

DIN EN 14476

ICS 11.080.20

Einsprüche bis 2012-02-12
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 14476:2007-02

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden
Wirkung für in der Humanmedizin verwendete chemische
Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung prEN 14476:2011**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical
disinfectants and antiseptics used in human medicine –
Test method and requirements (Phase 2/Step 1);
German version prEN 14476:2011

Antiseptiques et désinfectants chimique –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et
désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine –
Méthode d'essai et prescription (phase 2, étape 1);
Version allemande prEN 14476:2011

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2011-12-12 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses
Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise als Datei per E-Mail an named@din.de in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle
kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE
unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder in Papierform an den Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN, 10772 Berlin (Hausanschrift:
Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 42 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 14476:2011) wurde von der Arbeitsgruppe 1 „Humanmedizin“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN 14476:2007-02 wurde folgende Änderung vorgenommen:

- a) Aufnahme eines modifizierten Verfahrens mit 97 % Konzentratprüfung für Sonderfälle;
- b) Aufnahme von *Noroviren* als Prüfviren;
- c) Änderung des *Parvoviren* Stammes in *Muriner Parvovirus*, Stamm Crawford, ATCC VR-1346 (vorher *Boviner Parvovirus*, Stamm Haden, ATCC VR-767);
- d) Einwirkzeit wird als Zeitspanne angegeben (keine festen Einwirkzeiten vorgegeben);
- e) Änderung der maximalen Prüftemperatur für Instrumentendesinfektion auf 70 °C;
- f) Ergänzung eines Anhangs zur statistischen Auswertung mittels biometrischer Bewertung von experimentellen Annäherungen und zur Berechnung des Reduktionsfaktors (C.2.2);
- g) Verweise aktualisiert, unter anderem Verweis auf die übergeordneten Normen DIN EN 14885 und DIN EN 12353
- h) redaktionell überarbeitet.

CEN/TC 216

Datum: 2011-11

prEN 14476rev

CEN/TC 216

Sekretariat: AFNOR

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung für in der Humanmedizin verwendete chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques — Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés en médecine humaine — Méthode d'essai et prescription (phase 2, étape 1)

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

ICS:

Deskriptoren

Inhalt

Seite

Vorwort	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Anforderungen	6
5 Materialien und Reagenzien	7
5.1 Apparate und Glasgeräte	7
5.1.1 Allgemeines	7
5.1.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	8
5.2 Kulturmedien und Reagenzien	9
5.2.1 Allgemeines	9
5.2.2 Wasser	9
5.2.3 Zusammensetzung und Herstellung von Zellkulturmedien und Reagenzien	10
5.3 Viren	11
5.3.1 Prüfviren	11
5.3.2 Suspension von Referenzviren	12
5.3.3 Virus-Stammsuspension	12
5.3.4 Virusprüfsuspension	12
6 Prüfverfahren (Allgemeines)	13
6.1 Prinzip	13
6.2 Wahl der Versuchsbedingungen	13
6.3 Herstellung der Virusprüfsuspension	13
6.4 Herstellung der Zellkultur für die Viruzidieprüfung	14
6.5 Infektiositätsversuch	14
6.5.1 Quantalversuche (Endpunkttitration)	14
6.5.2 Plaqueversuch (für <i>Poliovirus</i>)	14
6.6 Prüfung der Viruzidie	15
6.6.1 Allgemeines	15
6.6.2 Herstellung der Produktprüflösung	15
6.6.3 Herstellung des Prüfgemischs	16
6.6.4 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität	16
6.6.5 Elimination der Zytotoxizität	17
6.6.6 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Desinfektionsmittels	17
6.6.7 Referenz-Virusinaktivierungsprüfung	18
6.6.8 Titration der Viruskontrollprobe	18
6.6.9 Titration der Untersuchungsproben	18
7 Prüfvorschriften bei spezifischen Prüfviren für festgelegte vorgesehene Verwendungen	19
7.1 Allgemeines	19
7.2 <i>Poliovirus</i>	19
7.2.1 Allgemeines	19
7.2.2 Reagenzien	19
7.2.3 Verfahren der Viruzidieprüfung	19
7.3 <i>Adenovirus</i>	20
7.3.1 Allgemeines	20
7.3.2 Reagenzien	20
7.3.3 Verfahren der Viruzidieprüfung	20
7.4 <i>Norovirus</i>	21
7.4.1 Allgemeines	21

7.4.2	Reagenzien	21
7.4.3	Verfahren der Viruzidieprüfung	21
7.5	<i>Parvovirus</i>	22
7.5.1	Reagenzien	22
7.5.2	Verfahren der Viruzidieprüfung	22
8	Berechnung und Darstellung der Ergebnisse	22
8.1	Protokollierung der Ergebnisse	22
8.2	Berechnung des Infektiositätstiters (TCID ₅₀ bzw. PFU)	23
8.2.1	Allgemeines	23
8.2.2	Berechnung der TCID ₅₀	23
8.2.3	Berechnung der PFU	23
8.3	Verifizierung des Verfahrens	23
8.4	Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten	23
9	Darstellung der Ergebnisse	24
9.1	Allgemeines	24
9.2	Prüfbericht	24
Anhang A (normativ) Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebfiltration		25
A.1	Molekularsiebfiltration mit Sephadex™ LH 20	25
A.1.1	Prinzip	25
A.1.2	Sephadex-Suspension	25
A.1.3	Verfahren	25
A.2	Molekulares Sieben mit MicroSpin™ S 400 HR	27
Anhang B (informativ) Beispiele für Viren, die im Bereich der Humanmedizin Instrumente, Hände oder Oberflächen kontaminieren können		28
Anhang C (informativ) Berechnung des viralen Infektiositätstiters		29
C.1	Quantalversuche	29
C.1.1	Beispiel einer Bestimmung der TCID ₅₀ nach dem Spearman-Kärber-Verfahren	29
C.2	Plaque-Untersuchungen	30
C.2.1	Allgemeines	30
C.2.2	Biometrische Bewertung von experimentellen Annäherungen und Beurteilung der desinfizierenden Wirkung auf den Virus (Reduktionsfaktor [RF]):	31
Anhang D (informativ) Darstellung der Prüfergebnisse einer wirksamen Konzentration		34
Anhang E (informativ) Quantitative Bestimmung von Formaldehydkonzentrationen		37
Anhang F (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation von Europäischen Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika		38
F.1	Einleitung	38
F.2	Allgemeine Hinweise für die Anwendung und Interpretation von Prüfverfahren nach Europäischen Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika	38
F.3	Leitfaden für die Interpretation der Prüfverfahren für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika	39
Literaturhinweise		40

Vorwort

Dieses Dokument (prEN 14476:2011) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemical disinfectants and Antiseptics“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

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

1 Anwendungsbereich

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

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

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

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

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

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

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

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

2 Normative Verweisungen

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

EN 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Aufbewahrung von Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden, mykobakteriziden, sporiziden und fungiziden 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.

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 zytopathologische Wirkung (CPE) (siehe **3.5**) auslöst

3.5

virale zytopathologische Wirkung

CPE

(en: **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 je Volumeneinheit vorhandenen infektiösen Viren

4 Anforderungen

Bei Prüfung in Übereinstimmung mit Tabelle 1 und den Abschnitten **5**, **6**, **7**, **8** und **9** muss für das Produkt eine dezimal-logarithmische Reduktion (lg) um mindestens vier Stufen nachgewiesen werden.

Tabelle 1 — Geforderte Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Instrumenten- desinfektion	Oberflächen- desinfektion	Hygienische Händedesinfektion und Händewaschung
Prüfvirus	<i>Poliovirus</i> <i>Adenovirus</i> <i>Norovirus</i> Wenn die Temperatur 40 °C oder mehr beträgt: nur <i>Parvovirus</i>	<i>Poliovirus</i> <i>Adenovirus</i> <i>Norovirus</i>	<i>Poliovirus</i> <i>Adenovirus</i> <i>Norovirus</i>
Prüftemperatur	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber zwischen 20 °C und 70 °C		
Einwirkzeit	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber <u>nicht länger als</u> 60 min		
Belastungssubstanzen			
a) geringe Belastung	0,3 g/l Rinderserum- albumin	0,3 g/l Rinderserum- albumin	0,3 g/l Rinderserum- albumin (Händedesinfektion)
	und/oder	und/oder	und/oder
b) hohe Belastung	3,0 g/l Rinderserum- albumin plus 3,0 ml/l Erythrozyten	3,0 g/l Rinderserum- albumin plus 3,0 ml/l Erythrozyten	3,0 g/l Rinderserum- albumin plus 3,0 ml/l Erythrozyten (Händewaschung)
* Die in Tabelle 1 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.			

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

5 Materialien und Reagenzien

5.1 Apparate und Glasgeräte

5.1.1 Allgemeines

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

5.1.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung¹⁾

5.1.2.1 Allgemeines

und besonders folgende Geräte:

5.1.2.2 Sterilisatoren

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

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

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

5.1.2.5 pH-Messgerät, kalibriert auf $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei 20 °C .

5.1.2.6 Umkehr-Mikroskop zum mikroskopischen Betrachten der Zellkulturen.

5.1.2.7 Stoppuhr

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

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

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

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

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

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

5.1.2.14 Becken als Eisbad mit Eis und Wasser.

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

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

ANMERKUNG Kalibrierte automatische Pipetten dürfen verwendet werden.

5.1.2.17 Messkolben, kalibriert bei 20 °C .

1) Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

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

5.1.2.18 Mechanisches Schüttelgerät

5.1.2.19 Zentrifuge

5.1.2.20 Biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II

5.1.2.21 Tiefkühleinrichtung, einstellbar auf $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.1 Allgemeines

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

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

5.2.2 Wasser

5.2.2.1 Allgemeine Anforderungen an Wasser

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

Sterilisation im Autoklaven (siehe **5.1.2.2**).

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

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

5.2.2.2 Wasser standardisierter Härte

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

— Lösung A:

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

Sterilisation im Autoklaven (siehe **5.1.2.2**). Die Lösung lässt sich bei $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zu höchstens einem Monat aufbewahren.

— Lösung B:

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

Wasser standardisierter Härte:

— für die Herstellung von 1 l werden in einen 1 000-ml-Messkolben (siehe **5.1.2.17**) mindestens 600 ml Wasser (siehe **5.2.2.1**) gegeben, dazugegeben werden 6,0 ml Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B;

- nach Durchmischen wird mit Wasser (siehe 5.2.2.1) auf 1 000 ml aufgefüllt;
- der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $(7,0 \pm 0,2)$ betragen;
- falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Chlorwasserstoffsäure (HCl) eingestellt;
- das Wassers standardisierter Härte ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

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

5.2.3 Zusammensetzung und Herstellung von Zellkulturmedien und Reagenzien

5.2.3.1 Allgemeines

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

5.2.3.2 Wachstums- und Erhaltungsmedien

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

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

5.2.3.3 Belastungssubstanzen

5.2.3.3.1 Allgemeines

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

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

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

5.2.3.3.2 Bedingungen geringer Belastung (Rinderserumalbumin)

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

- in 100 ml Wasser (siehe 5.2.2) werden 0,3 g Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) gelöst;
- die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration;
- Aufbewahrung im Kühlschrank und Verbrauch innerhalb eines Monats.

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

5.2.3.3.3 Bedingungen hoher Belastung

a) Rinderserumalbumin

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

- in 100 ml Wasser (siehe **5.2.2**) werden 3 g Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) gelöst;
- die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration;
- Aufbewahrung im Kühlschrank und Verbrauch innerhalb eines Monats.

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

b) Schaf-Erythrozyten

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

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

c) Rinderserumalbumin und Erythrozytenlösung

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

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

5.3 Viren

5.3.1 Prüfviren

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