

Zur Tenazität und Desinfektion von aviären Influenza A-Viren

Dr. Ayhan Yilmaz und Prof. Erhard F. Kaleta (Gießen)

Einleitung

Die klassische Geflügelpest und die Newcastle-Krankheit (= atypische Geflügelpest) sind Seuchen des Hausgeflügels von überragender Bedeutung. Beide führen zu erheblichen Verlusten und zur nachhaltigen Beeinflussung des internationalen Handels. Deshalb werden weltweit große Anstrengungen zur Tilgung bzw. zur Eindämmung der Ausbreitung unternommen. Die Bekämpfung der klassischen Geflügelpest beruht überwiegend auf der „Keulung“ betroffener Bestände. Die Newcastle-Krankheit wird dagegen in den meisten Ländern dieser Welt durch Impfungen mittels Lebend- und Inaktivimpfstoffen bekämpft.

Die klassische Geflügelpest wird mit Bezug auf den Erreger auch als hochpathogene aviäre Influenza A (HPAI) der Hämagglutinin-Subtypen H5 und H7 und die atypische Geflügelpest als Newcastle Disease bezeichnet. Eine diagnostische Differenzierung anhand der klinischen Erscheinungen ist aufgrund der weitgehenden Ähnlichkeit nicht möglich. Ursächlich für die klassische Geflügelpest sind die hoch pathogenen Viren der Subtypen H5 und H7 der Familie Orthomyxoviridae, während die atypische Geflügelpest durch Paramyxoviren der Serogruppe 1 hervorgerufen wird. Die Virionen der Orthomyxoviridae sind behüllt, pleomorph, meistens sphärisch und tragen einzelsträngige RNA als Erbmaterial (VAN REGENMORTEL et al., 2000). Die Verschleppung und Übertragung der Viren erfolgt nur horizontal mit infizierten Tieren und deren Ausscheidungen sowie unbehandelten Tierprodukten einschließlich belebter und unbelebter Vektoren (WERNER und KALETA, 2004).

Akute Anlässe zu erneuten Arbeiten über die Tenazität und Möglichkeiten der chemischen Desinfektion sind die zahlreichen Ausbrüche der klassischen Geflügelpest während der letzten Jahre (ALEXANDER, 2003) in Italien durch den hoch pathogenen AIV-Subtyp H7N1 und andere Subtypen (CAPUA und MINELLI, 2001; CAPUA et al., 2003), in den Niederlanden, Belgien und Deutschland durch den hoch pathogenen AIV-Subtyp H7N7 (PARKER et al., 2003), in Texas, USA, durch den Subtyp H5N2, in Kanada durch den Subtyp H7N3, und durch den Subtyp H5N1 in mehreren südasiatischen Ländern und erst kürzlich im August 2004 durch den Subtyp H5N2 in einer Provinz der Republik Südafrika.

Hier soll über die Stabilität der Infektiosität des aviären Influenza A-Virus (AIV) auf Federn verschiedener Vogelarten und über Möglichkeiten der chemischen Desinfektion von AIV der Subtypen H5 und H7 berichtet werden.

Zur Tenazität der aviären Influenza-A-Viren

Unter „Tenazität“ versteht man den Erhalt der Infektiosität und Vermehrungsfähigkeit eines Krankheitserregers außerhalb eines Tieres unter natürlichen Bedingungen. Diese Eigenschaft kann man auch als Widerstandsfähigkeit des Erregers gegenüber äußeren Einflüssen bezeichnen. AIV wird in großen Mengen im infizierten Geflügel gebildet und mittels Kot sowie Sekreten wie Schleim aus Lidbindehäuten, Nase und Rachen ausgeschieden. Erreicht dieses neu gebildete Virus innerhalb kurzer Zeit und unter günstigen Bedingungen ein empfängliches Tier, so erfolgt

über den Atem- und Verdauungstrakt eine Infektion mit nachfolgender Erkrankung. Ist kein empfängliches Tier erreichbar, so geht das Virus innerhalb einer gewissen Zeitspanne zugrunde, d. h., es verliert seine Infektiosität und Vermehrungsfähigkeit. Krankheitsfälle können durch ein inaktiviertes Virus nicht mehr ausgelöst werden.

Die Kenntnis der Inaktivierungsgeschwindigkeit und der Umstände, unter denen eine solche Inaktivierung erfolgt, ist für die Ausbreitung des Erregers und für die Diagnostik von großer Bedeutung (BÖHM, 2002). Aus zahlreichen Studien ist bekannt, dass die Zerstörung der Infektiosität eines jeden Influenza-A-Virus von mehreren Faktoren abhängig ist. Gleichzeitig zeigen diese Studien, dass die Infektiosität in logarithmischer Weise abnimmt. Von besonderer Bedeutung für die Abnahme der Infektiosität sind erfahrungsgemäß Temperatur, Feuchte, pH-Wert und Struktur sowie chemische Zusammensetzung des umgebenden Milieus.

Je höher die **Temperatur** desto schneller erfolgt die Zerstörung der Infektiosität. Aufgrund dieser Erkenntnis ist die Hitzebehandlung von infektiösem Material gängige Praxis, wobei Wärme durch Pasteurisieren (KING, 1991), Kochen, Verbrennen oder im Labor durch Autoklavieren erzeugt werden kann. Unter eher natürlichen Bedingungen kann Wärme auch durch Kompostierung erzeugt werden, was ebenfalls als wirksames Verfahren anzusehen ist (ANONYM, 1997; BERGDORF, 1989; BEHR und GERDES, 2003). Gemäß Angaben des Internationalen Tierseuchenamtes (Paris) wird AIV durch Einwirkung von 56 °C für drei Stunden oder 60 °C für 30 Minuten vollständig inaktiviert (OIE Disease Card, 2004). Einfrieren des AIV erhält dagegen die Infektiosität in direkter Abhängigkeit von der Gefriertemperatur für sehr lange Zeiträume (Monate bis Jahre).

Die **Feuchte** in der Umgebung des Virus ist ebenfalls von großer Bedeutung für die Überlebensfähigkeit des AIV. Alle Influenza A-Viren befinden sich nach der Ausscheidung durch infizierte Tiere zunächst in wässriger Phase. In Wasser (Teiche, Tränken, Gülle) übersteht das AIV lange Zeiträume. Demgegenüber sind AIV hinsichtlich Austrocknung besonders empfindlich. Wasserverlust entsteht beim Antrocknen von Virus auf diversen Oberflächen oder durch Erhitzen. In Süß- und Salzwasser aber auch in tierischen Geweben einschließlich Muskulatur (SWAYNE und SUAREZ, 2000) bleibt die Infektiosität des AIV für Wochen bis Monate erhalten.

Der **pH-Wert** der das Virus umgebenden Feuchte nimmt direkten Einfluss auf die Überlebensfähigkeit des AIV. Saurer Milieu zerstört die Infektiosität, während ein neutraler oder schwach alkalischer Bereich die Vermehrungsfähigkeit des AIV stabilisiert. Die natürliche Fleischreifung, die mit einem Absinken des pH-Wertes einhergeht, reicht beim Geflügelfleisch nicht aus, um die Infektiosität des AIV innerhalb angemessener Zeiträume zu zerstören.

Die Struktur und Zusammensetzung des **Milieus**, in dem sich das AIV befindet, wirkt ebenfalls auf dessen Stabilität ein. Proteine haben einen stabilisierenden Effekt. Sauerstoff und **UV-Strahlen** zerstören dagegen die Infektiosität (STETT-MUND und MAHNEL, 1980). Die Emulgierung in Fetten oder Fett-Protein-Mischungen erhält die Infektiosität.

Aus diesen Ausführungen lassen sich folgende wesentliche Schlüsse ziehen:

- die Inaktivierung des AIV außerhalb eines empfänglichen Tieres erfolgt als komplexer Vorgang, an dem mehrere unter praktischen Bedingungen nur schwer zu kontrollierende Faktoren wie Temperatur, Feuchte, pH-Wert, UV-Strahlung und Sauerstoffmilieu beteiligt sind.
- Das Absinken der Infektiosität erfolgt in logarithmischer Weise. Damit ist erklärt, dass eine vollständige Eliminierung von infektiösem AIV zumindest theoretisch nicht zu erreichen ist.
- Der Faktor Zeit ist von überragender Bedeutung bei allen Maßnahmen zur Tilgung des AIV in kontaminierten Materialien.

Es obliegt der Weisheit, Fachkenntnis und Erfahrung jenes Personenkreises, der sich um die Tilgung hoch pathogener AIV (und NDV) von Berufswegen zu bemühen hat, im konkreten Seuchenfall die richtigen Überlegungen anzustellen und schnelle, fachlich korrekte Entscheidungen zu treffen.

Desinfektionsmittelprüfungen mit AIV nach DVG-Richtlinie, CEN-Richtlinie und Richtlinie des Bundesgesundheitsamts

Aus der Kenntnis der Gesichtspunkte über den Verlust der Infektiosität des AIV außerhalb des empfänglichen Tieres leitet sich der Bedarf nach einer kontrollierten und zeitlich beschleunigten Inaktivierung des AIV ab. Dies kann durch gezielte Desinfektion erreicht werden. Gemäß Empfehlungen des Internationalen Tierseuchenamtes kommen als Desinfektionsmittel in Betracht: oxidierende Mittel, Lipidlösungsmittel und Formalin oder Handelspräparate.

Die Richtlinie des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen (Stand 1997) nennt für die Desinfektion des Virus der klassischen Geflügelpest (aviäre Influenza) die Flächendesinfektionsmittel Formalin (2 % - 2 Std.), Peressigsäure (1 % - 1 Std.) und Handelsdesinfektionsmittel, die gemäß Richtlinien der DVG getestet, als wirksam gegenüber behüllten Viren (Spalte 7a: begrenzt viruzid) gefunden, höchstens innerhalb von 2 Stunden inaktivierend wirken und in die aktuelle 12. Liste der DVG (ANONYM, 2003a) aufgenommen worden sind, und zwar in doppelter Konzentration der empfohlenen Konzentration (ANONYM, 1997).

Die Überprüfung der Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln unter Laborbedingungen zum Einsatz im Bereich der Tierhaltung erfolgt derzeit nach den Richtlinien der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. Gießen (ANONYM, 2000) und innerhalb der Europäischen Union nach den in der Entwicklung und Erprobung befindlichen Guidelines des CEN (Comité Européen de Normalisation) (ANONYM, 2003b).

Material und Methoden

Aufgrund der leichteren Handhabung und ergiebigen Virusvermehrung wurde bei allen Testvorgängen zunächst der Subtyp H7N1 (Influenza A/Carduelis/Germany/72) verwendet. In einem Versuch zur Klärung der Frage „Tenazität von Influenza-A-Virus auf Federn“ wurden gemauserte Fe-

dern (Rücken-, Bauch-, Flügel- und Schwanzfedern) jeweils mit 0,1 ml AIV (verdünnt in phosphatgepufferter Kochsalzlösung, PBS) beschichtet, bei Raumtemperatur angetrocknet und aufbewahrt. Zu verschiedenen Zeiten wurde das verbliebene Virus durch Titration in HEF-Kulturen quantitativ bestimmt.

Zur Bestimmung der Widerstandsfähigkeit der AIV gegenüber Desinfektionsmitteln wurden fünf verschiedene Handelspräparate einer Prüfung unterzogen. Derzeit gibt es in Europa keine einheitliche Viruzid-Prüfvorschrift für chemische Desinfektionsmittel im Bereich der Tierhaltung. Deshalb wurden die Stalldesinfektionsmittel Venno FF super (20 % Glutaraldehyd, 12 % Oligomeres Pentaerithritose-Kondensat) und Venno Vet 1 super (55 % Ameisensäure, 7 % Glyoxylsäure) nach DVG-Richtlinien (ANONYM, 2000a), die Händedesinfektionsmittel Manorapid Synergy 63 (14 % Propan-2-ol, 0,115 % 1,3-Butandiol) und Poly-Alcohol Hände-Antisepticum nach der Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes (ANONYM 1982, 1983) und das Präparat Halamid (100 % Natrium-p-toluolsulfonchloramid) nach CEN-Richtlinien (ANONYM, 2003b) geprüft. Dabei wurden mehrere Parameter wie Zeit, Konzentration, organische Belastung, Oberflächenbeschaffenheit, Umgebungstemperatur sowie Wasserhärte in Betracht gezogen.

Zur Aufklärung der Frage, ob zwischen H7- und H5-Subtypen ein Resistenzunterschied besteht, wurden zusätzlich vergleichende Desinfektionsversuche mit Subtypen H7N1 (A/carduelis/Germany/72), H5N2 (A/chicken/Pennsylvania/1370/83) und H5N9 (A/turkey/Ontario/7732/66) durchgeführt. Als Referenzdesinfektionsmittel diente Ameisensäure. Es wurden 1,0 ml virushaltige Allantoisflüssigkeit mit 1,0 ml Ameisensäurelösung in 2facher Konzentration der erwünschten Endkonzentration gemischt. Negativkontrollen wurden mit PBS behandelt. Nach einer Reaktionszeit von 15 Min. bei 20 °C wurde jeweils 0,1 ml Probe auf Restvirus quantitativ untersucht. Als Nachweissystem wurden primäre Hühnerembryofibroblasten (HEF)-Kulturen verwendet. Die Details der Virusnachweise sind den DVG-Richtlinien zu nehmen (ANONYM, 2000).

Die Desinfektionsmittelversuche nach DVG-Richtlinien erfolgten in Suspensions- und Keimträgerversuchen, diejenige nach Richtlinien des Gesundheitsamts und nach CEN-Richtlinien gegenwärtig nur in Suspensionsversuchen. Während bei Suspensionsversuchen die Inaktivierungskinetik in flüssiger Phase festgestellt wird, werden bei Keimträgerversuchen nach DVG-Richtlinien 0,1 ml Virussuspension mit 40 % Serumzusatz auf Holz- und Mullkeimträgern getrocknet und erst dann jeweils mit 4 ml der Desinfektionsmittelverdünnungen behandelt. Infolge der Schutzfunktion der Proteine und der Porosität der Keimträgeroberfläche sind die Virionen besonders auf Holzkeimträgern wesentlich schwerer zu inaktivieren. Mullkeimträger dagegen lassen sich relativ leichter desinfizieren. Deshalb wurden Versuche mit Mullkeimträger bei unseren Untersuchungen ausgeschlossen.

Ergebnisse

Persistenz von AIV auf Federn

AIV kann in den Ausscheidungen infizierten Geflügels, im Tierkörper selbst und im Gefieder des Geflügels vorhanden sein. Bei Tilgungsaktionen und der unschädlichen Beseitigung der Kadaver kommt es regelmäßig zu einer unbeabsichtigten Streuung von Federn in die nähere Umgebung. Deshalb ist es wesentlich, Kenntnis über die Dau-

er der Überlebensfähigkeit des AIV auf Federn zu erhalten. In Versuchen zur Klärung dieser Frage wurden gemauerte Federn jeweils mit 0,1 ml Virussuspension beschichtet. Die Virus-kontaminierten Federn wurden bei Zimmertemperatur aufbewahrt und zu verschiedenen Zeiten das verbliebene noch infektiöse Virus quantitativ bestimmt. Die Titrations ergaben folgende Befunde:

- Innerhalb der Zeit „0“ bis „1 Stunde“ tritt durch das An-trocknen des AIV auf den Federn ein Abfall des Virus-titers ein.
- Infektiöses Virus ist bis zu 24 Stunden nach dem Auf-tragen auf die Federn aller Vogelspezies nachweisbar.
- Am längsten ist infektiöses AIV auf den Federn der Pe-kingenten nachweisbar, wobei der Mechanismus der längeren Verweildauer des AIV auf Federn dieser Spe-zies noch unbekannt ist.
- Auf den Hühnerfedern ist infektiöses Virus immerhin bis zu 48 Stunden nach dem Auftragen erhalten geblie-ben.
- Zwischen den Federn von Huhn, Taube und Bussard bestehen keine erheblichen Unterschiede im Restvi-rusgehalt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass unter den hier verwen-de-ten Bedingungen der Virusgehalt der kontaminierten Fe-dern mit zunehmender Dauer der Lagerung abnimmt. Min-destens für zwei Tage bleibt jedoch infektiöses AIV nach-weisbar.

Tabelle 1: Nachweis von Influenza A-Virus (H7N1) auf kontaminierten Federn von vier Vogelarten zu verschiedenen Zeiten nach deren Be-schichtung mit AI-Virus

Zeit zwischen Beschichtung der Federn und Bestimmung des AIV in Stunden	Virus-Titer ¹ in log 10 KID ₅₀ je 0,1 ml auf den Federn			
	Huhn	Taube	Bussard	Ente
0	6,7	6,7	6,7	6,7
1	5,1	5,6	4,6	6,3
6	3,9	2,3	4,4	6,0
12	3,1	2,1	2,5	5,0
24	1,8	1,8	2,0	3,3
36	- ²	1,4	1,1	3,5
48	1,9	1,2	-	2,0
72	-	-	-	-
96	-	-	-	1,5

¹ = Geometrische Mittel von jeweils 6 einzeln untersuchten Federn von drei verschiedenen Körperregionen
² = Titer unterhalb der Nachweisgrenze

Desinfektionsversuche mit AIV und zwei Handelspräpa-raten nach DVG-Richtlinie

Gemäß DVG-Richtlinie aus dem Jahre 2000 dient zyto-pathogenes Virus der Newcastle-Krankheit (Stamm Mon-tana) als Prüfvirus. Zur Überprüfung der Wirksamkeit ge-gen AIV wurden vier Handelspräparate untersucht. Es er-gaben sich folgende Resultate:

Tabelle 2: Viruzide Wirksamkeit des Venno Vet 1 super und Venno FF super gegen aviäres Influenza-A-Virus unter verschiedenen Testbedingungen¹ gemäß Prüfung nach DVG-Richtlinien (ANONYM, 2000)

Versuch	Testtem- peratur (°C)	Versuchs- ansatz	Protein- belastung	Ausgangs- titer ²	Einwirkzeiten (Minuten) bis zur Inaktivierung ³							
					Venno Vet 1 Super				Venno FF super			
					0,1 %	0,5 %	1,0 %	2,0 %	0,1 %	0,5 %	1,0 %	2,0 %
SV	20	I	-	8,1	5	5	5	5	5	5	5	5
			+	8,0	5	5	5	5	15	5	5	5
		II	-	8,1	5	5	5	5	5	5	5	5
			+	8,1	10	5	5	5	15	5	5	5
	10	I	-	8,1	15	5	5	5	5	5	5	5
			+	8,0	60	5	5	5	-	5	5	5
		II	-	8,1	15	5	5	5	5	5	5	5
			+	8,1	60	5	5	5	-	5	5	5
	4	I	-	8,1	30	5	5	5	5	5	5	5
			+	8,0	120	10	5	5	-	5	5	5
II		-	8,1	30	5	5	5	5	5	5	5	
		+	8,1	-	10	5	5	-	5	5	5	
KTV	20	I	+	7,1	60	30	10	5	-	30	5	5
			+	7,0	60	15	5	5	-	30	5	5
	10	I	+	7,1	-	-	15	10	-	-	5	5
			+	7,0	-	-	15	10	-	120	5	5
	4	I	+	7,1	-	-	30	15	-	-	60	10
			+	7,0	-	-	30	15	-	-	30	10
	4	II	+	7,1	-	-	30	15	-	-	60	10
			+	7,0	-	-	30	15	-	-	30	10

¹ : Zu Details der Virusinaktivierungskinetik siehe YILMAZ et al., 2004
³ : Untere Nachweisgrenze liegt bei 3,5 KID₅₀/ml in SV, 2,5 KID₅₀/ml in KTV
 SV: Suspensionsversuch KTV: Keimträgerversuch mit Pappelholz

² : KID₅₀/ml
 -: Keine Desinfektion innerhalb von 120 Min.

Venno FF super

- Bei Zimmertemperatur verliert das H7N1-Virus seine Infektiosität innerhalb von 15 Minuten, wenn es mit 0,1 % Venno FF super in flüssiger Phase behandelt wird (Tab. 2).
- Eine Temperaturreduktion auf 10 °C erfordert verlängerte Einwirkzeiten von 0,1 % Venno FF super bis zur vollständigen Eliminierung der Infektiosität.
- Bei 4 °C erfolgt eine sichere Desinfektion mit 0,1 % Venno FF super nur ohne organische Belastung. Bei Gegenwart von Proteinen konnte eine Desinfektion im Suspensionsversuch erst mit 0,5 % innerhalb von 10 Minuten erreicht werden.
- Auf Keimträgern wurde H7N1-Virus erst nach 60 Minuten Einwirkung der 0,1 % Venno FF super bei 20 °C erreicht.
- Bei 10 °C wurden die Keimträger innerhalb von 15 Minuten mit 1,0 % und 10 Min. mit 2,0 % Venno FF super desinfiziert. Die Temperaturreduktion auf 4 °C führte zur weiteren Verluste der Wirksamkeit, jedoch schaltete eine 2,0 %ige Lösung die Infektiosität trotz all dieser Hemmungsfaktoren innerhalb von 15 Minuten aus.
- Bei allen Testtemperaturen desinfizierte 0,1 % Venno Vet 1 super das IAV N7N1 innerhalb von 15 Minuten ohne Proteinbelastung.

Venno Vet 1 super:

- Bei Gegenwart von Proteinen wurden Wirkungsverluste des 0,1 % Venno Vet 1 super festgestellt (Tab. 2). Die 0,5 %ige Lösung führte dagegen bei allen Testtemperaturen innerhalb von 5 Minuten zur vollständigen Desinfektion.

- Eine Desinfektion der Viren auf Keimträgern erforderte längere Reaktionszeiten oder höhere Konzentrationen des Venno Vet 1 super.

Poly-Alcohol Hände-Antiseptikum und Manorapid Synergy

Bei allen Suspensionsversuchen gemäß Prüfvorschrift des Bundesgesundheitsamts aus den Jahren 1982 und 1983 konnte sowohl ohne als auch mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) oder 0,2 % bovinem Serumalbumin (BSA), schon nach einer Einwirkzeit von 15 bzw. 30 Sekunden des 80,0 %igen Poly-Alcohol Hände-Antisepticum und des 80,0 %igen Manorapid Synergy kein vermehrungsfähiges Influenza-A-Virus mehr festgestellt werden (Tab. 3).

Halamid

Unabhängig von der Proteinbelastung mit 0,3 % bovinem Serumalbumin (BSA) oder mit 1 % BSA plus 1 % Hefeextrakt (gemäß CEN-Prüfvorschrift) inaktivierte das Präparat Halamid in Konzentrationen von 0,1, 0,3 und 0,5 % das AIV des Subtyps H7N1 innerhalb von 30 Minuten bei einer Testtemperatur von 10 °C.

Wirksamkeitsvergleich von Ameisensäure gegenüber AIV-Subtypen

Gemäß Entwurf der CEN-Richtlinien soll zukünftig Ameisensäure als Referenz-Desinfektionsmittel bei allen Wirksamkeitsuntersuchungen chemischer Desinfektionsmittel eingesetzt werden. Deshalb werden hier auch die Ergebnisse der Desinfektionsversuche mit Ameisensäure mitgeteilt. Die Ameisensäurekonzentrationen von 0,005 bis 0,025 % führten zu geringen und etwa gleichen Titer-

Tabelle 3: Inaktivierung des aviären Influenza-A-Virus (A/carduelis/Germany/72, H7N1) durch Poly-Alcohol Hände-Antisepticum und Manorapid Synergy im quantitativen Suspensionsversuch. Prüfung gemäß Richtlinie des BGA (ANONYM, 1982, 1983)

Ansatz	Produkt	Desinfektionsmittel-Konzentration (%)	Belastung	Restinfektiosität in log ₁₀ KID ₅₀ /ml nach		= 4 log ₁₀ Reduktion nach
				15 Sekunden	30 Sekunden	
I	Poly-Alcohol Hände-Antisepticum	80,0	ohne	=2,50	=2,50	15 Sekunden
	Poly-Alcohol Hände-Antisepticum	80,0	0,2% BSA	=2,50	=2,50	15 Sekunden
	Poly-Alcohol Hände-Antisepticum	80,0	10,0% FKS	=2,50	=2,50	15 Sekunden
	Virus-Kontrolprobe	0,0	ohne	n. d.	7,6	-
	Virus-Kontrolprobe	0,0	0,2% BSA	n. d.	7,5	-
	Virus-Kontrolprobe	0,0	10,0% FKS	n. d.	7,6	-
II	Poly-Alcohol Hände-Antisepticum	80,0	ohne	=2,50	=2,50	15 Sekunden
	Poly-Alcohol Hände-Antisepticum	80,0	0,2% BSA	=2,50	=2,50	15 Sekunden
	Poly-Alcohol Hände-Antisepticum	80,0	10,0% FKS	=2,50	=2,50	15 Sekunden
	Virus-Kontrolprobe	0,0	ohne	n. d.	7,6	-
	Virus-Kontrolprobe	0,0	0,2% BSA	n. d.	7,6	-
	Virus-Kontrolprobe	0,0	10,0% FKS	n. d.	7,5	-
I	Manorapid Synergy	80,0	ohne	=2,50	=2,50	15 Sekunden
	Manorapid Synergy	80,0	0,2% BSA	=2,50	=2,50	15 Sekunden
	Manorapid Synergy	80,0	10,0% FKS	=2,50	=2,50	15 Sekunden
	Virus-Kontrolprobe	0,0	ohne	n. d.	7,5	-
	Virus-Kontrolprobe	0,0	0,2% BSA	n. d.	7,6	-
	Virus-Kontrolprobe	0,0	10,0% FKS	n. d.	7,5	-
II	Manorapid Synergy	80,0	ohne	=2,50	=2,50	15 Sekunden
	Manorapid Synergy	80,0	0,2% BSA	=2,50	=2,50	15 Sekunden
	Manorapid Synergy	80,0	10,0% FKS	=2,50	=2,50	15 Sekunden
	Virus-Kontrolprobe	0,0	ohne	n. d.	7,5	-
	Virus-Kontrolprobe	0,0	0,2% BSA	n. d.	7,5	-
	Virus-Kontrolprobe	0,0	10,0% FKS	n. d.	7,6	-

Tabelle 4: Viruzide Wirkung des Halamid gegen aviäres Influenza-A-Virus (A/carduelis/Germany/72, H7N1) in Suspensionsversuchen. Testtemperatur 10 ± 1 °C. Reaktionszeit 30 min. Prüfung nach CEN-Richtlinie (ANONYM, 2003b)

Desinfektionsmittelkonzentration	Ansatz	Ohne organische Belastung		Mit geringer organischen Belastung ¹		Mit hoher organischen Belastung ²	
		Virustiter (KID ₅₀ /ml)	Titerreduktion (in log ₁₀)	Virustiter (KID ₅₀ /ml)	Titerreduktion (in log ₁₀)	Virustiter (KID ₅₀ /ml)	Titerreduktion (in log ₁₀)
Negative Kontrolle	1	8,5	-	8,5	-	8,5	-
	2	8,1	-	8,0	-	8,0	-
0,1 %	1	=2,5	=6,0	=2,5	=6,0	=2,5	=6,0
	2	=2,5	=5,6	=2,5	=5,5	=2,5	=5,5
0,3 %	1	=2,5	=6,0	=2,5	=6,0	=2,5	=6,0
	2	=2,5	=5,6	=2,5	=5,5	=2,5	=5,5
0,5 %	1	=2,5	=6,0	=2,5	=6,0	=2,5	=6,0
	2	=2,5	=5,6	=2,5	=5,5	=2,5	=5,5

¹: 0,3 % bovines Serumalbumin (Fraktion V)

²: 1,0 % bovines Serumalbumin (Fraktion V) + 1,0 % Hefeextrakt

reduktionen in Suspensionen von H7N1, H5N2, H5N9. Ab 0,05 % Ameisensäure konnte keine Virusvermehrung oberhalb der Nachweisgrenze festgestellt werden.

Tabelle 5: Wirksamkeit von Ameisensäure gegenüber verschiedenen AIV-Subtypen

Konzentration (%)	Infektiositätstiter (in KID50/ml)		
	H7N1 ¹	H5N2 ²	N5N9 ³
0,000	5,9	6,0	5,9
0,005	5,8	6,0	6,0
0,010	5,4	5,8	5,6
0,025	5,3	5,6	5,5
0,050	=2,5	=2,5	=2,5
0,100	=2,5	=2,5	=2,5
0,250	=2,5	=2,5	=2,5
0,500	=2,5	=2,5	=2,5

¹: A/carduelis/Germany/72

²: A/chicken/Pennsylvania/1370/83

³: A/turkey/Ontario/7732/66

Diskussion

Obwohl Influenza A-Viren hinsichtlich ihrer geringen Tenazität in der Natur und Widerstandsfähigkeit gegenüber chemisch-physikalischen Noxen zu den labilen Viren zu zählen sind (HAUSSMANN und GRAFE, 1956, 1957; ALBRECHT, 1957; ALBRECHT et al., 1957-58; HENNEBERG und HÖPPNER, 1960; SPRÖSSIG und MÜCKE, 1968; KING, 1991; DAVISON et al., 1999; LU et al., 2003), können bestimmte Faktoren ihr Überleben außerhalb des Wirtsorganismus oder in tierischen Produkten besonders begünstigen. Hierbei sind niedrige Umgebungstemperaturen oder Schutzfunktionen organischer Stoffe besonders wirksam. Unter solchen Umständen können die Viruspartikel in Produkten oder Abfällen tierischer Herkunft wochenlang infektiös bleiben (ALEXANDER, 2000; SWAYNE und SUAREZ, 2000). HAAS und Mitarbeiter (1995) stellten fest, dass die Influenza A-Viren in flüssigem Mist zwar innerhalb einer Stunde bei 55 °C zugrunde gehen, jedoch bei 20 °C erst nach zwei Wochen und bei 5 °C sogar erst nach neun Wochen inaktiviert wurden. Unsere Untersuchungen zur Bestimmung der Tenazität auf Fe-

dern zeigen, dass das AIV auf Federn von Huhn, Taube und Bussard ab 72 Stunden nicht mehr zu detektieren war, während es auf Entenfedern bis zu 96 infektiös geblieben ist. Die minimale infektiöse Dosis des AIV für Hühnerküken liegt bei nur 1 bis 10 vermehrungsfähigen Viruspartikeln (LU et al., 2003). Bleiben auch nur sehr geringe Mengen infektiösen AIV auf Federn, die bei der Verladung von Tierkadavern unbeabsichtigt verstreut werden, so kommt der Vermeidung dieser Streuung von im Seuchenfalle kontaminierten Federn eine beachtliche praktische und epidemiologische Bedeutung zu.

Im Gegensatz zu den unbehüllten Viren sind die Viren mit Hülle relativ leicht zu desinfizieren. Die behüllten Viren der Orthomyxoviridae stellen hierbei keine Ausnahme dar. Auch unsere Untersuchungen bestätigen, dass die Desinfektion von AIV in flüssiger Phase keine wesentlichen Probleme bereitet. Die geprüften Händedesinfektionsmittel auf alkoholischer Basis inaktivierten die Viren innerhalb wenigen Sekunden. Besonders schwierig war jedoch die Desinfektion des AIV auf porösen, saugfähigen Oberflächen. Nach jeder Erweiterung des Grades der Eiweißbelastung und durch Temperaturreduktion wurde ein Rückgang der Wirksamkeit beobachtet. Trotz dieser extrem erschwerten Bedingungen konnten die getesteten Hände-Desinfektionsmittel innerhalb von relativ kurzen Einwirkzeiten und akzeptablen Konzentrationen eine Desinfektion zustande bringen.

Die Desinfektion der behüllten Viren beruht auf der physikalischen und chemischen Denaturierung der Virushülle. Das Aufbauprinzip der Hüllmembran ist bei allen Subtypen des AIV, abgesehen von den Oberflächenproteinen Hämagglutinin und Neuraminidase, fast identisch. Folglich dürfte es keine nennenswerten Resistenzunterschiede gegenüber chemischen Desinfektionsmitteln zwischen den Subtypen des AIV geben. Unsere Untersuchungen bestätigten diese Feststellung. Es konnten zwischen den Subtypen H7N1, H5N2 und H5N9 kaum Unterschiede hinsichtlich der Widerstandsfähigkeit gegen Ameisensäure festgestellt werden.

Zusammenfassung

Auf experimentell mit AIV kontaminierten und bei Zimmertemperatur gelagerten Federn kommt es spontan zu einem langsamen Absinken der Gehalte an infektiösem

Virus. Es konnte jedoch infektiöses Virus für mehr als zwei Tage auf den AIV-beschichteten Federn nachgewiesen werden. Auf Federn von Hühnern und Tauben war infektiöses Virus bis zu zwei Tagen nach dem Aufbringen des AIV nachweisbar. Auf Federn der Pekingente waren geringe Virusmengen sogar bis zu vier Tagen vorhanden. Alle geprüften chemischen Desinfektionsmittel (Handelsnamen: Venno FF super, Venno Vet 1 super, Poly-Alcohol Hände-Antisepticum, Manorapid Synergy und Halamid), die hier als Handelspräparate auf Wirksamkeit geprüft wurden, führten zu einer vollständigen Desinfektion innerhalb kurzer Zeiten in Suspensions- und Keimträgerversuchen. Die erforderlichen Einwirkzeiten und Desinfektionsmittel-Konzentrationen sind für das geprüfte AIV des Subtyps H7N1 nahezu identisch und unterscheiden sich nicht wesentlich von den Werten, die für die Desinfektion von zytopathogenem Virus der Newcastle-Krankheit in die 12. Liste der DVG-geprüften und gelisteten chemischen Desinfektionsmittel eingetragen sind. Ameisensäure desinfizierte in niedriger Konzentration AIV der Subtypen H5 und H7. Somit eignet sich Ameisensäure als Referenzdesinfektionsmittel im Sinne der CEN-Richtlinie.

Literatur

- ALEXANDER, D. J. (2000): A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology* 74, 3-13
- ANONYM (1982): Richtlinie des Bundesgesundheitsamtes und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren. *Bundesgesundheitsblatt* 25, 397-398
- ANONYM (1983): 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, 413-414
- ANONYM (1997): Richtlinien des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, über Mittel und Verfahren für die Durchführung der Desinfektion bei anzeigepflichtigen Tierseuchen. 331/322-3602-19/1.
- ANONYM (2000): Richtlinien für die Prüfung chemischer Desinfektionsmittel. Hrsg: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e. V. 3. Auflage, Gießen
- ANONYM (2003a): 12. Desinfektionsmittelliste der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft für die Tierhaltung. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft e.V., Gießen
- ANONYM (2003b): Draft European Standard: Chemical disinfectants and antiseptics-Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in veterinary field test method and requirements (phase 2, step 1). prEN, WI 216026, CEN/TC 216/WG2 - N147 January 2003
- ALBRECHT, J. (1957): Vergleichende Desinfektionsmittelprüfungen an verschiedenen Virusarten. *Archiv für Hygiene und Bakteriologie* 141, 460-468
- ALBRECHT, J., T. LAMMERS, E. v. WASIELEWSKI (1957/58): Zur chemischen Wäschedesinfektion bei Viruskrankheiten. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, 1. Abteilung, Originale 170, 531-537
- BERGDORF, V. (1989): Virologische Untersuchung über die Eignung der Düngerverpackung gem. §14 No. 1 der Anlage A-BAVG zur Desinfektion von Festmist. Dissertation. Universität Hohenheim, Stuttgart
- BEHR, K.-P., U. GERDES (2003): Tötung und Entsorgung von Wirtschaftsgeflügel im Seuchenfall: derzeitige Konzepte und mögliche Alternativen. Referate-Sammlung des 65. Fachgesprächs über Geflügelkrankheiten, Hannover, 6./7. November 2003, 41-52
- BÖHM, R. (2002): Grundlagen der Reinigung und Desinfektion. In: Strauch, D. und R. Böhm (Hrsg.), *Reinigung und Desinfektion in der Nutztierhaltung und Veredelungswirtschaft*. Enke-Verlag, Stuttgart
- CAPUA, I., F. MINELLI (2001): A colour atlas and text on Avian Influenza. Publisher, Papi Editore, Bologna, Italy. ISBN 88836 900-7
- CAPUA, I., S. MARANGON, M. d. POZZA, C. TERREGINO, G. CATTOLI (2003): Avian influenza in Italy 1997-2001. *Avian Diseases* 47 (3 Suppl): 839-843
- DAVISON, S., C. E. BENSON, A. F. ZIEGLER, R. J. ECKROADE (1999): Evaluation of disinfectants with the addition of antifreezing compounds against non-pathogenic H7N2 avian influenza virus. *Avian Diseases* 43, 533-537
- HAUSSMANN, H., A. GRAFE (1956): Desinfektion des Influenza-, Mumps- und Newcastle-Virus im eiweißfreiem Medium. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 143, 278-303
- HAUSSMANN, H. G. und A. GRAFE (1957): Virucide Desinfektionsmittelwirkung und Hämagglutininrest. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 143, 334-342
- KING (1991): Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids. *Avian Diseases* 35, 505-514
- HENNEBERG, G., E. HÖPPNER (1960): Desinfektionsversuche an Viren. *Archiv für Hygiene und Bakteriologie* 144, 149-159
- HAAS, B. R. AHL, R. BÖHM, D. STRAUCH (1995): Inactivation of viruses in liquid manure. *Revue Scientifique et Techniques Office International de Epizooties* 14, 435-445
- LU, H., A. E. CASTRO, K. PENNICK, J. LIU, Q. YANG, P. DUNN, D. WEINSTOCK, D. HENZLER (2003): Survival of avian influenza virus H7N2 in SPF chickens and their environments. *Avian Diseases* 47 (3 Suppl), 1015-21
- PARKER, D., M. ALCORN, A. JOHNSTON (2003): Outbreak of highly pathogenic avian influenza in The Netherlands. *Veterinary Record* 152, 338
- VAN REGENMORTEL M. H. V., C. M. FAUQUET, D. H. L. BISHOP, E. B. CARSTENS, M. K. ESTES, S. M. LEMON, J. MANILOFF, M. A. MAYO, D. J. MCGEOCH, C. R. PRINGLE, R. B. WICKNER (2000): *Virus Taxonomy, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer Verlag, Wien.
- SPRÖSSIG, M., H. MÜCKE (1968): Über die antimikrobielle Wirkung der Peressigsäure. *Pharmazie* 23, 665-667
- STETTMUND VON BRODOROTTI, H., H. MAHNEL (1982): Vergleichende Untersuchungen zur UV-Empfindlichkeit von Viren. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B* 29, 129-136
- SWAYNE, D. E., D. L. SUAREZ (2000): Highly pathogenic avian influenza. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 19, 463-482
- WERNER, O. und E. F. KALETA (2004): *Orthomyxoviridae*. In: *Kompendium der Geflügelkrankheiten*, 7. Aufl. (Hrsg. O. Siegmann und U. Neumann). Im Druck.
- YILMAZ, A., URSULA HEFFELS-REDMANN, T. REDMANN (2004): Evaluation of the virucidal efficacy of two chemical disinfectants against avian influenza virus A at different temperatures. *Archiv für Geflügelkunde* 68, 50-56

Anschrift der Verfasser

Dr. Ayhan Yilmaz und Prof. Dr. Erhard F. Kaleta
Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
Justus-Liebig Universität Gießen
Frankfurter Str. 91-93
35392 Gießen

Email: ayhan.yilmaz@vetmed.uni-giessen.de

Email: erhard.f.kaleta@vetmed.uni-giessen.de