

DIN EN 17083

ICS 11.080.20

Einsprüche bis 2017-04-17

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Oberflächenversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung
chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich
auf nicht-porösen Oberflächen –
Prüfverfahren und Anforderungen – Phase 2, Stufe 2;
Deutsche und Englische Fassung prEN 17083:2017**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative non-porous surface test for the evaluation of virucidal activity of chemical
disinfectants and antiseptics used in the veterinary area –
Test method and requirements – Phase 2, step 2;
German and English version prEN 17083:2017

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de surface non-poreuse pour l'évaluation de l'activité virucide des
antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de vétérinaire –
Méthode d'essai et prescriptions – Phase 2, étape 2;
Version allemande et anglaise prEN 17083:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-02-17 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 nal@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 Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL),
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 64 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)



Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17083:2017) 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.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-02-03 AA *Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich (DTL)*, (Spiegelausschuss zu CEN/TC 216/WG 2) im DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 17083 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Oberflächenversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich auf nicht-porösen Oberflächen — Prüfverfahren und Anforderungen — Phase 2, Stufe 2

Antiseptiques et désinfectants chimiques — Essai quantitatif de surface non-poreuse pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de vétérinaire — Méthode d'essai et prescriptions — Phase 2, étape 2

Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative non-porous surface test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area — Test method and requirements — Phase 2, step 2

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	8
4.1 Anforderungen für die viruzide Wirkung auf Oberflächen.....	8
5 Prüfverfahren	8
5.1 Kurzbeschreibung	8
5.2 Materialien und Reagenzien	9
5.2.1 Prüfviren	9
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	9
5.2.3 Prüfoberfläche	14
5.2.4 Allgemeines	14
5.2.5 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung) und insbesondere folgende Geräte:	14
5.3 Produktprüflösungen	15
5.4 Verfahren zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts	16
5.4.1 Allgemeines	16
5.4.2 Infektiositätstest	17
5.4.3 Plaque-Assay	17
5.4.4 Prüfung auf viruzide Wirkung — Vorbereitung	17
5.4.5 Prüfverfahren	18
5.4.6 Kontrolle der Effizienz der Suppression der Desinfektionswirkung	19
5.4.7 Verdünnung in eiskaltem Medium	19
5.4.8 Filtrationstechnik	19
5.5 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	19
5.5.1 Protokoll der CPE-Ergebnisse	19
5.5.2 Berechnung des Virustiters	19
5.5.3 Berechnung der PFU	19
5.6 Verifizierung des Verfahrens	19
5.7 Berechnung der viruziden Wirkung des Produkts	20
5.7.1 Referenzinaktivierungsprüfung des Prüfvirus	20
5.8 Angabe der Ergebnisse	20
5.8.1 Aktivität auf nicht porösen Oberflächen	20
5.9 Prüfbericht	20
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	22
Anhang B (normativ) Zytotoxizität, Referenzinaktivierungsprüfung, Prüfvirustitration und Detoxikation der Prüfgemische	23
B.1 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität	23
B.2 Referenz-Inaktivierungsprüfung	24
B.3 Titration der Virus-Prüfsuspension	24
B.4 Detoxikation der Prüfgemische durch Molekülsiebung	24
B.4.1 Molekülsiebung mit Sephadex TM LH 20	24

B.4.2 Molekülsiebung mit MicroSpin™ S 400 HR.....	26
Anhang C (informativ) Berechnung des Infektiositätstiters des Virus	27
C.1 Berechnung des viralen Infektiositätstiters.....	27
C.2 Berechnung der Plaque bildenden Einheiten (PFU).....	27
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts	29
Literaturhinweise.....	31

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17083:2017) 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.

Einleitung

Diese Europäische Norm beschreibt ein Oberflächenprüfverfahren, mit dem festgestellt werden kann, ob ein für die in Abschnitt 1 beschriebenen Bereiche als Desinfektionsmittel vorgesehenes Produkt auf nicht porösen Oberflächen eine viruzide Wirkung aufweist oder nicht.

Dieses Verfahren ist ein Laborversuch und simuliert praxisnahe Anwendungsbedingungen. Die gewählten Bedingungen (Einwirkzeit, Temperatur, Viren auf Oberflächen usw.) spiegeln Parameter wider, wie sie in der Praxis vorkommen, einschließlich der Bedingungen, die die Wirkung von Desinfektionsmitteln beeinflussen können.

Jede Anwendungskonzentration, die aus dieser Prüfung resultiert, entspricht festgelegten Untersuchungsbedingungen. Die Bedingungen genügen den allgemeinen Ansprüchen und wurden so ausgewählt, dass sie einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten erlauben. Bei speziellen Applikationen können die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt jedoch abweichen. In diesem Fall sind u. U. zusätzliche Prüfbedingungen erforderlich, die in dieser Europäischen Norm nicht behandelt werden können.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die viruzide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die mit Wasser standardisierter Härte oder — im Fall gebrauchsfertiger Lösungen — mit Wasser eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung bilden.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte zur Anwendung ohne mechanische Einwirkung auf nicht porösen Oberflächen im Veterinärbereich, d. h. bei der Aufzucht, Haltung, Produktion, in veterinärmedizinischen Gesundheitseinrichtungen und beim Transport von Tieren sowie bei der Tierkörperbeseitigung, außer wenn die Tiere nach der Tötung durch Zuführung in die weiterverarbeitende Industrie in die Lebensmittelkette gelangen.

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

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren ist zur Bestimmung der Wirkung von handelsüblichen Zubereitungen oder Wirkstoffen unter deren Anwendungsbedingungen vorgesehen.

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

ANMERKUNG 3 Bei Anwendung dieser Europäischen Norm ist es möglich, die viruzide Wirkung des unverdünnten Produkts zu bestimmen.

ANMERKUNG 4 Für diese Norm wird das Porzine Parvovirus verwendet, da das für den Suspensionstest EN 14675 eingesetzte Bovine Enterovirus Typ 1 (ECBO) aufgrund der Abnahme des Virentiters beim Trocknen für Oberflächenprüfungen nicht verwendet werden kann. Das Porzine Parvovirus und das ECBO-Virus weisen vergleichbare Resistenz auf.

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 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 Begriffe nach EN 14885 zusammen mit den folgenden Begriffen.

3.1 Zytotoxizität

Eigenschaft des Produkts, morphologische Veränderungen und/oder die Zerstörung von Zellen oder eine Verringerung ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Virusvermehrung auszulösen

3.2 Belastungssubstanzen

Proteinlösungen, die einer Virus-Prüfsuspension zugesetzt werden, um einen möglichen Einfluss von Proteinen und Erythrozyten auf die viruzide Wirkung der Produktprüflösung nachzuweisen

3.3

Plaque bildende Einheiten

PFU

(en: plaque forming units)

Anzahl der infektiösen Partikel je Volumeneinheit (ml)

3.4

Referenz-Virusinaktivierungsprüfung

Prüfung mit einem festgelegten Reagenz (z. B. Formalin) anstelle eines Produkts, durchgeführt zur internen Kontrolle der Prüfergebnisse; die Ergebnisse der Referenz-Virusinaktivierungsprüfung müssen innerhalb der Grenzwerte für die Validierung des Verfahrens liegen

3.5

Virus-Bezugssuspension

Suspension eines bestimmten Virusstammes, die nicht öfter als 10 Mal passagiert wurde und in nationalen Kultursammlungen vorgehalten und in kleinen Volumina (weniger als 1 ml) bei einer Temperatur von –70 °C oder vorzugsweise in flüssigem Stickstoff bei 196 °C aufbewahrt wird

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

3.6

Virus-Stammsuspension

Suspension eines bestimmten Virusstammes, die in großem Maßstab vermehrt wurde, um eine Virussuspension mit denselben Eigenschaften wie die Virus-Bezugssuspension zu erhalten, und die in einem kleinen Volumen bei einer Temperatur unter 70 °C oder vorzugsweise über flüssigem Stickstoff bei 196 °C aufbewahrt wird

3.7

Virus-Prüfsuspension

Virussuspension, die in Prüfungen des Desinfektionsmittels auf viruzide Wirkung verwendet wird

3.8

Gewebekultur-Infektionsdosis

TCID₅₀

(en: tissue culture infecting dose)

50 %-Infektionsdosis einer Virussuspension oder diejenige Verdünnung der Virussuspension, die eine CPE (virale zytopathische Wirkung) (3.9) in 50 % der Zellkultureinheiten auslöst; Virendosis, die eine virale zytopathische Wirkung (CPE) in 50 % der inokulierten Zellkulturen auslöst

3.9

virale zytopathische Wirkung

CPE

(en: viral cytopathic effect)

morphologische Veränderung an Zellen und/oder deren Zerstörung infolge der Vermehrung eines Virus

3.10

Virusplaque

Bereich der Lyse in einem Zellmonolayer in halbfestem Medium, der sich infolge der Infektion durch ein einzelnes infektiöses Viruspartikel und dessen Vermehrung bildet

3.11

Virus-Titer

Anzahl infektiöser Viren je Volumeneinheit in einem Zellkulturlysats oder in einer Lösung

4 Anforderungen

4.1 Anforderungen für die viruzide Wirkung auf Oberflächen

Das Produkt muss nach Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte (siehe 5.2.2.3) bei einer nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 durchgeführten Prüfung eine dekadisch-logarithmische (lg)-Reduzierung um mindestens 4 Stufen aufweisen.

ANMERKUNG 1 Volle viruzide Wirkung bedeutet Aktivität gegenüber behüllten und unbehüllten Viren.

ANMERKUNG 2 Begrenzte viruzide Wirkung bedeutet Aktivität gegenüber behüllten Viren.

Tabelle 1 — Obligatorische und zusätzliche Prüfbedingungen

A: Volle viruzide Wirkung

	Obligatorische Prüfbedingungen	Zusätzliche Prüfbedingungen
Prüforganismus	Porzines Parvovirus, Stamm NADL2	Nicht anwendbar
Prüftemperatur	10 °C	4 °C, 20 °C oder 40 °C
Einwirkzeit	30 min	1 min, 5 min, 60 min, 120 min
Belastungssubstanz – Verschmutzung niedrigen Grades	3,0 g/l Rinderalbumin	Nicht anwendbar
Belastungssubstanz – Verschmutzung hohen Grades	10 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Rinderalbumin	Nicht anwendbar

B: Begrenzte viruzide Wirkung

	Obligatorische Prüfbedingungen	Zusätzliche Prüfbedingungen
Prüforganismus	Felines Coronavirus, Stamm München	Nicht anwendbar
Prüftemperatur	10 °C	4 °C, 20 °C oder 40 °C
Einwirkzeit	30 min	1 min, 5 min, 60 min, 120 min
Belastungssubstanz – Verschmutzung niedrigen Grades	3,0 g/l Rinderalbumin	Nicht anwendbar
Belastungssubstanz – Verschmutzung hohen Grades	10 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Rinderalbumin	Nicht anwendbar

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Eine Prüfsuspension von Viren, gemischt mit Belastungssubstanz, wird auf die Prüfoberfläche aufgebracht und getrocknet. Nach der Trockenzeit wird 0,1 ml des Produkts so auf die Oberfläche aufgebracht, dass es den getrockneten Film bedeckt. Die Oberfläche wird über einen festgelegten Zeitraum bei einer festgelegten

Temperatur gehalten, wie in Abschnitt 4 und 5.4.1.1 festgelegt. Nach Ablauf dieser Einwirkzeit werden die verbliebenen Viren durch Waschen mit eiskaltem DMEM mit 3 % FCS wiedergewonnen. Es wird der Titer der von der Oberfläche wiedergewonnenen Viren bestimmt.

Des Weiteren wird der Virustiter auf einer Oberfläche bestimmt, die anstelle von Produkt mit Wasser definierter Härte behandelt wurde. Die durch das Produkt bewirkte Reduzierung des Virustiters wird als Differenz berechnet.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfviren

Volle viruzide Wirkung muss mit dem folgenden Stamm bewertet werden:

Porzines Parvovirus, Stamm NADL2

Begrenzte viruzide Wirkung muss mit dem folgenden Stamm bewertet werden:

Felines Coronavirus, Stamm München

PPV und FeCoV können von der Virusbank des Friedrich-Loeffler-Instituts in Greifswald, Deutschland, bezogen werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle Gewichtsangaben von chemischen Substanzen in dieser Europäischen Norm beziehen sich auf wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Gewichtsangaben müssen angepasst werden, um daraus resultierende Differenzen im Molekulargewicht berücksichtigen zu können.

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

Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern, wird empfohlen, kommerziell erhältliche wasserfreie Materialien zur Herstellung von Kulturmedien zu verwenden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten strengstens befolgt werden.

Für jedes Kulturmedium und Reagenz sollte ein Verfallsdatum festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes Wasser und darf kein demineralisiertes Wasser sein.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.2.5.1a)].

ANMERKUNG 1 Eine Sterilisation ist nicht erforderlich, wenn das Wasser z. B. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG 2 Falls kein destilliertes Wasser von geeigneter Qualität verfügbar ist, kann Wasser für Injektionen (siehe Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

ANMERKUNG 3 Hinsichtlich des Verfahrens zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.3.

5.2.2.3 Wasser standardisierter Härte für die Verdünnung von Produkten

Das Verfahren für die Herstellung von 1 l Wasser standardisierter Härte ist wie folgt:

- Herstellung von Lösung A: 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration [5.2.5.1c)] oder im Autoklaven [5.2.5.1a)] sterilisiert. Die Sterilisation im Autoklaven, falls angewendet, kann zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird die Lösung unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung darf im Kühlschrank (5.2.5.16) nicht länger als einen Monat gelagert werden.
- Herstellung von Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration [5.2.5.1c)] sterilfiltriert. Die Lösung darf im Kühlschrank (5.2.5.16) nicht länger als eine Woche gelagert werden.
- Es werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) in einen 1 000-ml-Messkolben (5.2.5.13) gefüllt und zunächst 6,0 ml Lösung A, dann 8,0 ml Lösung B hinzugegeben. Die erhaltene Lösung wird gemischt und mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$, gemessen bei $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (5.2.5.4), betragen. Falls erforderlich, wird der pH-Wert mithilfe einer Natriumhydroxidlösung (NaOH) einer Konzentration von etwa 40 g/l (ungefähr 1 mol/l) oder mithilfe einer Salzsäurelösung (HCl) einer Konzentration von etwa 36,5 g/l (ungefähr 1 mol/l) eingestellt.

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

ANMERKUNG Wenn die Produktprüflösungen (5.3) hergestellt werden, führt die Zugabe des Produktes in das Wasser standardisierter Härte zu einer Änderung der Wasserhärte in jedem Prüfröhrchen. In jedem Fall ist die endgültige Wasserhärte im Prüfröhrchen niedriger als 375 mg/l Calciumcarbonat (CaCO_3).

5.2.2.4 Belastungssubstanz

5.2.2.4.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz muss nach den für das Produkt festgelegten Anwendungsbedingungen ausgewählt werden.

Die Belastungssubstanz muss steril sein und mit einer 10fach höheren Konzentration, als für die Prüfung benötigt wird, zubereitet werden.

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

ANMERKUNG Der Begriff „Belastungssubstanz“ wird verwendet, auch wenn mehr als eine Substanz enthalten ist.

5.2.2.4.2 Verschmutzung niedrigen Grades (Rinderserumalbumin-Lösung)

3,0 g Rinderserumalbumin (Cohn-Fraktion V für Dubos-Medium) werden in einem 100-ml-Messkolben (5.2.5.13) in 90 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst. Das Volumen wird mit Wasser (5.2.2.2) bis zur Marke aufgefüllt.

Die Lösung wird durch Membranfiltration [5.2.5.1c)] sterilfiltriert. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.2.5.16) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verbraucht.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins im Prüfverfahren (5.4) beträgt 3 g/l.

5.2.2.4.3 Verschmutzung hohen Grades (Gemisch aus Rinderserumalbumin-Lösung und Hefeextrakt)

In einem 250-ml-Messkolben (5.2.5.13) werden 50 g Hefeextraktpulver in 150 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst, und es wird gewartet, bis der Schaum sich aufgelöst hat. Das Volumen wird mit Wasser (5.2.2.2) bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in eine saubere trockene Flasche überführt und im Autoklaven [5.2.5.1 a)] sterilisiert. Danach lässt man sie auf $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ abkühlen.

25 ml dieser Lösung werden in einen 50-ml-Messkolben (5.2.5.13) pipettiert, und es werden 10 ml Wasser (5.2.2.2) hinzugegeben. 5 g Rinderserumalbumin, Fraktion V, werden unter Schütteln in der Lösung gelöst, und es wird gewartet, bis der Schaum sich aufgelöst hat. Die Lösung wird mit Wasser (5.2.2.2) bis zur Marke aufgefüllt und durch Membranfiltration [5.2.5.1 c)] sterilisiert. Sie wird im Kühlschrank (bei 2 °C bis 8 °C) (5.2.5.16) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verbraucht.

Die Endkonzentration im Prüfverfahren (5.4) beträgt 10 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Rinderserumalbumin.

5.2.2.5 Antibiotikasuspension

Chemikalien

50 Millionen Einheiten Penicillin-G (Sigma PEN-K)

50 g Streptomycinsulfat (entspricht etwa 750 IE/mg) (Sigma, Bestellnummer: 56501)

$25 \times 500\,000$ Einheiten Mycostatin (Nystatin: E R Squibb 59150)

Wasser (5.2.2.2) bis zu 2,5 l.

Herstellung

Der Inhalt der Glasfläschchen wird in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 2,5 l aufgefüllt. Die Suspension wird aseptisch in Aliquote zu 50 ml und 5 ml aufgeteilt. Die Suspension wird bei -200 °C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wird das Fläschchen geschüttelt.

Bei Verwendung von 5 ml je l Medium ergibt sich eine Endkonzentration von:

Penicillin, 100 Einheiten/ml

Streptomycin, 100 µg/ml

Mycostatin, 25 Einheiten/ml

5.2.2.6 Antibiotika-Versene (AV) 10fach-Konzentrat

Chemikalien

Natriumchlorid, 320 g

Kaliumchlorid, 16 g

Glucose, 40 g

Versene (EDTA), 8 g (Koch-Light, Bestellnummer: 0012424-/B)

0,2 % Phenolrot-Lösung in Wasser (5.2.2.2), 40 ml

7,5 % Natriumbicarbonat-Lösung in Wasser (5.2.2.2), 325 ml

Antibiotika (5.2.2.5), 20 ml

Herstellung

Die Lösung wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 4 Liter aufgefüllt, wobei das Natriumbicarbonat und die Antibiotika (siehe 5.2.2.5) weggelassen werden. Die Lösung wird unter positivem Druck durch einen Membranfilter (0,22 µm Porengröße) filtriert. Zu dem sterilen Filtrat werden das Natriumbicarbonat und die Antibiotika hinzugefügt. Die Lösung wird aseptisch in Aliquote zu 50 ml aufgeteilt und bei –200 °C aufbewahrt.

Zur Verwendung werden 50 ml 10fach konzentrierte AV-Lösung zu 450 ml Wasser (5.2.2.2) gegeben.

Die Arbeitskonzentration der Lösung beträgt 0,05 % Trypsin, 0,02 % Versene, pH = 7,8.

5.2.2.7 DMEM

	mg je l
Natriumchlorid (NaCl)	6 400
Kaliumchlorid (KCl)	400
Calciumchlorid (CaCl ₂)	200
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	200
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	124
D-Glucose	1 000
Eisennitrat (Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O)	0,1
Natriumpyruvat	110
Phenolrot	15
Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	3 700
L-Arginin HCl	84
L-Cystin	48
L-Glutamin	580
L-Histidin HCl H ₂ O	42
L-Isoleucin	105
L-Leucin	105
L-Methionin	30
L-Phenylalanin	66

L-Threonin	95
L-Valin	95
Glycin	30
L-Serin	42
L-Lysin HCl	146
Cholinchlorid	4
Folsäure	4
Myo-Inositol	7,2
Nicotinamid	4
D-Ca-Pantothenat	4
Pyridoxal HCl	4
Riboflavin	0,4
Thiamin HCl	4

5.2.2.8 DMEM mit 2 % FCS

5.2.2.9 pH 7,2 bis pH 7,4 (PBS)

Natriumchlorid (NaCl)	8,00 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	0,12 g
Wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	0,91 g
Kaliumchlorid (KCl)	0,2 g
Wasser	auffüllen auf 1 000 ml

Autoklavieren bei 121 °C

5.2.2.10 Phenolrot, 1 %

- In ein 100-ml-Becherglas werden 10 g in Alkohol lösliches Phenolrot gegeben. Es werden 20 ml 1 N Natriumhydroxidlösung (NaOH) hinzugegeben. Die Lösung wird gemischt und einige Minuten lang stehen gelassen.
- Der gelöste Farbstoff wird in einen 1 000-ml-Messkolben (5.2.5.13) überführt.
- Es werden weitere 10 ml 1 N Natriumhydroxidlösung (NaOH) in das Becherglas gegeben. Das gelöste Material wird in den Messkolben (5.2.5.13) überführt.
- Die Lösung wird mit Wasser (5.2.2.2) auf ein Endvolumen von 1 000 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

5.2.3 Prüfoberfläche

Dabei muss es sich um Edelstahlscheiben (mit 2 cm Durchmesser) aus Edelstahl der Werkstoffnummer 1.4301 (EN 10088-1) handeln, die auf beiden Seiten eine Oberflächenausführung 2 B entsprechend den Anforderungen in EN 10088-2 aufweisen. Die Scheiben müssen so flach wie möglich sein, was sich am besten durch die Verwendung von Edelstahl mit einer Dicke von 1,2 mm oder 1,5 mm erreichen lässt. Die Scheiben dürfen nur mit einer Pinzette berührt und nur einmal verwendet werden.

Vor der Verwendung müssen die Scheiben für 60 min in einen Behälter mit einer ausreichenden Menge von 5 % (v/v) Decon® 90¹⁾ oder 1 % Blanisol-Pur gegeben werden, und zwar so, dass ein Aneinanderhaften und eine Beschädigung der Oberflächen vermieden werden. Die Scheiben werden 10 s lang mit fließendem frisch destilliertem Wasser (siehe 5.2.2.2) oder demineralisiertem Wasser gespült, wobei darauf geachtet wird, dass sie nicht trocknen.

Die Scheiben werden weitere 10 s lang mit Wasser (siehe 5.2.2.2) gespült, um sicherzustellen, dass das Tensid vollständig entfernt wird. Um einen ausreichenden Wasserfluss bereitzustellen, kann ein sterilisiertes, Flüssigkeit spendendes Druckgefäß mit passenden Schläuchen und Anschlüssen oder ein anderes geeignetes Verfahren verwendet werden, welches so reguliert wird, dass es etwa 2 000 ml Wasser je min abgibt. Die Scheiben werden 15 min lang in ein Bad mit Ethanol einer Volumenkonzentration von 70 % (v/v) getaucht. Dann werden die Scheiben aus dem Bad genommen und mindestens 10 s lang mit doppelt destilliertem Wasser gespült. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

ANMERKUNG Geeignete Edelstahlscheiben können in der Regel von örtlichen Stahlbauunternehmen bezogen werden.

5.2.4 Allgemeines

Alle Glasgeräte und alle Teile der Prüfeinrichtung, die mit den Nährmedien, den Reagenzien oder der Probe in Berührung kommen, ausgenommen steril gelieferte, werden nach einem der folgenden Verfahren sterilisiert:

- a) durch Dampf in einem Autoklaven [5.2.5.1 a)];
- b) durch trockene Hitze im Heißluftsterilisator [5.2.5.1 b)].

5.2.5 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²⁾ und insbesondere folgende Geräte:

5.2.5.1 Sterilisatoren

- a) zur Sterilisation durch Dampf ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min auf einer Temperatur von (121_0^{+3}) °C gehalten werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluftsterilisator, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min bei (180_0^{+5}) °C, für eine Mindesthaltezeit von 1 h bei (170_0^{+5}) °C oder für eine Mindesthaltezeit von 2 h bei (160_0^{+5}) °C gehalten werden kann;
- c) zur Sterilisation von Medien ein geeignetes Membranfiltrationsgerät mit Filtern von 47 mm bis 50 mm Durchmesser und Membranen mit 0,22 µm Porengröße.

1) Decon® 90 und Blanisol-Pur sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN.

2) Sterile Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

5.2.5.2 Wasserbäder, einstellbar auf $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$ und $(10 \pm 1)^\circ\text{C}$ sowie auf zusätzliche Temperaturen $\pm 1^\circ\text{C}$ (5.4.1.1).

5.2.5.3 CO₂-Inkubator (95 % Luft, 5 % CO₂), einstellbar auf $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder auf $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

5.2.5.4 pH-Messgerät mit einer Kalibrierungsungenauigkeit von höchstens $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$

5.2.5.5 Inverses Mikroskop für die mikroskopische Untersuchung von Zellkulturen.

5.2.5.6 Stoppuhr

5.2.5.7 Schüttelgerät

a) Elektromechanisches Rührwerk, z. B. Vortex®-Mischer³⁾.

b) mechanisches Schüttelgerät.

5.2.5.8 96-Well-Mikrotiterplatten für die Zellkultur.

5.2.5.9 Behälter: sterile Prüfröhrchen, Flaschen oder Glaskolben mit geeignetem Volumen.

5.2.5.10 Magnetrührgerät, um Zellen vor der Aussaat in Suspension zu halten.

5.2.5.11 Petrischalen (Platten) in den Größen 30 mm bis 100 mm.

5.2.5.12 Sterile Messpipetten mit Nennvolumen 10 ml, 1 ml und 0,1 ml. Kalibrierte automatische Pipetten mit sterilen Einweg-Spitzen dürfen verwendet werden.

5.2.5.13 Messkolben

5.2.5.14 Sicherheitswerkbank, Klasse II.

5.2.5.15 Zentrifuge

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

5.2.5.17 Gefrierschrank für die Lagerung bei -20°C und -70°C .

5.2.5.18 6-Well-Platten für die Zellkultur

5.2.5.19 Exsikkator mit Vakuum-Manometer.

5.3 Produktprüflösungen

Produktprüflösungen müssen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.3) in mindestens drei verschiedenen Konzentrationen hergestellt werden, um eine Konzentration im wirksamen und eine im unwirksamen Bereich zu erfassen. Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden.

Verdünnungen von gebrauchsfertigen Produkten, d. h. Produkten, die zur Anwendung nicht verdünnt werden, müssen mit Wasser (5.2.2.2) hergestellt werden.

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

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand gelöst, indem mindestens $1,0 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ des Produkts in einen Messkolben (5.2.5.13) eingewogen werden und das Volumen mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.3) aufgefüllt wird. Die folgenden Verdünnungen (niedrigere Konzentrationen) müssen in Messkolben (5.2.5.13) mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.3) auf der Basis von Volumenanteilen hergestellt werden.

Bei flüssigen Produkten müssen die Verdünnungen des Produkts in Messkolben (5.2.5.13) mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.3) auf der Basis von Volumenanteilen hergestellt werden.

Die Produktprüflösungen müssen frisch hergestellt und innerhalb von 2 h verbraucht werden. Die Prüfkonzentration ist als Massenkonzentration oder als Volumenkonzentration anzugeben, und Einzelheiten zu den Produktproben im Lieferzustand sind festzuhalten.

5.4 Verfahren zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts

5.4.1 Allgemeines

5.4.1.1 Untersuchungsbedingungen (obligatorische und zusätzliche)

Neben der obligatorischen Temperatur und Einwirkzeit sowie den obligatorischen Belastungssubstanzen und Prüforganismen können zusätzliche Untersuchungsbedingungen und Prüforganismen entsprechend der vorgesehenen praktischen Anwendung des Produkts (Abschnitt 4) wie folgt ausgewählt werden:

a) Temperatur (in °C):

b) Einwirkzeit t (in min):

Die obligatorischen und zusätzlichen Einwirkzeiten bei der Prüfung sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt.

Die zulässige Abweichung von den gewählten Einwirkzeiten beträgt 10 s bzw. 5 s bei einer Einwirkzeit von 1 min.

c) Belastungssubstanz:

Die obligatorische Belastungssubstanz bei der Prüfung ist 3,0 g/l Rinderserumalbumin (5.2.2.4.2) bei Verschmutzung niedrigen Grades oder ein Gemisch von 10 g/l Rinderserumalbumin und 10 g/l Hefeextrakt (5.2.2.4.3) bei Verschmutzung hohen Grades entsprechend den praktischen Anwendungen.

d) Prüforganismen (5.2.1):

Der obligatorische Prüforganismus für volle viruzide Wirkung ist Porzines Parvovirus.

Der obligatorische Prüforganismus für begrenzte viruzide Wirkung ist Felines Coronavirus.

5.4.1.2 Herstellung der Virus-Prüfsuspensionen (für Porzines Parvovirus und Felines Coronavirus)

Die PPV-Stammsuspension wird in einer porzinen Nierenzelllinie (pK15) (XY), die FeCoV-Stammsuspension in einer felines Nierenzelllinie (CRFK) vermehrt. Beide Zelllinien produzieren hohe Titer an infektiösen Virenpartikeln. Der Kulturüberstand wird bei maximaler CPE geerntet. Er wird zwei Mal eingefroren und wieder aufgetaut, um das Virus freizusetzen. Die Zelltrümmer müssen anschließend durch vorsichtiges Zentrifugieren (15 min bei 400 g) abgetrennt werden. Dieses Präparat wird als „Virus-Prüfsuspension“ bezeichnet und muss einen Titer von mindestens $10^{7,5}$ TCID₅₀/ml aufweisen. Es kann sofort verwendet oder gefroren bei -70°C aufbewahrt werden. Präparate mit niedrigem Titer können nötigenfalls durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert werden. Es dürfen auch andere geeignete Zelllinien verwendet werden, wenn gezeigt werden kann, dass sie der Zelllinie pK15 oder CRFK gleichwertig sind. Für das Prüfverfahren (5.7) wird die Virus-Prüfsuspension unverdünnt verwendet.

5.4.1.3 Vorbereitung der Zelllinie

Zellen für die Virustitration, die als Suspension in quantalen Prüfungen eingesetzt werden, müssen den Verdünnungen der Prüfmischung in solch einer Dichte zugesetzt werden, dass sich bei der Zellkontrolle innerhalb von zwei Tagen ein Monolayer (> 90 % Konfluenz) ausbilden kann. Zellsuspensionen werden durch mechanisches Ernten konfluenter Zellen unter Verwendung von AV-Lösung (5.2.2.5) gewonnen, wobei eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml in DMEM-Medium (5.2.2.7) mit 10 % FCS eingestellt wird.

5.4.2 Infektiositätstest

5.4.2.1 Vorverdünnung der Virussuspension

Die Virussuspension wird in Prüfröhrchen oder direkt in Mikrotiterplatten in zehnfachen Verdünnungsschritten verdünnt, wobei jeweils 0,2 ml Virussuspension zu 1,8 ml DMEM mit 2 % FCS (5.2.2.8) gegeben werden. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Pipette bei jedem Verdünnungsschritt gewechselt wird. Virustitration in suspendierten Zellen auf Mikrotiterplatten

Von den Virussuspensionen, deren Konzentrationen sich jeweils um den Faktor 10 unterscheiden, werden, beginnend mit der höchsten Verdünnung, jeweils 0,1 ml in acht Wells einer Mikrotiterplatte gegeben. Es wird jeweils 0,1 ml Zellsuspension mit der doppelten Konzentration an fötalem Kälberserum hinzugegeben (um die gewünschte Endkonzentration zu erhalten). Diese weist eine solche Dichte auf, dass sich bei der Zellkontrolle innerhalb von zwei Tagen ein Monolayer (> 90 %) ausbilden kann. In sechs Wells wird keine Virussuspension pipettiert; sie dienen als Zellkontrolle. Die Vermehrung der Viren löst eine CPE aus, die nach ausreichender Inkubationszeit (48 h bis 72 h) mithilfe eines invertierten Mikroskops beobachtet werden kann.

5.4.3 Plaque-Assay

Kunststoffplatten-Wells (Durchmesser 30 mm bis 35 mm) mit konfluenten Zellmonolayern werden einmal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (5.2.2.9) gewaschen und mit jeweils 0,2 ml der seriellen Verdünnungen der Virussuspension in DMEM + 2 % FCS (5.2.2.8) inokuliert. Je Verdünnung werden in der Regel drei Wells verwendet. Nach einer Adsorptionsphase von 1 h bei 37 °C, in der die Zellmonolayer durch Neigen der Platten alle 8 min bis 10 min feucht gehalten werden, wird das Inokulum entfernt, und die Zellmonolayer werden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Wells mit 3 ml einer Mischung aus 2 % geschmolzener Agarose oder einem anderen geeigneten halbfesten Medium und 2fach konzentriertem DMEM mit 4 % FCS (5.2.2.7) überlagert. Die Kulturen werden in einem CO₂-Inkubator (5.2.5.3) 5 Tage bis 6 Tage bei 37 °C bebrütet. Nach Überlagerung mit 2 ml einer zweiten Schicht mit derselben Zusammensetzung wie die erste, die zusätzlich 5 % einer 1 : 1 000 verdünnten Lösung von Neutralrot enthält, und einer weiteren Bebrütung (im Dunkeln) für 24 h bis 48 h bei 37 °C in einem CO₂-Inkubator (5.2.5.3) können Plaques gezählt werden.

Die Zählung kann auch nach Hinzufügen von Kristallviolett erfolgen. Die Zellmonolayer werden durch Zugabe von 2 ml 10 % Trichloressigsäure (TCA) auf die Agarschicht 10 min bis 15 min lang bei Raumtemperatur fixiert. Die Agarschicht wird dann entfernt, und es werden 2 ml 0,1 % Kristallviolett in 20 % Ethanol hinzugegeben. Nach 10 min bis 15 min bei Raumtemperatur werden die Wells gründlich mit Wasser gewaschen, und die Plaques (weiße Flecken) werden gezählt.

5.4.4 Prüfung auf viruzide Wirkung — Vorbereitung

5.4.4.1 Allgemeines

Vor der Prüfung werden alle Reagenzien (ausgenommen die Virus-Prüfsuspension (5.4.1.2), die nach dem Auftauen auf Eis aufbewahrt wird), d.h. die Lösungen der Belastungssubstanz (5.2.2.4), Wasser standardisierter Härte (5.2.2.3), ATV (?), Zellkulturmedien und Produktprüflösung (5.3) im Wasserbad

(5.2.5.2) auf $10\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ eingestellt. Es wird überprüft, ob sich die Temperatur der Reagenzien stabilisiert hat.

Für die verschiedenen Titrationen nach den unterschiedlichen Einwirkzeiten werden Prüfröhrchen (5.2.5.9) mit eiskaltem MEM $\pm 2\%$ FCS (5.2.2.8) gefüllt und in einem Wasserbad bei 4 °C (5.2.5.2) oder in zerstoßenem Eis aufbewahrt. Mikrotiterplatten (5.2.5.8) werden zur Identifizierung beschriftet.

5.4.5 Prüfverfahren

Für jede zu prüfende Konzentration müssen zwei Träger vorbereitet werden. Höchstens 2 min vor der Inokulation der Träger werden neun Anteile Virussuspension (5.4.1.2) mit einem Anteil der Lösung der Belastungssubstanzen (5.2.2.4) gemischt.

Die Prüfoberflächen (5.2.3) werden aseptisch in je eine Petrischale (5.2.5.11) überführt, wobei sichergestellt wird, dass die Platten sich in einer horizontalen Position befinden. Die Prüfscheiben werden in einer Sicherheitswerkbank (5.2.5.14) vorbereitet. Hierzu werden 0,05 ml der Virussuspension oder der Belastungssubstanzen in die Mitte jeder Prüfoberfläche (5.2.3) gegeben. Das Inokulum wird in einem Exsikkator, der eine ausreichende Menge Silikagel enthält, bei 1 000 mbar getrocknet. Die Trockenzeit muss mindestens 30 min betragen, nötigenfalls bis die Scheiben sichtbar trocken sind, jedoch nicht mehr als 60 min. Die getrockneten Träger werden innerhalb von 60 min verwendet, um eine Inaktivierung des Virus mit der Zeit zu vermeiden. Nach dem Trocknen müssen die Träger auf die Prüftemperatur eingestellt und in eine sterile Petrischale überführt werden. Dabei ist sicherzustellen, dass sich die Scheibe in einer horizontalen Position befindet. Das getrocknete Inokulum wird vorsichtig mit 0,1 ml der Prüflösung (5.3) bedeckt, wobei darauf geachtet wird, dass die Pipettenspitze den Träger nicht berührt, dann wird der Deckel auf die Platte gelegt. Für die Wasserkontrolle werden 0,1 ml steriles Wasser standardisierter Härte (5.2.2.3) auf die andere Prüfoberfläche gegeben, wobei sicherzustellen ist, dass das getrocknete Inokulum von der Flüssigkeit vollständig bedeckt wird.

Nach der korrekten Einwirkzeit von 30 min bei 10 °C werden die Scheiben in einen separaten Behälter (flacher Boden mit 4 cm bis 5 cm Durchmesser an der Basis, mit Deckel) überführt, und es werden sofort 2,0 ml eiskaltes DMEM mit 2 % FCS (5.2.2.8) hinzugegeben. Das Medium muss in die Mitte der Oberfläche gegeben werden. Die verbliebenen Viren werden abgespült, indem ein Teil der Flüssigkeit mit der Pipette vorsichtig 10 Mal aufgesaugt und wieder ausgestoßen wird. Dabei ist darauf zu achten, dass sie nicht vom Träger rinnt. Des Weiteren wird darauf geachtet, dass am Ende keine Flüssigkeit auf dem Träger verbleibt. Der Inhalt der Spitze wird in 2,9 ml eiskaltes Erhaltungsmedium (DMEM + 2 % FCS) überführt. Dies entspricht einer Verdünnung auf die 10^{-1} -fache Konzentration. Anschließend wird von der entnommenen Virussuspension innerhalb von 30 min eine Serie zehnfacher Verdünnungen in eiskaltem Erhaltungsmedium hergestellt. Nach jeder Verdünnung müssen die Pipetten gewechselt werden, um ein Verschleppen von Viren zu vermeiden.

Infektiositätsprüfungen erfolgen entweder anhand einer Plaqueprüfung oder anhand eines quantalen Virustests. Von den einzelnen Verdünnungen werden je 0,1 ml in jeweils vier Wells einer Mikrotiterplatte überführt, die einen konfluenten Zellmonolayer enthalten.

Falls notwendig, muss nach einer Adsorptionszeit von 1 h das Medium in den Wells gewechselt werden. Die CPE wird nach 48 h bis 72 h unter dem Mikroskop (5.2.5.5) beurteilt.

Alternativ kann Zellsuspension in den Wells mit den Verdünnungen inokuliert werden. Nach dem Bebrüten wird der Virustiter bestimmt. Die Reduzierung des Virustiters (R) wird als Differenz zwischen dem Virustiter nach Behandlung mit dem Produkt (Na) und dem Virustiter der Wasserkontrolle (Nw) berechnet.