

DIN EN 17111

ICS 11.080.20

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der viruziden Wirkung für
Instrumente im humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche Fassung EN 17111:2018**

Chemical disinfectants and antiseptics –

Quantitative carrier test for the evaluation of virucidal activity for instruments used in the medical area –

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

German version EN 17111:2018

Désinfectants chimiques et antiseptiques –

Essai quantitatif de porte-germe pour l'évaluation de l'activité virucide pour instruments utilisés en médecine –

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

Version allemande EN 17111:2018

Gesamtumfang 43 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17111:2018) 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 von 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“ des DIN-Normenausschusses Medizin (NAMed) wahrgenommen.

Deutsche Fassung

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der viruziden
Wirkung für Instrumente im humanmedizinischen Bereich —
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)

Chemical disinfectants and antiseptics —
Quantitative carrier test for the evaluation
of virucidal activity for instruments used
in the medical area —
Test method and requirements (phase 2, step 2)

Désinfectants chimiques et antiseptiques —
Essai quantitatif de porte-germe pour
l'évaluation de l'activité virucide pour instruments
utilisés en médecine —
Méthode d'essai et exigences (phase 2, étape 2)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 18. Juni 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	6
4 Anforderungen	7
5 Prüfverfahren	8
5.1 Kurzbeschreibung	8
5.2 Materialien und Reagenzien	8
5.2.1 Prüforganismen	8
5.2.2 Kulturmedien, Reagenzien und Zellkulturen	9
5.3 Apparate und Glasgeräte	13
5.3.1 Allgemeines	13
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	13
5.4 Herstellung der Prüforganismensuspensionen und der Produktprüflösungen	14
5.4.1 Prüforganismensuspensionen (Prüfsuspension)	14
5.4.2 Produktprüflösung	15
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts	15
5.5.1 Allgemeines	15
5.5.2 Verfahren	17
5.5.3 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität	18
5.5.4 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Desinfektionswirkung	20
5.5.5 Referenz-Virusinaktivierungsprüfung	20
5.5.6 Titration der Viruskontrollprobe	20
5.5.7 Titration der Untersuchungsproben	20
5.6 Versuchsergebnisse und Berechnung	21
5.6.1 Protokollierung der Ergebnisse	21
5.6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID ₅₀ – PFU)	21
5.7 Verifizierung des Verfahrens	21
5.8 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen	22
5.9 Darstellung der Ergebnisse	22
5.9.1 Allgemeines	22
5.9.2 Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten	22
5.10 Berechnung	23
5.10.1 Viruzide Wirkung	23
5.10.2 Verwendung der Bezeichnung	23
5.11 Prüfbericht	23
Anhang A (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts	25
Anhang B (informativ) Beispiele für Viren, sortiert nach ihrer Präsenz im menschlichen Körper im Falle einer Virusinfektion	27
Anhang C (normativ) Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebfiltration	29
C.1 Molekularsiebfiltration mit Sephadex TM LH 20	29
C.1.1 Prinzip	29

C.1.2	Sephadex-Suspension	29
C.1.3	Verfahren	29
C.2	Molekulares Sieben mit MicroSpin TM S 400 HR.....	31
C.3	Bestimmung des „Restvirus“-Titters mit der Large-Volume-Plating-Methode (LVP-Methode).....	31
C.3.1	Allgemeines	31
C.3.2	Beispiel für die Berechnung von Titern und der Reduktion nach der Large-Volume-Plating Methode	32
Anhang D (informativ) Berechnung des viralen Infektiositätstiters		34
D.1	Quantalversuche — Beispiel für die Bestimmung der TCID ₅₀ nach dem Spearman-Kärber-Verfahren.....	34
D.2	Plaquerisversuche.....	35
D.3	Biometrische Bewertung von experimentellen Annäherungen und Beurteilung der desinfizierenden Wirkung auf den Virus (Reduktionsfaktor [R]):	36
D.3.1	Allgemeines	36
D.3.2	Berechnung des Virustiters mit 95%igem Konfidenzintervall	36
D.3.3	Berechnung des Reduktionsfaktors und seines 95%igen Konfidenzintervalls.....	37
D.3.4	Berechnung des durchschnittlichen Reduktionsfaktors ($R_{(mi)}$) und seines 95%igen Konfidenzintervalls	38
D.3.5	Praktische Beispiele.....	38
Literaturhinweise.....		41

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17111:2018) 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 April 2019, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis April 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

Diese Europäische Norm beschreibt einen Keimträgerversuch zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel zur Behandlung von Instrumenten (chirurgische Instrumente, Anästhesiematerial, Endoskopen usw.) im Rahmen der im Anwendungsbereich beschriebenen Anwendungsgebiete eine viruzide Wirkung aufweist oder nicht.

Der Laboratoriumsversuch bildet praktische Anwendungsbedingungen nahe nach, einschließlich des vorherigen Antrocknens von Viren auf einem Träger, der Einwirkzeit, Temperatur, Prüforganismen und Belastungssubstanzen, d. h. Bedingungen, die die Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in Praxis-situationen beeinflussen können. Jede durch diese Prüfung ermittelte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels entspricht den festgelegten Versuchsbedingungen.

1 Anwendungsbereich

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

Dieses Dokument gilt für Produkte, die zur Instrumentendesinfektion im humanmedizinischen Bereich durch Eintauchen 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 Einrichtungen in Schulen, Kindergärten und Heimen
- und können auch am Arbeitsplatz oder im häuslichen 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 kommerziell erhältlichen Zubereitungen oder Wirkstoffen 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 14885, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika*

3 Begriffe

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

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

Bei dem mit Wasser standardisierter Härte — oder bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser — verdünnten nach Abschnitt 5 geprüften Produkt muss mindestens eine dezimal-logarithmische (lg) Reduktion der Lebendkeimzahl um 4 Stufen nachgewiesen werden; die Prüfung muss unter simulierten Bedingungen niedriger Belastung (Lösung von 0,3 g/l Rinderalbumin) oder hoher Belastung (Lösung von 3 g/l Rinderalbumin plus 3 ml/l gewaschene Schaf-Erythrozyten) entsprechend seinen praktischen Anwendungsbedingungen und den Mindestprüfbedingungen erfolgen.

Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüf- bedingungen	Viruzide Wirksamkeit gegen behüllte Viren (begrenzte Viruzidie) ^b (Produkte zur Vorreinigung mit einem kombinierten Reiniger/Desinfektionsmittel)	Viruzide Wirksamkeit ^a (Instrumentendesinfektion bei Temperaturen < 40 °C)	Viruzide Wirksamkeit (Instrumentendesinfektion bei Temperaturen ≥ 40 °C)
Mindest- spektrum von Prüforganismen	modifiziertes Vaccinia Virus Ankara oder Vaccinia Virus, Stamm Elstree	Adenovirus und murines Norovirus	murines Parvovirus
zusätzlich	jeder zutreffende Prüforganismus		
Prüftemperatur	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber bei/zwischen		
	20 °C	20 °C und < 40 °C	≥ 40 °C und 70 °C
Einwirkzeit	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber nicht länger als		
	60 min	60 min	60 min
Belastungs- substanz			
niedrige Belastung	0,3 g/l Rinderserumalbuminlösung und/oder	0,3 g/l Rinderserumalbuminlösung und/oder	0,3 g/l Rinderserumalbuminlösung und/oder
hohe Belastung	3,0 g/l Rinderserumalbumin- lösung plus 3,0 ml/l gewaschene Schafs-Erythrozyten	3,0 g/l Rinderserumalbumin- lösung plus 3,0 ml/l gewaschene Schafs-Erythrozyten	3,0 g/l Rinderserumalbumin- lösung plus 3,0 ml/l gewaschene Schafs-Erythrozyten
zusätzliche Belastung^c	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz
^a Poliovirus (wie er in der korrespondierenden Suspensionsprüfung verwendet wird) kann aufgrund von Trocknungsproblemen auf der Fläche nicht verwendet werden. Zum Nachweis der viruziden Wirksamkeit muss das Produkt die Anforderungen der EN 14476 mit Polio-, Adeno- und murinen Noroviren erfüllen. ^b Die Prüfung „viruzide Wirksamkeit gegen behüllte Viren (begrenzte Viruzidie)“ deckt nur alle behüllte Viren ab (Anhang A). ^c 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 Eine Prüfsuspension von Prüfviren in einer Lösung von Belastungssubstanzen wird auf einem Glasträger (5.3.2.23) ausgestrichen. Nach dem Trocknen wird der Träger in einer Probe des Produkts im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (oder bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser) verdünnten Produkts eingetaucht. Gleichzeitig wird ein zweiter Träger mit Wasser (standardisierter Härte) anstelle des Produkts unter gleichen Prüfbedingungen behandelt (Wasserkontrolle). Die Träger werden bei einer der in Abschnitt 4 und 5.5.1.1 festgelegten Temperaturen und Einwirkzeiten gehalten. Am Ende dieser Einwirkzeit werden die Träger in ein Glasperlen enthaltendes Erhaltungsmedium überführt. Die Viren sind durch Schütteln (5.3.2.17) von der Oberfläche abzulösen. Die Anzahl überlebender Viren in jeder Probe wird bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahl durch Vergleich der Ergebnisse des Produkts und der Wasserkontrolle berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird mit dem modifizierten Vaccinia Virus Ankara oder dem Vaccinia Virus, Stamm Elstree (Produkte zur Vorreinigung mit Desinfektionsreiniger), dem Adenovirus Typ 5 und dem murinen Norovirus als Prüforganismen (Mindestspektrum von Prüforganismen) durchgeführt; bei Prüftemperaturen von 40 °C oder höher muss nur das murine Parvovirus verwendet werden.

5.1.3 Andere Einwirkzeiten und Temperaturen dürfen innerhalb bestimmter in Abschnitt 4 festgelegter Grenzen verwendet werden. Zusätzliche Belastungssubstanzen dürfen verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die viruzide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden als Prüforganismen ausgewählten Stämme nach Abschnitt 4 bewertet werden.¹⁾

a) Behülltes DNA-Virus

Vaccinia Virus, modifiziertes Vaccinia Virus, Stamm Ankara (MVA), ATCC VR-1508 oder

Stamm Elstree, ATCC VR-1549

b) Hüllenloses RNA-Virus²⁾

Murines Norovirus, Stamm S99 Berlin

c) Hüllenloses DNA-Virus

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

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

1) Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von der American Type Culture Collection (ATCC) 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. Das murine Norovirus kann vom Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Hauptsitz Insel Riems, Südufer 10, 17493 Greifswald-Insel Riems (Tel.: +49 (0)38351 7-0, Fax: +49 (0)38351 7-1219 bezogen werden. <https://www.fli.de/de/home/>.

Die geforderte Bebrütungstemperatur für diese Prüforganismen beträgt $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ oder $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (5.3.2.12). Die gleiche Temperatur (entweder 36 °C oder 37 °C) muss für alle Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung angewendet werden.

Wenn zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, müssen sie unter den im Prüfbericht anzugebenden optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien) bebrütet werden. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss ihre Eignung zur Lieferung der erforderlichen Impfansätze verifiziert werden. Wenn diese zusätzlichen Prüforganismen nicht in einem Referenzzentrum klassifiziert wurden, müssen ihre Identifizierungsmerkmale angegeben werden. Darüber hinaus müssen sie von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kultursammlung für fünf Jahre als Referenzprobe zurückgestellt werden. Die Quelle der Stämme muss angegeben 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 wasserfreie 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 gegebenenfalls handelsübliche Materialien verwendet werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten strengstens befolgt werden.

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

Alle festgelegten pH-Werte (5.3.2.4) werden bei $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ 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 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)	bis 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 0,45 µm gefiltert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

5.2.2.5 Fötales 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 aufgrund der hohen Zellempfindlichkeit gegenüber Endotoxinen ein spezielles FCS zu verwenden.

5.2.2.6 Trichloressigsäure (10%ige Lösung, w/V) (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: 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.11) oder im Autoklaven [(5.3.2.1 a)] sterilisiert. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird die Lösung unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung im Kühlschrank (5.3.2.6) nicht länger als einen Monat lagern;
- Herstellung von Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden 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 im Kühlschrank (5.3.2.6) nicht länger als eine Woche lagern;
- 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) werden in einen 1 000-ml-Messkolben gegeben, dazugegeben werden 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B. Die erhaltene Lösung wird gemischt und mit Wasser auf 1 000 ml (5.2.2.2) 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 (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt.

Das Wasser standardisierter Härte muss frisch unter aseptischen Bedingungen hergestellt und muss innerhalb von 12 h verbraucht werden.

ANMERKUNG Bei Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produktes 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.

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

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 (5.3.2.11), die Lösung ist in einem Kühlschrank (5.3.2.6) aufzubewahren und innerhalb von einem Monat zu verbrauchen.

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

5.2.2.8.3 Bedingungen hoher Belastung (Gemisch von Rinderserumalbuminlösung hoher Konzentration und 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 (5.3.2.11).

Es werden mindestens 8,0 ml frisches steriles defibriniertes Schafsblut (5.2.2.9) hergestellt. Die Erythrozyten werden bei 800 g_N für 10 min (5.3.2.18) abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Erythrozyten in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, en: phosphate-buffered saline) resuspendiert (5.2.2.3). 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 Kontamination zu verhindern, sollte dieses Gemisch in Portionen aufgeteilt, die wahrscheinlich an einem Tag verbraucht werden, und in gesonderten Behältern (5.3.2.8) im Kühlschrank für höchstens 7 Tage gelagert werden (5.3.2.6).

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

5.2.2.9 Defibriniertes Schafsblut

Das defibrinierte Schafsblut muss steril sein (aseptischer Aderlass und Vorbereitung). Das defibrinierte Schafsblut kann aus mehr als einem Schaf gewonnen sein und kann von einem kommerziellen Lieferanten bezogen werden.