

DIN EN 16777

ICS 11.080.20

Einsprüche bis 2017-02-16

Ersatz für

E DIN EN 16777:2014-09

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Versuch auf nicht porösen Oberflächen ohne mechanische
Einwirkung zur Bestimmung der viruziden Wirkung im
humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche und Englische Fassung prEN 16777:2016**

Chemical disinfectants and antiseptics –

Quantitative non-porous surface test without mechanical action for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in the medical area –

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

German and English version prEN 16777:2016

Antiseptiques et désinfectants chimiques –

Essai quantitatif de surface non-poreuse sans action mécanique pour l'évaluation de l'activité virucide désinfectants chimiques utilisés dans le domaine humain médecine –

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

Version allemande et anglaise prEN 16777:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-12-16 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm 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 named@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 Medizin (NAMED), 10772 Berlin, 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 77 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED)

Nationales Vorwort

Dieser zweite europäische Norm-Entwurf wurde von der Arbeitsgruppe 1 *Humanmedizin* (Sekretariat: DIN) des Technischen Komitees CEN/TC 216 *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika* (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

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

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 16777 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

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

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

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

ICS:

Deskriptoren

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

STD Version 2.8f

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	7
4 Anforderungen an die viruzide Wirkung auf Oberflächen	7
5 Prüfverfahren	8
5.1 Kurzbeschreibung	8
5.2 Materialien und Reagenzien, inklusive Zellkulturen	8
5.2.1 Prüfkeime	8
5.2.2 Kulturmedien, Reagenzien und Zellkulturen	9
5.3 Apparate und Glasgeräte	12
5.3.1 Allgemeines	12
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte:	13
5.3.3 Prüfflächen	14
5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und der Produktprüflösungen	14
5.4.1 Prüfkeimsuspensionen (Prüfvirussuspension)	14
5.4.2 Produktprüflösung	15
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts	15
5.5.1 Versuchsbedingungen	15
5.5.2 Prüfverfahren	16
5.5.3 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität	18
5.5.4 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Desinfektionsmittels	19
5.5.5 Referenzprüfung zur Virusinaktivierung	20
5.5.6 Titration der Viruskontrollprobe	20
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	20
5.6.1 Protokollierung der Ergebnisse	20
5.6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID ₅₀ bzw. PFU)	20
5.7 Verifizierung des Verfahrens	21
5.8 Auswertung	21
5.8.1 Allgemeines	21
5.8.2 Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten	21
5.9 Prüfbericht	22
Anhang A (informativ) Beispiele für Viren, sortiert nach ihrem Vorkommen im menschlichen Körper im Falle einer Virusinfektion	24
Anhang B (normativ) Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebung	26
B.1 Molekularsiebung mit Sephadex™ LH 20	26
B.1.1 Kurzbeschreibung	26
B.1.2 Sephadex-Suspension	26
B.1.3 Durchführung	26
B.2 Molekulares Sieben mit MicroSpin™ S 400 HR	28

B.3	Bestimmung des „Restvirus“-Titers mit der Large-Volume-Plating (LVP) Methode.....	28
B.3.1	Allgemeines	28
B.3.2	Beispiel für die Berechnung von Titern und der Reduktion nach der Large-Volume-Plating Methode	29
Anhang C (informativ) Berechnung des viralen Infektiositätstiters.....		31
C.1	Quantalversuche.....	31
C.1.1	Beispiel einer Bestimmung der TCID ₅₀ nach dem Spearman-Kärber-Verfahren	31
C.2	Plaque-Untersuchungen	32
C.3	Biometrische Bewertung von experimentellen Annäherungen und Beurteilung der desinfizierenden Wirkung auf den Virus (Reduktion [R]):.....	33
C.3.1	Allgemeines	33
C.3.2	Berechnung des Virustiters mit 95 %-Vertrauensbereich – Beispiel.....	33
C.3.3	Berechnung der Reduktion und des zugehörigen 95 %-Vertrauensbereichs	34
C.3.4	Berechnung der durchschnittlichen Reduktion ($R_{(mi)}$) und des zugehörigen 95 %-Vertrauensbereichs	35
C.3.5	Praktische Beispiele.....	36
Literaturhinweise.....		39

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16777:2016) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika* erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur zweiten CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Diese Europäische Norm beschreibt ein Oberflächenprüfverfahren zur Feststellung, ob ein als Desinfektionsmittel vorgeschlagenes Produkt in den in Abschnitt 1 beschriebenen Gebieten eine viruzide Wirkung auf nicht porösen Oberflächen aufweist oder nicht.

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

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

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

1 Anwendungsbereich

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

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

Diese Europäische Norm gilt für Bereiche und unter Bedingungen, wo eine Desinfektion aus medizinischen Gründen angezeigt ist. Indikationen dieser Art liegen z. B. vor bei der Patientenbetreuung:

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

und können auch am Arbeitsplatz oder im privaten Bereich gegeben sein.

Eingeschlossen sein können auch Einrichtungen wie Wäschereien und Küchen, die der direkten Versorgung von Patienten dienen.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren dient zur Bestimmung der Wirkung handelsüblicher Zubereitungen oder Wirkstoffe auf Viren unter den Bedingungen, unter denen sie angewendet werden.

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

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

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments 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 14476, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

EN 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Aufbewahrung von Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

EN 14885, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika*

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

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

3 Begriffe

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

4 Anforderungen an die viruzide Wirkung auf Oberflächen

Bei Prüfung in Übereinstimmung mit Tabelle 1 und Abschnitt 5 muss für das Produkt eine dezimal-logarithmische Reduktion (lg) um mindestens vier Stufen des Virustiters der Prüfstämme *Adenovirus* und *Murine Norovirus* nachgewiesen werden. Wie in EN 14885 beschrieben, muss das Produkt für die Auslobung der viruziden Wirksamkeit gegen behüllte Viren (begrenzte Viruzidie) sowohl die Anforderungen nach EN 14476 als auch prEN 16777 mit *Vacciniavirus* erfüllen und für die Auslobung eines begrenzten Spektrums viruzider Wirksamkeit (begrenzte Viruzidie PLUS) müssen die Anforderungen nach EN 14476 und prEN 16777 mit *Adenovirus* und *Murine Norovirus* erfüllt werden. Um jedoch die viruzide Wirkung auszuloben, muss das Produkt die Normen EN 14476 mit *Poliovirus*, *Adenovirus* und *Murine Norovirus* sowie prEN 16777 mit *Adenovirus* und *Murine Norovirus* erfüllen, da *Poliovirus* nicht trocknungsbeständig ist.

Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen

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

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

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

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

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

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

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

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

5.2 Materialien und Reagenzien, inklusive Zellkulturen

5.2.1 Prüfkeime

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

a) Hüllenloses RNA-Virus²⁾

Murine Norovirus, Stamm S99 Berlin

b) Hüllenloses DNA Virus

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

c) Behüllter DNA Virus

Vacciniavirus, Modifizierter *Vacciniavirus* Ankara (MVA), ATCC VR-1508 oder Stamm Elstree, ATCC VR-1549

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

²⁾ Virusstämme dürfen von nationalen oder internationalen Kultursammlungen bezogen werden. Das *Murine Norovirus* darf vom Friedrich-Loeffler-Institut Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Hauptsitz Insel Riems Südufer 10, 17493, Greifswald-Insel Riems; Tel.: +49 (0)38351 7-0, Fax: +49 (0)38351 7-1219, <https://www.fli.de/en/home/> bezogen werden.

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

Wenn zusätzliche Prüfkeime verwendet werden, sind diese unter den im Prüfbericht vermerkten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien) aufzubewahren und zu verwenden. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüfkeime nicht an einem Referenzzentrum klassifiziert wurden, sind deren Identifizierungsmerkmale anzugeben. Darüber hinaus müssen sie von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kultursammlung für fünf Jahre als Referenzprobe zurückgestellt werden.

5.2.2 Kulturmedien, Reagenzien und Zellkulturen

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in dieser Europäischen Norm angegebenen Massen chemischer Substanzen beziehen sich auf die wasserfreien Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um daraus folgende Differenzen in den relativen Molekülmassen zu berücksichtigen

Die Reagenzien müssen analysenrein und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Sie müssen frei von Substanzen sein, die toxisch oder hemmend auf die Prüfkeime wirken.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien handelsübliche Materialien verwendet werden, sofern diese geeignet sind. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten genau befolgt werden.

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

Alle festgelegten pH-Werte werden bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gemessen.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes und darf nicht entmineralisiertes Wasser sein. Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, darf Wasser für Injektionszwecke (siehe Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

Hinsichtlich des Verfahrens zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.7.

5.2.2.3 Phosphatgepufferte Kochsalz-Lösung (PBS)

Natriumchlorid (NaCl)	8,00 g
Kaliumchlorid (KCl)	0,20 g
Dinatriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$)	2,89 g
Kaliumphosphat, einbasisch (KH_2PO_4)	0,20 g
Wasser (5.2.2.2)	auf 1 000,0 ml

5.2.2.4 Neutralrot (1:1 000 verdünnte Lösung)

Die Stammlösung wird aus 0,1 mg/ml Neutralrot (Sigma N7005³⁾ in Wasser (5.2.2.2) hergestellt. Anschließend wird diese durch einen Filter mit einer Porenweite von 0,40 µm gefiltert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

5.2.2.5 Fetales Kälberserum (FKS)

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

Für RAW 264.7-Zellen ist aufgrund der hohen Zellempfindlichkeit gegenüber Endotoxinen ein spezielles FKS zu verwenden.

5.2.2.6 Trichloressigsäure (10 %ige Lösung) (TCA)

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

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

Die Vorgehensweise bei der Herstellung von 1 l Wasser standardisierter Härte ist wie folgt:

- Herstellung von Lösung A: Es werden 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.11) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall ist mit Wasser (5.2.2.2) unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.6) bis zu einem Monat aufbewahren.
- Herstellung Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.6) bis zu einer Woche aufbewahren.
- 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) werden in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.9) gegeben, dazu gegeben werden 6,0 ml Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B. Nach Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen (5.3.2.4). Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt.

Das Wasser standardisierter Härte ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

ANMERKUNG Bei Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produkts zum Wasser standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte, angegeben als Calciumcarbonat (CaCO_3), im Reagenzglas unter 375 mg/l.

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

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 10-fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

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

„Verdünnungsmittel“ werden üblicherweise in anderen Europäischen Normen im medizinischen Bereich zur Herstellung der Belastungssubstanz verwendet. Da es im Bereich der Viruzidie-Prüfung keine Erfahrungen mit Verdünnungsmitteln gibt, wird stattdessen 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 (Rinderserumalbumin)

Rinderserumalbumin ist in Form eines handelsüblichen Produkts zu verwenden oder wie folgt herzustellen:

- 0,3 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) werden in 100 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst;
- die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration;
- die Lösung ist in einem Kühlschrank aufzubewahren und innerhalb von einem Monat zu verbrauchen.

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

5.2.2.8.3 Bedingungen hoher Belastung

a) Rinderserumalbumin:

Rinderserumalbumin ist in Form eines handelsüblichen Produkts zu verwenden oder wie folgt herzustellen:

- 3 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) werden in 100 ml Wasser (siehe 5.2.2.2) gelöst;
- die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration;
- die Lösung ist in einem Kühlschrank aufzubewahren und innerhalb von einem Monat zu verbrauchen.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins (BSA) in der Kontrolle beträgt 3 g BSA je Liter.

b) Schaf-Erythrozyten:

Es werden mindestens 8,0 ml frisches defibriniertes Schafsblut (5.2.2.9) hergestellt. Die Erythrozyten werden bei 800 g_N für 10 min (5.3.2.18) 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.

c) Lösung aus Rinderserumalbumin und Erythrozyten:

3 ml der angereicherten (gepackten) Schaf-Erythrozyten werden in 97 ml 3 %iger (*m/V*) Rinderserumalbuminlösung resuspendiert.

Die Endkonzentration der Schaf-Erythrozyten und des Rinderserumalbumins im Prüfverfahren beträgt 3 ml/l bzw. 3 g/l. Um eine Kontamination zu verhindern, muss dieses Gemisch in Portionen aufgeteilt werden, die wahrscheinlich an einem Tag verwendet werden, und in gesonderten Behältern bei 2 °C bis 8 °C für höchstens 7 Tage gelagert werden.

5.2.2.9 Defibriniertes Schafsblut

Das defibrinierte Schafsblut muss steril sein (aseptischer Aderlass und Vorbereitung). Defibriniertes Schafsblut kann 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 FKS (5.2.2.5), Antibiotika und weiteren Wachstumsfaktoren je nach Erfordernis.

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

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

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

5.2.2.11 Zellkulturen

Einschichtige Zellrasen müssen vor der Beimpfung zu > 90 % zusammengewachsen (konfluent) sein. Zelllinien werden entsprechend ihrer Sensibilität gegenüber den Prüfkeimen (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 eines einschichtigen Zellrasens (Monolayer) in der Zellkontrollprobe mindestens innerhalb von zwei Tagen möglich ist. Zellkulturen können als einschichtige Zellrasen oder in Suspensionen für Quantalversuche verwendet werden. Hinsichtlich weiterer Einzelheiten zu den Zelllinien siehe 5.5.1.e).

5.3 Apparate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

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 [5.3.2.1 a)];
- b) durch trockene Hitze im Heißluftsterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung⁴⁾ und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation (feuchte und trockene Hitze)

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ und zusätzliche Prüftemperaturen $\pm 1^\circ\text{C}$ (5.5.1).

5.3.2.3 Umkehr-Mikroskop zum mikroskopischen Betrachten der Zellkulturen.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von 0,1 pH-Einheit bei 20°C .

5.3.2.5 Stoppuhr.

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

5.3.2.7 Elektromechanisches Rührwerk, z. B. Vortex[®]-Mischer⁵⁾

5.3.2.8 Behälter: Petrischalen, sterile Reagenzgläser, Kulturflaschen oder Kolben mit geeignetem Fassungsvermögen.

5.3.2.9 Messkolben, kalibriert bei 20°C .

5.3.2.10 Sterile Mikrotiterplatten, Zellkulturplatten mit sechs Vertiefungen und Kolben für die Zellkulturen.

5.3.2.11 Membranfiltrationsgerät zum Filtrieren von Medien, mit einer Porenweite von $0,2\ \mu\text{m}$.

5.3.2.12 CO₂-Brutschrank (95 % Luft, 5 % CO₂), einstellbar auf $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$, zur Bebrütung von Zellkulturen. Wenn kein Brutschrank für $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ zur Verfügung steht, darf ein Brutschrank für $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ verwendet werden.

5.3.2.13 Sterile Messpipetten mit Nennvolumina von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml.

Kalibrierte automatische Pipetten dürfen verwendet werden.

5.3.2.14 Magnetrührer, um die Zellen vor dem Beimpfen in Suspension zu halten.

5.3.2.15 Eismaschine oder kommerziell erhältliches Eis zum Kühlen des Zellerhaltungsmediums und der Reaktionsgemische während der Prüfung (siehe 5.5.2 und 5.5.4).

5.3.2.16 Becken als Eisbad mit Eis und Wasser.

5.3.2.17 Mechanisches Schüttelgerät.

4) Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

5) Vortex[®]-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.3.2.18 Zentrifuge.

5.3.2.19 Biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II.

5.3.2.20 Tiefkühleinrichtung, –70 °C oder weniger.

5.3.2.21 Exsikkator mit Vakuum-Manometer.

5.3.2.22 Membranvakuumpumpe (Durchsatz höchstens 3,8 m³/h, Endvakuum < 75 mbar).

5.3.3 Prüfflächen

Das müssen Scheiben aus nichtrostendem Stahl 1.4301 (nach EN 10088-1) (von 2 cm Durchmesser) sein, in Übereinstimmung mit den Anforderungen von EN 10088-2 beidseitig auf Grad 2B poliert. Die Scheiben müssen so eben wie möglich sein; das wird am besten durch Verwendung von nichtrostendem Stahl mit einer Dicke von 1,2 mm oder 1,5 mm erreicht. Die Scheiben dürfen nur mit einer Pinzette gehandhabt und nur einmal verwendet werden.

Vor der Verwendung müssen die Scheiben für 60 min so in einen Behälter gelegt werden, der eine ausreichende Menge von 5 %igem (V/V) Decon 90[®] oder 1 %igem Blanisol-Pur⁶⁾ enthält, dass sie nicht aneinander haften und dass die Oberfläche nicht beschädigt wird. Die Scheiben werden 10 s unter fließendem frisch destilliertem Wasser (5.2.2.2) oder entmineralisiertem Wasser gespült, wobei jegliches Trocknen zu vermeiden ist.

Die Scheiben sind weitere 10 s mit Wasser (5.2.2.2) zu spülen, um die vollständige Beseitigung des Detergens sicherzustellen. Um einen ausreichenden Wasserstrom zu liefern, kann ein steriles, Flüssigkeit abgebendes Druckgefäß mit geeignetem Schlauch und entsprechenden Anschlüssen oder ein anderes geeignetes Verfahren verwendet werden, das auf eine Zufuhr von etwa 2 000 ml/min eingestellt werden kann. Die Scheiben werden für 15 min in ein Bad mit ISO-Propanol (IPA) getaucht. Nach dem Herausnehmen werden die Scheiben mindestens 10 Sekunden mit bidestilliertem Wasser gespült. Das Sterilisieren erfolgt durch Autoklavieren.

ANMERKUNG Geeignete Scheiben aus nichtrostendem Stahl können üblicherweise von Maschinenbauunternehmen vor Ort bezogen werden.

5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüfkeimsuspensionen (Prüfvirussuspension)

Die Prüfkeime 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 werden durch Zentrifugieren (400 g_N für 15 min) abgetrennt. Dieses Präparat wird als „Prüfvirussuspension“ bezeichnet.

Die Virussuspension 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 dezimal-logarithmische (lg-) Reduktion des Titers um mindestens 4 Stufen zu ermöglichen, damit das Verfahren verifiziert werden kann.

Falls notwendig darf die Prüfsuspension durch geeignete Verfahren (z. B. Ultrazentrifugieren) konzentriert werden.

6) Decon 90[®] und Blanisol-Pur sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN.

Die Prüfsuspension wird in kleinen Mengen bei Temperaturen unter -70 °C oder vorzugsweise bei -196 °C unter Stickstoff aufbewahrt. Aus Sicherheitsgründen und — in einigen Fällen — zur Begrenzung möglicher Genmutationen sind nur 10 Passagen aus dem ursprünglichen Einsaat-Virus (z. B. Virus aus der Kultursammlung) zulässig.

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

5.4.2 Produktprüflösung

Einzelheiten zu den Proben des Produkts, das vom Hersteller oder einer anderen Quelle erhalten wurde, müssen aufgezeichnet werden.

Produktprüflösungen sind in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) herzustellen, wobei eine Konzentration im wirksamen Bereich und eine Konzentration im unwirksamen Bereich liegen muss. Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden.

Verdünnungen gebrauchsfertiger Produkte, d. h. von Produkten, die zu ihrer Anwendung nicht verdünnt werden, sind in Wasser (5.2.2.2) herzustellen.

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand gelöst, indem mindestens $1,0\text{ g} \pm 10\text{ mg}$ 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 (5.3.2.9) 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 (5.3.2.9) herzustellen.

Die Produktprüflösungen sind frisch herzustellen und innerhalb von 2 h für die Prüfung zu verwenden. Sie müssen eine physikalisch homogene stabile Zubereitung ergeben, die während des gesamten Prüfablaufs stabil ist. Falls während des Verfahrens eine sichtbare Inhomogenität durch Bildung 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 Massenkonzentration oder Volumenanteil aufzuzeichnen, ebenso sind die Einzelheiten der Produktprobe im Lieferzustand anzugeben.

5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Versuchsbedingungen

Die Auswahl von Einwirktemperatur, Einwirkzeit und Belastungssubstanzen muss entsprechend der für das Produkt vorgesehenen praktischen Anwendungsbedingungen (Abschnitt 4) wie folgt durchgeführt werden:

a) Prüftemperatur, θ (in $^{\circ}\text{C}$):

Die Prüftemperatur muss die Raumtemperatur sein und zwischen $(18 \pm 1)\text{ °C}$ und $(25 \pm 1)\text{ °C}$ liegen; zusätzliche Temperaturen dürfen gewählt und müssen im Prüfbericht (5.9) angegeben werden.

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; zusätzliche Einwirkzeiten dürfen gewählt und müssen im Prüfbericht (5.9) angegeben werden.

c) Virusstämme:

Die Stämme müssen den Festlegungen in Abschnitt 4, Tabelle 1 entsprechen.

Zusätzliche Stämme dürfen gewählt und müssen im Prüfbericht (5.9) angegeben werden.

d) Belastungssubstanz:

Die zu prüfende Belastungssubstanz ist Rinderserum-albuminlösung bei Bedingungen niedriger Belastung (5.2.2.8.2) oder bei Bedingungen hoher Belastung (5.2.2.8.3) Rinderserumalbumin und Schaf-Erythrozyten entsprechend den praktischen Anwendungsbedingungen.

Eine zusätzliche Belastungssubstanz kann gewählt und muss im Prüfbericht (5.9) angegeben werden.

e) Zelllinie(n):

Adenovirus wird in HeLa-Zellen oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt. *Murine Norovirus* wird in RAW 264.7-Zellen (ATCC TIB-71) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt.

Modifizierter *Vacciniavirus* Ankara wird in BHK-21-Zellen (ATCC CCL-10) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt. *Vacciniavirus*, Stamm Elstree wird in Vero-Zellen (ATCC CCL-81), CV-1-Zellen (ATCC CCL-70) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt

5.5.2 Prüfverfahren

Die Prüfung muss bei einer Temperatur zwischen (18 ± 1) °C und (25 ± 1) °C durchgeführt werden. Jede Prüfscheibe (5.3.3) wird unter aseptischen Bedingungen in eine Petrischale (5.3.2.8) gelegt, wobei die waagerechte Lage der Petrischale sicherzustellen ist.

Neun Volumenteile der Virussuspension (5.4.1 und 5.5) werden mit einem Volumenteil Belastungssubstanzlösung (5.2.2.8) gemischt.

Für jeden Prüfvirus werden 8 Prüfscheiben (2 Scheiben/Konzentration des Produkts plus 2 Scheiben zur Kontrolle) vorbereitet, indem 50 µl der Virussuspension plus Belastungssubstanz in 2 aliquoten Anteilen von jeweils 25 µl auf die Scheiben abgeimpft werden, wobei darauf zu achten ist, dass die Suspension in der Mitte der Scheibe (5.3.3) aufgebracht wird (ein Berühren der Scheibenränder ist zu vermeiden). Die Oberflächen werden getrocknet, bis sie sichtbar trocken sind, durch Beimpfung der Scheibe mit 50 µl der Virussuspension plus Belastungssubstanz.

Es ist selbstverständlich, dass das Trocknen der Prüfflächen aufgrund der Umgebungsbedingungen im Laboratorium und der Konstruktion des Brutschanks mit unterschiedlicher Geschwindigkeit erfolgen wird. Aus diesem Grund wird keine Zeitdauer festgelegt und die erforderliche Mindestzeit, bis die Flächen sichtbar trocken sind, sollte für jedes Laboratorium ermittelt werden. Die Trocknungszeit sollte 60 min nicht überschreiten; tritt dies auf, müssen alternative Trocknungsbedingungen angewendet werden. Die Prüfflächen sind an die gewählte Prüftemperatur $\theta \pm 1$ °C angleichen zu lassen.

Die getrockneten Träger sind innerhalb von 60 min zu verwenden, um eine Inaktivierung der Viren im Verlauf der Zeit zu verhindern.

Unmittelbar nach dem Trocknen wird jede Scheibe vorsichtig aufgenommen und mit der beimpften Seite nach oben in eine sterile Petrischale gelegt, wobei die waagerechte Lage der Scheibe sicherzustellen ist. Das getrocknete Inokulum von 6 Scheiben wird mit 100 µl der Prüflösung bedeckt. Es ist darauf zu achten, dass

die Pipettenspitze nicht den Träger berührt. Für den Kontrollversuch mit Wasser werden 100 µl Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) oder Wasser (5.2.2.2), wenn das Produkt mit Wasser verdünnt wurde, auf die anderen 3 Prüfscheiben gegeben, wobei sicherzustellen ist, dass das getrocknete Inokulum vollständig bedeckt wird.

Nach der ausgewählten Einwirkzeit wird jede der Scheiben in einen gesonderten Behälter (mit flachem Boden, Bodendurchmesser zwischen 4 cm und 5 cm, mit Deckel) überführt und es werden 0,9 ml eisgekühltes Zellkulturmedium ohne FKS, z. B. Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) oder Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM), in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie hinzugefügt. Der Inhalt von jedem Behälter wird 60 s gemischt (5.3.2.7), um die Viren zu resuspendieren.

Unmittelbar nach der Elution wird eine Reihe von Dezimalverdünnungen der Virussuspension in eisgekühltem Erhaltungsmedium (MEM + 2 % FKS) hergestellt. Die Pipettenspitzen sind nach jeder Verdünnung zu wechseln, um eine Verschleppung von Viren zu verhindern.

Die Verdünnungen werden auf Zellkulturen abgeimpft. Nach der Bebrütung wird der Virustiter berechnet.

Die Reduktion des Virustiters wird berechnet aus der Differenz des Titers zwischen denen, die mit Desinfektionsmittel behandelt wurden, und solchen, die mit hartem Wasser behandelt wurden.

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

a) Quantalversuche (Endpunkttitration) – [die Verfahren 1) bis 2) sind alternativ anzuwenden]

Die Virussuspension wird in Stufen, die einer zehnfachen Verdünnung entsprechen, verdünnt, indem 0,1 ml Virussuspension mit einem entsprechenden Volumen Kulturerhaltungsmedium (MEM ± 2 % FKS) gemischt werden. Die Pipetten müssen nach jedem Verdünnungsschritt gewechselt werden.

1) Virustitration auf Zellen in Suspension auf Mikrotiterplatten:

0,1 ml jeder Verdünnungsstufe werden, beginnend mit der höchsten Verdünnung, in sechs oder acht Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (5.3.2.10) überführt. 0,1 ml einer Zellkultursuspension (5.2.2.11) wird in einer solchen Dichte hinzugefügt, dass die Bildung eines einschichtigen Zellrasens (> 90 %) mindestens innerhalb von zwei Tagen in der Zellkontrollprobe möglich ist. Parallel dazu dienen sechs oder acht Vertiefungen als Zellkontrollprobe und erhalten keine Virussuspension.

Der zytopathische Effekt (CPE) des Virus wird nach der geeigneten Bebrütungszeit (entsprechend dem Virustyp) mittels eines Umkehr-Mikroskops beurteilt.

2) Virustitration auf einschichtigen Zellrasen auf Mikrotiterplatten:

0,1 ml jeder Verdünnungsstufe wird in sechs oder acht Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (5.3.2.10) überführt, die einen konfluenten (> 90 %) einschichtigen Zellrasen (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. Die Pipetten für die Röhrchen oder Vertiefungen sind zu wechseln, wenn Medium zugesetzt wird.

Der zytopathische Effekt des Virus wird nach der geeigneten Bebrütungszeit entsprechend dem Virustyp mittels eines Umkehr-Mikroskops beurteilt.

b) Plaqueversuch

Vertiefungen in Kulturplatten aus Kunststoff (Oberflächendurchmesser 30 mm bis 35 mm) mit konfluenten einschichtigen Zellrasen werden einmal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (5.2.2.3) gewaschen und mit 0,2 ml der Reihenverdünnungen der Viren in MEM + 2 % FKS beimpft. Im Allgemeinen werden sechs bis acht Vertiefungen je Verdünnung verwendet. Nach einer Adsorptionsdauer von 1 h bei 37 °C, während der die einschichtigen Zellrasen durch Neigen der Platten alle 8 min bis 10 min feucht gehalten werden, wird das Inokulum entfernt und die einschichtigen Zellrasen werden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Vertiefungen mit 3 ml eines Gemischs aus 2 %iger verflüssigter Agarose oder einem anderen geeigneten halbfesten Medium und doppelt konzentriertem MEM mit 4 %FKS überschichtet. Die Kulturen werden für 5 bis 6 Tage bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank (5.3.2.12) bebrütet. Die Plaques können nach Zusatz von 2 ml einer zweiten Überschichtung mit der gleichen Zusammensetzung wie die erste, die außerdem 5 % einer Neutralrotlösung 1:1 000 enthält, und weiterer Bebrütung (im Dunkeln) bei 37 °C für 24 h bis 48 h in einem CO₂-Brutschrank (5.3.2.12) ausgezählt werden. Die Auszählung kann auch nach Zugabe von Kristallviolett erfolgen. Die einschichtigen Zellrasen werden durch Zugabe von 2 ml 10 %iger Trichloressigsäure (TCA) (5.2.2.6) über die Agarüberschichtung für 10 min bis 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Agarüberschichtung wird dann entfernt und 2 ml 0,1 %iges Kristallviolett in 20 %igem Ethanol werden zugegeben. Nach 10 min bis 15 min bei Raumtemperatur werden die Vertiefungen ausgiebig mit Wasser gespült und die Plaques (weiße Flecken) werden ausgezählt.

ANMERKUNG Als Alternative zum Plaqueversuch kann die Bestimmung des CPE angewendet werden.

5.5.3 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität

5.5.3.1 Zytotoxische Wirkung

Zur Überprüfung einer möglichen morphologischen Veränderung der Zellen durch das Desinfektionsmittel werden 45 µl MEM + 2 % FKS mit 5 µl Belastungssubstanz gemischt, ein Träger wird beimpft und getrocknet. 100 µl des Produkts (in den in der Prüfung verwendeten Verdünnungen) werden hinzugefügt und alles wird 5 min bei Prüftemperatur belassen. Die Elution erfolgt mit 0,9 ml MEM + 2 % FKS 30 s gemischt (5.3.2.7). Reihenverdünnungen (Verdünnungsstufe 1:10) werden in dem Kulturmedium hergestellt und die Zellkulturen (einschichtige Zellrasen oder Zellsuspensionen) werden damit beimpft. Dies muss parallel zur Prüfung durchgeführt werden. Sämtliche mikroskopischen Veränderungen in den Zellen werden beim Ablesen der Prüfung auf Zytotoxizität (CPE) (2 Scheiben) aufgezeichnet.

5.5.3.2 Interferenzkontrolle – Kontrolle der Zellsensibilität

Ziel der Interferenzkontrolle ist nachzuweisen, dass die Zellsensibilität für die Virusinfektion durch die Behandlung mit dem Desinfektionsmittel nicht negativ beeinflusst wird.

Vergleichende Virustitrationen werden an Zellen, die mit Desinfektionsmitteln behandelt wurden bzw. die nicht mit Desinfektionsmitteln behandelt wurden, durchgeführt, um die Verminderung der Sensibilität gegenüber Viren wie folgt zu bestimmen:

Behandlung der Zellen:

- a) einschichtige Zellrasen: 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 6 angesiedelten Zellkulturen auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (5.3.2.10) aufgetragen. Nach Einwirkung für 1 h bei 37 °C wird der Überstand verworfen;
- b) 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.

Vergleichende Virustitration:

Das Virus wird von 10^{-1} bis 10^{-10} verdünnt und auf den behandelten oder unbehandelten Zellen parallel zu 5.5.2 a) oder b) titriert.

Zur Bestimmung einer Restinfektiosität können nur die Verdünnungen der Produktlösung verwendet werden, die:

- a) einen niedrigen Grad der Zellzerstörung ($< 25\%$ des einschichtigen Zellrasens) aufweisen oder
- b) eine Reduktion des Virentiters um < 1 lg hervorgerufen.

5.5.3.3 Beseitigung der Zytotoxizität

Falls die Zytotoxizität so stark ist, dass die Reduktion der Restinfektiosität nicht über einen Bereich von 4 lg TCID₅₀ verfolgt werden kann, müssen spezielle Techniken angewendet werden, wie z. B.:

- a) Molekularsiebung mit einem Molekularsiebfilter, d. h. Sephadex™ LH 20⁷⁾ (B.1);
- b) Ultrafiltration mit Minicon® (Millipore) oder Fertigsäulen, d. h. MicroSpin™ S 400 HR-Säulen⁷⁾ (GE Healthcare) (B.2);
- c) Bestimmung des Restvirus-Titers mit dem Large-Volume-Plating (LVP)-Methode (B.3).

Geeignete Kontrollen sind erforderlich, um nachzuweisen, dass das Verfahren die Infektiosität der Viren nicht reduziert. Die viruzide Wirkung wird durch Vergleich der Titer der behandelten und der unbehandelten Virussuspensionen ermittelt. Die Anwendung erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers.

5.5.4 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Desinfektionsmittels

5.5.4.1 Verdünnung in eisgekühltem Medium

100 µl der Prüflösung (Prüfkonzentration) und 850 µl eisgekühltes Medium mit 2 % FKS werden gemischt. Anschließend werden 50 µl des Virusinokulums dazugegeben und das Gemisch wird für die Zeit zwischen dem Ende der Einwirkzeit und der Vorbereitung der Verdünnungen für die Titration (siehe 8.4) im Eisbad bebrütet. Eine Reihenverdünnung in 10-log-Schritten wird hergestellt und die Zellkulturen werden mit den Verdünnungen beimpft. Der Titer wird bestimmt. Der Unterschied zwischen dem Titer der Unterdrückung der viruziden Wirkung und dem Titer der Viruskontrolle vor dem Trocknungsprozess sollte 0,5 lg nicht überschreiten.

5.5.4.2 Filtrationstechnik

Wenn die Differenz $> 0,5$ lg ist, kann eine eisgekühlte Verdünnung auf 1/100 versucht werden, oder es muss eine andere Technik verwendet werden: Molekularsiebung mittels Sephadex™ LH 20 oder Ultrafiltration mit Minicon® (Millipore) oder mit gebrauchsfertigen MicroSpin S 400 HR-Säulen (Pharmacia Biotech) (Anhang B).

⁷⁾ Sephadex™ LH 20, Minicon® und MicroSpin™ S 400 HR sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN.

5.5.5 Referenzprüfung zur Virusinaktivierung

Unter der Verwendung der Prüfkeime muss eine Kontrolle des Prüfsystems einbezogen werden, es gilt 5.5.2 mit Glutaraldehyd als Referenz (siehe Tabelle 2).

5.5.6 Titration der Viruskontrollprobe

Die Infektiosität der Prüfvirussuspension 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) für gebrauchsfertige Produkte ersetzt.

Es gilt 5.5.2 mit folgender Änderung:

Anstelle der Produktprüflösung werden 100 µl Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) – oder Wasser (5.2.2.2) für gebrauchsfertige Produkte – zugegeben.

5.6 Versuchsdaten und Berechnung

5.6.1 Protokollierung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Zellkultur werden als „0“ (Zellen ohne CPE) und mit „1“ (25 % der Zellen mit CPE) bis „4“ (alle Zellen mit CPE) (Quantalversuche) beziehungsweise als Anzahl der Plaques dokumentiert.

Die Berechnung der geschätzten Virustiter muss unter Anwendung geeigneter Verfahren erfolgen (Anhang C).

Die Reduktion des Virustiters wird aus der Differenz der Titer nach der Behandlung mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) – oder Wasser (5.2.2.2) für gebrauchsfertige Produkte – und nach der Behandlung mit dem Produkt berechnet.

Die Titer müssen mit den zugehörigen 95 %-Vertrauensbereichen berechnet werden, aus denen der Reduktionsfaktor mit dem 95 %-Vertrauensbereich berechnet werden muss (C.3.1).

5.6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID₅₀ bzw. PFU)

5.6.2.1 Allgemeines

Die Berechnung der geschätzten Viruskonzentration muss mittels geeigneter Verfahren durchgeführt werden (Anhang C). Die Titer müssen mit ihrem 95 %-Vertrauensbereich berechnet werden, von dem die Reduktion mit einem 95 %-Vertrauensbereich berechnet werden muss (C.1.1).

5.6.2.2 Berechnung der TCID₅₀

Ein geeignetes Berechnungsverfahren ist das Verfahren nach Spearman-Kärber (C.1).

5.6.2.3 Berechnung der PFU

Eine praktische Möglichkeit zur Berechnung der Anzahl der plaquebildenden Einheiten je Milliliter (PFU/ml) ist in C.2 beschrieben.

Für die Berechnung dürfen nur Platten mit nicht konfluenten 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.

5.7 Verifizierung des Verfahrens

Eine Prüfung ist nur dann valide, wenn die folgenden Kriterien erfüllt sind:

- a) die Prüfvirussuspension (5.4.1) hat den TCID₅₀-Wert von 10⁸/ml oder weist zumindest eine Konzentration auf, die die Bestimmung einer Reduktion des Virustiters um 4 logarithmische Stufen erlaubt;
- b) die nachweisbare Reduktion des Titers beträgt mindestens 4 lg;
- c) die Differenz zwischen dem logarithmischen Titer des Viruskontrollversuchs und dem logarithmischen Titer des Prüfvirus in der Referenzprüfung zur Inaktivierung (5.5.5) liegt zwischen den in Tabelle 2 angeführten Werten;

Tabelle 2 — Grenzwerte für Referenzsubstanzen

Sämtliche Prüfungen müssen 5 min unter Bedingungen niedriger Belastung durchgeführt werden.

Referenzsubstanz	Prüfvirus		
	Konzentration/Reduktion		
	<i>Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75</i>	<i>Vacciniavirus</i>	<i>Murine Norovirus</i>
Glutaraldehyd	125 ppm/2,0 lg bis 3,5 lg	50 ppm/< 3 lg	1 000 ppm/1,5 lg bis 3 lg

- d) die Zytotoxizität der Produktlösung beeinträchtigt nicht die Zellmorphologie und das Zellwachstum oder die Empfindlichkeit für den Prüfvirus in den Verdünnungen der Prüfgemische, die für den Nachweis einer Reduktion der Virusmenge um 4 logarithmische Stufen notwendig sind;
- e) die vergleichende Virustitration an Zellen, die mit Verdünnungen des Prüfgemischs behandelt wurden (oder ohne dieses, d. h. nur Zugabe von PBS), ergibt eine Differenz des Virustiters von < 1 lg;
- f) Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Produktes (5.5.4: Die Differenz zur Prüfsuspension muss ≤ 0,5 lg sein).

5.8 Auswertung

5.8.1 Allgemeines

Alle Ergebnisse werden als Rohdaten tabelliert und zusätzlich als negative logarithmische Werte der TCID₅₀ oder der PFU dargestellt.

Im Fall, dass in der höchsten Konzentration keine Virenvermehrung beobachtet wird ([5.5.2 a) oder b)], wird dieser Wert mit dem vorangestellten Zeichen „≤“ angegeben. Wenn eine Virenvermehrung in allen Verdünnungen beobachtet werden kann, wird der Wert mit dem vorangestellten Zeichen „≥“ angegeben.

5.8.2 Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten

Die Bewertung der Wirksamkeit der Desinfektionsmittelverdünnung wird durch Berechnung der Reduktion durchgeführt. Die Reduktion ist die Differenz zwischen dem Infektiositätstiter, erhalten ohne Einwirken des Desinfektionsmittels in TCID₅₀/ml oder lg der plaquebildende Einheiten (PFU)/ml des Kontrollversuchs mit

Wasser (5.5.7), und dem Infektiositätstiter, erhalten nach Einwirken des Desinfektionsmittels (5.5.2) bei einer ausgewählten spezifischen Einwirkzeit.

Das Produkt wird für die Prüfung als bestanden gewertet, wenn für *Adenovirus* und *Murine Norovirus* bei der ausgewählten spezifischen Einwirkzeit und einer Temperatur zwischen $(18 \pm 1) ^\circ\text{C}$ und $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ eine lg-Reduktion des Titors um mindestens 4 Stufen mit der gewählten Belastungssubstanz (Tabelle 1) unter den durch diese Prüfung festgelegten Bedingungen (5.5.2) nachgewiesen wird.

Die Berechnung des Vertrauensbereichs kann bestätigt werden (C.3), es ist notwendig den Vertrauensbereich aus zwei Reihen von Prüfungen zu berechnen.

5.9 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss auf diese Europäische Norm (EN 16777) verweisen.

Der Prüfbericht muss mindestens die folgenden Angaben enthalten:

- a) Identität des Prüflaboratoriums;
- b) Identität des Auftraggebers;
- c) Identifizierung der Probe:
 - 1) Bezeichnung des Produkts;
 - 2) Chargennummer und – falls vorliegend – Verfallsdatum;
 - 3) Hersteller – sofern nicht bekannt: Lieferant;
 - 4) Lieferdatum;
 - 5) Lagerbedingungen;
 - 6) vom Hersteller empfohlenes Verdünnungsmittel für das Produkt;
 - 7) Wirksubstanz(en) und deren Konzentration(en) (optional);
 - 8) Aussehen des Produkts;
- d) Versuchsbedingungen:
 - 1) Datum (Daten) der Prüfung (Analysenzeitraum);
 - 2) für die Produktprüflösung verwendetes Verdünnungsmittel (Wasser standardisierter Härte oder destilliertes Wasser);
 - 3) Produktprüfkonzentrationen;
 - 4) Aussehen der Produktverdünnungen;
 - 5) Einwirkzeiten;
 - 6) Prüftemperatur(en);
 - 7) Belastungssubstanz(en);