

**DIN EN 13727**

ICS 11.080.20

Ersatz für  
DIN EN 13727:2012-07

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –  
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden  
Wirkung im humanmedizinischen Bereich –  
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);  
Deutsche Fassung EN 13727:2012+A1:2013**

Chemical disinfectants and antiseptics –  
Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity in the medical area –  
Test method and requirements (phase 2, step 1);  
German version EN 13727:2012+A1:2013

Antiseptiques et désinfectants chimiques –  
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide en médecine –  
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);  
Version allemande EN 13727:2012+A1:2013

Gesamtumfang 53 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

## **Nationales Vorwort**

Dieses Dokument (EN 13727:2012+A1:2013) wurde von der Arbeitsgruppe 1 „Humanmedizin“ (Sekretariat: DIN) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der Arbeitsgruppe 1 des CEN/TC 216 wird über den Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) wahrgenommen.

## **Änderungen**

Gegenüber DIN EN 13727:2012-07 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Liste der Änderungen im Vorwort wurde um die reduzierte Neutralisationszeit von 10 s bei Produkten mit Einwirkzeit von 10 min oder weniger ergänzt;
- b) in der Länderliste im Vorwort wurde um die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien und die Türkei ergänzt;
- c) in 5.4.2, 5.5.4.1 und 5.6.2.3 wurden die Verfahren zur Prüfung von gebrauchsfertigen Produkten überarbeitet bzw. ergänzt;
- d) in 5.6.2.2 wurden die Volumen für Membranfiltration und/oder Handwaschprodukte ergänzt;
- e) in 5.6.2.4 wurden in den Beispielen a1 und a2 die Fehler in der Gleichung korrigiert;
- f) in 5.8.2 wurde das Wort „hygienischen“ zweimal ergänzt;
- g) in 5.9.2 wurde die lg-Reduktion von 3 auf 5 für die chirurgische Händewaschung korrigiert.

## **Frühere Ausgaben**

DIN EN 13727: 2004-03, 2012-07

Deutsche Fassung

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —  
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der  
bakteriziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich —  
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)

Chemical disinfectants and antiseptics —  
Quantitative suspension test for the evaluation of  
bactericidal activity in the medical area —  
Test method and requirements (phase 2, step 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques —  
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation  
de l'activité bactéricide en médecine —  
Méthode d'essai et prescriptions (Phase 2, Étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 9. März 2012 angenommen und schließt Änderung 1, die am 14. Oktober 2013 vom CEN angenommen wurde.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum des CEN-CENELEC oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG  
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION  
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

## Inhalt

Seite

|                                                                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Vorwort</b> .....                                                                                                                               | <b>3</b>  |
| <b>Einleitung</b> .....                                                                                                                            | <b>4</b>  |
| <b>1 Anwendungsbereich</b> .....                                                                                                                   | <b>5</b>  |
| <b>2 Normative Verweisungen</b> .....                                                                                                              | <b>5</b>  |
| <b>3 Begriffe</b> .....                                                                                                                            | <b>5</b>  |
| <b>4 Anforderungen</b> .....                                                                                                                       | <b>6</b>  |
| <b>5 Prüfverfahren</b> .....                                                                                                                       | <b>7</b>  |
| 5.1 Kurzbeschreibung .....                                                                                                                         | 7         |
| 5.2 Materialien und Reagenzien .....                                                                                                               | 7         |
| 5.2.1 Prüfkeime .....                                                                                                                              | 7         |
| 5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien .....                                                                                                            | 8         |
| 5.3 Apparate und Glasgeräte .....                                                                                                                  | 10        |
| 5.3.1 Allgemeines .....                                                                                                                            | 10        |
| 5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung .....                                                                                               | 11        |
| 5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und der Produktprüflösungen .....                                                                         | 12        |
| 5.4.1 Prüfkeimsuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension) .....                                                                                | 12        |
| 5.4.2 Produktprüflösungen .....                                                                                                                    | 14        |
| 5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produkts .....                                                                   | 14        |
| 5.5.1 Allgemeines .....                                                                                                                            | 14        |
| 5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren .....                                                                                                  | 16        |
| 5.5.3 Membranfiltrationsverfahren .....                                                                                                            | 18        |
| 5.5.4 Modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte .....                                                                                  | 20        |
| 5.6 Versuchsdaten und Berechnung .....                                                                                                             | 22        |
| 5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen .....                                                                                              | 22        |
| 5.6.2 Berechnung .....                                                                                                                             | 22        |
| 5.7 Verifizierung des Verfahrens .....                                                                                                             | 27        |
| 5.7.1 Allgemeines .....                                                                                                                            | 27        |
| 5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen .....                                                                                         | 27        |
| 5.7.3 Grundlegende Grenzwerte .....                                                                                                                | 28        |
| 5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision .....                                                                                                      | 28        |
| 5.8.1 Keimreduktion .....                                                                                                                          | 28        |
| 5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2) .....                                                                  | 29        |
| 5.8.3 Limitierender Prüfkeim und bakterizide Konzentration .....                                                                                   | 29        |
| 5.8.4 Präzision, Wiederholungen .....                                                                                                              | 29        |
| 5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung .....                                                                                         | 29        |
| 5.9.1 Allgemeines .....                                                                                                                            | 29        |
| 5.9.2 Bakterizide Wirkung von Produkten zur Händedesinfektion und Händewaschung .....                                                              | 29        |
| 5.9.3 Bakterizide Wirkung von Produkten zur Instrumentendesinfektion .....                                                                         | 30        |
| 5.9.4 Bakterizide Wirkung von Produkten zur Oberflächendesinfektion .....                                                                          | 30        |
| 5.9.5 Qualitätsnachweis für bestimmte Anwendungsgebiete .....                                                                                      | 30        |
| 5.10 Prüfbericht .....                                                                                                                             | 30        |
| <b>Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen</b> .....                                                                         | <b>32</b> |
| <b>Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten</b> .....                                                                     | <b>33</b> |
| <b>Anhang C (informativ) Graphische Darstellung der Prüfverfahren</b> .....                                                                        | <b>35</b> |
| <b>Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts</b> .....                                                                           | <b>43</b> |
| <b>Anhang E (informativ) Präzision des Prüfergebnisses</b> .....                                                                                   | <b>47</b> |
| <b>Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EU-Richtlinie 93/42/EWG</b> ..... | <b>50</b> |
| <b>Literaturhinweise</b> .....                                                                                                                     | <b>51</b> |

## Vorwort

Dieses Dokument (EN 13727:2012+A1:2013) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Mai 2014, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2014 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument enthält die Änderung A1, die vom CEN am 2013-10-14 angenommen wurde.

Dieses Dokument ersetzt EN 13727:2012.

Anfang und Ende der durch die Änderung eingefügten oder geänderten Texte sind jeweils durch Änderungsmarken **A1** **A1** angegeben.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

Zum Zusammenhang mit EU-Richtlinien siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokuments ist.

Dieses Dokument wurde überarbeitet, um dieses an den letzten Stand der Wissenschaften anzupassen, Fehler und Mehrdeutigkeiten zu korrigieren, es mit der Struktur und dem Wortlaut der anderen existierenden und in Vorbereitung befindlichen Prüfmethode des CEN/TC 216 zu harmonisieren, die Lesbarkeit zu verbessern und dadurch den Text besser verständlich zu machen. Nachfolgenden werden die wesentlichen technischen Änderungen seit der letzten Ausgabe aufgelistet:

- Der Anwendungsbereich wurde auf die folgenden Anwendungsfelder im medizinischen Bereich erweitert; auf Produkte für die chirurgische und/oder hygienische Händewaschung und/oder Händedesinfektion sowie auf Produkte für andere Flächen als Instrumentenflächen.
- „Obligatorische Prüfbedingungen“ wurden durch „Mindestprüfbedingungen“ (Prüftemperatur und Einwirkzeit können in Grenzen beliebig ausgewählt werden), die zum Bestehen einer Prüfung absolviert werden müssen, ersetzt.
- Eine zusätzlich modifizierte Methode zur Prüfung von gebrauchsfertigen Produkten mit einer höheren Konzentration als 80 %, z. B. 97 %, wurde beschrieben.
- Der Anhang ZA wurde neu formuliert, um eine genauere Beschreibung der Beziehung zur Medizinproduktrichtlinie zu geben.
- **A1** Die Neutralisationszeit wurde auf 10 s reduziert für Produkte mit einer Einwirkzeit von 10 min oder weniger. **A1**

**A1** Daten, die auf Grundlage einer früheren Ausgabe der EN 13727 erlangt wurden, können weiter verwendet werden, wenn die Neutralisationszeit von 10 s für alle Produkte mit einer Einwirkzeit von 10 min oder weniger ausreichend nachgewiesen wurde. Daten, die auf Grundlage der prEN 12054 erlangt wurden, dürfen nicht verwendet werden, da dieses Normungsprojekt 2001 beendet wurde. **A1**

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

## **Einleitung**

Diese Europäische Norm legt einen Suspensionsversuch fest zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder ein Antiseptikum in den im Anwendungsbereich beschriebenen Bereich und Gebieten eine bakterizide Wirkung aufweist.

Dieser Laboratoriumsversuch berücksichtigt praktische Anwendungsbedingungen des Produkts, zu denen die Einwirkzeit, die Temperatur, die Prüfkeime 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

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

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die im medizinischen Bereich auf den Gebieten der hygienischen Händedesinfektion, hygienischen Händewaschung, chirurgischen Händedesinfektion, chirurgischen Händewaschung, Instrumentendesinfektion durch Eintauchen und Oberflächendesinfektion durch Abwischen, Besprühen, Überfluten oder auf sonstige Weise verwendet werden.

Diese Europäische Norm gilt für Bereiche und unter Bedingungen, wo eine Desinfektion oder Antiseptik aus medizinischen Gründen angezeigt ist. Indikationen dieser Art liegen z. B. bei der Patientenbetreuung in:

- Krankenhäusern, kommunalen medizinischen Einrichtungen und im Dentalbereich;
- medizinischen Einrichtungen in Schulen, Kindergärten und Heimen;

vor und können auch am Arbeitsplatz und im häuslichen Bereich gegeben sein. Eingeschlossen sein können auch Einrichtungen wie Wäschereien und Küchen, die der direkten Versorgung der Patienten dienen.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren dient zur Bestimmung der Wirkung handelsüblicher Zubereitungen oder Wirkstoffe unter den Bedingungen, unter denen sie angewendet werden.

ANMERKUNG 2 Dieses Verfahren entspricht einer Prüfung der Phase 2, Stufe 1.

ANMERKUNG 3 Dieses Verfahren kann nicht angewendet werden, um die Wirkung von Produkten gegen *Legionella* in wasserführenden Systemen, gegen Mykobakterien und bakterielle Sporen zu bewerten.

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

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

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

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

## 3 Begriffe

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

## 4 Anforderungen

Bei Prüfung in Übereinstimmung mit Tabelle 1 und Abschnitt 5 muss für das Produkt eine dezimal-logarithmische Reduktion (lg) um mindestens fünf Stufen (bei der hygienischen Händewaschung eine lg-Reduktion um mindestens 3 Stufen) nachgewiesen werden.

**Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen**

| Prüfbedingungen                       | Hygienische Händedesinfektion und Händewaschung                                                       | Chirurgische Händedesinfektion und Händewaschung                                                       | Instrumenten-desinfektion                                                                                                               | Oberflächen-desinfektion                                        |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| <b>Mindestspektrum von Prüfkeimen</b> | <i>P. aeruginosa</i> ,<br><i>S. aureus</i> ,<br><i>E. hirae</i> ,<br><i>E. coli</i> K12               | <i>P. aeruginosa</i> ,<br><i>S. aureus</i> ,<br><i>E. hirae</i> ,<br><i>E. coli</i> K12                | <i>P. aeruginosa</i> ,<br><i>S. aureus</i> ,<br><i>E. hirae</i> ,<br>wenn die Temperatur 40 °C oder mehr beträgt: nur <i>E. faecium</i> | <i>P. aeruginosa</i> ,<br><i>S. aureus</i> ,<br><i>E. hirae</i> |
| zusätzlich                            | Jeder zutreffende Prüfkeim                                                                            |                                                                                                        |                                                                                                                                         |                                                                 |
| <b>Prüftemperatur</b>                 | entsprechend der Empfehlung des Herstellers, jedoch zwischen 20 °C und 20 °C                          |                                                                                                        |                                                                                                                                         |                                                                 |
| <b>Einwirkzeit</b>                    | entsprechend der Empfehlung des Herstellers                                                           |                                                                                                        |                                                                                                                                         |                                                                 |
|                                       | jedoch zwischen 30 s und 60 s                                                                         | jedoch zwischen 1 min und 5 min                                                                        | jedoch nicht länger als 60 min                                                                                                          | jedoch nicht länger als 5 min oder 60 min <sup>a</sup>          |
| <b>Belastungssubstanz</b>             |                                                                                                       |                                                                                                        |                                                                                                                                         |                                                                 |
| Bedingungen niedriger Belastung       | 0,3 g/l Rinderserum-albuminlösung (hygienische Händedesinfektion) <sup>b</sup>                        | 0,3 g/l Rinderserum-albuminlösung (chirurgische Händedesinfektion) <sup>b</sup>                        | 0,3 g/l Rinderserum-albuminlösung und/oder                                                                                              | 0,3 g/l Rinderserum-albuminlösung und/oder                      |
| Bedingungen hoher Belastung           | 3,0 g/l Rinderserum-albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten (hygienische Händewaschung) <sup>c</sup> | 3,0 g/l Rinderserum-albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten (chirurgische Händewaschung) <sup>c</sup> | 3,0 g/l Rinderserum-albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten                                                                            | 3,0 g/l Rinderserum-albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten    |
| zusätzlich                            | niedrige oder hohe Belastung; jede zutreffende Substanz                                               | niedrige oder hohe Belastung; jede zutreffende Substanz                                                | jede zutreffende Substanz                                                                                                               | jede zutreffende Substanz                                       |

<sup>a</sup> Die in dieser Tabelle angegebenen Einwirkzeiten für Oberflächendesinfektionsmittel werden auf der Grundlage der praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts ausgewählt. Die empfohlene Einwirkzeit für die Anwendung des Produkts liegt in der Verantwortung des Herstellers. Produkte, die zur Desinfektion von Oberflächen vorgesehen sind, die wahrscheinlich mit dem Patienten und/oder dem medizinischen Personal in Kontakt kommen, und Oberflächen, die häufig von verschiedenen Personen berührt werden, was zu einer Übertragung von Mikroorganismen auf den Patienten führt, sind mit einer Einwirkzeit von höchstens 5 min zu prüfen. Das Gleiche gilt für Fälle, bei denen die Einwirkzeit des Produktes aus praktischen Gründen begrenzt sein muss. Produkte für alle weiteren, als die oben angeführten Oberflächen dürfen mit einer Einwirkzeit von höchstens 60 min geprüft werden.

<sup>b</sup> Die Mittel für die hygienische und chirurgische Händedesinfektion müssen mindestens unter den Bedingungen niedriger Belastung geprüft werden.

<sup>c</sup> Die Mittel für die hygienische und chirurgische Händewaschung müssen mindestens unter den Bedingungen hoher Belastung geprüft werden.

**ANMERKUNG** Für die zusätzlichen Bedingungen kann die als ein Ergebnis festgelegte Konzentration geringer sein als eine unter den Mindestprüfbedingungen erhaltene Konzentration.

## 5 Prüfverfahren

### 5.1 Kurzbeschreibung

**5.1.1** Einer Prüfsuspension von Bakterien 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 gegeben. Das Gemisch wird bei einer der in Abschnitt 4 und 5.5.1.1 festgelegten Temperaturen und Einwirkzeiten gehalten. Nach dem Ende dieser Einwirkzeit wird ein aliquoter Anteil entnommen; die bakterizide und/oder bakteriostatische Wirkung in dieser Probenmenge wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. Das Verfahren der Wahl ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Wenn kein geeignetes Neutralisationsmedium gefunden werden kann, wird die Membranfiltration angewendet. Die Anzahl der überlebenden Bakterien wird in jeder Probe bestimmt und die Keimreduktion 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 von *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae* und bei bestimmten Produktarten mithilfe von *Escherichia coli* K12 als Prüfkeime durchgeführt (Abschnitt 4, Tabelle 1).

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

### 5.2 Materialien und Reagenzien

#### 5.2.1 Prüfkeime

Die bakterizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden als Prüfkeime ausgewählten Stämme nach Abschnitt 4 (Tabelle 1) zu bewerten<sup>1)</sup>:

- a) *Escherichia coli* K12, NCTC 10538;
- b) *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 15442;
- c) *Staphylococcus aureus*, ATCC 6538;
- d) *Enterococcus hirae*, ATCC 10541;
- e) *Enterococcus faecium*, ATCC 6057.

ANMERKUNG Zum Verweis auf Stämme in einigen anderen Kultursammlungen siehe Anhang A.

Die geforderte Bebrütungstemperatur für diese Prüfkeime beträgt  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  oder  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  (5.3.2.3). Die gleiche Temperatur (entweder  $36^\circ\text{C}$  oder  $37^\circ\text{C}$ ) ist für alle Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung anzuwenden.

Wenn zusätzliche Prüfkeime verwendet werden, sind diese unter den im Prüfbericht vermerkten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien) zu bebrüten. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüfkeime nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, ist deren Eignung zur Bereitstellung der geforderten Inokula zu verifizieren. Wenn diese zusätzlichen Prüfkeime 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.

---

1) Die NCTC- und 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.

## 5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

### 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 Prüfkeime wirken.

ANMERKUNG 1 Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien handelsübliche wasserfreie Materialien verwendet werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten genau befolgt werden.

ANMERKUNG 2 Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte eine zeitliche Begrenzung der Verwendung festgelegt werden.

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 [5.3.2.1 a)]. Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG Hinsichtlich des Verfahrens zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.7.

### 5.2.2.3 Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (Trypton-Soja-Agar (TSA))

Trypton-Soja-Agar, bestehend aus:

|                                                  |                    |
|--------------------------------------------------|--------------------|
| Trypton, tryptisch verdautes Casein              | 15,0 g             |
| Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl | 5,0 g              |
| Natriumchlorid (NaCl)                            | 5,0 g              |
| Agar                                             | 15,0 g             |
| Wasser (5.2.2.2)                                 | bis auf 1 000,0 ml |

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums  $7,2 \pm 0,2$  betragen.

ANMERKUNG Wenn Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auftreten, ist es möglicherweise erforderlich, dem TSA Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält eine Anleitung zu Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen. Es wird empfohlen, kein Neutralisationsmedium zu verwenden, das zu einer Trübung im Agar führt.

### 5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

|                                     |                    |
|-------------------------------------|--------------------|
| Trypton, tryptisch verdautes Casein | 1,0 g              |
| Natriumchlorid                      | 8,5 g              |
| Wasser (5.2.2.2)                    | bis auf 1 000,0 ml |

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Verdünnungsmittels  $7,0 \pm 0,2$  betragen.

#### 5.2.2.5 Neutralisationsmedium

Das Neutralisationsmedium muss für das zu prüfende Produkt nach **5.5.1.2**, **5.5.1.3** und **5.5.2** validiert sein. Das Neutralisationsmedium muss steril sein.

ANMERKUNG In Anhang **B** sind Angaben zu Neutralisationsmedien angeführt, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

#### 5.2.2.6 Spülflüssigkeit (für die Membranfiltration)

Die Spülflüssigkeit muss für das zu prüfende Produkt nach **5.5.1.2**, **5.5.1.3** und **5.5.3** validiert sein. Sie muss steril, mit der Filtermembran kompatibel und unter den in **5.5.3** beschriebenen Prüfbedingungen durch die Filtermembran filtrierfähig sein.

ANMERKUNG In Anhang **B** sind Angaben zu Spülflüssigkeiten angeführt, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

#### 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 ( $\text{MgCl}_2$ ) und 46,24 g Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) in Wasser (**5.2.2.2**) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (**5.3.2.7**) oder im Autoklaven [**5.3.2.1 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 lässt sich im Kühlschrank (**5.3.2.8**) bis zu einem Monat aufbewahren.
- Herstellung Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) in Wasser (**5.2.2.2**) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (**5.3.2.7**) sterilisiert. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (**5.3.2.8**) bis zu einer Woche aufbewahren.
- 600 ml bis 700 ml Wasser (**5.2.2.2**) werden in einen 1 000-ml-Messkolben (**5.3.2.12**) gegeben, dazu gegeben werden 6,0 ml (**5.3.2.9**) 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 (**5.3.2.4**). Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ ) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure ( $\text{HCl}$ ) 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 ( $\text{CaCO}_3$ ), 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 der modifizierten Methode, **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 Verdünnungsmittel (5.2.2.4) werden 0,30 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

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

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

#### 5.2.2.8.3 Bedingungen hoher Belastung (Gemisch von Rinderserumalbuminlösung in hoher Konzentration mit Schaf-Erythrozyten)

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

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7).

Es werden mindestens 8,0 ml frisches defibriniertes Schafsblut (5.2.2.9) hergestellt. Die Erythrozyten werden bei 800  $g_N$  für 10 min (5.3.2.13) abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Erythrozyten in Verdünnungsmittel (5.2.2.4) resuspendiert. Dieser Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt, bis der Überstand farblos ist.

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

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

#### 5.2.2.8.4 Bedingungen geringer und hoher Belastung bei dem modifizierten Verfahren für gebrauchsfertige Produkte (5.5.4)

Es sind die Verfahrensweisen zum Herstellen nach 5.2.2.8.2 und 5.2.2.8.3 einzuhalten, die Belastungssubstanz ist jedoch in einer fünffach höheren Konzentration herzustellen, für die Bedingungen hoher Belastung höchstens 50 ml um Probleme bei der Filtration zu vermeiden.

- a) Bedingungen geringer Belastung (5.2.2.8.2) — 1,50 g Rinderserumalbumin (anstelle von 0,3 g) werden in 100 ml Verdünnungsmittel gelöst;
- b) Bedingungen hoher Belastung (5.2.2.8.3) — 7,5 g Rinderserumalbumin (anstelle von 1,5 g) werden in 42,5 ml Verdünnungsmittel (anstelle von 48,5 ml) gelöst. Es ist mindestens 20 ml (anstelle von 4,0 ml) Schafsblut herzustellen. 7,5 ml (anstelle von 1,5 ml) gepackte Schaf-Erythrozyten werden in 42,5 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung resuspendiert, um 50 ml zu erhalten.

#### 5.2.2.9 Defibriniertes Schafsblut

Das defibrinierte Schafsblut sollte steril sein (aseptischer Aderlass und Vorbereitung), aus mehr als einem Schaf gewonnen sein und kann von einem kommerziellen Lieferanten bezogen werden.

### 5.3 Apparate und Glasgeräte

#### 5.3.1 Allgemeines

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

- a) durch feuchte Hitze im Autoklaven [5.3.2.1 a)];
- b) durch trockene Hitze im Heißluftsterilisator [5.3.2.1 b)].

### 5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung <sup>2)</sup>

und insbesondere folgende Geräte:

#### 5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation (feuchte und trockene Hitze)

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

**5.3.2.2 Wasserbäder**, einstellbar auf  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$  (um den TSA im Fall des Gussplattenverfahrens im verflüssigten Zustand zu halten) und zusätzliche Prüftemperaturen  $\pm 1^\circ\text{C}$  (**5.5.1**).

**5.3.2.3 Brutschrank**, einstellbar auf  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  oder  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  (**5.2.1**). Bei allen Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung muss die gleiche Temperatur verwendet werden.

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

ANMERKUNG Zur Messung des pH-Wertes der Agarmedien (**5.2.2.3**) sollte eine Einstichelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

#### 5.3.2.5 Stoppuhr.

#### 5.3.2.6 Schüttelgeräte

- a) Elektromechanisches Rührwerk, z. B. Vortex<sup>®</sup>-Mischer<sup>3)</sup>;
- b) mechanisches Schüttelgerät.

**5.3.2.7 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  $0,45\ \mu\text{m}$  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**) und für den Fall der Anwendung des Membranfiltrationsverfahrens (**5.5.3**).

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.

**5.3.2.8 Kühlschrank**, einstellbar auf  $2^\circ\text{C}$  bis  $8^\circ\text{C}$ .

**5.3.2.9 Messpipetten** mit Nennvolumina von 10 ml, 1 ml, 100  $\mu\text{l}$  und 1  $\mu\text{l}$  oder kalibrierte automatische Pipetten.

**5.3.2.10 Petrischalen**, (Platten) in den Größen 90 mm bis 100 mm.

**5.3.2.11 Glasperlen** (Durchmesser 3 mm bis 4 mm).

**5.3.2.12 Messkolben**.

**5.3.2.13 Zentrifuge** (800  $g_N$ ).

---

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

3) Vortex<sup>®</sup>-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

## 5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und der Produktprüflösungen

### 5.4.1 Prüfkeimsuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)

#### 5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüfkeim sind zwei unterschiedliche Suspensionen herzustellen: die „Prüfsuspension“ zur Durchführung der Prüfung und die „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrollversuche und der Verfahrensvalidierung.

#### 5.4.1.2 Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüfkeimen

Die Prüfkeime und deren Stammkulturen sind nach EN 12353 herzustellen und aufzubewahren.

#### 5.4.1.3 Gebrauchskultur der Prüfkeime

Um die Gebrauchskultur der Prüfkeime (5.2.1) herzustellen, ist eine Subkultur von der Stammkultur (5.4.1.2) durch Ausstrich auf TSA-Schrägarrröhrchen oder -Platten (5.2.2.3) anzulegen und zu bebrüten (5.3.2.3). Nach 18 h bis 24 h wird aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise eine zweite Subkultur angelegt und 18 h bis 24 h bebrütet. Aus dieser zweiten Subkultur darf auf gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden. Die zweite und (sofern angelegt) dritte Subkultur ist (sind) die Gebrauchskultur(en).

Wenn es nicht möglich ist, eine zweite Subkultur an einem bestimmten Tag anzulegen, darf eine 48-h-Subkultur für die nachfolgenden Subkulturen unter der Voraussetzung verwendet werden, dass die Subkultur während der 48 h im Brutschrank (5.3.2.3) verblieben ist.

Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

#### 5.4.1.4 Prüfsuspension (N)

- a) Es werden 10 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3) werden ösenweise Zellen in das Verdünnungsmittel (5.2.2.4) überführt. Das Suspendieren der Zellen im Verdünnungsmittel sollte durch Reiben der Öse an der feuchten Wand des Kolbens erfolgen, um die Zellen vor dem Eintauchen in das Verdünnungsmittel voneinander zu trennen. Unter Verwendung eines mechanischen Schüttelgeräts [5.3.2.6 b)] wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in ein Röhrchen überführt.
- b) Die Anzahl der Zellen in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) auf  $1,5 \times 10^8$  KBE/ml<sup>4)</sup> bis  $5,0 \times 10^8$  KBE/ml ( $1,5 \times 10^9$  KBE/ml bis  $5,0 \times 10^9$  KBE/ml im Fall des modifizierten Verfahrens — 5.5.4) eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mit einem geeigneten Verfahren abgeschätzt wird. Diese Prüfsuspension ist im Wasserbad bei 20 °C aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden. Die Temperatur ist nach 5.5.1.1 a) und 5.5.1.4 erst unmittelbar vor Prüfbeginn einzustellen.

**ANMERKUNG** Die Verwendung eines Spektrophotometers zur Einstellung der Zellzahl wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, Küvette mit 10 mm optischer Weglänge). Jedes Laboratorium sollte deshalb für jeden Prüfkeim Kalibrierdaten erarbeiten, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte im Allgemeinen zwischen 0,150 und 0,460 zu finden sind. Um reproduzierbare Ergebnisse dieser Messung zu erreichen, kann es erforderlich sein, die Prüfsuspension zu verdünnen, z. B. 1 + 9. Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

- c) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) Verdünnungen von  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  (Verdünnungen von  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  im Fall des modifizierten Verfahrens — 5.5.4) hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

---

4) KBE/ml = koloniebildende Einheit(en) je Milliliter.

Von jeder Verdünnung wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$  abgekühlter TSA (5.2.2.3) zugegeben.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in Anteile etwa gleicher Größe aufgeteilt und auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) von an der Oberfläche getrockneten TSA-Platten (5.2.2.3) ausgestrichen.

Die zur Auszählung der Prüfsuspension angewendete Verfahrensweise ist bei allen anderen Auszählungen, 5.4.1.5 d), 5.5.2.2 c) und d), 5.5.2.3 b), 5.5.2.4 b) und 5.5.2.5 b), anzuwenden.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

#### 5.4.1.5 Validierungssuspension ( $N_V$ , $N_{VB}$ )

- a) Zur Herstellung der Validierungssuspension ( $N_V$ ) wird die Prüfsuspension (5.4.1.4) mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) so verdünnt, dass sich  $3,0 \times 10^2$  KBE/ml bis  $1,6 \times 10^3$  KBE/ml ergeben [etwa ein Viertel (1 + 3) der Verdünnung  $10^{-5}$ ].

ANMERKUNG Im Fall des modifizierten Verfahrens (5.5.4) handelt es sich um die gleiche Verfahrensweise, aber nur ein Viertel (1+3) der Verdünnung  $10^{-4}$  wird verwendet, dies entspricht  $3,0 \times 10^3$  KBE/ml bis  $1,6 \times 10^4$  KBE/ml.

- b) Zur Herstellung der Validierungssuspension für die Kontrolle des Neutralisationsmediums ( $N_{VB}$ ) (5.5.2.4) wird die Prüfsuspension (5.4.1.4) mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) verdünnt, um  $3,0 \times 10^4$  KBE/ml bis  $1,6 \times 10^5$  KBE/ml zu erhalten [etwa ein Viertel (1 + 3) der Verdünnung  $10^{-3}$ ] ( $N_{VB}$ ).
- c) Diese Validierungssuspensionen ( $N_V$  und  $N_{VB}$ ) sind auf die gleiche Weise wie die Prüfsuspension [5.4.1.4 b)] zu erhalten und zu verwenden.
- d) Zur Auszählung wird mit Verdünnungsmittel (5.2.2.4) eine Verdünnung von  $10^{-1}$  [im Fall des modifizierten Verfahrens eine Verdünnung von  $10^{-2}$ ] hergestellt, für die Auszählung der Kontrolle des Neutralisationsmediums ist jedoch eine Verdünnung der Validierungssuspension von  $10^{-3}$  herzustellen [siehe b)].

Es ist zu durchmischen [5.3.2.6 a)].

Eine Probe von 1,0 ml wird als Doppelbestimmung entnommen und zur Beimpfung im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren [5.4.1.4 c)] verwendet.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

#### 5.4.1.6 Bebrüten und Auszählen der Prüf- und Validierungssuspensionen

- a) Die Platten werden für 20 h bis 24 h bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die aus irgendeinem Grund nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wird bestimmt. Danach werden die Platten für weitere 20 h bis 24 h bebrütet. Platten, die keine gut voneinander abgesetzten Kolonien mehr aufweisen, dürfen nicht erneut ausgezählt werden. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt. Wenn sich die Anzahl erhöht hat, darf nur die höhere Koloniezahl für die weitere Auswertung verwendet werden.
- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird  $> 330$  für alle Koloniezahlen über 330 aufgezeichnet; die  $V_c$ -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der KBE/ml in der Prüfsuspension  $N$  und in den Validierungssuspensionen  $N_V$  und  $N_{VB}$  (Kontrolle des Neutralisationsmediums 5.5.2.4) wird nach den in 5.6.2.3 und 5.6.2.5 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

## 5.4.2 Produktprüflösungen

Die Konzentration einer Produktprüflösung muss das 1,25-Fache der gewünschten Prüfkonzentration (= tatsächliche Prüfkonzentration) betragen, weil sie während der Prüfung und der Verfahrensvalidierung (5.5.2 oder 5.5.3) auf 80 % verdünnt wird.

Produktprüflösungen sind in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) herzustellen, um eine Konzentration im Wirkungsbereich und eine Konzentration im unwirksamen Bereich (5.8.2) zu erfassen. Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden; in diesem Fall beträgt die höchste geprüfte Konzentration 80 %. <sup>[A1]</sup> Gebrauchsfertige Produkte dürfen bei 97 % geprüft werden (siehe 5.5.4). <sup>[A1]</sup> In diesem Fall beträgt die „tatsächliche 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 (5.5.4) 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 g  $\pm$  10 mg des Produkts in einen Messkolben eingewogen werden und mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) aufgefüllt wird. Die nachfolgenden Verdünnungen (= niedrigere Konzentrationen) sind in Messkolben (5.3.2.12) im Verhältnis Volumen zu Volumen mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) herzustellen.

Bei flüssigen Produkten müssen die Verdünnungen des Produkts mit Wasser standardisierter Härte im Verhältnis Volumen zu Volumen in Messkolben (5.3.2.12) hergestellt werden.

Die Produktprüflösungen sind frisch herzustellen und innerhalb von 2 h in der Prüfung zu verwenden. Sie müssen eine physikalisch homogene Zubereitung ergeben, die während des gesamten Verfahrensablaufs stabil bleibt. Wenn im Verlauf des Verfahrens eine sichtbare Inhomogenität durch Bildung einer Ausfällung oder Ausflockung auftritt (z. B. infolge der Zugabe der Belastungssubstanz), muss dies im Prüfbericht angegeben werden.

**ANMERKUNG** Die Auszählung in einer Ausfällung oder Ausflockung eingebetteter Mikroorganismen ist schwierig und unzuverlässig.

Die im Prüfbericht angegebene Konzentration des Produkts muss die gewünschte Prüfkonzentration sein. Die Prüfkonzentration ist als Massenkonzentration oder als Volumenkonzentration anzugeben, ebenso Einzelheiten der Produktprobe im Lieferzustand.

## 5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der bakteriziden 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,  $\theta$  (in °C):  
Die Prüftemperaturen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt.  
Die zulässige Abweichung für jede gewählte Temperatur beträgt  $\pm 1$  °C.
- b) Einwirkzeit,  $t$  (in min):  
Die zu prüfenden Einwirkzeiten sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt.  
Die zulässige Abweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt  $\pm 10$  s, außer bei 1 min oder weniger, wo sie  $\pm 5$  s beträgt.