

DIN EN 16777



ICS 11.080.20

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Versuch auf nicht porösen Oberflächen ohne mechanische
Einwirkung zur Bestimmung der viruziden Wirkung im
humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche Fassung EN 16777:2018**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal
activity of chemical disinfectants used in the medical area –
Test method and requirements (phase 2, step 2);
German version EN 16777:2018

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de surface non poreuse sans action mécanique pour l'évaluation de l'activité
virucide désinfectants chimiques utilisés dans le domaine médical –
Méthode d'essai et exigences (phase 2, étape 2);
Version allemande EN 16777:2018

Gesamtumfang 43 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16777:2018) wurde von der Arbeitsgruppe 1 „Humanmedizin“ (Sekretariat: DIN) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

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

Deutsche Fassung

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitativer Versuch auf nicht porösen Oberflächen ohne
mechanische Einwirkung zur Bestimmung der viruziden
Wirkung im humanmedizinischen Bereich —
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)**

Chemical disinfectants and antiseptics —
Quantitative non-porous surface test without
mechanical action for the evaluation of virucidal activity
of chemical disinfectants used in the medical area —
Test method and requirements (phase 2/step 2)

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Essai quantitatif de surface non poreuse sans action
mécanique pour l'évaluation de l'activité virucide des
désinfectants chimiques utilisés dans le domaine médical —
Méthode d'essai et exigences (phase 2/étape 2)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 24. September 2018 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 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, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, 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	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	7
4 Anforderungen an die viruzide Wirkung auf Oberflächen	7
5 Prüfverfahren	9
5.1 Kurzbeschreibung	9
5.2 Materialien und Reagenzien, inklusive Zellkulturen	9
5.2.1 Prüfkeime	9
5.2.2 Kulturmedien, Reagenzien und Zellkulturen	10
5.3 Apparate und Glasgeräte	14
5.3.1 Allgemeines	14
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	14
5.3.3 Prüfflächen	15
5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und der Produktprüflösungen	16
5.4.1 Prüfkeimsuspensionen (Prüfvirussuspension)	16
5.4.2 Produktprüflösung	16
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts	17
5.5.1 Versuchsbedingungen	17
5.5.2 Prüfverfahren	18
5.5.3 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität	20
5.5.4 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Desinfektionsmittels	21
5.5.5 Referenz-Inaktivierungsprüfung von Viren	21
5.5.6 Titration der Viruskontrollprobe	21
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	22
5.6.1 Protokollierung der Ergebnisse	22
5.6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID ₅₀ bzw. PFU)	22
5.7 Verifizierung des Verfahrens	22
5.8 Auswertung	23
5.8.1 Allgemeines	23
5.8.2 Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten	23
5.9 Prüfbericht	24
Anhang A (informativ) Beispiele für Viren, sortiert nach ihrem Vorkommen im menschlichen Körper im Falle einer Virusinfektion	26
Anhang B (normativ) Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebung	28
B.1 Molekularsiebung mit Sephadex™ LH 20	28
B.1.1 Kurzbeschreibung	28
B.1.2 Sephadex-Suspension	28
B.1.3 Durchführung	28
B.2 Molekulares Sieben mit MicroSpin™ S 400 HR	30

B.3	Bestimmung des „Restvirus“-Titers mit der Large-Volume-Plating (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 (Reduktion [R]):.....	35
C.3.1	Allgemeines	35
C.3.2	Berechnung des Virustiters mit 95 %-Vertrauensbereich — Beispiel	35
C.3.3	Berechnung der Reduktion und des zugehörigen 95 %-Vertrauensbereichs	36
C.3.4	Berechnung der durchschnittlichen Reduktion ($R_{(mi)}$) und des zugehörigen 95 %-Vertrauensbereichs	37
C.3.5	Praktische Beispiele.....	38
Literaturhinweise.....		41

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 16777:2018) 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 Juni 2019, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 2019 zurückgezogen werden.

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

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, 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 ein Oberflächenprüfverfahren zur Feststellung, ob ein als Desinfektionsmittel vorgeschlagenes Produkt in den in Abschnitt 1 beschriebenen Gebieten eine viruzide Wirkung auf nicht porösen Oberflächen aufweist oder nicht.

Der Laboratoriumsversuch simuliert praxisnahe Anwendungsbedingungen. Die gewählten Bedingungen (Einwirkzeit, Temperatur, Organismen auf Oberflächen usw.) widerspiegeln Parameter, die in praktischen Situationen gefunden werden, einschließlich Bedingungen, die die Wirkung von Desinfektionsmitteln beeinflussen können. Jede durch diese Prüfung ermittelte Gebrauchskonzentration entspricht festgelegten Versuchsbedingungen.

Die Bedingungen sollen allgemeinen Ansprüchen genügen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten ermöglichen. Jede in dieser Prüfung ermittelte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht festgelegten Versuchsbedingungen.

Für bestimmte Anwendungszwecke können jedoch die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt abweichen und deshalb sind möglicherweise zusätzliche Prüfbedingungen notwendig, die nicht von diesem Dokument abgedeckt werden können.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die viruzide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte als homogene, physikalisch stabile Zubereitung vorliegen, beziehungsweise bei gebrauchsfertigen Produkten bei Verdünnung mit Wasser.

Dieses Dokument gilt für Produkte, die im medizinischen Bereich zur Desinfektion von nicht porösen Oberflächen, einschließlich Oberflächen auf Medizinprodukten, ohne mechanische Einwirkung verwendet werden.

Dieses Dokument 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 Wirkung von handelsüblichen Zubereitungen oder Wirkstoffen auf Viren unter den Bedingungen, unter denen sie angewendet werden.

ANMERKUNG 2 Dieses Verfahren entspricht einer Prüfung der Phase 2, Stufe 2.

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

2 Normative Verweisungen

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).

EN 14476, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

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*

EN 10088-1, *Nichtrostende Stähle — Teil 1: Verzeichnis der nichtrostenden Stähle*

EN 10088-2, *Nichtrostende Stähle — Teil 2: Technische Lieferbedingungen für Blech und Band aus korrosionsbeständigen Stählen für allgemeine Verwendung*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 14885 und EN 14476.

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

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

4 Anforderungen an die viruzide Wirkung auf Oberflächen

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 der Prüfstämme Adenovirus und murines Norovirus nachgewiesen werden. Wie in EN 14885 beschrieben, muss das Produkt für die Auslobung der viruziden Wirksamkeit gegen behüllte Viren (begrenzte viruzide Wirksamkeit) sowohl die Anforderungen nach EN 14476 als auch nach dieser Norm mit Vaccinia Virus erfüllen und für die Auslobung eines begrenzten Spektrums viruzider Wirksamkeit (begrenzte viruzide Wirksamkeit PLUS) müssen die Anforderungen nach EN 14476 und nach dieser Norm mit Adenovirus und murinem Norovirus erfüllt werden. Um jedoch die viruzide Wirkung auszuloben, muss das Produkt die Normen EN 14476 mit Poliovirus, Adenovirus und murinem Norovirus sowie nach dieser Norm mit Adenovirus und murinem Norovirus erfüllen, da Poliovirus nicht trocknungsbeständig ist.

Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen

Minimalspektrum von Prüfviren	Viruzide Wirksamkeit^a Adenovirus murines Norovirus Begrenzte viruzide Wirksamkeit PLUS^b Adenovirus murines Norovirus Begrenzte viruzide Wirksamkeit^c Vaccinia Virus
Prüftemperatur	zwischen 18 °C und 25 °C
Zusätzliche Temperatur	zwischen 4 °C und 30 °C
Einwirkzeit	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber nicht länger als 5 min oder 60 min ^d
Belastungssubstanzen a) niedrige Belastung b) hohe Belastung	0,3 g/l Rinderserumalbumin und/oder 3,0 g/l Rinderserumalbumin plus 3,0 ml Erythrozyten
Zusätzliche Bedingungen ^e	Weitere Einwirkzeit(en), Belastungssubstanz(en) oder Virus (Viren)
^a Poliovirus (wie es im entsprechenden Suspensionsversuch verwendet wird) kann für Oberflächen nicht verwendet werden, da es nicht trocknungsbeständig ist. ^b Die Prüfung mit begrenztem Spektrum viruzider Wirksamkeit (begrenzte viruzide Wirksamkeit PLUS) deckt alle behüllten Viren (Anhang A) sowie Norovirus, Rotavirus und Adenovirus ab. ^c Die Prüfung für die viruzide Wirksamkeit gegen behüllte Viren (begrenzte viruzide Wirksamkeit) deckt nur alle behüllten Viren (Anhang A) ab. ^d 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. ^e Wenn es angemessen ist (besondere Zwecke), muss die zusätzliche spezifische viruzide Wirkung unter anderen Bedingungen hinsichtlich der Zeit, Temperatur und Belastungssubstanzen (siehe 5.2.2.8) nach 5.5 bestimmt werden, um besondere bestimmungsgemäße Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen. Gegebenenfalls können zusätzliche Viren geprüft werden. Die Konzentrationen, die sich als Ergebnis der Prüfungen unter zusätzlichen Belastungen ergeben, können niedriger sein, als die, die unter den Mindestprüfbedingungen gewonnen wurden.	

Die bestimmte viruzide Konzentration des Prüfprodukts wird als geeignet für die praktischen Anwendungssituationen vorgeschlagen.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Prüfsuspension von Viren in einer Lösung von Belastungssubstanzen wird auf eine Prüffläche abgeimpft und trocknen gelassen. Eine vorbereitete Probe des zu untersuchenden Produkts wird so aufgebracht, dass der getrocknete Film bedeckt wird.

Die Prüffläche wird über eine festgelegte Einwirkdauer bei einer festgelegten Temperatur gehalten. Anschließend wird die Prüffläche in das Zellerhaltungsmedium überführt, so dass die Wirkung des Desinfektionsmittels unmittelbar neutralisiert wird. Der Titer des Virus, der von der Prüffläche zurückgewonnen wird, wird bestimmt.

Der Titer des Inokulums auf einer mit Wasser standardisierter Härte anstelle des Desinfektionsmittels behandelten Prüffläche wird ebenfalls bestimmt und die Reduktion des Virustiters, die dem Produkt zuzuordnen ist, durch Differenzbildung berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird unter Verwendung der in Abschnitt 4, Tabelle 1, festgelegten Prüfkeime durchgeführt.

5.1.3 Andere Einwirkzeiten und Temperaturen dürfen innerhalb der in Abschnitt 4, Tabelle 1, festgelegten Grenzen verwendet werden. Zusätzliche Belastungssubstanzen und Prüfkeime dürfen verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien, inklusive Zellkulturen

5.2.1 Prüfkeime

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

a) Hüllenloses RNA-Virus

Murines Norovirus, Stamm S99 Berlin

ANMERKUNG Virusstämme können von nationalen oder internationalen Kultursammlungen 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.

b) Hüllenloses DNA Virus

Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75, ATCC VR-5

c) Behülltes DNA Virus

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

Die geforderte Bebrütungstemperatur für diese Prüfkeime beträgt $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.12). Die gleiche Temperatur (entweder 36°C oder 37°C) ist für alle Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung anzuwenden.

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

Wenn zusätzliche Prüfkeime verwendet werden, sind diese unter den im Prüfbericht vermerkten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien) aufzubewahren und zu verwenden. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüfkeime 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 Prüfkeime wirken.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien handelsübliche Materialien verwendet werden, sofern diese geeignet sind. 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 [5.3.2.1 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 Phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung (PBS)

Natriumchlorid (NaCl)	8,00 g
Kaliumchlorid (KCl)	0,20 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$)	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 verdünnte Lösung)

Die Stammlösung wird aus 0,1 mg/ml Neutralrot (Sigma N7005²) in Wasser (5.2.2.2) hergestellt. Anschließend wird diese durch einen Filter mit einer Porenweite von 0,44 µm gefiltert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

5.2.2.5 Fetales Kälberserum (FKS)

Das FKS muss zertifiziert frei von Viren und Mycoplasmen sein. Fremdviren und -mycoplasmen können das Zell- und Virenwachstum stören und zu falschen Ergebnissen führen.

Für RAW 264.7-Zellen muss aufgrund der hohen Zellempfindlichkeit gegenüber Endotoxinen ein spezielles FKS verwendet werden.

5.2.2.6 Trichloressigsäure (10 %ige Lösung) (TCA)

10 g der TCA-Kristalle werden in 80 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst, dann wird das Volumen mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Zum Abschließen des Lösevorgangs wird gerührt.

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 (5.3.2.11) oder im Autoklaven [5.3.2.1 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 lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.6) bis zu einem Monat aufbewahren.
- 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 (5.3.2.11) sterilisiert. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.6) bis zu einer Woche aufbewahren.
- 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) werden in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.9) gegeben, dazu gegeben werden 6,0 ml 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 (5.3.2.4). 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.

2 Sigma N 7005 ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.