

DIN EN 17111

ICS 11.080.20

Einsprüche bis 2017-06-07

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der viruziden Wirkung für
Instrumente im humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17111:2017**

Chemical disinfectants and antiseptics –

Quantitative carrier test for the evaluation of virucidal activity for instruments used in the medical area –

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

German and English version prEN 17111:2017

Désinfectants chimiques et antiseptiques –

Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité virucide pour instruments utilisés en médecine –

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

Version allemande et anglaise prEN 17111:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-04-07 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 76 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED)

Nationales Vorwort

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

Die Mitarbeit von 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 beigefügt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der viruziden Wirkung für Instrumente im humanmedizinischen Bereich — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)

Désinfectants chimiques et antiseptiques — Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité virucide pour instruments utilisés en médecine — Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2)

Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative carrier test for the evaluation of virucidal activity for instruments used in the medical 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	7
5 Prüfverfahren	8
5.1 Kurzbeschreibung	8
5.2 Materialien und Reagenzien	8
5.2.1 Prüforganismen	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)	12
5.4 Herstellung der Prüforganismensuspensionen und der Produktprüflösungen	14
5.4.1 Prüforganismensuspensionen (für Prüfung und Validierung)	14
5.4.2 Produktprüflösung	14
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts	15
5.5.1 Allgemeines	15
5.5.2 Verfahren	16
5.5.3 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität	18
5.5.4 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Desinfektionswirkung	19
5.5.5 Referenz-Virusinaktivierungsprüfung	20
5.5.6 Titration der Viruskontrollprobe	20
5.5.7 Titration der Untersuchungsproben	20
5.6 Versuchsergebnisse und Berechnung	20
5.6.1 Protokollierung der Ergebnisse	20
5.6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID ₅₀ - PFU)	20
5.7 Verifizierung des Verfahrens	21
5.8 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen	21
5.9 Darstellung der Ergebnisse	21
5.9.1 Allgemeines	21
5.9.2 Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten	21
5.10 Berechnung	22
5.10.1 Viruzide Wirkung	22
5.10.2 Verwendung der Bezeichnung	22
5.11 Prüfbericht	22
Anhang A (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts	24
Anhang B (informativ) Beispiele für Viren, sortiert nach ihrer Präsenz im menschlichen Körper im Falle einer Virusinfektion	26
Anhang C (normativ) Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebfiltration	28
C.1 Molekularsiebfiltration mit Sephadex TM LH 20	28
C.1.1 Prinzip	28

C.1.2	Sephadex-Suspension	28
C.1.3	Verfahren	28
Anhang D (informativ) Berechnung des viralen Infektiositätstiters		30
D.1	Quantalversuche — Beispiel für die Bestimmung der TCID ₅₀ nach dem Spearman-Kärber-Verfahren.....	30
D.2	Plaueversuche.....	31
D.3	Biometrische Bewertung von experimentellen Annäherungen und Beurteilung der desinfizierenden Wirkung auf den Virus (Reduktionsfaktor [R]):	31
D.3.1	Allgemeines	31
D.3.2	Berechnung des Virustiters mit 95%igem Konfidenzintervall	32
D.3.3	Berechnung des Reduktionsfaktors und seines 95%igen Konfidenzintervalls.....	33
D.3.4	Berechnung des durchschnittlichen Reduktionsfaktors ($R_{(mi)}$) und seines 95%igen Konfidenzintervalls	34
D.3.5	Praktische Beispiele.....	34
Literaturhinweise.....		37

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17111:2017) 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 einen Keimträgerversuch zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel zur Behandlung von Instrumenten (chirurgischen Instrumenten, Anästhesiematerial, Endoskopen usw.) im Rahmen der im Anwendungsbereich beschriebenen Anwendungsgebiete eine viruzide Wirkung aufweist oder nicht.

Der Laboratoriumsversuch bildet praktische Anwendungsbedingungen nahe nach, einschließlich des vorherigen Antrocknens von Viren auf einem Träger, der Einwirkzeit, Temperatur, Prüforganismen und Belastungssubstanzen, d. h. Bedingungen, die die Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in Praxis-situationen beeinflussen können. Jede durch diese Prüfung ermittelte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels entspricht den festgelegten Versuchsbedingungen.

1 Anwendungsbereich

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

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die zur Instrumentendesinfektion im humanmedizinischen Bereich durch Eintauchen 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 Einrichtungen in Schulen, Kindergärten und Heimen;
- und können auch am Arbeitsplatz oder im häuslichen 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 von kommerziell erhältlicher Zubereitungen oder Wirkstoffe 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 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.

4 Anforderungen

Bei dem mit Wasser standardisierter Härte – oder bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser – verdünnten nach Abschnitt 5 geprüften Produkt muss mindestens eine dezimal-logarithmische (lg) Reduktion der Lebendkeimzahl um 4 Stufen nachgewiesen werden; die Prüfung muss unter simulierten Bedingungen niedriger Belastung (Lösung von 0,3 g/l Rinderalbumin) oder hoher Belastung (Lösung von 3 g/l Rinderalbumin plus 3 ml/l gewaschene Schaf-Erythrozyten) entsprechend seinen praktischen Anwendungsbedingungen und den Mindestprüfbedingungen erfolgen.

Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Produkte zur Vorreinigung mit einem kombinierten Reiniger/Desinfektionsmittel	Instrumentendesinfektion bei Temperaturen < 40 °C	Instrumentendesinfektion bei Temperaturen ≥ 40 °C
Mindestspektrum von Prüforganismen^a	Modifizierter <i>Vacciniavirus</i> Ankara oder <i>Vacciniavirus</i> , Stamm Elstree	<i>Adenovirus^b</i> und <i>Norovirus^b</i>	<i>Parvovirus</i>
zusätzlich	Jeder zutreffende Prüforganismus		
Prüftemperatur	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber bei/zwischen		
	20 °C	20 °C und 40 °C	> 40 °C und 70 °C
Einwirkzeit	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber nicht länger als		
	60 min	60 min	60 min
Belastungs- substanz	0,3 g/l Rinderserumalbuminlösung und/oder 3,0 g/l Rinderserumalbuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten	0,3 g/l Rinderserumalbuminlösung und/oder 3,0 g/l Rinderserumalbuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten	0,3 g/l Rinderserumalbuminlösung und/oder 3,0 g/l Rinderserumalbuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten
niedrige Belastung			
hohe Belastung			
Zusätzliche Belastung^c	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz
^a Die Prüfung mit begrenztem Spektrum viruzider Wirksamkeit (begrenzte Viridie PLUS) deckt alle behüllten Viren (Anhang B) und alle angegebenen Prüforganismen ab. ^b Zum Nachweis der viruziden Wirksamkeit muss das Produkt die Anforderungen der EN 14476 mit <i>Polio</i> -, <i>Adeno</i> - und <i>murinen Noroviren</i> erfüllen. ^c Die Konzentrationen, die sich als Ergebnis der Prüfungen unter zusätzlichen Belastungen ergeben, können niedriger sein, als die, die unter den Mindestprüfbedingungen gewonnen wurden.			

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Prüfsuspension von Prüfviren in einer Lösung von Belastungssubstanzen wird auf einem Glasträger ausgestrichen. Nach dem Trocknen wird der Träger in einer Probe des Produkts im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (oder bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser) verdünnten Produkts eingetaucht. Gleichzeitig wird ein zweiter Träger mit Wasser (standardisierter Härte) anstelle des Produkts unter gleichen Prüfbedingungen behandelt (Wasserkontrolle). Die Träger werden bei einer der in Abschnitt 4 und 5.5.1.1 festgelegten Temperaturen und Einwirkzeiten gehalten. Am Ende dieser Einwirkzeit werden die Träger in ein Glasperlen enthaltendes Neutralisationsmedium überführt. Die Viren sind durch Schütteln von der Oberfläche abzulösen. Die Anzahl überlebender Viren in jeder Probe wird bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahl durch Vergleich der Ergebnisse des Produkts und der Wasserkontrolle berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird mit dem modifizierten *Vacciniavirus* Ankara oder dem *Vacciniavirus*, Stamm Elstree (Produkte zur Vorreinigung mit Desinfektionsreiniger), dem *Adenovirus* Typ 5 und dem *murinen Norovirus* als Prüforganismen (Mindestspektrum von Prüforganismen) durchgeführt; bei Prüftemperaturen von 40 °C oder höher muss nur das *murine Parvovirus* verwendet werden.

5.1.3 Andere Einwirkzeiten und Temperaturen dürfen innerhalb bestimmter in Abschnitt 4 festgelegter Grenzen verwendet werden. Zusätzliche Belastungssubstanzen dürfen verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die viruzide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden als Prüforganismen ausgewählten Stämme nach Abschnitt 4 bewertet werden.¹⁾

- a) Behülltes DNA-Virus²⁾
Vacciniavirus, modifizierter *Vacciniavirus* Stamm Ankara (MVA), ATCC VR-1508 oder Stamm Elstree, ATCC VR-1549
- b) Hüllenloses RNA-Virus³⁾
Murine Norovirus, Stamm S99 Berlin
- c) Hüllenloses DNA-Virus
 - 1) *Adenovirus* Typ 5, Stamm Adenoid 75, ATCC VR-5
 - 2) *Murine Parvovirus*, Minute Virus of Mice (MVM), Stamm Crawford, ATCC VR-1346

¹⁾ Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von der American Type Culture Collection (ATCC) geliefert werden. Diese Information dient 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 *Vacciniavirus* kann 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 bezogen werden. <https://www.fli.de/en/home/>

³⁾ Virusstämme dürfen von nationalen oder internationalen Kultursammlungen bezogen werden. Das *murine Norovirus* kann 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 bezogen werden. <https://www.fli.de/en/home/>

Die geforderte Bebrütungstemperatur für diese Prüforganismen beträgt $(36\text{ °C} \pm 1)\text{ °C}$ oder $(37 \pm 1)\text{ °C}$ (5.3.2.12). Die gleiche Temperatur (entweder 36 °C oder 37 °C) muss für alle Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung angewendet werden.

Wenn zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, müssen sie unter den im Prüfbericht anzugebenden optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien) bebrütet werden. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss ihre Eignung zur Lieferung der erforderlichen Impfansätze verifiziert werden. Wenn diese zusätzlichen Prüforganismen nicht in einem Referenzzentrum klassifiziert wurden, müssen ihre Identifizierungsmerkmale angegeben werden. Darüber hinaus müssen sie von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kultursammlung für fünf Jahre als Referenzprobe zurückgestellt werden. Die Quelle der Stämme muss angegeben 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 wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um daraus folgende Differenzen in den relativen Molekülmassen zu berücksichtigen.

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

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien gegebenenfalls handelsübliche Materialien verwendet werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten strengstens befolgt werden.

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

Alle festgelegten pH-Werte werden bei $(20 \pm 1)\text{ °C}$ 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 Phosphatpuffer-Kochsalz-Lösung (PBS)

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

5.2.2.4 Neutralrot (1:1 000-Lösung)

Die Stammlösung wird aus 0,1 mg/ml Neutralrot (Sigma N7005) in Wasser (5.2.2.2) hergestellt. Anschließend wird diese durch einen Filter mit der Porengröße 0,40 µm gefiltert und bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

5.2.2.5 Fötales Kälberserum (FCS)

Das FCS muss zertifiziert frei von Viren und Mykoplasmen sein. Überflüssige Viren und Mykoplasmen können das Zell- und Virenwachstum beeinflussen und zu falschen Ergebnissen führen.

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

5.2.2.6 Trichloressigsäure (10%ige Lösung) (TCA)

10 g der TCA-Kristalle werden mit 80 ml Wasser (5.2.2.2) verdünnt, dann wird das Volumen auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt. Durch Umrühren wird die Lösung vervollständigt.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

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

- Herstellung von Lösung A: 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 (5.3.2.7) oder im Autoklaven [(5.3.2.1 a)] sterilisiert. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies 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 im Kühlschrank (5.3.2.8) nicht länger als einen Monat lagern.
- Herstellung von Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden 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 im Kühlschrank (5.3.2.8) nicht länger als eine Woche lagern.
- 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) werden in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.9) gegeben, dazu gegeben werden 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B. Die erhaltene Lösung wird gemischt und mit Wasser auf 1 000 ml (5.2.2.2) aufgefüllt. Der pH-Wert (5.3.2.4) 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 (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt.

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

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

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Allgemeines

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

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem 10fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

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

ANMERKUNG Der Begriff „Belastungssubstanz“ wird auch dann verwendet, wenn es sich um mehrere Substanzen handelt.

5.2.2.8.2 Bedingungen niedriger Belastung (Rinderserumalbuminlösung – geringe Konzentration)

In 100 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) werden 0,30 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7), die Lösung ist in einem Kühlschrank (5.3.2.8) aufzubewahren und innerhalb von einem Monat zu verbrauchen.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins im Prüfverfahren (5.5) muss 0,3 g/l betragen.

5.2.2.8.3 Bedingungen hoher Belastung (Gemisch von Rinderserumalbuminlösung hoher Konzentration und Schaf-Erythrozyten (5.2.2.6))

In 97 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) werden 3,00 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7).

Es werden mindestens 8,0 ml frisches steriles defibriniertes Schafsblut (5.2.2.6) hergestellt. Die Erythrozyten werden bei 800 g_N für 10 min (5.3.2.13) abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Erythrozyten in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, en: phosphate-buffered saline) resuspendiert (). Dieser Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt, bis der Überstand farblos ist.

3 ml der angereicherten (gepackten) Schaf-Erythrozyten werden in den 97 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung (siehe oben) resuspendiert. Um eine Kontamination zu verhindern, sollte dieses Gemisch in Portionen aufgeteilt, die wahrscheinlich an einem Tag verbraucht werden, und in gesonderten Behältern im Kühlschrank für höchstens 7 Tage gelagert werden (5.3.2.8).

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins und der Schaf-Erythrozyten im Prüfverfahren (5.5) muss 3 g/l beziehungsweise 3 ml/l betragen.

5.2.2.9 Defibriniertes Schafsblut

Das defibrinierte Schafsblut muss steril sein (aseptischer Aderlass und Vorbereitung). Das defibrinierte 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 muss Eagle's Minimum-Essential Medium (MEM) oder ein gleichwertiges Medium verwendet werden, ergänzt mit FCS (5.2.2.5), Antibiotika und weiteren Wachstumsfaktoren je nach Erfordernis.

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

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

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

5.2.2.11 Zellkulturen

Einschicht-Zellkulturen müssen vor der Beimpfung zu >90 % zusammengewachsen (konfluierend) sein. Zelllinien werden entsprechend ihrer Sensibilität gegenüber den Prüforganismen (5.2.1) ausgewählt. Die Zellen für eine Virustitration müssen, wenn sie als Suspensionen in Quantalversuchen verwendet werden, den Verdünnungen des Prüfgemischs (5.5.2) in einer solchen Dichte hinzugefügt werden, dass die Bildung einer einschichtigen Zellschicht (en: monolayer) in der Zellkontrollprobe mindestens innerhalb von zwei Tagen möglich ist. Zellkulturen können als Einschicht-Zellkulturen oder in Suspensionen für Quantalversuche verwendet werden. Für weitere Details zu den Zelllinien siehe 5.5.1.1.e).

5.3 Apparate und Glasgeräte

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf 20 °C $\pm$ 1 °C und zusätzliche Prüftemperaturen $\pm$ 1 °C (5.5.1)

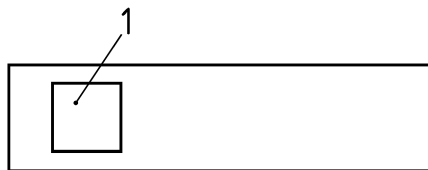
5.3.2.3 Umkehr-Mikroskop zum mikroskopischen Betrachten der Zellkulturen

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

- 5.3.2.4 pH-Messgerät**, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von $\pm 0,1$ pH-Einheiten 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 Volumen
- 5.3.2.9 Messkolben**, kalibriert bei 20 °C
- 5.3.2.10 Sterile Mikrotiterplatten, 6-Well-Platten für Zellkulturen und Kolben** für die Zellkulturen
- 5.3.2.11 Membranfiltrationsgerät** für die Filtration von Medien mit einer Porenweite von 0,2 µm
- 5.3.2.12 CO₂-Brutschrank** (95 % Luft, 5 % CO₂), einstellbar auf 36 °C $\pm$ 1 °C, für die Bebrütung von Zellkulturen. Ein Brutschrank einstellbar auf 37 °C $\pm$ 1 °C darf verwendet werden, wenn ein Brutschrank einstellbar auf 36 °C $\pm$ 1 °C nicht verfügbar ist.
- 5.3.2.13 Sterile Messpipetten** mit Nennvolumina von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml
- ANMERKUNG Kalibrierte automatische Pipetten dürfen verwendet werden.
- 5.3.2.14 Magnetrührer**, um die Zellen vor der Aussaat in Suspension zu halten
- 5.3.2.15 Eismaschine oder kommerziell erhältliches Eis** zum Kühlen des Zellerhaltungsmediums und der Reaktionsgemische während der Prüfung (siehe 6.1, 6.5.1, und 6.6.3).
- 5.3.2.16 Becken als Eisbad** mit Eis und Wasser
- 5.3.2.17 Mechanisches Schüttelgerät**
- 5.3.2.18 Zentrifuge**
- 5.3.2.19 Biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II**
- 5.3.2.20 Tiefkühleinrichtung**, –70 °C
- 5.3.2.21 Glasperlen**, Durchmesser: 3 mm bis 4 mm und 0,25 mm bis 0,5 mm
- 5.3.2.22 Zylindrische Röhrchen** von etwa 15 ml Volumen und etwa 18 mm Durchmesser mit Schraubverschluss aus Kunststoff (für den Keimträger)
- 5.3.2.23 Objektträger aus Mattglas**, Maße (15 × 60 × 1) mm, bei denen eine Fläche mit Sand abgestrahlt ist. Zur Vorbereitung wird der Glasträger 10 min in einem geeigneten Reinigungsmittel gekocht, mindestens dreimal mit Wasser und abschließend einmal mit Ethanol (70 % Volumenkonzentration) gespült. An einem Ende des getrockneten Glasträgers wird auf der abgestrahlten Fläche ein Quadrat von 10 mm Seitenlänge

⁵⁾ Vortex® ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.

etwa 2 mm von den drei Rändern entfernt markiert. Sterilisation im Heißluft-Sterisilator (5.3.2.1 b). Nach dem Sterilisationsprozess müssen die Kennzeichnungen für das „Beimpfungsquadrat“ deutlich sichtbar sein.



Legende

1 Beimpfungsquadrat

Bild 1 — Mattglasträger mit markiertem Prüffeld

5.4 Herstellung der Prüfor organismensuspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüfor organismensuspensionen (für Prüfung und Validierung)

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

Die Virussuspension sollte einen Mindesttiter von 10^8 TCID₅₀/ml – bestimmt durch einen Quantalversuch (5.5.2 a) oder durch einen Plaqueversuch (5.5.2 b) – aufweisen. In jedem Fall muss er hoch genug sein, um eine Titerabnahme um mindestens 4 lg Stufen zu ermöglichen, damit das Verfahren verifiziert werden kann.

In besonderen Fällen darf die Virussuspension durch geeignete Verfahren (z. B. Ultrazentrifugieren) konzentriert werden.

Die Prüfsuspension wird in kleinen Mengen und bei Temperaturen unter -70 °C oder vorzugsweise bei -196 °C unter Stickstoff aufbewahrt. Aus Sicherheitsgründen und – in einigen Fällen – zur Begrenzung einer möglichen Genmutation sind nur 10 Passagen aus dem ursprünglichen Aussaatvirus (z. B. Virus aus der Kulturensammlung) zulässig.

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

5.4.2 Produktprüflösung

Produktprüflösungen müssen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt werden, 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 bei ihrer Anwendung nicht verdünnt werden, müssen in Wasser (5.2.2.2) anstatt in Wasser standardisierter Härte hergestellt werden.

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand gelöst, indem mindestens $1\text{ g} \pm 10\text{ mg}$ des Produkts in einen Messkolben eingewogen werden und mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) aufgefüllt wird. Die folgenden Verdünnungen (d. h. niedrigeren Konzentrationen) müssen in Messkolben (5.3.2.9) auf der Basis von Volumenanteilen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) hergestellt werden.

Bei flüssigen Produkten müssen die Verdünnungen des Produkts mit Wasser standardisierter Härte auf der Basis von Volumenanteilen in Messkolben (5.3.2.9) hergestellt werden.

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

Die Prüfkonzentration ist als Konzentration Volumen je Volumen oder Masse je Volumen aufzuzeichnen wie auch die Einzelheiten der Produktprobe im Lieferzustand.

5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Versuchsbedingungen (Mindestbedingungen und zusätzliche Bedingungen)

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

a) Temperatur θ (in °C):

Die Prüftemperaturen sind in Abschnitt 4 festgelegt.

Die zulässige Grenzabweichung für jede gewählte Temperatur beträgt ± 1 °C.

b) Einwirkzeit t (in min):

Die zu prüfenden Einwirkzeiten sind in Abschnitt 4 festgelegt.

Die zulässige Grenzabweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt ± 10 s, außer bei 1 min oder weniger, wo sie ± 5 s beträgt.

c) Belastungssubstanz:

Die zu prüfende Belastungssubstanz ist 0,30 g/l Rinderserumalbuminlösung (5.2.2.8.2) bei Bedingungen niedriger Belastung oder bei Bedingungen hoher Belastung ein Gemisch von 3 ml/l Schaf-Erythrozyten und 3,0 g/l Rinderserumalbuminlösung (5.2.2.8.3), nach Abschnitt 4 und den praktischen Anwendungsbedingungen.

Zusätzliche Belastungssubstanzen dürfen entsprechend den spezifischen Anwendungsgebieten geprüft werden.

d) Prüforganismen:

Stämme müssen den Bestimmungen in Abschnitt 4, Tabelle 1 entsprechen.

Zusätzliche Stämme dürfen ausgewählt werden und müssen im Prüfbericht vermerkt werden (8.2).

e) Zelllinie(n):

Das modifizierte *Vacciniavirus* Ankara oder *Vacciniavirus*, Stamm Elstree wird in BHK-21-Zellen (ATCC CCL-10) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt. Das *Adenovirus* Typ 5 wird in HeLa-Zellen oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt. Das *murine Norovirus* wird in RAW 264.7-Zellen (ATCC TIB-71) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt. Das *murine Parvovirus* wird in A9-Zellen (ATCC CC-1.4) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt.

Zusätzliche Prüfviren dürfen getestet werden.

5.5.1.2 Allgemeine Anweisungen für Validierungs- und Kontrollverfahren

Im Falle von gebrauchsfertigen Produkten wird Wasser (5.2.2.2) anstelle von Wasser standardisierter Härte verwendet.

5.5.1.3 Temperaturangleichung

Alle Reagenzien [Produktprüflösungen (5.4.2), Prüfsuspension (5.4.1.4), Validierungssuspension (5.4.1.5), Verdünnungsmittel (5.2.2.4), Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) und Belastungssubstanz (5.2.2.8)] werden vor der Prüfung im auf θ eingestellten Wasserbad (5.3.2.2) auf die Prüftemperatur θ (5.5.1.1 a) eingestellt. Die Bestimmungen in Abschnitt 5.4.1.4 b) sind zu beachten. Die Stabilisierung der Temperatur der Reagenzien auf θ ist zu überprüfen.

Das Neutralisationsmedium (5.2.2.5) und das Wasser (5.2.2.2) müssen an eine Temperatur von $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ angeglichen werden.

Bei gebrauchsfertigen Produkten muss zusätzlich das Wasser (5.2.2.2) auf die Prüftemperatur θ eingestellt werden.

5.5.1.4 Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Prüforganismen

Der obere Teil der Innenseiten der Reagenzgläser darf beim Einfüllen der Prüf- oder Validierungssuspension (5.4.1) nicht berührt werden.

5.5.1.5 Beimpfung der Keimträger

- a) Die aseptisch zu verwendenden Träger in horizontaler Position werden in Petrischalen (5.3.2.10) positioniert. 1,0 ml Belastungssubstanz (5.2.2.8) wird in ein Röhrchen pipettiert. Es werden 9,0 ml Prüfsuspension N (5.4.1.4) zugegeben. Dieser Ansatz wird durchmischt (5.3.2.6) und 0,05 ml werden auf das „Beimpfungsquadrat“ eines Keimträgers (5.3.2.17) pipettiert und gleichmäßig über das Quadrat verteilt, z. B. mit der Spitze der Pipette. Die Petrischale nicht vollständig schließen. Den Impfansatz in der biologischen Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung bis zur sichtbaren Trocknung bei $18 ^\circ\text{C}$ bis $25 ^\circ\text{C}$ trocknen lassen, jedoch nicht länger als 60 min. Den Keimträger sofort nach Ende der Trocknungszeit verwenden.
- b) Die Trocknungszeit ist im Prüfbericht zu erfassen.

5.5.2 Verfahren

5.5.2.1 Prüfung „ N_a “ (Bestimmung der viruziden Konzentrationen) und Kontrollversuch mit Wasser „ N_W “

- a) 10 ml einer der Produktprüflösungen (5.4.2) werden in ein zylindrisches Röhrchen mit Schraubverschluss (5.3.2.15) pipettiert, das in einem auf die gewählte Prüftemperatur θ (5.5.1.1 a) eingestellten Wasserbad steht. Sofort nach Abschluss des Trocknungsprozesses wird ein beimpfter Keimträger (5.5.1.6 a) eingetaucht. Es ist sicherzustellen, dass das Beimpfungsquadrat vollständig mit der Produktprüflösung (5.4.2) bedeckt ist. Die Stoppuhr wird eingeschaltet und der Keimträger für die gewählte Einwirkzeit t (5.5.1.1 b) dort belassen.
- b) Nach Ablauf von t wird der Keimträger in ein zweites zylindrisches Röhrchen mit Schraubverschluss (5.3.2.15) überführt, das in einem auf $20 ^\circ\text{C}$ eingestellten Wasserbad steht und mit 5 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.10) und etwa 1 ml Glasperlen (5.3.2.14) gefüllt ist. Die Stoppuhr wird erneut gestartet und es wird 60 s durchmischt (5.3.2.6). Sofort nach der Elution wird von der entnommenen Virussuspension eine Verdünnungsreihe mit einem Faktor von zehn in eiskaltem Erhaltungsmedium (EMEM + 2 % FCS) hergestellt. Die Pipettenspitzen müssen nach jeder Verdünnung gewechselt werden, um ein Verschleppen von Viren zu vermeiden.

Die Zellkulturen werden mit den Verdünnungen beimpft. Nach dem Bebrüten wird der Virustiter bestimmt.

- c) Das Verfahren wird unter Verwendung der anderen Produktprüflösungen gleichzeitig durchgeführt.
- d) Kontrollversuch mit Wasser N_W : Das Verfahren wird durchgeführt, aber anstelle der Produktprüflösung werden 10 ml Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) oder – bei gebrauchsfertigen Produkten Wasser (5.2.2.2) – einpipettiert.
- e) Die Arbeitsgänge a) bis d) werden unter Verwendung der anderen zusätzlichen Untersuchungsbedingungen (5.5.1.1) durchgeführt.

Die Zellkulturen werden mit den Verdünnungen beimpft. Nach dem Bebrüten wird der Virustiter bestimmt.

Die Reduktion der Infektiosität der Viren wird aus den Differenzen der logarithmischen Virustiter der Wasserkontrolle N_W und nach der Behandlung mit dem Produkt N_a berechnet.

Nach der Behandlung mit dem Produkt wird die Infektiosität mit einem der folgenden Verfahren 5.5.2.2 oder 5.5.2.3 geprüft:

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

1) Virustitration auf Zellen in Suspension auf Mikrotiterplatten:

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

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

2) Virustitration auf einschichtigen Zelllagen auf Mikrotiterplatten:

0,1 ml jeder Verdünnung wird in sechs bis acht Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (5.3.1.14) übertragen, die eine konfluierende (>90 %) einschichtige Zelllage (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 auswechseln, wenn Medium zugesetzt wird.

Die Virussuspension in zehnfachen Verdünnungsschritten verdünnen, wobei jeweils 0,1 ml Virussuspension zu einer angemessenen Menge Erhaltungsmedium (EMEM + 2 % FCS) gegeben werden. Nach jeder Verdünnung muss die Pipette gewechselt werden.

0,1 ml jeder Verdünnung wird, beginnend mit der höchsten Verdünnung, in sechs oder acht Vertiefungen einer Mikrotiterplatte übertragen. 0,1 ml einer Zellkultursuspension wird in einer solchen Dichte hinzugefügt, dass die Bildung einer einschichtigen Zelllage (> 90 %) mindestens innerhalb von zwei Tagen in der Zellkontrollprobe möglich ist. In die letzte Reihe von sechs oder acht Vertiefungen darf keine Virussuspension gegeben werden, sie dient als Zellkontrollprobe.

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

5.5.2.3 Plaqueversuche

Vertiefungen in Untersuchungstabletts aus Kunststoff (Oberflächendurchmesser 30 mm bis 35 mm) mit konfluierenden einschichtigen Zelllagen werden einmal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (5.2.2.3) gewaschen und mit jeweils 0,2 ml der Verdünnungsreihen der Viren in EMEM + 2 % FCS beimpft. Im Allgemeinen werden sechs bis acht Vertiefungen je Verdünnung verwendet. Nach einer Adsorptionsdauer von 1 h bei 37 °C, in der die Einschicht-Zelllagen durch Neigen der Platten alle 8 min bis 10 min feucht gehalten werden, wird das Inokulum entfernt und die Zelllagen werden einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Vertiefungen mit 3 ml eines Gemischs aus 2 % verflüssigter Agarose oder einem sonstigen geeigneten halbfesten Medium und doppelt konzentriertem MEM mit 4 % FCS überschichtet. Die Kulturen werden für 5 bis 6 Tage bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank (5.1.2.12) bebrütet. Die Plaques können nach Zusatz von 2 ml einer zweiten Überschichtung mit der gleichen Zusammensetzung wie die erste, die ebenfalls 5 % Neutralrotlösung 1:1 000 enthält, und weiterer Bebrütung (im Dunkeln) bei 37 °C für 24 h bis 48 h in einem CO₂-Brutschrank (5.1.2.12) ausgezählt werden. Die Auszählung kann auch nach Zugabe von Kristallviolett erfolgen. Die Einschicht-Zellkulturen werden durch Zugabe von 2 ml Trichloressigsäure (TCA) 10 % (5.2.2.6) über die Agarüberschichtung für 10 min bis 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Agarüberschichtung wird dann entfernt und 2 ml Kristallviolett 0,1 % in 20%igem Ethanol werden zugegeben. Nach 10 min bis 15 min bei Raumtemperatur werden die Vertiefungen ausgiebig mit Wasser gespült und die Plaques (weiße Flecken) werden ausgezählt.

ANMERKUNG Als Alternative zum Plaqueversuch kann die Bestimmung mit CPE verwendet werden.

5.5.3 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität

5.5.3.1 Zytotoxische Wirkung

Zur Überprüfung einer möglichen morphologischen Veränderung der Zellstrukturen durch das Desinfektionsmittel werden 45 µl MEM mit 2 % FCS + 5 µl Belastungssubstanz gemischt. Mit dem Gemisch wird ein Träger beimpft, der anschließend im Exsikkator (6.6.3) getrocknet wird. Es werden 100 µl des Produkts (in den bei der Prüfung verwendeten Verdünnungen) hinzugeben und für 5 min bei Prüftemperatur inkubiert. Es wird mit 0,9 ml MEM + 0 % FCS 30 s auf dem Vortex gemischt. Verdünnungsreihen (Verdünnungsstufe: 1:10) werden in dem Kulturmedium hergestellt und die Zellkulturen (einlagige Zellschichten oder Zellsuspensionen) werden damit beimpft. Dies muss parallel zur Prüfung durchgeführt werden. Etwaige mikroskopische Veränderungen an den Zellen werden beim Ablesen der Prüfung auf Zytotoxizität (3 Scheiben) aufgezeichnet.

5.5.3.2 Interferenzkontrolle – Kontrolle der Zellsensibilität

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

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

Behandlung der Zellen:

- a) Einschicht-Zellkulturen: 0,1 ml der niedrigsten, offenbar nicht zytotoxischen Verdünnung (keine mikroskopisch erkennbare Veränderung) der Produktprüflösung (5.4.2) oder PBS (5.2.2.3) und 0,1 ml des Kulturmediums werden auf jede der 6 dargestellten Zellkulturen auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (5.3.2.14) aufgetragen. Nach Einwirkung für 1 h bei 37 °C wird der Überstand verworfen;
- b) Zellsuspensionen: 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 ist von 10^{-1} bis 10^{-10} zu verdünnen und wird auf den behandelten oder unbehandelten Zellen parallel zu 5.5.2 a) oder b) titriert.

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

- a) einen niedrigen Grad der Zellzerstörung ($< 25\%$ der Einschicht-Zellkultur) aufweisen;
- b) eine Reduktion des Virustiters um < 1 lg hervorrufen.

5.5.3.3 Elimination der Zytotoxizität

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

- a) Molekularsiebfiltration, d. h. Sephadex™ LH 20⁶⁾ (Anhang C);
- b) Ultrafiltration mit Minicon® (Millipore) oder Fertigsäulen, d. h. MicroSpin™ S 400 HR columns⁷⁾ (GE Healthcare) (Anhang C).

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 unbehandelten Suspension bestimmt. Die Verwendung erfolgt entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

5.5.4 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Desinfektionswirkung

5.5.4.1 Verdünnung in eisgekühltem Medium

Direkt nach der Zubereitung des Prüfgemisches (5.5.2) wird gemischt (5.3.2.6 a) und 0,5 ml des Prüfgemisches werden in 4,5 ml eiskaltes MEM + 2 % FCS (5.2.2.5) pipettiert. Es wird erneut gemischt und die Uhr wird gestartet. Die Mischung wird für $30 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ im Eisbad (5.3.2.11) bebrütet. Anschließend werden sofort Verdünnungen bis zu einem Faktor von 10^{-8} hergestellt und das Virus titriert (5.5.2 a) oder b) ist anzuwenden. Diese Kontrolle ist parallel zur Prüfung (5.5.2) durchzuführen.

Die Differenz des Titers zur Prüfsuspension muss $\leq 0,5$ lg sein.

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: Molekularsiebfiltration mittels Sephadex™ LH 20 oder Ultrafiltration mit Minicon® (Millipore) oder mit Fertigsäulen MicroSpin™ S 400 HR columns (Pharmacia Biotech) (Anhang C).

Die Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung des Desinfektionsmittels muss in diesen Fällen unter den gleichen Bedingungen, wie sie in 5.5.5.1 beschrieben werden, nach einer Bebrütung des Gemisches für $30 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ im Eisbad, erfolgen.

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

5.5.5 Referenz-Virusinaktivierungsprüfung

Eine Kontrolle des Prüfsystems muss unter Verwendung der Prüforganismen durchgeführt werden; 5.5.2 gilt als Referenz für Glutaraldehyd.

5.5.6 Titration der Viruskontrollprobe

Die Infektiosität der Virusprüfsuspension muss unter Prüfbedingungen, zu Beginn der Einwirkzeit und bei der in der Prüfung verwendeten maximalen Einwirkzeit bestimmt werden. Die Produktprüflösung (5.4.2) wird durch Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) ersetzt.

5.5.7 Titration der Untersuchungsproben

Es gilt 5.5.2 a) oder b)

5.6 Versuchsergebnisse und Berechnung

5.6.1 Protokollierung der Ergebnisse

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

Die Berechnung der geschätzten Virustiter muss mittels geeigneter Verfahren durchgeführt werden (Anhang D).

Die Reduktion des Virustiter wird aus den Differenzen der getrockneten Virustiter vor und nach der Behandlung mit dem Produkt berechnet.

Die Titer müssen mit ihren 95%igen Konfidenzintervallen berechnet werden, von denen der Reduktionsfaktor mit dem 95%igen Konfidenzintervall berechnet werden muss (Anhang D.3.2).

5.6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID₅₀ – PFU)

5.6.2.1 Allgemeines

Die Berechnung der geschätzten Viruskonzentration muss mittels geeigneter Verfahren durchgeführt werden (Anhang D). Die Titer müssen mit ihren 95%igen Konfidenzintervallen berechnet werden, von denen der Reduktionsfaktor mit dem 95%igen Konfidenzintervall berechnet werden muss (Anhang D).

5.6.2.2 Berechnung der TCID₅₀

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

5.6.2.3 Berechnung der PFU

Die Anzahl der plaquebildenden Einheiten je Milliliter (PFU/ml) sollte nach den in Anhang D.2 beschriebenen Prinzipien berechnet werden.

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

5.7 Verifizierung des Verfahrens

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

- a) die Virus-Prüfsuspension (5.4.1) hat eine $TCID_{50}$ 10^8 /ml oder mindestens eine Konzentration, die die Bestimmung einer Reduktion des Virustiters um 4 logarithmische Stufen erlaubt;
- b) die nachweisbare Reduktion des Virustiters beträgt mindestens 4 lg;
- c) die Differenz zwischen dem logarithmischen Titer der Viruskontrolle minus dem logarithmischen Titer des Prüfvirus in der Referenz-Inaktivierungsprüfung (5.5.5) beträgt ≥ 4 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) vergleichende Virustitration auf Zellkulturen, die mit Verdünnungen des Prüfgemischs behandelt wurden (oder ohne dieses, d. h. bei Zugabe von nur PBS), ergibt eine Differenz des Virustiters von < 1 lg.

5.8 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen

Überblick über die unterschiedlichen Suspensionen und Prüfgemische

- N_a steht für viruzides Prüfgemisch;
- N_W steht für das Prüfgemisch in der Wasserkontrolle.

5.9 Darstellung der Ergebnisse

5.9.1 Allgemeines

Alle Ergebnisse werden als Rohdaten tabelliert und zusätzlich als negative logarithmische Werte der $TCID_{50}$ 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 „ $\leq$ “ angegeben. Wenn eine Virenvermehrung in allen Verdünnungen beobachtet werden kann, wird der Wert mit dem vorangestellten Zeichen „ $\geq$ “ angegeben.

Ein Beispiel zur Darstellung der Prüfergebnisse ist in Anhang A angegeben.

5.9.2 Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten

Die Bewertung der Wirksamkeit der Desinfektionsmittelverdünnung wird durch Berechnung des Reduktionsfaktors durchgeführt. Der Reduktionsfaktor ist die Differenz zwischen dem Infektiositätstiter berechnet ohne Einwirkzeit auf das Desinfektionsmittel lg $TCID_{50}$ /ml oder lg der plaquebildenden Einheiten (PFU)/ml der Wasserkontrolle (5.5.7) und dem Infektiositätstiter berechnet nach der Einwirkzeit des Desinfektionsmittels (5.5.2) bei einer ausgewählten spezifischen Einwirkzeit.

Das Produkt ist als bestanden zu werten, wenn für es in einer validen Prüfung eine Keimreduktion um mindestens 4 logarithmische Stufen innerhalb einer ausgewählten spezifischen Einwirkzeit mit der gewählten Belastungssubstanz (Tabelle 1) unter den für diese Prüfung festgelegten Bedingungen nachgewiesen ist (5.5.2).

Die Berechnung des Konfidenzintervalls ist durchzuführen (Anhang D.3).