

DIN EN 17854



ICS 11.120.20

**Antimikrobielle Wundauflagen –
Anforderungen und Prüfverfahren;
Deutsche Fassung EN 17854:2024**

Antimicrobial wound dressings –
Requirements and test method;
German version EN 17854:2024

Pansements antimicrobiens –
Exigences et méthode d'essai;
Version allemande EN 17854:2024

Gesamtumfang 52 Seiten

DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech)

Nationales Vorwort

Das Dokument EN 17854:2024 wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 205 „Nicht aktive Medizinprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 176-04-08 AA „Verbandmittel und Behältnisse“ im DIN-Normenausschuss Gesundheitstechnologien (NAGesuTech).

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

Deutsche Fassung

Antimikrobielle Wundauflagen — Anforderungen und Prüfverfahren

Antimicrobial wound dressings —
Requirements and test method

Pansements antimicrobiens —
Exigences et méthode d'essai

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 14. August 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	6
3 Begriffe, Symbole und Abkürzungen	6
3.1 Begriffe	6
3.2 Symbole und Abkürzungen	7
4 Anforderungen	9
4.1 Dokumentation und Ausbildung	9
4.2 Mikrobizide Wundauflagen	9
4.3 Mikrobiostatische Wundauflagen	9
4.4 Leistungstabelle	10
5 Prüfverfahren	10
5.1 Kurzbeschreibung	10
5.2 Allgemeine Bedingungen	11
5.2.1 Volumina	11
5.2.2 Agarplatten	11
5.3 Materialien und Reagenzien	11
5.3.1 Prüforganismenstämme	11
5.3.2 Reagenzien und Kulturmedien	12
5.3.3 Prüfgerät	14
5.4 Herstellung der Prüf-Wundauflagen und negativen Kontroll-Wundauflagen	15
5.5 Berechnung des Sättigungsvolumens und des Arbeitsvolumens	15
5.6 Herstellung der Prüforganismen-Suspensionen	18
5.6.1 Bakterien	18
5.6.2 Hefen	18
5.6.3 Herstellung von <i>STOCKA</i>	18
5.7 Validierung der Neutralisation	19
5.7.1 Allgemeines	19
5.7.2 Herstellung des Inokulums	19
5.7.3 Toxizität des Neutralisationsmittels	20
5.7.4 Lebensfähigkeit der Prüforganismen	20
5.7.5 Wirksamkeit des Neutralisationsmittels	21
5.7.6 Auswertung der Daten	21
5.8 Verfahren	23
5.8.1 Einwirken der Prüforganismen auf die Prüf-Wundauflagen und negativen Kontroll-Wundauflagen	23
5.8.2 Rückgewinnung und Auszählung von Prüforganismen	25
5.8.3 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	26
5.8.4 Berechnung der Nachweisgrenze der Prüfung	29
5.8.5 Beurteilung der Gültigkeit der Prüfung	30
5.9 Prüfbericht	30
Anhang A (informativ) In Bezug genommene Prüforganismenstämme anderer nationaler Sammlungen	33
Anhang B (informativ) Validierung der Neutralisation	34
B.1 Kurzbeschreibung	34
B.2 Auswahl des Neutralisationsmittels	34
Anhang C (informativ) Neutralisationsmittel	35
Anhang D (informativ) Begründung	36
D.1 Allgemeines	36
D.2 Titel	36

D.3	Prüforganismenstämme	36
D.4	Herstellung der Prüforganismen-Suspensionen	37
D.5	Zuschneiden von Wundauflagen	37
D.6	Positiv-Kontrolle	37
D.7	Leistungsanforderungen	37
D.8	Medien	38
D.9	Bebrütungstemperaturen	38
D.10	Klassifikation von Wundauflagen	38
D.11	Sättigungsvolumen	38
D.12	Verfahren	39
D.13	Einwirkzeiten	39
D.14	Vorbehandlung und wiederholte Challengetests	39
D.15	Luftfeuchte	39
D.16	Rückgewinnung von Prüforganismen von Wundauflagen	39
Anhang E (informativ)	Parallelproben	41
Anhang F (informativ)	Graphische Darstellung der Prüfverfahren	42
Anhang G (informativ)	Beispiel für Tabellen in einem Prüfbericht	47
Literaturhinweise		49

Bilder

Bild F.1 — Sättigungsvolumen und Arbeitsvolumen	42
Bild F.2 — Anordnung der Prüfmuster der Wundauflage in der Petrischale	43
Bild F.3 — Herstellung von <i>STOCK A</i> und <i>STOCK B</i>	44
Bild F.4 — Validierung der Neutralisation	45
Bild F.5 — Herstellung von <i>INOC C</i> , <i>INOC T</i> und Überführung auf negative Kontroll-Wundauflagen und Prüf-Wundauflagen	46

Tabellen

Tabelle 1 — Leistungsanforderungen an antimikrobielle Wundauflagen	10
Tabelle 2 — Beispielhafte Berechnung von W_{Te}	16
Tabelle 3 — Beispielhafte Berechnung zur Anpassung von <i>STOCK N</i> bei Verwendung von Spatelplatten	20
Tabelle 4 — Beispielhafte Daten und Berechnungen von <i>NE</i> und <i>NT</i>	23
Tabelle 5 — Beispiel für die Herstellung von <i>INOC C</i> für eine theoretisch negative Kontroll-Wundauflage	24
Tabelle 6 — Beispiel für Berechnungen für eine theoretisch negative Kontroll-Wundauflage und eine Prüf-Wundauflage unter Verwendung von 1-ml-Agar-Gussplatten (5.2.2)	28
Tabelle 7 — Beispiel für eine Berechnung von <i>LOD</i> für ein beispielhaftes Prüfmuster der Wundauflage bei Verwendung von Gussplatten	30
Tabelle C.1 — Beispiele für Wirkstoffe und mögliche Neutralisationsmittel	35
Tabelle G.1 — Beispiel für eine ausgefüllte Tabelle mit Ergebnissen für den Prüfbericht (mikrobizid)	47
Tabelle G.2 — Beispiel für eine ausgefüllte Tabelle mit Ergebnissen für den Prüfbericht (mikrobiostatisch)	47

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17854:2024) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 205 „Nicht aktive Medizinprodukte“ erarbeitet, dessen Sekretariat von DIN gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis September 2024, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis September 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 ein Prüfverfahren zur Feststellung, ob eine Wundauflage eine antimikrobielle Wirkung aufweist, fest.

Diese Ausgabe des Dokumentes gilt als am besten geeignet für Arten von Wundauflagen, die im Rahmen der Ringversuche geprüft wurden, d. h. jene, die einen eingebetteten aktiven antimikrobiellen Wirkstoff enthalten und mindestens eine geringe Saugfähigkeit aufweisen. Für andere Arten von Wundauflagen liegen derzeit keine Daten vor (z. B. Folien sowie nicht absorbierende, mehrlagige, klebende, bakterienbindende Wundauflagen usw.) und daher ist nicht bekannt, ob dieses Dokument für diese Arten von Wundauflagen geeignet ist.

Mit der Laborprüfung unter Anwendung geeigneter Prüfflüssigkeiten, Temperatur, Organismen und Einwirkzeiten, die die Parameter in klinischen Situationen widerspiegeln, sollen Anwendungsbedingungen simuliert werden. Bedingungen, die die Wirkung von Wundauflagen mit antimikrobiellen Eigenschaften beeinflussen können, wurden mit einbezogen.

Die Bedingungen sollen allgemeine Anwendungen erfassen und Vergleiche von Laboren und Produktarten ermöglichen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Mindestanforderungen und ein Prüfverfahren für die antimikrobielle (mikrobizide oder mikrobiostatische) Wirkung von Wundauflagen fest. Es gilt für alle Wundauflagen, die ausdrücklich eine antimikrobielle Wirkung nach diesem Dokument für sich beanspruchen.

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*

3 Begriffe, Symbole und Abkürzungen

3.1 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten 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 <https://www.iso.org/obp>

3.1.1

antimikrobielle Wundauflage

Wundauflage, die nachweisbar mikrobizide oder mikrobiostatische Eigenschaften aufweist

3.1.2

antimikrobielle Wirkung

A

Fähigkeit einer Wundauflage, entweder das Wachstum von lebensfähigen Zellen relevanter Prüforganismen unter festgelegten Bedingungen zu hemmen oder eine Verringerung ihrer Anzahl zu bewirken, darunter lebensfähige Bakterienzellen und/oder lebensfähige vegetative Hefezellen

3.1.3

Prüfmuster der Wundauflage

Stück einer negativen Kontroll-Wundauflage oder Prüf-Wundauflage, das auf die nach diesem Dokument erforderliche Größe zugeschnitten wurde und für die Prüfung verwendet wird

3.1.4

mikrobizid

Fähigkeit der Wundauflage, bei Prüfung unter den Prüfbedingungen nach Abschnitt 5 zumindest eine log-3-Reduktion der Anzahl lebensfähiger Zellen der Prüforganismen zu bewirken

3.1.5

mikrobiostatisch

Fähigkeit der Wundauflage, bei Prüfung unter den Prüfbedingungen nach Abschnitt 5 zumindest eine log-0-Reduktion der Anzahl lebensfähiger Zellen der Prüforganismen zu bewirken

3.1.6

negative Kontroll-Wundauflage

Wundauflage, die der zu prüfenden Wundauflage entspricht, jedoch keine antimikrobielle Ausrüstung aufweist

Anmerkung 1 zum Begriff: Wenn keine ähnliche Wundauflage ohne antimikrobielle Ausrüstung verfügbar ist, muss eine sterile Mullkompressen genutzt werden.

3.1.7

Neutralisationsmittel

chemische Zubereitung zur Inaktivierung der antimikrobiellen Wirkung antimikrobieller Wirkstoffe

3.1.8

Plattenzählverfahren

Verfahren, bei dem die Anzahl der nach der Inkubation vorhandenen lebensfähigen Mikroorganismen durch Zählen der KBE berechnet wird

3.1.9

Plattenfaktor

PF

Faktor, der bei den KBE-Berechnungen angewendet wird und das Volumen der auf die Agarplatten ausgestrichenen Suspensionen berücksichtigt

Anmerkung 1 zum Begriff: Dieser Faktor unterscheidet sich in Abhängigkeit davon, ob es sich um Guss- oder Spatelplatten handelt.

3.1.10

Sättigungsvolumen

SV

maximales Volumen der Flüssigkeit, die bei der Prüfung nach 5.5 in diesem Dokument von dem Prüfmuster der Wundauflage aufgenommen wird

3.1.11

simulierte Wundflüssigkeit

SWF, en: simulated wound fluid

Prüfmedium, das Wundexsudat simulieren soll und zum Suspendieren von Prüforganismen genutzt wird, bevor es mit dem Prüfmuster der Wundauflage in Berührung kommt

3.1.12

Prüf-Wundauflage

antimikrobielle Wundauflage, die zur Beurteilung ihrer antimikrobiellen Wirkung geprüft wird

3.1.13

Arbeitsvolumen

WV, en: working volume

Volumen der SWF, das der Prüf-Wundauflage oder der negativen Kontroll-Wundauflage während der Prüfung zugegeben wird und mit 80 % des Sättigungsvolumens festgelegt ist

3.2 Symbole und Abkürzungen

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Symbole und Abkürzungen.

<i>A</i>	Antimikrobielle Wirkung
<i>KBE</i>	koloniebildende Einheit(en)
<i>C</i> ₀	Lebendkeimzahl je negativer Kontroll-Wundauflage bei T = 0 h
<i>C</i> ₂₄	Lebendkeimzahl je negativer Kontroll-Wundauflage bei T = 24 h

C_C	Lebendkeimzahl von <i>INOC C</i>
C_S	Lebendkeimzahl je Prüfmuster der Wundaufgabe (KBE/Prüfmuster), das zur Berechnung von <i>INOC C</i> verwendet wird (in Tabelle 5)
C_T	Lebendkeimzahl je Prüfmuster der Wundaufgabe (C_0 , C_{24} , oder T_{24})
C_V	Lebendkeimzahl je ml
DF	Verdünnungsfaktor (en: dilution factor)
h	Stunden
<i>INITIAL STOCK</i>	Mikrobensuspension in Maximal-Wiederbelebungslösung (MRD, en: maximum recovery diluent), die von der Agar-Subkultur geerntet wird
<i>INOC C</i>	Inokulum für die negative Kontroll-Wundaufgabe (hergestellt aus <i>STOCK B</i> und berechnetes Volumen der unbeimpften SWF gleich $WV_C - 0,5$ ml)
<i>INOC T</i>	Inokulum für die Prüf-Wundaufgabe (hergestellt aus <i>STOCK B</i> und berechnetes Volumen der unbeimpften simulierten Wundflüssigkeit gleich $WV_T - 0,5$ ml)
<i>LOD</i>	Nachweisgrenze (en: limit of detection)
$\log C_0$	durchschnittlicher logarithmischer Wert (log-Wert) für die Anzahl von Organismen, der von drei Prüfmustern der negativen Kontroll-Wundaufgaben unmittelbar nach der Beimpfung erhalten wurde
$\log T_{24}$	durchschnittlicher log-Wert für die Anzahl von Organismen, der von drei Prüfmustern der Prüf-Wundaufgaben nach einer Bebrütung über 24 h erhalten wurde
min	Minuten
N	Durchschnittliche Anzahl der KBE auf P_1 und P_2
N_0	Unverdünnte Prüfsuspension
NE	Wirksamkeit der Neutralisation (%)
N_{EFF}	Durchschnittliche Wirksamkeit des Neutralisationsmittels bei der Validierung der Neutralisation (KBE/ml)
NT	Toxizität der Neutralisation (%)
N_{TOX}	Durchschnittliche Toxizität des Neutralisationsmittels bei der Validierung der Neutralisation (KBE/ml)
N_{VIAB}	Durchschnittliche Lebensfähigkeit der Prüforganismen bei der Validierung der Neutralisation (KBE/ml)
P_1	Anzahl der Organismen auf Platte 1 der doppelt angelegten Agarplatten (KBE)
P_2	Anzahl der Organismen auf Platte 2 der doppelt angelegten Agarplatten (KBE)
PF	Plattenfaktor (3.1.9)
s	Sekunde
<i>STOCK A</i>	Mikrobensuspension von <i>INITIAL STOCK</i> , verdünnt in MRD auf 3×10^8 KBE/ml bis 1×10^9 KBE/ml, die zur Herstellung von <i>STOCK B</i> und <i>STOCK N</i> verwendet wird
<i>STOCK B</i>	Mikrobensuspension von <i>STOCK A</i> , verdünnt in SWF auf 3×10^6 KBE/ml bis 1×10^7 KBE/ml
<i>STOCK N</i>	Mikrobensuspension von <i>STOCK A</i> , verdünnt in MRD auf $1,5 \times 10^3$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^3$ KBE/ml, die bei der Validierung der Neutralisation mit 1-ml-Gussplatten verwendet wird
SV	Sättigungsvolumen
SV_A	Durchschnittliches Sättigungsvolumen von drei Parallelproben (g)

SV_{HIGH}	Höchstes prozentuales Sättigungsvolumen von drei Parallelproben (%)
SV_{LOW}	Geringstes prozentuales Sättigungsvolumen von drei Parallelproben (%)
SV_{MAX}	Höchstes gemessenes Sättigungsvolumen von drei Parallelproben (g)
SV_{MIN}	Geringstes gemessenes Sättigungsvolumen von drei Parallelproben (g)
SV_{SPREAD}	Prozentuale Verteilung der drei Parallelproben (%)
T_{24}	Lebendkeimzahl je Prüf-Wundauflage bei $T = 24$ h
V_{N}	Volumen des Neutralisationsmittels
V_{S}	Volumen, das dem Walkmischgerät-Beutel bei der Herstellung von dezimalen Verdünnungsreihen in 5.8.2.4 als Probe entnommen wird (ml)
V_{T}	Prüfvolumen = Volumen des Neutralisationsmittels (V_{N}) + Arbeitsvolumen (WV_{T} oder WV_{C}) (ml)
W_0	Durchschnittliche Masse des Prüfmusters der Wundauflage bei $T = 0$ h (g)
W_{Te}	Durchschnittliche Masse des vollständig gesättigten Prüfmusters der Wundauflage (g), die dann bestimmt wird, wenn sich die Masse zwischen zwei Zeitpunkten um nicht mehr als 5 % ändert
W_{Tv}	Masse des Prüfmusters der Wundauflage nach der Sättigung in SWF zum jeweiligen Zeitpunkt, soweit zutreffend (g)
WV	Arbeitsvolumen (3.1.13), das Volumen der SWF, das dem Prüfmuster der Wundauflage während der Prüfung zugegeben wird und mit 80 % des Sättigungsvolumens (ml) festgelegt ist
WV_{C}	Arbeitsvolumen (WV), das der negativen Kontroll-Wundauflage zugegeben wird (ml)
WV_{T}	Arbeitsvolumen (WV), das der Prüf-Wundauflage zugegeben wird (ml)

4 Anforderungen

4.1 Dokumentation und Ausbildung

Die Arbeitsweise von Laboren, die die Prüfung nach diesem Dokument durchführen, sollte einem geeigneten Qualitätsmanagementsystem (wie EN ISO 13485 [1], EN ISO/IEC 17025 [2] oder Ähnliches) folgen. Dies stellt sicher, dass von dem Prüflabor geeignete Aufzeichnungen aufbewahrt werden, um die lückenlose Rückverfolgbarkeit aller Rohdaten, die den im Prüfbericht (5.9) angegebenen Ergebnissen zugrunde liegen, zu ermöglichen und sicherzustellen, dass eine entsprechende Qualifikation für mikrobiologische Untersuchungen vorhanden ist.

4.2 Mikrobizide Wundauflagen

Bei der Prüfung nach dem in diesem Dokument beschriebenen Prüfverfahren müssen antimikrobielle Wundauflagen in einer gültigen Prüfung (5.8.5) innerhalb der vorgeschriebenen Einwirkzeit von 24 h ($T = 24$ h) eine antimikrobielle Wirkung gegen alle drei Prüforganismen (5.3.1) zeigen, die mindestens einer log-3-Reduktion der Aktivität entspricht.

ANMERKUNG 1 Die log-Werte im Text und in den Gleichungen dieses Dokumentes beziehen sich auf $\log_{10}$.

ANMERKUNG 2 Eine Begründung für die mikrobiziden Anforderungen ist in Anhang D enthalten.

4.3 Mikrobiostatische Wundauflagen

Bei der Prüfung nach dem in diesem Dokument beschriebenen Prüfverfahren müssen mikrobiostatische Wundauflagen in einer gültigen Prüfung (5.8.5) innerhalb der vorgeschriebenen Einwirkzeit von 24 h

(T = 24 h) eine antimikrobielle Wirkung gegen alle drei Prüforganismen (5.3.1) zeigen, die ein weiteres Wachstum des ursprünglichen Inokulums verhindert. Das bedeutet, dass zumindest eine log-0-Reduktion erreicht wird, die keiner Zunahme der Anzahl der Prüforganismen innerhalb der vorgeschriebenen Einwirkzeit von 24 h (T = 24 h) bei allen drei Prüforganismen (5.3.1) entspricht.

4.4 Leistungstabelle

Tabelle 1 enthält die Leistungsanforderungen an antimikrobielle Wundauflagen, die als mikrobizid oder mikrobiostatisch einzustufen sind.

Tabelle 1 — Leistungsanforderungen an antimikrobielle Wundauflagen

Mikrobizid	Mikrobiostatisch
$A \geq 3,0$ gegen alle drei Prüforganismen	$A \geq 0,0$ gegen alle drei Prüforganismen
A = Antimikrobielle Wirkung (5.8.3.5)	

Wenn eine Prüf-Wundauflage weder eine mikrobizide noch eine mikrobiostatischen Wirkung aufweist, ist sie nach diesem Dokument nicht antimikrobiell wirksam.

Der Prüfbericht (5.9) muss bereitgestellt werden, um eine Übereinstimmung mit diesem Dokument zu zeigen.

Wenn ein Hersteller eine antimikrobielle Wirkung für weitere Einwirkzeiten neben der vorgeschriebenen Einwirkzeit von 24 h (T = 24 h) angibt, dürfen diese zusätzlichen Zeitpunkte unter Anwendung dieses Dokumentes überprüft werden. Die Lebensfähigkeit der Prüforganismen bei der negativen Kontroll-Wundauflage muss für die zusätzlichen Zeitpunkte validiert werden. Die zusätzlichen Daten der Validierung und die Prüfergebnisse müssen in den Prüfbericht (5.9) aufgenommen und auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden.

Das Prüfverfahren in diesem Dokument darf mit zusätzlichen Prüforganismen angewendet werden, darunter auch Schimmelpilze, sofern eine angemessene Validierung der Neutralisation durchgeführt wurde. Wenn die Ergebnisse von Prüfungen mit solchen zusätzlichen Prüforganismen öffentlich verfügbar gemacht werden, muss die Validierung der Neutralisation auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden.

ANMERKUNG Beispielhafte Tabellen sind in Anhang G enthalten.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Ein Muster einer Wundauflage (Prüf-Wundauflage und negative Kontroll-Wundauflage) wird mit einer Prüfsuspension aus Bakterien oder Hefe in einer Lösung aus simulierter Wundflüssigkeit beimpft. Das Volumen der zuzugebenden Prüfsuspension wird vor der Beimpfung durch Bestimmung des Sättigungsvolumens des Prüfmusters der Wundauflage festgelegt. Die Prüfmuster der Wundauflage werden über eine festgelegte Einwirkzeit bei einer festgelegten Temperatur inkubiert und anschließend in ein zuvor validiertes Neutralisationsmittel überführt, um damit die Wirkung des antimikrobiellen Wirkstoffs zu neutralisieren. Im Anschluss wird die Anzahl der überlebenden Bakterien oder Hefen, die von der Prüf-Wundauflage zurückgewonnen werden können, quantitativ bestimmt und mit der Anzahl der Bakterien oder Hefen in einer negativen Kontroll-Wundauflage zu Beginn der Prüfung verglichen. Die negative Kontroll-Wundauflage muss während der gesamten Prüfdauer genauso behandelt werden wie die Prüf-Wundauflage.

ANMERKUNG Eine Begründung für die gewählten Prüfparameter ist in Anhang D enthalten.

Alle zulässigen Abweichungen von diesem Prüfverfahren müssen auf geeignete Weise validiert und im Prüfbericht dokumentiert werden und ihre Anwendung muss begründet werden.

5.2 Allgemeine Bedingungen

5.2.1 Volumina

Sofern nicht anders angegeben, müssen alle Volumina eine Grenزابweichung von $\pm 5\%$ einhalten.

5.2.2 Agarplatten

Dieses Dokument wurde mit der Absicht erarbeitet, dass 1-ml-Agar-Gussplatten zur Auszählung genutzt werden, d. h. 1 ml des Suspensionsvolumens wird mit 15–20 ml geschmolzenem Agar vermischt. Es ist jedoch bekannt, dass einige Labore bei der Auszählung nur Spatelplatten verwenden. Das bei Verwendung von Spatelplatten geänderte Volumen muss an verschiedenen Stellen des Verfahrens berücksichtigt werden. Aus diesem Grund werden im gesamten Dokument Anleitungen für die erforderlichen Anpassungen gegeben, wenn Spatelplatten verwendet werden. Die Anwender dieses Dokumentes sollten sicherstellen, dass die erforderlichen Anpassungen sorgfältig vorgenommen werden. Bei Verwendung von Spatelplatten ist möglicherweise eine Verringerung der Bebrütungsdauer erforderlich, um ein zu starkes Wachstum der Kolonien zu vermeiden.

ANMERKUNG Die Anwendung eines sehr geringen Volumens für Spatelplatten vermindert die Empfindlichkeit der Prüfung, was sich auf die Fähigkeit, die benötigte log-3-Reduktion zu berechnen, auswirken kann. Deshalb wird stets die Verwendung von 1-ml-Gussplatten empfohlen.

5.3 Materialien und Reagenzien

5.3.1 Prüforganismenstämme

5.3.1.1 Aufbewahrung der Organismen

Die Organismen müssen den Empfehlungen des Herstellers oder EN 12353 entsprechend aufbewahrt werden.

Die Identifikation und der Ursprung (Kultursammlung) der Organismen sowie das Aufbewahrungsverfahren im Labor müssen aufgezeichnet werden.

Prüforganismenstämme aus nationalen Sammlungen, die gleichwertig mit den in 5.3.1.2 und 5.3.1.3 aufgeführten sind, dürfen verwendet werden; einige gebräuchliche alternative Empfehlungen in anderen nationalen Sammlungen sind in Anhang A enthalten.

5.3.1.2 Bakterien

Die folgenden beiden Bakterienstämme müssen beurteilt werden:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

Staphylococcus aureus ATCC 6538

5.3.1.3 Hefen

Der folgende Hefestamm muss beurteilt werden:

Candida albicans ATCC 10231

5.3.1.4 Zusätzliche Prüforganismenstämme

Zusätzlich zu den in 5.3.1.2 und 5.3.1.3 aufgeführten dürfen weitere Prüforganismenstämme zur Beurteilung genutzt werden. Ihre Eignung zur Herstellung von ausreichend konzentrierten Inokula muss vor der Anwendung überprüft werden.

Wenn die zusätzlichen Stämme nicht in einer Referenzsammlung klassifiziert sind (z. B. klinische Isolate), sollten ihre Identifikationsmerkmale in dem Bericht angegeben werden und sie sollten mindestens fünf Jahre von dem Prüflabor aufbewahrt werden, um die Prüfungen bei Bedarf wiederholen zu können.

5.3.2 Reagenzien und Kulturmedien

5.3.2.1 Allgemeines

Die bei den Prüfungen verwendeten Reagenzien müssen analysenrein und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Zur Herstellung der Kulturmedien werden getrocknete oder gebrauchsfertige handelsübliche Produkte empfohlen. Die Anleitungen des Herstellers zur Herstellung, Sterilisation und Aufbewahrung der Kulturmedien müssen strikt befolgt werden. Sofern nichts anderes angegeben ist, müssen alle Reagenzien vor der Verwendung auf Umgebungstemperatur (15 °C bis 25 °C) gebracht werden.

Von den aufgeführten Medien abweichende Medien dürfen verwendet werden, wenn sie zuvor angemessen validiert wurden. Die Anwendung alternativer Agartechnologien, etwa Petrifilm™- oder Compact Dry™1-Platten, ist ebenfalls annehmbar, sofern ihre Anwendung angemessen validiert wurde und sie zur Durchführung der Validierung der Neutralisation (5.7) verwendet wurden. Jegliche alternativen Medien oder Medientechnologien müssen im Prüfbericht (5.9) als Abweichung angegeben werden.

Es wird nicht empfohlen, das fetale Kälberserum (FKS), das auch als fetales Rinderserum bekannt ist, in der SWF (5.3.2.5) auszutauschen (siehe Anhang D, D.8).

5.3.2.2 Wasser

Zur Herstellung der Nährmedien muss gereinigtes (d. h. destilliertes, entmineralisiertes, entionisiertes oder durch Umkehrosmose hergestelltes) Wasser oder Wasser von ähnlicher Qualität, das keine Substanzen enthält, die das Wachstum der Mikroorganismen unter den Prüfbedingungen hemmen oder beeinflussen können (z. B. Chlor-, Ammoniak- und Metallionenspuren), verwendet werden.

ANMERKUNG Siehe EN ISO 11133 [3] für weitere Informationen zur Herstellung von Kulturmedien.

5.3.2.3 Trypton-Soja-Bouillon (TSB)

Zur Erhaltung der Bakterien und Qualität der Lebendkeimzahl.

Trypton, pankreatisch verdautes Casein	15,0 g
Soja-Pepton, papainisch verdautes Soja	5,0 g
NaCl	5,0 g
Wasser	bis 1 000 ml

Es erfolgt die Sterilisation im Autoklav. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert zwischen 7,1 und 7,5 liegen.

5.3.2.4 Trypton-Soja-Agar (TSA)

Zur Erhaltung der Bakterien und Qualität der Lebendkeimzahl.

Trypton, pankreatisch verdautes Casein	15,0 g
Soja-Pepton, papainisch verdautes Soja	5,0 g
NaCl	5,0 g

1 Petrifilm™ und Compact Dry™ sind Beispiele für handelsübliche alternative Agarprodukte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser Produkte durch CEN oder CENELEC.

Agar	15,0 g
Wasser	bis 1 000 ml

Es erfolgt die Sterilisation im Autoklav. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert zwischen 7,1 und 7,5 liegen.

5.3.2.5 Simulierte Wundflüssigkeit (SWF)

Zum Suspendieren von Prüforganismen, bevor die Berührung mit dem Prüfmuster der Wundauflage erfolgt.

Maximal-Wiederbelebungslösung (5.3.2.6)	50 %
FKS; steril, hitzeinaktiviert	50 %

Das FKS muss vor der Verwendung entweder von dem Lieferanten oder von dem Labor durch Erwärmung inaktiviert werden, um das Komplemente-System zu inaktivieren. Die MRD und das FKS werden unter aseptischen Bedingungen vermischt.

5.3.2.6 Maximal-Wiederbelebungslösung (MRD)

Zur Herstellung der SWF und der Prüforganismen-Suspensionen.

Pepton	1,0 g
NaCl	8,5 g
Wasser	bis 1 000 ml

Es erfolgt die Sterilisation im Autoklav. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert zwischen 6,8 und 7,2 liegen.

5.3.2.7 Sabouraud-Glucose-Bouillon (SAB)

Zur Erhaltung der Hefen und Qualität der Lebendkeimzahl.

Pepton Neutral Bact. Pepton	10 g
Destilliertes Wasser	1 000 ml

Es erfolgt eine Erwärmung bis zum Siedepunkt, um das Pepton vollständig aufzulösen. Anschließend wird Folgendes hinzugegeben:

Glukose, puriss. (Dextrose)	20 g
-----------------------------	------

Die Glukose wird schnellstmöglich von Hand in dem heißen, aber nicht kochenden Bouillon aufgelöst und vermischt.

Es erfolgt die Sterilisation im Autoklav. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert zwischen 5,8 und 6,0 liegen.

5.3.2.8 Sabouraud-Dextrose-Agar (SAA)

Zur Erhaltung der Hefen und Qualität der Lebendkeimzahl.

Pepton Neutral Bact. Pepton	10 g
Agar, bakteriologisch	18 g
Destilliertes Wasser	1 000 ml

Es erfolgt eine Erwärmung bis zum Siedepunkt, um das Pepton vollständig aufzulösen. Anschließend wird Folgendes hinzugegeben:

Glukose, puriss. (Dextrose) 20 g

Die Glukose wird schnellstmöglich von Hand in dem heißen, aber nicht kochenden Agar aufgelöst und vermischt.

Es erfolgt die Sterilisation im Autoklav. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert zwischen 5,8 und 6,0 liegen.

5.3.2.9 Neutralisationsmittel

Die Neutralisationslösung muss im Hinblick auf den Wirkstoff in dem Produkt durch Prüfung nach 5.7 validiert werden. Das Neutralisationsmittel muss vor der Verwendung steril sein.

ANMERKUNG Angaben über Neutralisationsmittel, die sich für einige Kategorien antimikrobieller Substanzen als geeignet erwiesen haben, sind in 5.7.5.2 und Anhang C angegeben.

5.3.3 Prüfgerät

Die üblichen mikrobiologischen Laborgeräte und insbesondere die folgenden müssen verwendet werden:

5.3.3.1 Spektralphotometer, das in der Lage ist, Messungen bei Wellenlängen von 600 nm bis 660 nm durchzuführen, oder McFarland-Nephelometer.

5.3.3.2 Brutschrank, der die folgenden Temperaturbereiche halten kann: 20 °C bis 25 °C, 30 °C bis 34 °C und 30 °C bis 35 °C.

5.3.3.3 Walkmischgerät in kleiner Ausführung, das in der Lage ist Volumina bis zu 100 ml zu bearbeiten (z. B. Stomacher 80, Biomaster, oder Neutec Masticator 2 Compact model – 80 ml)².

5.3.3.4 Sterile Walkmischgerät-Beutel.

5.3.3.5 Mischer, elektromechanisches Rührwerk (z. B. Vortex®-Mischer)³.

5.3.3.6 Verschiedene sterile Behälter, Reagenzgläser, Flaschen und Kolben mit geeignetem Fassungsvermögen bis zu 60 ml.

5.3.3.7 Sterile Petrischalen, 55 mm Durchmesser und 90 mm Durchmesser.

5.3.3.8 Pinzetten, steril.

5.3.3.9 pH-Messgerät, auf geeignete Weise kalibriert und in der Lage, den pH-Wert bei 19 °C bis 21 °C bis ±0,1 pH-Einheiten zu messen.

5.3.3.10 Autoklav, der während einer Haltezeit von mindestens 15 min auf einer Temperatur von 121 °C bis 124 °C gehalten werden kann.

5.3.3.11 Pipetten, mit einem Nenn-Fassungsvermögen von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml kalibriert. Automatische Pipetten dürfen verwendet werden.

2 Die Labormischer Stomacher 80, Biomaster und Neutec Masticator 2 Compact model – 80 ml sind Beispiele für handelsübliche, geeignete Produkte. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser Produkte durch CEN oder CENELEC.

3 Der Vortex®-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes, im Handel erhältliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieser Produkte durch CEN oder CENELEC.