

**DIN EN 14675**

ICS 71.100.35

Einsprüche bis 2013-09-22  
Vorgesehen als Ersatz für  
DIN EN 14675:2006-04

**Entwurf**

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –  
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden  
Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den  
Veterinärbereich –  
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);  
Deutsche Fassung prEN 14675:2013**

Chemical disinfectants and antiseptics –

Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area –

Test method and requirements (phase 2, step 1);

German version prEN 14675:2013

Antiseptiques et désinfectants chimiques –

Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire –

Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);

Version allemande prEN 14675:2013

**Anwendungswarnvermerk**

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2013-07-01 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 online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter [www.entwuerfe.din.de](http://www.entwuerfe.din.de) bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter [www.entwuerfe.normenbibliothek.de](http://www.entwuerfe.normenbibliothek.de), sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an [nal@din.de](mailto:nal@din.de) möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter [www.din.de/stellungnahme](http://www.din.de/stellungnahme) oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter [www.dke.de/stellungnahme](http://www.dke.de/stellungnahme) abgerufen werden;
- oder in Papierform an den Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) 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 32 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

## Nationales Vorwort

Die Europäische Norm wurde von der Arbeitsgruppe 2 „Anwendung im Veterinärbereich“ (Sekretariat: Vereinigtes Königreich, BSI) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird, unter Beteiligung deutscher Experten erarbeitet.

Im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. ist der Arbeitsausschuss NA 057-02-03 AA „Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich (DTL)“ im Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) zuständig.

## Änderungen

Gegenüber DIN EN 14675:2006-04 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Aufnahme von normativen Verweisungen;
- b) Begriffe (3) wurden überarbeitet;
- c) Anforderungen (4) wurden überarbeitet (Tabelle 1 „Obligatorische und zusätzliche Prüfbedingungen“ neu aufgenommen);
- d) Neuer Unterabschnitt 5.6.3 „Virustitration auf einschichtigen Zelllagen auf Mikrotiterplatten“ aufgenommen;
- e) Unterabschnitt (5.8 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Desinfektionsmittels) aufgenommen;
- f) Anhang B wurde überarbeitet und die „Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebfiltration“ (B.4) aufgenommen;
- g) Anhang E (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation von Europäischen Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika gestrichen;
- h) Norm wurde redaktionell überarbeitet.

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

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

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

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm  
Dokument-Untertyp:  
Dokument-Stage: CEN-Umfrage  
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.4e - RC2

## Inhalt

|                                                                                                                                    | Seite |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Vorwort .....                                                                                                                      | 4     |
| Einleitung.....                                                                                                                    | 5     |
| 1 Anwendungsbereich .....                                                                                                          | 6     |
| 2 Normative Verweisungen .....                                                                                                     | 6     |
| 3 Begriffe .....                                                                                                                   | 6     |
| 4 Anforderungen .....                                                                                                              | 7     |
| 5 Prüfverfahren .....                                                                                                              | 8     |
| 5.1 Kurzbeschreibung .....                                                                                                         | 8     |
| 5.2 Materialien und Reagenzien .....                                                                                               | 8     |
| 5.2.1 Prüfvirus .....                                                                                                              | 8     |
| 5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien .....                                                                                            | 9     |
| 5.3 Apparate und Glasgeräte .....                                                                                                  | 14    |
| 5.3.1 Allgemeines .....                                                                                                            | 14    |
| 5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere die folgenden Geräte: .....                                        | 15    |
| 5.4 Produkt-Prüflösungen .....                                                                                                     | 16    |
| 5.5 Verfahren zur Bewertung der viruziden Wirkung des Produktes .....                                                              | 16    |
| 5.5.1 Allgemeines .....                                                                                                            | 16    |
| 5.6 Infektiositäts-Versuch .....                                                                                                   | 17    |
| 5.6.1 Vorverdünnen der Virussuspension .....                                                                                       | 17    |
| 5.6.2 Virustitration von suspendierten Zellen in Mikrotiterplatten .....                                                           | 17    |
| 5.6.3 Virustitration auf einschichtigen Zelllagen auf Mikrotiterplatten .....                                                      | 17    |
| 5.6.4 Plaque-Untersuchung .....                                                                                                    | 18    |
| 5.7 Viruzidieprüfung – Vorbereitung .....                                                                                          | 18    |
| 5.7.1 Allgemeines .....                                                                                                            | 18    |
| 5.7.2 Prüfverfahren .....                                                                                                          | 18    |
| 5.8 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Desinfektionsmittels .....                                     | 19    |
| 5.8.1 Verdünnung in eisgekühltem Medium .....                                                                                      | 19    |
| 5.8.2 Filtrationstechnik .....                                                                                                     | 19    |
| 6 Berechnung und Angabe der Ergebnisse .....                                                                                       | 19    |
| 6.1 Versuchsprotokoll zum CPE-Ergebnis .....                                                                                       | 19    |
| 6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID <sub>50</sub> ) .....                                                                | 19    |
| 6.3 Berechnung der PFU .....                                                                                                       | 19    |
| 6.4 Verifizierung der Methodik .....                                                                                               | 20    |
| 6.5 Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten .....                                                                           | 20    |
| 6.6 Angabe der Ergebnisse .....                                                                                                    | 20    |
| 7 Schlussfolgerung .....                                                                                                           | 20    |
| 7.1 Allgemeines .....                                                                                                              | 20    |
| 7.2 Prüfbericht .....                                                                                                              | 21    |
| Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen .....                                                                | 22    |
| Anhang B (normativ) Zytotoxizität, Inaktivierungs-Bezugsprüfung, Titration des Prüfvirus und<br>Entgiftung von Prüfgemischen ..... | 23    |
| B.1 Zytotoxische Wirkung der Produktlösungen .....                                                                                 | 23    |
| B.2 Inaktivierungs-Bezugsprüfung .....                                                                                             | 24    |
| B.3 Titration der Virus-Prüfsuspension .....                                                                                       | 24    |

|                              |                                                                                            |           |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>B.4</b>                   | <b>Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebfiltration .....</b>                    | <b>24</b> |
| <b>B.4.1</b>                 | <b>Molekularsiebfiltration mit Sephadex™ LH 20 .....</b>                                   | <b>24</b> |
| <b>B.4.2</b>                 | <b>Molekulares Sieben mit Microspin-Säule.....</b>                                         | <b>25</b> |
| <b>Anhang C (informativ)</b> | <b>Berechnung des viralen Infektiositätstiters und der Plaque-bildenden Einheiten.....</b> | <b>27</b> |
| <b>C.1</b>                   | <b>Berechnung des viralen Infektiositätstiters.....</b>                                    | <b>27</b> |
| <b>C.2</b>                   | <b>Berechnung der Plaque-bildenden Einheiten (PFU).....</b>                                | <b>28</b> |
| <b>Anhang D (informativ)</b> | <b>Beispiel eines typischen Prüfberichts .....</b>                                         | <b>29</b> |
| <b>Literaturhinweise</b>     | <b>.....</b>                                                                               | <b>30</b> |

## Vorwort

Dieses Dokument (prEN 14675:2013) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 14675:2006 ersetzen.

## Einleitung

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

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

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

## 1 Anwendungsbereich

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

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

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

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

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung 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 (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 Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

**3.1**  
**Zytotoxizität**  
morphologische Veränderung von Zellen und/oder deren Zerstörung oder verminderte Empfindlichkeit gegenüber der Virusvermehrung, verursacht durch das Produkt

**3.2**  
**Belastungssubstanzen**  
Eiweißlösungen und Erythrozyte, die einer Virus-Prüfsuspension vor der Zugabe der Produkt-Prüflösung zugegeben werden zum Nachweis jeglichen Einflusses von Eiweiß und Erythrozyten auf die viruzide Wirkung der Produkt-Prüflösung

**3.3**  
**Plaque-bildende Einheiten (PFU)**  
Anzahl infektiöser Viruspartikel je Volumeneinheit (ml)

**3.4**  
**Virusinaktivierungs-Bezugsversuch**  
Prüfung zur internen Versuchskontrolle mit definiertem Reagenz (z. B. Formalin) anstatt eines Produktes

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

### 3.5

#### Virus-Bezugssuspension

Virussuspension eines festgelegten Virenstammes, der zur Weiterzüchtung nicht öfter als zehnmal überimpft ist, die in der nationalen Kultursammlung gehalten und in kleinen Volumina (weniger als 1 ml) bei  $-70\text{ °C}$  oder vorzugsweise bei etwa  $-196\text{ °C}$  auf flüssigem Stickstoff aufbewahrt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Virus-Stammsuspensionen werden aus den Virus-Bezugssuspensionen hergestellt.

### 3.6

#### Virus-Stammsuspension

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

### 3.7

#### Virus-Prüfsuspension

Virussuspension, die zum Prüfen des Desinfektionsmittels auf viruzide Wirkung verwendet wird

### 3.8

#### Gewebekultur-Infektionsdosis ( $TCID_{50}$ )

50-%-Infektionsdosis einer Virussuspension oder der Verdünnung der Virussuspension, die in 50 % der Zellkultureinheiten eine zytopathologische Wirkung (CPE) (3.9) auslöst

### 3.9

#### virale zytopathologische Wirkung (CPE)

morphologische Veränderung von Zellen und/oder ihre Zerstörung als Folge einer Virusvermehrung

### 3.10

#### virale Plaque

in einer Einschichtkultur unter halbfestem Medium gebildetes Lysisgebiet aufgrund einer Infektion durch einen und der Vervielfältigung eines einzelnen infektiösen Viruspartikel(s)

### 3.11

#### Virus-Titer

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

## 4 Anforderungen

Das Produkt muss, wenn es mit hartem Wasser (5.2.2.3) oder — im Fall von Fertigprodukten — mit Wasser (5.2.2.2) verdünnt sowie nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 geprüft wurde, mindestens eine logarithmische Verminderung des Virus-Titers um 4 zur Folge haben. Es ist auch möglich, das Produkt im Lieferzustand zu prüfen (die höchste Prüfkonzentration beträgt 80 %).

Tabelle 1 — Verbindliche und zusätzliche Prüfbedingungen

|                                                                                                                                                                                                                                                                                             | Verbindliche Bedingungen                          | Zusätzliche Bedingungen |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------|
| Prüforganismus                                                                                                                                                                                                                                                                              | <i>Bovine enterovirus</i> vom Typ 1 (ECBO)        |                         |
| Prüftemperatur <sup>a</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                 | 10 °C                                             | 4 °C, 20 °C oder 40 °C  |
| Einwirkzeit <sup>b</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                    | 30 min                                            | 1 min, 5 min und 60 min |
| Belastungssubstanz – geringfügige Belastung <sup>c</sup>                                                                                                                                                                                                                                    | 3,0 g/l Rinderalbumin                             |                         |
| Belastungssubstanz – hochgradige Belastung <sup>c</sup>                                                                                                                                                                                                                                     | 10 g/l Rinderalbumin zuzüglich 10 g/l Hefeextrakt |                         |
| <sup>a</sup> Zulässige Abweichung $\pm 1\text{ °C}$ .<br><sup>b</sup> Die zulässige Abweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt $\pm 10\text{ s}$ , ausgenommen für $\leq 1\text{ min}$ : $\pm 5\text{ s}$ .<br><sup>c</sup> In Abhängigkeit vom praktischen Anwendungsfall zu wählen. |                                                   |                         |

## 5 Prüfverfahren

### 5.1 Kurzbeschreibung

**5.1.1** Eine Probe des Produktes im Lieferzustand und/oder verdünnt mit hartem Wasser (oder mit Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten) wird zu einer Prüfsuspension des Virus in einer Lösung einer Belastungssubstanz zugegeben. Das Prüfgemisch wird bei  $(10 \pm 1)^\circ\text{C}$  für  $30 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$  (verbindliche Prüfbedingungen) gehalten.

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

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

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

**5.1.2** Zusätzliche und optionale Einwirkzeiten und Temperaturen sind festgelegt.

### 5.2 Materialien und Reagenzien

#### 5.2.1 Prüfvirus

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

— *Bovine enterovirus* vom Typ 1 (en: Enteric Cytopathogenic Bovine Orphan Virus – ECBO) ATCC VR-248<sup>1)</sup>

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

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

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

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

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