

DIN EN 17914



ICS 71.100.35

Einsprüche bis 2022-12-14

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden
Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in den
Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche
Einrichtungen –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17914:2022**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test method for the evaluation of virucidal activity of chemical
disinfectants and antiseptics in food, industrial, domestic and institutional areas –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German and English version prEN 17914:2022

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et
des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie,
dans les domaines domestiques et en collectivité –
Méthode d'essai et prescriptions (Phase 2/Étape 1);
Version allemande et anglaise prEN 17914:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-10-14 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 oder Am DIN-Platz, 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 79 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17914:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-08-04 AA „Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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

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

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)

Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test method for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics in food, industrial, domestic and institutional areas – Test method and requirements (phase 2, step 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité – Méthode d'essai et prescriptions (Phase 2/Étape 1)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Anforderungen	8
5 Prüfverfahren	10
5.1 Kurzbeschreibung	10
5.2 Materialien und Reagenzien, inklusive Zellkulturen	11
5.2.1 Prüforganismen	11
5.2.2 Kulturmedien, Reagenzien und Zellkulturen	11
5.3 Apparate und Glasgeräte	15
5.3.1 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte:	15
5.4 Herstellung der Prüforganismensuspensionen und der Produktprüflösungen	16
5.4.1 Prüforganismensuspensionen (Virusprüfsuspension)	16
5.4.2 Produktprüfsuspensionen	17
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts	17
5.5.1 Allgemeines	17
5.5.2 Prüfverfahren	19
5.5.3 Modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte	20
5.5.4 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität	20
5.5.5 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Produkts	22
5.5.6 Referenz-Virusinaktivierungsprüfung	22
5.5.7 Titration der Viruskontrollprobe	22
5.5.8 Titration der Untersuchungsproben	22
5.6 Versuchsergebnisse und Berechnung	23
5.6.1 Protokollierung der Ergebnisse	23
5.6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID ₅₀ bzw. PFU)	23
5.7 Verifizierung des Verfahrens	23
5.8 Darstellung der Ergebnisse	24
5.8.1 Allgemeines	24
5.8.2 Berechnung der begrenzten viruziden Wirksamkeit von Produkten	24
5.8.3 Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten	24
5.8.4 Berechnung der begrenzten viruziden Wirksamkeit	25
5.9 Prüfbericht	25
Anhang A (informativ) Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebfiltration	28
A.1 Molekularsiebfiltration mit Sephadex™ LH 20	28
A.1.1 Kurzbeschreibung	28
A.1.2 Sephadex-Suspension	28
A.1.3 Verfahren	28
A.2 Molekulares Sieben mit MicroSpin™ S 400 HR	30
A.3 Bestimmung des „Restvirus“-Titers mit der Large-Volume-Plating-Methode (LVP-Methode)	30
A.3.1 Allgemeines	30
A.3.2 Beispiel für die Berechnung von Titern und der Reduktion nach der Large-Volume-Plating-Methode	31
Anhang B (informativ) Berechnung des viralen Infektiositätstiters	33
B.1 Quantalversuche — Beispiel einer Bestimmung der TCID ₅₀ nach dem Spearman-Kärber-Verfahren	33
B.2 Plaque-Untersuchungen	33

B.3	Biometrische Bewertung von experimentellen Annäherungen und Beurteilung der desinfizierenden Wirkung auf den Virus (Reduktionsfaktor [R])	34
B.3.1	Allgemeines	34
B.3.2	Berechnung des Virustiters	34
B.3.3	Berechnung des Reduktionsfaktors	35
B.3.4	Praktische Beispiele	35
Anhang C (informativ)	Darstellung der Prüfergebnisse einer wirksamen Konzentration	37
Literaturhinweise		39

Bilder

Bild A.1	Gerät zum molekularen Sieben mit Spritze	29
Bild A.2	MicroSpin™ S 400 HR zur Reinigung von Virenproben	30

Tabellen

Tabelle 1	Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen	9
Tabelle 2	Geforderte chemische und physikalische Parameter	15
Tabelle 3	Grenzen für Referenzsubstanzen	23
Tabelle C.1	Beispiel von Titrationsergebnissen	33
Tabelle C.2	a) Rohdaten für ein Beispiel von Titrationsergebnissen — Vorher (Virustiterkontrolle = a)	35
Tabelle C.3	b) Rohdaten für ein Beispiel von Titrationsergebnissen — Nach Produktzugabe (Restvirus = b)	36
Tabelle C.1	Tabelle der Ergebnisse des Produkts XYZ und Adenovirus unter Bedingungen hoher Belastung	37
Tabelle C.2	Rohdaten für Produkt XYZ mit 0,3 g/l BSA in der Prüfung gegen Adenovirus (Quantalversuch; z. B. 8 Vertiefungen)	38

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17914:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Dieses Dokument beschreibt einen Suspensionsversuch zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder ein Antiseptikum in dem/den im Anwendungsbereich beschriebenen Bereich und Gebieten eine viruzide Wirkung aufweist.

Dieser Laboratoriumsversuch berücksichtigt praktische Anwendungsbedingungen des Produkts, zu denen die Einwirkzeit, die Temperatur, die Prüforganismen und die Belastungssubstanzen gehören, d. h. Bedingungen, die dessen Wirkung in praktischen Situationen beeinflussen können. Jede durch diese Prüfung ermittelte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht den gewählten Versuchsbedingungen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die viruzide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte als homogene, physikalisch stabile Zubereitung vorliegen, bzw. bei gebrauchsfertigen Produkten, z. B. Produkte, die bei der Anwendung nicht mit Wasser verdünnt werden. Die Produkte können nur bei einer Konzentration von 80 % (97 % bei einem modifizierten Verfahren für Sonderfälle) geprüft werden, da durch Zugabe der Prüfkeime und der Belastungssubstanz immer eine gewisse Verdünnung bewirkt wird.

Dieses Dokument gilt für Produkte, die in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen zur Handdesinfektion, hygienischen Händewaschung, Oberflächendesinfektion durch Abwischen, Besprühen, Überfluten oder auf sonstige Weise sowie für die Wäsche- und Gerätedesinfektion verwendet werden, mit Ausnahme von Bereichen und Bedingungen, wo eine Desinfektion aus medizinischen Gründen angezeigt ist.

Dieses Dokument gilt mindestens für den folgenden Anwendungsbereich:

a) Verarbeitung, Vertrieb und Verkauf von:

— Lebensmitteln tierischer Herkunft:

- Milch und Milchprodukte;
- Fleisch und Fleischprodukte;
- Fisch, Meerestiere und daraus hergestellte Erzeugnisse;
- Eier und Eiprodukte;
- Tiernahrung;
- usw.;

— Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft:

- Getränke;
- Früchte, Gemüse und daraus hergestellte Erzeugnisse (einschließlich Zucker, Destillationsprodukte usw.);
- Mehl, gemahlene und gebackene Produkte;
- Tiernahrung;
- usw.;

b) gewerbliche Einrichtungen und Haushaltsbereiche:

- Verpflegungseinrichtungen;
- öffentliche Bereiche;
- öffentliche Verkehrsmittel;
- Schulen;
- Kindergärten;

- Geschäfte;
- Sportstätten;
- Abfallbehälter (Mülltonnen usw.);
- Hotels;
- Wohngebäude;
- klinisch nicht relevante Bereiche von Krankenhäusern;
- Büroräume;
- usw.;

c) andere industrielle Bereiche als der Lebensmittelbereich:

- Verpackungsmaterial;
- Biotechnologie (Hefe, Proteine, Enzyme usw.);
- Hersteller von Pharmazeutika;
- Hersteller von Kosmetika und Toilettenartikeln;
- Hersteller von Textilien;
- Weltraumforschungsindustrie und Computerindustrie;
- usw.

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

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

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

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

3 Begriffe

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

3.1

Zytotoxizität

morphologische Veränderung von Zellen und/oder ihre Zerstörung oder die Reduktion ihrer Empfindlichkeit gegenüber einer Virusmultiplikation, die durch das Produkt verursacht wird

3.2

plaquebildende Einheiten

PFU, en: plaque forming units

Anzahl der infektiösen Viruspartikel je Volumeneinheit (ml)

3.3

Referenz-Inaktivierungsprüfung von Viren

Prüfung mit einem festgelegten Produkt (z. B. Glutaraldehyd) parallel mit einem zu prüfenden Produkt zur internen Kontrolle der Prüfung

3.4

TCID₅₀

50 %-Infektionsdosis einer Virussuspension oder der Verdünnung der Virussuspension, die in 50 % der Zellkultureinheiten eine virale zytopathische Wirkung (CPE) (3.5) auslöst

3.5

virale zytopathische Wirkung

CPE, en: viral cytopathic effect

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

3.6

Virusplaque

Bereich der in einer Einschicht-Zellkultur unter einem halbfesten Medium aufgetretenen Zellauflösung (Lysis) durch die Infektion mit einem einzigen infektiösen Viruspartikel und dessen Vermehrung

3.7

Virustiter

Menge der in einem Zellkulturlysate oder in einer Lösung je Volumeneinheit vorhandenen infektiösen Viren

3.8

viruzide Wirksamkeit

Fähigkeit eines Produkts zur Verringerung der Anzahl infektiöser Viruspartikel des Adenovirus und des murinen Norovirus für hygienische Händedesinfektion und Händewaschung, zur Oberflächendesinfektion in anderen Bereichen als der Lebensmittelverarbeitung, dem Vertrieb und dem Einzelhandel, des murinen Norovirus für Bereiche der Lebensmittelverarbeitung, des Vertriebs und des Einzelhandels und des murinen Parvovirus zur Verwendung bei einer Temperatur von > 40 °C

3.9

begrenzte viruzide Wirksamkeit

Fähigkeit eines Produkts zur Verringerung der Anzahl infektiöser Viruspartikel aller umhüllten Viren (Anhang A) sowie des Norovirus, Rotavirus und Adenovirus für hygienische Händedesinfektion und Händewaschung

3.10

begrenzte viruzide Wirksamkeit

Fähigkeit eines Produkts zur Verringerung der Anzahl infektiöser Viruspartikel des Vacciniavirus, wobei die Aktivität gegen alle umhüllten Viren abgedeckt ist

4 Anforderungen

Bei Prüfung in Übereinstimmung mit Tabelle 1 und Abschnitt 5, muss für das Produkt eine dezimal-logarithmische Reduktion (lg) um mindestens vier Stufen des Virustiters nachgewiesen werden.

Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Hygienische Händedesinfektion und Händewaschung	Oberflächen-desinfektion in Industriebereichen, in Bereichen der Lebensmittelverarbeitung, des Vertriebs und des Einzelhandels	Oberflächen-desinfektion in gewerblichen Einrichtungen und Haushaltsbereichen;	Wäschedesinfektion
Mindestspektrum von Prüforganismen	Begrenzte viruzide Wirksamkeit <i>Adenovirus</i> <i>Murines Norovirus</i> Begrenzte viruzide Wirksamkeit <i>Vacciniavirus</i>	Viruzide Wirksamkeit für die biopharmazeutische Industrie <i>Murines Parvovirus</i> Viruzide Wirksamkeit für industrielle Bereiche außer der biopharmazeutischen und Lebensmittel-industrie <i>Adenovirus</i> <i>Murines Norovirus</i> Viruzide Wirksamkeit für die Lebensmittel-industrie <i>Murines Norovirus</i> Begrenzte viruzide Wirksamkeit <i>Vacciniavirus</i> Viruzide Wirksamkeit <i>Murines Parvovirus bei Temperaturen > 40 °C</i>	Viruzide Wirksamkeit für die Anwendung in gewerblichen Einrichtungen und im Haushalt <i>Adenovirus</i> <i>Murines Norovirus</i> Begrenzte viruzide Wirksamkeit <i>Vacciniavirus</i>	Viruzide Wirksamkeit für die Anwendung in gewerblichen Einrichtungen und im Haushalt <i>Adenovirus</i> <i>Murines Norovirus</i> Begrenzte viruzide Wirksamkeit <i>Vacciniavirus</i> Viruzide Wirksamkeit <i>Murines Parvovirus bei Temperaturen > 40 °C</i>
zusätzlich:	Jeder zutreffende Prüforganismus			
Prüftemperatur	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber bei/zwischen			
	20 °C	4 °C und ≤ 40 °C	4 °C und ≤ 40 °C	10 °C und 70 °C für einen Hauptwaschzyklus 10 °C und 20 °C für einen Spülzyklus
Einwirkzeit	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber			
	aber zwischen 30 s und 60 s 30 s und 120s für eine hohe viruzide Wirksamkeit	60 min	aber nicht länger als 60 min	aber nicht länger als 60 min für einen Waschzyklus 20 min für einen Spülzyklus
Belastungssubstanz				

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Prüf- bedingungen	Hygienische Händedesinfektion und Händewaschung	Oberflächen- desinfektion in Industriebereichen, in Bereichen der Lebensmittel- verarbeitung, des Vertriebs und des Einzelhandels	Oberflächen- desinfektion in gewerblichen Einrichtungen und Haushaltsbereichen;	Wäschedesinfektion
niedrige Belastung	0,3 g/l Rinderserum- albuminlösung (hygienische Händedesinfektion)	0,3 g/l Rinderserum- albuminlösung und/oder	0,3 g/l Rinderserum- albuminlösung und/oder	0,3 g/l Rinderserum- albuminlösung (Spülzyklus) 3,0 g/l Rinderserum- albuminlösung (Waschzyklus)
hohe Belastung	3,0 g/l Rinderserum- albuminlösung (hygienische Händedesinfektion)	3,0 g/l Rinderserum- albuminlösung	3,0 g/l Rinderserum- albuminlösung	
Zusätzliche Belastung	niedrige oder hohe Belastung; jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Einer Prüfsuspension von Viren in einer Lösung einer Belastungssubstanz wird eine Probe des Produkts im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (oder Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten) verdünnten Produkts zugegeben. Das Gemisch wird bei einer der in Abschnitt 4, Tabelle 1 und 5.5.1.1 festgelegten Temperaturen und Einwirkzeiten gehalten. Nach dem Ende dieser Einwirkzeit wird ein aliquoter Anteil entnommen; die viruzide Wirkung in dieser Probenmenge wird sofort nach einem validierten Verfahren unterdrückt (Verdünnung der Probe in eisgekühltem Zellerhaltungsmedium). Die Verdünnungen werden in Zellkulturgefäße (Petrischalen, Röhrchen oder die Vertiefungen von Mikrotiterplatten) übertragen, entweder unter Verwendung von einschichtigen Zellschichten oder von Zellsuspensionen. Infektiositätsprüfungen werden entweder als Plaqueversuch oder als Quantalversuche durchgeführt. Nach der Bebrütung wird der Infektiositätstiter nach Spearman-Kärber (Quantalversuch, C.1) oder durch Plaque-Zählung (Plaque-Untersuchung, C.2) berechnet und bewertet. Die Reduktion der Infektiosität der Viren wird aus den Differenzen der logarithmischen Virustiter vor (Viruskontrolle) und nach der Behandlung mit dem Produkt berechnet.

ANMERKUNG Handwaschprodukte werden immer mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) vorverdünnt; die sich ergebende Lösung wird als gebrauchsfertiges Produkt (5.4.2) angesehen.

5.1.2 Die Prüfung wird unter Verwendung der in Abschnitt 4, Tabelle 1 angegebenen Prüforganismen durchgeführt.

5.1.3 Andere Einwirkzeiten und Temperaturen können innerhalb bestimmter in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegter Grenzen verwendet werden. Zusätzliche Belastungssubstanzen und Prüforganismen dürfen verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien, inklusive Zellkulturen

5.2.1 Prüforganismen

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

a) Hüllenloses RNA-Virus²:

- 1) *Murines Norovirus*, Stamm S99 Berlin;

b) Hüllenloses DNA-Virus:

- 1) *Adenovirus* Typ 5, Stamm Adenoid 75, ATCC VR-5;
- 2) *Murines Parvovirus*, Minute Virus of Mice (MVM), Stamm Crawford, ATCC VR-1346;

c) Behüllter DNA Virus:

- 1) *Modifizierter Vacciniavirus*, Stamm Ankara (MVA), ATCC VR-1508.

Die geforderte Bebrütungstemperatur für diese Prüfkeime beträgt $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.1.3). Die gleiche Temperatur (entweder 36°C oder 37°C) ist für alle Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung anzuwenden.

Wenn zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, sind diese unter den im Prüfbericht vermerkten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien) aufzubewahren und zu verwenden. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüforganismen 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 Prüforganismen wirken.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien handelsüblich erhältliche Materialien verwendet werden, wenn sie 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.

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

2 Das Murine Norovirus kann vom Friedrich-Loeffler-Institut „Bundesforschungsinstitut“ für Tiergesundheit, Hauptsitz Insel Riems Südufer 10, 17493, Greifswald-Insel Riems (Tel.: +49 38351 7-0, Fax: +49 038351 7-121 bezogen werden. <http://www.fli.bund.de>.

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 [5.3.1.1 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, 12-fach 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)	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 ein Filter mit der Porengröße 0,40 µm filtriert 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 %-Lösung) (TCA)

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

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

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

- Herstellung von Lösung A: Es werden 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.1.7) oder im Autoklaven [5.3.1.1 a)]. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall ist mit Wasser (5.2.2.2) unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lösung im Kühlschrank (5.3.1.8) nicht länger als einen Monat lagern.
- Herstellung Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.1.7) sterilisiert. Die Lösung im Kühlschrank (5.3.1.8) nicht länger als eine Woche lagern.
- 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) werden in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.1.12) gegeben, dazu gegeben werden 6,0 ml (5.3.1.9) Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B. Nach Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen

(5.3.1.4). Falls erforderlich, wird der pH-Wert (5.3.1.4) mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt.

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

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

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Allgemeines

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

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem 10-Fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht (dem 50-Fachen im Falle des modifizierten Verfahrens, 5.2.2.8.4).

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

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

5.2.2.8.2 Bedingungen niedriger Belastung (Rinderserumalbuminlösung — geringe Konzentration)

In 100 ml Wasser (5.2.2.2) Endvolumen werden 0,30 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.1.7), die Lösung wird in einem Kühlschrank (5.3.1.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verbraucht.

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

5.2.2.8.3 Bedingungen hoher Belastung (Rinderserumalbuminlösung — hohe Konzentration)

In 100 ml Wasser (5.2.2.2) Endvolumen werden 3,00 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.1.7), die Lösung wird in einem Kühlschrank (5.3.1.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verbraucht.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins in dem Prüfverfahren (5.5) muss 3 g/l betragen.

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

Die Verfahrensweisen zum Herstellen nach 5.2.2.8.2 und 5.2.2.8.3 werden eingehalten, die Belastungssubstanz wird jedoch in einer fünffach höheren Konzentration hergestellt, für die Bedingungen hoher Belastung höchstens 50 ml, um Probleme bei der Filtration zu vermeiden.

- a) Bedingungen niedriger Belastung (5.2.2.8.2) — 1,50 g Rinderserumalbumin (anstelle von 0,3 g) werden in 100 ml Wasser (5.2.2.2) Endvolumen gelöst;

- b) Bedingungen hoher Belastung (5.2.2.8.3) — 7,5 g Rinderserumalbumin (anstelle von 1,5 g) werden in 50 ml Wasser (5.2.2.2) Endvolumen gelöst.

5.2.2.8.5 Milch (für Molkereibetriebe)

Magermilch, die garantiert frei von Antibiotika und Zusatzstoffen ist, muss wie folgt hergestellt werden:

- Es wird eine Lösung von 100 g Milchpulver in 1 000 ml Wasser (5.2.2.2) hergestellt.
- Es wird eine Lösung von 10,0 % (V/V) in Wasser (5.2.2.2) durch Zugabe von 10 Teilen rekonstituierter Milch zu 90 Teilen Wasser hergestellt. Es wird 30 min bei $(105 \pm 3)^\circ\text{C}$ [oder 5 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$] erhitzt.
- Für das modifizierte Verfahren (5.5.3) wird eine Lösung von 50,0 % (V/V) in Wasser (5.2.2.2) durch Zugabe von 50 Teilen rekonstituierter Milch zu 50 Teilen Wasser hergestellt. Es wird 30 min bei $(105 \pm 3)^\circ\text{C}$ [oder 5 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$] erhitzt.

Die Endkonzentration der rekonstituierten Milch in dem Prüfverfahren (5.5) beträgt 10,0 g/l.

Milch (entspricht 1,0 g/l des Milchpulvers).

5.2.2.9 Medium für Zellkulturen

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

- a) Ein *Wachstumsmedium* für die Zellvermehrung wird 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 Literaturhinweis [2]. Siehe EN 12353 für eine detaillierte Beschreibung.

5.2.2.10 Zellkulturen

Zellkulturen können als Einschicht-Zellkulturen oder in Suspensionen für Quantalversuche verwendet werden. Einschicht-Zellkulturen müssen vor der Beimpfung zu > 90 % zusammengewachsen (konfluierend) sein. Die Zellen für eine Virustitration müssen, wenn sie als Suspensionen in Quantalversuchen verwendet werden, den Verdünnungen des Prüfgemischs (5.5.2) in einer solchen Dichte hinzugefügt werden, dass die Bildung einer einschichtigen Zellschicht (monolayer) in der Zellkontrollprobe mindestens innerhalb von zwei Tagen möglich ist.

Zelllinien werden entsprechend ihrer Sensibilität gegenüber den Prüforganismen (5.2.1) ausgewählt. Für weitere Details zu den Zelllinien siehe 5.5.1.1 e).

5.2.2.11 Referenz Glutaraldehyd (Glutaral, 1,5-Pentanedial) CAS-Nummer 111-30-8

Die geforderten chemischen und physikalischen Parameter zur Verwendung als Referenzstandard für die Prüfung von Desinfektionsmittelzubereitungen sind in Tabelle 2 festgelegt.

Tabelle 2 — Geforderte chemische und physikalische Parameter

Parameter	Festlegungen	
	50%ige Lösung	25%ige Lösung
Aussehen ^a	durchsichtige Flüssigkeit	durchsichtige Flüssigkeit
pH-Wert	3,1 bis 4,5	3,1 bis 4,5
Konzentration von Glutaraldehyd (durch Titration)	50,0 % bis 52,0 %	25,0 % bis 26,0 %
Stabilität (Umgebungsbedingungen)	12 Monate	12 Monate
^a Anmerkung: Eine gelbliche Farbe zeigt eine beginnende Polymerisierung an.		

Die vorstehend angegebenen Festlegungen (siehe Tabelle 2) sollten auf dem Analysenzertifikat überprüft werden. Die pH-Werte müssen regelmäßig vom Labor geprüft und bestätigt werden. Wenn der pH-Wert und/oder das Aussehen außerhalb der Festlegung liegen, kann das Glutardialdehyd nicht mehr verwendet werden.

5.3 Apparate und Glasgeräte

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

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

5.3.1 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung³ und insbesondere folgende Geräte:

5.3.1.1 Geräte zur Sterilisation (feuchte und trockene Hitze)

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

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

5.3.1.3 CO₂-Brutschrank (95 % Luft, 5 % CO₂), einstellbar entweder auf $(36 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ (5.2.1).

5.3.1.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei $(20 \pm 1)^{\circ}\text{C}$.

5.3.1.5 Stoppuhr.

5.3.1.6 Schüttelgeräte.

3 Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

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

5.3.1.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem Material, das mit den zu filtrierenden Substanzen verträglich ist, mit einem Filterhalter von mindestens 50 ml Nutzvolumen und geeignet zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von 0,22 µm für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7), Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2, 5.2.2.8.3 und 5.2.2.8.4).

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

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

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

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

5.3.1.11 Becken als Eisbad mit Eis und Wasser.

5.3.1.12 Messkolben.

5.3.1.13 Zentrifuge (400 g_N bis 1000 g_N).

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

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

5.3.1.16 Umkehr-Mikroskop zum mikroskopischen Betrachten der Zellkulturen.

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

5.3.1.18 Biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II.

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

5.4 Herstellung der Prüforganismensuspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüforganismensuspensionen (Virusprüfsuspension)

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

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

Es wird vorgeschlagen, dass die Virussuspension einen Mindesttiter von 10⁸ TCID₅₀/ml — bestimmt durch einen Quantalversuch [5.5.2 a)] oder durch einen Plaqueversuch [5.5.2 b)] — aufweist. In jedem Fall muss er

⁴ Vortex[®] 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.

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 Kultursammlung) zulässig.

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

5.4.2 Produktprüfsuspensionen

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

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

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

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand gelöst, indem mindestens $1,0\text{ g} \pm 10\text{ mg}$ 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 (5.3.1.12) auf der Basis von Volumenanteilen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) herzustellen.

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

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

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

5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der viruziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Versuchsbedingungen

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

- a) Temperatur, θ (in °C): Die Prüftemperaturen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt.

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

- b) Einwirkzeit, t (in min):

Die zu prüfenden Einwirkzeiten sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt.

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

- c) Belastungssubstanz:

Die zu prüfende Belastungssubstanz ist entweder

0,30 g/l Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2) bei Bedingungen niedriger Belastung

oder

3,0 g/l Rinderserumalbumin (5.2.2.8.3) bei Bedingungen hoher Belastung.

Nach Abschnitt 4, Tabelle 1 und praktische Anwendungsbedingungen. Zusätzliche Belastungssubstanzen dürfen entsprechend den spezifischen Anwendungsgebieten wie Milch (5.2.2.8.5) für Molkereibetriebe geprüft werden.

- d) Prüforganismen

Die Prüforganismen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 und 5.2.1 festgelegt. Zusätzliche Prüforganismen dürfen getestet werden.

- e) Zelllinie(n):

Adenovirus wird in HeLa- oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt.

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

Parvovirus wird in A9-Zellen (ATCC CCL-1.4) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt.

Modifiziertes Vacciniavirus Ankara wird in BHK-21-Zellen (ATCC CCL-10) oder anderen Zelllinien mit einer geeigneten Sensibilität vermehrt.

5.5.1.2 Herstellung

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

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

5.5.1.3 Besondere Angaben für gebrauchsfertige Produkte

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

5.5.1.4 Temperaturangleichung

Alle Reagenzien [Produktprüflösungen (5.4.2), PBS (5.2.2.3), Zellkulturen (5.2.2.11), Wasser (5.2.2.2), Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) und Belastungssubstanz (5.2.2.8)] werden vor der Prüfung im auf θ eingestellten Wasserbad (5.3.1.2) auf die Prüftemperatur θ [5.5.1.1 a)] eingestellt. Die Stabilisierung der Temperatur der Reagenzien auf θ wird überprüft. Die Prüfsuspension (5.4.1) wird im Eisbad (5.3.1.11) aufbewahrt, um einen Titerverlust zu vermeiden.

Wasser (5.2.2.2) ist auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ einzustellen.

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

5.5.2 Prüfverfahren

1 ml Belastungssubstanz (5.2.2.8) wird in einen Behälter pipettiert, dessen Volumen für die ausreichende Durchmischung geeignet ist. 1 ml Virusprüfsuspension (5.4.1) wird in den Behälter zugegeben; dabei wird sorgfältig darauf geachtet, dass der obere Teil der Innenseite nicht berührt wird. Es wird durchmischt [(5.3.1.6 a)]. 8 ml Produktprüflösung (5.4.2) werden in den Behälter zugegeben. Es wird durchmischt [(5.3.1.6 a)], die Stoppuhr sofort in Gang gesetzt und der Behälter in ein Wasserbad (5.3.1.2) gestellt, das kontrolliert auf die ausgewählte Prüftemperatur [5.5.1.1 a)] eingestellt ist. Die Wirkung des Produkts muss für die Einwirkzeit(en) nach Abschnitt 4, Tabelle 1 bestimmt werden. Sofort nach Ablauf der gewählten Einwirkzeit wird durchmischt [(5.3.1.6 a)] und 0,5 ml des Prüfgemischs werden in 4,5 ml eisgekühltes MEM [5.2.2.10 b)] pipettiert und in ein Eisbad (5.3.1.11) gestellt. Innerhalb von 30 min wird eine Verdünnungsreihe mit einem Faktor von zehn aus diesem Gemisch (Prüfmischung + MEM) erstellt. Die Pipettenspitzen sind nach jeder Verdünnung zu wechseln, um eine Virenverschleppung zu verhindern. Nach der Bebrütung wird der Virustiter berechnet, die Reduktion der Virusinfektiosität wird aus der Differenz der lg Virustiter vor (5.5.7) und nach der Behandlung mit dem Produkt bestimmt.

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

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

1) Virustitration auf Zellen in Suspension auf Mikrotiterplatten:

0,1 ml jeder Verdünnungsstufe werden, 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) werden in einer solchen Dichte hinzugefügt, dass die Bildung einer einschichtigen Zellschicht (> 90 %) mindestens innerhalb von 2 Tagen in der Zellkontrollprobe möglich ist. Parallel dazu dienen sechs oder acht Vertiefungen als Zellkontrollprobe und erhalten keine Virussuspension.

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

2) Virustitration auf einschichtigen Zellschichten auf Mikrotiterplatten:

0,1 ml jeder Verdünnung werden in sechs bis acht Vertiefungen einer Mikrotiterplatte (5.3.1.14) übertragen, die eine konfluierende (> 90 %) einschichtige Zellschicht (5.2.2.11) ohne Medium enthalten. In die letzte Reihe von sechs oder acht Vertiefungen werden 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 werden ausgetauscht, wenn Medium zugesetzt wird.

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

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

b) Plaqueversuche

Vertiefungen in Untersuchungstabletts aus Kunststoff (Oberflächendurchmesser 30 mm bis 35 mm) mit konfluierenden einschichtigen Zellschichten (5.2.2.11) werden einmal mit PBS (5.2.2.3) gewaschen und mit 0,2 ml der Verdünnungsreihen der Viren mit Zellerhaltungsmedium [5.2.2.10 b)] beimpft. Im Allgemeinen werden drei Vertiefungen je Verdünnung verwendet. Nach einer Adsorptionsdauer von 1 h bei 37 °C, während der die Einschicht-Zellschichten durch Neigen der Platten alle 8 min bis 10 min feucht gehalten werden, wird das Inokulum entfernt und die Zellschichten werden einmal mit PBS (5.2.2.3) gewaschen. Anschließend werden die Vertiefungen mit 3 ml eines Gemischs aus verflüssigter Agarose oder einem sonstigen geeigneten halbfesten Medium und doppelt konzentriertem MEM mit 4 % FCS (5.2.2.5) überschichtet. Die Kulturen werden für 2 bis 3 Tage bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank (5.3.1.3) bebrütet.

Die Plaques können nach Zusatz einer zweiten Überschichtung mit der gleichen Zusammensetzung wie die erste, die ebenfalls 5 % Neutralrotlösung (5.2.2.4) 1 : 1 000 enthält, und weiterer Bebrütung (im Dunkeln) bei 37 °C für 24 h bis 48 h in einem CO₂-Brutschrank (5.3.1.3) ausgezählt werden (B.2).

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 (B.2).

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

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

5.5.3 Modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte

Gebrauchsfertigen Produkten dürfen nach dem nachfolgend beschriebenen modifizierten Prüfverfahren geprüft werden, wenn das geprüfte Produkt die Prüfung nach 5.5.2 nicht bestanden hat. Der Titer der Prüfsuspension muss mindestens 10⁸ TCID₅₀/ml betragen oder eine Konzentration aufweisen, die die Bestimmung einer 4 lg-Reduktion des Virustiters ermöglicht. Die Menge des zu verwendenden Produkts muss 9,7 ml betragen. Die Menge der zu verwendenden Virusprüfsuspension beträgt 0,1 ml und die Menge der Belastungssubstanz(en), Zubereitung in 5-fach höherer Konzentration (5.2.2.8.4), ist 0,2 ml.

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

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

5.5.4 Durch Produktlösungen verursachte Zytotoxizität

5.5.4.1 Zytotoxische Wirkung

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

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

5.5.4.2 Interferenzkontrolle — Kontrolle der Zellsensibilität

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

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

a) Behandlung der Zellen:

- 1) Einschicht-Zellkulturen: 0,1 ml der niedrigsten, offenbar nicht zytotoxischen Verdünnung (keine mikroskopisch erkennbare Veränderung) der Produktprüflösung (5.4.2) oder PBS (5.2.2.3) und 0,1 ml des Kulturmediums werden auf jede der 6 dargestellten Zellkulturen auf Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (5.3.1.14) aufgetragen; nach Einwirkung für 1 h bei 37 °C wird der Überstand verworfen;
- 2) Zellsuspensionen: ein Volumen der niedrigsten, offenbar nicht zytotoxischen Verdünnung des Produkts oder PBS (5.2.2.3) wird einem Volumen doppelt konzentrierter Zellsuspension zugegeben. Nach Einwirkung für 1 h bei 37 °C werden die Zellen abzentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert.

b) Vergleichende Virustitration:

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

- 1) einen niedrigen Grad der Zellzerstörung (< 25 % der Einschicht-Zellkultur) aufweisen; oder
- 2) eine Reduktion des Virentiters um < 1 lg hervorrufen.

5.5.4.3 Elimination der Zytotoxizität

Falls die Zytotoxizität so stark ist, dass die Reduktion der verbleibenden Infektiosität kleiner als die geforderten 4 lg TCID₅₀ ist und deshalb eine 4 lg-Reduktion nicht bestimmt werden kann, müssen spezielle Techniken verwendet werden, wie z. B.:

- a) Molekularsiebfiltration, d. h. Sephadex™ LH 20)⁵ (A.1);
- b) Ultrafiltration mit Minicon®⁵ (Millipore) oder Fertigsäulen, d. h. MicroSpin™ S 400 HR columns⁵ (GE Healthcare) (A.2);
- c) Bestimmung des „Restvirus“-Titters mit dem Large-Volume-Plating (LVP)-Methode (A.3). Dieses spezielle Verfahren kann nur durchgeführt werden, wenn das Prüfverfahren (5.5.2 oder 5.5.3) und deren zugehörigen Kontrollen (5.5.4 bis 5.5.7) durchgeführt wurden, und durch diese nachgewiesen ist, dass eine 4 log-Reduktion nicht bestimmt werden kann, aber das Verfahren wie in 5.7 a), b), d), e) verifiziert ist.

Die Anwendung erfolgt nach den Anweisungen des Herstellers.

Geeignete Kontrollen sind erforderlich, um nachzuweisen, dass das Verfahren die Infektiosität der Viren nicht reduziert.

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

5.5.5 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Produkts

5.5.5.1 Verdünnung in eisgekühltem Medium

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

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

0,5 ml des Gemischs werden in 4,0 ml eisgekühltes MEM + 2 % FCS (5.2.2.5) pipettiert. 0,5 ml Virusprüfsuspension (5.4.1) werden in den Behälter zugegeben; dabei ist sorgfältig darauf zu achten, dass der obere Teil der Innenseite nicht berührt wird. Es wird erneut durchmischt und die Stoppuhr in Gang gesetzt. Die Mischung wird für 30 min $\pm$ 10 s im Eisbad (5.3.1.11) bebrütet. Anschließend werden sofort 10-fach-Verdünnungen 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 Titors zur Prüfsuspension muss $\leq 0,5$ lg sein.

5.5.5.2 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 (GE Healthcare) (Anhang A).

5.5.6 Referenz-Virusinaktivierungsprüfung

Es muss eine Kontrolle des Prüfsystems unter Verwendung der Prüforganismen durchgeführt werden, wobei 5.5.2 mit Glutardialdehyd (5.2.2.12) als Referenz gilt (siehe Tabelle 3).

5.5.6.1 Überprüfung der Zytotoxizität der Glutaraldehydlösung

Es gilt 5.5.4 mit den folgenden Änderungen:

8 ml der Referenzsubstanz werden anstelle des Produkts verwendet.

5.5.7 Titration der Viruskontrollprobe

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

Es gilt 5.5.2 mit folgender Änderung:

Anstelle der Produktprüflösung werden 8 ml Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) oder 9,7 ml Wasser (5.2.2.2) bei gebrauchsfertigen Produkten zugegeben.

5.5.8 Titration der Untersuchungsproben

Es gilt 5.5.2 a) oder b).