

DIN EN 1500

ICS 11.080.20; 71.100.35

Ersatz für
DIN EN 1500:2013-07

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Hygienische Händedesinfektion –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2);
Deutsche Fassung EN 1500:2013**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Hygienic handrub –
Test method and requirements (phase 2/step 2);
German version EN 1500:2013

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Traitement hygiénique de mains par frictions –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2/étape 2);
Version allemande EN 1500:2013

Gesamtumfang 41 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm (EN 1500:2013) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) unter Beteiligung deutscher Experten erstellt. Bei DIN Deutsches Institut für Normung e. V. ist hierfür im Normenausschuss Medizin der Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ zuständig.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 1500:1997-10 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) andere statistische Auswertmethode. Die Probandenzahl wurde deshalb leicht erhöht, um eine gleiche statistische Sicherheit zu haben wie vorher;
- b) Aufnahme der Neutralisierungsvalidierung;
- c) eine weitere Harmonisierung von Struktur und Wortlaut mit anderen Normen des CEN/TC 216 wurde vorgenommen.

Gegenüber DIN EN 1500:2013-07 wurden folgende Korrekturen vorgenommen:

- a) falsch zugeordnete Texte zu den 6 Schritten des Standard-Einreibeverfahrens im Anhang A wurden korrigiert;
- b) in 5.8 wurde die Verwendung des Wilcoxon als Anforderung eindeutiger übersetzt und die Referenz korrigiert;
- c) in Anhang E wurde der Mittelwert der lg-Vorwerte für RP in 6,78 (statt 6,60) für die Überprüfung der Annahmekriterien nach 5.7.1 a) bis e) (nach Tabelle E.3) korrigiert;
- d) redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN 1500: 1997-10, 2013-07

Deutsche Fassung

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Hygienische Händedesinfektion —
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2)

Chemical disinfectants and antiseptics —
Hygienic handrub —
Test method and requirements (phase 2/step 2)

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Traitement hygiénique de mains par frictions —
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2/étape 2)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 1. März 2013 angenommen.

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

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

Inhalt

Seite

Vorwort	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Anforderungen	4
5 Prüfverfahren	5
5.1 Kurzbeschreibung	5
5.2 Materialien und Reagenzien	5
5.2.1 Prüfkeim	5
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	5
5.3 Apparate und Glasgeräte	8
5.3.1 Allgemeines	8
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	9
5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und der Produktprüflösungen	10
5.4.1 Prüfkeimsuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)	10
5.4.2 Produktprüflösungen	12
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der bakteriziden Wirksamkeit des Produkts auf den Händen von Probanden	12
5.5.1 Allgemeines	12
5.5.2 Neutralisation — Kontrolle und Validierung	14
5.5.3 Prüfverfahren mit Probanden	15
5.5.4 Bebrütung und Auszählung des Prüfgemischs sowie der Kontroll- und Validierungsgemische	17
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	17
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen	17
5.6.2 Berechnung	17
5.7 Verifizierung des Verfahrens — Validierung des Versuchs	21
5.7.1 Annahmekriterien für Prüfergebnisse	21
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	21
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	21
5.8 Statistische Auswertung (Signifikanzprüfung), Angabe der Ergebnisse und Präzision	22
5.9 Schlussfolgerung	22
5.10 Prüfbericht	22
Anhang A (normativ) Standard-Einreibeverfahren	24
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten	25
Anhang C (informativ) Kontrolle und Validierung von Neutralisationsmedien	27
Anhang D (informativ) Qualitätskontrolle der Kaliseife	28
Anhang E (informativ) Beispiele für die Angabe der Ergebnisse und die Signifikanzprüfung	29
Anhang F (normativ) Test auf Nicht-Unterlegenheit	37
Literaturhinweise	39

Vorwort

Dieses Dokument (EN 1500:2013) 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 Oktober 2013, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2013 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 ersetzt EN 1500:1997.

Die Norm wurde überarbeitet, um sie dem neuesten Stand der Wissenschaft anzupassen, Fehler und Unklarheiten zu beheben, um die Struktur und den Wortlaut mit anderen bestehenden oder in Vorbereitung befindlichen Prüfungen des CEN/TC 216 zu harmonisieren und die Lesbarkeit der Standard zu verbessern und sie damit verständlicher zu machen. Die folgenden technischen Änderungen wurden vorgenommen:

- Neutralisation (5.5.1.2),
- die Anzahl der Probanden (5.5.1.4),
- die statistische Auswertung (5.8).
- Die Anhänge wurden komplett überarbeitet.

Daten die unter Verwendung der früheren Version von EN 1500 erzeugt wurden, dürfen weiter verwendet werden, wenn sie durch Daten der Neutralisation, zusätzliche Ergebnisse von weiteren Probanden ergänzt werden und die neue statistische Auswertung aus den "gemischten" (alten und neuen) Datensätzen angewendet wurde. Die zusätzlichen Ergebnisse sollten vorzugsweise im gleichen Labor und mit Probanden durchgeführt werden, die nicht an der vorherigen ("alten") Studie teilgenommen haben. Wenn das Neutralisationsmittel, das in der Prüfung mit der früheren Version verwendet wurde, nicht ausreichend zu neutralisieren ist, sollte eine komplette neue Prüfung durchgeführt werden. Das veränderte Verfahren nach Anhang A wird als ohne (oder vernachlässigbaren) Einfluss auf die Ergebnisse betrachtet.

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.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren fest, das praktische Bedingungen simuliert um festzustellen, ob ein Produkt für die hygienische Händedesinfektion die Abgabe der auf den Händen befindlichen transienten mikrobiellen Flora verringert, wenn es auf den künstlich kontaminierten Händen von freiwilligen Probanden verrieben wird.

ANMERKUNG 1 Es wird darauf hingewiesen, dass Versuche mit menschlichen Probanden in bestimmten europäischen Ländern/Regionen gesetzlichen Bestimmungen unterliegen.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte zur hygienischen Händedesinfektion, die in Bereichen und unter Bedingungen angewendet werden, wo eine Desinfektion 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 von Patienten dienen.

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

ANMERKUNG 2 Das Verfahren entspricht einer Prüfung der Phase 2, Stufe 2.

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 der Prüfung nach Abschnitt 5 darf die bei der hygienischen Händedesinfektion mit dem zu prüfenden Produkt erreichte mittlere Reduktion der Abgabe des Prüfkeims *Escherichia coli* K12 zumindest nicht unterlegen sein im Vergleich zu der mit einem festgelegten Mittel für die hygienische Referenz-Händedesinfektion (Propan-2-ol mit einer Volumenkonzentration von 60 %) erreichte Reduktion.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Die Hände von Probanden werden künstlich mit Prüfkeimen kontaminiert. Die Anzahl der von den Fingerringen in eine Probenahme Flüssigkeit abgegebenen Prüfkeime wird vor und nach der Durchführung der hygienischen Händedesinfektion ermittelt. Das Verhältnis der beiden sich ergebenden Werte stellt ein Maß für die antimikrobielle Wirksamkeit des geprüften Produktes dar. Die erforderliche Präzision wird durch eine Versuchswiederholung an 18 bis 22 Probanden erreicht. Um äußere Einflüsse zu kompensieren, erfolgt ein Vergleich mit der Reduktion, die in einer mit denselben Probanden, am selben Tag und unter vergleichbaren Umgebungsbedingungen durchgeführten Referenz-Händedesinfektion erhalten worden ist.

Vor der Prüfung wird ein geeignetes Neutralisationsmedium validiert. Das Neutralisationsmedium wird als Probenahme Flüssigkeit zur Keimrückgewinnung von Prüfkeimen nach der hygienischen Händedesinfektion verwendet um sicherzustellen, dass die bakterizide und/oder bakteriostatische Wirkung in der Probenahme Flüssigkeit neutralisiert oder unterdrückt wird.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfkeim

Escherichia coli K12 NCTC 10538, CIP 54.117, NCIMB 10083¹⁾

ANMERKUNG Dieser Prüfkeim wurde speziell ausgewählt, um den Anforderungen von Leitfäden zur Sicherheit und zum Gesundheitsschutz sowie von Ethikkommissionen Rechnung zu tragen. Es handelt sich um einen K12 Stamm von *E. coli* mit Herkunft aus der Normalflora, welcher international als nicht-pathogen anerkannt wird. Nach dem Katalog der Nationalen Sammlung von Industrie- und Meeresbakterien des Vereinigten Königreiches (National Collections of Industrial & Marine Bacteria (siehe Literaturhinweis [2])), wird der NCIMB-Stamm 10083 als Organismus der Risikogruppe 1 klassifiziert. Auch in der deutschen Gentechnik-Sicherheitsverordnung [3] wird der K12-Stamm der Gruppe 1 zugeordnet. In Richtlinie 93/88/EWG [4] (Anhang III zur Richtlinie 90/679/EWG [5]) kommt explizit zum Ausdruck, dass nicht-pathogene Stämme von *Escherichia coli* von der Zuordnung zu Gruppe 2 *ausgenommen* sind.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in dieser Europäischen Norm angegebenen Massen von chemischen Substanzen beziehen sich auf wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um daraus folgende Differenzen in den relativen Molekülmassen zu berücksichtigen.

Die Reagenzien müssen analysenrein und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Sie müssen frei von Substanzen sein, die toxisch oder hemmend auf die Prüfkeime wirken. 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 strengstens befolgt werden. Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte ein Endverbrauchsdatum festgelegt werden.

¹⁾ Die NCTC-, CIP- und NCIMB-Nummern sind die Sammlungsnummern dieses Stammes, der durch diese Kultursammlungen vertrieben wird. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN.

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)]. Eine 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 Trypton-Soja-Agar und selektiver Trypton-Soja-Agar

a) 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 des Mediums, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $7,2 \pm 0,2$ betragen.

ANMERKUNG 1 TSA wird zur Herstellung und zur Auszählung von N , N_V und N_{VB} (5.4.1.4, 5.4.1.5) verwendet.

b) Selektiver Trypton-Soja-Agar (TSSA)

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
Natriumdesoxycholat	0,5 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 des Mediums, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $7,2 \pm 0,2$ betragen.

ANMERKUNG 2 TSSA wird für die quantitativen Kulturen der Probenahme Flüssigkeiten und deren Verdünnungen (5.5.3.2, 5.5.3.3.4) verwendet.

5.2.2.4 Trypton-Soja-Bouillon (TSB)

Trypton-Soja-Bouillon, bestehend aus:

Trypton, tryptisch verdautes Casein	15,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	5,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 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 des Mediums, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

Das Neutralisationsmedium muss für das zu prüfende Produkt nach 5.5.1.2, 5.5.2.1 und 5.5.2.2 ausgewählt, kontrolliert und validiert sein. Es sind nur Neutralisationsmedien zulässig, bei denen TSB (5.2.2.4) als Verdünnungsmittel verwendet wird. Das Neutralisationsmedium muss steril sein. Das Neutralisationsmedium wird nur durch Verdünnung neutralisiert.

ANMERKUNG In Anhang B finden sich Angaben über Neutralisationsmedien, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.6 Verdünnte Kaliseife

Leinöl	50 Masseteile
Kaliumhydroxid [1]	9,5 Masseteile
Ethanol (mindestens 95%ig) [1]	7 Masseteile
Heißes destilliertes Wasser $(75 \pm 5) ^\circ\text{C}$	nach Bedarf

Es wird eine Lösung aus 9,5 Teilen Kaliumhydroxid in 15 Teilen Wasser (5.2.2.2) hergestellt, zu der 50 Teile Leinöl zugegeben werden. Der Ansatz wird unter ständigem Rühren auf etwa $70 ^\circ\text{C}$ erwärmt. Nach Zusatz des Ethanols wird das Erwärmen unter Rühren fortgesetzt, bis der Verseifungsprozess beendet ist und sich eine Probe in Wasser klar und in Ethanol fast klar löst. Die Masse der Kaliseife wird anschließend durch Zusatz von auf $(75 \pm 5) ^\circ\text{C}$ erwärmtem Wasser (5.2.2.2) zum Verdünnen der Kaliseife auf 100 Teile gebracht. 200 g der Kaliseife werden entnommen, mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 g aufgefüllt und im Autoklaven [5.3.2.1a)] sterilisiert. Der pH-Wert der Endverdünnung der Kaliseife muss zwischen 10,0 und 11,0 liegen.

Zur Qualitätskontrolle der Kaliseife siehe Anhang D.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

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

- Herstellung von Lösung A: 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die 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 von Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7). Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einer Woche aufbewahren.
- In einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) 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 $7,0 \pm 0,2$, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.4), betragen. Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt.

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

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

5.2.2.8 Propan-2-ol als Mittel für die Referenz-Händedesinfektion [52,3 % (Massenkonzentration), das entspricht 60 % (Volumenkonzentration) bei 20 °C]

471 g Propan-2-ol [1] mit einem Reinheitsgrad von mindestens 99,5 % (Volumenanteil) (bestimmt durch Gaschromatographie, mit einer Dichte von 0,785) werden in einen mit einem Glasstopfen ausgestatteten 1 000-ml-Kolben, der auf der Wägefläche einer Waage (mit einer Präzision von 0,1 g) steht, gefüllt. 429 g Wasser (5.2.2.2) werden hinzugefügt. Das ergibt ein Volumen von etwa 1 000 ml. Der Kolben wird mit dem passenden Glasstopfen verschlossen und der Inhalt wird gründlich geschüttelt.

ANMERKUNG Diese Lösung kann bei Raumtemperatur geschützt vor Lichteinwirkungen für unbestimmte Zeit aufbewahrt 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 Heißluft-Sterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²⁾

und besonders folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf (20 ± 1) °C und (45 ± 1) °C (um den TSA und TSSA beim Gussplattenverfahren im verflüssigten Zustand zu halten).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf (36 ± 1) °C oder (37 ± 1) °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 ± 1) °C. Für die Messung des pH-Werts 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®-Mischer³⁾;
- b) mechanisches Schüttelgerät.

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem Material, das mit den zu filtrierenden Substanzen verträglich ist.

Das Gerät muss mit einem Filterhalter von mindestens 50 ml Nutzvolumen ausgestattet sein. Er muss zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von 0,45 µm für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) geeignet sein.

Die verwendete Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen. 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 °C bis 8 °C.

5.3.2.9 Messpipetten mit einem Nennvolumen von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml oder kalibrierte automatische Pipetten.

5.3.2.10 Petrischalen (Platten) mit einem Durchmesser von 90 mm bis 100 mm.

²⁾ Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

³⁾ Ein Vortex®-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.

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

5.3.2.12 Messkolben.

5.3.2.13 Spatel, aus Glas oder anderem Material.

5.3.2.14 Behälter ausreichender Größe, um gleichzeitig beide senkrecht gehaltenen Hände bis zur Mitte der Mittelhand in 2 l Kontaminationsflüssigkeit aufnehmen zu können.

5.3.2.15 Zwei Flaschen mit einem Mindestvolumen von 1 l.

5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüfkeimsuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

Für den Prüfkeim müssen zwei unterschiedliche Suspensionen hergestellt werden: die „Prüfsuspension“, d. h. die Kontaminationsflüssigkeit zur Durchführung der Prüfung, und die „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrollversuche und der Verfahrensvalidierung.

5.4.1.2 Aufbewahrung und Stammkulturen der Prüfkeime

Der Prüfkeim und dessen Stammkulturen sind nach EN 12353 herzustellen und aufzubewahren.

5.4.1.3 Gebrauchskultur der Prüfkeime

Zur Herstellung der Gebrauchskultur des Prüfkeims (5.2.1) wird aus der Stammkultur (5.4.1.2) eine erste Subkultur durch Ausstreichen auf Schrägagar oder Platten aus TSA [5.2.2.3 a)] angelegt und bebrütet (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. Die zweite Subkultur wird zur Herstellung der Prüfsuspension verwendet.

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

5.4.1.4 Prüfsuspension („N“)/Kontaminationsflüssigkeit

- a) Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3) werden ösenweise Zellen in zwei Röhrchen mit jeweils 5 ml TSB (5.2.2.4) überführt und 18 h bis 24 h bebrütet (5.3.2.3). Diese Kulturen werden in zwei Flaschen (5.3.2.15) mit jeweils höchstens 1 l TSB (5.2.2.4) überimpft und erneut 18 h bis 24 h bebrütet (5.3.2.3). Die erhaltenen Bakteriensuspensionen werden in einem Behälter (5.3.2.14) vereinigt.
- b) Mit TSB (5.2.2.4) wird die Zellzahl in der Suspension auf $1,5 \times 10^8$ KBE/ml⁴) bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mittels eines geeigneten Verfahrens abgeschätzt wird. Diese Prüfsuspension ist im Wasserbad bei 20 °C aufzubewahren und innerhalb von 4 h als Kontaminationsflüssigkeit und zur Herstellung der Validierungssuspensionen (5.4.1.5) zu verwenden. 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 Kalibrierdaten für jeden Prüfkeim 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.

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

ANMERKUNG Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

- c) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit TSB (5.2.2.4) Verdünnungen von 10^{-6} und 10^{-7} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Von jeder Verdünnung wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und zur Beimpfung im Gussplattenverfahren oder im Spatelplattenverfahren verwendet.
- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1-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 a)] zugegeben.
 - 2) Bei Anwendung des Spatelplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in etwa gleiche Anteile geteilt und auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) an der Oberfläche getrockneter TSA-Platten [5.2.2.3 a)] ausgestrichen.

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 TSB (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}].
- b) Zur Herstellung der Validierungssuspension für die Kontrolle des Neutralisationsmediums (5.5.2.1) („ N_{VB} “) wird die Prüfsuspension (5.4.1.4) mit TSB (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}) werden auf die gleiche Weise wie die Prüfsuspension [5.4.1.4 b)] erhalten und verwendet.
- d) Zur Auszählung wird mit TSB (5.2.2.4) eine Verdünnung 10^{-1} hergestellt, zur Auszählung der Kontrolle des Neutralisationsmediums wird jedoch eine Verdünnung der Validierungssuspension von 10^{-3} hergestellt [siehe b)].

Es wird durchmischt [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 Bebrütung und Auszählung der Prüf- und Validierungssuspensionen

- a) Die Platten werden 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 KBE wird bestimmt. Danach werden die Platten 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, wird nur die höhere Koloniezahl für die weitere Auswertung verwendet.
- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird „> 330“ für alle Koloniezahlen über 330 aufgezeichnet, und 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} “ wird nach den in 5.6.2.3 und 5.6.2.5 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.