

DIN EN 14675

ICS 11.080.20; 11.220

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden
Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den
Veterinärbereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 14675:2006**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical
disinfectants and antiseptics used in the veterinary area –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German version EN 14675:2006

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et
des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);
Version allemande EN 14675:2006

Gesamtumfang 32 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm wurde von der Arbeitsgruppe 2 „Veterinary“ (Sekretariat: BSI) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ (Sekretariat: AFNOR) unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der Arbeitsgruppe 2 des CEN/TC 216 wird über den Arbeitsausschuss „Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Deutsche Fassung

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden
Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den
Veterinärbereich —
Prüfverfahren und Anforderungen
(Phase 2, Stufe 1)**

Chemical disinfectants and antiseptics —
Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal
activity of chemical disinfectants and antiseptics used
in the veterinary area —
Test method and requirements
(phase 2, step 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité
virucide des antiseptiques et des désinfectants chimiques
utilisés dans le domaine vétérinaire —
Méthode d'essai et prescriptions
(phase 2, étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 26. September 2005 angenommen.

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
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen.....	5
3 Begriffe	5
4 Anforderungen	7
5 Prüfverfahren	7
5.1 Kurzbeschreibung	7
5.2 Materialien und Reagenzien	7
5.3 Apparate und Glasgeräte	14
5.4 Produkt-Prüflösungen	15
5.5 Verfahren zur Bewertung der viruziden Wirkung des Produktes	16
5.6 Infektiositäts-Versuch	17
5.7 Viruzidieprüfung – Vorbereitung.....	18
6 Berechnung und Angabe der Ergebnisse.....	19
6.1 Versuchsprotokoll zum CPE-Ergebnis.....	19
6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (KID50).....	19
6.3 Berechnung der PFU	19
6.4 Verifizierung der Methodik.....	19
6.5 Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten.....	19
6.6 Angabe der Ergebnisse.....	19
7 Schlussfolgerung.....	20
7.1 Allgemeines.....	20
7.2 Prüfbericht.....	20
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	22
Anhang B (normativ) Zytotoxizität, Inaktivierungs-Bezugsprüfung und Titration des Prüfvirus	23
Anhang C (informativ) Berechnung des viralen Infektiositätstiters und der plaque-bildenden Einheiten	24
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts	26
Anhang E (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation Europäischer Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika	28
Literaturhinweise	30

Vorwort

Dieses Dokument (EN 14675:2006) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ 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 August 2006, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2006 zurückgezogen werden.

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.

Einleitung

Diese Europäische Norm legt einen Suspensionsversuch zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum in den Bereichen, die im Anwendungsbereich beschrieben sind, eine viruzide Wirkung hat oder nicht, fest.

Der Laborversuch simuliert nahezu die praktischen Anwendungsbedingungen. Die gewählten Bedingungen, z. B. Einwirkzeit, Temperatur, Prüforganismen, Belastungssubstanzen, stellen Parameter dar, die in der Praxis angetroffen werden, und schließen Bedingungen ein, die die Wirkung der Antiseptika oder chemischen Desinfektionsmittel beeinflussen können.

Die Bedingungen sollen die allgemeinen Ansprüche berücksichtigen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten zulassen. Jede durch diesen Versuch ermittelte anwendbare Nutzkonzentration für ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum bezieht sich auf die definierten Versuchsbedingungen. Bei einigen Anwendungen können jedoch die Gebrauchsempfehlungen für ein Produkt unterschiedlich sein, woraus die Notwendigkeit zur Anwendung zusätzlicher Versuchsbedingungen erwächst.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die viruzide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die, bei Verdünnung mit hartem Wasser oder — bei der Verwendung von gebrauchsfertigen Produkten — mit Wasser, eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung bilden. Die Produkte können nur bei einer Konzentrationen von 80 % oder darunter geprüft werden, da durch die Zugabe der Prüforganismen und der Belastungssubstanz immer eine Verdünnung hervorgerufen wird.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die im Veterinärbereich eingesetzt werden, d. h. bei der Aufzucht, Haltung, Produktion, beim Transport und bei der Tierkörperbeseitigung aller Tierarten mit Ausnahme der Bereiche, in denen Tiere direkt nach der Tötung als Nahrungsmittel verwendet oder der weiterverarbeitenden Industrie zugeführt werden.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren ist zur Bestimmung der viruziden Wirksamkeit von im Handel erhältlichen Zubereitungen oder aktiven Substanzen unter Anwendungsbedingungen vorgesehen.

ANMERKUNG 2 Das Verfahren entspricht einem Versuch der Phase 2/Stufe 1 (Anhang E).

2 Normative Verweisungen

Nicht anwendbar.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Produkt

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

3.2

Viruzid

Produkt, das Viren unter vorgegebenen Bedingungen inaktiviert

ANMERKUNG Das von „Viruzid“ abgeleitete Adjektiv ist „viruzid“.

3.3

viruzide Wirkung

Fähigkeit eines Produktes, die Anzahl infektiöser Viruspartikel entsprechender Prüforganismen unter vorgegebenen Bedingungen zu vermindern

3.4

virale Infektiosität

Fähigkeit eines Virus, in Zellen seine genetische Information auszudrücken und/oder in ihnen eine infektiöse Nachkommenschaft zu vervielfachen

3.5

Inaktivierung von Viren

Verminderung der Infektiosität eines Virus durch ein Produkt

ANMERKUNG Eine Änderung der antigenen Reaktivität oder irgendeiner viralen Komponente bedeutet nicht zwangsläufig eine Infektiositätsverminderung eines Virus.

3.6

Virus-Bezugssuspension

Virussuspension eines festgelegten Virenstammes, der zur Weiterzüchtung nicht öfter als zehnmal überimpft ist, die in der nationalen Kultursammlung gehalten und in kleinen Volumina (weniger als 1 ml) bei -196 °C auf flüssigem Stickstoff aufbewahrt wird

ANMERKUNG Virus-Stammsuspensionen werden aus den Virus-Bezugssuspensionen hergestellt.

3.7

Virus-Stammsuspension

Virussuspension eines vorgegebenen Virenstammes, die zum Erhalt einer Virussuspension mit den gleichen Eigenschaften wie die Virus-Bezugssuspension in großem Umfang vervielfacht wurde und in kleinen Volumina bei einer Temperatur von unter -70 °C oder vorzugsweise -196 °C auf flüssigem Stickstoff aufbewahrt wird

3.8

Virus-Prüfsuspension

Virensuspension, die zum Prüfen des Desinfektionsmittel auf viruzide Wirkung verwendet wird

3.9

Virus-Titer

Menge an infektiösem Virus je Volumeneinheit, die in einem Zellkulturlysate vorhanden ist

3.10

Virusinaktivierungs-Bezugsversuch

eine Prüfung zur internen Versuchskontrolle mit definiertem Reagenz (z. B. Formalin) anstatt eines Produktes

Die Ergebnisse des Virusinaktivierungs-Bezugsversuches müssen innerhalb der Grenzen für die Validierung des Verfahrens liegen.

3.11

Zytotoxizität

morphologische Veränderung von Zellen und/oder ihre verminderte Empfindlichkeit von Zellen gegenüber der Virusvermehrung, verursacht durch das Produkt

3.12

viraler zytopathischer Effekt (CPE)

die morphologische Änderung und/oder Zerstörung von Zellen als eine Folge der Virusvermehrung

3.13

gewebekulturinfektiöse Dosis (KID_{50})

Virendosis, die eine zytopathische Änderung (CPE) in 50 % der beimpften Zellkulturen hervorruft

3.14

virale Plaque

in einer Einschichtkultur unter halbfestem Medium gebildetes Lysisgebiet auf Grund einer Infektion durch und der Vervielfältigung eines einzelnen infektiösen Viruspartikels

3.15

plaque-bildende Einheiten (PFU)

Anzahl infektiöser Viruspartikel je Volumeneinheit (ml)

4 Anforderungen

Das Produkt muss, wenn es mit hartem Wasser (5.2.2.3) oder — im Fall von Fertigprodukten — mit Wasser (5.2.2.2) verdünnt und nach **Abschnitt 5** mit simulierter geringfügiger Belastung (3 g/l Rinderalbumin-Lösung) (5.2.2.4.2) oder simulierter hochgradiger Belastung (Lösung mit 10 g/l Rinderserumalbumin und 10 g/l Hefeextrakt) (5.2.2.4.3) entsprechend dessen praktischen Anwendungen und unter den anderen verbindlichen Versuchsbedingungen: 1 ausgewählter Prüforganismus, 10 °C, 30 min, geprüft wurde, mindestens eine logarithmische Verminderung des Virus-Titers um 4 zur Folge haben. Es ist auch möglich, das Produkt in dessen gelieferter Form zu prüfen (die höchste Prüfkonzentration beträgt 80 %).

Die viruzide Wirkung muss unter Verwendung des folgenden Prüforganismus bewertet werden: *Bovine enterovirus* vom Typ 1 (ECBO).

Falls angegeben, muss zusätzlich eine bestimmte viruzide Wirkung mit anderen Einwirkzeiten, Temperaturen und Prüforganismen nach 5.2.1 und 5.5.1.1 bestimmt werden, um die vorgesehenen spezifischen Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

ANMERKUNG Für diese zusätzlichen Bedingungen kann die als Ergebnis festgelegte Konzentration niedriger als die unter den verbindlichen Prüfbedingungen erhaltene Konzentration sein.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Probe des Produktes in dessen gelieferter Form und/oder verdünnt mit hartem Wasser (oder mit Wasser bei Fertigprodukte) wird zu einer Prüfsuspension des Virus in einer Lösung einer Belastungssubstanz zugegeben. Das Prüfgemisch wird bei 10 °C ± 1 °C für 30 min ± 10 s (verbindliche Prüfbedingungen) gehalten.

Am Ende der Einwirkzeit werden 0,5 ml Virus-Desinfektionsmittel-Gemisch entnommen. Die viruzide Wirkung wird sofort durch Verdünnen in eiskaltem Verdünnungsmittel unterdrückt. Anschließend wird in einem für 10 min im Eisbad belassenen eiskalten Medium eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 hergestellt. Die Verdünnungen sollten in Reagenzgläsern (5.3.2.9) oder Mikrotiterplatten (5.3.2.8) hergestellt werden. Die Pipetten sind nach jedem Verdünnungsansatz zu wechseln, um das Übertragen von Viren zu vermeiden.

Die Verdünnungen werden in die Zellkultureinheiten (Kavitäten der Mikrotiterplatten) mit den suspendierten Zellen überführt. Mit jeder Verdünnung müssen jeweils acht Einheiten beimpft werden. Nach der Bebrütung wird der Infektiositätstiter berechnet. Die Titrationsergebnisse der Quanten-Assays müssen die Verdünnungsstufen mit dem Prozentsatz positiver Ergebnisse (CPE oder Plaque treten auf) zwischen 100 % und 0 % wiedergeben. Die Werte werden nach Spearman und Kärber berechnet (siehe Anhang C).

Die Werte der Virusinaktivierung werden aus den Differenzen der Virustiter vor und nach der Behandlung mit dem Produkt berechnet.

5.1.2 Zusätzliche und optionale Einwirkzeiten und Temperaturen sind festgelegt. Zusätzliche Prüforganismen können verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfvirus

Die viruzide Wirkung muss unter Verwendung des folgenden Stammes bewertet werden:

— *Bovine enterovirus* Typ 1 (en: Enteric Cytopathogenic Bovine Orphan Virus – ECBO) ATCC VR-248¹⁾

1) ATCC VR-248 ist ein Stamm, der von der Kultursammlung American Type Culture Collections ausgegeben wird. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und stellt keine Bestätigung des genannten Produktes durch das CEN dar. Ein entsprechender Stamm, der von anderen Kultursammlungen geliefert wird, darf verwendet werden, wenn dieser nachweisbar zu gleichen Ergebnisse führt.

ANMERKUNG 1 *Bovine enterovirus* Typ 1, ECBO-Stamm, wurde als Modellvirus für das große Genus *Picornavirus* ausgewählt. Zum Genus *Picornavirus* gehören viele klinisch bedeutende Virusarten, zum Beispiel Coxsackieviren A und B und humane ECHO-Viren (en: Enteric cytopathogenic human orphan viruses). Einige dieser Viren sind von vorrangiger Bedeutung und stellen daher ein gleich bleibendes Risiko für Tiere im Veterinärbereich dar. Außerdem weisen sie eine hohe Resistenz gegenüber Chemikalien auf, sind säurebeständig (mit Ausnahme der Rhinoviren) und werden von Lipid-Lösemitteln wie Ether, den meisten Reinigungsmitteln oder quarternären Ammoniumprodukten nicht angegriffen.

ANMERKUNG 2 Es ist das Modellvirus für alle Anwendungen, und zwar für die Desinfektion von Instrumenten und Oberflächen und Nachkontaminationsbehandlung von Obduktionsräumen, Zwingern und bei Tierunterbringungen.

ANMERKUNG 3 Auf Grund der großen Resistenzunterschiede gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen zwischen und innerhalb von Virusgruppen ist das Prüfen aller Viren gegenüber jedem einzelnen chemischen Desinfektionsmittel oder Antiseptikum finanziell nicht möglich. Deshalb wird in dieser Europäischen Norm das Prüfen auf nur einen so genannten „Modellvirus“ beschränkt, der auf der Grundlage des derzeitigen Wissensstandes als repräsentatives Beispiel für die Viruswiderstandsfähigkeit und die bedeutende klinische Relevanz im Veterinärbereich ausgewählt wurde. Wenn ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum eine den Anforderungen dieser Europäischen Norm entsprechende viruzide Wirkung zeigt, kann es für eine Prüfung der Phase 2/Stufe 2 (siehe Anhang E) in Erwägung gezogen werden.

ANMERKUNG 4 Wenn hinsichtlich der Verminderung von Virenvermehrung, Virusinfektiosität oder Zytotoxizität durch Produkte Verbesserungen in der Methodik ausgearbeitet wurden, dürfen diese zur Darstellung der Verbesserung parallel zur Methodik, die in diesem Verfahren beschrieben ist, angewendet werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle Gewichtsangaben von chemischen Substanzen in dieser Europäischen Norm beziehen sich auf wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die geforderten Gewichtsangaben müssen so eingestellt werden, dass sie daraus folgende Molekulargewichtsdifferenzen ermöglichen.

Die Reagenzien müssen analysenrein und/oder für virologische Zwecke geeignet sein. Sie müssen frei von Substanzen sein, die für den Prüforganismus toxisch oder hemmend wirken.

ANMERKUNG 1 Um die Vergleichspräzision zu verbessern, wird empfohlen, kommerziell erhältliche wasserfreie Materialien zur Herstellung von Kulturmedien zu verwenden. Die Anweisung des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollte strengstens befolgt werden.

ANMERKUNG 2 Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte eine Verwendungsbeschränkung festgesetzt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliert und darf kein demineralisiertes Wasser sein.

Es wird im Autoklaven [5.3.2.1a)] sterilisiert.

ANMERKUNG 1 Die Sterilisation ist nicht erforderlich, wenn das Wasser zunächst verwendet wird — z. B. zur Herstellung von Kulturmedien — und anschließend eine Sterilisation erfolgt.

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

ANMERKUNG 3 Für das Verfahren zur Herstellung von hartem Wasser siehe 5.2.2.3.