

Quantitative Prüfung der viruziden Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel auf nicht-porösen Oberflächen

(Anwendung im Bereich Humanmedizin)

Inhalt

- 1 Einleitung
- 2 Testviren
- 3 Materialien
- 4 Carrier-Vorbereitung
- 5 Herstellung der
Testvirus-Suspensionen
- 6 Zellkultur zum Nachweis nicht
inaktivierter Viren (Wiederfindung
nach der Einwirkzeit (EWZ))
- 7 Herstellung der Produkt-Testlösung
- 8 Durchführung der Viruzidie-Prüfung
- 9 Kontroll- und Vergleichsversuche
- 10 Bestimmung der Infektiosität
der Virussuspensionen
- 11 Berechnung, Darstellung und
Bewertung der Ergebnisse
- 12 Prüfbericht
- 13 Literatur

1 Einleitung

Diese nationale Leitlinie orientiert sich am europäischen Entwurf der CEN/TC 216/WG 1 N 395rev. (Fassung Juni 2008) zur praxisnahen Prüfung viruzider Desinfektionsmittel für die Flächendesinfektion [CEN, 2008].

Die Leitlinie beschreibt die Durchführung der quantitativen Prüfung der viruziden Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel, die zur Anwendung auf nicht-porösen Oberflächen im medizinischen Bereich (z. B. in Krankenhäusern und anderen medizinischen und zahnmedizinischen Einrichtungen) vorgesehen sind. Die Versuche zur Viruzidie sind mit den Belastungen entsprechend den europäischen Normen im Testansatz durchzuführen. Eine ausreichende Reduktion der Infektiosität bestimmter Testviren (i. d. R. Titerreduktion um $4 \log_{10}$) lässt den Schluss zu, dass das Desinfektionsmittel unter den geprüften Bedingungen die mit dieser Prüfmethode nachweisbaren viruziden Eigenschaften besitzt.

Das Prüfverfahren simuliert die praktischen Verhältnisse für die Anwendung. Die gewählten Bedingungen (Einwirkungszeit, Konzentration, Temperatur u. a.) reflektieren praxisrelevante Gegebenheiten – einschließlich solcher Bedingungen, die die Wirkung von Desinfektionsmitteln beeinflussen können. Um methodisch bedingte Einflüsse auf die Tenazität (z. B. durch die verwendeten Zellen, Passagezahl, Zytotoxizität, verwendetes Testvirus) und damit auf die Prüfergebnisse zu vermeiden, ist eine geeignete Referenzsubstanz (in einer definierten Konzentration und Einwirkzeit) in jedem Testansatz mitzuführen (als interner Standard). Dieses Vorgehen ermöglicht

Anhang 1:
Hinweise zur Durchführung des
Infektiositätstests

Anhang 2:
Biometrische Auswertung der Versuchs-
ansätze und Beurteilung der virusinakti-
vierenden Wirkung

Anhang 3:
Angaben zu Reduktionsfaktoren
von Referenzsubstanzen

Anhang 4:
Tabellarische Darstellung
der Prüfungsergebnisse

Anhang 5:
Herstellung von Wasser
standardisierter Härte (WSH)

Autoren

Prof. Dr. Holger F. Rabenau*
Frau Dr. Ingeborg Schwebke*
Dr. Jochen Steinmann
Frau PD Dr. Maren Eggers
Frau Dr. Ingrid Rapp
Prof. Dr. Dieter Neumann-Haefelin
und die Mitglieder des Fachaus-
schuss Virusdesinfektion**

* korrespondierende Autoren
** weitere Mitglieder und Gäste in
alphabetischer Reihenfolge
PD Dr. J. Blümel
PD Dr. D. Glebe
PD Dr. F. von Rheinbaben
Prof. Dr. B. Ruf
Prof. Dr. A. Sauerbrei
Dr. H. Willkommen
Prof. Dr. M.H. Wolff
Prof. Dr. P. Wutzler

eine bessere Vergleichbarkeit von Prüfergebnissen bzw. Produkten.

In der vorliegenden Leitlinie finden auch biometrische Aspekte besondere Aufmerksamkeit. Damit soll sichergestellt werden, dass der ermittelte Reduktionsfaktor mit hoher Wahrscheinlichkeit die „wahre Wirksamkeit“ widerspiegelt. Aus den Ergebnissen der Prüfung können daher unter Berücksichtigung der Prüfbedingungen Anwendungsempfehlungen durch den Hersteller (bzw. Vertreiber) des Produkts für die getesteten Desinfektionsmittel abgeleitet werden.

In dieser Leitlinie werden die Begriffe „begrenzt viruzid“ (wirksam nur gegen behüllte Viren) und „viruzid“ (wirksam gegen unbehüllte Viren und behüllte Viren) im Sinne der Definition durch den Arbeitskreis „Viruzidie am RKI“ [RKI, 2004] verwendet.

2 Testviren

Es sind folgende Viren zu verwenden:

2.1 Wirkungsbereich „begrenzt viruzid“

- MVA (Modifiziertes Vacciniavirus Ankara¹, erhältlich über Prof. Sutter, LMU München) bzw. Vacciniavirus¹, Stamm Elstree

2.2 Wirkungsbereich „viruzid“

2.2.1 Viruzid (low level – d. h. ohne Enteroviren und Parvoviren)

- Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75 (ATCC VR-5)
- Murines Norovirus (MNV), Stamm S99 (erhältlich über das Friedrich-Löffler-Institut, www.fli.bund.de)
- MVA (Modifiziertes Vacciniavirus Ankara) bzw. Vacciniavirus, Stamm Elstree

2.2.2 Viruzid (high level – d. h. einschließlich Enteroviren und Parvoviren)

- Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75 (ATCC VR-5)
- Murines Norovirus (MNV), Stamm S99 (erhältlich über das Friedrich-Löffler-Institut, www.fli.bund.de)
- Murines Parvovirus (Minute Virus of Mice, MVM; ATCC VR-1346)

3 Materialien

- Edelstahl-Plättchen (Carrier), rund, Durchmesser 20 mm, Dicke 1,2–1,5 mm,

Edelstahl 1.4301 nach EN 10088-1. Die Oberfläche muss auf beiden Seiten eine Qualität 2B nach EN 10088-2 aufweisen (Bezugsquelle z. B. GK Formblech GmbH, D-12277 Berlin, Art-Nr. 4174-3000)

- Zylindrische Polypropylen Schraubverschlussgefäße² (für Aufbewahrung der Carrier während der Einwirkzeit), Volumen 20 ml (z. B. Länge 50 mm, Durchmesser 27 mm) (Bezugsquelle z. B. Sanowa Plasto-Form, In der Gerberswiese, 10, 69181 Leimen, www.sanowa.de, Bestellnummer: 810-020).
 - Autoklav oder Heißluftsterilisator
 - Schüttelgerät (z. B. Vortexer)
 - Zellkulturplatten (96 [ggf. 24-l-Loch-Mikrotiterplatten])
 - Pipetten, Verdrängungspipetten zur Dosierung alkoholischer Lösungen bzw. visköser Flüssigkeiten
 - CO₂-Brutschrank
 - Inversmikroskop
 - Sterile Pinzetten
 - Messkolben
 - Belastungssubstanzen
- Die Belastungssubstanzen müssen in 10-facher Konzentration, in der sie im Test eingesetzt werden, hergestellt werden.

► Geringe Belastung

0,3 g BSA (Cohn-Fraktion V) werden in 90 ml Aqua dest. in einen 100-ml-Messkolben gegeben. Danach wird bis zur 100 ml-Marke mit Aqua dest. aufgefüllt und anschließend mittels Membranfiltration sterilisiert. Die Endkonzentration des BSA im Prüfverfahren beträgt 0,3 g/l. Haltbarkeit der Lösung: 6 Monate bei -20 °C.

► Hohe Belastung

BSA und Schaf-Erythrozyten-Suspension
3 ml Schaf-Erythrozyten (siehe a) werden in 97 ml (3 % w/v) BSA-Lösung (siehe b) resuspendiert. Die Endkonzentration der Schaf-Erythrozyten und des BSA in dem

Prüfverfahren soll 3 ml/l bzw. 3 g/l betragen. Haltbarkeit der Suspension bis zu 7 Tagen bei 2–8 °C.

a) Schaf-Erythrozyten

Für die Bereitung der Schaf-Erythrozyten wird steriles defibriertes Schafblut, das kommerziell erhältlich ist oder nach DIN EN 14820 hergestellt wird, verwendet [DIN EN 14820, 2004]. Dazu werden mindestens 8 ml defibriertes Schafblut bei 800 g 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands werden die Erythrozyten in steriler Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) resuspendiert. Dieser Vorgang wird mindestens 3-mal wiederholt bis der Überstand farblos ist.

b) BSA-Suspension

3 g BSA (Cohn-Fraktion V) werden in 90 ml Aqua dest. in einen 100-ml-Messkolben gegeben. Danach wird bis zur 100 ml-Marke mit Aqua dest. aufgefüllt und anschließend mittels Membranfiltration sterilisiert. Die Endkonzentration des BSA in dem Prüfverfahren beträgt 3 g/l.

- Aqua dest.: steriles destilliertes oder demineralisiertes Wasser³

4 Carrier-Vorbereitung

Vor der Verwendung der Carrier sollten diese in einem Behälter mit einer entsprechenden Menge von 5 % (v/v) Decon 90^{®4} für 60 min (bei Raumtemperatur) eingelegt werden, ohne dass sie dabei aneinander kleben oder die Oberfläche beschädigt wird. Anschließend sind sie sofort gründlich mit Aqua dest. 2 × für je mindestens 10 s zu spülen, um eine vollständige Entfernung des Tensids zu gewährleisten. Die Carrier werden danach ohne zu trocknen für 15 min in 70 % (v/v) Ethanol eingelegt, 3 × je 10 s mit Aqua dest. gespült und nachfolgend sterilisiert (Dampf- oder Heißluftsterilisation). Die

¹ Aus Arbeitsschutzgründen wurde in der Leitlinie der DVV/RKI (Blümel et al., 2008) die Prüfung mit Vacciniavirus durch MVA ersetzt. Die Übergangszeit für die Prüfung mit Vacciniavirus endet vorerst am 1.9.2014. Sofern entsprechend geimpft Personal diesen Test durchführt, kann ggf. Vacciniavirus auch darüber hinaus eingesetzt werden.

² Bei der Auswahl der Gefäße ist zu beachten, dass der Carrier horizontal gelagert werden kann damit die aufgebrauchte Desinfektionsmittellösung vollständig auf dem Carrier verbleibt.

³ Die Spezifikationen für destilliertes Wasser werden gegenwärtig überarbeitet. In europäischen Normen wird die Freiheit von zelltoxischen Substanzen und die Destillation in einem Glasgefäß gefordert. Alternativ wird die Verwendung von Aqua ad iniectionabilia gemäß europäischem Arzneibuch empfohlen. Somit sollte, sofern kein steriles Glas-destilliertes Wasser verwendet wird, destilliertes oder demineralisiertes Wasser eingesetzt werden, dessen relevante Kennwerte wie Leitfähigkeit und TOC denen, in der jeweils aktuellen Europäischen Pharmakopöe für Aqua ad iniectionabilia angegebenen, entsprechen.

⁴ nur beispielhaft aufgeführt – auch andere Tenside können verwendet werden

Carrier dürfen nur mit der Pinzette gehandhabt und nur einmal verwendet werden.

5 Herstellung der Testvirus-Suspensionen

Die Methoden, die zur Herstellung der Testvirus-Suspension eingesetzt werden, können in Abhängigkeit vom Prüfvirus differieren. Die Viren sind in Zellkulturen zu vermehren. Hierfür können Zellen in Suspension oder adhärenente Zellen (Monolayer) verwendet werden. Der Virustiter sollte nicht weniger als 10^8 TCID₅₀/ml betragen. Dies kann u. a. wie folgt gewährleistet werden:

– Die mit dem Virus infizierten Kulturen können mit dem gesamten Medium und Zelldetritus mindestens einmal eingefroren und aufgetaut werden. Sofern keine ausreichend hohen Titer erzielt werden, kann anschließend die Virus-Suspension⁵, nach vorangegangener niedertouriger Zentrifugation, für 60 min bei $40.000 \times g$ und $+4^\circ\text{C}$ zentrifugiert werden, so dass sich die Viren im Bodensatz anreichern. Das Sediment wird in wenig PBS oder Zellkulturmedium resuspendiert und zur Entfernung von Zelldetritus ggf. erneut niedertourig zentrifugiert.

Der Virustiter darf auch niedriger als 10^8 TCID₅₀/ml sein, wenn gewährleistet ist, dass eine Titerreduktion von mindestens 4 log₁₀-Stufen bei der Desinfektionsmittelprüfung erzielt werden kann.

6 Zelllinien

Die einzusetzenden Zelllinien und Kulturmedien sind in Abhängigkeit vom jeweiligen Prüfvirus auszuwählen – es können Zellen in Suspension oder adhärenente Zellen (Monolayer) verwendet werden. Bei langen Inkubationszeiten ist die Verwendung von suspendierten Zellen empfehlenswert.

Die folgenden Zelllinien werden für die angegebenen Testviren empfohlen:

Testvirus	Zelllinie ⁶
Adenovirus Typ 5, Adenoid 75; ATCC VR-5	A549 (humane Lungenkarzinomzelllinie); ATCC CCL-185™
MNV, S99	RAW 264.7 (murine Makrophagenzelllinie); ATCC TIB-71™
MVM; ATCC VR-1346	A9 (murine L-Zelllinie); ATCC CRL-1811
MVA	BHK-21 (Baby-Hamster-Nieren-Zelllinie); ATCC CCL-10™

7 Herstellung der Produktprüflösung

Das zu prüfende Desinfektionsmittel wird in der vom Hersteller angegebenen Konzentration und in zwei weiteren Konzentrationen geprüft, wovon eine im nicht wirksamen Bereich liegen muss, um die Grenzen der Wirksamkeit zu ermitteln. Die Testkonzentrationen werden mit Wasser standardisierter Härte (WSH, s. Anhang 5) – unter Berücksichtigung der Herstellerangaben zur Erzeugung der Gebrauchsverdünnung – gefertigt. Das unverdünnte Produkt kann ebenfalls als Produktprüflösung verwendet werden, sofern es so angewendet werden soll. Präparate, die unverdünnt angewendet werden bzw. in gebrauchsfertiger Form in den Handel kommen, werden mit Aqua dest. verdünnt (zum Nachweis der Grenze der Wirksamkeit).

Zur Herstellung der höchsten zu prüfenden Konzentration der Prüflösung aus Feststoffen wird das Produkt (mindestens $1,0 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ des Produkts) in einem Messkolben mit WSH gelöst. Nachfolgende Verdünnungen für geringere Konzentrationen werden ebenfalls mittels Messkolben auf Volumen-Basis in WSH hergestellt.

Bei flüssigen Produkten werden die Verdünnungen des Produkts mit WSH bzw. Aqua dest. auf einer v/v-Basis hergestellt. Die Produktprüflösung sollte frisch zubereitet und innerhalb von 4 h in der Prüfung eingesetzt werden. Der pH-Wert der Anwendungslösung und des Konzentrates muss vor Versuchsbeginn dokumentiert werden. Dabei sollte es sich um eine physikalisch homogene Zubereitung handeln, die während des gesamten Verfahrens stabil ist. Wenn im Laufe des Verfahrens eine sichtbare Inhomogenität oder andere Veränderungen auftreten (z. B. aufgrund der Bildung von Präzipitaten oder Ausflockungen durch die Belastungssubstanzen), so ist dies im Prüfbericht zu dokumentieren. Die eingesetzten Konzentrationen des Produktes sind im Prüfbericht anzugeben.

8 Durchführung der Viruzidie-Prüfung

8.1 Prinzip des Tests

Das Virusinokulum (Testvirus-Suspension mit Belastungssubstanz), wird auf einen Carrier aufgetragen und getrocknet. Anschließend wird das zu prüfende Produkt

auf den getrockneten Film so aufgebracht, dass das gesamte Virusinokulum bedeckt wird. Der Carrier wird bei Raumtemperatur für einen definierten Zeitraum [(Einwirkzeit (EWZ))] inkubiert. Am Ende der gewählten EWZ wird der Carrier mit eiskaltem Zellkulturmedium (ohne FKS) bedeckt, damit die Wirkung des Desinfektionsmittels sofort neutralisiert wird. Dann erfolgt die Bestimmung des residualen Virustiters. Alle Versuche sind in zwei unabhängigen Ansätzen an unterschiedlichen Tagen mit jeweils 3 Carriern pro Ansatz durchzuführen.

8.2 Wahl der experimentellen Bedingungen

- Mindestens zwei EWZ sind zu prüfen. Um Produktvergleiche zu ermöglichen, werden 5 min EWZ geprüft. Zusätzlich ist eine weitere EWZ zu testen, die entsprechend dem Anwendungsbereich ausgewählt wird und ggf. der auszulobenden EWZ entspricht. Die geprüften Zeiten müssen im Prüfbericht angegeben werden (siehe Pkt. 12.1).
- Die Auswahl der Belastungssubstanz sollte entsprechend den Anwendungsbedingungen des Produktes erfolgen: Folgende Belastungssubstanzen können geprüft werden: BSA (geringe Belastung) und/oder BSA mit Schaf-Erythrozyten (hohe Belastung).
- Virusstämme: Die unter 2.1. bzw. 2.2 aufgeführten Stämme sind zu testen.
- Prüftemperatur: Die Versuche sollen bei Raumtemperatur ($22^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$) durchgeführt werden. Weitere Temperaturen können – gemäß den Angaben des Herstellers für die beabsichtigte Anwendung – geprüft werden. Die Temperatur muss im Prüfbericht angegeben werden (siehe Pkt. 12.1).

8.3 Vorbereitung zur Viruzidie-Prüfung

8.3.1 Herstellung des Virusinokulum

Zur Herstellung des Virusinokulum werden neun Volumenanteile der Testvirus-Suspension mit einem Volumen der jeweiligen Belastungssubstanz gemischt, z. B. 45 µl Testvirus-Suspension mit 5 µl BSA bzw. 5 µl BSA/Schaf-Erythrozyten, und kurz gevortext.

⁵ Ausnahme: Adenoviren dürfen nicht ultrazentrifugiert werden.

⁶ Quelle z.B. ATCC (www.atcc.org)

8.3.2 Weitere Vorbereitungen

Vor der Prüfung sind alle Lösungen mit Ausnahme der Testvirus-Suspension auf $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ zu bringen. Jeder Carrier ist aseptisch in einem Plastikgefäß (s. Pkt. 3) horizontal zu platzieren.

8.4 Testdurchführung

50 μl des Virusinokulums werden in die Mitte eines jeden Carrier pipettiert (Verteilung auf ca. dreiviertel der Carrieroberfläche mit der Pipettenspitze, um eine Trocknung in der angegebenen Zeit zu gewährleisten, s. Abbildung 1).

Abbildung 1:
Carrier mit
Virusinokulum
(getrocknet).



Danach werden die Carrier bis zur sichtbaren Trocknung (maximal 60 min) in der Sicherheitswerkbank bei laufendem Gebläse gelagert. Anschließend sind die Carrier nach frühestens 15 min und innerhalb von maximal 2 h nach Ablauf der Trocknungszeit zu verwenden (Lagerung in der Sicherheitswerkbank). Je Konzentration und Einwirkzeit sind 3 Carrier zu verwenden.

Das auf dem Carrier getrocknete Virusinokulum ist sorgfältig mit 100 μl Prüflösung zu bedecken. Während der EWZ wird das Gefäß nicht verschlossen. Unmittelbar nach der EWZ wird der Carrier mit 900 μl eiskaltem Zellkulturmedium (z. B. MEM) überschichtet und 1 min gevortext, um das Virusinokulum zu resuspendieren und die Wirkung des Präparates aufzuheben.

Anschließend ist eine Verdünnungsreihe in eiskaltem Zellkulturmedium anzulegen. Die Röhrchen der Verdünnungsreihe sind unmittelbar nach der Verdünnung in ein Eisbad ($0\text{--}4\text{ °C}$) zu stellen. Die Verdünnungen sind sofort auf Zellkulturen zu verimpfen (im Prüfbericht ist die Zeit zwischen dem Ende der Einwirkzeit und der Verimpfung auf die Zellen anzugeben – siehe Pkt. 12.1). Dabei ist eine mögliche Nachwirkung des Desinfektionsmittels auszuschließen (siehe Pkt. 9.1.3). Zur quantitativen Bestimmung der (Rest)Infektiosität ist Pkt. 10 zu beachten.

9 Kontroll- und Vergleichsversuche

9.1 Kontrollen im quantitativen Suspensionsversuch und im praxisnahen Carrierversuch

9.1.1 Viruskontrolle vor Antrocknung

50 μl Virusinokulum und 950 μl Medium ohne FKS werden gemischt. Nach Ablauf der maximalen Einwirkzeit sind Verdünnungsreihen in \log_{10} -Schritten anzulegen und der Titer (z. B. nach der Gleichung von Spearman und Kärber, siehe Anhang 2) zu bestimmen. Diese Kontrolle wird einerseits als Ausgangswert für die Ermittlung der Stabilität des Virus nach Antrocknung und andererseits für die Bewertung der Nachwirkungskontrolle benötigt.

9.1.2 Viruskontrolle nach Antrocknung

50 μl des Virusinokulums werden auf den Carrier gegeben und angetrocknet. Dann erfolgt die Zugabe von 100 μl WSH. Nach Ablauf der einzelnen gewählten EWZ werden 900 μl eiskaltes Medium ohne FKS zugegeben. Es sind Verdünnungsreihen anzulegen, und der Titer (z. B. nach der Gleichung von Spearman und Kärber, siehe Anhang 2) ist zu bestimmen. Diese Kontrolle wird für die Ermittlung des Reduktionsfaktors einer Prüfsubstanz benötigt.

9.1.3. Nachwirkungskontrolle

100 μl Prüfsubstanz (Testkonzentration) und 850 μl eiskaltes Medium ohne FKS werden gemischt. Dann werden 50 μl Virusinokulum zugegeben und der Ansatz für die Zeitphase zwischen Beendigung der EWZ des Desinfektionsmittels und Ansatz der Verdünnungsreihe zur Titration (siehe 8.4) im Eisbad inkubiert. Anschließend werden Verdünnungsreihen in \log_{10} -Schritten hergestellt und die Verdünnungen zu den Zellen gegeben. Der Titer ist z. B. nach der Gleichung von Spearman und Kärber (siehe Anhang 2) zu bestimmen. Die Differenz des ermittelten Titers der Nachwirkungskontrolle im Vergleich zur Viruskontrolle vor Antrocknung (siehe Pkt. 9.1.1) sollte $\leq 0,5 \log_{10}$ sein.

9.1.4 Interferenzkontrolle-Kontrolle der Zellsuszeptibilität

Mit der Interferenzkontrolle soll nachgewiesen werden, dass die Suszeptibilität der Zellen für die Virusinfektion durch die Behandlung mit dem Desinfektionsmittel nicht negativ beeinflusst wird.

Von der Produktprüflösung (Testkonzentration) wird eine Verdünnung hergestellt, die keine Zytotoxizität (siehe Pkt. 9.1.5) zeigt. Diese Mischung wird für 1 h analog der Art der Bestimmung der Infektiosität der Virus-suspensionen (siehe Anhang 1) mit der Zellkultur in Kontakt gebracht. Als Negativkontrolle werden parallel Zellkulturen in gleicher Weise mit PBS in Kontakt gebracht und unter gleichen Bedingungen für 1 h inkubiert. Nach der EWZ wird die Produktprüflösung bzw. PBS von der Zellkultur entfernt. Anschließend werden Verdünnungsreihen der Virussuspension (siehe Pkt. 8.4) angelegt und der Titer auf den vorbehandelten Zellen bestimmt. Die Differenz des Titers nach Behandlung mit PBS und Produktprüflösung sollte $\leq 0,5 \log_{10}$ sein.

9.1.5 Zytotoxizitätskontrolle

Anstelle des Virusinokulums werden 50 μl Medium ohne FKS auf den Carrier aufgetragen und getrocknet. Anschließend werden 100 μl der Produktprüflösung (Testkonzentration) auf den getrockneten Film so aufgebracht, dass das getrocknete Medium bedeckt wird. Der Carrier wird bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wird der Carrier mit 900 μl eiskaltem Medium (ohne FKS) überschichtet. Wie bei der Bestimmung der Virusinfektiosität werden hiervon Verdünnungsreihen angelegt, mit denen die Zellkulturen inokuliert werden.

Werden andere Verfahren als das unter Pkt. 8.4 beschriebene Verdünnungsverfahren zur Verringerung der Zytotoxizität oder zur Aufhebung der Desinfektionsmittelwirkung (z. B. Gelfiltration, Mikrofiltration oder chemische Neutralisation) angewendet, sind diese entsprechend zu prüfen (analog der DVV/RKI-Leitlinie [Blümel et al., 2008]).

9.2 Allgemeine Kontrollen

9.2.1 Zellkontrolle

Die Zellen werden wie im Versuchsansatz behandelt jedoch nur mit Zellkulturmedium versehen.

9.3 Prüfung einer Referenzsubstanz

Die Prüfung einer Referenzsubstanz dient dem Nachweis der Eignung der Testviren, d. h. dem Nachweis, dass sie gegenüber bestimmten Wirkstoffen eine stets gleichbleibende Tenazität aufweisen. Die Auswahl der Referenzsubstanz sollte sich am Wirkstoff des zu prüfenden Produkts ori-

entieren – z. B. ist bei aldehydischen Produkten Glutaraldehyd (GDA) und bei oxidativ-wirksamen Produkten Peressigsäure (PES) zu verwenden. Bei Wirkstoffgemischen sollte die Referenzsubstanz für den Wirkstoff mit der höchsten Konzentration im Produkt ausgewählt werden. Die Prüfung wird analog Pkt. 8.4 durchgeführt, wobei die Produktprüflösung durch die Referenzlösung ersetzt wird.

In einer ersten Phase der Etablierung dieser Prüfmethode sind die Prüflabore aufgefordert, laborinterne Referenzwerte zu erstellen. Aus diesen Daten sollen zu einem späteren Zeitpunkt für die Bewertung von Gutachten verbindliche Werte festgelegt werden⁷. Orientierende Angaben zu Reduktionsfaktoren bei verschiedenen Viren und Referenzsubstanzen sind in Anhang 3 aufgeführt.

10 Bestimmung der Infektiosität der Virussuspensionen

Als Methodik werden i. d. R. quantale Tests (Endverdünnungsmethode) eingesetzt, bei denen die Infektiosität der Versuchsansätze in Makro- oder Mikrotests bestimmt wird. Als Infektiositätsparameter wird meist der zytopathische Effekt (CPE) bestimmt werden (siehe Anhang 1).

Für die quantalen Prüfung müssen mindestens 6–8 Vertiefungen mit 100 µl jeder Verdünnung inokuliert werden. Die Kulturen sind für eine virusspezifische Zeit bei einer geeigneten Temperatur zu inkubieren. Nach der Inkubation ist der Virustiter zu ermitteln. Dabei sollten die Verdünnungsstufen, die mit der Zellkultur zur Ermittlung des jeweiligen Virusgehalts in Kontakt gebracht werden, so gewählt werden, dass möglichst sowohl Reihen vorhanden sind, in denen alle Vertiefungen einen zytopathischen Effekt zeigen, als auch solche, in denen keine Vertiefung positiv ist.

Die Virustitrationen sind so durchzuführen, dass der Virustiter ein 95 % Konfidenzintervall (KI) von $\leq 0,5 \log_{10}$ aufweist. Die Anzahl der Replikate pro Verdünnung (z. B. 6, 8, 12 oder 16) und der Verdünnungsfak-

tor in der Verdünnungsreihe (z. B. 3, 5 oder 10), die für die Titration verwendet wird, sind entsprechend festzulegen.

Alle Versuche sind in zwei unabhängigen Ansätzen an unterschiedlichen Tagen durchzuführen.

11 Berechnung, Darstellung und Bewertung der Ergebnisse

11.1 Darstellung und Berechnung der Ergebnisse

Alle Ergebnisse sind als Rohdaten und zusätzlich als logarithmische Werte (\log_{10} TCID₅₀/ml) im Prüfbericht tabellarisch darzustellen.

Der Virustiter (TCID₅₀/ml) kann auf verschiedene Weise ermittelt werden, u. a. nach der Gleichung von Spearman und Kärber [Spearman, 1908; Kärber 1931] (ein Rechenbeispiel ist in der Leitlinie der DVV/RKI [Blümel et al., 2008] enthalten).

11.2 Berechnung des Reduktionsfaktors (RF)

Die Beurteilung der Wirksamkeit der Desinfektionsmittel-Verdünnung erfolgt durch die Ermittlung des RF. Der RF ist die Differenz aus dem ohne Einwirkung des Desinfektionsmittels erhaltenen Infektiositätstiter (\log_{10} TCID₅₀/ml) der Viruskontrolle (siehe Pkt. 9.1.2) und dem nach Einwirkung des Desinfektionsmittels erhaltenen Infektiositätstiter (siehe Pkt. 8.4 und 10). Die Titer sind mit ihrem 95 % KI zu ermitteln und daraus der RF mit dem 95 % KI zu berechnen (siehe Anhang 2).

11.3 Bewertung der Ergebnisse

Von einer ausreichenden, Desinfektionsmittel-bedingten Titerreduktion ist auszugehen, wenn der berechnete RF der mindestens 6 Ansätze (2 Ansätze mit je 3 Carriern mit Desinfektionsmittel) für die ausgelobte Konzentrations-Zeit-Relation mindestens $4 \log_{10}$ beträgt.

Die Ergebnisse dürfen nicht durch zytotoxische Einflüsse, Interferenzen oder Nachwirkung des Desinfektionsmittels beeinträchtigt sein.

Der Test ist deshalb nur gültig, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

a) Die Testvirus-Suspension besitzt mindestens einen Titer, der die Bestimmung

einer $4 \log_{10}$ Reduktion nach Behandlung mit dem Desinfektionsmittel erlaubt (in der Regel 10^8 TCID₅₀/ml).

b) Der RF für die entsprechende Referenzsubstanz entspricht den Angaben in Tabelle 1.

c) Die Zytotoxizität des Produktes beeinträchtigt nicht die Zellmorphologie und das Zellwachstum oder die Empfindlichkeit für das Prüfvirus bzw. sollte so gering sein, dass der Nachweis einer Reduktion des Virustiters um $4 \log_{10}$ möglich ist.

d) Der Interferenzttest zeigt keinen Suszeptibilitätsverlust der Zellen. Die Differenz des hiermit ermittelten Titers im Vergleich zur Negativkontrolle (mit PBS) sollte $\leq 0,5 \log_{10}$ betragen.

e) Von einer zu vernachlässigenden oder nicht vorhandenen Nachwirkung des Desinfektionsmittels kann ausgegangen werden, wenn die Differenz des Titers im Vergleich zur Viruskontrolle (siehe 9.1.1) $\leq 0,5 \log_{10}$ beträgt.

12 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss alle Angaben enthalten, die zur Beurteilung der Testdurchführung und der erzielten Ergebnisse erforderlich sind (siehe Pkt. 11 und Pkt. 12.1).

– In der Einleitung sollte kurz berichtet werden, für welchen Anwendungsbereich das Mittel eingesetzt werden soll. Insbesondere muss angegeben werden, unter welchen Bedingungen das Mittel anzuwenden ist.

– Die Wirkstoffe des Desinfektionsmittels müssen vollständig angegeben werden.

– Das Desinfektionsmittel ist genau zu beschreiben: Chargen-Nr., Herstellungsdatum, Verfallsdatum, physikalische Eigenschaften, Farbe, pH-Wert (der pH-Wert der Prüflösungen im Prüfmuster und in der Gebrauchsverdünnung mit WSH soll gemessen werden; dies gilt nicht für alkoholische Lösungen $> 60\%$!).

– Die Herkunft, Präparation und Passagezahl des Prüfvirus sowie der verwendeten Zelllinien müssen beschrieben werden.

– Die Methodik für die Prüfungen und die Kontrollversuche muss entsprechend den durch die Leitlinie vorgegebenen Abläufen und den im Labor konkreten Detailumsetzungen beschrieben werden. Ein Verweis auf die Leitlinie ist nicht ausreichend. Insbesondere ist die Herstellung und ggf. die Art der Aufkonzentrierung der Testvirus-Suspension genau zu beschreiben.

⁷ Derartige Daten können dem DVV-Fachausschuss (siehe: <http://www.dvv-ev.de/>) übermittelt werden. Für MVA liegen noch keine konkreten Daten vor.

Maßnahmen zu Verminderung der Zytotoxizität, der Nachwirkung oder Neutralisation der Prüfsubstanz sowie der Nachweis, dass diese das Prüfergebnis nicht beeinträchtigen, sind ebenfalls darzulegen. Die Ergebnisse aller Versuche müssen tabellarisch als Rohdaten und als berechnete Titer ($TCID_{50}/ml$), einschließlich der 95 % KI angegeben werden. Die Methode der Titerberechnung muss ebenfalls genannt werden.

12.1 Angaben, die im Prüfbericht enthalten sein müssen

- a) Name und Anschrift des Prüflaboratorium
- b) Identifizierung der Probe:
 - Produktbezeichnung
 - Chargennummer
 - Verfallsdatum (falls verfügbar)
 - Hersteller
 - Herstellungsdatum
 - Datum der Lieferung
 - Lagerungsbedingungen
 - Wirkstoff(e) und deren Konzentration(en) (Bezeichnungen gemäß IUPAC-Regeln sowie Bezeichnungen auf den Etiketten)
 - Beschreibung des Produktes (Aussehen, Geruch, pH-Wert)
- c) Prüfbedingungen
 - Zeitraum der Analyse
 - Prüftemperatur
 - Titrationsverfahren
 - Prüfkonzentrationen
 - Einwirkzeiten
 - Belastungssubstanzen
- d) Beschreibung der Durchführung des Tests
 - Titer der Testvirus-Suspension
 - Beschreibung der einzelnen Tests und Kontrolluntersuchungen
 - maximal nachweisbare RF mit Desinfektionsmittel
 - RF bei der Referenzsubstanz
- e) Darstellung der Prüfergebnisse
 - Beschreibung
 - Tabelle der Ergebnisse aller Tests
- f) Schlussfolgerung über die Wirksamkeit des Produkts unter den aktuellen Testbedingungen
- g) Datum und Unterschrift

13 Literatur

1. Blümel J, Glebe D, Neumann-Haefelin D, Rabenau HF, Rapp I, von Rheinbaben F, Ruf B, Sauerbrei A, Schwebke I, Steinmann J, Willkommen H, Wolff MH, Wutzler P (2008) Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin. Fassung vom 1. August 2008. Bundesgesundheitsblatt 51, 937–941.
2. RKI (2004) Prüfung und Deklaration der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren. Stellungnahme des Arbeitskreises Viruzidie am RKI. Bundesgesundheitsbl 47: 62–66.
3. Spearman C (1908) The method of "right and wrong cases" ("constant stimuli") without Gauss's formulae. British Journal of Psychology 2: 227–242.
4. Kärber G (1931) Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche [A contribution to the collective treatment of a pharmacological experimental series]. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie 162: 480–483.
5. Bekanntmachung über die Zulassung von Arzneimitteln, Anforderungen an Validierungsstudien zum Nachweis der Virussicherheit von Arzneimitteln aus menschlichem Blut oder Plasma vom 20. Dezember 1993/21. (1994) Bundesanzeiger Nr. 84: 4740–4744.
6. CEN 216 WI 00216037: Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative nonporous surface test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants used in human medicine. Test method and requirements without mechanical action (phase 2/step 2) 2008.
7. DIN EN 14820 Gefäße zur einmaligen Verwendung für die venöse Blutentnahme beim Menschen; Deutsche Fassung EN 14820: 2004.
8. Rabenau HF, Rapp I, Schwebke I, Eggers M, Steinmann J (2012) Suitability of adenovirus type 5 and four different animal parvoviruses as model virus for testing virucidal activity of chemical disinfectants on surfaces: an inter-laboratory comparison. Journal of Clinical Virology (eingereicht)
9. DIN EN 14476 Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine - Test method and requirements (Phase 2/Step 1); German version prEN 14476:2011.
10. DIN EN 10088-1 Nichtrostende Stähle - Teil 1: Verzeichnis der nichtrostenden Stähle; Deutsche Fassung EN 10088-1:2005.
11. DIN EN 10088-2 Nichtrostende Stähle - Teil 2: Technische Lieferbedingungen für Blech und Band für allgemeine Verwendung; Deutsche Fassung EN 10088-2:2005.

Anhang 1

Hinweise zur Durchführung des Infektiositätstests

Die Prüfung der Infektiosität der Virus-Suspensionen (Virusausgangslösung, Kontrollen, resuspendierte Test-Suspension) und ihrer jeweiligen Verdünnungen kann als (Mikrotiter-) Plattentest zur Bestimmung der $TCID_{50}/ml$ erfolgen.

(Mikrotiter-) Platten-Test

a) Beispiel: Virustitration unter Verwendung einer Zellsuspension

Die Verdünnung der Virussuspension erfolgt z. B. in 10-er Verdünnungsschritten in geeignetem Zellkulturmedium. Von jeder Verdünnung werden 100 µl in mindestens 6–8 Vertiefungen einer z. B. 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt, beginnend mit der höchsten Verdünnung. Die letzte Reihe der Mikrotiterplatte dient als Zellkontrolle. Alle Vertiefungen enthalten zusätzlich je 100 µl Zellsuspension, die abhängig von dem Prüfsystem, vor oder nach der Virussuspension in die Vertiefungen gegeben werden. Nach der entsprechenden Inkubationszeit ist der virusspezifische zytopathische Effekt mikroskopisch abzulesen.

b) Beispiel: Virustitration unter Verwendung von Zellkultur-Monolayern

Die Verdünnung der Virus-Suspension erfolgt in z. B. 10-er Verdünnungsschritten (100 µl Virus-Suspension) in geeignetem Zellkulturmedium. Von jeder Verdünnung werden 100 µl in mindestens 6–8 Vertiefungen einer z. B. 96-Loch-Mikrotiterplatte mit einem konfluenten (>90 %) oder subkonfluenten (<90 %) Zellmonolayer (abhängig von der virusspezifischen Inkubationszeit und dem eingesetzten Virus) überführt. Die letzte Reihe der Mikrotiterplatte dient als Zellkontrolle (mit 200 µl Erhaltungsmedium). Nach der entsprechenden virusspezifischen Inkubationszeit ist der zytopathische Effekt mikroskopisch abzulesen.

Anhang 2

Biometrische Auswertung der Versuchsansätze und Beurteilung der virusinaktivierenden Wirkung (Reduktionsfaktor [RF])

Bei Versuchsansätzen (Kontrollversuche), die im Suspensionsversuch getestet wer-

den, sind die Berechnungen entsprechend der DVV/RKI-Leitlinie [Blümel et al., 2008] durchzuführen, in der auch eine Beispielsrechnung aufgeführt ist. Für die Berechnung bei Carrier-Ansätzen ist wie im Folgenden angegeben vorzugehen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass für beide Versuche (zwei unabhängige Versuchsansätze mit jeweils 3 Carriern, s. Pkt. 8.2, 8.4, 10) der RF und das 95% KI gemeinsam zu berechnen sind).

A 2.1 Berechnung des Virustiters und der Standardabweichung

Die Berechnung des logarithmischen Infektionstiters (z. B. nach Spearman und Kärber) in TCID₅₀/ml erfolgt nach:

$$m = x_k + d/2 - d \sum p_i$$

Dabei ist:

m = negativer dekadischer Logarithmus des Titers bezogen auf das Testvolumen

x_k = Logarithmus der kleinsten Dosis (Verdünnungsstufe) bei der alle Testobjekte positiv reagieren

d = Logarithmus des Verdünnungsfaktors
p_i = beobachtete Reaktionsrate

Die Standardabweichung (s) von m errechnet sich nach [Bekanntmachung über die Zulassung von Arzneimitteln, 1994]:

$$s_m = \sqrt{d^2 \sum \{p_i (1 - p_i) / (n - 1)\}}$$

Dabei ist:

s_m = Standardabweichung des logarithmierten Titers

d = Logarithmus des Verdünnungsfaktors

p_i = beobachtete Reaktionsrate

n = die Anzahl der pro Verdünnung eingesetzten Testobjekte

Das 95% KI des Titers entspricht näherungsweise 2 s_m und sollte stets <0,5 log₁₀ betragen. Bei der Titerberechnung muss die Vorverdünnung der Probe berücksichtigt und auf das gleiche Volumen bezogen werden.

A 2.2 Berechnung des mittleren RF (RF_(Ca)) und seines 95% KI

Der mittlere RF(RF_(Ca)) wird errechnet als Differenz des logarithmierten Virustiters aus den 6 Einzel(Carrier)bestimmungen (2 Ansätze mit jeweils 3 Carriern) der „Kontroll-Titration“ (siehe Pkt. 9.1.2: gleich Titer T_(Ko)) und den 6 Einzel(Carrier)bestimmungen (2 Ansätze mit jeweils 3 Carriern) des Testansatzes nach Einwirkung des Desinfektionsmittels („Restvirus“, siehe Pkt. 8.4, gleich Titer T_(Rv)).

Die Berechnung des mittleren, logarithmierten Titers des Kontrollansatzes (T_(Ko)) und des Versuchsansatzes (T_(Rv)) (= Restvirus) erfolgt nach:

$$T_{(Ko)} = (c1 + c2 + c3 + c4 + c5 + c6) / 6$$

Dabei ist:

T_(Ko) = Mittlerer, logarithmierter Titer der 6 Carrier aus dem Kontrollansatz (aus 2 Ansätzen mit jeweils 3 Carriern)

C1 = log₁₀ TCID₅₀/ml der Titration des 1. Carriers

C2 = log₁₀ TCID₅₀/ml der Titration des 2. Carriers

C3 = log₁₀ TCID₅₀/ml der Titration des 3. Carriers usw.

Der mittlere Titer des Restvirus (T_(Rv)) ist analog zu ermitteln.

Von T_(Ko) und T_(Rv) ist jeweils die Standardabweichung zu berechnen. Die Standardabweichung berechnet sich nach:

$$s_{T(Ko)} = \sqrt{\sum \{(x - x_m)^2 / (n - 1)\}}$$

Dabei ist:

s_{T(Ko)} = Standardabweichung des mittleren, logarithmierten Titer der 6 Carrier aus dem Kontrollansatz

x = logarithmierte Titer der einzelnen Carrier
x_m = mittlerer, logarithmierter Titer der 6 Carrier

n = die Anzahl der Carrier

Die Standardabweichung von T_(Rv) ist analog zu ermitteln.

Der mittlere RF der Carrierversuche (RF_(Ca)) – aus den 6 Einzel(Carrier)bestimmungen) und sein 95% KI wird wie folgt berechnet:

$$RF_{(Ca)} = T_{(Ko)} - T_{(Rv)}$$

Dabei ist:

RF_(Ca) = Reduktionsfaktor des Versuchsansatzes

T_(Ko) = mittlerer logarithmierter Titer der 6 Carrier aus dem Kontrollansatz (aus 2 Ansätzen mit jeweils 3 Carriern)

T_(Rv) = mittlerer logarithmierter Titer der 6 Carrier aus dem Testansatz (Restvirus) (aus 2 Ansätzen mit jeweils 3 Carriern)

Das 95% KI des RF_(Ca) berechnet sich nach:

$$K_{RF(Ca)} = \sqrt{(2 s_{T(Ko)})^2 + (2 s_{T(Rv)})^2}$$

Dabei ist:

K_{RF(Ca)} = 95% KI des RF_(Ca) des Versuchsansatzes

s_{T(Ko)} = Standardabweichung des mittleren Titer der 6 Carrier aus dem Kontrollansatz

2s_{T(Ko)} = 95% KI des mittleren Titer der 6 Carrier aus dem Kontrollansatz

s_{T(Rv)} = Standardabweichung des mittleren Titer der 6 Carrier aus dem Testansatz (Restvirus)

2s_{T(Rv)} = 95% KI des mittleren Titer der 6 Carrier aus dem Testansatz (Restvirus)

Sofern im Testansatz mit Desinfektionsmittel kein „Restvirus“ mehr nachweisbar ist, entspricht das 95% KI des RF des Testansatzes dem des Kontrollansatzes:

$$KRF_{(Ca)} = \sqrt{(2s_{T(Ko)})^2}$$

Anhang 3

Angaben zu Reduktionsfaktoren von Referenzsubstanzen

Die Prüfung einer Referenzsubstanz dient dem Nachweis der Eignung der Testviren, d. h. dem Nachweis, dass sie gegenüber bestimmten Wirkstoffen eine stets gleichbleibende Tenazität aufweisen. In Ringversuchen wurden Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkmechanismen geprüft [Rabenau et al., 2012]. Aus diesen Ergebnissen sind die in der Tabelle 1 aufgeführten Referenzwerte abgeleitet. Diese Referenzwerte haben vorläufig orientierenden Charakter.

Tabelle 1: Übersicht über mögliche Referenzsubstanzen, zu prüfende Konzentrationen und damit zu erzielende Reduktionsfaktoren bei geringer Belastung.

Testvirus/Wirkstoff	Alkoholische Produkte: Ethanol		Aldehydische Produkte: GDA		Oxidativ-wirksame Produkte: PES	
	Konz.	RF	Konz.	RF	Konz.	RF
Adenovirus	50 %	1,1–3,5	0,0125 % (125 ppm)	2,0–3,5	0,05 % (500 ppm)	1,8–3,8
MNV	45 %	1,4–2,6	0,1 % (1000 pm)	1,9–2,9	0,05 % (500 ppm)	2,3–3,3
MVM	–	–	0,1 % (1000 pm)	1,8–4,0	0,05 % (500 ppm)	1,2–2,8

Anhang 4

Tabellarische Darstellung der Prüfungsergebnisse

Tabelle 2: Beispiel für die tabellarische Darstellung der Prüfungsergebnisse.

Testvirus	Konzentration des Desinfektionsmittels im Ansatz (%)	Belastung	Virustiter der Kontroll-Titration (\log_{10} TCID ₅₀ /ml) einschließlich 95% KI	Virustiter der „Restvirus“-Titration (\log_{10} TCID ₅₀ /ml) einschließlich 95% KI		RF nach ... (min) einschließlich 95% KI	
				1.EWZ ¹	2.EWZ	1.EWZ	2.EWZ
MNV							
MVM							

¹ Einwirkzeit

Anhang 5

Herstellung von Wasser standardisierter Härte (WSH)

Für die Herstellung werden 2 Lösungen benötigt:

Lösung A: 19,84 g wasserfreies Magnesiumchlorid (MgCl₂) und 46,24 g wasserfreies Kalziumchlorid (CaCl₂) werden in Aqua dest. gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt (es können auch äquivalente Mengen wasserhaltiger Salze verwendet werden). Die Lösung wird im Dampfsterilisator sterilisiert. Sie kann bei 2–8 °C bis zu einem Monat aufbewahrt werden.

Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) werden in Aqua dest. gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration sterilisiert. Sie kann bei 2–8 °C bis zu einer Woche aufbewahrt werden.

Für die Herstellung von 1 Liter WSH werden in einen sterilisierten 1000 ml-Messkolben mindestens 600 ml steriles Aqua dest. gegeben. Dazu werden 6,0 ml Lösung A und 8,0 ml Lösung B gegeben und nach dem Durchmischen mit Aqua dest. zu 1000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert dieser Lösung muss $7,0 \pm 0,2$ betragen. Falls erforderlich ist der pH-Wert mit 1 N Natriumhydroxid (NaOH) bzw. 1 N Salzsäure (HCl) einzustellen. WSH ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 24 h zu verbrauchen.

Anmerkung: Bei Herstellung der Produktprüflösungen führt die Zugabe des Produkts in WSH zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas niedriger als 300 mg/l für Calciumcarbonat (CaCO₃).