
Textiles — Détermination de l'activité virucide de produits textiles

Textiles — Determination of antiviral activity of textile products

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 18184:2014](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bbc2ac5c-6278-416a-8de9-86e5d190b4af/iso-18184-2014)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bbc2ac5c-6278-416a-8de9-86e5d190b4af/iso-18184-2014>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 18184:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bbc2ac5c-6278-416a-8de9-86e5d190b4af/iso-18184-2014>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2014

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Virus et cellule hôte	3
6 Avertissement	3
7 Appareillage	3
8 Stérilisation de l'appareillage	6
9 Réactif et milieu de culture	6
10 Préparation	11
10.1 Restauration de la cellule hôte cryoconservée.....	11
10.2 Sous-culture de cellules hôtes.....	11
10.3 Culture cellulaire pour détermination du titre infectieux d'une suspension virale.....	12
10.4 Préparation du virus à soumettre à essai.....	12
10.5 Préparation des éprouvettes.....	15
10.6 Essais témoin.....	16
11 Mode opératoire d'essai	17
11.1 Préparation des éprouvettes.....	17
11.2 Inoculation du virus dans les éprouvettes.....	17
11.3 Durée de contact.....	17
11.4 Élimination du virus immédiatement après inoculation.....	17
11.5 Élimination du virus après la durée de contact.....	17
12 Préparation pour dilutions en série de la suspension virale	17
13 Mesurage du titre infectieux	18
13.1 Méthode des plages de lyse.....	18
13.2 Méthode TCID ₅₀	18
14 Calcul du titre infectieux	18
14.1 Méthode des plages de lyse.....	18
14.2 Méthode TCID ₅₀	19
14.3 Résultat de l'essai.....	20
15 Rapport d'essai	21
Annexe A (normative) Souches virales et cellules hôtes	22
Annexe B (normative) Détermination du titre infectieux: méthode des plages de lyse	23
Annexe C (normative) Détermination du titre infectieux: méthode TCID₅₀	26
Annexe D (normative) Composition des milieux	27
Annexe E (informative) Autre virus: virus de la poliomyélite	30
Annexe F (informative) Méthode d'essai utilisant des œufs de poule fécondés SPF	31
Annexe G (informative) Efficacité virucide	36
Annexe H (informative) Résultats des essais interlaboratoires (1)	37
Annexe I (informative) Résultats des essais interlaboratoires (2)	39
Bibliographie	42

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/CEI, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: Avant-propos — Informations supplémentaires.

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 38, *Textiles*.

Introduction

Au cours de ces dernières années, le niveau de vie de la population mondiale a connu une nette amélioration et les consommateurs tendent aujourd'hui à rechercher des produits de soin ou de protection de la santé. Cette tendance s'accompagne d'un regain d'intérêt de la population pour la protection contre des maladies épidémiques, tel que les banlieusards qui empruntent quotidiennement des moyens de transport bondés, les hôpitaux, les maisons médicalisées, etc.

Grâce à la récente accélération du développement de techniques ultra performantes pour le traitement des produits textiles, les produits d'hygiène et de protection de la santé occupent une place de plus en plus importante sur le marché.

Ces produits relativement nouveaux ont bénéficié des avancées techniques réalisées dans le domaine des technologies textiles et les fabricants ont individuellement développé des méthodes d'essai afin d'évaluer les performances des produits. Cependant, aucune méthode d'essai unifiée n'a été élaborée et les consommateurs et les fabricants ne disposent à ce jour d'aucune information claire sur ces produits hautement fonctionnels.

Les produits à propriétés virucides figurent parmi ces produits et intègrent les domaines techniques des technologies textiles et des biotechnologies.

Dans ce contexte, la nécessité d'élaborer une Norme internationale s'impose aux consommateurs, distributeurs, fabricants ou autres intervenants, ainsi qu'aux différents acteurs du marché.

Les produits textiles à propriétés virucides sont des textiles capables de réduire le nombre de virus infectieux entrant en contact avec leur surface. La présente norme établit une méthode d'essai quantitative permettant d'évaluer les performances virucides de ces produits.

Les données objectives obtenues grâce à la présente norme permettent à tous les acteurs (consommateurs, fabricants, distributeurs, etc.) de déterminer de manière correcte la performance des produits textiles antiviraux.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bbc2ac5c-6278-416a-8de9-86e5d190b4af/iso-18184-2014>

Deux méthodes permettent de quantifier le nombre de virus infectieux (titre infectieux dans la présente norme): la méthode directe des plages de lyse et la méthode TCID₅₀. La méthode utilisée peut être choisie en fonction de l'expertise et des capacités techniques de chaque centre d'essai. Tout système cellulaire approprié peut être utilisé et les conditions d'essai en cas d'utilisation doivent être consignées.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 18184:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bbc2ac5c-6278-416a-8de9-86e5d190b4af/iso-18184-2014>

Textiles — Détermination de l'activité virucide de produits textiles

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie des méthodes d'essai permettant d'évaluer l'activité virucide des produits textiles. Les produits textiles incluent les tissus, les tricots, les fibres, les fils, les tresses, etc.

Les virus utilisés dans la présente Norme internationale sont:

- l'un des virus enveloppés, un virus de la grippe, qui est un virus infectieux chez l'homme qui provoque une infection des voies respiratoires;
- l'un des virus non enveloppés, un calicivirus félin, qui est l'un des substituts de norovirus qui sont importants pathogènes entériques.

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 105-F02, *Textiles — Essais de solidité des teintures — Partie F02: Spécifications pour les tissus témoins en coton et en viscose* <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bbc2ac5c-6278-416a-8de9-86e5d190b4af/iso-18184-2014>

ISO 3696, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

ISO 6330, *Textiles — Méthodes de lavage et de séchage domestiques en vue des essais des textiles*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1

virus

micro-organisme acellulaire dont le matériel génétique est contenu dans une enveloppe protéique. Il peut se répliquer dans des cellules hôtes spécifiques

3.2

activité virale

capacité d'un virus à se répliquer dans des cellules hôtes spécifiques

3.3

propriété virucide

propriété permettant une modification morphologique ou entraînant une altération structurelle de la surface protéique du virus

Note 1 à l'article: Le virus endommagé perd son affinité pour le récepteur de la cellule hôte et son activité virale est ainsi diminuée. En plus d'une altération des virus enveloppés, celle de l'enveloppe existe aussi.

Note 2 à l'article: La modification de la réponse antigénique ou la modification d'un élément constitutif n'implique pas nécessairement une réduction de la virulence d'un virus.

3.4

substances chimiques virucides

substances chimiques inorganiques ou organiques capables de réduire l'activité virale

Note 1 à l'article: Les substances chimiques virucides organiques modifient la surface protéique du virus par adsorption chimique. Les substances virucides métalliques inorganiques détruisent ou modifient la morphologie du virus par arrachement d'un atome d'hydrogène de la protéine virale, grâce à des radicaux OH générés par réaction radicalaire.

3.5

éttoffe de référence

éttoffe utilisée pour vérifier la stabilité du virus soumis à essai sur une éttoffe textile

Note 1 à l'article: Le tissu 100 % coton décrit dans l'ISO 105-F02, sans aucun traitement chimique, tel qu'un blanchiment optique, etc., pourrait être utilisé.

Note 2 à l'article: Les éttoffes avant traitement virucide peuvent servir d'éttoffes de référence dans les mêmes conditions que celles décrites au [3.5](#).

3.6

essai témoin d'une éprouvette

essai destiné à vérifier qu'une éprouvette n'a aucune influence sur la cellule hôte

Note 1 à l'article: Cet essai est effectué dans les mêmes conditions que l'essai réel, mais sans le virus

3.7

effet cytopathogène (ECP) du virus

effet qui se manifeste sous la forme d'une altération morphologique ou d'une destruction des cellules hôtes provoquée par la multiplication des virus

3.8

titre infectieux du virus

nombre de particules virales infectieuses présentes par unité de volume dans un lysat cellulaire ou dans une solution

3.9

plage de lyse

zone formée dans une monocouche cellulaire en milieu semi-solide à la suite d'un processus de lyse induit par l'infection et la multiplication d'un seul virus

3.10

unité formatrice de plages (UFP)

unité exprimée en concentration de virus infectieux par unité de volume (ml)

3.11

méthode des plages de lyse

méthode destinée à déterminer le titre infectieux du virus à partir du nombre d'UFP en utilisant des dilutions successives

3.12

méthode TCID₅₀

dose infectieuse à 50 % d'une suspension virale de rinçage ou d'une dilution de suspension virale qui induit un ECP dans 50 % des cultures cellulaires

Note 1 à l'article: voir [3.7](#).

4 Principe

Les virus sont inoculés dans une éprouvette. Une fois le temps de contact écoulé, la quantité restante du virus infectieux est déterminée et le taux de réduction est calculé par comparaison entre l'éprouvette d'essai du produit virucide et l'éprouvette de référence, par logarithme décimal. Deux méthodes

permettent de quantifier le titre infectieux d'un virus. La première est la méthode des plages de lyse (3.11) et la seconde la méthode TCID₅₀ (3.12). La méthode est choisie en fonction de l'expertise et des capacités du centre d'essai.

5 Virus et cellule hôte

Les virus utilisés dans la présente norme sont un virus Influenza et un calicivirus félin qui sont décrits dans l'Annexe A. Les cellules hôtes respectivement associées sont également décrites dans cette annexe. Le choix de l'un de ces virus, ou des deux, qui seront utilisés lors de l'essai, dépend de l'utilisation finale des produits textiles.

6 Avertissement

La présente norme nécessite l'utilisation de virus infectieux ou de substances et/ou modes opératoires qui peuvent être préjudiciables à la santé et à l'environnement si les conditions appropriées ne sont pas respectées. Elle se réfère uniquement à l'aptitude technique et ne dispense nullement l'utilisateur de satisfaire, à tout moment, aux obligations légales en matière de santé, de sécurité et d'environnement.

L'avertissement est également applicable aux éléments suivants. Le virus utilisé dans le cadre de la présente norme doit être un virus de niveau de sécurité biotechnologique de classe II, désigné comme tel par les directives de l'OMS. L'utilisateur de la présente norme doit disposer de connaissances et d'une expertise suffisantes en matière de biotechnologies. Par ailleurs, les utilisateurs doivent rigoureusement se conformer à la norme de sécurité des fabricants et à la réglementation locale applicable.

iTeh STANDARD PREVIEW

7 Appareillage (standards.iteh.ai)

7.1 **Stérilisateur sous vapeur à haute pression: autoclave**, réglable à une température de $(121 \pm 2)^\circ\text{C}$ et une pression de (103 ± 5) kPa.

7.2 **Stérilisateur à chaleur sèche**: étuves, réglables aux températures de $(180 \pm 2)^\circ\text{C}$ et $(160 \pm 2)^\circ\text{C}$.

7.3 **Fiole jaugée**, d'une capacité de 1 l.

7.4 **Balance**, offrant une plage de mesure de $100 \text{ g} \pm 0,1 \text{ g}$ à $0,01 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$.

7.5 **Pipette en verre**, de capacités: $50 \text{ ml} \pm 0,5 \text{ ml}$, $25 \text{ ml} \pm 0,25 \text{ ml}$, $10 \text{ ml} \pm 0,1 \text{ ml}$ et $5 \text{ ml} \pm 0,05 \text{ ml}$.

7.6 **Pipette en plastique**, de capacités: $50 \text{ ml} \pm 0,5 \text{ ml}$, $25 \text{ ml} \pm 0,25 \text{ ml}$, $10 \text{ ml} \pm 0,1 \text{ ml}$ et $5 \text{ ml} \pm 0,05 \text{ ml}$.

7.7 **Pipeteur**, capable de recevoir les pipettes en verre ou en plastique, ou les embouts pour pipette.

7.8 **Micropipette**, de volume parfaitement adapté à chaque utilisation, à extrémité en verre ou en plastique, avec une tolérance inférieure ou égale à 0,5 %.

7.9 **Bain d'eau**, pour maintenir une température de $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$, $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ ou $(56 \pm 2)^\circ\text{C}$.

7.10 **Mélangeur (type vortex)**, utilisé pour les essais microbiens.

7.11 **Congélateur**, réglable à une température de $-(80 \pm 2)^\circ\text{C}$ ou $-(20 \pm 2)^\circ\text{C}$.

7.12 **Bain d'azote liquide**, pour la conservation à -196°C environ.

7.13 **Filtre à membrane**, avec un diamètre de pore de $0,22 \mu\text{m}$.



Figure 2 — Plaquette en plastique à 6 puits à utiliser pour la méthode des plages de lyse

7.23 Fioles, pour la culture cellulaire, stérilisées aux rayonnements gamma, traitées pour faciliter l'adhérence cellulaire, avec une zone de culture cellulaire de 75 cm², un bouchon d'aération et un bouchon étanche. Le bouchon d'aération peut laisser passer de l'air sans bactéries via un filtre à pores de 0,2 µm.



Figure 3 — Fiole pour culture cellulaire

7.24 Incubateur à CO₂, pour maintenir une atmosphère contenant 5 % de CO₂ à une température de (34 ± 2) °C et de (37 ± 2) °C.

7.25 Incubateur, pour maintenir une température de (25 ± 2) °C, (34 ± 2) °C ou (37 ± 2) °C.

7.26 Tube à centrifuger.

7.27 Boîte de culture cellulaire.

7.28 Tube à essai.

7.29 Bécher.

8 Stérilisation de l'appareillage

Stériliser tous les équipements entrant en contact avec les cellules, les substances chimiques ou les éprouvettes. La stérilisation doit être effectuée à la vapeur d'eau ou par chaleur sèche.

- Stérilisation à la vapeur d'eau (7.1): par autoclave à une température de 121 °C et une pression de 103 kPa pendant 15 min.
- Stérilisation par chaleur sèche (7.2): par stérilisateur à chaleur sèche à une température de 180 °C pendant 30 min ou à 160 °C pendant 2 h.

9 Réactif et milieu de culture

Tous les réactifs doivent être d'une qualité adaptée aux besoins virologiques, c'est-à-dire sans substance toxique pour les essais microbiens. Certains milieux de culture sont disponibles dans le commerce.

9.1 Eau, de qualité 3 conformément à l'ISO 3696.

9.2 Milieu minimum essentiel d'Eagle (EMEM), disponible dans le commerce. La composition de ce milieu est décrite à l'Annexe D. Si des composants du milieu sont manquants, les ajouter conformément au tableau présentant la composition. (standards.iteh.ai)

9.3 Solution de bicarbonate de sodium à 7,5 %.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/bbc2ac5c-6278-416a-8de9-100000000000/iso-18184-2014>

9.3.1 Stériliser à l'autoclave 75 g de bicarbonate de sodium dans une boîte de culture fermée par un bouchon étanche.

9.3.2 Stériliser également de l'eau de qualité 3 par autoclave.

9.3.3 Bien dissoudre le bicarbonate de sodium dans 1 000 ml d'eau stérilisée.

9.4 Solution de formaldéhyde.

9.4.1 À utiliser pour la fixation cellulaire.

9.4.2 Préparer une solution de 100 ml de formaldéhyde à 37 %.

9.4.3 Ajouter 900 ml d'eau de qualité 3 à 9.4.2.

9.5 Solution de bleu de méthylène.

À utiliser pour la coloration cellulaire.

9.5.1 Préparer une fiole jaugée (7.3) de 1 l, puis y ajouter les substances suivantes:

- Eau de qualité 3, 1 000 ml
- Bleu de méthylène, 0,375 g
- Solution d'hydroxyde de sodium 1 N, 62,5 µl

9.5.2 Dissoudre et bien mélanger.

9.6 Sérum bovin foetal inactivé (SBF).

9.6.1 Plonger le sérum bovin foetal congelé cryoconservé, encore dans son emballage, dans un bain d'eau (7.9) maintenu à 37 °C, jusqu'à décongélation.

9.6.2 Le placer ensuite dans le bain-marie à une température de 56 °C et l'y maintenir pendant 30 min afin de l'inactiver.

9.6.3 Placer ensuite le sérum dans plusieurs tubes. Placer les tubes dans le congélateur (7.11) à une température inférieure à -20 °C.

9.6.4 Juste avant utilisation, placer le sérum dans un bain d'eau à 37 °C et l'y maintenir jusqu'à décongélation.

9.7 Milieu de croissance.

Utilisé pour les cultures cellulaires.

9.7.1 Préparer une fiole jaugée (7.3) de 1 l, puis y ajouter les substances suivantes.

- Eau de qualité 3, 800 ml
- Sulfate de kanamycine, 60 mg
- Milieu minimum essentiel d'Eagle, 9,53 g, ou milieu RPMI 1640, 10,4 g

9.7.2 Dissoudre et bien mélanger, puis compléter le volume total de la solution à 1 000 ml avec de l'eau de qualité 3.

NOTE L'acronyme RPMI signifie "Roswell Park Memorial Institute".

9.7.3 Stériliser la solution mélangée de 9.7.2 à l'aide d'un filtre à pores de 0,22 µm (7.13).

9.7.4 Ajouter ensuite 15 ml de solution de bicarbonate de sodium à 7,5 % (9.3) et 100 ml de sérum bovin foetal inactivé (9.6) dans la solution de 9.7.3.

NOTE Lorsque la L-glutamine n'est pas incluse dans l'EMEM acheté dans le commerce, l'ajouter avant utilisation conformément à la composition indiquée dans l'Annexe C.

9.8 Milieu de conservation.

Utilisé pour les cultures cellulaires.

9.8.1 Préparer une fiole jaugée (7.3) de 1 l, puis y ajouter les substances suivantes.

- Eau de qualité 3, 800 ml
- Sulfate de kanamycine, 60 mg
- Milieu minimum essentiel d'Eagle, 9,53 g, ou milieu RPMI 1640, 10,4 g

9.8.2 Bien dissoudre les différents composants, puis compléter le volume total de la solution à 1 000 ml avec de l'eau de qualité 3.

9.8.3 Stériliser la solution mélangée de 9.8.2 en utilisant le filtre (7.13) à pores de 0,22 µm.

9.8.4 Ajouter 15 ml de la solution de bicarbonate de sodium à 7,5 % (9.3) à la solution de 9.8.3.

NOTE Lorsque la L-glutamine n'est pas incluse dans l'EMEM acheté dans le commerce, l'ajouter avant utilisation conformément à la composition indiquée dans l'Annexe C.

9.9 Double concentration du milieu de conservation (9.8).

9.9.1 Préparer une fiole jaugée (7.3) de 1 l, puis y ajouter les substances suivantes.

- Eau de qualité 3, 800 ml
- Sulfate de kanamycine, 120 mg
- Milieu minimum essentiel d'Eagle, 19,06 g.

9.9.2 Bien dissoudre les différents composants, puis compléter le volume total de la solution à 1 000 ml avec de l'eau de qualité 3.

9.9.3 Stériliser la solution mélangée de 9.9.2 en utilisant le filtre (7.13) à pores de 0,22 µm.

9.10 Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) 0,01 mol/l.

9.10.1 Préparer une fiole jaugée (7.3) de 1 l, puis y ajouter les substances suivantes.

- Chlorure de sodium, 8 g
- Chlorure de potassium, 0,2 g
- Phosphate d'hydrogène disodique dodécahydraté, 2,9 g
- Phosphate dipotassique d'hydrogène, 0,2 g

9.10.2 Ajouter de l'eau de qualité 3, compléter le volume total à 1 000 ml et bien dissoudre.

9.10.3 Stériliser ensuite la solution de 9.10.2 à l'aide de l'autoclave (7.1) à une température de 121 °C et une pression de 103 kPa pendant 15 min.

9.11 Trypsine pancréatique bovine et solution PBS.

9.11.1 Préparer un bécher, puis y placer les substances suivantes.

- Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) 0,01 mol/l (9.10), 100 ml;
- Trypsine pancréatique bovine, 1,0 g.

9.11.2 Dissoudre et bien homogénéiser en utilisant un mélangeur pendant 2 h.

9.11.3 Stériliser ensuite la solution de 9.11.2 en utilisant le filtre (7.13) à pores de 0,22 µm.

Les tubes entre lesquels la solution a été divisée et qui ne sont pas utilisés immédiatement sont conservés dans le congélateur à une température inférieure à -80 °C.

9.11.4 Préparer un tube à essai et y ajouter les solutions suivantes.

- Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) 0,01 mol/l (9.10), 9 ml;
- Solution mélangée contenant de la trypsine pancréatique bovine et la solution PBS (9.11.3), 1 ml.

9.11.5 Dissoudre et bien les mélanger.

9.11.6 Placer la solution dans plusieurs tubes à essai et conserver ces tubes dans le congélateur à une température inférieure à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

9.11.7 Juste avant utilisation, placer les tubes dans un bain d'eau (7.9) à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ et les y maintenir jusqu'à décongélation.

9.12 Solution de trypsine/EDTA.

9.12.1 Préparer une fiole jaugée (7.3) de 1 l, puis y ajouter les substances suivantes:

- Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) 0,01 mol/l (9.10), 1 000 ml;
- Trypsine, 2,5 g;
- Sulfate de kanamycine, 0,1 g;
- Sulfate de streptomycine, 0,1 g;
- Amphotéricine B, 2 mg;
- EDTA, 0,014 mol.

9.12.2 Dissoudre et bien mélanger.

9.12.3 Stériliser ensuite la solution de 9.12.2 en utilisant le filtre (7.13) à pores de $0,22\text{ }\mu\text{m}$.

9.12.4 Placer la solution dans plusieurs tubes à essai; conserver ces tubes dans le congélateur à une température inférieure à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

9.12.5 Juste avant utilisation, placer les tubes dans un bain d'eau (7.9) à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ et les y maintenir jusqu'à décongélation.

NOTE La solution de trypsine/EDTA est disponible dans le commerce. Les produits contenant les différents composants de 9.12.1 peuvent être utilisés après un processus de validation adapté.

9.13 Solution de DEAE/dextrane.

9.13.1 Préparer une fiole jaugée (7.3) de 1 l, puis y ajouter les substances suivantes.

- Eau de qualité 3, 1 000 ml;
- DEAE/dextrane, 20 g.

9.13.2 Dissoudre et bien mélanger.

9.13.3 Stériliser ensuite la solution de 9.13.2 en utilisant le filtre (7.13) à pores de $0,22\text{ }\mu\text{m}$.

9.14 Milieu gélosé.

Utilisé pour la méthode des plages de lyse. Préparer ce milieu avec les liquides A et B, conformément aux instructions ci-après. Bien mélanger avant utilisation.