

DIN EN 14476

ICS 11.080.20

Ersatz für
DIN EN 14476:2005-08

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch Viruzidie für in der Humanmedizin
verwendete chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 14476:2005+A1:2006**

Chemical disinfectants and antiseptics –

Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine –

Test method and requirements (phase 2, step 1);

German version EN 14476:2005+A1:2006

Antiseptiques et désinfectants chimiques –

Essai virucide quantitatif de suspension pour les antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine –

Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);

Version allemande EN 14476:2005+A1:2006

Gesamtumfang 38 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 14476:2005+A1:2006) wurde von der Arbeitsgruppe 1 „Humanmedizin“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der Arbeitsgruppe 1 des CEN/TC 216 wird über den Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin und Gemeinschaftsaufgaben“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) wahrgenommen.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 14476:2005-08 wurde folgende Änderung vorgenommen:

- a) in 6.5.2, Zeile 7 wird die Konzentration von 1 % verflüssigten Agarose in 2 % geändert, um eine ausreichende Ausgangskonzentration zu erhalten;
- b) im Beispiel in C.2 ist der Wert des zugefügten Volumens von 0,1 ml in 0,2 ml zu berichtigen.

Frühere Ausgaben

DIN EN 14476: 2005-08

Deutsche Fassung

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitativer Suspensionsversuch Viruzidie für in der
Humanmedizin verwendete chemische Desinfektionsmittel und
Antiseptika —
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)**

Chemical disinfectants and —
Virucidal quantitative suspension test for chemical
disinfectants and antiseptics used in human medicine —
Test method and requirements (phase 2, step 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Essai virucide quantitatif de suspension pour les
antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en
médecine humaine —
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 3. März 2005 angenommen und schließt Änderung 1 ein, die am 28. September 2006 vom CEN angenommen wurde.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Anforderungen	6
5 Materialien und Reagenzien	7
6 Prüfverfahren (Allgemeines).....	12
7 Prüfvorschriften bei spezifischen Prüfviren für festgelegte vorgesehene Verwendungen.....	17
8 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse	20
9 Darstellung der Ergebnisse	21
Anhang A (normativ) Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebfiltration	23
Anhang B (informativ) Beispiele für Viren, die im Bereich der Humanmedizin Instrumente, Hände oder Oberflächen kontaminieren können	26
Anhang C (informativ) Berechnung des viralen Infektiositätstiters.....	28
Anhang D (informativ) Darstellung der Prüfergebnisse einer wirksamen Konzentration	30
Anhang E (informativ) Quantitative Bestimmung von Formaldehydkonzentrationen	33
Anhang F (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation von Europäischen Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika	34
Literaturhinweise	36

Vorwort

Dieses Dokument (EN 14476:2005+A1:2006) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemical disinfectants and Antiseptics“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis April 2007, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis April 2007 zurückgezogen werden.

Dieses Dokument enthält die Änderung A1, und wurde vom CEN am 2006-09-28 angenommen.

Dieses Dokument ersetzt EN 14476:2005.

Anfang und Ende der durch die Änderung eingefügten oder geänderten Texte sind jeweils durch Änderungsmarken   angegeben.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Weitere Verfahren zur Bewertung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für andere medizinische Anwendungsgebiete befinden sich in Vorbereitung.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die viruzide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln oder Antiseptika für Instrumente, Oberflächen oder Hände fest, die in Wasser standardisierter Härte – oder im Falle von gebrauchsfertigen Produkten in Wasser - als homogenes, physikalisch stabiles Präparat vorliegen.

Dieses Dokument ist auf ein breites Spektrum von Viren (siehe Anhang B) und auf Bereiche und Bedingungen anwendbar, wo eine Desinfektion aus medizinischen Gründen indiziert ist. Solche Indikationen ergeben sich bei der Versorgung von Patienten, beispielsweise

- in Krankenhäusern, kommunalen medizinischen Einrichtungen und im Dentalbereich;
- in medizinischen Bereichen in Schulen, Kindergärten und Heimen

und können auch am Arbeitsplatz oder im privaten Bereich gegeben sein. Eingeschlossen sein können auch Einrichtungen wie Wäschereien und Küchen, die der direkten Versorgung von Patienten dienen.

Eine Bestimmung der viruziden Wirkung des unverdünnten Produktes ist nicht möglich, da durch Zugabe des Inokulums und der Belastungssubstanz immer eine bestimmte Verdünnung bewirkt wird. Jedoch wird ein Desinfektionsmittel oder Antiseptikum, das in unverdünnter Form verwendet wird, in 80 %iger Konzentration geprüft und muss vor weiterer Bewertung diese Prüfung bestehen.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren dient zur Bestimmung der Wirksamkeit kommerziell erhältlicher Zubereitungen oder Wirkstoffe unter den Bedingungen, unter denen sie angewendet werden.

ANMERKUNG 2 Dieses Verfahren entspricht einer Prüfung der Phase 2, Stufe 1 (siehe Anhang F).

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendungen dieses Dokumentes erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN 14820, *Gefäße zur einmaligen Verwendung für die venöse Blutentnahme beim Menschen*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokumentes gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Bedingungen niedriger Belastung

Belastung, die der Belastung von Oberflächen entspricht, die einem ausreichenden Reinigungsprogramm unterzogen worden sind und/oder bei denen bekannt ist, dass sie nur einen minimalen Grad der Verunreinigung mit organischen und/oder anorganischen Substanzen aufweisen

3.2

Zytotoxizität

morphologische Veränderung von Zellen und/oder ihre Zerstörung oder die Verringerung ihrer Empfindlichkeit gegenüber einer Virusmultiplikation, die durch das Produkt verursacht wird

3.3

Bedingungen hoher Belastung

Belastung, die der Belastung von Oberflächen entspricht, bei denen bekannt ist oder die Möglichkeit besteht, dass sie mit organischen und/oder anorganischen Substanzen verunreinigt sind

3.4**Inaktivierung von Viren**

Verminderung der Infektiosität eines Virus durch ein Produkt

ANMERKUNG Die Veränderung der antigenen Reaktivität oder eines Virusbestandteils bedeutet nicht unbedingt die Verminderung der Infektiosität eines Virus.

3.5**Belastungssubstanzen**

Proteinlösungen und Erythrozyten, die einer Virusprüfsuspension vor der Zugabe der Produktprüflösung hinzugefügt werden, um einen Einfluss der Proteine und Erythrozyten auf die viruzide Wirkung der Produktprüflösung nachzuweisen

3.6**plaquebildende Einheiten (plaque forming units, PFU)**

Anzahl der infektiösen Viruspartikel je Volumeneinheit (ml)

3.7**Produkt**

chemischer Wirkstoff oder Zubereitung, der (die) als chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum verwendet wird

3.8**Referenz-Inaktivierungsprüfung von Viren**

Prüfung mit einem festgelegten Produkt (z. B. Formaldehyd) parallel mit einem zu prüfenden Produkt zur internen Kontrolle der Prüfung

3.9**TCID₅₀**

50 %-Infektionsdosis einer Virussuspension oder der Verdünnung der Virussuspension, die in 50 % der Zellkultureinheiten eine zytopathologische Wirkung (CPE) (siehe 3.8) auslöst

3.10**virale zytopathologische Wirkung (cytopathic effect, CPE)**

morphologische Veränderung von Zellen und/oder ihre Zerstörung als Folge einer Virusmultiplikation

3.11**Infektiosität eines Virus**

Fähigkeit eines Virus, in einem empfindlichen Zellstamm eine infektiöse Nachkommenschaft zu erzeugen

ANMERKUNG Zur Infektiosität kann auch die Expression mindestens eines Teiles der genetischen Information eines Virus in Zellen gehören.

3.12**Virusplaque**

Bereich der in einer Einschicht-Zellkultur unter einem halbfesten Medium aufgetretenen Zellauflösung (Lysis) durch die Infektion mit einem einzigen infektiösen Viruspartikel und dessen Vermehrung

3.13**Viruzid**

Produkt, das Viren unter festgelegten Bedingungen inaktiviert

ANMERKUNG Das Adjektiv dazu ist viruzid.

3.14**viruzide Wirkung**

Fähigkeit eines Produkts, die Anzahl infektiöser Viruspartikel unter festgelegten Bedingungen zu verringern

3.15

Virustiter

Menge der in einem Zellkulturlysat je Volumeneinheit vorhandenen infektiösen Viren

4 Anforderungen

Ein nach Abschnitt 6 und Abschnitt 7 geprüfetes Produkt muss eine Verringerung des Virustiters der Prüfstämme um mindestens 4 dezimallogarithmische Stufen (lg) bewirken, wenn es unter den in Tabelle 1 beschriebenen Prüfbedingungen geprüft wird.

Tabelle 1 — Geforderte Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Desinfektionsmittel für Oberflächen und Instrumente	Hygienische Händedesinfektion und Händewaschung	Chemo-thermische Desinfektionsverfahren
Prüfvirus	<i>Poliovirus</i> und <i>Adenovirus</i>	<i>Poliovirus</i> und <i>Adenovirus</i>	<i>Parvovirus</i>
Prüftemperatur	20 °C ± 1 °C (außer bei der chemo-thermischen Desinfektion)	20 °C ± 1 °C (außer bei der chemo-thermischen Desinfektion)	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber nicht über 60 °C
Einwirkzeit			
a) obligatorisch	60 min	1 min oder 30 s, bei Empfehlung des Herstellers < 1 min	die durch den Hersteller empfohlene Einwirkzeit, aber nicht länger als 60 min
b) zusätzlich	5 min, 15 min, 30 min	3 min	—
Belastungssubstanzen			
a) geringe Belastung	0,3 g/l Rinderserum-albumin	PBS ^a	0,3 g/l Rinderserum-albumin
und/oder	und/oder		und/oder
b) hohe Belastung	3,0 g/l Rinderserum-albumin plus 3,0 ml/l Erythrozyten		3,0 g/l Rinderserum-albumin plus 3,0 ml/l Erythrozyten
^a phosphatgepufferte Kochsalzlösung			

ANMERKUNG Das Menschliche-Immun-Schwäche-Virus (HIV, en: Human Immunodeficiency Virus) wurde nicht als erforderliches Prüfvirus berücksichtigt, da es ein sehr anfälliges Virus ist. Deshalb wird die Prüfung auf viruzide Wirksamkeit von chemischen Desinfektionsmitteln gegen HIV nicht als notwendig im Rahmen dieses Europäischen Standards angesehen, wenn ein Produkt wirksam gegen Poliovirus ist. Tatsächlich wurde das Poliovirus als Prüfvirus ausgewählt, da es hochresistent gegen Chemikalien, säurestabil und unbeeinflusst durch lipide Lösungsmittel wie Ether, Reinigungsmittel oder quaternäre Produkte ist.

5 Materialien und Reagenzien

5.1 Apparate und Glasgeräte

5.1.1 Allgemeines

Mit Ausnahme steril gelieferter sind alle Glasgeräte und alle Geräteteile, die mit den Kulturmedien, den Reagenzien oder der Probe in Berührung kommen, nach einem der in 5.1.2.2 beschriebenen Verfahren zu sterilisieren.

5.1.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung¹⁾

5.1.2.1 Allgemeines

und besonders folgende Geräte:

5.1.2.2 Sterilisatoren

- a) zur Dampfsterilisation ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min auf eine Betriebstemperatur von (121^{+3}_0) °C einstellbar ist;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluft-Sterilisator, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min auf eine Betriebstemperatur von (180^{+5}_0) °C, mindestens 1 h auf eine Betriebstemperatur von (170^{+5}_0) °C oder mindestens 2 h auf eine Betriebstemperatur von (160^{+5}_0) °C einstellbar ist.

5.1.2.3 Wasserbad, einstellbar auf eine Betriebstemperatur von $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

5.1.2.4 Kühlschrank, einstellbar auf 2 °C bis 8 °C .

5.1.2.5 pH-Messgerät, kalibriert auf $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei 25 °C .

5.1.2.6 Umkehr-Mikroskop zum mikroskopischen Betrachten der Zellkulturen.

5.1.2.7 Stoppuhr

5.1.2.8 elektromechanisches Schüttelgerät, z. B. Vortex[®]-Mischer²⁾.

5.1.2.9 Membranfiltrationsgerät zum Filtern der Medien (Porenweite $0,22\text{ }\mu\text{m}$).

5.1.2.10 Mikrotiterplatten und -röhrchen, Petrischalen und Kolben für die Zellkulturen.

5.1.2.11 Magnetrührer, um die Zellen vor der Aussaat in Suspension zu halten.

5.1.2.12 CO₂-Brutschrank (95 % Luft, 5 % CO₂), einstellbar auf $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, zum Bebrüten der Zellkulturen. Falls ein auf $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ einstellbarer Brutschrank nicht zur Verfügung steht, darf ein auf $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ einstellbarer Brutschrank verwendet werden.

1) Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

2) Vortex[®] ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.1.2.13 Eismaschine oder kommerziell erhältliches Eis zum Kühlen des Zellerhaltungsmediums und der Reaktionsgemische während der Prüfung (siehe 6.1, 6.6.3 und 6.6.6.1).

5.1.2.14 Becken als Eisbad mit Eis und Wasser.

5.1.2.15 Behälter: sterile Reagenzgläser, Kulturflaschen oder Kolben mit geeignetem Volumen.

5.1.2.16 Messpipetten mit einem Nennvolumen von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml.

ANMERKUNG Kalibrierte automatische Pipetten dürfen verwendet werden.

5.1.2.17 Messkolben, kalibriert bei 20 °C.

5.1.2.18 Mechanisches Schüttelgerät

5.1.2.19 Zentrifuge

5.1.2.20 Biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II

5.1.2.21 Tiefkühleinrichtung, einstellbar auf –70 °C .

5.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.1 Allgemeines

Die Reagenzien müssen analysenrein und/oder für virologische Zwecke geeignet sein.

ANMERKUNG Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, für die Herstellung von Kulturmedien handelsüblich verfügbare wasserfreie Materialien zu verwenden. Bei der Herstellung dieser Präparate sollten die Anweisungen des Herstellers genauestens eingehalten werden.

5.2.2 Wasser

5.2.2.1 Allgemeine Anforderungen an Wasser

Das Wasser muss frei von zelltoxischen Substanzen sein. Es muss frisch in einem Glasgerät doppelt destilliert und darf nicht entmineralisiert sein.

Sterilisation im Autoklaven (siehe 5.1.2.2).

ANMERKUNG 1 Falls das Wasser während der Sterilisation der Reagenzien mit sterilisiert wird, ist dies nicht erforderlich.

ANMERKUNG 2 Falls destilliertes Wasser geeigneter Qualität nicht zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionslösungen verwendet werden (siehe Literaturhinweise [1]).

5.2.2.2 Wasser standardisierter Härte

Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte wird wie folgt hergestellt:

— Lösung A:

19,84 g wasserfreies Magnesiumchlorid (MgCl_2) oder eine äquivalente Menge wasserhaltiges Magnesiumchlorid und 46,24 g wasserfreies Calciumchlorid (CaCl_2) oder eine äquivalente Menge wasserhaltiges Calciumchlorid werden in Wasser (siehe 5.2.2.1) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt.

Sterilisation im Autoklaven (siehe 5.1.2.2). Die Lösung lässt sich bei 2 °C bis 8 °C bis zu höchstens einem Monat aufbewahren.

— Lösung B:

35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (siehe 5.2.2.1) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Sterilisation durch Membranfiltration. Die Lösung lässt sich bei 2 °C bis 8 °C bis zu höchstens einer Woche aufbewahren.

Wasser standardisierter Härte:

- für die Herstellung von 1 l werden in einen 1 000-ml-Messkolben (siehe 5.1.2.17) mindestens 600 ml Wasser (siehe 5.2.2.1) gegeben, dazugegeben werden 6,0 ml Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B;
- nach Durchmischen wird mit Wasser (siehe 5.2.2.1) auf 1 000 ml aufgefüllt;
- der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss ($7,0 \pm 0,2$) betragen;
- falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Chlorwasserstoffsäure (HCl) eingestellt;
- das Wassers standardisierter Härte ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

ANMERKUNG Bei Herstellung der Produktprüflösungen führt die Zugabe des Produkts in dieses Wassers standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas niedriger als 300 mg/l für Calciumcarbonat (CaCO_3).

5.2.3 Zusammensetzung und Herstellung von Zellkulturmedien und Reagenzien

5.2.3.1 Allgemeines

Die Chemikalien sollten analysenrein sein. Bei jeder Wägung sollten neue oder gereinigte und getrocknete Spatel verwendet werden, um eine Kreuzkontamination der Reagenzien zu vermeiden. Bei jeder Charge eines Medienansatzes sollte die Chargennummer aller Reagenzien beim Abwiegen festgehalten werden.

5.2.3.2 Wachstums- und Erhaltungsmedien

Es ist Eagle's Minimum-Essential Medium (MEM) oder ein gleichwertiges Medium zu verwenden, ergänzt mit einer geeigneten Konzentration inaktiviertem und mykoplasmafreiem fötalem Kälberserum (FCS), Antibiotika und weiteren Wachstumsfaktoren je nach Erfordernis (zur Referenz siehe Literaturhinweise [2]).

ANMERKUNG Materialien und Reagenzien für Zellkulturen dürfen bei Lieferfirmen für biologische Produkte erworben werden.

5.2.3.3 Belastungssubstanzen

5.2.3.3.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz(en) muss (müssen) nach den für das Produkt festgelegten Anwendungsbedingungen ausgewählt werden (siehe Tabelle 1).

Die Belastungssubstanz(en) muss (müssen) steril sein und mit der 10fachen in der Prüfung verwendeten Endkonzentration hergestellt werden (außer das frisch defibrierte Schafblut).

Das Verfahren der Herstellung und Sterilisation sowie die Zusammensetzung sind im Prüfbericht zu erfassen (siehe 9.2).

5.2.3.3.2 Bedingungen geringer Belastung (Rinderserumalbumin)

Rinderserumalbumin sollte als handelsüblich erhältliches Produkt verwendet oder muss wie folgt hergestellt werden:

- in 100 ml Wasser (siehe 5.2.2) werden 0,3 g Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) gelöst;
- die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins (BSA) in der Prüfung ist 0,3 g BSA je Liter.

5.2.3.3.3 Bedingungen hoher Belastung

a) Rinderserumalbumin

Rinderserumalbumin sollte als handelsüblich erhältliches Produkt verwendet oder muss wie folgt hergestellt werden:

- in 100 ml Wasser (siehe 5.2.2) werden 3 g Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) gelöst;
- die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins (BSA) in der Prüflösung ist 3 g BSA je Liter (siehe 6.6.3).

b) Schaf-Erythrozyten

Steriles defibriertes Schafblut sollte als handelsüblich erhältliches Produkt verwendet oder muss nach EN 14820 hergestellt werden.

Die Erythrozyten aus mindestens 8 ml frisch defibriertem Schafblut werden 10 min bei einer Drehzahl von 800 g abzentrifugiert (siehe 5.1.2.19). Nachdem der Überstand verworfen wurde, werden die Erythrozyten in steriler Phosphatpuffer-Kochsalz-Lösung (PBS) resuspendiert. Dieser Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt (der Überstand sollte farblos sein).

c) Rinderserumalbumin und Erythrozytenlösung

3 ml der gepackten Erythrozyten werden in 97 ml der 3 %igen (Masse/Volumen) Rinderserumalbumin-Lösung resuspendiert.

Die Endkonzentration der Schaf-Erythrozyten und des Albumins im Prüfverfahren muss 3 ml/l bzw. 3 g/l betragen. Um eine Kontamination zu verhindern, sollte dieses Gemisch in Portionen abgefüllt werden, die wahrscheinlich an einem Tag benötigt werden, und in gesonderten Behältern bei 2 °C bis 8 °C höchstens 7 Tage aufbewahrt werden.

5.3 Viren

5.3.1 Prüfviren

Die viruzide Wirkung muss durch Verwendung der in Tabelle 2 aufgeführten Prüfviren in Abhängigkeit von der vorgesehenen Verwendung des Produkts ermittelt werden.