

DIN EN 16616



ICS 11.080.20

Ersatz für
DIN EN 16616:2015-10

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Chemothermische Wäschedesinfektion –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche Fassung EN 16616:2022**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Chemical-thermal textile disinfection –
Test method and requirements (phase 2, step 2);
German version EN 16616:2022

Désinfectants chimiques et antiseptiques –
Désinfection thermochimique du textile –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2);
Version allemande EN 16616:2022

Gesamtumfang 53 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16616:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed).

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 2267 siehe DIN ISO 2267

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 16616:2015-10 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) den Anwendungsbereich an den Anwendungsbereich der WG 1 angepasst;
- b) in Abschnitt 4 die Anforderungen für die Tests der Phase 2, Stufe 1 gestrichen;
- c) in 5.2.2.4 Wasser für die Prüfung und die Referenzkontrolle hinzugefügt;
- d) das Beispiel für Waschmaschinen aus 5.3.2.18 der früheren Fassung in den neuen Anhang D „Beispiel einer Waschmaschine“ aufgenommen;
- e) das Gerät Potter S 1 hinzugefügt (5.3.2.22);
- f) 5.4.3.1 bis 5.4.3.3.3 an andere aktuelle Normen angepasst;
- g) die Beschreibung der Neutralisation (5.5.1.2) neu formuliert und eine Verweisung auf die Tests der Phase 2, Stufe 1 hinzugefügt;
- h) in 5.4.4.3 eine Information über die Verwendung eines Spektrophotometers zur Zählung der Zellzahlen von Mykobakterien hinzugefügt;
- i) Dokumentation und Begründung zur Wahl des Neutralisationsmittels im Prüfbericht (5.5.1.2, 5.10) aufgenommen;
- j) eine Referenzkontrolle hinzugefügt (5.5.2.3);
- k) RII gestrichen (5.5.2.5);
- l) in 5.6.1.1 die Tabelle korrigiert und an die aktuellen Prüfungen angepasst;
- m) in 5.6.2.1 zwei Absätze hinzugefügt (bisher 5.6.2.3);
- n) in 5.6.2.2.2 die V_c -Werte je Träger ausgedrückt (bisher je ml);

- o) in 5.6.2.3 die Berechnung von N und N_0 hinzugefügt, die Formel korrigiert;
- p) in 5.6.2.4 die Berechnung in Werte je Träger geändert, die Formel korrigiert und der gewichtete Mittelwert in allen Berechnungen hinzugefügt;
- q) in 5.6.2.4 die Anforderungen für N_w korrigiert;
- r) in 5.6.2.5 die Berechnung geändert: nur N_w wird berechnet, RI wird nicht gezählt und RII , B und C werden in der Norm nicht mehr verwendet;
- s) das Beispiel in 5.7.2 korrigiert;
- t) 5.7.3 an die Prüfungen in der aktuellen Version angepasst;
- u) Anhang A an EN 12353 angepasst;
- v) Anhang C korrigiert;
- w) Anhang E „Zubereitung von hartem Wasser zur Verwendung im Prüf- und Referenzverfahren“ hinzugefügt;
- x) Anhang F „Beispiel für einen Prüfbericht“ hinzugefügt;
- y) Anhang G „Beispiel für das Beladen der Waschmaschine“ hinzugefügt;
- z) die Norm redaktionell überarbeitet, nicht mehr benötigte Abschnitte der früheren Ausgabe gestrichen;
- aa) Entharmonisierung der Norm, Anhang ZA gestrichen.

Frühere Ausgaben

DIN EN 16616: 2015-10

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 2267, Grenzflächenaktive Stoffe — Darstellung von verschiedenen Wascheinflüssen — Methoden zur Herstellung und Verwendung von fleckenfreiem Baumwollbezugsgewebe

Deutsche Fassung

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Chemothermische Wäschedesinfektion —
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)

Chemical disinfectants and antiseptics —
Chemical-thermal textile disinfection —
Test method and requirements (phase 2, step 2)

Désinfectants chimiques et antiseptiques —
Désinfection thermochimique du textile —
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 27. Juni 2022 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 CEN-CENELEC-Management-Zentrum 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, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, 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: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Anforderungen	8
5 Prüfverfahren	9
5.1 Kurzbeschreibung	9
5.2 Materialien und Reagenzien	9
5.2.1 Prüforganismen	9
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	10
5.3 Apparate und Glasgeräte	13
5.3.1 Allgemeines	13
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	13
5.4 Herstellung der Prüforganismus-Suspensionen (Prüfsuspension)	16
5.4.1 Allgemeines	16
5.4.2 Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüforganismen	17
5.4.3 Gebrauchskultur und Prüforganismen	17
5.4.4 Prüfsuspension (N)	18
5.4.5 Beimpfung der Keimträger	22
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der mikrobiziden Wirkung des Produkts	22
5.5.1 Allgemeines	22
5.5.2 Prüfverfahren	23
5.6 Prüfdaten und Berechnung	26
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen	26
5.6.2 Berechnung	26
5.7 Verifizierung des Verfahrens	29
5.7.1 Allgemeines	29
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	29
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	30
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	30
5.8.1 Keimreduktion	30
5.8.2 Wiederholungen	30
5.9 Interpretation der Ergebnisse – Schlussfolgerung	31
5.9.1 Allgemeines	31
5.9.2 Mikrobizide Wirkung	31
5.10 Prüfbericht	32
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	34
Anhang B (informativ) Geeignete Neutralisationsmedien	36
B.1 Allgemeines	36
B.2 Neutralisationsmedien	36
B.3 Dem Agar für die Keimzählung zugesetzte Neutralisationsmedien	37
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung des Prüfverfahrens	38

Anhang D (informativ) Beispiel für die Spezifikation einer Waschmaschine.....	39
Anhang E (informativ) Vorbereitung von Wasser standardisierter Härte für die Verwendung in den Prüf- und Referenzverfahren.....	40
Anhang F (informativ) Prüfbericht (Beispiel)	41
Anhang G (informativ) Beispiel für die Beladung der Waschmaschine	47
Literaturhinweise.....	49

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 16616:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Februar 2023, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Februar 2023 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN 16616:2015.

Das Dokument wurde überarbeitet, um es an den aktuellen Stand der Wissenschaft anzupassen, um Fehler und Mehrdeutigkeiten zu korrigieren, um es hinsichtlich Gliederung und Formulierungen an andere bereits bestehende oder in Vorbereitung befindliche Prüfverfahren von CEN/TC 216 anzugleichen und die Lesbarkeit und Verständlichkeit des Dokuments zu verbessern. Nachfolgend sind die wesentlichen technischen Änderungen gegenüber der letzten Ausgabe EN 16616:2015 aufgelistet:

- Anpassung des Anwendungsbereichs an den Anwendungsbereich der WG 1;
- Löschung der Anforderungen an Prüfungen der Phase 2, Stufe 1 in Abschnitt 4;
- Hinzufügung von Wasser für die Prüfung und Referenzkontrolle (5.2.2.4);
- Verschiebung des Beispiels für eine Waschmaschine aus 5.3.2.18 der vorherigen Fassung in Anhang D;
- Hinzufügung des Homogenisators S 1 nach Potter-Elvehjem (5.3.2.22);
- Anpassung von 5.4.3.1 bis 5.4.3.3 an andere aktuelle Normen;
- Überarbeitung von 5.4.4 (redaktionelle Änderungen und bessere Beschreibung);
- neue Formulierung der Beschreibung der Neutralisation (5.5.1.2) und Hinzufügung einer Verweisung auf Prüfungen der Phase 2, Stufe 1;
- Hinzufügung der Angabe zur Verwendung eines Spektrophotometers zur Bestimmung der Zellzahlen von Mykobakterien in 5.4.4.3 (ANMERKUNG);
- Hinzufügung der Dokumentation und Begründung für die Wahl des Neutralisationsmediums (5.5.1.2) im Prüfbericht;
- Hinzufügung einer neuen ANMERKUNG in 5.5.2.1;
- Hinzufügung einer ANMERKUNG und der Verweisung auf Anhang G in 5.5.2.2;
- Hinzufügung von der Referenzkontrolle (5.5.2.3);
- Löschung von RII;
- Hinzufügung einer Verweisung auf Prüfungen der Phase 2, Stufe 1;
- Korrektur und Anpassung an die aktuellen Prüfungen der Tabelle 2 (5.6.1.1);

- Hinzufügung von zwei Absätzen in 5.6.2.1 (zuvor 5.6.2.3);
- in 5.6.2.2 werden die V_c -Werte je Keimträger angegeben (zuvor je ml);
- Hinzufügung von N und N_0 in der Berechnung (5.6.2.3);
- in 5.6.2.4 wurde die Berechnung zu Werten je Keimträger geändert, die Gleichung wurde korrigiert und der gewichtete Mittelwert wurde in alle Berechnungen neu aufgenommen;
- Änderung der Berechnung in der Gleichung in 5.6.2.5: nur N_w wird berechnet, RI wird nicht ausgezählt und RII , B und C werden in der Norm nicht mehr verwendet;
- Korrektur des Beispiels in 5.7.2;
- Anpassung von 5.7.3 an die Prüfungen in der aktuellen Version;
- Aufnahme der Anforderungen an den Prüfbericht in 5.10;
- Anpassung von Anhang A an EN 12353;
- Korrektur von Anhang C;
- Hinzufügung eines neuen Anhangs D „Beispiel für die Spezifikation einer Waschmaschine“;
- Hinzufügung eines neuen Anhangs E „Vorbereitung von Wasser standardisierter Härte für die Verwendung in den Prüf- und Referenzverfahren“;
- Hinzufügung eines neuen Anhangs F „Prüfbericht (Beispiel)“;
- Hinzufügung eines neuen Anhangs G „Beispiel für die Beladung der Waschmaschine“;
- Dokument redaktionell überarbeitet, Abschnitte die nicht zutreffen (aus der älteren Version) gelöscht;
- Entharmonisierung der Norm, Anhang ZA gestrichen.

Die bei dieser Überarbeitung vorgenommenen Änderungen wirken sich nicht auf die Prüfergebnisse aus, die unter Anwendung der Version EN 16616:2015 erzielt wurden. Diese Ergebnisse sind weiterhin gültig, es sei denn die Reduktion der Referenzkontrolle N_w war größer als 3 lg-Einheiten und/oder die Berechnung der Ergebnisse erfolgte auf die falsche Weise der Version 2015.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

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

Einleitung

Dieses Dokument legt eine Keimträgerprüfung zur Feststellung, ob ein Einzelwaschmittel zur Desinfektion oder eine Kombination von Produkten zur Behandlung von kontaminierten Textilien die notwendige mikrobizide Wirkung aufweist oder nicht, fest. Dieses Dokument ist ausschließlich dafür vorgesehen, den desinfektionsbezogenen Teil des Waschprozesses zu validieren.

Diese Laboratoriumsprüfung berücksichtigt praktische Anwendungsbedingungen des Produkts, zu denen die Einwirkzeit, die Temperatur, die Prüforganismen und die Belastungssubstanzen gehören, d. h. Bedingungen, die dessen Wirkung in praktischen Situationen beeinflussen könnten.

Die Bedingungen sollen allgemeinen Ansprüchen genügen und einen Vergleich zwischen mikrobiologischen Laboratorien und Arten von Wasch- und Desinfektionsmitteln ermöglichen. Jede durch diese Prüfung ermittelte wirksame Dosierung des chemischen Desinfektionsmittels entspricht ausschließlich den gewählten Prüfbedingungen. Wenn die tatsächlichen Bedingungen schwanken, sind zur Bestimmung der wirksamen Dosierung zusätzliche Prüfungen in mikrobiologischen Laboren notwendig. Für Gebrauchsanweisungen sind die Hersteller von Wasch- oder Desinfektionsmitteln verantwortlich.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die mikrobizide Wirkung eines festgelegten Desinfektionsprozesses zur Behandlung von kontaminierten Textilien fest. Dieses Verfahren wird unter Einsatz einer in 5.3.2.18 festgelegten Waschmaschine durchgeführt und bezieht sich auf den Desinfektionsschritt ohne Vorwaschen. Dieses Verfahren ist nicht auf bestimmte Arten von Textilien beschränkt. Die Anweisungen des Lieferanten werden als ausreichend angenommen, wenn sie die im Prüfverfahren angegebenen Prozessparameter (z. B. Dosierung des Desinfektionsmittels in einer beliebigen Waschphase, z. B. Hauptwaschgang, Spülen, Desinfektion bei 40 °C) enthalten.

Dieses Dokument ist anzuwenden für Bereiche und unter Bedingungen, wo eine Desinfektion aus medizinischen Gründen angezeigt ist. Indikationen dieser Art liegen bei der Patientenbetreuung vor, z. B.:

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

und könnten auch am Arbeitsplatz und im häuslichen Bereich gegeben sein.

Eingeschlossen sein könnten auch Einrichtungen wie Wäschereien und Küchen, die der direkten Versorgung der Patienten dienen.

Das beschriebene Verfahren dient der Bestimmung der Wirksamkeit eines Produkts oder einer Kombination von Produkten unter den Bedingungen, unter denen es/sie angewendet wird/werden. Es ist eine Laborprüfung der Phase 2, Stufe 2, die die Bedingungen der Produktanwendung simuliert.

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

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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 Prüforganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

EN 13624, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Wirkung 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 14348, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der mykobakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich einschließlich der Instrumentendesinfektionsmittel — 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 und die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

3.1

Flottenverhältnis

Verhältnis der Masse der trockenen Textilien in Kilogramm zum Volumen der Waschflotte in Liter (m/V)

3.2

Desinfektionsprozess

Prozess, der die praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts zur Desinfektion von Textilien berücksichtigt, zu denen die Einwirkzeit(en), die Temperatur(en), die Konzentration(en), das Flottenverhältnis, die Prüforganismen und die Belastungssubstanzen gehören

3.3

Behandlung von kontaminierten Textilien

Handhabung von Textilien in Übereinstimmung mit dem Desinfektionsprozess, um desinfizierte Textilien zu erhalten

4 Anforderungen

Die Prüfergebnisse müssen den grundlegenden Grenzwerten (siehe 5.7.3) entsprechen. Bei Prüfung nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 muss das Produkt eine Verminderung der Keimzahl um mindestens die in 5.9.2 festgelegte dezimallogarithmische (lg) Reduktion nachweisen.

Tabelle 1 — Mindestprüfbedingungen und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Temperatur zur Wäschedesinfektion < 60 °C	Temperatur zur Wäschedesinfektion ≥ 60 °C
Prüforganismus	<i>E. coli</i> K12 <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>C. albicans</i>	<i>E. faecium</i> ^b
Zusätzlicher Prüforganismus		
Fungizide Wirkung	<i>A. brasiliensis</i>	
Tuberkulozide Wirkung	<i>M. terrae</i>	
Mykobakterizide Wirkung	<i>M. terrae</i> und <i>M. avium</i>	
Temperatur	wie vom Hersteller empfohlen und < 60 °C ^a	wie vom Hersteller empfohlen und ≥ 60 °C ^a
Einwirkzeit	wie vom Hersteller empfohlen	wie vom Hersteller empfohlen
Belastungssubstanz	Schafsblut	Schafsblut

Prüfbedingungen	Temperatur zur Wäschedesinfektion < 60 °C	Temperatur zur Wäschedesinfektion ≥ 60 °C
ANMERKUNG Die Einbeziehung von Bakteriensporen und Viren wurde erörtert. Für die technische Durchführbarkeit ist eine Weiterentwicklung notwendig.		
^a Die Temperatur und die Einwirkzeit müssen auf der Grundlage der praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts ausgewählt werden und liegen in der Verantwortung des Herstellers. ^b Dies schließt die bakterizide, levurozide, fungizide, tuberkulozide und mykobakterizide Wirkung mit ein.		

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Die Keimträger aus Baumwollgewebe (5.3.2.16) werden mit einer Prüfsuspension von Mikroorganismen in defibriniertem Schafsblut (5.2.2.12) kontaminiert. Nach dem Trocknen werden die Keimträger in Baumwolltücher überführt und anschließend wird der Desinfektionsprozess in der Waschmaschine bei Prüftemperaturen entweder $t < 60\text{ °C}$ oder $t \geq 60\text{ °C}$ durchgeführt. Der Prozess bezieht sich auf den Desinfektionsschritt ohne Vorwäsche. Am Ende des Desinfektionsschrittes des Verfahrens sind die Tücher mit den Keimträgern zu entnehmen. Jeder Keimträger wird in ein getrenntes Röhrchen mit Neutralisationsmedium (5.2.2.11) und Glasperlen (5.3.2.11) überführt. Die Mikroorganismen sollten durch Schütteln von den Keimträgern zurückgewonnen werden. Die Anzahl der überlebenden Mikroorganismen in jeder Probe wird bestimmt und die (Keim-)Reduktionsrate berechnet.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die bakterizide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden als Prüforganismen ausgewählten Stämme¹ bewertet werden:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 15442™;
- *Escherichia coli* (K12) NCTC® 10538;
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™;
- *Enterococcus hirae* ATCC® 10541™;
- *Enterococcus faecium* ATCC® 6057™.

Die levurozide/fungizide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden Prüforganismen bewertet werden:

- *Candida albicans* ATCC® 10231™;
- *Aspergillus brasiliensis*² ATCC® 16404™.

¹ Die ATCC®-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von American Type Culture Collection® (ATCC®) geliefert werden. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser Produkte durch CEN.

² Ehemals: *Aspergillus niger* ATCC® 16404™.

Die tuberkulozide/mykobakterizide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden Prüforganismen bewertet werden:

- *Mycobacterium terrae* ATCC® 15755™;
- *Mycobacterium avium* ATCC® 15769™.

ANMERKUNG Für entsprechende Stammnummern in einigen anderen Kultursammlungen siehe Anhang A.

Die geforderten Bebrütungstemperaturen für diese Prüforganismen betragen $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.3) [*C. albicans* und *A. brasiliensis*: $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$]. Die gleiche Temperatur muss für alle Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrollen und Validierung angewendet werden.

Wenn zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, müssen diese unter den im Prüfbericht vermerkten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre und Medien) bebrütet werden. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den festgelegten Stämmen/Arten entsprechen, muss deren Eignung zur Bereitstellung der geforderten Inokula verifiziert werden. Wenn diese zusätzlichen Prüforganismen nicht an einem Referenzzentrum klassifiziert wurden, müssen deren Identifizierungsmerkmale angegeben werden. Darüber hinaus müssen sie von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kultursammlung für fünf Jahre als Referenzprobe zurückgestellt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in diesem Dokument 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 das Wachstum der Prüforganismen 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 genau befolgt werden.

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

5.2.2.2 Wasser zur Herstellung von Medien

Das Wasser muss frisch destilliertes und darf nicht nur entmineralisiertes Wasser sein. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

ANMERKUNG 1 Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. für die Herstellung der Kulturmedien benötigt wird und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG 2 Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionszwecke (siehe [1]) verwendet werden.

5.2.2.3 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte für Validierungsprüfungen

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, könnte das 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) bei 2 °C bis 8 °C bis zu einem Monat aufbewahren.
- Herstellung von Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (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) bei 2 °C bis 8 °C 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 mit Hilfe einer Pipette (5.3.2.9) 6,0 ml 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, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, $7,0 \pm 0,2$ 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.

5.2.2.4 Wasser für die Prüfung und Referenzkontrolle

Es ist Wasser von Trinkwasserqualität erforderlich (das Wasser sollte bei 36 °C und 22 °C weniger als 100 KBE/ml Bakterien enthalten). Die Wasserhärte muss im Laborprotokoll aufgezeichnet und im Prüfbericht dokumentiert werden. Die endgültige Wasserhärte muss mindestens 4 mmol/l Erdalkalitionen (Mg^{2+} und Ca^{2+}) betragen. Die Temperatur des zulaufenden Wassers sollte zwischen 12 °C und 20 °C liegen.

ANMERKUNG 1 In Anhang E wird beschrieben, wie die Wasserhärte für die Prüfung und das Referenzverfahren mittels Lösung A und Lösung B aus 5.2.2.3 eingestellt wird. Die Wasserhärte kann mit Hilfe von handelsüblichen Test-Kits gemessen werden.

ANMERKUNG 2 Zur Dokumentation der Wasserhärte können Daten des Wasserversorgers verwendet werden.

5.2.2.5 Trypton-Soja-Agar (TSA)

Trypton, pankreatisch 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.

Wenn Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auftreten, könnte es erforderlich sein, dem TSA Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält eine Anleitung zu Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen.

5.2.2.6 Trypton-Soja-Bouillon (TSB)

BEISPIEL

Trypton, pankreatisch 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 $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $7,2 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.7 Hirn-Herz-(Glucose)-Agar (en: Brain Heart Infusion Agar; BHI)

BEISPIEL

Hirn-Herz-Aufguss (en: brain heart infusion)	12,5 g
Rinderherzaufguss	5,0 g
Proteose-Pepton	10,0 g
Glucose	2,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat	2,5 g
Agar	10,0 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.

5.2.2.8 Malzextrakt-Agar (MEA)

Malzextrakt	30,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	3,0 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 $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $5,6 \pm 0,2$ betragen.