

	DIN EN 17846	
ICS 11.080.20 Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitatives Prüfverfahren zur Bestimmung der sporiziden Wirkung gegen <i>Clostridioides difficile</i> 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 17846:2023 Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative test method for the evaluation of sporicidal activity against <i>Clostridioides difficile</i> 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 17846:2023 Antiseptiques et désinfectants chimiques – Méthode d’essai quantitative pour l’évaluation de l’activité sporicide contre <i>Clostridioides difficile</i> 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 17846:2023 Gesamtumfang 44 Seiten DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech)		

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17846:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 176-03-06 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed).

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

Deutsche Fassung

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitatives Prüfverfahren zur Bestimmung der sporiziden
Wirkung gegen *Clostridioides difficile* 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 sporicidal
activity against *Clostridioides difficile* 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 sporicide contre *Clostridioides difficile* 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 4. September 2023 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	6
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Anforderungen	7
5 Prüfverfahren	8
5.1 Kurzbeschreibung	8
5.2 Materialien und Reagenzien	8
5.2.1 Prüforganismus	8
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	9
5.3 Apparate und Glasgeräte	11
5.3.1 Allgemeines	11
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	12
5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und der Produktprüflösungen	15
5.4.1 Prüfkeimsuspensionen	15
5.4.2 Produktprüflösung	16
5.5 Verfahren zur Beurteilung der sporiziden Wirkung des Produkts gegen <i>C. difficile</i>	17
5.5.1 Allgemeines	17
5.5.2 Verfahren	19
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	23
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen	23
5.6.2 Berechnung	23
5.7 Verifizierung des Verfahrens	28
5.7.1 Allgemeines	28
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	28
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte für Prüfmikroorganismen für die sporizide Wirksamkeit	28
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	28
5.8.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen/Prüfgemische	28
5.8.2 V_C -Werte	29
5.8.3 Limitierender Prüforganismus und sporizide Konzentration	29
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	30
5.9 Interpretation der Ergebnisse – Schlussfolgerung	30
5.10 Prüfbericht	30
Anhang A (informativ) Referenzstamm in nationalen Sammlungen	33
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien	34
Anhang C (informativ) Graphische Darstellungen des Prüfverfahrens	36
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts	38
Literaturhinweise	42

Bilder

Bild 1 — PVC-Hartschaumplatte (20 cm × 50 cm, Dicke 2 mm), FOREX classic, seidenmatte Oberfläche, einseitig folienbeschichtet und mit 4 Feldern markiert	13
Bild 2 — Schematische Darstellung der Markierungen und des Wischdurchgangs über vier Prüffelder auf der Prüffläche	14
Bild 3 — Zurückschieben des Einheitsgewichts von Hand über die Prüfflächen, ohne zusätzlichen Druck auszuüben	21

Bild C.1 — Graphische Darstellung des Prüfverfahrens (N_a)/Kontrollversuch mit Wasser (N_w)
für Gussplattenverfahren — sporizide Wirkung 36

Bild C.2 — Validierung 37

Tabellen

Tabelle 1 — Anzahl der je ml oder je 25 cm² in den verschiedenen Prüfgemischen
ausgezählten KBE 23

Tabelle 2 — Prüfplan 30

Tabelle B.1 — Neutralisationsmedien 34

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17846:2023) 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 Mai 2024, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2024 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.

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 einen Keimträgerversuch zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel zur Anwendung auf Oberflächen durch Aufbringen mit Tüchern im Rahmen der im Anwendungsbereich beschriebenen Anwendungsgebiete eine sporizide Wirkung gegen *Clostridioides difficile* aufweist, fest.

Der Laboratoriumsversuch simuliert praxisnahe Anwendungsbedingungen, wie z. B. Einwirkzeit, Temperatur und Belastungssubstanzen, einschließlich des vorherigen Antrocknens von festgelegten Prüforganismen auf einer Prüffläche als Träger und des Abwischens des Produkts 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 Produkts entspricht festgelegten Versuchsbedingungen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die sporizide Wirkung gegen Sporen von *Clostridioides difficile* von chemischen Desinfektionsmitteln fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte – bzw. bei gebrauchsfertigen Produkten bei der Verdünnung mit Wasser – als homogene, physikalisch stabile Zubereitung vorliegen.

Dieses Dokument ist anwendbar 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.

Aufgrund der neuen Verfahren zur Anwendung von Oberflächendesinfektionsmitteln wie vorgetränkten Tüchern wurde dieses Dokument erstellt, um die verschiedenen Anwendungsmethoden zu behandeln.

Das Dokument ist anwendbar für vier Verfahren zur Anwendung von Produkten zum Wischen und/oder Abputzen:

- a) Tränken eines nicht-spezifisierten Tuchs oder Putzlappens mit dem Produkt;
- b) Sprühen des Produkts auf ein nicht-spezifiziertes Tuch und/oder einen Putzlappen oder ein spezifiziertes Tuch oder Putzlappen;
- c) Tränken spezifizierter Tücher oder Putzlappen mit dem Produkt entsprechend den Herstellerempfehlungen durch den Anwender;
- d) Vortränken spezifizierter Tücher oder Putzlappen als gebrauchsfertige Tücher oder Putzlappen durch den Hersteller.

Bei allen Anwendungsarten muss mit dem Standardtuch [5.3.2.17 a)] der Kontrollversuch mit Wasser durchgeführt werden, da es sich um eine Prozess- oder Verfahrenskontrolle handelt.

Dieses Dokument ist nicht anwendbar für Produkte, die auf Oberflächen gesprüht oder geschwemmt und bis zur Einwirkungsanwendung darauf belassen werden; dann sollten Normen der Phase 2, Stufe 2 ohne mechanische Einwirkung und die zugehörigen Verfahren durchgeführt werden.

Die Prüffläche (5.3.2.16) wurde als Standardoberfläche gewählt und sollte alle nicht-porösen Oberflächen abdecken. Es war nicht beabsichtigt, den Einfluss der einzelnen unterschiedlichen Oberflächen zu behandeln.

Dieses Dokument ist anwendbar 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 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 17126:2018, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der sporiziden 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 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

vorgetränktes Tuch

gebrauchsfertiges Tuch

Tuch mit Desinfektionsmittel, das vom Tuchhersteller am Herstellungsort zum Tuch hinzugefügt wird

3.2

getränktes Tuch

Tuch mit Desinfektionsmittel, das vom Anwender zum Tuch hinzugefügt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Beispiele sind u. a. ein in Desinfektionsmittel getränktes Tuch oder ein mit Desinfektionsmittel besprühtes Tuch.

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 + 3,0 ml/l Schaf-Erythrozyten) entsprechend seiner praktischen Anwendungen und unter den folgenden Prüfbedingungen: Temperatur zwischen 4 °C und 30 °C, Einwirkzeit mindestens 1 min und höchstens entweder 30 min oder 60 min¹ geprüften Produkt muss eine dezimal-logarithmische (lg) Reduktion der Lebendkeimzahl um mindestens 4 Stufen auf dem Prüffeld 1 nachgewiesen werden. Der Mittelwert der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) je 25 cm² auf den Prüffeldern 2 bis 4 muss gleich oder weniger als 50 betragen, der Mittelwert der Anzahl der KBE auf den Prüffeldern 1 bis 4 des Kontrollversuchs mit Wasser muss gleich oder mehr als 10 betragen. Details zur Präzision und zur Wiederholung werden in 5.8.4 und EN 14885 angegeben.

1 Siehe 5.5.1.1 b).

Die sporizide Wirkung gegen Sporen von *Clostridioides difficile* muss unter Verwendung des folgenden Prüforganismus bewertet werden: *Clostridioides difficile* R027.

Wo es angezeigt ist, muss die spezifische sporizide Wirkung zusätzlich unter Anwendung anderer Einwirkzeiten und Prüforganismen 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 Sporen von *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) 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 standardisierter Härte [5.5.2.2 e)] anstelle des Produkts getränkt.

ANMERKUNG Für die Zwecke dieses Dokuments können Verweisungen auf „Wischen“, „Tuch“ und „gewischt“ mit „Abputzen“, „Putzlappen“ und „abgeputzt“ gleichgesetzt werden, wenn das Normverfahren angewendet wird, um eine Anwendung mit einem Putzlappen zu prüfen.

Temperatur, Verschmutzung und Einwirkzeit werden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers angewendet. Am Ende der Einwirkzeit werden die Prüforganismen von jedem Prüffeld mit befeuchteten Tupfern zurückgewonnen. Die Tupfer werden in ein Röhrchen eingebracht, das ein Verdünnungsmittel und ein Neutralisationsmedium enthält, und die Prüforganismen werden durch Schütteln vom Tupfer abgetrennt. Die Anzahl der überlebenden Prüforganismen 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 auf den 4 Feldern verteilt wurden, und ihre Anzahl einen bestimmten Wert erreicht hat. Die Prüfung wird unter Verwendung von *C. difficile* als Prüforganismus (Mindestprüfbedingungen) durchgeführt.

5.1.2 Zusätzliche Prüforganismen (nur sporizide Stämme), Einwirkzeiten und Belastungssubstanzen können verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismus

Die sporizide Wirkung gegen *C. difficile* muss unter Verwendung des folgenden als Prüforganismus ausgewählten Stamms² bewertet werden:

— *Clostridioides difficile* R027 NCTC 13366

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

2 Die NCTC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von National Collection of Type Cultures (NCTC) geliefert werden. Diese Angabe dient nur zur Information der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

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 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 fünf Jahre als Referenzprobe zurückgestellt werden.

Die geforderte Bebrütungstemperatur für diese Prüfbakterien beträgt $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ oder $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (5.3.2.3) unter anaeroben Bedingungen. Die gleiche Temperatur (36 °C oder 37 °C) und anaerobe Bedingungen müssen für alle Bebrütungen während deren Kontrolle und Validierung angewendet 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 den Prüforganismus 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 $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (5.3.2.4) gemessen.

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) BHIYT-L-Agar

— Hirn-Herz-Infusion	37,0 g
— Hefeextrakt	5,0 g
— L-Cystein	1,0 g
— Natriumtaurocholat	1,0 g
— Agar	15,0 g
— Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums $7,0 \pm 0,2$ betragen. Das Medium wird auf $48\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ abgekühlt. Es werden 200 000 Einheiten Lysozym in 10 ml Wasser (5.2.2.2) aufgelöst. Die enzymatische Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert.

Sollten Probleme bei der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auftreten, kann es notwendig sein, dem BHIYT-L 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 1 000,0 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.

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 – Allgemeines

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 wird mit Wasser (5.2.2.2) unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einen 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 eine 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 muss unter aseptischen Bedingungen frisch hergestellt und innerhalb von 12 h verbraucht werden.

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.

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 Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert.

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

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 Laborausrüstung³

und insbesondere die folgenden 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 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ und $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ [um den Agar im Fall des Gussplattenverfahrens im verflüssigten Zustand zu halten und auf zusätzliche Prüftemperaturen $\pm 1^\circ\text{C}$ (5.5.1)].

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

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierunsicherheit von nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. 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®-Mischer⁴.
- b) **Mechanisches Schüttelgerät**.

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem Material, das mit den zu filtrierenden Substanzen verträglich ist, mit einem Filterhalter von mindestens 50 ml Nutzvolumen und geeignet zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von $0,45\ \mu\text{m}$ für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) 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 Kühltank, 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. (Die Petrischalen werden für das Plattengussverfahren und für das Vorbefeuchten der Standardtücher mit 16 ml Prüflösung des Produkts oder mit Wasser standardisierter Härte benötigt.)

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

³ Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

⁴ Vortex®-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produkts durch CEN.