

DIN EN 16615

ICS 11.080.20

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitatives Prüfverfahren zur Bestimmung der bakteriziden und
levuroziden Wirkung auf nicht-porösen Oberflächen mit mechanischer
Einwirkung mit Hilfe von Tüchern im humanmedizinischen Bereich
(4-Felder-Test) –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche Fassung EN 16615:2015**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative test method for the evaluation of bactericidal and yeasticidal activity on
non-porous surfaces with mechanical action employing wipes in the medical area (4-field
test) –
Test method and requirements (phase 2, step 2);
German version EN 16615:2015

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Méthode d'essai quantitative pour l'évaluation de l'activité bactéricide et levuricide sur
des surfaces non poreuses, avec action mécanique à l'aide de lingettes dans le domaine
médical (essai à 4 zones) –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2);
Version allemande EN 16615:2015

Gesamtumfang 45 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16615:2015) 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.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed) verantwortlich.

Deutsche Fassung

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitatives
Prüfverfahren zur Bestimmung der bakteriziden und levuroziden
Wirkung auf nicht-porösen Oberflächen mit mechanischer
Einwirkung mit Hilfe von Tüchern im humanmedizinischen
Bereich (4-Felder-Test) - Prüfverfahren und Anforderungen
(Phase 2, Stufe 2)**

Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative test
method for the evaluation of bactericidal and yeasticidal
activity on non-porous surfaces with mechanical action
employing wipes in the medical area (4- field test) -
Test method and requirements (phase 2, step 2)

Antiseptiques et désinfectants chimiques - Méthode d'essai
quantitative pour l'évaluation de l'activité bactéricide et
levuricide sur des surfaces non poreuses, avec action
mécanique à l'aide de lingettes dans le domaine médical
(essai à 4 zones) -
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 3. Januar 2015 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

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

Inhalt

Seite

Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	6
5.1 Kurzbeschreibung	6
5.2 Materialien und Reagenzien	7
5.2.1 Prüfkeim.....	7
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	7
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.....	13
5.4.1 Prüfkeimsuspensionen	13
5.4.2 Produktprüflösung.....	15
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der bakteriziden und levuroziden Wirkung des Produkts	16
5.5.1 Allgemeines	16
5.5.2 Verfahren	18
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	21
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen.....	21
5.6.2 Berechnung	21
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.....	27
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision.....	28
5.8.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen/Prüfgemische	28
5.8.2 V_C -Werte	28
5.8.3 Limitierender Prüfkeim sowie bakterizide und levurozide Konzentration.....	29
5.8.4 Präzision, Wiederholungen.....	29
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	29
5.9.1 Bakterizide Interpretation der Ergebnisse:	29
5.9.2 Levurozide Interpretation der Ergebnisse:	30
5.10 Prüfbericht.....	30
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	32
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien	33
Anhang C (informativ) Graphische Darstellungen des Prüfverfahrens.....	35
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts.....	38
Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EU-Richtlinie 93/42/EWG	42
Literaturhinweise	43

Vorwort

Dieses Dokument (EN 16615:2015) 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 2015, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2015 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 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.

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 Keimträgerversuch zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel zur Anwendung auf Oberflächen durch Aufbringen mit Tüchern im Rahmen der im Anwendungsbereich beschriebenen Anwendungsgebiete eine bakterizide und levurozide Wirkung aufweist, fest.

Der Laboratoriumsversuch simuliert praxisnahe Anwendungsbedingungen, wie z. B. Einwirkzeit, Temperatur und Belastungssubstanzen, einschließlich des vorherigen Antrocknens von festgelegten Prüfkeimen auf einer Prüffläche als Träger und des Abwischens des Produktes auf der Prüffläche mit einem Tuch. Die Bedingungen sollen allgemeinen Ansprüchen genügen. Wenn jedoch bei einigen Anwendungsarten die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt abweichen, dürfen oder müssen zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

Jede durch diese Prüfung ermittelte Gebrauchskonzentration des Produktes entspricht festgelegten Versuchsbedingungen.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die bakterizide und levurozide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte als homogene, physikalisch stabile Zubereitung vorliegen, bzw. bei gebrauchsfertigen Produkten bei der Verdünnung mit Wasser.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die im medizinischen Bereich zur Desinfektion von nicht-porösen Oberflächen, einschließlich Oberflächen auf Medizinprodukten, durch Abwischen verwendet werden — unabhängig davon, ob sie in der Richtlinie 93/42/EWG über Medizinprodukte erfasst sind oder nicht.

Diese Europäische Norm gilt auch für „gebrauchsfertige Tücher“, die mit einer mikrobiziden Lösung getränkt sind.

Diese Europäische Norm gilt für Bereiche und unter Bedingungen, 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 der Patienten dienen.

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

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 13624, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel für Instrumente im humanmedizinischen Bereich — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

EN 13727, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

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 dem mit Wasser standardisierter Härte oder — bei gebrauchsfertigen Produkten — mit Wasser verdünnten und nach Abschnitt 5 unter simulierter niedriger Belastung (0,3 g/l Rinderserumalbumin) oder simulierter hoher Belastung (3,0 g/l Rinderserumalbumin und 3,0 ml/l Schaf-Erythrozyten) entsprechend seiner praktischen Anwendungen und unter den folgenden Prüfbedingungen: vier ausgewählte Prüfkeime, Temperatur zwischen 4 °C und 30 °C, Einwirkzeit mindestens 1 min und höchstens entweder 5 min oder 60 min¹⁾ geprüften Produkt muss eine dezimal-logarithmische (lg) Reduktion der Lebendkeimzahl um mindestens 5 Stufen (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*) oder 4 Stufen (*Candida albicans*) auf dem Prüffeld 1 nachgewiesen werden. Der Mittelwert der koloniebildenden Einheiten (KBE) auf den Prüffeldern 2 bis 4 muss gleich oder weniger als 50 betragen, der Mittelwert der KBE des Kontrollversuchs mit Wasser muss gleich oder mehr als 10 betragen.

Die bakterizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden Prüfkeime zu bewerten: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Die levurozide Wirkung ist unter Verwendung des folgenden Prüfkeims zu bewerten: *Candida albicans*.

Wo es angezeigt ist, muss die spezifische bakterizide und levurozide Wirkung zusätzlich unter Anwendung anderer Einwirkzeiten und Prüfkeime bestimmt werden, um besondere bestimmungsgemäße Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

ANMERKUNG Bei diesen zusätzlichen Bedingungen kann die als Ergebnis festgestellte Konzentration niedriger sein als die unter den Mindestprüfbedingungen erhaltene Konzentration.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Prüffläche wird mit vier hintereinander liegenden Quadraten von 5 cm × 5 cm, den „Prüffeldern“, markiert. Prüffeld 1 auf der Prüffläche wird mit einer Prüfsuspension von Bakterien oder Hefen in einer Lösung von Belastungssubstanzen beimpft. Das Inokulum wird trocknen gelassen. Ein Tuch wird mit einer Probe des Produkts im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (oder Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten) verdünnten Produkts getränkt. Die Prüffläche wird mit dem getränkten Tuch über die vier markierten Prüffelder gewischt, beginnend vor dem Prüffeld 1, wobei unmittelbar nach Prüffeld 4 gewendet und zurück zum Startpunkt gewischt wird. Parallel wird ein Kontrollversuch mit Wasser durchgeführt: ein Tuch wird mit Wasser (5.5.2.2 e)) anstelle des Produkts getränkt.

Temperatur, Verschmutzung und Einwirkzeit werden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers angewendet. Am Ende der Einwirkzeit werden die Prüfkeime von jedem Prüffeld mit befeuchteten Wattetupfern zurückgewonnen. Die Tupfer werden in ein Röhrchen eingebracht, das eine Bouillon und ein Neutralisationsmedium enthält, und die Prüfkeime werden durch Schütteln vom Tupfer abgetrennt. Die Anzahl der überlebenden Prüfkeime in jeder Probe wird bestimmt und die Keimreduktion wird berechnet, indem die Ergebnisse des Kontrollversuchs zur Trocknung D_{Ct} und die mit dem Produkt erhaltenen Ergebnisse verglichen werden. Parallel zu dieser Prüfung mit dem Produkt wird Wasser in der gleichen Weise aufgebracht, um sicherzustellen, dass die Prüforganismen den 4 Feldern verteilt wurden, und ihre Anzahl einen bestimmten Wert erreicht hat. Die Prüfung wird unter Verwendung von *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. hirae* und *C. albicans* als Prüfkeime (Mindestprüfbedingungen) durchgeführt.

5.1.2 Zusätzliche Prüfkeime (nur Bakterien- oder Pilzstämmen), Einwirkzeiten und Belastungssubstanzen können verwendet werden.

1) Siehe 5.5.1.1 b).

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfkeim

Die bakterizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden als Prüfkeime ausgewählten Stämme²⁾ zu bewerten:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442;
- *Enterococcus hirae* ATCC 10541.

Die levurozide Wirkung ist unter Verwendung des folgenden als Prüfkeim ausgewählten Stamms³⁾ zu bewerten:

- *Candida albicans* ATCC 10231.

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

Wenn zusätzliche Prüfkeime verwendet werden, sind diese unter den im Prüfbericht vermerkten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre und 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.

Die geforderte Bebrütungstemperatur für diese Prüfbakterien beträgt $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.3). Die gleiche Temperatur ($36 ^\circ\text{C}$ oder $37 ^\circ\text{C}$) ist für alle Bebrütungen während deren Kontrolle und Validierung anzuwenden. Die geforderte Bebrütungstemperatur für *Candida albicans* beträgt $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.3).

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 den Prüfkeim wirken.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien handelsübliche wasserfreie Materialien verwendet werden, wenn sie den nachstehend angeführten Mischungsverhältnissen entsprechen. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten genau befolgt werden.

Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte eine (zeitliche) Begrenzung der Verwendung festgelegt werden.

Alle festgelegten pH-Werte werden bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.4) gemessen.

2) Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von American Type Culture Collections (ATCC) geliefert werden. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

3) Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von American Type Culture Collections (ATCC) geliefert werden. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes oder entionisiertes und entmineralisiertes Wasser sein. Falls kein destilliertes oder entionisiertes und entmineralisiertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, darf Wasser für Injektionszwecke (siehe [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.

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

5.2.2.3 Medium

a) Soja-Agar (TSA)

— 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 1000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven (5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums $7,2 \pm 0,2$ betragen.

Wenn Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2) 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.

b) Malzextrakt-Agar (MEA)

Malzextrakt-Agar, bestehend aus:

— Malzextrakt	30,0 g
— Agar	15,0 g
— Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven (5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $5,6 \pm 0,2$ betragen (5.3.2.4).

Wenn Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2) auftreten, ist es möglicherweise erforderlich, dem MEA 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

a) Allgemeines Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung:

— Trypton, tryptisch verdautes Casein	1,0 g
— Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g
— Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven (5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des allgemeinen Verdünnungsmittels $7,0 \pm 0,2$ betragen.

b) Verdünnungsmittel mit Glycerol (nur für *Pseudomonas aeruginosa*)

Trypton-Natriumchlorid-Glycerol-Lösung:

— Trypton, tryptisch verdautes Casein	1,0 g
— Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g
— Glycerol [Literaturhinweis 1]	2,0 g
— Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven (5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Verdünnungsmittels $7,0 \pm 0,2$ betragen.

Dieses modifizierte Verdünnungsmittel [5.2.2.4 b)] darf nur für die Herstellung der Prüfsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* (5.4.1.4) verwendet werden. Alle weiteren Verdünnungen sollten mit dem allgemeinen Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] durchgeführt werden.

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

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

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

5.2.2.6 Steriles defibriniertes Schafsblut

Steriles defibriniertes Schafsblut kann von einem kommerziellen Lieferanten bezogen werden.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

a) Allgemeines Wasser standardisierter Härte

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

- Herstellung von Lösung A: Es werden 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7) 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: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in Wasser 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 werden 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B gegeben. Nach dem 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 (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.

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

b) Wasser standardisierter Härte mit Zugabe von Polysorbate 80

Verwenden Sie das in 5.2.2.7 a) beschriebenen Verfahren. Am Ende wird 1 ml Polysorbat 80 pro Liter zugegeben. Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration. Das Wasser standardisierter Härte mit der Zugabe von Polysorbat 80 ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

5.2.2.8 Belastungssubstanzen

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.

Die Ionenzusammensetzung (z. B. pH-Wert, Calcium- und/oder Magnesiumhärte) und die chemische Zusammensetzung (z. B. Mineralstoffe, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, 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 allgemeinen Verdünnungsmittels [5.2.2.4 a)] 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) beträgt 0,3 g/l.

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

In 97 ml allgemeinen Verdünnungsmittels [5.2.2.4 a)] 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 steriles defibriniertes Schafsblut (5.2.2.6) hergestellt. Das Schafsblut wird bei 800 g_N für 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Erythrozyten im allgemeinen Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] 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 Kontamination zu verhindern, sollte dieses Gemisch in Portionen aufgeteilt werden, die wahrscheinlich an einem Tag verwendet werden, und in gesonderten Behältern in einem Kühlschrank bei 2 °C bis 8 °C 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.

5.3 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 Laborausrüstung⁴⁾

und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation:

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf (20 ± 1) °C und (45 ± 1) °C [um den TSA im Fall des Gussplattenverfahrens im verflüssigten Zustand zu halten und auf zusätzliche Prüftemperaturen ± 1 °C (5.5.1)].

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf (36 ± 1) °C oder (37 ± 1) °C (Bakterien) oder auf (30 ± 1) °C (Hefen). Bei allen Bebrütungen der Bakterien 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. 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[®]-Mischer⁵⁾;
- 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 µm für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) und Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2 und 5.2.2.8.3).

Die verwendete Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen.

5.3.2.8 Kühlschrank, einstellbar auf 2 °C bis 8 °C.

5.3.2.9 Messpipetten mit Nennvolumina von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml. Kalibrierte automatische Pipetten dürfen angewendet werden.

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.

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

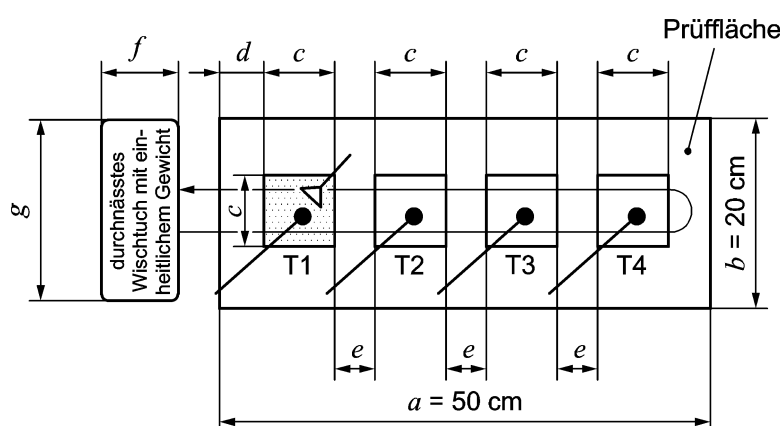
5) Vortex[®]-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.3.2.13 Zentrifuge (800 g_N).

5.3.2.14 Rechteckige Glasspatel (4 cm Kantenlänge).

5.3.2.15 Öse (aus Metall oder Kunststoff).

5.3.2.16 **Prüffläche**, aus PVC mit PUR-Oberflächenvergütung, Dicke 2,5 mm, Maße 20 cm $\times$ 50 cm. Die Prüffläche wird mit 70%igem n-Propanol gereinigt. Nach dem Trocknen werden mit einem Bleistift oder Permanentmarker vier Quadrate als Prüffelder 1 bis 4 markiert, wobei jedes die Maße 5 cm $\times$ 5 cm aufweist und alle in einer Reihe mit einem Abstand zueinander von 5 cm angeordnet sind. Die Reihe sollte sich annähernd in der Mitte der Prüffläche befinden (siehe Bild 1). Die Kontrollversuche zur Trocknung D_{C0} und D_{Ct} werden auf einer kleineren Prüffläche mit den min. Maßen 7 cm $\times$ 13 cm durchgeführt, auf dem zwei Quadrate von 5 cm $\times$ 5 cm markiert werden. (Beispiel für die Prüffläche: „DLW Solid Pur 521-029 2,0mm“, Artikelnummer: 6235, Hersteller: „Armstrong“, Stuttgarter Str. 75, 74321 Bietigheim Bissingen⁶⁾).



Legende

Schematische Darstellung der Prüffläche:

$a = 50$ cm $b = 20$ cm

mit vier Prüffeldern T1 bis T4 (5 cm $\times$ 5 cm) und einem vorgegebenen Bereich der Wischerbreite.

$c = 5$ cm $d = 10$ cm $e = 5$ cm

Größe des einheitlichen Gewichts:

$f = 8,6$ cm $g = 12,1$ cm

Prüffeld 1 wird mit 0,05 ml des Gemisches aus Prüfkeimen und Belastungssubstanz ($1,5$ bis $5,0 \times 10^9$ KBE/ml, was einer endgültigen Keimzahl auf dem Prüffeld 1 von $6,75 \times 10^7$ KBE bis $2,25 \times 10^8$ KBE entspricht; bei *Candida albicans* $1,5$ bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml, was einer endgültigen Keimzahl auf dem Prüffeld 1 von $6,75 \times 10^6$ KBE bis $2,25 \times 10^7$ KBE entspricht) beimpft. Der Pfeil stellt den Reinigungsdurchgang mit dem Tuch dar. Der Startpunkt liegt vor dem Prüffeld 1 und die Wendung erfolgt unmittelbar nach dem Prüffeld 4. Der Endpunkt des Wischprozesses ist der Startpunkt, nachdem Prüffeld 1 zum zweiten Mal passiert wurde.

Bild 1 — Schematische Darstellung der Markierungen und des Wischdurchgangs über vier Prüffelder auf der Prüffläche

6) Diese Prüffläche 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.