Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren“ (Stand: 1. Sept. 2001) gebe ich die folgende Beurteilung der Ergebnisse in dem Prüfbericht B 14930a vom 04.04.2008:

Ergebnisse der In vitro-Versuche

RHEOSEPT-Händedesinfektion verursachte in den quantitativen Suspensionsversuchen Reduktionsfaktoren von über 5,0 log-Einheiten von *S. aureus*, *E. hirae*, *P. aeruginosa* und *C. albicans* in 80%iger Konzentration unter geringer organischer Belastung binnen 1 Minute.

Ergebnisse unter praxisnahen Bedingungen

Das Prüfverfahren mit **RHEOSEPT-Händedesinfektion** ist in der Sofortwirkung signifikant besser als das Referenzverfahren. In der 3-Stunden-Wirkung weist das Prüfverfahren mit **RHEOSEPT-Händedesinfektion** zwar einen höheren Mittelwert der Reduktionsfaktoren auf als das Referenzverfahren, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

HYGIENE

**Anwendungsempfehlung für RHEOSEPT-Händedesinfektion
zur chirurgischen Händedesinfektion**

Prof. Dr. H.-P. Werner, ab Hygiene International Prof. Dr. H.-P. Werner, Austria

**Konzentriertes RHEOSEPT-Händedesinfektion unverdünnt
für 1,5 Minute einreiben und feucht halten.**



04.04.2008

Prof. Dr. med. H.-P. Werner

Prof. We

RHEOSEPT-Händedesinfektion
Chirurgische Händedesinfektion

GUTACHTEN

Nach Prüfung der Eignung von RHEOSEPT-Händedesinfektion für die Chirurgische Händedesinfektion nach E 12791 (Stand: 2005) und in den in vitro-Tests nach den „Standardmethoden der DGfHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren“ (Stand: 1. Sept. 2001) gebe ich die folgende Beurteilung der Ergebnisse in dem Prüfbericht B 14930a vom 04.04.2008:

Ergebnisse der In vitro-Versuche

RHEOSEPT-Händedesinfektion verursachte in den quantitativen Suspensionsversuchen Reduktionsfaktoren von über 5,0 log-Einheiten von *S. aureus*, *E. hirae*, *P. aeruginosa* und *C. albicans* in 80%iger Konzentration unter geringer organischer Belastung binnen 1 Minute.

Ergebnisse unter praxisnahen Bedingungen

Das Prüfverfahren mit RHEOSEPT-Händedesinfektion ist in der Sofortwirkung signifikant besser als das Referenzverfahren. In der 3-Stunden-Wirkung weist das Prüfverfahren mit RHEOSEPT-Händedesinfektion zwar einen höheren Mittelwert der Reduktionsfaktoren auf als das Referenzverfahren, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

Dermatest[®] GmbH, Postfach 2165, D - 48008 Münster

Wachendorff-Chemie GmbH
Langbaughstr. 15

D-53842 TROISDORF

date:

Münster, 22.02.2008

Z E R T I F I K A T

über das Arzneimittel


RHEOSEPT-Hände- und Hautdesinfektion Art.-Nr. 290200
(1/12.07)

Dermatologische Prüfungen am Menschen 2008

**Die von mir unter fachärztlicher Kontrolle durchgeführten
dermatologisch - allergologischen Prüfungen Ihres o.g. Produktes
bestand das Produkt mit**

„sehr gut“

**Bei dem genannten Präparat traten im
Epikutantest nach internationalen Richtlinien k e i n e
allergischen oder toxisch- irritativen Unverträglichkeitsreaktionen auf.
Das Präparat kann deshalb mit
dermatologisch getestet oder allergiegetestet deklariert werden.**



Dr. med. Werner Voss
Facharzt für Dermatologie
Venerologie, Allergologie,
Phlebologie und Umweltmedizin



Verbund für Angewandte Hygiene (VAH)
Association for Applied Hygiene

– Desinfektionsmittel-Kommission im VAH –
Disinfectant Commission in VAH

Zertifikat / Certificate

über die Konformität der Wirksamkeitsprüfungen für / for conformity of efficacy tests for

RHEOSEPT-WD plus

mit dem Anforderungskatalog der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM) - Stand 4.2.2002 - basierend auf den Standardmethoden der DGHM - Stand 1.9.2001 - bzw. den Übergangsbestimmungen vom 4.9.2002. DGHM und VAH bestätigen die Äquivalenz mit den früher herausgegebenen DGHM-Zertifikaten. *with the Requirements issued by the German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM) on February 4th 2002 which is based on the DGHM Standard Methods of September 1st 2001 or the transitional provisions of Sept. 4th 2002. DGHM and VAH confirm the equivalence to the former issued DGHM certificates.*

ANTRAGSTELLER / APPLICANT:

Wachendorff-Chemie GmbH
Langbaurchstr. 15
53842 Troisdorf

WIRKSTOFFE nach Art und Menge bezogen auf 100 g:

Quantity of active substances per 100 g:

0,25 g Alkyldimethylethylbenzylammoniumchlorid

0,25 g Benzalkoniumchlorid

0,25 g Dialkyldimethylammoniumchlorid

Hiermit wird bestätigt, dass das o.g. Produkt für die prophylaktische Desinfektion in den aufgeführten Anwendungsbereichen in folgenden Konzentrations-Zeit-Relationen als wirksam eingestuft wird:

This is to confirm that the above product was found to be effective for prophylactic disinfection in the application domains listed below at the specified concentration/contact time ratios:

Flächendesinfektion zur Prophylaxe in Krankenhaus und Praxis (Bakterizidie und Levurozidie) Surface disinfection for prophylaxis in hospital and primary healthcare (bactericidal activity and yeasticidal activity)								
Wischen Mechanical action		Organische Belastung Interfering substance		Einwirkzeit in min Contact time in min				
mit/with	ohne/ without	gering/clean conditions	hoch/dirty conditions	5	15	30	60	240
X		X		konz.				

Das Zertifikat ist gültig vom 15.06.2015 bis zum 15.06.2018 (3 Jahre) /
Certificate is valid from 15.06.2015 until 15.06.2018 (3 years)

Der Antragsteller hat sich mit den Bedingungen der zum Zeitpunkt der Antragstellung gültigen Geschäftsordnung der Desinfektionsmittelkommission im VAH einverstanden erklärt und rechtsverbindlich bestätigt, dass das von ihm in Handel gebrachte Präparat in seiner Zusammensetzung identisch mit den für die Erstellung der Gutachten eingereichten Mustern ist. / *The applicant has agreed to the conditions laid down in the rules of the disinfectant commission in the VAH valid at the time of application and has legally binding confirmed that the distributed product is identical with the product used for the activity testing.*

Bonn, den **15.06.2015**
Place/Date

Der Vorsitzende der / *The Chairman of the*
Desinfektionsmittel-Kommission im VAH / *Disinfectant Commission in VAH - Ident.No N15/103*

Desinfektionsmittel-Kommission im VAH, c/o Institut für Hygiene, Sigmund Freud-Str. 25, D-53127 Bonn, www.vah-online.de, info@vah-online.de, Tel. 0228-287 1 4022



**Prüfbericht und Gutachten
für**

Wachendorff-Chemie GmbH

Postfach 3124
D-53831 Troisdorf

**Untersuchungen
zur Wirksamkeit von**

RHEOSEPT WD plus

gegenüber dem

**Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV)
(Surrogat für HCV)**

im
quantitativen Suspensionsversuch

Testmethode nach BGA/DVV (1982)

Dr. Jochen Steinmann
MikroLab GmbH
Norderoog 2
D-28259 Bremen

Phone: +49 (0) 421-27819102
Fax: +49 (0) 421-2760283
E-mail: Mikrolab.GmbH@t-online.de
<http://www.mikrolab-gmbh.de>

10.09.2005



PRÜFBERICHT

1. Laboratorium

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

2. Identifizierung der Probe (Prüfgegenstand)

Projektnummer	S05185
Auftraggeber	Wachendorff-Chemie GmbH
Produktbezeichnung	RHEOSEPT WD plus
Anwendungsbereich	Desinfektion und Reinigung von med. Inventar
Chargennummer	023038
Verfall	06.2007
Aktive Substanz(en) und ihre Konzentration(en) in 100 g	0,26 g Alkyldimethylbenzylammoniumchlorid 0,26 g Alkyldimethylethylbenzylammoniumchlorid 0,26 g Dialkyldimethylammoniumchlorid
Aussehen und Geruch	klare, farblose Flüssigkeit produktspezifisch
pH-Wert(e) (Glaselektrode)	unverdünnt: 6,76 (20°C)
Lagerbedingungen	Raumtemperatur, dunkel (Aufbewahrungsbereich nicht frei zugänglich)
Lieferdatum	21.03.2005

3. Material

3.1 Medium und Reagenzien

- Eagle`s Minimum Essential Medium mit Earle`s BSS (EMEM, Cambrex Bio Science Verviers s.p.r.l., Katalog Nr. 12-125F)
- Fötale Kälberserum (Biochrom AG, Artikel Nr. S 0115)
- Formaldehydlösung (Riedel-de-Häen, Artikel Nr. 33220)
- MicroSpin™ S-400 HR-Säulen (Amersham Biosciences Europe GmbH, Artikel Nr. 27-5140-01)
- Aqua bidest. (Fresenius Kabi Deutschland, Artikel Nr. P2N 1636071)
- PBS (Invitrogen, Artikel Nr. 18912-014)
- BSA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Artikel Nr. CA-2153)



3.2 Virus und Zellen

Das BVDV Stamm NADL (VR-534) stammte von Frau Dr. Stephanie Bendfeldt, Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Vor den Inaktivierungsversuchen wurde das Virus einmal in primären Kälbernierzellen und fünfmal in *KOP-R-Zellen* (Ösopharynxgewebe vom Rind) passagiert.

Die *KOP-R-Zellen* (Passage 42) stammten von der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere auf der Insel Riems (Dr. R. Riebe, Katalog Nr. RIE 244). Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf morphologische Veränderungen und auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht. Morphologische Veränderungen und Mykoplasmen konnten dabei wiederholt nicht nachgewiesen werden.

3.3 Geräte

- Brutschrank (CO₂-Inkubator, Nunc GmbH & Co. KG, Modell QWJ 350)
- Vortex Mischer (Genie Mischer, Typ G 560E)
- pH-Meter 315i (WTW, Artikel Nr. 2A10-100)
- Tischzentrifuge (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Typ 113)
- Umkehrmikroskop (Olympus, Typ CK 30)
- Zentrifuge 5804 R (Eppendorf AG)
- Wasserbad (JULABO, Julabo U 3)

4. Prüfbedingungen

Prüftemperatur	20°C ± 1°C
Produktkonzentration	100,0 %
Einwirkzeiten	1 und 5 Minuten
Eiweißbelastung	0,2 % Serumalbumin (BGA/DVV) 10,0 % fötales Kälberserum (BGA/DVV)
Aufhebung der Desinfektionsmittelwirkung	Gelfiltration
Verdünnungsmittel	Aqua bidest.
Virusstamm	BVDV Stamm NADL
Zeitraum der Prüfung	21.06.2005 – 10.09.2005
Abschluss der Prüfung	10.09.2005



5. Methoden

5.1 Herstellung der Virussuspension

Für die Herstellung der Virussuspension wurden *KOP-R-Zellen*, die mit Eagle's Minimum Essential Medium und 10 % bzw. 2 % fötalem Kälberserum (keine Antikörper gegen BVDV nachweisbar) kultiviert worden sind, in 175 cm² Zellkulturflaschen (Nunc GmbH & Co. KG, Artikel Nr. 156502) mit dem BVDV beimpft. Nach Ausbildung des zytopathogenen Effektes (CPE) (nach ca. 3-4 Tagen) folgte ein Einfrier-/Auftauvorgang. Die Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation bei 3000 UpM und 4°C für zehn Minuten entfernt. Der Überstand wurde als Virussuspension gewonnen, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

5.2 Inaktivierungsversuche und Kontrollansätze

Die Inaktivierungsversuche sind entsprechend der Richtlinie des BGA und der DVV durchgeführt worden. Acht Volumenanteile des Desinfektionsmittels wurden mit einem Volumenanteil Virussuspension und einem Volumenanteil Aqua bidest. vermischt. Bei den Versuchen mit Eiweißbelastung wurde anstelle von Aqua bidest. ein Volumenanteil fötales Kälberserum bzw. ein Volumenanteil einer 2 %igen (w/v) Serumalbumin-Lösung (bovine serum albumin = BSA) zugegeben.

Ein Kontrollansatz des Prüfsystems bestand aus einem Volumenanteil Virussuspension, vier Volumenanteilen PBS und fünf Volumenanteilen einer 1,4 %igen (w/v) Formaldehyd-Lösung. Ferner sind Kontrollansätze für die Bestimmung des Virustiters nach der längsten der geprüften Einwirkzeiten mitgeführt worden.

Alle Versuchsansätze wurden in geschlossenen Plastikröhrchen (Sarstedt AG & Co., Artikel Nr. 55.468.001) in einem Wasserbad bei 20°C ± 1°C durchgeführt. Nach den einzelnen Einwirkzeiten wurden Teilmengen entnommen und die Restinfektiosität der Ansätze bestimmt. Diese Versuche erfolgten unter Einbeziehung von MicroSpin™ S-400 HR-Säulen (siehe 5.5). Unmittelbar nach Ablauf der Expositionszeit sind 100 µL des Ansatzes in eine MicroSpin™ S-400 HR-Säule gegeben worden. Es folgte eine Zentrifugation bei 3.000 UpM für eine Minute in der Tischzentrifuge.

5.3 Bestimmung der Infektiosität

Die Bestimmung der Infektiosität erfolgte mit Hilfe der Endpunkttitration im Mikrotiter-Verfahren. Dabei wurden die Proben nach ihrer Entnahme zunächst in eiskaltem Medium mit dem Faktor 10 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 100 µL der einzelnen Verdünnungen in acht Kavitäten einer sterilen 96 well Mikrotiterplatte (Nunc GmbH & Co. KG, Artikel Nr.



149026) mit präformierten Monolayer aus *KOP-R-Zellen* überführt (pro Kavität ca. $10\text{-}15 \times 10^3$ Zellen) und die Platten bei 37°C im CO_2 -Brutschrank (5 % CO_2 -Gehalt) inkubiert. Nach 10 Tagen erfolgte die Auswertung der Ansätze über die Beurteilung des virusspezifischen CPE in den einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte mit einem inversen Mikroskop. Die Berechnung des Virustiters als mittlere infektiöse Dosis (TCID_{50}) wurde nach der Methode von Spearman und Kärber vorgenommen.

5.4 Bestimmung der Zytotoxizität

Für die Bestimmung der Zytotoxizität des Desinfektionsmittels wurden zwei Volumenanteile PBS mit acht Volumenanteilen des Desinfektionsmittels bzw. der Desinfektionsmittelverdünnung gemischt und nach serieller Verdünnung in die Mikrotiterplatte mit präformiertem Monolayer überführt. Dieser Ansatz wurde ferner, zusätzlich zu der in der Richtlinie vorgesehenen Kontrolle, mit den interferierenden Substanzen vorgenommen.

5.5 Reduktion der Zytotoxizität

Da der BVDV-Titer bei unseren Versuchen $10^{8,0}$ $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ nicht erreichte, sind zur Darstellung eines Titerabfalls von vier \log_{10} -Stufen MicroSpin™ S-400 HR-Säulen eingesetzt worden. Unmittelbar nach Ablauf der Einwirkzeit wurden jeweils 100 μL der Ansätze in eine MicroSpin™ S-400 HR-Säule gegeben, die vorher nach den Angaben des Herstellers präpariert und zusätzlich mit 200 μL einer 0,5 %igen BSA-Lösung gespült worden war.

5.6 Berechnung und Bewertung der virusinaktivierenden Wirksamkeit

Die Beurteilung der virusinaktivierenden Wirksamkeit des zu prüfenden Desinfektionsmittels erfolgte durch Berechnung des Titerabfalls (Subtraktion) gegenüber der jeweils parallel durchgeführten Kontrolltitrationen ohne Desinfektionsmittel (Viruskontrollproben). Die Differenz wird als Reduktionsfaktor (RF) angegeben.

Nach der Richtlinie des BGA und der DVV kann immer dann von einer Virus-Wirksamkeit ausgegangen werden, wenn eine Titerreduktion von ≥ 4 \log_{10} -Stufen (Inaktivierung $\geq 99,99$ %) darstellbar ist.



6. Ergebnisse

6.1 Bestimmung der Zytotoxizität

Parallel zu den Inaktivierungsversuchen wurde die Zytotoxizität des Präparates RHEOSEPT WD plus (100,0 %) und der 0,7 %igen Formaldehyd-Lösung ermittelt.

Die als Kontrolle mitgeführte Formaldehyd-Lösung wirkte toxisch auf die eingesetzten *KOP-R-Zellen* bei der Anwendung einer 0,1%igen Verdünnung (1:1000). Dies bedeutet rechnerisch einen $\log_{10}CD_{50}/mL$ -Wert (in Analogie zum $TCID_{50}$ -Wert) von 4,50 (siehe Tabelle 1).

Demgegenüber ergab sich bei der Überprüfung des Präparates RHEOSEPT WD plus unverdünnt eine $\log_{10}CD_{50}/mL$ von 3,50. Damit ist in der 1:100-Verdünnung eine Zytotoxizität nachgewiesen worden (Tabelle 1).

Nach der Behandlung mit den MicroSpin™ S-400 HR-Säulen reduzierte sich der $\log_{10}CD_{50}/mL$ -Wert für RHEOSEPT WD plus auf $\leq 1,50$ und für die Formaldehyd-Lösung auf 2,50 (siehe Tabelle 1).

Diese Versuche zur Feststellung der Zytotoxizität sind unbedingt erforderlich, um die untere Nachweisbarkeitsschwelle für nicht inaktiviertes BVDV zu determinieren.

6.2 Virusinaktivierende Wirksamkeit der Formaldehyd-Kontrolle

Die als Referenzlösung mitgeführte 0,7 %ige Formaldehyd-Lösung reduzierte den BVDV-Titer nach 5 bzw. 15 Minuten um 1,00 bzw. $\geq 2,37$ \log_{10} -Stufen. Nach 30 und 60 Minuten betrug der RF $\geq 3,25$ (siehe Tabelle 2; Rohdaten siehe Appendix).

6.3 Virusinaktivierende Wirksamkeit des Desinfektionsmittels

Die Untersuchungsergebnisse der Inaktivierungsversuche finden sich in der Tabelle 2. Auf eine graphische Darstellung der Resultate ist aufgrund der fehlenden Kinetik der Virus-Inaktivierung verzichtet worden.

Das RHEOSEPT WD plus wurde unverdünnt bei 20°C eingesetzt. Die Einwirkzeiten betragen 1 und 5 Minuten.

Eine parallel durchgeführte Kontrolle der Virustiter (20°C) vor und nach der Behandlung mit den MicroSpin™ S-400 HR-Säulen ergab bei den hier beschriebenen Versuchen keine bzw. eine geringfügige Reduktion, die unter einer halben \log_{10} -Stufe lag (Virustiter im Ansatz ohne MicroSpin™ S-400 HR-Säule: 5,88; nicht dargestellt).



Das Präparat RHEOSEPT WD plus (100,0 %) wies eine Wirksamkeit gegenüber dem BVDV auf. Bereits nach einer Minute Einwirkzeit war in allen Ansätzen, also auch in Gegenwart der interferierenden Substanzen, kein BVDV mehr zu detektieren. Die Reduktionsfaktoren betragen zu diesem Zeitpunkt $\geq 4,25$ (Ansatz ohne Belastung), $\geq 4,13$ (Ansatz mit Serumalbumin) und $\geq 4,25$ (Ansatz mit FKS). Dies entspricht in allen Fällen einer Inaktivierung von $\geq 99,99$ % und demonstriert damit eine Virus-Wirksamkeit.

Dr. J. Steinmann

Wiss. techn. Leiter der MikroLab GmbH



7. Qualitätssicherung

Eine Qualitätssicherung der Ergebnisse erfolgte u.a. dadurch, dass die Bestimmung der virusinaktivierenden Eigenschaften von Desinfektionsmitteln in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der Guten Laborpraxis (GLP) durchgeführt wurde.

- 1) Chemikaliengesetz der Bundesrepublik Deutschland, Anhang 1, datiert vom 01.08 1994 (BGBl. I, 1994, S. 1703). Anhang zuletzt geändert am 14. Mai 1997 (BGBl. I, 1997, S. 1060).
- 2) OECD Grundsätze der Guten Laborpraxis (überarbeitet 1997); OECD Environmental Health and Safety Publications; Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring – Number 1. Environment Directorate, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris 1998.

Die Plausibilität der Ergebnisse wurde zusätzlich durch die unterschiedlichen Kontrollen gesichert, die in den Inaktivierungsansätzen mitgeführt wurden (siehe 5.2).

8. Archivierung

Ein Original des Prüfberichtes und alle Protokolle der Schriftwechsel wurden im Archiv der MikroLab GmbH archiviert.

Gemäß DIN EN ISO/IEC 17025:2005 übernimmt die MikroLab GmbH keine inhaltliche Verantwortung für eine eventuell sinnentstellende Darstellung der Prüfmethode und Prüfergebnisse aufgrund von auszugsweiser Wiedergabe des vorliegenden Prüfberichtes.

DR. JOCHEN STEINMANN
Wiss. techn. Leiter der
MikroLab GmbH

Norderoog 2
D-28259 Bremen

Tel.: +49 (421) 27819102
Fax: +49 (421) 2760283
<http://www.mikrolab-gmbh.de>
E-Mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

10.09.2005
Dr. St/BB

Wachendorff-Chemie GmbH
Postfach 3124

D-53831 Troisdorf

BVDV-Wirksamkeit von RHEOSEPT WD plus im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C

GUTACHTEN

Das Flächendesinfektionsmittel RHEOSEPT WD plus der Wachendorff-Chemie GmbH wurde gemäß Auftrag auf seine virusinaktivierenden Eigenschaften gegenüber dem BVDV Stamm NADL in enger Anlehnung an die Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes (BGA, jetzt Robert Koch-Institut) und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) untersucht.

Das Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) diente dabei als Surrogatvirus für das Hepatitis C Virus (HCV), da dieses nicht im Tiermodell oder einem Zellkultursystem zur Vermehrung gebracht werden kann. Durch die Testung dieses Surrogatvirus wird die Möglichkeit geschaffen, Aussagen zu Anwendungsempfehlungen für das zu prüfende Präparat bezüglich der Inaktivierung des HCV zu machen.

In der Richtlinie des BGA und der DVV wird dann von einer Virus-Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels ausgegangen, wenn nach einer bestimmten Einwirkzeit eine Reduktion des initialen Virustiters um $\geq 4 \log_{10}$ -Stufen (Inaktivierung $\geq 99,99\%$) erfolgt ist.

Das Flächendesinfektionsmittel RHEOSEPT WD plus wurde unverdünnt bei 20°C untersucht. Die Einwirkzeiten betragen zwischen ein und fünf Minuten. Nach einer Minute war eine Reduktion des Virustiters in allen Ansätzen um \geq vier \log_{10} -Stufen nachweisbar. Nach diesen Ergebnissen des quantitativen Suspensionsversuchs kann in Ermangelung praxisnaher Prüfrichtlinien empfohlen werden, das Flächendesinfektionsmittel RHEOSEPT WD plus zur BVDV-Inaktivierung (Surrogat für HCV) wie folgt einzusetzen:


Dr. J. Steinmann

unverdünnt

1 Minute

DR. JOCHEN STEINMANN
Wiss. techn. Leiter der
MikroLab GmbH

Norderoog 2
D-28259 Bremen

phone: +49 (421) 27819102
fax: +49 (421) 2760283
<http://www.mikrolab-gmbh.de>
E-Mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

2005-09-10
Dr. St/BB

Wachendorff-Chemie GmbH
Postfach 3124

D-53831 Troisdorf

BVDV efficacy of RHEOSEPT WD plus in a quantitative suspension test at 20°C

EXPERT OPINION

The virus-inactivating properties of the surface disinfectant RHEOSEPT WD plus of Wachendorff-Chemie GmbH against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) strain NADL were investigated by a quantitative suspension test according to the guideline of the Bundesgesundheitsamt (BGA, Federal Office of Health, now Robert Koch-Institute) and the Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (German Association for the Control of Virus Diseases).

BVDV was chosen as a surrogate of hepatitis C virus (HCV) since there is no animal model or cell culture system for growing this virus. Testing this surrogate virus the possibility is created to give recommendations for the inactivation of HCV by the disinfectant.

According to this suspension test, a disinfectant or a disinfectant solution at a particular concentration is considered as having virus-inactivating properties if within the recommended exposure period the titre is reduced by $\geq 4 \log_{10}$ (inactivation $\geq 99,99 \%$).

RHEOSEPT WD plus was examined undiluted at 20°C. The exposure times were 1 and 5 minutes. After an exposure time of one minute virus reduction exceeded 4 \log_{10} -steps in all assays. Due to the lack of guidelines simulating practical conditions, results of the quantitative suspension test lead to the recommendation to use the surface disinfectant RHEOSEPT WD plus for inactivation of BVDV (surrogate of HCV) as follows:

undiluted 1 min


Dr. J. Steinmann

Literatur

1. Richtlinien des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren.
Bundesgesundheitsblatt 25, 1982, 397-398
2. Kommentar zur Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren.
Bundesgesundheitsblatt 26, 1983, 413-414
3. EN 14476:2005: Chemical disinfectants and antiseptics – virucidal quantitative suspension test - Test method and requirements (phase 2, step 1)
4. Spearman, C.: The method of 'right or wrong cases' (constant stimuli) without Gauss's formulae.
Brit J Psychol 1908; 2: 227-242
5. Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch Exp Path Pharmac 1931; 162: 480-487

Tabelle 1: Zytotoxizität von RHEOSEPT WD plus und der 0,7%igen Formaldehyd-Lösung vor und nach Behandlung mit MicroSpin™ S-400 HR-Säulen.

vor Behandlung	Konz.	Belastung	Verdünnungsstufen				
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Prüfpräparat	100,0%	Aqua bidest.	+	+	-	-	-
Prüfpräparat	100,0%	0,2% BSA	+	+	-	-	-
Prüfpräparat	100,0%	10,0% FKS	+	+	-	-	-
Formaldehyd	0,7%	PBS	+	+	+	-	-
nach Behandlung	Konz.	Belastung	Verdünnungsstufen				
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Prüfpräparat	100,0%	Aqua bidest.	-	-	-	-	-
Prüfpräparat	100,0%	0,2% BSA	-	-	-	-	-
Prüfpräparat	100,0%	10,0% FKS	-	-	-	-	-
Formaldehyd	0,7%	PBS	+	-	-	-	-

Tabelle 2: Inaktivierung des BVDV durch RHEOSEPT WD plus und Formaldehyd (0,7%) im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C.

Produkt	Konz.	Belastung	log ₁₀ TCID ₅₀ /mL nach				≥ 4 log ₁₀ Reduktion nach
			1 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	
Prüfpräparat	100,0%	Aqua bidest.	≤ 1,50	≤ 1,50	n.d.	n.d.	1 Min.
Prüfpräparat	100,0%	0,2% BSA	≤ 1,50	≤ 1,50	n.d.	n.d.	1 Min.
Prüfpräparat	100,0%	10,0% FKS	≤ 1,50	≤ 1,50	n.d.	n.d.	1 Min.
Kontrollen	Konz.	Belastung	log ₁₀ TCID ₅₀ /mL nach				≥ 4 log ₁₀ Reduktion nach
			5 Min.	15 Min.	30 Min.	60 Min.	
Formaldehyd	0,7%	PBS	4,75	≤ 3,38	≤ 2,50	≤ 2,50	≥ 30 Min.
Virus-Kontrollprobe	n.a.	Aqua bidest.	n.d.	n.d.	n.d.	5,75	n.a.
Virus-Kontrollprobe	n.a.	0,2% BSA	n.d.	n.d.	n.d.	5,63	n.a.
Virus-Kontrollprobe	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	5,75	n.a.

n.d. = nicht durchgeführt

n.a. = nicht anwendbar

**Prüfbericht und Gutachten
für**

Wachendorff Chemie GmbH

Postfach 3124
53831 Troisdorf

**Untersuchungen
zur Wirksamkeit von**

RHEOSEPT WD plus

gegenüber dem

Vakziniavirus

im

quantitativen Suspensionsversuch

Testmethode nach BGA/DVV (1982)

Dr. Jochen Steinmann

MikroLab GmbH
Norderoog 2
D-28259 Bremen

Phone: +49 (0) 421-27819102

Fax: +49 (0) 421-2760283

E-mail: Mikrolab.GmbH@t-online.de

<http://www.mikrolab-gmbh.de>

25.08.2005



PRÜFBERICHT

1. Laboratorium

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

2. Identifizierung der Probe (Prüfgegenstand)

Projektnummer	S05185
Auftraggeber	Wachendorff GmbH
Produktbezeichnung	RHEOSEPT WD plus
Anwendungsbereich	Desinfektion und Reinigung von med. Inventar
Chargennummer	023038
Verfall	06.2007
Aktive Substanz(en) und ihre Konzentration(en) in 100 g	0,26 g Alkyldimethylbenzylammoniumchlorid 0,26 g Alkyldimethylethylbenzylammoniumchlorid 0,26 g Dialkyldimethylammoniumchlorid
Aussehen und Geruch	klare, farblose Flüssigkeit produktspezifisch
pH-Wert(e) (Glaselektrode)	unverdünnt: 6,76 (20°C)
Lagerbedingungen	Raumtemperatur, dunkel (Aufbewahrungsbereich nicht frei zugänglich)
Lieferdatum	21.03.2005

3. Material

3.1 Medium und Reagenzien

- Eagle`s Minimum Essential Medium mit Earle`s BSS (EMEM, Cambrex Bio Science Verviers s.p.r.l., Katalog Nr. 12-125F)
- Fötale Kälberserum (Biochrom AG, Artikel Nr. S 0115)
- Formaldehydlösung (Riedel-de-Häen, Artikel Nr. 33220)
- Aqua bidest. (Fresenius Kabi Deutschland, Artikel Nr. P2N 1636071)
- PBS (Invitrogen, Artikel Nr. 18912-014)
- BSA (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Artikel Nr. CA-2153)



3.2 Virus und Zellen

Das Vakziniavirus Stamm Elstree stammte vom Institut für Medizinische Virologie und Immunologie der Universität Essen. Vor den Inaktivierungsversuchen wurde das Virus zehnmal in *GMK AH-1 Zellen* (Green Monkey Kidney, permanente Affennieren-Zelllinie), dreimal in *HeLa-Zellen* (menschliches Zervix-Karzinom) und fünfmal in *Vero-Zellen* (Affennieren-Zelllinie) passagiert.

Die *Vero-Zellen* (Passage 45) stammten von der Firma Vircell, S.L. aus Spanien, 18320 Santa Fe (jetzt BIOTRIN International GmbH, 69126 Heidelberg). Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf morphologische Veränderungen und auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht. Morphologische Veränderungen und Mykoplasmen konnten dabei wiederholt nicht nachgewiesen werden.

3.3 Geräte

- Brutschrank (CO₂-Inkubator, Nunc GmbH & Co. KG, Modell QWJ 350)
- Vortex Mischer (Genie Mischer, Typ G 560E)
- pH-Meter 315i (WTW, Artikel Nr. 2A10-100)
- Tischzentrifuge (Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Typ 113)
- Umkehrmikroskop (Olympus, Typ CK 30)
- Zentrifuge 5804 R (Eppendorf AG)
- Wasserbad (JULABO, Julabo U 3)

4. Prüfbedingungen

Prüftemperatur	20°C ± 1°C
Produktkonzentration	100,0 %
Einwirkzeiten	1, 5, 15, 30 und 60 Minuten
Eiweißbelastung	0,2 % Serumalbumin (BGA/DVV) 10,0 % fötales Kälberserum (BGA/DVV)
Aufhebung der Desinfektionsmittelwirkung	unmittelbare Verdünnung
Verdünnungsmittel	Aqua bidest.
Virusstamm	Vakziniavirus Stamm Elstree
Zeitraum der Prüfung	18.04.2005 – 25.08.2005
Abschluss der Prüfung	25.08.2005



5. Methoden

5.1 Herstellung der Virussuspension

Für die Herstellung der Virussuspension wurden *Vero-Zellen*, die mit Eagle's Minimum Essential Medium und 10 % bzw. 2 % fötalem Kälberserum kultiviert worden sind, in 175 cm² Zellkulturflaschen (Nunc GmbH & Co. KG, Artikel Nr. 156502) mit dem Vacciniavirus beimpft. Nach Ausbildung des zytopathogenen Effektes (CPE) (nach ca. 2 Tagen) folgte die Virusernte über das Zellpack-Verfahren. Dafür wurden die Zellen zunächst mit einem Zellschaber (Nunc GmbH & Co. KG, Artikel Nr. 179693) vom Kulturboden gelöst und durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000 UpM (RT) sedimentiert. Das Sediment wurde in 2 mL Überstand resuspendiert und eingefroren. Nach insgesamt drei Einfrier-/Auftauvorgängen und einer Behandlung der Suspension für dreimal 30 sec mit Ultraschall (40 % Leistung) ist eine weitere Zentrifugation bei 3000 UpM und 4°C für zehn Minuten durchgeführt worden, um den Zelldetritus zu entfernen. Der Überstand wurde schließlich als Virussuspension gewonnen, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Unmittelbar vor den Inaktivierungsversuchen wurde die Virussuspension erneut für eine Minute bei 10.000 UpM (RT) in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um letzte Zelltrümmer zu entfernen.

5.2 Inaktivierungsversuche und Kontrollansätze

Die Inaktivierungsversuche sind entsprechend der Richtlinie des BGA und der DVV durchgeführt worden. Acht Volumenanteile des Desinfektionsmittels wurden mit einem Volumenanteil Virussuspension und einem Volumenanteil Aqua bidest. vermischt. Bei den Versuchen mit Eiweißbelastung wurde anstelle von Aqua bidest. ein Volumenanteil fötales Kälberserum bzw. ein Volumenanteil einer 2 %igen (w/v) Serumalbumin-Lösung (bovine serum albumin = BSA) zugegeben.

Ein Kontrollansatz des Prüfsystems bestand aus einem Volumenanteil Virussuspension, vier Volumenanteilen PBS und fünf Volumenanteilen einer 1,4 %igen (w/v) Formaldehyd-Lösung. Ferner sind Kontrollansätze für die Bestimmung des Virustiters nach der längsten der geprüften Einwirkzeiten mitgeführt worden.

Alle Versuchsansätze wurden in geschlossenen Plastikröhrchen (Sarstedt AG & Co., Artikel Nr. 55.468.001) in einem Wasserbad bei 20°C ± 1°C durchgeführt. Nach den einzelnen Einwirkzeiten wurden Teilmengen entnommen und die Restinfektiosität der Ansätze bestimmt.



5.3 Bestimmung der Infektiosität

Die Bestimmung der Infektiosität erfolgte mit Hilfe der Endpunkttitration im Mikrotiter-Verfahren. Dabei wurden die Proben nach ihrer Entnahme zunächst in eiskaltem Medium mit dem Faktor 10 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 100 µL der einzelnen Verdünnungen in acht Kavitäten einer sterilen 96 well Mikrotiterplatte (Nunc GmbH & Co. KG, Artikel Nr. 149026) mit vorab vorgelegten *Vero-Zellen* überführt (pro Kavität ca. 10-15 x 10³ Zellen) und die Platten bei 37°C im CO₂-Brutschrank (5 % CO₂-Gehalt) inkubiert. Nach 10 Tagen erfolgte die Auswertung der Ansätze über die Beurteilung des viruspezifischen CPE in den einzelnen Kavitäten der Mikrotiterplatte mit einem inversen Mikroskop. Die Berechnung des Virustiters als mittlere infektiöse Dosis (TCID₅₀) wurde nach der Methode von Spearman und Kärber vorgenommen.

5.4 Bestimmung der Zytotoxizität

Für die Bestimmung der Zytotoxizität des Desinfektionsmittels wurden zwei Volumenanteile PBS mit acht Volumenanteilen des Desinfektionsmittels bzw. der Desinfektionsmittelverdünnung gemischt und nach serieller Verdünnung in die Mikrotiterplatte überführt. Dieser Ansatz wurde ferner, zusätzlich zu der in der Richtlinie vorgesehenen Kontrolle, mit den interferierenden Substanzen vorgenommen. Anschließend erfolgte die Zugabe der Zellsuspension.

5.5 Berechnung und Bewertung der virusinaktivierenden Wirksamkeit

Die Beurteilung der virusinaktivierenden Wirksamkeit des zu prüfenden Desinfektionsmittels erfolgte durch Berechnung des Titerabfalls (Subtraktion) gegenüber der jeweils parallel durchgeführten Kontrolltitrationen ohne Desinfektionsmittel (Viruskontrollproben). Die Differenz wurde als Reduktionsfaktor (RF) angegeben.

Nach der Richtlinie des BGA und der DVV kann immer dann von einer Virus-Wirksamkeit ausgegangen werden, wenn eine Titerreduktion von $\geq 4 \log_{10}$ -Stufen (Inaktivierung $\geq 99,99$ %) darstellbar ist.

6. Ergebnisse

6.1 Bestimmung der Zytotoxizität

Parallel zu den Inaktivierungsversuchen wurde die Zytotoxizität des Flächendesinfektionsmittels RHEOSEPT WD plus (100,0 %) und der 0,7 %igen Formaldehyd-Lösung ermittelt.



Die als Kontrolle mitgeführte Formaldehyd-Lösung wirkte toxisch auf die eingesetzten Vero-Zellen bei der Anwendung einer 0,1%igen Verdünnung (1:1000). Dies bedeutet rechnerisch einen $\log_{10}CD_{50}/mL$ -Wert (in Analogie zum $TCID_{50}$ -Wert) von 4,50 (siehe Tabellen 1 bis 3).

Demgegenüber ergab sich bei der Überprüfung des Flächendesinfektionsmittels RHEOSEPT WD plus eine $\log_{10}CD_{50}/mL$ von 3,50. Damit ist in der 1:100-Verdünnung eine Zytotoxizität nachgewiesen worden.

Diese Versuche zur Feststellung der Zytotoxizität sind unbedingt erforderlich, um die untere Nachweisbarkeitsschwelle für nicht inaktiviertes Vakziniavirus zu determinieren.

6.2 Virusinaktivierende Wirksamkeit der Formaldehyd-Kontrolle

Die als Referenzlösung mitgeführte 0,7 %ige Formaldehyd-Lösung reduzierte den Vakziniavirus-Titer nach 5 bzw. 15 Minuten um $\geq 2,75$ bzw. $\geq 3,38 \log_{10}$ -Stufen. Nach 30 und 60 Minuten betrug der RF ebenfalls $\geq 3,38$ (siehe Tabelle 2; Rohdaten siehe Appendix).

6.3 Virusinaktivierende Wirksamkeit des Desinfektionsmittels

Die Untersuchungsergebnisse der Inaktivierungsversuche finden sich in den Tabelle (Rohdaten siehe Appendix).

Das Flächendesinfektionsmittel RHEOSEPT WD plus wurde unverdünnt bei 20°C eingesetzt. Die Einwirkzeiten betragen 1 und 5 Minuten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in der Tabelle 2 dargestellt. Bereits nach einer Minute Einwirkzeit waren Reduktionsfaktoren von $\geq 4,38$ (Ansatz ohne Belastung), $\geq 4,25$ (Ansatz mit BSA) und $\geq 4,38$ (Ansatz mit FKS) nachweisbar.

Alle genannten Reduktionsfaktoren entsprechen einer Inaktivierung von $\geq 99,99$ % und demonstrieren damit eine Virus-Wirksamkeit.



Dr. J. Steinmann

Wiss. techn. Leiter der MikroLab GmbH



7. Qualitätssicherung

Eine Qualitätssicherung der Ergebnisse erfolgte u.a. dadurch, dass die Bestimmung der virusinaktivierenden Eigenschaften von Desinfektionsmitteln in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der Guten Laborpraxis (GLP) durchgeführt wurde.

- 1) Chemikaliengesetz der Bundesrepublik Deutschland, Anhang 1, datiert vom 01.08 1994 (BGBl. I, 1994, S. 1703). Anhang zuletzt geändert am 14. Mai 1997 (BGBl. I, 1997, S. 1060).
- 2) OECD Grundsätze der Guten Laborpraxis (überarbeitet 1997); OECD Environmental Health and Safety Publications; Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring – Number 1. Environment Directorate, Organization for Economic Co-operation and Development, Paris 1998.

Die Plausibilität der Ergebnisse wurde zusätzlich durch die unterschiedlichen Kontrollen gesichert, die in den Inaktivierungsansätzen mitgeführt wurden (siehe 5.2).

8. Archivierung

Ein Original des Prüfberichtes und alle Protokolle der Schriftwechsel wurden im Archiv der MikroLab GmbH archiviert.

Gemäß DIN EN ISO/IEC 17025:2005 übernimmt die MikroLab GmbH keine inhaltliche Verantwortung für eine eventuell sinnentstellende Darstellung der Prüfmethode und Prüfergebnisse aufgrund von auszugsweiser Wiedergabe des vorliegenden Prüfberichtes.

Tabelle 1: Zytotoxizität von RHEOSEPT WD plus und der 0,7%igen Formaldehyd-Lösung vor und nach Behandlung mit MicroSpin™ S-400 HR-Säulen.

vor Behandlung	Konz.	Belastung	Verdünnungsstufen				
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Prüfpräparat	100,0%	ohne	+	+	-	-	-
Prüfpräparat	100,0%	0,2% BSA	+	+	-	-	-
Prüfpräparat	100,0%	10,0% FKS	+	+	-	-	-
Formaldehyd	0,7%	ohne	+	+	+	-	-
nach Behandlung	Konz.	Belastung	Verdünnungsstufen				
			10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Prüfpräparat	100,0%	ohne	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prüfpräparat	100,0%	0,2% BSA	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prüfpräparat	100,0%	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Formaldehyd	0,7%	ohne	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 2: Inaktivierung des Vakziniavirus durch RHEOSEPT WD plus und Formaldehyd (0,7%) im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C.

Produkt	Konz.	Belastung	log ₁₀ TCID ₅₀ /mL nach				≥ 4 log ₁₀ Reduktion nach
			1 Min.	5 Min.	10 Min.	15 Min.	
Prüfpräparat	100,0%	ohne	≤ 3,50	≤ 3,50	n.d.	n.d.	1 Min.
Prüfpräparat	100,0%	0,2% BSA	≤ 3,50	≤ 3,50	n.d.	n.d.	1 Min.
Prüfpräparat	100,0%	10,0% FKS	≤ 3,50	≤ 3,50	n.d.	n.d.	1 Min.
Kontrollen	Konz.	Belastung	log ₁₀ TCID ₅₀ /mL nach				≥ 4 log ₁₀ Reduktion nach
			5 Min.	15 Min.	30 Min.	60 Min.	
Formaldehyd	0,7%	ohne	≤ 5,13	≤ 4,50	≤ 4,50	≤ 4,50	≥ 15 Min.
Virus-Kontrollprobe	n.a.	ohne	n.d.	n.d.	n.d.	7,88	n.a.
Virus-Kontrollprobe	n.a.	0,2% BSA	n.d.	n.d.	n.d.	7,75	n.a.
Virus-Kontrollprobe	n.a.	10,0% FKS	n.d.	n.d.	n.d.	7,88	n.a.

n.d. = nicht durchgeführt

n.a. = nicht anwendbar

DR. JOCHEN STEINMANN
Wiss. techn. Leiter der
MikroLab GmbH

Norderoog 2
D-28259 Bremen

Tel.: +49 (421) 27819102
Fax: +49 (421) 2760283
<http://www.mikrolab-gmbh.de>
E-Mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

25.08.2005
Dr. St/BB

Wachendorff-Chemie GmbH
Postfach 3124

D-53831 Troisdorf

Vakziniavirus-Wirksamkeit von RHEOSEPT WD plus im quantitativen Suspensionsversuch bei 20°C

GUTACHTEN

Das Flächendesinfektionsmittel RHEOSEPT WD plus der Wachendorff-Chemie GmbH wurde gemäß Auftrag auf seine virusinaktivierenden Eigenschaften gegenüber dem Vakziniavirus Stamm Elstree nach der Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes (BGA, jetzt Robert Koch-Institut) und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (DVV) untersucht.

In der Richtlinie des BGA und der DVV wird dann von einer Virus-Wirksamkeit eines Desinfektionsmittels ausgegangen, wenn nach einer bestimmten Einwirkzeit eine Reduktion des initialen Virustiters um $\geq 4 \log_{10}$ -Stufen (Inaktivierung $\geq 99,99\%$) erfolgt ist.

Das Flächendesinfektionsmittel RHEOSEPT WD plus wurde als unverdünnt bei 20°C untersucht. Die Einwirkzeiten betragen eine und fünf Minuten. Nach einer Minute war eine Reduktion des Virustiters in allen Ansätzen um vier \log_{10} -Stufen nachweisbar. Nach diesen Ergebnissen des quantitativen Suspensionsversuchs kann in Ermangelung praxisnaher Prüfrichtlinien empfohlen werden, das Flächendesinfektionsmittel RHEOSEPT WD plus zur Vakziniavirus-Inaktivierung wie folgt einzusetzen:

unverdünnt

1 Minute


Dr. J. Steinmann

DR. JOCHEN STEINMANN
Wiss. techn. Leiter der
MikroLab GmbH

Norderoog 2
D-28259 Bremen

phone: +49 (421) 27819102
fax: +49 (421) 2760283
<http://www.mikrolab-gmbh.de>
E-Mail: MikroLab.GmbH@t-online.de

MikroLab GmbH, Norderoog 2, D-28259 Bremen

2005-08-25
Dr. St/BB

Wachendorff-Chemie GmbH
Postfach 3124

D-53831 Troisdorf

Vaccinia virus efficacy of RHEOSEPT WD plus in a quantitative suspension test at 20°C

EXPERT OPINION

The virus-inactivating properties of the surface disinfectant RHEOSEPT WD plus of Wachendorff-Chemie GmbH against vaccinia virus strain Elstree were investigated by a quantitative suspension test according to the guideline of the Bundesgesundheitsamt (BGA, Federal Office of Health, now Robert Koch-Institute) and the Deutsche Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. (German Association for the Control of Virus Diseases).

According to this suspension test, a disinfectant or a disinfectant solution at a particular concentration is considered as having virus-inactivating properties if within the recommended exposure period the titre is reduced by $\geq 4 \log_{10}$ (inactivation $\geq 99.99\%$).

RHEOSEPT WD plus was examined undiluted at 20°C. Exposure times were 1 and 5 minutes. After an exposure time of one minute virus reduction exceeded $4 \log_{10}$ -steps in all assays. Due to the lack of guidelines simulating practical conditions, results of the quantitative suspension test lead to the recommendation to use the surface disinfectant RHEOSEPT WD plus for inactivation of vaccinia virus as follows:

undiluted 1 minute


Dr. J. Steinmann

Literatur

1. Richtlinien des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren.
Bundesgesundheitsblatt 25, 1982, 397-398
2. Kommentar zur Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren.
Bundesgesundheitsblatt 26, 1983, 413-414
3. prEN 14476:2004: Chemical disinfectants and antiseptics – virucidal quantitative suspension test - Test method and requirements (phase 2, step 1)
4. Spearman, C.: The method of 'right or wrong cases' (constant stimuli) without Gauss's formulae.
Brit J Psychol 1908; 2: 227-242
5. Kärber, G.: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch Exp Path Pharmac 1931; 162: 480-487

18.12.2019

Prof.We

Wachendorff-Chemie GmbH

Langbaughstr. 15

53842 Troisdorf

Deutschland

[H.-P. WERNER | C/O HYGCEN AUSTRIA GMBH | WERKSGELÄNDE 28 | 5500 BISCHOFSHOFEN]

RHEOSEPT-WD plus

Flächendesinfektion mit Mechanik (4-Felder-Test) in Kombination mit einem standardisierten Tuchmaterial

Bakterizide und levuroziden Wirksamkeit

Niedrige Belastung

GUTACHTEN

Nach Prüfung der Eignung von **RHEOSEPT-WD plus** in Kombination mit dem Referenz Tuch für die Flächendesinfektion mit Mechanik entsprechend den „Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren“ (Stand: 15.03.2019), gebe ich die folgende Beurteilung der Ergebnisse in den Prüfberichten B 23316 (qualitative Suspensionsversuche) vom 18.12.2019, B 23316a (prEN 13624:2019) vom 18.12.2019, B 23316b (EN 13727:2015) vom 18.12.2019, B 23316c (EN 16615:2015) vom 18.12.2019 sowie B 23316d (EN 16615:2015, 3. DG) vom 18.12.2019:

Ergebnisse der in vitro- Tests

Aufgrund der Resultate des qualitativen Suspensionstests waren die Ergebnisse mit den 4 Testkeimen in den nachfolgenden quantitativen Suspensionsversuchen aussagekräftig.

Die quantitativen Suspensionstests wurden mit **niedriger Belastung**, mittels Plattengussverfahren für den Keimnachweis durchgeführt.

RHEOSEPT-WD plus verursachte ausreichende Reduktionen (5 log. Einheiten der Testkeime *S. aureus*, *E. hirae* und *P. aeruginosa* bzw. 4 log. Einheiten von *C. albicans*)

unter **niedriger Belastung**

in 80%, 50% und 10% binnen 1, 5 und 10 Minuten.

Ergebnisse unter praxisnahen Bedingungen

Die Wirksamkeit des Desinfektionsmittels **RHEOSEPT-WD plus** mit dem Referenz Tuch wurde nach EN 16615 unter **niedriger Belastung** gegenüber allen 4 Testkeimen geprüft.

Unter **niedriger Belastung** erwiesen sich

100% binnen 1 und 5 Minuten

als ausreichend wirksam gegenüber den Testkeimen *S. aureus*, *E. hirae*, *P. aeruginosa* und *C. albicans*.

Anwendungsempfehlungen für RHEOSEPT-WD plus zur Flächendesinfektion mit Mechanik

RHEOSEPT-WD plus erfüllt nach den vorliegenden Resultaten die

„Anforderungen für die Zertifizierung von chemischen Desinfektionsverfahren“
durch die Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

bei folgender Anwendung:

unter **niedriger Belastung**

als Konzentrat binnen 1 und 5 Minuten.


Prof. Dr. med. H.-P. Werner

Dermatest[®] GmbH, Postfach 2165, D - 48008 Münster

Wachendorff-Chemie GmbH
Langbaorghstr. 15

D-53842 TROISDORF

date: Münster, 21.05.2010

Z E R T I F I K A T

über das Kosmetik – Produkt

RHEOSEPT-WD plus


Dermatologische Prüfungen am Menschen 2010

**Die von mir unter fachärztlicher Kontrolle durchgeführten
dermatologischen Prüfungen Ihres o.g. Produktes
bestand das Produkt mit**

„sehr gut“

**Bei dem genannten Präparat traten im
Epikutantest nach internationalen Richtlinien k e i n e
toxisch- irritativen Unverträglichkeitsreaktionen auf.**

**Das Präparat kann deshalb mit
dermatologisch getestet deklariert werden.**


Dr. med. Werner Voss
Facharzt für Dermatologie
Venerologie, Allergologie,
Phlebologie und Umweltmedizin



Dermatest[®] GmbH, Postfach 2165, D - 48008 Münster

Wachendorff-Chemie GmbH
Langbaurghstr. 15

D-53842 TROISDORF

Muenster, 21.05.2010

date:

C E R T I F I C A T E

for the Cosmetic-Product

RHEOSEPT-WD plus

Dermatological test on humans in 2010

**The dermatological test performed by us
on your product under the control of dermatological specialists was passed
for this product with the rating of**

“very good”.

**This product did not lead to toxic- irritative intolerance reactions in patch
testing carried out in accordance with international guidelines. The
preparation can therefore be declared as dermatologically tested.**

Dr. med. Werner Voss
Investigating specialist
for dermatology, allergology,
venerology, phlebology
and environmental medicine



2019-12-18

Prof.We

Wachendorff-Chemie GmbH

Langbaughstr. 15

53842 Troisdorf

Deutschland

[H.-P. WERNER | C/O HYGCEN AUSTRIA GMBH | WERKSGELÄNDE 28 | 5500 BISCHOFSHOFEN]

RHEOSEPT-WD plus

Surface disinfection with mechanical action (4-field-test) in combination with standardized wipe material

Bactericidal and yeasticidal activity

clean and dirty conditions

EXPERTISE

Having tested the disinfectant **RHEOSEPT-WD plus** in combination with reference wipes for surface disinfection with mechanical action according to, "Requirements and methods for VAH¹- certification chemical disinfection methods" (Status: 15.03.2019), I hereby issue the following evaluation of the results from the test reports B 23316 (qualitative suspension tests) of 2019-12-18, B 23316a (prEN 13624:2019) of 2019-12-18, B 23316b (EN 13727:2015) of 2019-12-18, B 23316c (EN 16615:2015) of 2019-12-18 as well as B 23316d (EN 16615:2015, 3rd test run) of 2019-12-18:

Results of the in vitro-test

On the basis of the results of the qualitative suspension tests the results obtained with the 4 test germs in the following quantitative suspension tests were evaluable.

The quantitative suspension tests were carried out in pour plate method for germ detections under **clean conditions**.

¹ VAH = Verbund für Angewandte Hygiene

RHEOSEPT-WD plus results in sufficient reductions (5 lg. units of test bacteria *S. aureus*, *E. hirae* and *P. aeruginosa* or 4 lg units of *C. albicans*

under **clean conditions**

in 80%, 50% and 10% within 1, 5 and 10 minutes.

Results obtained in tests simulating practical conditions

The efficacy of the disinfectant **RHEOSEPT-WD plus** in combination with reference wipe was tested under **clean conditions** according to EN 16615 against all 4 test strains.

Under **clean conditions** the product showed

100% within 1 and 5 minutes

sufficient efficacy against the test germs *S. aureus*, *E. hirae*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*.

Application recommendations for RHEOSEPT-WD plus for surface disinfection with mechanical action

According to the results obtained, **RHEOSEPT-WD plus** complies with the

„Requirements for certification of chemical disinfection procedures“
by the commission of disinfectants in the VAH¹

at the following application:

under **clean conditions**

as concentrate within 1 and 5 minutes.

Prof. Dr. med. H.-P. Werner

¹ VAH = Verbund für Angewandte Hygiene

Wachendorff-Chemie GmbH
Langbaorghstraße 15
53831 Troisdorf
DEUTSCHLAND

c/o
HygCen Austria GmbH
Werksgelände 2B
Techno-Z / Bauteil 3
5500 Bischofshofen

Phone: +43 (0) 6462 5319
Fax: +43 (0) 6462 3275 3
Email: info@hygcn.at
Web: www.hygcn.at

16.11.2018

Prof.We

RHEOSEPT-Händedesinfektion

Hygienic handrub

EXPERTISE

Having tested **RHEOSEPT-Händedesinfektion** for hygienic handrub according to EN 1500 (Status: 2013) and in the in vitro-tests according to the "Standard methods of the DGHM" for testing of chemical disinfection methods" (Status: 2001-09-01) and the "Requirements and methods to VAH¹) – certified chemical disinfection methods" (Status: 2015) I hereby issue the following evaluation of the test results from the test reports B 14930 of 2008-03-07 and B 14930 + B 21529 of 2018-11-16:

Results of the in vitro-test

In the quantitative suspension tests the disinfectant **RHEOSEPT-Händedesinfektion** showed in the 80% concentration within 15 seconds a bactericidal and yeasticidal efficacy on the test germs *S. aureus*, *E. hirae*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*.

Results obtained under practical conditions

The test procedure, according to **EN 1500** hygienic handrub – phase 2 / step 2 –with **RHEOSEPT-Händedesinfektion** was non-inferior to the reference procedure.

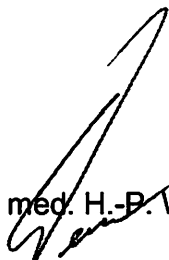
All acceptance criteria required in EN 1500 were fulfilled this also includes the results of the neutralization and method validation.

According to the results obtained, the product is suitable for hygienic handrub with the following application recommendation:

Application recommendation for RHEOSEPT-Händedesinfektion for hygienic handrub according to EN 1500:

**3 ml RHEOSEPT-Händedesinfektion
rubbed on hands during 30seconds.**

Prof. Dr. med. H.-P. Werner



¹⁾VAH = Verbund für Angewandte Hygiene

^{*)} DGHM = German society for Hygiene and Microbiology.



Verband für Angewandte Hygiene e.V.
Desinfektionsmittel-Kommission

VAH, c/o Hygiene-Institut, Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn

Wachendorff-Chemie GmbH
z. Hd. Herrn Wachendorff
Langbaurghstr. 15
53842 Troisdorf

VAH e.V.
Desinfektionsmittel-Kommission
c/o Institut für Hygiene und Öffentliche
Gesundheit der Universität Bonn
Venusberg-Campus 1
Gebäude 64
53127 Bonn
Tel: 0228 287-14022
Fax: 0228 287-19522
Email: info@vah-online.de
www.vah-online.de

Bonn, den 16.07.2019

Präparat: RHEOSEPT-Händedesinfektion
Aktenzeichen: N18/486
Sparte: Händedesinfektion

Zertifizierung und Aufnahme in die nächste Desinfektionsmittel-Liste

Sehr geehrter Herr Wachendorff,
hiermit übersenden wir Ihnen das Zertifikat für das o. a. Präparat, das in die nächste Desinfektionsmittel-Liste in der Rubrik **Händedesinfektion** aufgenommen wird.
Die Angaben in der nächsten VAH-Liste sind identisch mit den Angaben auf dem Zertifikat. Außerdem wird in der Liste die Eintragung „**Alkohol(e)**“ in der Rubrik „Wirkstoffbasis“ erfolgen. Sollten Sie mit den Angaben nicht einverstanden sein, bitten wir um umgehende Mitteilung.
Bitte senden Sie **möglichst umgehend** die beiliegenden 3 Formulare

1. Druckfreigabe für den mhp-Verlag,
3. Rechtsverbindliche Bestätigung

2. Einverständniserklärung für den VAH

mit Ihrer Unterschrift versehen an die Geschäftsstelle des VAH zurück. Nach Bestätigung der Richtigkeit der Angaben im Zertifikat liegt die Verantwortung für den Inhalt des Zertifikates bei Ihnen. Bitte kontrollieren Sie deshalb die Angaben **sehr sorgfältig**.

Mit der Rechtsverbindlichen Erklärung bestätigen Sie, dass das in den Handel gebrachte Präparat in seiner Zusammensetzung identisch ist mit den für die Erstellung der Gutachten eingereichten Prüfmustern.

Wurde bei einem zur Zertifizierung eingereichten Präparat die Rezeptur geändert, der Präparatname jedoch beibehalten, so dass hinsichtlich in der Zusammensetzung eine Änderung eintrat, ohne dass dies für den Verbraucher ersichtlich ist oder wird im neuen Zertifikat bei gleicher Rezeptur und gleichem Präparatnamen eine höhere Anwendungskonzentration und / oder längere Einwirkzeit genannt, so verpflichten Sie sich mit dieser Erklärung den Vertreiber und Anwender über die oben beschriebenen Änderungen zu informieren, sowie das Präparat in der alten Rezeptur nicht mehr zu vertreiben.

Bei Änderung der Konzentrations-Zeit-Relationen sind ggf. die Etiketten auf der alten Ware im Lagerbestand zu ändern.

Wir weisen ausdrücklich darauf hin, dass die Desinfektionsmittel-Kommission (DMK) über jede Änderung in der Zusammensetzung eines in der Liste aufgeführten Präparates informiert werden muss.

Die DMK entscheidet dann, ob und in welchem Umfang eine neuerliche Prüfung notwendig ist.

Mit freundlichen Grüßen

J. A. C. Zhyg. W.
Dr. rer. nat. J. Gebel