

DIN EN 14476



ICS 11.080.20

Ersatz für
DIN EN 14476:2015-12

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung
im humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 14476:2013+A2:2019**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area –
Test method and requirements (Phase 2/Step 1);
German version EN 14476:2013+A2:2019

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide dans le domaine
médical –
Méthode d'essai et prescriptions (Phase 2/Étape 1);
Version allemande EN 14476:2013+A2:2019

Gesamtumfang 47 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 14476:2013+A2:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Gremium ist der Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ des DIN-Normenausschusses Medizin (NAMed).

Änderungen

Gegenüber DIN EN 14476:2015-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) im Europäischen Vorwort wurde der Änderungsvermerk erweitert;
- b) in Abschnitt 4 wurde Tabelle 1 geändert;
- c) in 5.2.1, 5.2.2.8.3, 5.5.1.1, 5.5.4.3, 5.5.5.1, 5.5.6.1, und 5.7 wurden Änderungen vorgenommen;
- d) in Anhang B wurde Abschnitt B.3 hinzugefügt;
- e) Aktualisierung der Literaturhinweise.

Frühere Ausgaben

DIN EN 14476: 2005-08, 2007-02, 2013-10, 2015-12

Deutsche Fassung

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der
viruziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich —
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)

Chemical disinfectants and antiseptics —
Quantitative suspension test for the evaluation of
virucidal activity in the medical area —
Test method and requirements (Phase 2/Step 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de
l'activité virucide dans le domaine médical —
Méthode d'essai et prescriptions (Phase 2/Étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 27. Juli 2015 angenommen und enthält die Änderung 2, die von CEN am 9. April 2019 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 CEN-CENELEC-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, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Anforderungen	8
5 Prüfverfahren	10
5.1 Kurzbeschreibung	10
5.2 Materialien und Reagenzien, inklusive Zellkulturen	10
5.2.1 Prüforganismen	10
5.2.2 Kulturmedien, Reagenzien und Zellkulturen	11
5.3 Apparate und Glasgeräte	14
5.3.1 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte:	15
5.4 Herstellung der Prüforganismensuspensionen und der Produktprüflösungen	16
5.4.1 Prüforganismensuspensionen (Virusprüfsuspension)	16
5.4.2 Produktprüfsuspension	16
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts	17
5.5.1 Allgemeines	17
5.5.2 Prüfverfahren	18
5.5.3 Modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte	20
5.5.4 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität	20
5.5.5 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Produkts	21
5.5.6 Referenz-Virusinaktivierungsprüfung	22
5.5.7 Titration der Viruskontrollprobe	22
5.5.8 Titration der Untersuchungsproben	22
5.6 Versuchsergebnisse und Berechnung	22
5.6.1 Protokollierung der Ergebnisse	22
5.6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID ₅₀ bzw. PFU)	23
5.7 Verifizierung des Verfahrens	23
5.8 Darstellung der Ergebnisse	24
5.8.1 Allgemeines	24
5.8.2 Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten	24
5.9 Prüfbericht	24
Anhang A (informativ) Beispiele für Viren, sortiert nach ihrer Präsenz im menschlichen Körper im Falle einer Virusinfektion	26
Anhang B (informativ) Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebfiltration	28
B.1 Molekularsiebfiltration mit Sephadex™ LH 20	28
B.1.1 Prinzip	28
B.1.2 Sephadex-Suspension	28
B.1.3 Verfahren	28
B.2 Molekulares Sieben mit MicroSpin™ S 400 HR	30
B.3 Bestimmung des „Restvirus“-Titters mit der Large-Volume-Plating-Methode (LVP- Methode)	30
B.3.1 Allgemeines	30

B.3.2	Beispiel für die Berechnung von Titern und der Reduktion nach der Large-Volume-Plating-Methode.....	31
Anhang C (informativ) Berechnung des viralen Infektiositätstiters.....		33
C.1	Quantalversuche — Beispiel einer Bestimmung der TCID ₅₀ nach dem Spearman-Kärber-Verfahren.....	33
C.2	Plaque-Untersuchungen	34
C.3	Biometrische Bewertung von experimentellen Annäherungen und Beurteilung der desinfizierenden Wirkung auf den Virus (Reduktionsfaktor [R]):	34
C.3.1	Allgemeines	34
C.3.2	Berechnung des Virustiters mit 95%igem Konfidenzintervall	35
C.3.3	Berechnung des Reduktionsfaktors und seines 95%igen Konfidenzintervalls.....	35
C.3.4	Berechnung des durchschnittlichen Reduktionsfaktors (R(mi)) und seines 95%igen Konfidenzintervalls	36
C.3.5	Praktische Beispiele.....	37
Anhang D (informativ) Darstellung der Prüfergebnisse einer wirksamen Konzentration		40
Anhang E (informativ) Quantitative Bestimmung von Formaldehydkonzentrationen		43
Anhang ZA (informativ)  Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EU-Richtlinie 93/42/EWG.....		44
Literaturhinweise.....		45

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 14476:2013+A2:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis A2 Januar 2020 A2, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis A2 Januar 2020 A2 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt A2 EN 14476:2013+A1:2015 A2.

Dieses Dokument enthält die Änderung 1, angenommen von CEN am 2015-07-27 und die Änderung 2, angenommen von CEN am 2019-04-09.

Der Beginn und das Ende von neuem oder geändertem Text durch die Änderung 1 werden durch die Markierungen A1 A1 angezeigt.

Der Beginn und das Ende von neuem oder geändertem Text durch die Änderung 2 werden durch die Markierungen A2 A2 angezeigt.

A1 Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Mandats erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

Zum Zusammenhang mit EU-Richtlinien siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokuments ist. A1

Dieses Dokument wurde überarbeitet, um dieses an den letzten Stand der Wissenschaften anzupassen, Fehler und Mehrdeutigkeiten zu korrigieren, es mit der Struktur und dem Wortlaut der anderen existierenden und in Vorbereitung befindlichen Prüfmethode des CEN/TC 216 zu harmonisieren, die Lesbarkeit zu verbessern und dadurch den Text besser verständlich zu machen. Nachfolgend werden die wesentlichen technischen Änderungen seit der letzten Ausgabe aufgelistet:

- Der Anwendungsbereich wurde auf die folgenden Anwendungsfelder im medizinischen Bereich erweitert; z. B. auf Produkte für die Wäschedesinfektion.
- „Obligatorische Prüfbedingungen“ wurden durch „Mindestprüfbedingungen“ (Prüftemperatur und Einwirkzeit können in Grenzen beliebig ausgewählt werden), die zum Bestehen einer Prüfung absolviert werden müssen, ersetzt.
- Ein zusätzliches modifiziertes Verfahren zur Prüfung von gebrauchsfertigen Produkten mit einer höheren Konzentration als 80 %, z. B. 97 %, wurde beschrieben.

A1

- Für die Verfahren zur hygienischen Händewaschung und Händedesinfektion wurde eine Prüfung zur viruziden Wirksamkeit gegen behüllte Viren mit Vaccinia Virus aufgenommen.

- Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EU-Richtlinie 93/42/EWG über Medizinprodukte wurde aufgenommen (Vorwort und Anhang ZA).
- Der Wert v_n in C.1 wird berichtigt (0,001 anstelle von 0,000 1). ^{A1}

^{A2}

- Für die Flächendesinfektion wurde eine Prüfung für die viruzide Wirksamkeit gegen behüllte Viren mit Vaccinia Virus (begrenzte viruzide Wirksamkeit) und eine Prüfung mit begrenztem Spektrum viruzider Wirksamkeit mit Adenovirus und murinem Norovirus (begrenzte viruzide Wirksamkeit PLUS) aufgenommen.
- Die Schreibweise für Vaccinia Virus wurde korrigiert (Tabelle 1).
- Die Prüfung mit begrenztem Spektrum viruzider Wirksamkeit (begrenzte viruzide Wirksamkeit PLUS) deckt Norovirus, Rotavirus und Adenovirus ab.
- Das Vaccinia Virus Stamm Elstree wurde als alternativer Stamm aufgenommen [5.2.1 c) 1)], [5.5.1.1 e)].
- Für hohe Belastungen (5.2.2.8.3) muss die Resuspendierung in PBS und nicht in Wasser durchgeführt werden (redaktionelle Änderung, die die tatsächliche Praxis widerspiegelt).
- Die Verdünnung in eisgekühltem Medium für die Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Produkts (5.5.5.1) wurde besser beschrieben.
- Das Large-Volume-Plating-Methode (5.5.4.3, B.3) wurde aufgenommen. ^{A2}

^{A2} Die oben genannten Änderungen haben keinen Einfluss auf die Prüfergebnisse, die mit Bezug auf die vorherige Version erhalten wurden. Diese Ergebnisse sind weiterhin gültig. ^{A2}

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, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die Republik Nordmazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Serbien, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

Dieses Dokument beschreibt einen Suspensionsversuch zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder ein Antiseptikum in dem/den im Anwendungsbereich beschriebenen Bereich und Gebieten eine viruzide Wirkung aufweist.

Dieser Laboratoriumsversuch berücksichtigt praktische Anwendungsbedingungen des Produkts, zu denen die Einwirkzeit, die Temperatur, die Prüforganismen und die Belastungssubstanzen gehören, d. h. Bedingungen, die dessen Wirkung in praktischen Situationen beeinflussen können. Jede durch diese Prüfung ermittelte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht den gewählten Versuchsbedingungen.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die viruzide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte als homogene, physikalisch stabile Zubereitung vorliegen, bzw. bei gebrauchsfertigen Produkten, z. B. Produkte, die bei der Anwendung nicht mit Wasser verdünnt werden. Die Produkte können nur bei einer Konzentration von 80 % (97 % bei einem modifizierten Verfahren für Sonderfälle) geprüft werden, da durch Zugabe der Prüfkeime und der Belastungssubstanz immer eine gewisse Verdünnung bewirkt wird.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die im medizinischen Bereich auf den Gebieten der hygienischen Händedesinfektion, hygienischen Händewaschung, Instrumentendesinfektion durch Eintauchen und Oberflächendesinfektion durch Abwischen, Besprühen, Überfluten oder auf sonstige Weise sowie für die Wäschedesinfektion verwendet werden.

Diese Europäische Norm gilt für Bereiche und unter Bedingungen, wo eine Desinfektion aus medizinischen Gründen angezeigt ist. Indikationen dieser Art liegen z. B. vor bei der Patientenbetreuung:

- 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.

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.

ANMERKUNG 3 EN 14885 legt im Einzelnen die Beziehung der verschiedenen Prüfungen untereinander sowie zu den „Anwendungsempfehlungen“ fest.

2 Normative Verweisungen

A2 Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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). **A2**

EN 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Aufbewahrung von Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

EN 14885, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokumentes gelten die Begriffe nach EN 14885 und die folgenden Begriffe.

A2 ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp> **A2**

3.1

Zytotoxizität

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

3.2

plaquebildende Einheiten

PFU

(en: plaque forming units)

Anzahl der infektiösen Viruspartikel je Volumeneinheit (ml)

3.3

Referenz-Inaktivierungsprüfung von Viren

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

3.4

TCID₅₀

50 %-Infektionsdosis einer Virussuspension oder der Verdünnung der Virussuspension, die in 50 % der Zellkultureinheiten eine virale zytopathologische Wirkung (CPE) (3.5) auslöst

3.5

virale zytopathologische Wirkung

CPE

(en: viral cytopathic effect)

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

3.6

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

3.7

Virustiter

Menge der in einem Zellkulturlysate oder in einer Lösung je Volumeneinheit vorhandenen infektiösen Viren

4 Anforderungen

Bei Prüfung in Übereinstimmung mit Tabelle 1 und Abschnitt 5, muss für das Produkt eine dezimal-logarithmische Reduktion (lg) um mindestens vier Stufen des Virustiters nachgewiesen werden.

Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Hygienische Händedesinfektion und Händewaschung	Instrumenten-desinfektion	Oberflächen-desinfektion	Wäsche-desinfektion
Mindestspektrum von Prüforganismen	Ⓐ₂ Viruzide Wirksamkeit Ⓐ₂ Poliovirus Adenovirus murines Norovirus Begrenzte viruzide Wirksamkeit PLUS^a Adenovirus murines Norovirus Ⓐ₁ Begrenzte viruzide Wirksamkeit^b Vaccinia Virus Ⓐ ₁	Ⓐ₂ Viruzide Wirksamkeit Ⓐ₂ Poliovirus Adenovirus murines Norovirus Wenn die Temperatur 40 °C oder mehr beträgt: nur Parvovirus	Ⓐ₂ Viruzide Wirksamkeit Ⓐ₂ Poliovirus Adenovirus murines Norovirus Ⓐ₂ Begrenzte viruzide Wirksamkeit PLUS^a Adenovirus murines Norovirus Begrenzte viruzide Wirksamkeit^b Vaccinia Virus Ⓐ ₂	Parvovirus
zusätzlich:	Jeder zutreffende Prüforganismus			
Prüftemperatur	20 °C	20 °C und 70 °C	4 °C und 30 °C	30 °C und 70 °C
Einwirkzeit	zwischen 30 s und 120 s	60 min	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber nicht länger als 5 min oder 60 min ^c	20 min
Belastungssubstanzen	niedrige Belastung 0,3 g/l Rinderserum-albuminlösung (hygienische Händedesinf.) ^d hohe Belastung 3,0 g/l Rinderserum-albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten (hygienische Händewaschung) ^e	0,3 g/l Rinderserum-albuminlösung und/oder 3,0 g/l Rinderserum-albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten	0,3 g/l Rinderserum-albuminlösung und/oder 3,0 g/l Rinderserum-albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten	3,0 g/l Rinderserum-albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten
Zusätzliche Belastung ^f	niedrige oder hohe Belastung ^{d,e} ; jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz
^a Ⓐ₂ Die Prüfung mit „begrenztem Spektrum viruzider Wirksamkeit (begrenzte viruzide Wirksamkeit PLUS)“ deckt alle behüllten Viren (Anhang A) sowie Norovirus, Rotavirus und Adenovirus ab. Ⓐ₂ ^b Ⓐ₁ Die Prüfung für die Ⓐ₂ „viruzide Wirksamkeit gegen behüllte Viren (begrenzte viruzide Wirksamkeit)“ Ⓐ₂ deckt nur alle behüllten Viren (Anhang A) ab. Ⓐ₁ ^c Die in dieser Tabelle angegebenen Einwirkzeiten für Oberflächendesinfektionsmittel werden auf der Grundlage der praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts ausgewählt. Die empfohlene Einwirkzeit für die Anwendung des Produkts liegt in der Verantwortung des Herstellers. Produkte, die zur Desinfektion von Oberflächen vorgesehen sind, die wahrscheinlich mit dem Patienten und/oder dem medizinischen Personal in Kontakt kommen, und Oberflächen, die häufig von verschiedenen Personen berührt werden, was zu einer Übertragung von Mikroorganismen auf den Patienten führt, sind mit einer Einwirkzeit von höchstens 5 min zu prüfen. Das Gleiche gilt für Fälle, bei denen die Einwirkzeit des Produktes aus praktischen Gründen begrenzt sein muss. Produkte für alle weiteren als die oben angeführten Oberflächen dürfen mit einer Einwirkzeit von höchstens 60 min geprüft werden. ^d Die Mittel für die hygienische Händedesinfektion müssen mindestens unter den Bedingungen niedriger Belastung geprüft werden. ^e Die Mittel für die hygienische Händewaschung müssen mindestens unter den Bedingungen hoher Belastung geprüft werden. ^f Die Konzentrationen, die sich als Ergebnis der Prüfungen unter zusätzlichen Belastungen ergeben, können niedriger sein als die, die unter den Mindestprüfbedingungen gewonnen wurden.				

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Einer Prüfsuspension von Viren in einer Lösung einer Belastungssubstanz wird eine Probe des Produkts im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (oder Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten) verdünnten Produkts zugegeben. Das Gemisch wird bei einer der in Abschnitt 4 und 5.5.1.1 festgelegten Temperaturen und Einwirkzeiten gehalten. Nach dem Ende dieser Einwirkzeit wird ein aliquoter Anteil entnommen; die viruzide Wirkung in dieser Probenmenge wird sofort nach einem validierten Verfahren unterdrückt (Verdünnung der Probe in eisgekühltem Zellerhaltungsmedium). Die Verdünnungen werden in Zellkulturgefäße (Petrischalen, Röhrchen oder die Vertiefungen von Mikrotiterplatten) übertragen, entweder unter Verwendung von einschichtigen Zelllagen oder von Zellsuspensionen. Infektiositätsprüfungen werden entweder als Plaqueversuch oder als Quantalversuche durchgeführt. Nach der Bebrütung wird der Infektiositätstiter nach Spearman-Kärber (Quantalversuch, C.1) oder durch Plaque-Zählung (Plaque-Untersuchung, C.2) berechnet und bewertet. Die Reduktion der Infektiosität der Viren wird aus den Differenzen der logarithmischen Virustiter vor (Viruskontrolle) und nach der Behandlung mit dem Produkt berechnet.

ANMERKUNG Handwaschprodukte werden immer mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) vorverdünnt. Die sich ergebende Lösung wird als gebrauchsfertiges Produkt (5.4.2) angesehen.

5.1.2 Die Prüfung wird unter Verwendung der in Abschnitt 4, Tabelle 1 angegebenen Prüforganismen durchgeführt.

5.1.3 Andere Einwirkzeiten und Temperaturen können innerhalb bestimmter in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegter Grenzen verwendet werden. Zusätzliche Belastungssubstanzen und Prüforganismen dürfen verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien, inklusive Zellkulturen

5.2.1 Prüforganismen

Die viruzide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden als Prüforganismen ausgewählten Stämme nach Abschnitt 4, Tabelle 1 bewertet werden¹⁾:

a) Hüllenloses RNA-Virus²⁾

- 1) Poliovirus Typ 1, LSc-2ab (Picornavirus)
- 2) Murines Norovirus, Stamm S99 Berlin

b) Hüllenloses DNA-Virus

- 1) Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75, ATCC VR-5*

1) Die ATCC Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von diesen Kultursammlungen geliefert werden. Diese Information dient zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

2) Virusstämme dürfen von nationalen oder internationalen Kultursammlungen bezogen werden. In Bezug auf Polioviren darf nur Virusmaterial verwendet werden, das die Anforderungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für die Herstellung von oralen Polio-Impfstoffen bestanden hat. (Andere von LSc-2ab abgeleitete Stämme können nicht mehr verwendet werden.) LSc-2ab können vom NIBSC (www.nibsc.ac.uk; Kontakt: Dr. Javier Martin) oder vom Eurovir Hygiene Institut (www.eurovir.de; Kontakt: Dr. Jursch) bezogen werden.

Das Murine Norovirus kann vom Friedrich-Loeffler-Institut  Bundesforschungsinstitut  für Tiergesundheit, Hauptsitz Insel Riems Südufer 10, 17493, Greifswald-Insel Riems (Tel.: +49 38351 7-0, Fax: +49 038351 7-121, <http://www.fli.bund.de>) bezogen werden.

- 2) Murines Parvovirus, Minute Virus of Mice (MVM), Stamm Crawford, ATCC VR-1346

Ⓐ₁

c) Behüllter DNA Virus

- 1) Ⓐ₂ Modifizierter Vaccinia Virus Ankara (MVA), ATCC VR-1508 oder Vaccinia Virus Stamm Elstree, ATCC VR-1549. Ⓐ₂ Ⓐ₁

Die geforderte Bebrütungstemperatur für diese Prüfkeime beträgt $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.1.3). Die gleiche Temperatur (entweder 36°C oder 37°C) ist für alle Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung anzuwenden.

Wenn zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, sind diese unter den im Prüfbericht vermerkten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien) aufzubewahren und zu verwenden. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht an einem Referenzzentrum klassifiziert wurden, sind deren Identifizierungsmerkmale anzugeben. Darüber hinaus müssen sie von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kultursammlung für fünf Jahre als Referenzprobe zurückgestellt werden.

5.2.2 Kulturmedien, Reagenzien und Zellkulturen

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in dieser Europäischen Norm angegebenen Massen chemischer Substanzen beziehen sich auf die wasserfreien Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um daraus folgende Differenzen in den relativen Molekülmassen zu berücksichtigen

Die Reagenzien müssen analysenrein und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Sie müssen frei von Substanzen sein, die toxisch oder hemmend auf die Prüforganismen wirken.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien handelsübliche Materialien verwendet werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten genau befolgt werden.

Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte eine zeitliche Begrenzung der Verwendung festgelegt werden.

Alle festgelegten pH-Werte werden bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gemessen.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes und darf nicht entmineralisiertes Wasser sein. Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, darf Wasser für Injektionszwecke (siehe Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.1.1 a)]. Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

Hinsichtlich des Verfahrens zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.7.

5.2.2.3 Phosphatpuffer-Kochsalz-Lösung (PBS)

Natriumchlorid (NaCl)	8,00 g
Kaliumchlorid (KCl)	0,20 g
Dinatriumhydrogenphosphat, 12fach verdünnt ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$)	2,89 g
Kaliumphosphat, einbasisch (KH_2PO_4)	0,20 g
Wasser (5.2.2.2)	auf 1 000,0 ml

5.2.2.4 Neutralrot (1 : 1 000 Lösung)

Die Stammlösung wird aus 0,1 mg/ml Neutralrot (Sigma N7005) in Wasser (5.2.2.2) hergestellt. Anschließend wird diese durch einen Filter mit der Porengröße 0,40 µm gefiltert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

5.2.2.5 Fötale Kälberserum (FCS)

Das FCS muss zertifiziert frei von Viren und Mykoplasmen sein. Überflüssige Viren und Mykoplasmen können das Zell- und Virenwachstum beeinflussen und zu falschen Ergebnissen führen.

Für RAW 264.7 Zellen ist ein spezielles FCS aufgrund der hohen Zellempfindlichkeit gegenüber Endotoxinen zu verwenden.

5.2.2.6 Trichloressigsäure (10%-Lösung) (TCA)

10 g der TCA-Kristalle werden mit 80 ml Wasser (5.2.2.2) verdünnt, dann wird das Volumen auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt. Durch Umrühren wird die Lösung vervollständigt.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

Die Vorgehensweise bei der Herstellung von 1 l Wasser standardisierter Härte ist wie folgt:

- Herstellung von Lösung A: Es werden 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.1.7) oder im Autoklaven [5.3.1.1 a)]. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall ist mit Wasser (5.2.2.2) unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lösung im Kühlschrank (5.3.1.8) nicht länger als einen Monat lagern.
- Herstellung Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.1.7) sterilisiert. Die Lösung im Kühlschrank (5.3.1.8) nicht länger als eine Woche lagern.
- 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) werden in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.1.12) gegeben, dazu gegeben werden 6,0 ml (5.3.1.9) Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B. Nach Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen (5.3.1.4). 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) Salzsäure (HCl) eingestellt.

Das Wasser standardisierter Härte ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

ANMERKUNG Bei Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produkts zum Wasser standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte, angegeben als Calciumcarbonat (CaCO_3), im Reagenzglas unter 375 mg/l.

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz muss nach den für das Produkt festgelegten Anwendungsbedingungen ausgewählt werden.

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem 10fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht (dem 50fachen im Falle des modifizierten Verfahrens, 5.2.2.8.4).

Die Ionenzusammensetzung (z. B. pH-Wert, Calcium- und/oder Magnesiumhärte) und die chemische Zusammensetzung (z. B. Mineralstoffe, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Detergenzien) müssen festgelegt sein.

„Verdünnungsmittel“ werden üblicherweise in anderen Europäischen Normen im medizinischen Bereich zur Herstellung der Belastungssubstanzen verwendet. Da es im Bereich der Viruzidie-Prüfung keine Erfahrungen mit Verdünnungsmitteln gibt, wird anstelle dessen Wasser (5.2.2.2) verwendet.

ANMERKUNG Der Begriff „Belastungssubstanz“ wird auch dann verwendet, wenn es sich um mehrere Substanzen handelt.

5.2.2.8.2 Bedingungen niedriger Belastung (Rinderserumalbuminlösung — geringe Konzentration)

In 100 ml Wasser (5.2.2.2) werden 0,30 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.1.7), die Lösung ist in einem Kühlschrank (5.3.1.8) aufzubewahren und innerhalb von einem Monat zu verbrauchen.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins in dem Prüfverfahren (5.5) muss 0,3 g/l betragen.

5.2.2.8.3 Bedingungen hoher Belastung (Gemisch von Rinderserumalbuminlösung in hoher Konzentration mit Schaf-Erythrozyten)

In 97 ml Wasser (5.2.2.2) werden 3,00 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.1.7).

Es werden mindestens 8,0 ml frisches defibriniertes Schafsblut (5.2.2.9) hergestellt. Die Erythrozyten werden bei 800 g_N für 10 min (5.3.1.13) abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Erythrozyten in A_2 PBS (5.2.2.3) A_2 resuspendiert. Dieser Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt, bis der Überstand farblos ist.

3 ml der angereicherten (gepackten) Schaf-Erythrozyten werden in den 97 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung (siehe oben) resuspendiert. Um eine spätere Kontamination zu verhindern, sollte dieses Gemisch in Portionen aufgeteilt werden, die wahrscheinlich an einem Tag verwendet werden, und in gesonderten Behältern in einem Kühlschrank (5.3.1.8) für höchstens 7 Tage gelagert werden.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins und der Schaf-Erythrozyten im Prüfverfahren (5.5) muss 3 g/l bzw. 3 ml/l betragen.