

DIN EN 17272



ICS 11.080.20; 71.100.35

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Verfahren zur luftübertragenen Raumdesinfektion durch automatisierte
Verfahren –
Bestimmung der bakteriziden, mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden,
levuroziden, viruziden, tuberkuloziden und Phagen-Wirksamkeit;
Deutsche Fassung EN 17272:2020**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Methods of airborne room disinfection by automated process –
Determination of bactericidal, mycobactericidal, sporicidal, fungicidal, yeasticidal, virucidal
and phagocidal activities;
German version EN 17272:2020

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Méthodes de désinfection des pièces par voie aérienne par des procédés automatisés –
Détermination de l'activité bactéricide, fongicide, levuricide, sporicide, tuberculocide,
mycobactéricide, virucide et phagocide;
Version allemande EN 17272:2020

Gesamtumfang 75 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)
DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17272:2020) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

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

Deutsche Fassung

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Verfahren zur luftübertragenen Raumdesinfektion durch
automatisierte Verfahren —
Bestimmung der bakteriziden, mykobakteriziden, sporiziden,
fungiziden, levuroziden, viruziden, tuberkuloziden und
Phagen-Wirksamkeit**

Chemical disinfectants and antiseptics —
Methods of airborne room disinfection by automated
process —
Determination of bactericidal, mycobactericidal,
sporicidal, fungicidal, yeasticidal, virucidal and
phagocidal activities

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Méthodes de désinfection des pièces par voie aérienne
par des procédés automatisés —
Détermination de l'activité bactéricide, fongicide,
levuricide, sporicide, tuberculocide, mycobactéricide,
virucide et phagocide

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 13. Oktober 2019 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	5
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Anforderungen	9
4.1 Prüfungen der Wirksamkeit	9
4.2 Verteilungsprüfungen	11
5 Prüfverfahren	11
5.1 Kurzbeschreibung	11
5.1.1 Vorprüfung zur Validierung des Fehlens der Residualwirkung	11
5.1.2 Prüfung der Wirksamkeit	11
5.1.3 Verteilungsprüfung	12
5.2 Materialien und Reagenzien	12
5.2.1 Prüforganismen	12
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	13
5.2.3 Keimträger	19
5.3 Geräte und Glasgeräte	19
5.3.1 Allgemeines	19
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte:	20
5.4 Herstellung und Auszählung von Prüfsuspensionen	22
5.4.1 Herstellung von Prüfsuspensionen (Bakterien, Mykobakterien, Sporen, Schimmelpilzsporen, Hefen)	22
5.4.2 Herstellung von Suspensionen in Belastungssubstanzen	23
5.4.3 Auszählen von in Belastungssubstanz hergestellten Suspensionen	28
5.4.4 Herstellung und Auszählung von Viren-Suspensionen	30
5.4.5 Herstellung und Auszählung von Bakteriophagen-Prüfsuspensionen	32
5.5 Verfahren zur Bewertung der Prozessaktivität der automatisierten luftübertragenen Desinfektion	35
5.5.1 Verfahren zur Bewertung der Prozessaktivität entsprechend den vom Hersteller bereitgestellten Anwendungsbedingungen (Bakterien, Mykobakterien, Sporen, Schimmelpilzsporen, Hefen, Viren, Bakteriophagen)	35
5.5.2 Prüfungen der viruziden Wirkung	45
5.5.3 Verfahren zur Bewertung der mykobakteriziden Aktivität	48
5.6 Untersuchungsdaten und Berechnungen (Bakterien, Hefen, Schimmelpilzsporen, bakterielle Sporen, Bakteriophagen und Mykobakterien)	49
5.6.1 Allgemeines	49
5.6.2 Koloniezählung und Schwellengrenzwerte	49
5.6.3 Bestimmung der Anzahl von Prüforganismen N in Suspensionen von Bakterien, Mykobakterien, bakteriellen Sporen, Hefen, Schimmelpilzsporen und Bakteriophagen (siehe 5.4)	50
5.6.4 Bestimmung der Anzahl von Mikroorganismen T auf Kontrollkeimträgern (siehe 5.5.1.2)	51
5.6.5 Ermittlung von in der Vorprüfung erhaltenen Werten (siehe 5.5.1.3)	51
5.6.6 Bestimmung der Anzahl von Prüforganismen und Plaques auf Prüfkeimträgern nach der Einwirkung und Reduktion R (siehe 5.5.1.4.3)	51

5.7	Angabe der Ergebnisse	53
5.8	Prüfbericht.....	54
Anhang A (normativ) Zusammenfassung der Prüfanforderungen		58
A.1	Prüfungen der Wirksamkeit.....	58
A.2	Verteilungsprüfungen.....	60
Anhang B (normativ) Abstand zwischen Diffusionsgerät und Prüfkeimträgern.....		61
Anhang C (normativ) Belastungssubstanz		62
Anhang D (normativ) Herstellung von <i>Bacillus-subtilis</i> -Sporen-Stammsuspensionen		65
D.1	Materialien und Reagenzien.....	65
D.1.1	Trypton-Glucose-Bouillon (TGB):.....	65
D.1.2	Fleisch-Hefeextrakt-Agar (MEA).....	65
D.1.3	Zentrifuge mit einer Beschleunigung von 10 000 g_N	65
D.2	Herstellung von <i>Bacillus</i> -Sporen-Stammsuspensionen	65
Anhang E (normativ) Graphische Darstellung des Prüfverfahrens.....		67
Literaturhinweise.....		73

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17272:2020) 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 Oktober 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2020 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 legt ein Verfahren der Phase 2, Stufe 2 fest, das wie folgt ausgelegt ist:

- zur Überprüfung unter genormten Laborbedingungen, die der Praxis nahekommen, dass die vorgeschlagenen luftübertragenen Verfahren für die Oberflächendesinfektion das Ziel erreichen, für das sie entwickelt wurden;
- für den Quervergleich verschiedener Verfahren unter reproduzierbaren Bedingungen;
- für die Bereitstellung einer Versuchsanordnung innerhalb festgelegter Grenzen, wenn die Praxisbedingungen von denen abweichen, die im nachfolgenden Text festgelegt sind.

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

Der Zweck dieses Dokuments besteht in der Beschreibung eines Prüfverfahrens zur Bewertung der desinfizierenden Wirkung von luftübertragenen Verfahren für die Oberflächendesinfektion unter speziellen Versuchsbedingungen.

Das vorgeschlagene Prüfverfahren besteht aus zwei Teilen:

- Teil 1 – Wirksamkeitsprüfung: vorgesehen zur Sicherstellung, dass die Mindestanforderungen an die Wirksamkeit für jede ausgewiesene Wirkungsart und für den/die angestrebten Anwendungsbereich(e) (CEN/TC 216 WG 1 und/oder WG 2 und/oder WG 3) erfüllt werden;
- Teil 2 – Verteilungsprüfung: vorgesehen zur Sicherstellung der Wirksamkeit des Prozesses im gesamten umschlossenen Raum. Sie wird mit einem Referenz-Prüforganismus an 4 Probenahmestellen durchgeführt.

Die betreffenden Verfahren umfassen die Verfahren, in denen chemische Desinfektionsmittel in dispergierter gasförmiger, dampfförmiger und/oder aerosolierter Form verwendet werden.

Jede(r) automatische luftübertragene Desinfektionszyklus/-anwendung ist einzigartig und der Zweck dieses Dokuments besteht darin, eine festgelegte Herausforderung darzustellen, die durch das automatische luftübertragene Desinfektionssystem erfüllt werden muss, damit es als ein wirksames Verfahren angesehen wird. Dieses genormte Verfahren sollte deshalb als ein geeigneter Ausgangspunkt angesehen werden und nicht als Validierung für alle vorgesehenen Behandlungen mit einem bestimmten automatischen luftübertragenen Desinfektionssystem.

Das Verfahren wird zur qualitativen Bestimmung des Prozesses angewendet, d. h. für das/die zur Umsetzung erforderliche(n) Gerät(e) und Produkt(e). Für solche chemischen Verfahren kann die Kombination von Gerät und Produkt nicht getrennt werden.

Bei den festgelegten Prüfbedingungen kann die Anzahl der Keimträger und ihrer Prüfpositionen entsprechend den besonderen Bedürfnissen einer bestimmten Anwendung oder lokalen Bedürfnissen erhöht werden.

Der Hersteller

- legt die Begrenzungen und Vorsichtsmaßnahmen bei der Anwendung des Verfahrens fest;
- stellt sicher, dass die festgelegten Prüfbedingungen für die empfohlene(n) Anwendung(en) repräsentativ sind.

Das Ziel dieses Dokuments besteht in der Simulation von praktischen Bedingungen einer luftübertragenen Desinfektion in einer Laborsituation; entsprechend dem nachstehend festgelegten Prüfverfahren werden obligatorische Bedingungen festgelegt. Zusätzliche Bedingungen werden ebenfalls vorgeschlagen.

Der Prüfbericht legt die Bedingungen fest, unter denen die Prüfungen durchgeführt werden, und fasst diese zusammen.

Im Allgemeinen werden die Prozesse nach einem Reinigungsverfahren eingeführt und danach entsprechend den Anwendungsbereichen unter Bedingungen niedriger Belastung oder bei einem niedrigen Verschmutzungsgrad geprüft. Bei spezifischen Anwendungen und/oder entsprechend den Empfehlungen des Herstellers können Prüfverfahren mit anderen Belastungssubstanzen auch als zusätzliche Bedingungen in Betracht gezogen werden.

Die in diesem Dokument beschriebenen Prüfungen beruhen auf der Messung der Reduktion (ausgedrückt als dekadischer Logarithmus lg) der Anzahl an überlebenden Prüforganismen verschiedener Stämme von Bakterien, Mykobakterien, bakteriellen Sporen, Schimmelpilzsporen, Hefen, Viren oder Bakteriophagen und unter spezifischen Bedingungen. Die Prüforganismen dürfen durch weitere Prüforganismen ergänzt werden. Es wird erwartet, dass die in diesem Dokument beschriebene Versuchsanordnung befolgt wird, jedoch können die Bedingungen den Bedürfnissen der praktischen Anwendung(en) angepasst werden.

Dieses Verfahren kann als Grundlage für Anwendungen in Laboren hinsichtlich biologischer Sicherheit angewendet werden.

Suspensionsversuche zur Bewertung der irreversiblen Inaktivierung durch das Produkt nach CEN TC 216 Phase 2, Stufe 1 können nicht durchgeführt werden, da das Produkt durch die Diffusion in der Luft verändert wird (z. B. von flüssigem zu dampfförmigem Zustand).

1 Anwendungsbereich

Die beschriebenen Prüfverfahren sind zur Bestimmung der desinfizierenden Wirkung von verwendeten Prozessen 1) im humanmedizinischen Bereich, 2) im Veterinärbereich, 3) in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen ausgelegt, bei denen automatisierte Verfahren zur Verteilung von Chemikalien durch Diffusion in der Luft ohne manuelles Auftragen des Desinfektionsmittel durch einen Anwender genutzt werden. Dieses Dokument umfasst die Desinfektion von porenfreien Oberflächen, aber nicht der Luft.

Das Ziel der beschriebenen Verfahren besteht im Desinfizieren der Oberflächen der gesamten Fläche, einschließlich der Außenflächen der in diesen Räumen befindlichen Ausrüstung. Speziell für die Desinfektion von Medizinprodukten ausgelegte Luftbehandlungen und Produkte oder Prozesse sind vom Anwendungsbereich dieses Dokuments ausgeschlossen. Die beschriebenen Prüfverfahren und Volumina stellen eine festgelegte Herausforderung dar.

Dieses Dokument gilt für Prozesse, für die die Wirkung bei den folgenden Gruppen von Mikroorganismen ausgewiesen wird:

- vegetative Bakterien;
- Mykobakterien;
- bakterielle Sporen;
- Hefen;
- Schimmelpilzsporen;
- Viren;
- Bakteriophagen.

Dieses Dokument enthält keine Verfahren, bei denen die Wirkungsweise auf Eintauchen und/oder Zirkulieren, Fluten, Besprühen, Wischen oder anderen Vorgehensweisen, bei denen das Produkt direkt auf die Oberflächen aufgetragen und nicht durch die Luft verteilt wird, beruht.

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 10088-2, *Nichtrostende Stähle — Teil 2: Technische Lieferbedingungen für Blech und Band aus korrosionsbeständigen Stählen für allgemeine Verwendung*

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

3.1

chemisches Verfahren

Verfahren, bei dem der Wirkstoff eine chemische Substanz (Produkt) ist, die in gasförmiger, flüssiger und/oder fester Form diffundiert

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Produkt und das Diffusionssystem (Gerät) können nicht getrennt voneinander bewertet werden.

3.2

automatisiertes luftübertragenes Desinfektionsverfahren

Verfahren, bei dem ein Produkt in Form von Gas, Dampf und/oder Aerosol (außer wässrigem Dampf) ohne die Notwendigkeit menschlichen Eingreifens aus einem Gerät diffundiert, wobei das Produkt auf Oberflächen und nicht in der Luft selbst wirken soll

3.3

Einwirkzeit der luftübertragenen Desinfektion

ADC-Zeit

(en: airborne disinfection contact time)

Zeit von der ersten Freisetzung des Produkts (Desinfektionsmittel) bis zu dem Zeitpunkt, an dem Keimträger zurückgewonnen werden, oder bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Belüftung einsetzt, insofern eine Belüftungszeit als notwendig erachtet wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Keimträger können am Ende der ADC-Zeit oder während der Belüftungszeit zurückgewonnen werden, gegebenenfalls mit geeigneter persönlicher Schutzausrüstung (PSA).

3.4

Belüftungszeit

Zeitspanne, während der basierend auf den Gebrauchsanweisungen und der Risikobeurteilung des Herstellers durch einen Luftaustausch eine geeignete Konzentration des Produkts im umschlossenen Raum erreicht wird, sodass die Rückgewinnung von Keimträgern möglich wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Dauer dieser Belüftungszeit hängt von den Eigenschaften des Luftbehandlungssystems ab.

3.5

Verteilungsprüfung

Anordnung von Prüforganismen tragenden Prüfkeimträgern, sodass die Verteilung des Produkts durch die Kombination eines Geräts (Maschine) und des Produkts die ausgewiesene Wirkung im gesamten umschlossenen Raum erreicht

Anmerkung 1 zum Begriff: Diese Prüfung wird nach der oder parallel zur Prüfung der Wirksamkeit durchgeführt.

3.6

ergänzende obligatorische Bedingungen

Prüfbedingungen, die anstelle der obligatorischen Bedingungen angewendet werden, wenn die praktische Anwendung des Verfahrens und die Herstellerangaben die obligatorischen Prüfbedingungen klar und eindeutig ausschließen

3.7

sensitiver Prüforganismus

Prüforganismus, bei dem die Trocknung eine lg-Reduktion von mehr als 1,5 nach Ende der Belüftungszeit bewirkt

4 Anforderungen

4.1 Prüfungen der Wirksamkeit

Das automatisierte luftübertragene Desinfektionsverfahren, das unter den in 5.5. festgelegten obligatorischen Versuchsbedingungen geprüft wird, muss zu folgenden in Zahlen ausgedrückten und als dekadischer Logarithmus (lg) angegebenen Reduktionen führen:

Bakterizide Wirkung:

- Reduktion von 5 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei jedem der vier angegebenen bakteriellen Prüforganismen.

Für den humanmedizinischen Bereich siehe 5.2.1.2, 5.2.1.3, 5.2.1.4, 5.2.1.5.

Für den Veterinärbereich siehe 5.2.1.1, 5.2.1.2, 5.2.1.3, 5.2.1.6.

Für die Bereiche Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen siehe 5.2.1.1, 5.2.1.2, 5.2.1.3, 5.2.1.4.

Mykobakterizide Wirkung:

- für den humanmedizinischen Bereich und die Bereiche der Lebensmittelindustrie und der Laboratorien eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei den beiden angewendeten Prüforganismen, siehe 5.2.1.15, 5.2.1.16;
- für den Veterinärbereich eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei dem angegebenen Prüforganismus, siehe 5.2.1.15.

Sporizide Wirkung:

- für den humanmedizinischen Bereich eine Reduktion von 4 lg oder größer, für den Veterinärbereich und die Bereiche Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen eine Reduktion von 3 lg auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei dem angegebenen Prüforganismus bakterieller Sporen, siehe 5.2.1.7.

Fungizide Wirkung:

- für den humanmedizinischen Bereich, den Veterinärbereich und die Bereiche Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei den beiden angegebenen pilzartigen Prüforganismen (Hefe und Schimmelpilzsporen), siehe 5.2.1.8, 5.2.1.9.

Levurozide Wirkung:

- für den humanmedizinischen Bereich, den Veterinärbereich und die Bereiche der Lebensmittelindustrie und der Laboratorien eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei dem angegebenen Prüforganismus Hefe, siehe 5.2.1.8.

Viruzide Wirkung:

- für den humanmedizinischen Bereich und die Bereiche der Lebensmittelindustrie und der Laboratorien eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei den beiden angegebenen Prüforganismen, siehe 5.2.1.10, 5.2.1.11;
- für den Veterinärbereich eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei dem angegebenen Prüforganismus, siehe 5.2.1.12.

Phagen-Wirkung:

- für die Bereiche der Lebensmittelindustrie und der Laboratorien eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei den beiden angegebenen Prüforganismen, siehe 5.2.1.13, 5.2.1.14.

Die Anforderungen und Prüfverfahren sind in Anhang A zusammengefasst.

Die Reduktionen werden als dekadischer Logarithmus (lg) ausgedrückt.

Die in der Tabelle in Anhang A angegebenen Reduktionen sind die Mindestreduktionen, die im Vergleich zu den Kontrollkeimträgern, die dem Prozess nicht ausgesetzt sind, auf Prüfkeimträgern erhalten werden müssen.

Diese Wirkungen dürfen unabhängig voneinander bestimmt werden, d. h. durch gesondertes Prüfen der unterschiedlichen mikrobiologischen Gruppen, z. B. Mykobakterien; die Prüfungen müssen nicht alle gleichzeitig durchgeführt werden. Jede Wirkung kann unabhängig von anderen ausgewiesen werden, das Bestehen der Prüfungen bezüglich der bakteriziden als auch der levuroziden Wirkung, deren Beschreibung in Anhang A enthalten ist, stellt jedoch die Mindestanforderung für die Beanspruchung der Übereinstimmung mit dem vorliegenden Dokument dar.

Diese sieben Wirkungen müssen unter den in 5.5 festgelegten genormten Referenzversuchsbedingungen bestimmt werden.

Zusätzliche spezielle bakterizide, mykobakterizide, sporizide, fungizide, levurozide, viruzide und Phagen-Wirkungen können, wie jeweils anwendbar, für spezielle vorgesehene Zwecke unter anderen Bedingungen (z. B. andere ADC-Zeit, Keimträgerart, Prüforganismus, Volumen des umschlossenen Raums, Temperatur, Luftfeuchte) bestimmt werden. Diese zusätzlichen Bedingungen müssen im Prüfbericht beschrieben, aufgezeichnet und angegeben werden.

Selbst wenn ein automatisiertes luftübertragenes Desinfektionssystem das gesamte oder Teile des in diesem Dokument beschriebenen Prüfverfahrens bestanden hat, müssen das System und dessen bereitgestellte Zyklen anschließend in der Praxis im eigenen zu desinfizierenden umschlossenen Raum (z. B. Krankenhausraum oder Stallgebäude) validiert werden, indem entsprechende biologische oder validierte chemische Indikatoren verwendet werden.

4.2 Verteilungsprüfungen

Die Reduktion der Anzahl lebensfähiger Bakterienzellen im gesamten umschlossenen Raum muss mit *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 = CIP 4,83 (siehe 5.2.1.2) bestimmt werden, um auf jedem Prüfkeimträger eine Reduktion von mindestens 5 lg zu erhalten. Prüfkeimträger müssen in Übereinstimmung mit Anhang A, Teil 2 angeordnet werden. Die Prüfbedingungen müssen die in den Prüfungen der Wirksamkeit angewendeten reproduzieren.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Vorprüfung zur Validierung des Fehlens der Residualwirkung

Das Ziel der Vorprüfung besteht darin zu identifizieren, ob es aufgrund des über die Keimträger in die Subkulturmedien (Agarplatten und/oder Membrane) überführten verbliebenen Produkts eine Residualwirkung gibt, und ein Verfahren zur Beseitigung dieser Wirkung zu finden. Dieses Verfahren sollte sicherstellen, dass die Ergebnisse der Wirksamkeitsprüfung nur auf der irreversiblen Inaktivierung der Prüforganismen und nicht auf einer hemmenden (statischen) Wirkung beruhen.

Nicht kontaminierte Keimträger werden dem Verfahren nach der Auftragung und Trocknung der in der Prüfung verwendeten Belastungssubstanz ausgesetzt.

Rückgewinnung in 100 ml (20 ml für viruzide Wirkung) steriles Flüssigmedium und Prüfen auf mikrobiostatische (z. B. bakteriostatische) Wirkung aufgrund von den Keimträgern anhaftenden Spuren des Produkts, was eine hemmende Wirkung im Agarmedium und/oder auf den Membranfiltern oder eine Verringerung des Restvirustiters erzeugen könnte.

5.1.2 Prüfung der Wirksamkeit

Unter Anwendung von Belastungssubstanzen enthaltenden Prüforganismussuspensionen werden 50 µl je Keimträger aufgetragen, die wie in 5.2.3 beschrieben vorbereitet wurden.

Das Inokulum wird wie in 5.5.1.2.2 beschrieben ausgestrichen und an der Luft trocknen gelassen, danach werden die vorbereiteten Prüfkeimträger unter den festgelegten Bedingungen dem Produkt ausgesetzt, wobei das Produkt durch das geprüfte automatisierte luftübertragene Desinfektionsverfahren diffundiert wird.

Die überlebenden Bakterien, Mykobakterien, bakteriellen Sporen, Hefen, Schimmelpilzsporen, Viren oder Bakteriophagen werden durch mechanische Behandlung wie Abschaben (z. B. mit einer Glaspipette oder einem Skalpell) oder erforderlichenfalls durch Ultraschallbehandlung von den Keimträgern rückgewonnen und in der Rückgewinnungsflüssigkeit aufgefangen:

Bei Bakterien, Mykobakterien, bakteriellen Sporen, Schimmelpilzsporen und Hefen wird verdünnt und das Agar mit einem Teil der Rückgewinnungsflüssigkeit beimpft. Es wird bebrütet und die Kolonien werden gezählt. Die verbliebene Rückgewinnungsflüssigkeit wird mittels Membranfiltration filtriert, danach wird die Membran zum Entfernen von so viel Produkt wie möglich gespült. Die Membran wird auf das Agar-Medium übertragen. Der Keimträger wird in das Agar-Medium eingebracht, um alle verbleibenden überlebenden Prüforganismen aufzufangen. Es wird bebrütet und die Kolonien werden gezählt.

Bei Viren und Bakteriophagen wird ein Teil der Rückgewinnungsflüssigkeit verdünnt, es wird auf einer Zelllinie bebrütet und der Virustiter bestimmt.

5.1.3 Verteilungsprüfung

Die Verteilungsprüfung ist eine Wiederholung der Wirksamkeitsprüfung mit dem Unterschied, dass nur *Staphylococcus aureus* als Prüforganismus verwendet wird und die Prüfkeimträger in anderen definierten Lagen und Ausrichtungen angeordnet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

In Abhängigkeit von der angestrebten Wirkung müssen bei den Prüfungen alle oder einige der folgenden Prüforganismen verwendet werden.

Diese Prüforganismen können aus Kultursammlungen bezogen werden. Die Prüforganismen sind:

Für Prüfungen der bakteriziden Wirkung:

- 5.2.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 = CIP 103-467 (DSM 937);
- 5.2.1.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 = CIP 4.83 (DSM 799);
- 5.2.1.3 *Enterococcus hirae* ATCC 10541 = CIP 5855 (DSM 3320);
- 5.2.1.4 *Escherichia coli* ATCC 10536 = CIP 54127 (DSM 682);
- 5.2.1.5 *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 = CIP 70.34 (DSM 30007);
- 5.2.1.6 *Proteus hauseri* ATCC 13315 = CIP 58.60 (DSM 30118).

Für Prüfungen der sporiziden Wirkung:

- 5.2.1.7 Sporen von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 = CIP 52 62.

Für Prüfungen der levuroziden Wirkung:

- 5.2.1.8 *Candida albicans* ATCC 10231 = IP 4872 (DSM 1386).

Für Prüfungen der fungiziden Wirkung:

- 5.2.1.8 *Candida albicans* ATCC 10231 = IP 4872 (DSM 1386);
- 5.2.1.9 *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 = IP 1431-83 (DSM 1988).

Für Prüfungen der viruziden Wirkung:

- 5.2.1.10 Murines Norovirus, Stamm S99, Friedrich-Loeffler-Institut, Berlin. MNV, kultiviert auf Zelllinie RAW 264.7 (ATCC TIB-71);
- 5.2.1.11 Adenovirus Typ 5, Stamm adenoid, ATCC VR-5. *Adenovirus*, kultiviert auf HeLa-Zellen oder anderen Linien mit geeigneter Anfälligkeit;
- 5.2.1.12 Porzines Parvovirus NADL2, Stamm auf ST-Zellen oder anderer entsprechender Zelllinie kultiviert.

Für Phagen-Wirkung:

- 5.2.1.13 Bakteriophage für *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* P001 (DSM 4262);
- 5.2.1.14 Bakteriophage für *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* P008 (DSM 10567).

Die Vermehrung dieser beiden Bakteriophagen muss durch den folgenden Wirtstamm erreicht werden: *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* F7/2 (DSM 4366).

Für die mykobakterizide Wirkung:

- 5.2.1.15 *Mycobacterium avium* ATCC 15769 = CIP 105415;
- 5.2.1.16 *Mycobacterium terrae* ATCC 15755 (tuberkulozide Wirkung).

Beide Prüforganismen müssen geprüft werden, außer für den Veterinärbereich, in dem nur *Mycobacterium avium* erforderlich ist.

Diese Stämme können aus biologischen Kultursammlungen von Referenzzentren bezogen werden.

Verwendung anderer Prüforganismen

Wenn zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, müssen diese unter optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien) bebrütet und im Prüfbericht vermerkt werden. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den festgelegten Stämmen 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. Wasserhaltige Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um dadurch folgende Differenzen in den relativen Molekulargewichten auszugleichen.

Die Reagenzien müssen analysenrein und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Sie müssen frei von Substanzen sein, die toxisch oder hemmend auf die Prüforganismen wirken.

ANMERKUNG Von CEN bereitgestellte handelsbezogene Informationen (z. B. Produktbezeichnungen) dienen nur der Information der Anwender dieses Dokuments und stellen keine Anerkennung dieser Produkte durch CEN dar. Gleichwertige Produkte können eingesetzt werden, wenn nachgewiesen wurde, dass sie zu den gleichen Ergebnissen führen.

5.2.2.2 Kulturmedien für Bakterien, Mykobakterien, Sporen, Schimmelpilzsporen und Hefen

5.2.2.2.1 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes und darf nicht entmineralisiertes Wasser sein.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklav [5.3.2.1 a)].

Steriles destilliertes Wasser ist für die Vorbereitung von für Prüfungen vorgesehenen Suspensionen notwendig. Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. zur Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG 1 Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionszwecke verwendet werden.

5.2.2.2.2 Agar für die Keimzahlbestimmung (Trypton-Soja-Agar: TSA)

Für die Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Bakterienzellen (5.2.1.1 bis 5.2.1.6)

Trypton, tryptisch verdautes Casein	15,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	5,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (siehe 5.2.2.2.1) bis auf	1 000 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklav. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($7,2 \pm 0,2$) betragen, wenn er bei (20 ± 1) °C gemessen wird.

Bei Bedarf wird dem Medium ein Neutralisationsmedium zugesetzt (und die Zugabe im Prüfbericht aufgezeichnet).

Agar für die Aufbewahrung von Prüforganismen 5.2.1.1 bis 5.2.1.6 (siehe 5.2.2.2.2) ohne Neutralisationsmedium.

5.2.2.2.3 Rekonstituierte Milch zur Verwendung mit sensitiven Prüforganismen

Die rekonstituierte Magermilch (Fettgehalt 15 g/l) wird wie folgt hergestellt:

Magermilchpulver, garantiert frei von Antibiotika und Zusatzstoffen, wird im Verhältnis von 100 g Pulver je 1 l destilliertes Wasser rekonstituiert.

Es wird 30 min bei (105 ± 3) °C oder 5 min bei (121 ± 3) °C sterilisiert.

5.2.2.2.4 Malzextrakt-Agar (MEA)

Für die Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Hefe- und Schimmelpilzsporenzellen (5.2.1.8 und 5.2.1.9).

Malzextrakt (technische Reinheit)	30,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (siehe 5.2.2.2.1) bis auf	1 000 ml

Der Malzextrakt muss Lebensmittelqualität (z. B. Cristomalt Powder) oder eine gleichwertige Qualität besitzen, darf nicht hochrein sein und nicht nur Maltose enthalten.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklav. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($5,6 \pm 0,2$) betragen, wenn er bei (20 ± 1) °C gemessen wird.

Bei Bedarf wird dem Medium ein Neutralisationsmedium zugesetzt (und die Zugabe im Prüfbericht aufgezeichnet).

5.2.2.2.5 Medium für die Aufbewahrung von Prüforganismen 5.2.1.8 und 5.2.1.9 ohne Neutralisationsmedium (5.2.2.2.4)

5.2.2.2.6 Agar für Mykobakterien (siehe 5.2.1.15 und 5.2.1.16)

Middlebrook-Cohn-7H10-Medium + 10 % Ölsäure-Albumin-Dextrose-Komplex (OADC) (nachfolgend als 7H10 angeführt)

Zur Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Mykobakterien:

—	Middlebrook-7H10-Agar	19 g
—	Glycerol	5 ml
—	Wasser (siehe 5.2.2.2.1) bis auf	895 ml

Zur vollständigen Auflösung wird bis zum Sieden erhitzt. Nach 10 min Sterilisation im Autoklav bei 121 °C erfolgt Abkühlen auf 50 °C bis 55 °C in einem Wasserbad.

Unter aseptischen Bedingungen werden 100 ml Middlebrook-Medium mit OADC-Anreicherung zugegeben. Endgültiger pH-Wert = 6,6 bei (20 ± 1) °C.

5.2.2.2.7 Medium für Sporen (siehe 5.2.1.7)

Trypton-Soja-Agar (TSA) für die Bestimmung der Anzahl von lebensfähigen *Bacillus*-Sporen:

Trypton, tryptisch verdautes Casein	15,0 g
Sojapepton, Papain-Auflösung von Sojabohnenmehl	5,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (siehe 5.2.2.2.1) bis auf	1 000 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklav (5.3.2.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums $(7,2 \pm 0,2)$ betragen, wenn er bei (20 ± 1) °C gemessen wird.

Für Sporen dürfen andere Medien verwendet werden: siehe Anhang D.

5.2.2.2.8 Verdünnungsmittel für mikrobielle Suspensionen

Bakterien, Pilze, Hefe und Sporen

Kochsalz-Trypton-Lösung:

—	Trypton, tryptisch verdautes Casein	1,0 g
—	Natriumchlorid	8,5 g
—	Wasser (siehe 5.2.2.2.1) bis auf	1 000 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklav. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($7,2 \pm 0,2$) betragen, wenn er bei (20 ± 1) °C gemessen wird.

Mykobakterien: Kochsalz-Trypton-Lösung (5.2.2.2.9) oder destilliertes Wasser (5.2.2.2.1).

Das Verdünnungsmittel darf zwischen den Prüforganismen und dem zu prüfenden Produkt keine Beeinträchtigungen hervorrufen.

5.2.2.2.9 Flüssigkeit zur Gewinnung von Prüforganismen und Spülflüssigkeit für die Membranfiltration

Zusammensetzung:

Trypton, tryptisch verdautes Casein	1,0 g
Natriumchlorid	8,5 g
Wasser (siehe 5.2.2.2.1) bis auf	1 000 ml

Herstellung:

Natriumchlorid und Trypton werden in Wasser gelöst. Ein beliebiges, speziell für das zu prüfende Produkt ausgelegtes Neutralisationsmittel wird zugegeben.

Das Verdünnungsmittel wird in Chargen von großem Volumen hergestellt und danach in geeignete kleinere Kolben verteilt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklav.

Bei Mykobakterien wird Wasser (siehe 5.2.2.2.1) anstelle von Verdünnungsmitteln verwendet.

5.2.2.3 Kulturmedien und Reagenzien zur Vorbereitung des Virus (Prüforganismen 5.2.1.10 bis 5.2.1.12)

5.2.2.3.1 Wachstum und Aufbewahrung von Medien

Für Viren sollte Eagles Minimum Essential Medium (MEM) oder ein gleichwertiges Medium verwendet werden, ergänzt mit einer geeigneten Konzentration von mykoplasmafreiem inaktiviertem fetalem Kälberserum, Antibiotika und weiteren Wachstumsfaktoren je nach Erfordernis (siehe EN 14476 und EN 14675).

5.2.2.4 Kulturmedien und Reagenzien zur Vorbereitung von Bakteriophagen (Prüforganismen 5.2.1.13 bis 5.2.1.14)

5.2.2.4.1 M17-Kulturbouillon

Für die Aufbewahrung des Wirtsbakterienstammes, die Vermehrung von Bakteriophagen und die Herstellung des Bakteriophagen-Verdünnungsmittels:

Phytonpepton (aus Sojamehl)	5,0 g
Polypepton (aus Casein und Tiergewebe)	5,0 g
Rinderextraktpulver	5,0 g
Hefeextrakte	2,5 g

D(+)-Lactose	5,0 g
Ascorbinsäure	0,5 g
Natrium- β -Glycerophosphat	19,0 g
Magnesiumsulfat, 7 H ₂ O	0,2 g
Wasser (siehe 5.2.2.2.1) bis auf	1 000 ml

Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($7,0 \pm 0,2$) betragen, wenn er bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gemessen wird.

Wenn M17-Bouillon das bei der Herstellung des Neutralisationsmediums verwendete Verdünnungsmittel ist (siehe EN 13610), sollte doppelt konzentriert hergestellte M17-Bouillon verwendet werden (d. h. die Konzentration aller den 1 000 ml Wasser zugegebenen Bestandteile sollte verdoppelt werden).

5.2.2.4.2 M17-Agar (Unterschichtagar)

Unterschichtagar für das quantitative Zählen von Lysebereichen (Plaques), die von einzelnen infektiösen Bakteriophagenpartikeln in dem Bakterienrasen der Wirtsbakterien erhalten werden.

15 g Agar werden zu 1 000 ml M17-Bouillon gegeben. Der Agar wird durch Sieden unter ständigem Rühren gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($7,0 \pm 0,2$) betragen, wenn er bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gemessen wird. Wenn der Agar auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt ist, werden 10 ml einer sterilen 1 mol/l CaCl₂-Stammlösung (siehe 5.2.2.4.6) zugegeben. Es wird vorsichtig gemischt und 15 ml bis 18 ml Agar werden in Petrischalen gefüllt.

5.2.2.4.3 Übersichtungungsagar (Deckagar, Weichagar)

Für das Zählen der Bakteriophagen: 6,5 g Agar werden in 1 000 ml M17-Bouillon gelöst (es wird unter ständigem Rühren bis zum Sieden erwärmt). Der geschmolzene Agar wird in Reagenzgläser gefüllt (2,5 ml bis 3 ml je Reagenzglas).

Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

5.2.2.4.4 Bakteriophagen-Verdünnungsmittel (basierend auf 1 : 4 verdünnter Ringerlösung)

Zur Herstellung der Verdünnungsreihen, die für die Bestimmung des Titors der Bakteriophagensuspensionen (Zählen der von den Bakteriophagen stammenden Lysebereiche) vorgesehen sind:

1 : 4 verdünnte Ringerlösung:

—	Natriumchlorid	2 250 g
—	Kaliumchlorid	0,105 g
—	Calciumchlorid, wasserfrei	0,060 g
—	Natriumhydrogencarbonat	0,050 g
—	Wasser (siehe 5.2.2.2.1) bis auf	1 000 ml

10 ml M17-Kulturbouillon werden 90 ml 1 : 4 verdünnter Ringerlösung hinzugegeben.

Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren. Vor Gebrauch wird 1 ml einer 1 mol/l CaCl_2 -Stammlösung zu 100 ml Verdünnungsbouillon hinzugegeben.

ANMERKUNG Ringerlösung kann aus fertigen Tabletten nach den Empfehlungen des Herstellers hergestellt werden.

5.2.2.4.5 SM-Pufferlösung

Zur Resuspension und Aufbewahrung der intakten Bakteriophagenpartikel:

TRIS/HCl	2,4 g
Natriumchlorid	5,8 g
Magnesiumsulfat, 7 H_2O	2,5 g
Wasser (siehe 5.2.2.2.1) bis auf	1 000 ml

Der pH-Wert der Pufferlösung wird auf $(7,4 \pm 0,1)$ eingestellt, wenn bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gemessen wird. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

5.2.2.4.6 CaCl_2 -Stammlösungen (1 mol/l und 0,05 mol/l)

Es werden entweder 110,99 g oder 5,55 g wasserfreies CaCl_2 in Wasser (5.2.2.2.1) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt, um die 1-mol/l- bzw. die 0,05-mol/l-Stammlösung herzustellen. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

5.2.2.4.7 Milchsäurelösung (10 % Volumenkonzentration)

Sie dient zur Ansäuerung von Milch mit niedrigem Fettgehalt für die Zubereitung von Sauermolke.

Eine Stammlösung mit 90 % Volumenkonzentration aus Milchsäure wird mit Wasser (siehe 5.2.2.2.1) verdünnt, um eine Gebrauchslösung mit 10 % Volumenkonzentration herzustellen. Dafür werden 8 Anteile Wasser zu einem Anteil Stammlösung gegeben. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

5.2.2.5 Belastungssubstanz (siehe Anhang C)

Die Belastungssubstanz sollte nach dem Anwendungsbereich des Verfahrens ausgewählt werden (siehe Anhang C).

Wenn bei sensitiven Prüforganismen (z. B. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* und/oder anderen zusätzlichen Stämmen wie *Proteus hauseri*) eine übermäßige Trocknungsverlustgeschwindigkeit festgestellt wird, ist zur Begrenzung des Trocknungsverlustes das Hinzufügen von Magermilch mit einer Verdünnung von 1 : 20 zu der (den) empfohlenen Belastungssubstanz(en) zulässig.

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem 10-Fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

Das Verfahren der Herstellung und Sterilisation sowie die Zusammensetzung müssen im Prüfbericht aufgezeichnet werden.

5.2.3 Keimträger

5.2.3.1 Allgemeines

Für jede Prüfung müssen neue Keimträger verwendet werden.

5.2.3.2 Obligatorische Keimträger

Scheiben aus nichtrostendem Stahl 301 (EN 10088-1), Durchmesser 3 cm bis 4 cm, nach EN 10088-2 als Sorte 2B bewertet, beidseitig poliert. Die Oberflächen sollten so eben wie möglich sein; es wird nichtrostender Stahl mit einer Dicke von 1,2 mm oder 1,5 mm verwendet. Sie dürfen nur einmal verwendet und müssen dann verworfen werden.

Vor der Verwendung sollten die Flächen 60 min in einem Becherglas (Mindestfassungsvermögen: 50 ml) angeordnet werden, das mindestens 20 ml Decon ®¹ mit einer Volumenkonzentration von 5 % (V/V) enthält. Die Scheiben werden danach sofort 10 s mit Wasser (siehe 5.2.2.2.1) gespült.

Die Fläche darf zwischenzeitlich in keiner Weise trocknen. Die Scheiben dürfen nur mit einer Pinzette gehandhabt werden. Die Prüfflächen werden weitere 10 s unter fließendem Wasser (siehe 5.2.2.2.1) gespült, um die vollständige Entfernung des Detergens sicherzustellen. Um einen ausreichenden Wasserstrom zu erreichen, kann ein Druckgefäß mit geeignetem Schlauch und Verbindungen oder ein anderes geeignetes Verfahren zur Lieferung einer sterilisierten Flüssigkeit verwendet werden, mit dem die Zufuhr auf etwa 2 000 ml je min eingestellt werden kann. Die saubere Scheibe wird für 15 min in ein Bad mit Isopropanol mit einer Volumenkonzentration von 70 % (V/V) gegeben. Die Scheibe wird herausgenommen und mittels Verdunstung in einem laminaren Luftstrom getrocknet.

5.2.3.3 Zusätzliche Keimträger

Unter der Voraussetzung, dass er porenfrei und im Prüfbericht genau beschrieben ist, darf jeder Keimträger benutzt werden.

Die Keimträger müssen zum Ausstreichen eines 50-µl-Inokulums auf einer Oberfläche mit einer Fläche von 3 cm² (2 cm Durchmesser) geeignet sein. Die Umsetzbarkeit des Ausstreichens auf diesem Keimträger wird verifiziert. Sie müssen danach dafür geeignet sein, dass sie in einen 150-ml- bis 500-ml-Behälter und zum Plattieren in eine Petrischale eingebracht werden können.

Die Anforderungen an die Reinigung, Desinfektion und/oder Sterilisation müssen entsprechend dem Keimträgerformat und der Art des Materials bestimmt und genau im Prüfbericht angegeben werden.

5.3 Geräte und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

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

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

¹ Decon ® ist ein Beispiel eines geeigneten handelsüblichen Produktes. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Sterilisator

- a) Zur Sterilisation durch feuchte Hitze 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 Wasserbad, regelbar bei $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$.

5.3.2.3 Brutschränke

- Brutschrank, zur Trocknung kontaminierter Keimträger in weniger als 2 h mit oder ohne Luftaustausch, geregelt auf $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- Brutschrank (für bakterizide, mykobakterizide, sporizide, viruzide und Phagen-Wirkung), einstellbar auf eine Temperatur von entweder $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Brutschrank (für fungizide und levurozide Wirkung), einstellbar auf eine Temperatur von $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$;
- CO_2 -Brutschrank (95 % Luft, 5 % CO_2), einstellbar auf eine Temperatur von entweder $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ zur Bebrütung von Zellkulturen und Viren.

5.3.2.4 pH-Messgerät mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, zur Messung des pH-Werts der Agarmedien. Es sollte eine Einstichelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

5.3.2.5 Stoppuhr

5.3.2.6 Mechanisches oder elektromechanisches Schüttelgerät

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem mit den zu filtrierenden Substanzen kompatiblen Material.

Das Gerät muss mit einem analytischen Filterhalter mit einem Mindestvolumen von 50 ml ausgestattet sein. Es muss für die Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von $0,45\ \mu\text{m}$ geeignet sein.

Die verwendete Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen über die Membran zu erreichen und einen zu lange andauernden 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, Temperatur einstellbar auf 2°C und 8°C .

5.3.2.9 Messpipetten mit Nennvolumina von 10 ml, 2 ml, 1 ml und 0,1 ml. Kalibrierte automatisierte Pipetten dürfen verwendet werden.

5.3.2.10 Petrischalen in den Größen 90 mm bis 100 mm im Durchmesser und 55 mm für die Membranen.

5.3.2.11 Glasperlen (Durchmesser: 3 mm bis 4 mm)

5.3.2.12 Glasfilterfritte, Porenweite im Bereich zwischen $40\ \mu\text{m}$ und $100\ \mu\text{m}$ (ISO 4793) = Porenweite 2.

- 5.3.2.13 Laborzentrifuge** mit einer Beschleunigung von 2 000 g_N (4 000 g_N für Bakteriophagen).
- 5.3.2.14 Roux-Flasche** mit geradem Hals.
- 5.3.2.15 Analysenwaage** mit entsprechendem Betriebsbereich.
- 5.3.2.16 Spektralphotometer**, ausgestattet mit einem Monochromator.
- 5.3.2.17 Vakuumpumpe**
- 5.3.2.18 Sterile Membranfilter** mit hydrophobem Gitternetz, 0,45 μm Porenweite (Durchmesser 47 mm bis 50 mm), aus Celluloseester oder jeglichem an das Prüfprodukt angepassten anderen Werkstoff.
- 5.3.2.19 Vorrichtung zum Halten der Prüfkeimträger** bei einem festgelegten Abstand zur Quelle.
- 5.3.2.20 Mikroskop**, vorzugsweise ein Phasenkontrastmikroskop (für die Prüfungen der sporiziden Wirkung) und Umkehrmikroskop für die viruzide Wirkung.
- 5.3.2.21 Pinzette**
- 5.3.2.22 Reagenzgläser** mit Schraubverschluss (Durchmesser 18 mm oder 20 mm).
- 5.3.2.23 Behälter**: Kolben oder Gefäße mit entsprechendem Fassungsvermögen.
- 5.3.2.24 Erlenmeyerkolben** mit breiterem Rand, Fassungsvermögen 250 ml oder 500 ml.
- 5.3.2.25 Kolben mit Schraubverschluss**
- 5.3.2.26 Mikropipetten** mit Einwegspitzen, die 0,05 ml = 50 μl zum Auftragen des Inokulums abgeben.
- 5.3.2.27 Ultraschall-Schwinger**, zwischen 30 kHz und 43 kHz.
- 5.3.2.28 Magnetrührer**, um die Zellen vor dem Abimpfen in Suspension zu halten.
- 5.3.2.29 Petrischalen**, sterile Reagenzgläser, Kulturgefäße mit geeignetem Fassungsvermögen.
- 5.3.2.30 Messkolben**, kalibriert bei 20 °C.
- 5.3.2.31 Sterile 96-Well-Mikrotiterplatten**, 6- bis 8-Well-Platten für die Zellkultur und Gefäße mit der Zellkultur.
- 5.3.2.32 Eismaschine oder handelsübliches Eis** zum Kühlen des Zellerhaltungsmediums und der Reaktionsgemische während der Prüfung.
- 5.3.2.33 Becken als Eisbad** mit Eis und Wasser.
- 5.3.2.34 Biologische Sicherheitswerkbank** der Klasse II (darf ebenfalls während des Trocknungsvorgangs des Inokulums verwendet werden).
- 5.3.2.35 Tiefkühleinrichtung** mit Temperaturen von höchstens –70 °C.
- 5.3.2.36 Exsikkator** mit Unterdruckmanometer oder Verwendung von MSS mit Luftaustausch als Alternative für den Trocknungsvorgang des Inokulums auf Keimträgern.
- 5.3.2.37 Hochgeschwindigkeitshomogenisator**, z. B. Potter-Homogenisator.