

DIN EN 14476



ICS 11.080.20

Einsprüche bis 2024-08-07
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 14476:2019-10

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung
im humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche und Englische Fassung prEN 14476:2024**

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 and English version prEN 14476:2024

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 et anglaise prEN 14476:2024

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-06-07 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nagesutech@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 95 Seiten

DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech)

Nationales Vorwort

Das Dokument prEN 14476:2024 wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 176-03-06 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ im DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 14476:2019-10 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) der Anwendungsbereich wurde für die folgenden Anwendungen im medizinischen Bereich erweitert, d. h. für Produkte zur Desinfektion von Textilien (einschließlich Peressigsäure als Referenz);
- b) für die Angaben zu hygienischen Handreinigungs- und Handwaschmitteln wurde eine Prüfung auf viruzide Wirksamkeit gegen behüllte Viren mit Vacciniavirus hinzugefügt, wobei für Produkte zur Handwaschung eine spezifische log-Reduktion gefordert wird;
- c) die Berechnung wurde in den Haupttext verlagert (harmonisiert mit EN 13727);
- d) die LVP-Methode wurde in den Haupttext verschoben;
- e) Klarstellung, dass die angegebenen Zellliniennummern nur Beispiele sind;
- f) Berichtigung von Rechtschreibfehlern und falschen Verweisungen.

Juni 2024

prEN 14476

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)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	7
5 Prüfverfahren	10
5.1 Kurzbeschreibung	10
5.2 Materialien und Reagenzien, inklusive Zellkulturen	10
5.2.1 Prüfviren	10
5.2.2 Kulturmedien, Reagenzien und Zellkulturen	11
5.3 Apparate und Glasgeräte	15
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	17
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts	18
5.5.1 Allgemeines	18
5.5.2 Prüfverfahren	19
5.5.3 Modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte	20
5.5.4 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität	20
5.5.5 Interferenzkontrolle – Kontrolle der Zellsensibilität	21
5.5.6 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Produkts	22
5.5.7 Referenz-Virusinaktivierungsprüfung	22
5.5.8 Titration der Viruskontrollprobe	24
5.5.9 Titration der Untersuchungsproben	24
5.6 Versuchsergebnisse und Berechnung	24
5.6.1 Protokollierung der Ergebnisse	24
5.6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID ₅₀ bzw. PFU)	24
5.6.3 Berechnung der Reduktion und ihres 95%igen Konfidenzintervalls	30
5.6.4 Berechnung der durchschnittlichen Reduktion ($R_{(mi)}$) und ihres 95%igen Konfidenzintervalls	31
5.7 Verifizierung des Verfahrens	32
5.8 Darstellung der Ergebnisse	32
5.8.1 Allgemeines	32
5.8.2 Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten	33
5.9 Prüfbericht	33
Anhang A (informativ) Beispiele für Viren, sortiert nach ihrer Präsenz im menschlichen Körper im Falle einer Virusinfektion	35
Anhang B (informativ) Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebfiltration	37
B.1 Molekularsiebfiltration mit Sephadex™ LH 20	37
B.1.1 Prinzip	37
B.1.2 Sephadex-Suspension	37
B.1.3 Verfahren	37
B.2 Molekulares Sieben mit MicroSpin™ S 400 HR	39
Anhang C (informativ) Darstellung der Prüfergebnisse einer wirksamen Konzentration	40
Anhang D (informativ) Quantitative Bestimmung von Formaldehyd- und PAA-Konzentrationen	43
D.1 Quantitative Bestimmung für Formaldehyd	43
D.2 Bestimmung der Peressigsäure-Konzentration	44
Literaturhinweise	46

Bilder

Bild B.1 — Gerät zum molekularen Sieben mit Spritze	38
Bild B.2 — MicroSpin™ S 400 HR zur Reinigung von Virenproben	39

Tabellen

Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen	8
Tabelle 2 — Konsolidierte Klassifizierung der Wasserqualität:	12
Tabelle 3 — Beispiel von Titrationsergebnissen mit 6 Vertiefungen	25
Tabelle 4 — Beispiel von Titrationsergebnissen (Tabelle C.2, 5 min Einwirkzeit)	25
Tabelle C.1 — Tabelle der Ergebnisse des Produkts XYZ und Poliovirus unter Bedingungen niedriger Belastung	40
Tabelle C.2 — Rohdaten für Produkt XYZ mit 0,3 g/l BSA in der Prüfung gegen Poliovirus (Quantalversuch; z. B. 8 Vertiefungen)	41

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 14476:2024) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 14476:2013+A2:2019 ersetzen.

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 Prüfmethoden des CEN/TC 216 zu harmonisieren, die Lesbarkeit zu verbessern und dadurch den Text besser verständlich zu machen.

prEN 14476:2024 enthält die folgenden wesentlichen technischen Änderungen gegenüber EN 14476:2013+A2:2019:

- der Anwendungsbereich wurde für die folgenden Anwendungen im medizinischen Bereich erweitert, d. h. für Produkte zur Desinfektion von Textilien (einschließlich Peressigsäure als Referenz);
- für die Angaben zu hygienischen Handreinigungs- und Handwaschmitteln wurde eine Prüfung auf viruzide Wirksamkeit gegen behüllte Viren mit Vacciniavirus hinzugefügt, wobei für Produkte zur Handwaschung eine spezifische log-Reduktion gefordert wird;
- die Berechnung wurde in den Haupttext verlagert (harmonisiert mit EN 13727);
- die LVP-Methode wurde in den Haupttext verschoben;
- Klarstellung, dass die angegebenen Zellliniennummern nur Beispiele sind;
- Berichtigung von Rechtschreibfehlern und falschen Verweisungen.

Die oben genannten Änderungen haben keinen Einfluss auf die Prüfergebnisse, die mit Bezug auf die Version EN 14476:2013+A2:2019 erhalten wurden. Diese Ergebnisse sind weiterhin gültig mit Ausnahme von Prüfberichten, die die Entgiftung durch Gelfiltration verwenden und die keine parallele Titration des nicht entgifteten Prüfgemischs vorsehen.

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

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

Dieses Dokument 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 gebrauchsfertigen Produkte können nur bei einer Konzentration von bis zu 80 % (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 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.

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 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

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 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Aufbewahrung von Prüforganismen 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.

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>

3.1

Zytotoxizität

morphologische Veränderung von Zellen und/oder ihre Zerstörung, 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 (für die hygienische Händewaschung eine lg-Reduktion um mindestens zwei Stufen) des Virustiters nachgewiesen werden.

Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Hygienische Händedesinfektion	Hygienische Händewaschung	Instrumenten-desinfektion	Oberflächen-desinfektion	Wäsche-desinfektion
Mindestspektrum von Prüforganismen	Viruzide Wirksamkeit Poliovirus Adenovirus ^d murines Norovirus Begrenzte viruzide Wirksamkeit PLUS ^a Adenovirus murines Norovirus Begrenzte viruzide Wirksamkeit ^b Vaccinia Virus	 Begrenzte viruzide Wirksamkeit ^b Vaccinia Virus	Viruzide Wirksamkeit für medizinische Anwendungen Poliovirus Adenovirus murines Norovirus Wenn die Temperatur 40 °C oder mehr beträgt: nur murines Parvovirus Begrenzte viruzide Wirksamkeit ^b (Vorreinigungs-produkte mit einem kombinierten Reinigungs-/ Desinfektionsmittel) Vaccinia Virus	Viruzide Wirksamkeit für medizinische Anwendungen Poliovirus Adenovirus murines Norovirus Begrenzte viruzide Wirksamkeit PLUS ^a Adenovirus murines Norovirus Begrenzte viruzide Wirksamkeit ^b Vaccinia Virus	Viruzide Wirksamkeit für medizinische Anwendungen murines Parvovirus Begrenzte viruzide Wirksamkeit ^b Vaccinia Virus
zusätzlich:	Jeder zutreffende Prüforganismus				
Prüftemperatur	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber bei/zwischen				
	20 °C (alkohol. Desinf.mittel mit Adenovirus bei 25 °C ± 1°C) ^d	20 °C	20 °C und 70 °C	4 °C und 30 °C	30 °C und 70 °C
Einwirkzeit	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber				
	zwischen 30 s und 120 s	zwischen 30 s und 120 s	nicht länger als 60 min	nicht länger als 5 min oder 60 min ^c	zwischen 10 min und 20 min
Belastungssubstanzen					

Tabelle 1 (fortgesetzt)

niedrige Belastung	0,3 g/l Rinderserumalbuminlösung (hygienische Händedesinf.) ^d	—	0,3 g/l Rinderserum- albuminlösung	0,3 g/l Rinderserum- albuminlösung	0,3 g/l Rinderserum- albuminlösung (für Prozesse mit Vorwäsche)
hohe Belastung	—	3,0 g/l Rinderserum- albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten (hygienische Händewaschung)e	und/oder 3,0 g/l Rinderserum- albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten	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 (für Prozesse ohne Vorwäsche)
Zusätzliche Belastung	hohe Belastung; jede zutreffende Substanz	niedrige Belastung jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz

^a Die Prüfung mit „begrenztem Spektrum viruzider Wirksamkeit (begrenzte viruzide Wirksamkeit PLUS)“ deckt alle behüllten Viren (Anhang A) sowie Norovirus, Rotavirus und Adenovirus ab.

^b Die Prüfung für die „viruzide Wirksamkeit gegen behüllte Viren (begrenzte viruzide Wirksamkeit)“ deckt nur alle behüllten Viren (Anhang A) ab.

^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 Adenoviren sind bei der Händedesinfektion bei (25 ± 1) °C zu testen. Es ist seit langem bekannt, dass Adenoviren im Gegensatz zu anderen unbehüllten Viren (Polio- + Entero-Viren) in alkoholischen Formulierungen einen Temperatureffekt aufweisen [16]. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die besondere Struktur mit antennenartigen Faserproteinen zurückzuführen, die zu einer Ausfällung des Virus führen könnten, das sich dann bei (37 ± 1) °C wieder auflöst. Die Viren werden dann in die Lösung freigesetzt. Das Händedesinfektionsmittel scheint also falsch-negativ unwirksam zu sein, obwohl nur wenige Grad Unterschied das Virus in diesem künstlichen Suspensionsversuch wieder inaktivierbar machen. 25 °C liegt noch im Bereich der Hauttemperatur der Hände. [16]

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Probe des Produkts im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (oder Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten) verdünnten Produkts wird der Virusprüfsuspension in einer Lösung einer Belastungssubstanz 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 z.B. 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, 5.6.2.2), durch Plaque-Zählung (Plaque-Untersuchung, 5.6.2.3) oder mit der Large-Volume-Plating (LVP)-Methode (5.6.2.4) 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 Prüfviren

Die viruzide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden als Prüforganismen ausgewählten Stämme nach Abschnitt 4, Tabelle 1 bewertet werden¹. Die Virusstämme müssen aus einer nationalen oder internationalen Kultursammlung bezogen werden.

a) Hüllenloses RNA-Virus²

1) Poliovirus Typ 1, LSc-2ab (Picornavirus)

Für das Poliovirus darf nur Virusmaterial verwendet werden, das die Anforderungen der zuständigen Behörde für die Herstellung von Polio-Schluckimpfstoff erfüllt. (Andere von LSc-2ab abgeleitete Stämme können nicht mehr verwendet werden.)

ANMERKUNG Siehe die Liste der Impfstoffe der Weltgesundheitsorganisation (WHO).

2) Murines Norovirus, Stamm S99 Berlin;

1 Die ATCC Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von diesen Kultursammlungen geliefert werden. Diese Information dient zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung durch CEN.

2 LSc-2ab können vom NIBSC (www.nibsc.ac.uk) bezogen werden. Murines Norovirus und Poliovirus können 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. Diese Information dient zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung durch CEN.

b) Hüllenloses DNA-Virus:

- 1) Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75, ATCC VR-5*;
- 2) Murines Parvovirus, Minutenvirus von Mäusen (MVM), Stamm Crawford, ATCC VR-1346;

c) Behüllter DNA Virus:

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

Die geforderte Bebrütungstemperatur für diese Prüfkeime beträgt $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.1.3). 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, sensible Zelllinie) aufzubewahren und zu verwenden. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüforganismen (Viren und Zelllinie) 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 diesem Dokument 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 oder entmineralisiertes Wasser sein, das die Anforderungen nach ASTM D 1193 (Typ I oder II) erfüllt. 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. Alternativ eignet sich Wasser in Zellkulturqualität für die Zubereitung von Zellkulturmedien und anderen Lösungen, die in der Zellkultur verwendet werden.

Tabelle 2 — Konsolidierte Klassifizierung der Wasserqualität:

	Einheit	Typ I (Hochreines Wasser)	Typ II (gereinigtes Wasser)
Resistenz	(M/cm)Ω	> 18	> 1
Leitfähigkeit	μS/cm	< 0,056	< 1
Silikate (SiO ₄)	ppb or μg/L	3	3
TOC	ppb or μg/l	50	50
Bakterien	KBE/ml	< 1	< 100
Endotoxin	EU/ml	< 0,001	0,03
Typ I	Erforderlich für kritische Laboranwendungen (z. B. für HPLC, GC; MS usw.). Auch für die Herstellung von Puffern für Zellkulturen sowie für Anwendungen in der Molekularbiologie.		
Typ II	Wird für Puffer und mikrobiologische Nährböden verwendet. Wird als Systemwasser für Laborautomaten und zum Auflösen von Kontrollen und Reagenzien verwendet.		

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 (Na ₂ HPO ₄ × 12H ₂ O)	2,89 g
Kaliumphosphat, einbasisch (KH ₂ PO 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 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 muss ein spezielles FCS aufgrund der hohen Zellempfindlichkeit gegenüber Endotoxinen verwendet werden.

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 PBS (5.2.2.3) 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.

5.2.2.8.4 Bedingungen niedriger und hoher Belastung bei dem modifizierten Verfahren für gebrauchsfertige Produkte (5.5.3)

Es sind die Verfahrensweisen zum Herstellen nach 5.2.2.8.2 und 5.2.2.8.3 einzuhalten, die Belastungssubstanz ist jedoch in einer fünffach höheren Konzentration herzustellen, für die Bedingungen hoher Belastung höchstens 50 ml, um Probleme bei der Filtration zu vermeiden.

- a) Bedingungen niedriger Belastung (5.2.2.8.2) — 1,50 g Rinderserumalbumin (anstelle von 0,3 g) werden in 100 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst;
- b) Bedingungen hoher Belastung (5.2.2.8.3) — 7,5 g Rinderserumalbumin (anstelle von 1,5 g) werden in 42,5 ml Wasser (5.2.2.2) (anstelle von 48,5 ml) gelöst. Es sind mindestens 20 ml (anstelle von 4,0 ml) Schafsblut herzustellen. 7,5 ml (anstelle von 1,5 ml) gepackte Schaf-Erythrozyten werden in 42,5 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung resuspendiert, um 50 ml zu erhalten.

5.2.2.9 Defibriniertes Schafsblut

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

5.2.2.10 Medium für Zellkulturen

Es ist Eagle's Minimum-Essential Medium (MEM) oder ein gleichwertiges Medium zu verwenden, ergänzt mit FCS (5.2.2.5), Antibiotika und weiteren Wachstumsfaktoren je nach Erfordernis.

- a) Ein *Wachstumsmedium* für die Zellvermehrung wird im Allgemeinen mit 10 % FCS ergänzt. Es werden 10 Teile FCS (5.2.2.5) zu 90 Teilen MEM gegeben.
- b) Ein *ErhaltungsmEDIUM*, um den Zellstoffwechsel ohne Stimulation des Zellwachstums aufrechtzuerhalten, wird im Allgemeinen mit 2 % FCS ergänzt. Es werden 2 Teile FCS (5.2.2.5) zu 98 Teilen MEM gegeben.

Andere Medien dürfen verwendet werden, wenn sie für die bestimmte Zelllinie geeignet sind.

Siehe auch Literaturhinweis [2]. Siehe EN 12353 für eine detaillierte Beschreibung.

5.2.2.11 Zellkulturen

Vor der Virusinokulation müssen die Zellmonolayer einen für das spezifische Virus geeigneten Konfluenzgrad aufweisen (siehe auch EN 12353). Zelllinien werden entsprechend ihrer Sensibilität gegenüber den Prüforganismen (5.2.1) ausgewählt. Die Zellen für eine Virustitration müssen, wenn sie als Suspensionen in Quantalversuchen verwendet werden, den Verdünnungen des Prüfgemischs (5.5.2) in einer solchen Dichte hinzugefügt werden, dass die Bildung einer einschichtigen Zellschicht (monolayer) in der Zellkontrollprobe mindestens innerhalb von zwei Tagen möglich ist. Zellkulturen können als Einschicht-Zellkulturen oder in Suspensionen für Quantalversuche verwendet werden. Für weitere Details zu den Zelllinien siehe 5.5.1.1.e).

5.3 Apparate und Glasgeräte

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

- a) durch feuchte Hitze im Autoklaven [5.3.1.1 a)];
- b) durch trockene Hitze im Heißluftsterilisator [5.3.1.1 b)].

5.3.1 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung³ und insbesondere folgende Geräte:

5.3.1.1 Geräte zur Sterilisation (feuchte und trockene Hitze)

- a) zur Dampfsterilisation ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min bei (121^{+3}_0) °C gehalten werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluftsterilisator, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min bei (180^{+5}_0) °C, für eine Mindesthaltezeit von 1 h bei (170^{+5}_0) °C oder für eine Mindesthaltezeit von 2 h bei (160^{+5}_0) °C gehalten werden kann.

5.3.1.2 Wasserbäder, einstellbar auf (20 ± 1) °C und zusätzliche Prüftemperaturen ± 1 °C (5.5.1).

5.3.1.3 CO₂-Brutschrank (95 % Luft, 5 % CO₂), einstellbar entweder auf (36 ± 1) °C oder (37 ± 1) °C (5.2.1).

5.3.1.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei (20 ± 1) °C.

5.3.1.5 Stoppuhr.

5.3.1.6 Schüttelgeräte:

- a) Elektromechanisches Rührwerk, z. B. Vortex®-Mischer⁴;
- b) mechanisches Schüttelgerät.

5.3.1.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem Material, das mit den zu filtrierenden Substanzen verträglich ist, mit einem Filterhalter von mindestens 50 ml Nutzvolumen und geeignet zur Verwendung von

3 Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

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

Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von 0,22 µm für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7), Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2, 5.2.2.8.3 und 5.2.2.8.4).

Die verwendete Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen auf der Membran zu erreichen und um einen zu lange dauernden Filtrationsvorgang zu verhindern, muss das Gerät so eingestellt werden, dass 100 ml der Spülflüssigkeit in 20 s bis 40 s filtriert werden. Die Filtration für die Belastungssubstanz (5.2.2.8) für das modifizierte Verfahren (5.5.3) darf länger dauern.

5.3.1.8 Kühltisch, einstellbar auf (2 bis 8) °C.

5.3.1.9 Messpipetten mit Nennvolumina von 10 ml, 1 ml, 100 µl, 10 µl oder kalibrierte automatische Pipetten.

5.3.1.10 Eismaschine oder kommerziell erhältliches Eis zum Kühlen des Zellerhaltungsmediums und der Reaktionsgemische während der Prüfung.

5.3.1.11 Becken als Eisbad mit Eis und Wasser.

5.3.1.12 Messkolben.

5.3.1.13 Zentrifuge (400 g_N bis 1 000 g_N).

5.3.1.14 Mikrotiterplatten oder -röhrchen, Petrischalen und Kolben für die Zellkulturen.

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

5.3.1.16 Umkehr-Mikroskop zum mikroskopischen Betrachten der Zellkulturen.

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

5.3.1.18 Biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II.

5.3.1.19 Tiefkühleinrichtung, einstellbar auf –70 °C oder tiefer.

5.3.1.20 Einrichtung für die Lagerung in flüssigem Stickstoff.

5.4 Herstellung der Prüforganismensuspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüforganismensuspensionen (Virusprüfsuspension)

Die Prüforganismen und ihre Stammkulturen sind nach EN 12353 herzustellen und aufzubewahren.

Die Virus-Stammsuspension wird in einer geeigneten Zelllinie, die hohe Titer von infektiösen Viren erzeugt, vermehrt. Die Zelltrümmer müssen danach durch Zentrifugieren (400 g_N für 15 min) abgetrennt werden. Dieses Präparat wird als „Virusprüfsuspension“ bezeichnet.

Die Virusprüfsuspension wird in kleinen Volumina unter –70 °C aufbewahrt. Aus Sicherheitsgründen und — in einigen Fällen — um die Möglichkeit genetischer Mutationen zu begrenzen, sind nur 10 Passagen des ursprünglichen Ausgangsvirus (z. B. Virus aus einer Kultursammlung) zulässig.

Die Virusprüfsuspension sollte einen Mindesttiter von 10⁸ TCID₅₀/ml — bestimmt durch einen Quantalversuch [5.5.2 a)] oder durch einen Plaqueversuch [5.5.2 b)] — aufweisen. In jedem Fall muss er hoch genug sein, um eine Titerabnahme um mindestens 4 lg Stufen (für die hygienische Händewaschung 2 lg Stufen) zu ermöglichen, damit das Verfahren verifiziert werden kann.

Die Virusprüfsuspension darf durch geeignete Verfahren [z. B. Ultrazentrifugieren, Ultrazentrifugalfilter (Amicon®)⁵] konzentriert werden.

ANMERKUNG Bei der Ultrazentrifugation können Aggregate entstehen, die einen Einfluss auf die Virusinaktivierung haben können.

Die Virusprüfsuspension wird unverdünnt im Prüfverfahren (5.5.2 oder 5.5.3) verwendet.

5.4.2 Produktprüfsuspension

Die Konzentration der Produktprüflösung muss das 1,25fache der gewünschten Prüfkonzentration (= reale Prüfkonzentration) betragen, weil sie bei der Prüfung (5.5.2) auf 80 % verdünnt wird.

Produktprüflösungen sind in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen herzustellen, wobei eine Konzentration im wirksamen Bereich und eine Konzentration im unwirksamen Bereich liegen muss (5.7). Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden, in diesem Fall ist höchste zu prüfende Konzentration 80 %. Gebrauchsfertige Produkte dürfen bei 97 % geprüft werden [modifiziertes Verfahren (5.5.3)]. In diesem Fall ist die „reale Prüfkonzentration“ 97 %.

Verdünnungen gebrauchsfertiger Produkte sind in Wasser (5.2.2.2) anstatt in Wasser standardisierter Härte herzustellen. Handwaschprodukte werden immer mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) vorverdünnt, um eine Lösung von 62,5 % zu erhalten. Diese Lösung simuliert die Zugabe von Leitungswasser in der Praxis (1 : 1). Ein derartiges Produkt wird dennoch als ein „gebrauchsfertiges Produkt“ angesehen. Das modifizierte Verfahren (5.5.3) kann nicht angewendet werden, da 62,5 % die höchstzulässige Konzentration (50 %) multipliziert mit 1,25 darstellt.

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand gelöst, indem mindestens 1,0 g ± 10 mg des Produkts in einen Messkolben eingewogen werden und mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) aufgefüllt wird. Die folgenden Verdünnungen (= niedrigeren Konzentrationen) sind in Messkolben (5.3.1.12) auf der Basis von Volumenanteilen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) herzustellen.

Bei flüssigen Produkten sind die Verdünnungen des Produkts mit Wasser standardisierter Härte auf der Basis von Volumenanteilen in Messkolben (5.3.1.12) herzustellen.

Die Produktprüflösungen sind frisch herzustellen und innerhalb von 2 h für die Prüfung zu verwenden. Sie müssen während des gesamten Prüfablaufs eine physikalisch homogene stabile Zubereitung ergeben. Falls während des Verfahrens eine sichtbare Inhomogenität durch das Eintreten einer Ausfällung oder Ausflockung auftritt, zum Beispiel durch die Zugabe der Belastungssubstanz, muss dies in den Prüfbericht aufgenommen werden.

Die im Prüfbericht angegebene Konzentration des Produkts muss die gewünschte Prüfkonzentration sein. Die Prüfkonzentration ist als Konzentration Volumen je Volumen oder Masse je Volumen aufzuzeichnen wie auch die Einzelheiten der Produktprobe im Lieferzustand.

5 Amicon® ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unter-
richtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch
CEN.

5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Versuchsbedingungen

Die Versuchsbedingungen dürfen entsprechend der für das Produkt vorgesehenen praktischen Anwendungsbedingungen (Abschnitt 4) ausgewählt werden:

- a) Temperatur, θ (in °C): Die Prüftemperaturen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt. Die zulässige Grenzabweichung für jede gewählte Temperatur beträgt ± 1 °C.
- b) Einwirkzeit, t (in min): Die zu prüfenden Einwirkzeiten sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt. Die zulässige Grenzabweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt ± 10 s, außer bei 1 min oder weniger, wo sie ± 5 s beträgt.
- c) Belastungssubstanz: Die zu prüfende Belastungssubstanz ist 0,30 g/l Rinderserumalbuminlösung (5.2.2.8.2) bei Bedingungen niedriger Belastung oder bei Bedingungen hoher Belastung ein Gemisch von 3 ml/l Schaf-Erythrozyten und 3,0 g/l Rinderserumalbuminlösung (5.2.2.8.3), nach Abschnitt 4, Tabelle 1 und nach den praktischen Anwendungsbedingungen. Zusätzliche Belastungssubstanzen dürfen entsprechend den spezifischen Anwendungsgebieten geprüft werden.
- d) Prüforganismen: Die Prüforganismen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 und 5.2.1 festgelegt. Zusätzliche Prüforganismen dürfen getestet werden.
- e) Zelllinie(n): Adenovirus wird in HeLa- (z. B. ATCC CCL-2) A549 Zellen (z. B. ATCC CCL-185) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt. Poliovirus wird in HeLa- oder BMG-Zellen (z. B. ECACC 90092601) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt. Murines Norovirus wird in RAW 264.7-Zellen (z. B. ATCC TIB-71) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt. Murines Parvovirus wird in A9 Zellen (z. B. ATCC CCL-1.4) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt. Modifiziertes Vaccinia Virus Ankara wird in BHK-21-Zellen (z. B. ATCC CCL-10) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt. Vaccinia Virus Stamm Elstree wird in Vero-Zellen (z. B. ATCC CCL-81), CV-1-Zellen (z. B. ATCC CCL-70) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt.

5.5.1.2 Herstellung

Röhrchen werden mit eisgekühltem Zellerhaltungsmedium [5.2.2.10 b)] für die unterschiedlichen Titrationen, die nach den unterschiedlichen Einwirkzeiten herzustellen sind, gefüllt und in ein Eisbad gestellt. Mikrotiterplatten sind zur Identifikation zu beschriften.

Die Verfahren, die in 5.5.4 bis 5.5.8 beschrieben werden, sind immer parallel zum Prüfverfahren (5.5.2) durchzuführen.

5.5.1.3 Besondere Angaben für gebrauchsfertige Produkte

Im Falle von gebrauchsfertigen Produkten wird Wasser (5.2.2.2) anstelle von Wasser standardisierter Härte verwendet, wobei die Ausnahme für Handwaschprodukte zu beachten ist (5.1.1, ANMERKUNG).

5.5.1.4 Temperaturangleichung

Alle Reagenzien [Produktprüflösungen (5.4.2), PBS (5.2.2.3), Zellkulturen (5.2.2.11), Wasser (5.2.2.2), Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) und Belastungssubstanz (5.2.2.8)] werden vor der Prüfung auf θ eingestellt unter Verwendung z. B. eines Wasserbades (5.3.1.2), Thermoblocks oder Thermomixers, welches/welcher auf θ eingestellt ist. Die Stabilisierung der Temperatur der Reagenzien auf θ ist zu überprüfen. Die Virusprüfsuspension (5.4.1) ist im Eisbad (5.3.1.11) aufzubewahren, um einen Titerverlust zu vermeiden.

Wasser (5.2.2.2) ist auf (20 ± 1) °C einzustellen.

Im Fall gebrauchsfertiger Produkte muss das Wasser (5.2.2.2) auf die Prüftemperatur θ eingestellt werden.

5.5.2 Prüfverfahren

Ein Teil Belastungssubstanz (5.2.2.8) wird in einen Behälter pipettiert, dessen Volumen für die ausreichende Durchmischung geeignet ist. Ein Teil Virusprüfsuspension (5.4.1) wird in den Behälter zugegeben; dabei ist sorgfältig darauf zu achten, dass der obere Teil der Innenseite nicht berührt wird. Es wird durchmischt [(5.3.1.6 a)]. 8 Teile Produktprüflösung (5.4.2) werden in den Behälter zugegeben. Es wird durchmischt [(5.3.1.6 a)], die Stoppuhr sofort in Gang gesetzt und der Behälter mit dem Prüfgemisch in ein Wasserbad (5.3.1.2) gestellt, das kontrolliert auf die ausgewählte Prüftemperatur [5.5.1.1 a)] eingestellt ist.

Ein Teil darf nicht weniger als 0,1 ml betragen, und das Verhältnis ist einzuhalten.

Die Wirkung des Produkts muss für die Einwirkzeit(en) nach Abschnitt 4, Tabelle 1 bestimmt werden. Sofort nach Ablauf der gewählten Einwirkzeit wird durchmischt [(5.3.1.6 a)] und eine Verdünnungsreihe mit einem Faktor von zehn unter Verwendung von eisgekühltem MEM [5.2.2.10 b)] durchgeführt/vorbereitet und in ein Eisbad (5.3.1.11) gestellt. Sofort wird eine Verdünnungsreihe mit einem Faktor von zehn aus diesem Gemisch (Prüfmischung + MEM) erstellt. Die Pipettenspitzen sind nach jeder Verdünnung zu wechseln, um eine Virenverschleppung zu verhindern. Nach der Bebrütung ist der Virustiter zu berechnen, die Reduktion der Virusinfektiosität wird berechnet aus der Differenz der lg Virustiter vor (5.5.7) und nach der Behandlung mit dem Produkt.

Nach der Behandlung mit dem Produkt wird die Infektiosität mit einem der folgenden Verfahren geprüft:

a) Quantalversuche (Endpunkttitration) – [die Verfahren 1) bis 3) sind alternativ anzuwenden]

1) Virustitration auf Zellen in Suspension auf Mikrotiterplatten:

0,1 ml jeder Verdünnungsstufe wird, beginnend mit der höchsten Verdünnung, in sechs oder acht Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (5.3.1.14) übertragen. 0,1 ml einer Zellkultursuspension (5.2.2.11) wird in einer solchen Dichte hinzugefügt, dass die Bildung einer einschichtigen Zellschicht (> 90 %) mindestens innerhalb von zwei Tagen in der Zellkontrollprobe möglich ist. Parallel dazu dienen sechs oder acht Vertiefungen als Zellkontrollprobe und erhalten keine Virussuspension.

Die zytopathologische Wirkung (CPE) des Virus wird nach der geeigneten Bebrütungszeit (entsprechend dem Virustyp) mittels eines Umkehr-Mikroskops beurteilt.

2) Virustitration auf einschichtigen Zellschichten auf Mikrotiterplatten:

0,1 ml jeder Verdünnungsreihe mit einem Faktor von zehn wird in sechs bis acht Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (5.3.1.14) übertragen, die eine konfluierende (> 90 %) einschichtige Zellschicht (5.2.2.11) ohne Medium enthalten. In die letzte Reihe von sechs oder acht Vertiefungen wird 0,1 ml Kulturmedium (5.2.2.10) gegeben, sie dient als Zellkontrollprobe. Nach einer Bebrütungsdauer von 1 h bei 37 °C wird jeder Vertiefung 0,1 ml Zellkulturmedium (5.2.2.10) zugesetzt. Bei Verdünnungsreihen müssen die Spitzen oder Pipetten bei jedem Verdünnungsschritt gewechselt werden. Die Pipetten für die Röhrchen oder Vertiefungen sind auszuwechseln, wenn Medium zugesetzt wird.

3) Virustitration auf einschichtigen Zellschichten (5.2.2.11) in Zellkultur-Röhrchen oder -Fläschchen:

Punkt 2) gilt mit der Änderung, dass die Volumen mit dem Faktor 5 bis 10 multipliziert werden.

b) Plaqueversuche

Vertiefungen in Untersuchungstabletts aus Kunststoff (Oberflächendurchmesser 30 mm bis 35 mm) mit konfluierenden einschichtigen Zellschichten (5.2.2.11) werden einmal mit PBS (5.2.2.3) gewaschen und mit 0,2 ml der Verdünnungsreihen der Viren mit Zellerhaltungsmedium [5.2.2.10 b)] beimpft. Im Allgemeinen werden drei Vertiefungen je Verdünnung verwendet. Nach einer Adsorptionsdauer von 1 h bei 37 °C, wäh-

rend der die Einschicht-Zelllagen durch Neigen der Platten alle 8 min bis 10 min feucht gehalten werden, wird das Inokulum entfernt und die Zelllagen werden einmal mit PBS (5.2.2.3) gewaschen. Anschließend werden die Vertiefungen mit 3 ml eines Gemischs aus verflüssigter Agarose oder einem sonstigen geeigneten halbfesten Medium und doppelt konzentriertem MEM mit 4 % FCS (5.2.2.5) überschichtet. Die Kulturen werden für 2 Tage bis 3 Tage bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank (5.3.1.3) bebrütet.

Die Plaques können nach Zusatz einer zweiten Überschichtung mit der gleichen Zusammensetzung wie die erste, die ebenfalls 5 % Neutralrotlösung (5.2.2.4) 1 : 1 000 enthält, und weiterer Bebrütung (im Dunkeln) bei 37 °C für 24 h bis 48 h in einem CO₂-Brutschrank (5.3.1.3) ausgezählt werden (5.6.2.3).

Die Auszählung kann auch nach Zugabe von Kristallviolett erfolgen. Die Einschicht-Zellkulturen werden durch Zugabe von 2 ml Trichloressigsäure (TCA) 10 % (5.2.2.6) über die Agarüberschichtung für 10 min bis 15 min bei (20 ± 1) °C fixiert. Die Agarüberschichtung wird dann entfernt und 2 ml Kristallviolett 0,1 % in 20 %igem Ethanol werden zugegeben. Nach 10 min bis 15 min bei (20 ± 1) °C werden die Vertiefungen ausgiebig mit Wasser gespült und die Plaques (weiße Flecken) werden ausgezählt (5.6.2.3).

5.5.3 Modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte

Gebrauchsfertigen Produktes dürfen nach dem nachfolgend beschriebenen modifizierten Prüfverfahren geprüft werden. Der Titer der Virusprüfsuspension muss mindestens 10⁸ TCID₅₀/ml betragen. Die Menge des zu verwendenden Produktes muss 9,7 ml betragen. Die Menge der zu verwendenden Virusprüfsuspension beträgt 0,1 ml und die Menge der Belastungssubstanz(en), Zubereitung in 5fach höherer Konzentration (5.2.2.8.4), ist 0,2 ml.

ANMERKUNG 1 Die Konzentration des Produkts beträgt in dem modifizierten Verfahren 97 %.

ANMERKUNG 2 Das modifizierte Verfahren gilt nicht für die Prüfung von Handwaschprodukten.

5.5.4 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität

5.5.4.1 Zytotoxische Wirkung

Zur Überprüfung einer möglichen morphologischen Veränderung der Zellstrukturen durch das Desinfektionsmittel werden 1 Teil Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) und (1) Teil Belastungssubstanz(en) (5.2.2.8) mit 8 Teilen der Produktprüflösung (5.4.2) gemischt.

Wenn das modifizierte Verfahren für gebrauchsfertige Lösungen (5.5.3) durchgeführt wird, müssen 9,7 ml der Produktprüflösung mit 0,2 ml Belastungssubstanz(en), zubereitet in 5facher erhöhter Konzentration, und 0,1 ml Wasser (5.2.2.2) vermischt werden.

Danach werden in beiden Fällen Verdünnungsreihen mit einem Faktor von zehn in dem Kulturmedium hergestellt und die Zellkulturen (einlagige Zellschichten oder Zellsuspensionen) werden damit beimpft. Dies muss parallel zu jeder Prüfung durchgeführt werden. Etwaige mikroskopische Veränderungen an den Zellen werden beim Ablesen der Prüfung auf Zytotoxizität (CPE) aufgezeichnet.

5.5.4.2 Elimination der Zytotoxizität

Falls die Zytotoxizität so stark ist, dass der verbleibenden Infektionstiter kleiner ist als die geforderten 4 lg (2 lg für die hygienische Händewaschung) TCID₅₀ und somit die Reduktion um 4 lg (2 lg für die hygienische Händewaschung) nicht bestimmt werden kann, müssen spezielle Techniken verwendet werden, wie z. B.:

a) Bestimmung des „Restvirus“-Titters mit dem Large-Volume-Plating (LVP)-Methode (5.6.2.4).

Bei der LVP wird die niedrigste, offensichtlich nicht zytotoxische Verdünnung der Prüfmischung nach der angegebenen Einwirkzeit in eiskaltes Medium gegeben, und diese Prüfmischung muss zu einer bestimmten Anzahl von Vertiefungen gegeben werden, die die Indikatorzellen in 100 µl Zellkulturmedium enthalten.

ANMERKUNG Der Nachweis von Restviren kann durch die Untersuchung eines großen Probenvolumens verbessert werden.

Die Zellen werden für eine bestimmte Inkubationszeit kultiviert. Anschließend werden die Zellen auf virusbedingte Veränderungen der Zellmorphologie untersucht.

- b) Molekularsiebfiltration, d. h. Sephadex™ LH 20⁶ (B.1);
- c) Ultrafiltration mit Minicon®⁶ (Millipore) oder Fertigsäulen, d. h. MicroSpin™ S 400 HR columns⁶ (GE Healthcare) (B.2);

b) und c) erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers.

Geeignete Kontrollen sind erforderlich, um nachzuweisen, dass das Verfahren die Infektiosität der Viren nicht reduziert. Zusätzlich ist ein Vergleich zwischen der unfiltrierten und der filtrierten Prüfmischung vorzunehmen. Bei abweichenden Ergebnissen, z. B. bei Titerunterschieden von bis zu 3 lg Stufen, muss die LVP-Methode angewendet werden ([14], siehe Appendix G).

5.5.5 Interferenzkontrolle – Kontrolle der Zellsensibilität

Ziel der Interferenzkontrolle ist festzustellen, ob die Zellsensibilität für die Virusinfektion durch die Behandlung mit der Produktprüfsuspension nicht negativ beeinflusst wird.

Vergleichende Virustitrationen werden an Zellen, die mit und ohne Produktprüfsuspension behandelt wurden, durchgeführt, um die Verminderung der Sensibilität gegenüber Viren wie folgt zu bestimmen:

a) Behandlung der Zellen:

- 1) Einschicht-Zellkulturen: 0,1 ml der niedrigsten, offenbar nicht zytotoxischen Verdünnung (keine mikroskopisch erkennbare Veränderung) der Produktprüflösung (5.4.2) oder PBS (5.2.2.3) und 0,1 ml des Kulturmediums werden auf jede der sechs oder acht dargestellten Zellkulturen ohne jedes Medium auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (5.3.1.14) aufgetragen. Nach Einwirkung für 1 h bei 37 °C wird der Überstand verworfen;
- 2) Zellsuspensionen: ein Volumen der niedrigsten, offenbar nicht zytotoxischen Verdünnung des Produktes oder PBS (5.2.2.3) wird einem Volumen doppelt konzentrierter Zellsuspension zugegeben. Nach Einwirkung für 1 h bei 37 °C werden die Zellen abzentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert.

b) Vergleichende Virustitration:

Die Virusprüfsuspension (5.4.1) ist von 10^{-1} bis 10^{-10} zu verdünnen und wird auf den behandelten oder unbehandelten Zellen parallel zu 5.5.2 a) oder b) titriert.

Zur Bestimmung einer verbleibenden Infektiosität können nur die Verdünnungen der Produktprüflösung verwendet werden, die:

- 1) einen niedrigen Grad der Zellzerstörung (< 25 % der Einschicht-Zellkultur) aufweisen; oder
- 2) eine Reduktion des Virentiters um < 1 lg zwischen der Virusprüfsuspension, die auf mit PBS behandelten Zellen titriert wurde, und den mit der Produktprüflösung behandelten Zellen, hervorrufen.

6 Sephadex™ LH 20, Minicon® und MicroSpin™ S 400 HR sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Information dient zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.5.6 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Produkts

5.5.6.1 Verdünnung in eisgekühltem Medium

1 Teil Belastungssubstanz (5.2.2.8) wird in einen Behälter pipettiert, dessen Volumen für die ausreichende Durchmischung geeignet ist. Dem Behälter wird 1 Teil MEM + 2 % FCS (5.2.2.5) hinzugefügt. 8 Teile der Produktprüfsuspension (5.4.2) werden dem Behälter hinzugefügt. Es wird durchmischt [5.3.1.6 a)].

Wenn das modifizierte Prüfverfahren für gebrauchsfertige Produkte (5.5.3) verwendet wird, müssen 9,7 Teile der Produktprüfsuspension mit 0,2 Teilen der Belastungssubstanz(en), Zubereitung in 5fach höherer Konzentration, und 0,1 Teil MEM + 2 % FCS (5.2.2.5) durchmischt werden.

1 Teil (z. B. 0,5 ml) des Prüfgemisches werden in 8 Teilen (z. B. 4,0 ml) eisgekühltes MEM + 2 % FCS (5.2.2.5) pipettiert. 1 Teil (z. B. 0,5 ml) Virusprüfsuspension (5.4.1) werden in den Behälter zugegeben; dabei ist sorgfältig darauf zu achten, dass der obere Teil der Innenseite nicht berührt wird. Es wird erneut durchmischt und die Stoppuhr in Gang gesetzt. Die Mischung wird für $30 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ im Eisbad (5.3.1.11) bebrütet. Anschließend werden sofort 10fach-Verdünnungen hergestellt und das Virus titriert [5.5.2 a) oder b) ist anzuwenden]. Diese Kontrolle ist parallel zur Prüfung (5.5.2) durchzuführen.

Für die Kontrolle wird die Produktprüflösung durch Wasser ersetzt (5.2.2.2 oder 5.2.2.7).

Die Differenz zwischen der Kontrolle der Suspension und der entsprechenden Prüfviruskontrolle muss $\leq 0,5 \text{ lg}$ sein.

5.5.6.2 Filtrationstechnik

Wenn die Differenz $> 0,5 \text{ lg}$ ist, kann eine eisgekühlte Verdünnung auf 1/100 versucht werden, oder es kann eine andere Technik verwendet werden: LVP, Molekularsiebfiltration mittels SephadexTM LH 20, Ultrafiltration mit Minicon® (Millipore) oder mit Fertigsäulen MicroSpin S 400 HR columns (GE Healthcare) (Anhang B).

Die Filtrationstechnik ist bei Einwirkzeiten von weniger als 1 min nicht anwendbar, da die Zentrifugation zu lange dauert.

Die Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung des Desinfektionsmittels muss in diesem Fall unter den gleichen Bedingungen erfolgen.

Geeignete Kontrollen sind erforderlich, um nachzuweisen, dass das Verfahren die Infektiosität des Virus nicht verringert. Zusätzlich ist ein Vergleich zwischen unfiltrierter und filtrierter Prüfmischung vorzunehmen. Bei abweichenden Ergebnissen, z. B. bei Titerunterschieden von bis zu 3 lg Stufen, muss die LVP-Methode angewendet werden ([14], siehe Appendix G).

5.5.7 Referenz-Virusinaktivierungsprüfung

5.5.7.1 Allgemeines

Formaldehyd muss für eine Kontrolle des Prüfsystems einbezogen werden. Ein anderes geeignetes Produkt [z. B. Glutaraldehyd, Peressigs\char"00E4\relaxure (PAA), Ethanol, Isopropanol] darf gewählt werden, wenn Ringversuche eine ähnliche Reproduzierbarkeit gezeigt haben.

7 SephadexTM LH 20, Minicon® und MicroSpinTM S 400 HR sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Information dient zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN

5.5.7.2 Formaldehydreferenz

5.5.7.2.1 Allgemeines

1 Teil (z. B. 2 ml) der Virusprüfsuspension (5.4.1) sind mit 4 Teilen (z. B. 8 ml) PBS (5.2.2.3) und (5) Teilen (z. B. 10 ml) 1,4 % Formaldehydlösung (Masse/Volumen) (Anhang D) zu mischen, um die Validität des Systems zu überprüfen. Die Einwirkzeiten betragen 30 min und 60 min mit Ausnahme des Vaccinia Virus, bei dem die Einwirkzeiten 5 min und 15 min betragen.

Unmittelbar nach Beendigung der Einwirkzeit wird durchmischt [5.3.1.6 a)] und 1 Teil (z. B. 0,2 ml) des Prüfgemischs werden in ein Röhrchen, das 9 Teile (z. B. 1,8 ml) eisgekühltes Medium (MEM + 2 % FCS) enthält, pipettiert. Anschließend erfolgt eine weitere 10fache Verdünnung. Die Mischung wird im Eisbad (5.3.1.11) belassen. Verdünnungen bis zu einem Faktor von 10^{-6} werden durch Pipettieren des verdünnten Prüfgemischs in weitere Röhrchen, die eisgekühltes MEM + 2 % FCS im Eisbad enthalten, hergestellt. Der Verdünnungsfaktor muss 10 betragen. Die Verdünnungen werden für nachfolgende Prüfungen eisgekühlt aufbewahrt.

In außergewöhnlichen Fällen (z. B. zu geringes Volumen der Virusprüfsuspension) können kleinere Volumina der Reagenzien und der Virusprüfsuspension verwendet werden, wobei sicherzustellen ist, dass die relativen Proportionen aufrechterhalten werden.

5.5.7.2.2 Überprüfung der Zytotoxizität der Formaldehydprüflösung

Es gilt 5.5.4 mit den folgenden Änderungen:

4 Teile (z. B. 8 ml) von 1,4 % (Masse/Volumen) Formaldehyd werden anstelle des Produkts verwendet. 1 Teil (z. B. 2 ml) des Wassers (5.2.2.2) ist mit 4 Teilen (z. B. 8 ml) PBS (5.2.2.3) und (5) Teilen (z. B. 10 ml) 1,4 % (w/v) Formaldehyd (Anhang D) zu mischen. Diese Mischung wird in einem Eisbad auf 10^{-5} weiter verdünnt und werden in Zellkulturen (Monolayer oder suspendierte Zellen) beimpft. Etwaige mikroskopische Veränderungen an den Zellen werden beim Ablesen der Prüfung auf Zytotoxizität (CPE) aufgezeichnet.

5.5.7.3 Referenzkontrolle für chemo-thermische Desinfektionsverfahren mit Peressigsäure

5.5.7.3.1 Allgemeines

Diese Prüfungen werden nur mit murinen Parvoviren durchgeführt. 50 ppm Peressigsäure (PAA) ist als Validierungskontrolle für Oxidationsprodukte zu verwenden. Die PAA-Referenzkontrollprüfung wird bei 60 °C ohne Verwendung einer Proteinladung durchgeführt, wobei die Produktprüflösung durch die Referenzprüflösung ersetzt werden muss. Dazu wird 1 Teil (z. B. 0,1 ml) der Virusprüfsuspension mit 1 Teil (z. B. 0,1 ml) Wasser (5.2.2.2) und (8) Teilen (z. B. 0,8 ml) 62,5 ppm PAA für die Kontrolle der Validität des Systems gemischt. Die Einwirkzeit beträgt 10 min. Die entsprechende Kontrolle wird bei 60 °C und einer Einwirkzeit von 10 min durchgeführt. 1 Teil (z. B. 0,1 ml) der Virusprüfsuspension wird mit 9 Teilen (z. B. 0,9 ml) Wasser (5.2.2.2) gemischt. Die Bestimmung der Konzentration und die Herstellungsbedingungen für eine hochkonzentrierte Peressigsäurelösung sind in Anhang D beschrieben.

5.5.7.3.2 Überprüfung der Zytotoxizität der Peressigsäureprüflösung

Zur Überprüfung einer möglichen morphologischen Veränderung der Zellen durch Peressigsäure werden 8 Teile (z. B. 0,8 ml) 62,5 ppm PAA zu 2 Teilen (z. B. 0,2 ml) Wasser (5.2.2.2) gegeben. Verdünnungsreihen mit einem Faktor von zehn werden im Kulturmedium hergestellt und in Zellkulturen (Monolayer oder suspendierte Zellen) beimpft. Dies muss parallel zu jeder Prüfung erfolgen. Etwaige mikroskopische Veränderungen an den Zellen werden beim Ablesen der Prüfung auf Zytotoxizität (CPE) aufgezeichnet.

5.5.7.4 Andere Referenzkontrollen: 70% Isopropanol

Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den Laboren sollte 70%iges Isopropanol als handelsübliches, gebrauchsfertiges Produkt bezogen werden.

5.5.8 Titration der Viruskontrollprobe

Die Infektiosität der Virusprüfsuspension ist unter Prüfbedingungen, zu Beginn der Einwirkzeit und bei der in der Prüfung verwendeten maximalen Einwirkzeit zu bestimmen. Die Produktprüflösung (5.4.2) wird durch Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) oder Wasser (5.2.2.2) bei gebrauchsfertigen Produkten ersetzt.

Es gilt 5.5.2 mit folgender Änderung:

Anstelle der Produktprüflösung werden 8 Teile standardisierter Härte (5.2.2.7) oder Wasser (5.2.2.2) für gebrauchsfertige Produkte oder 9,7 ml Wasser (5.2.2.2) bei gebrauchsfertigen Produkten für die Verwendung im modifizierten Verfahren zugegeben.

5.5.9 Titration der Untersuchungsproben

Es gilt 5.5.2 a) oder b).

5.6 Versuchsergebnisse und Berechnung

5.6.1 Protokollierung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Zellkultur werden als „0“ für das Fehlen einer zytopathologischen Wirkung (CPE) und mit „1“ (ungefähr 25 % der Zellen mit CPE) bis „4“ (alle Zellen mit CPE) (Quantalversuche) bzw. als Anzahl der Plaques (plaquebildende Einheiten, PFU) dokumentiert.

5.6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID₅₀ bzw. PFU)

5.6.2.1 Allgemeines

Die Berechnung der geschätzten Viruskonzentration ist mittels geeigneter Verfahren durchzuführen. Die Titer müssen mit ihrem 95%igen Konfidenzintervall berechnet werden, von dem die Reduktion mit dem 95%igen Konfidenzintervall (5.6.2.5) berechnet werden muss.

5.6.2.2 Berechnung der TCID₅₀ für Quantalversuche/-bestimmungen

Ein geeignetes Berechnungsverfahren ist das Verfahren nach Spearman-Kärber.

Das Verfahren nach Spearman-Kärber ist einfach und gibt Ergebnisse, die mit anderen Berechnungen hoch kompatibel sind. Voraussetzung der Beurteilung ist die Verwendung mehrerer Verdünnungen, die den Bereich von der Infektion aller Zellkultureinheiten bis zu denen, innerhalb derer es keine Virenvermehrung mehr gibt, abdecken. Der Mittelwert und die Standardabweichung können nur dann berechnet werden, wenn mehrere Prüfergebnisse vorliegen.

Bei Verwendung der Spearman-Kärber-Verfahren wird der logarithmische Infektiositätstiter in TCID₅₀/ml wie folgt berechnet:

$$m = x_K + d/2 - d \sum p_i \quad (1)$$

Dabei ist

m der negativer dekadischer Logarithmus des Titers auf Basis des Prüfvolumens;

x_K der Logarithmus der niedrigsten Dosierung (Verdünnungslevel), bei dem alle Prüfbjekte eine positive Reaktion abgeben;

d der Logarithmus des Verdünnungsfaktors;

p_i die beobachtete Reaktionsrate.

a) BEISPIEL mit 6 Vertiefungen

Tabelle 3 — Beispiel von Titrationsergebnissen mit 6 Vertiefungen

Verdünnung (-lg)	Ergebnis ^a	% positiv
4	444 444	100
5	444 344	100
6	443 003	66,7
7	400 020	33,3
8	000 000	0
Summe der positiven Kulturen in %		300
^a 1 bis 4: Virus ist vorhanden, Grad der zytopathologischen Wirkung (CPE) in 6 Zellkultureinheiten (Röhrchen, Vertiefungen, Mikrotiterplatten); 0: kein Virus vorhanden		

Unter Verwendung der Daten aus Tabelle C.1 wird der 50 %-Endpunkt wie folgt berechnet:

Negativer Logarithmus des 50 %-Endpunkts = Negativer Logarithmus der höchsten verwendeten Viruskonzentration – {[Summe der bei jeder Verdünnung geschädigten Zellkultureinheiten in %/100) – 0,5] × (lg der Verdünnungen)}

$$\begin{aligned}
 & -4 - \left[\left\{ \frac{(100+100+66,7+33,3+0)}{100} \right\} - 0,5 \right] \times 1 = \\
 & -4 - \left[\frac{300}{100} - 0,5 \right] \times 1 \\
 & -4 - 2,5 \times 1 = -6,5
 \end{aligned}$$

Deshalb ist der 50 %-Endpunkt $10^{-6,5}$ oder

$$\lg \text{TCID}_{50}/100 \mu\text{l} = 6,5$$

$$\lg \text{TCID}_{50}/1 \text{ ml} = 7,5$$

b) BEISPIEL mit 8 Vertiefungen

Exemplarische Berechnung des Virustiters und der Reduktion nach Spearman und Kärber mit 8 Vertiefungen.

Titerberechnung der Kontrolltitration des ersten Prüflaufs (T_1):

Tabelle 4 — Beispiel von Titrationsergebnissen (Tabelle C.2, 5 min Einwirkzeit)

Verdünnung	lg	Anzahl positiver Kulturen pro Verdünnung	p_i
1 : 10	1	8/8	1
1 : 100	2	8/8	1
1 : 1 000	3	8/8	1
1 : 10 000	5	8/8	1
1 : 100 000	6	8/8	1
1 : 1 000 000	7	6/8	0,75

Tabelle 4 (fortgesetzt)

1 : 10 000 000	8	4/8	0,5
1 : 100 000 000	9	1/8	0,125
1 : 1.000 000 000	10	0/8	0
Ausgangsparameter: 100 µl Inokulum pro Vertiefung, 8 Wiederholungen pro Verdünnung und eine lg-Verdünnungsreihe			

Der Titer wird anhand der in Tabelle C.2 angegebenen Zahlenwerte berechnet (Viruskontrolle):

Der logarithmische Infektiositätstiter nach Spearman und Kärber (lg TCID₅₀/ml) wird mit Gleichung (1) berechnet:

$$m = x_k + \frac{d}{2} - d \sum p_i = -5 + \frac{1}{2} - 1 \times 2,38 = -6,88$$

Unter Berücksichtigung des verwendeten Prüfvolumens ergibt sich ein Titer von 7,88 lg TCID₅₀/ml.

Die Standardabweichung und das 95%-Konfidenzintervall des Titers wird aus den angegebenen Werten (Tabelle C.2; Viruskontrolle) mit Hilfe der Gleichung (5) berechnet:

$$S_m = \sqrt{d^2 \sum \{[p_i (1 - p_i)] / (n - 1)\}} = \sqrt{1^2 \sum \{[p_i (1 - p_i)] / (8 - 1)\}}$$

Da $p_1 = 1$, $p_2 = 0,75$, $p_3 = 0,5$ und $p_4 = 0,125$ und n in allen 8 Verdünnungen ist, ergibt sich

$$p_1(1 - p_1)/(n_1 - 1) = 0$$

$$p_2(1 - p_2)/(n_2 - 1) = [0,75 \times (1 - 0,75)]/(8 - 1) = 0,0268$$

$$p_3(1 - p_3)/(n_3 - 1) = [0,50 \times (1 - 0,50)]/(8 - 1) = 0,0357$$

$$p_4(1 - p_4)/(n_4 - 1) = [0,125 \times (1 - 0,125)]/(8 - 1) = 0,0156$$

$$S_m = \sqrt{1 \times (0,0268 + 0,0357 + 0,0156)} = 0,28$$

d. h. $2s_m = 0,56$

Das Ergebnis ist $k_a = 0,56$.

Der Titer der Kontrolltitration beträgt somit $7,88 \pm 0,56$ lg TCID₅₀/ml.

Berechnet man analog den Restvirustiter des ersten Prüflaufs (60 min Einwirkzeit, Tabelle C.2), so ergibt sich für dieses Beispiel ein Wert von $3,50 \pm 0,00$ lgTCID₅₀/ml.

Die Reduktion (R) wird nach Gleichung (6) wie folgt berechnet:

$$R_{T1} = 7,88 - 3,50 = 4,38$$

R ist für den ersten Prüflauf somit 4,38 lg.

Das 95%ige Konfidenzintervall von R ($K_{R(T1)}$) wird nach Gleichung (7) wie folgt berechnet:

$$K_{R(T1)} = \sqrt{S_a^2 + S_b^2} = \sqrt{0,56^2 + 0^2} = 0,56$$

Die Reduktion des ersten Prüflaufs beträgt somit $4,38 \pm 0,56$ lg.

Unter der Annahme, dass die Titer der Viruskontrolltitration und der Restvirustitration im zweiten Prüflauf unter analogen Ausgangsbedingungen $(8,25 \pm 0,22)$ lg TCID₅₀/ml und $(3,25 \pm 0,34)$ lg TCID₅₀/ml betragen, errechnet sich R_{T2} einschließlich des 95%igen Konfidenzintervalls zu $5,0 \pm 0,40$.

Der durchschnittliche R -Wert aus beiden Prüfläufen einschließlich des 95 %-Konfidenzintervalls wird nach Gleichung (9) wie folgt berechnet:

$$R_{(mi)} = \frac{(R_{T1} + R_{T2})}{2} = \frac{(4,38 + 5,0)}{2} = 4,69$$

Das 95%ige Konfidenzintervall der durchschnittlichen R ($K_{R(mi)}$) wird nach Gleichung (10) wie folgt berechnet:

$$K_{R(mi)} = \sqrt{\frac{[K_{R(T1)}]^2 + [K_{R(T2)}]^2}{2}} = \sqrt{\frac{(0,56)^2 + (0,4)^2}{2}} = 0,49$$

Die Gesamtreduktion R -aus beiden Prüfläufen (einschließlich 95%igem Konfidenzintervall) für das gegebene Beispiel beläuft sich somit auf $4,69 \pm 0,49$ lg.

Die einzelnen Titrationsen erfüllen die Anforderungen der Leitlinie an die Genauigkeit, da die 95%-Konfidenzintervalle der berechneten Titer $\leq 0,5$ lg sind.

5.6.2.3 Berechnung der PFU

Die Anzahl der plaquebildenden Einheiten je Milliliter (PFU/ml) sollte nach den in diesem Abschnitt beschriebenen Prinzipien berechnet werden.

Für die Berechnung dürfen nur Platten mit nicht konfluierenden Plaques verwendet werden. Die PFU sollten aus drei Platten berechnet werden. Falls Platten aus zwei Verdünnungen in diesen Bereich fallen, wird die Zahl der PFU/ml als gewichteter Mittelwert berechnet. Wenn nur Platten einer Verdünnung in diesem Bereich liegen, wird der arithmetische Mittelwert berechnet.

Zur Berechnung der gewichteten mittleren Anzahl wird folgende Gleichung verwendet:

$$PFU/t = \frac{\sum c_1 + c_2 + \dots c_n}{(n_1 + n_2 \times v_2 + \dots n_n \times v_n) \times d} \quad (2)$$

Dabei ist

t das Prüfvolumen, das je Verdünnungsstufe auf eine Platte aufgetragen wurde;

c_1 die Anzahl der PFU auf allen Platten der ersten Verdünnungsstufe (niedrigste Verdünnung) mit nicht konfluierenden Plaques;

c_2 die Anzahl der PFU auf allen Platten der zweiten Verdünnungsstufe mit nicht konfluierenden Plaques;

c_n die Anzahl der PFU auf allen Platten der letzten Verdünnungsstufe (höchste Verdünnung);

n_1 die Anzahl aller Platten der ersten Verdünnungsstufe (niedrigste Verdünnung) mit nicht konfluierenden Plaques, die c_1 entspricht;

n_2 die Anzahl aller Platten der zweiten Verdünnungsstufe mit nicht konfluierenden Plaques (c_2);

v_2 der Verdünnungsfaktor von n_1 zu n_2 (z. B. $n_1 = 10^{-3}$ und $n_2 = 10^{-4}$, dann ist $v_2 = 0,1$);

n_n die Anzahl aller Platten der letzten Verdünnung, auf denen PFU gezählt wurden (c_n);