

DIN EN 13624

ICS 11.080.20

Einsprüche bis 2010-04-22
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 13624:2004-02

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden und
levuroziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung prEN 13624:2010**

Chemical disinfectants and antiseptics –

Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal and yeasticidal activity in the
medical area –

Test method and requirements (phase2, step 1);

German version prEN 13624:2010

Désinfectants chimiques et antiseptiques –

Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide en
médecine –

Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);

Version allemande prEN 13624:2010

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2010-02-22 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses
Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise als Datei per E-Mail an named@din.de in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle
kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den Normenausschuss Medizin (NAMED) im DIN, 10772 Berlin (Hausanschrift:
Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevante
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 61 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMED) im DIN

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm wurde von der Arbeitsgruppe 1 „Humanmedizin“ (Sekretariat: DIN) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der Arbeitsgruppe 1 des CEN/TC 216 wird über den Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) wahrgenommen.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 13624:2004-02 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Erweiterung des Anwendungsbereichs über die Instrumentendesinfektion hinaus auf Produkte für die hygienische Händewaschung, hygienische Händedesinfektion, chirurgische Händewaschung und Händedesinfektion sowie Flächendesinfektion;
- b) Überarbeitung der statistischen Auswertung (Berücksichtigung der Ringtestergebnisse);
- c) Aufnahme eines modifizierten Verfahrens zur Prüfung von Produkten mit 97 % Konzentration für bestimmte Anwendungen;
- d) Harmonisierung der Norm mit den anderen Normen des CEN/TC 216.

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)

Désinfectants chimiques et antiseptiques — Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide en médecine — Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1)

Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity in the medical area — Test method and requirements (phase 2, step 1)

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

Inhalt

	Seite
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	8
5.1 Prinzip	8
5.2 Materialien und Reagenzien	8
5.2.1 Prüforganismen	8
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	9
5.3 Apparate und Glasgeräte	12
5.3.1 Allgemeines	12
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	12
5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüfkeime und der Produktprüflösungen	13
5.4.1 Suspensionen der Prüfkeime (Prüf- und Validierungssuspension)	13
5.4.2 Produktprüflösungen	17
5.5 Verfahrensablauf zur Bewertung der fungiziden Wirkung des Produkts	17
5.5.1 Allgemeines	17
5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	19
5.5.3 Membranfiltrationsverfahren	21
5.5.4 Modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte	24
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	26
5.6.1 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen	26
5.6.2 Berechnung	26
5.7 Verifizierung des Verfahrens	32
5.7.1 Allgemeines	32
5.7.2 Kontrolle der gewichteten Mittelwerte der Auszählungen	32
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	32
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	33
5.8.1 Keimreduktion	33
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	33
5.8.3 Grenzwert-Prüfkeim und fungizide oder levurozide Konzentration	33
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	33
5.9 Interpretation der Ergebnisse – Schlussfolgerung	34
5.9.1 Allgemeines	34
5.9.2 Fungizide Wirksamkeit bei Produkten für die Instrumentendesinfektion	34
5.9.3 Fungizide Wirksamkeit bei Produkten für die Oberflächendesinfektion	34
5.9.4 Levurozide Wirksamkeit für Händedesinfektions- und Händewaschprodukte	34
5.9.5 Levurozide Wirksamkeit bei Produkten für die Instrumentendesinfektion	34
5.9.6 Levurozide Wirksamkeit bei Produkten für die Oberflächendesinfektion	34
5.9.7 Qualitätsnachweis für bestimmte Anwendungsgebiete	35
5.10 Prüfbericht	35
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Stammsammlungen	37
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten	38
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung der Prüfverfahren	40
C.1 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	40

	Seite
C.2 Membranfiltrationsverfahren	42
C.3 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte)	44
C.4 Membranfiltrationsverfahren (modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte)	46
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichtes	48
Anhang E (informativ) Präzision der Prüfergebnisse	54
Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 93/42/EWG	58
Literaturhinweise	59

Vorwort

Dieses Dokument (prEN 13624:2010) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 13624:2003 ersetzen.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EG-Richtlinien.

Zum Zusammenhang mit EG-Richtlinien siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokuments ist.

Einleitung

Diese Europäische Norm legt einen Suspensionsversuch fest, mit dem festgestellt werden soll, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum auf den im Anwendungsbereich beschriebenen Gebieten eine fungizide oder levurozide Wirkung aufweist.

Dieser Laborversuch berücksichtigt praktische Anwendungsbedingungen des Produkts, zu denen die Einwirkzeit, die Temperatur, die Prüfkeimen und die Belastungssubstanzen gehören, d. h. Bedingungen, die dessen Wirkung in praktischen Situationen beeinflussen können.

Die festgelegten Bedingungen sollen allgemeinen Ansprüchen genügen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten ermöglichen. Jede in diesem Versuch ermittelte Anwendungskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht den gewählten Versuchsbedingungen. Bei einigen Anwendungsarten können jedoch die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt unterschiedlich sein, und deshalb müssen zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren und Mindestanforderungen für die fungizide oder levurozide (Hefen abtötende) Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte bzw. – im Fall von gebrauchsfertigen Produkten – mit Wasser als homogenes physikalisch stabiles Präparat vorliegen. Die Produkte können nur in einer Konzentration bis zu 80 % (97 % bei einem modifizierten Verfahren in Sonderfällen) geprüft werden, da durch Zugabe der Prüfkeime und der Belastungssubstanz stets eine gewisse Verdünnung bewirkt wird.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die im humanmedizinischen Bereich für hygienische Händedesinfektion und Händewaschung, chirurgische Händedesinfektion und Händewaschung, für die Instrumentendesinfektion durch Eintauchen sowie für die Oberflächendesinfektion mittels Wischen, Sprühen, Spülen o. ä. verwendet werden.

Diese Europäische Norm gilt für Bereiche und Bedingungen, wo eine Desinfektion oder Antisepsis aus medizinischen Gründen angezeigt ist. Derartige Gründe treten bei der Patientenbetreuung z. B. in

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

auf und können auch am Arbeitsplatz oder im privaten Bereich gegeben sein. Eingeschlossen sein können auch Einrichtungen wie Wäschereien und Küchen, die der direkten Versorgung der Patienten dienen.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren dient zur Bestimmung der Wirksamkeit kommerziell erhältlicher Zubereitungen oder Wirkstoffe unter den jeweiligen Anwendungsbedingungen.

ANMERKUNG 2 Dieses Verfahren entspricht einer Prüfung der Phase 2, Stufe 1.

EN 14885 legt detailliert die Beziehungen der unterschiedlichen Prüfungen untereinander und zu „Anwendungsempfehlungen“ fest.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Aufbewahrung von Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden, mykobakteriziden, sporiziden und fungiziden Wirkung*

EN 14885, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika*

ISO 4793, *Laboratory sintered (fritted) filters — Porosity grading, classification and designation*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 14885.

4 Anforderungen

Bei Prüfung nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 unter simulierten Bedingungen niedriger Belastung (0,3 g/l Rinderalbuminlösung) oder unter Bedingungen hoher Belastung (3 g/l Rinderalbuminlösung und 3 ml/l gewaschene Schaf-Erythrozyten) muss das Produkt eine Verminderung der Keimzahl um mindestens 4 dezimallogarithmische (lg) Stufen nachweisen (für hygienische und chirurgische Händewaschungen eine Verminderung um mindestens 2 lg Stufen). Bei Desinfektionsmitteln für Instrumente im humanmedizinischen Bereich, für die der Hersteller die Anwendung bei höheren Temperaturen empfiehlt, muss das Produkt die Reduktion um 4 lg Stufen nur bei der empfohlenen Temperatur nachweisen.

Tabelle 1 — Obligatorische und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Hygienische Hände- desinfektion und Händewaschung	Chirurgische Hände- desinfektion und Händewaschung	Instrumenten- desinfektion	Oberflächen- desinfektion
Prüforganismus a) obligatorisch	<i>Candida albicans</i> (vegetative Zellen)	<i>Candida albicans</i> (vegetative Zellen)	a1) fungizide Wirkung: <i>Aspergillus niger</i> (Sporen) <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen) a2) levurozide Wirkung: <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen)	a1) fungizide Wirkung: <i>Aspergillus niger</i> (Sporen) <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen) a2) levurozide Wirkung: <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen)
b) zusätzlich	Jeder zutreffende Prüfkeim			
Prüftemperatur a) obligatorisch	20 °C	20 °C	Bei der niedrigsten empfohlenen Temperatur, min. 20 °C, max. 60 °C	20 °C
b) zusätzlich	Entsprechend der Empfehlung des Herstellers, jedoch nicht höher als			
	20 °C	20 °C	60 °C	30 °C
Einwirkzeit a) obligatorisch	60 s	5 min	60 min	5 min oder 60 min ^a
b) zusätzlich	Entsprechend der Empfehlung des Herstellers, jedoch nicht länger als			
	60 s ^b	5 min	60 min	5 min oder 60 min ^a
Belastungssubstanz a) obligatorisch, niedrige Belastung	0,3 g/l Rinderalbumin- lösung (hygienische Händedesinfektion)	0,3 g/l Rinderalbumin- lösung (chirurgische Händedesinfektion)	0,3 g/l Rinderalbumin- lösung	0,3 g/l Rinderalbumin- lösung
a) hohe Belastung	3,0 g/l Rinderalbumin- lösung zzgl. 3,0 ml Erythrozyten (hygienische Hände- waschung)	3,0 g/l Rinderalbumin- lösung zzgl. 3,0 ml Erythrozyten (chirurgische Händewaschung)	und/oder 3,0 g/l Rinderalbuminlösung zzgl. 3,0 ml Erythrozyten	und/oder 3,0 g/l Rinderalbuminlösung zzgl. 3,0 ml Erythrozyten
b) zusätzlich	—	—	jede zutreffende Substanzen	jede zutreffende Substanzen
^a Die in Tabelle 1 angegebenen obligatorischen Einwirkzeiten für Oberflächendesinfektionsmittel werden auf der Grundlage exakter praktischer Anwendung des Produkts ausgewählt. Die ausgewiesenen Prüfbedingungen sind in keinem Fall weder als Anforderungen für die Anwendung des Produkts noch als Anforderungen an die Bewertung und Annahme von Produkten durch gesetzliche Behörden vorgesehen. Die empfohlene Einwirkzeit für die Anwendung des Produkts liegt in der Verantwortung des Herstellers. Produkte, die zur Desinfektion von Oberflächen vorgesehen sind, die wahrscheinlich mit dem Patienten und/oder dem medizinischen Personal in Kontakt kommen, wodurch es zu einer Übertragung von Mikroorganismen auf den Patienten kommen könnte und bei denen die Einwirkzeit des Produkts aus praktischen Gründen begrenzt sein muss, sind mit einer obligatorischen Einwirkzeit von 5 min zu prüfen. Produkte für alle weiteren, als die oben genannten Oberflächen könnten mit einer obligatorischen Einwirkzeit von 60 min geprüft werden. ^b 75 s bei hygienischer Händewaschung. ANMERKUNG Die für die zusätzlichen Bedingungen als Ergebnis festgelegte Konzentration kann geringer sein als die unter den obligatorischen Prüfbedingungen ermittelte Konzentration.				

Eine zusätzliche fungizide oder levurozide Wirksamkeit ist nach **5.2.1** und **5.5.1.1** zu ermitteln, um vorge-sehene besondere Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

5 Prüfverfahren

5.1 Prinzip

5.1.1 Eine Probe des Produkts im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (oder bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser) verdünnten Produkts wird zu einer Prüfsuspension von Pilzen (Hefezellen oder Schimmelpilzsporen) in einer Lösung einer Belastungssubstanz gegeben. Das Gemisch wird bei den in Abschnitt 4 festgelegten Werten für Temperatur und Einwirkzeit gehalten.

5.1.1.1 Nach dem Ende dieser Einwirkzeit wird eine Teilmenge entnommen; die fungizide und/oder fungistatische Wirkung in dieser Probenmenge wird sofort in einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. Das vorzuziehende Verfahren ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Kann kein geeignetes Neutralisationsmedium gefunden werden, wird die Membranfiltration angewendet. Die Anzahl der überlebenden Pilze in jeder Probe wird bestimmt und die Reduktion berechnet.

ANMERKUNG Händewaschprodukte werden immer mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) vorverdünnt. Die entstandene Lösung wird als gebrauchsfertiges Produkt (5.4.2) angesehen.

5.1.2 Für die Prüfung werden die Sporen von *Aspergillus niger* und die vegetativen Zellen von *Candida albicans* (fungizide Wirkung) oder nur der vegetativen Zellen von *Candida albicans* (levurozide Wirkung) als Prüfkeime verwendet (Abschnitt 4, Tabelle 1).

5.1.3 Zusätzliche und optionale Einwirkzeiten und Temperaturen sind festgelegt (Abschnitt 4, Tabelle 1). Zusätzliche Belastungssubstanzen und Prüfkeime können verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die fungizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden Stämme von Prüfkeimen zu bewerten, ausgewählt nach Abschnitt 4, Tabelle 1¹⁾:

- *Candida albicans* ATCC 10231;
- *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Die levurozide Wirkung ist ausschließlich unter Verwendung von *Candida albicans* zu bewerten.

ANMERKUNG Zum Verweis auf Stämme in einigen anderen Kulturensammlungen siehe Anhang A.

Die erforderliche Bebrütungstemperatur für diese Prüfkeime beträgt $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Werden zusätzliche Prüfkeime verwendet, müssen diese unter optimalen Wachstumsbedingungen bebrütet werden (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien), die im Prüfbericht zu dokumentieren sind. Entsprechen die gewählten zusätzlichen Prüfkeime nicht den festgelegten Stämmen, muss ihre Eignung zur Bereitstellung der erforderlichen Inokula verifiziert werden. Wurden diese zusätzlichen Prüfkeime nicht durch ein Referenz-Zentrum klassifiziert, sind ihre Identifizierungsmerkmale anzugeben. Darüber hinaus müssen sie von dem Prüflabor oder der nationalen Kulturensammlung für fünf Jahre als Referenzprobe aufbewahrt werden.

¹⁾ Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die durch diese Kulturensammlungen geliefert werden. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in dieser Europäischen Norm angegebenen Massen chemischer Substanzen beziehen sich auf die wasserfreien Salze. 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 Prüfkeime wirken.

ANMERKUNG 1 Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien kommerziell erhältliche wasserfreie Materialien verwendet werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten genau befolgt werden.

ANMERKUNG 2 Für jedes Kulturmedium und Reagenz sollte eine zeitliche Begrenzung der Verwendung festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes Wasser sein und darf nicht entmineralisiertes sein. Steht kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung, kann Wasser für Injektionszwecke (siehe Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

Sterilisation in einem Dampf-Sterilisator (Autoklav) [5.3.2.1 a)]. Eine Sterilisation ist nicht erforderlich, wenn das Wasser – z. B. zur Herstellung von Kulturmedien – verwendet und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG Siehe 5.2.2.7 zum Verfahren für die Herstellung von Wasser standardisierter Härte.

5.2.2.3 Malzextraktagar (MEA)

Malzextraktagar bestehend aus:

Malzextrakt	30,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	3,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis 1 000 ml

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

ANMERKUNG Treten Probleme bei der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auf, ist es möglicherweise erforderlich, dem MEA ein Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält Leitlinien zu den Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen. Die Anwendung von Neutralisationsmedien, die eine Opaleszenz des Agars hervorrufen, ist nicht zu empfehlen.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Trypton)	1,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g
Wasser (5.2.2.2)	bis 1 000,0 ml

Sterilisation im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums $7,0 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

Das Neutralisationsmedium muss für das nach 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.2 zu prüfende Produkt validiert sein. Es muss steril sein.

ANMERKUNG In Anhang B sind Neutralisationsmedien angegeben, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.6 Spülflüssigkeit (für die Membranfiltration)

Die Spülflüssigkeit muss für das nach 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.3 zu prüfende Produkt validiert sein. Sie muss steril, mit der Filtermembran kompatibel und unter den in 5.5.3 beschriebenen Untersuchungsbedingungen durch die Filtermembran filtrierbar sein.

ANMERKUNG Anhang B enthält Angaben zu Spülflüssigkeiten, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

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

- Herstellung der Lösung A: 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) werden in Wasser (5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird mittels Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Dampf-Sterilisator (Autoklaven) [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Bei Sterilisierung im Autoklaven kann es zu einem Flüssigkeitsverlust kommen. In diesem Fall wird das Volumen unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens einen Monat aufbewahrt;
- Herstellung der Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml verdünnt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens eine Woche aufbewahrt;
- in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) gegeben, dazu werden 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A und anschließend 8,0 ml Lösung B gegeben. Es wird durchmischt und 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, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.4). Bei Bedarf wird der pH-Wert mit Hilfe einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Chlorwasserstoffsäure (HCl) eingestellt.

Das Wasser standardisierter Härte muss unter aseptischen Bedingungen frisch hergestellt und innerhalb von 12 h verwendet werden.

ANMERKUNG 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 im Reagenzglas unter 300 mg/kg, bezogen auf Calciumcarbonat (CaCO_3).

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz muss nach den für das Produkt festgelegten Anwendungsbedingungen ausgewählt werden.

Die Belastungssubstanz muss steril sein und mit einer zehnfach höheren Konzentration hergestellt werden, als für die Prüfung erforderlich.

Die Ionenzusammensetzung (z. B. pH-Wert, Calcium- und/oder Magnesiumhärte) und die chemische Zusammensetzung (z. B. Mineralstoffe, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Detergenzien) sind vollständig festzulegen.

ANMERKUNG Der Ausdruck „Belastungssubstanz“ wird verwendet, auch wenn mehr als eine Substanz enthalten ist.

5.2.2.8.2 Niedrige Belastung (Rinderalbuminlösung – geringe Konzentration)

In 100 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) werden 0,30 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Es wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert, die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verwendet.

Die Endkonzentration des Rinderalbumins im Prüfverfahren (5.5) muss 0,3 g/l betragen.

5.2.2.8.3 Hohe Belastung (Gemisch von Rinderserumalbuminlösung – hohe Konzentration mit Schaf-Erythrozyten)

In 97 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) werden 3,0 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7).

Es werden mindestens 8,0 ml frisches defibriniertes Schafsblut hergestellt (5.2.2.9). Die Erythrozyten werden bei 800 g_N für 10 min abzentrifugiert (5.3.2.13). Nach Verwerfen des Überstandes werden die Erythrozyten in Verdünnungsmittel (5.2.2.4) resuspendiert. Dieser Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt, bis der Überstand farblos ist.

3 ml der gepackten Schaf-Erythrozyten werden in den 97 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung (siehe oben) resuspendiert. Um eine spätere Kontamination zu verhindern, sollte dieses Gemisch in Portionen aufgeteilt werden, die wahrscheinlich an einem Tag verbraucht werden, und in gesonderten Behältern im Kühlschrank (5.3.2.8) höchstens 7 Tage gelagert werden.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins und der Schaf-Erythrozyten im Prüfverfahren (5.5) beträgt 3 g/l bzw. 3 ml/l.

5.2.2.8.4 Niedrige und hohe Belastung beim modifizierten Verfahren für gebrauchsfertige Produkte (5.5.4)

Im Allgemeinen sind die Herstellungsverfahren nach 5.2.2.8.2 und 5.2.2.8.3 zu befolgen, die Belastungssubstanz ist jedoch in 5fach höheren Konzentrationen herzustellen.

- a) Niedrige Belastung (5.2.2.8.2) – 1,50 g (statt 0,3 g) Rinderserumalbumin werden in 100 ml Verdünnungsmittel aufgelöst.
- b) Hohe Belastung (5.2.2.8.3) – 15,0 g (statt 3,0 g) Rinderserumalbumin werden in 85 ml (statt 97 ml) Verdünnungsmittel aufgelöst.

Vorbereitung von mindestens 40 ml (statt 8,0 ml) Schafsblut. 15 ml (statt 3,0 ml) der gepackten Schaf-Erythrozyten werden in 85 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung (siehe oben) resuspendiert.

5.2.2.9 Steriles defibriniertes Schafsblut

Das sterile defibrinierte Schafsblut kann handelsüblich bezogen oder nach EN 14820 [2] hergestellt werden.

5.3 Apparate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Sofern nicht steril geliefert, sind alle Glasgeräte und alle Geräteteile, die mit den Kulturmedien, den Reagenzien oder der Probe in Berührung kommen, nach einem der folgenden Verfahren zu sterilisieren:

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

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²⁾

und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation durch feuchte und trockene Hitze

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf (20 ± 1) °C, (45 ± 1) °C (um den MEA im Fall des Gussplattenverfahrens verflüssigt zu halten) und zusätzliche Prüftemperaturen ± 1 °C (5.5.1).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf (30 ± 1) °C.

5.3.2.4 pH-Messgerät, kalibriert auf $\pm 0,1$ Einheiten des pH-Wertes bei (20 ± 1) °C.

ANMERKUNG Zur Ermittlung des pH-Wertes des Agars (5.2.2.3) sollte eine Stichelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

2) Einweggeräte sind eine zulässige Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

5.3.2.5 Stoppuhr

5.3.2.6 Schüttelgeräte

- a) Schnellschüttelgerät, elektromechanisch, z. B. Vortex[®]-Mischer³⁾;
- b) mechanisches Schüttelgerät.

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät aus einem Material, das mit den zu filternden Substanzen verträglich ist, mit einem Filterhalter von mindestens 50 ml Nutzvolumen und geeignet zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von 0,45 µm für die Sterilfiltration von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7), Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2, 5.2.2.8.3 und 5.2.2.8.4) und für den Fall der Anwendung des Membranfiltrationsverfahrens (5.5.3).

Die verwendete Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen. Für eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen auf der Membran und zur Vermeidung eines übermäßig langen Filtrationsvorgangs muss das Gerät so eingestellt werden, dass 100 ml der Spülflüssigkeit in 20 s bis 40 s filtriert werden.

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

5.3.2.9 Messpipetten mit einem Nennvolumen von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml oder kalibrierte automatische Pipetten.

5.3.2.10 Petrischalen, (Platten) in den Größen 90 mm bis 100 mm.

5.3.2.11 Glasperlen (Durchmesser 3 mm bis 4 mm).

5.3.2.12 Messkolben.

5.3.2.13 Zentrifuge (800 g_N und 2 000 g_N).

5.3.2.14 Roux-Flaschen oder ähnliche Kolben.

5.3.2.15 Frittenfilter mit einer Porenweite von 40 µm bis 100 µm (siehe Abschnitt 2: ISO 4793).

5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüfkeime und der Produktprüflösungen

5.4.1 Suspensionen der Prüfkeime (Prüf- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüfkeim sind zwei unterschiedliche Suspensionen herzustellen: Die „Prüfsuspension“ zur Durchführung der Prüfung und die „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrolluntersuchungen und der Verfahrensvalidierung.

5.4.1.2 Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüfkeimen

Die Prüfkeime und ihre Stammkulturen sind nach EN 12353 vorzubereiten und aufzubewahren.

3) Vortex[®] ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN.

5.4.1.3 Gebrauchskultur der Prüfkeime

5.4.1.3.1 *Candida albicans* (Hefe)

Zur Herstellung der Gebrauchskultur von *Candida albicans* (5.2.1) ist eine Subkultur von der Stammkultur (5.4.1.2) durch Ausstrich auf MEA-Schrägaragarröhrchen oder MEA-Platten (5.2.2.3) anzulegen und zu bebrüten (5.3.2.3). Nach 42 h bis 48 h wird eine zweite Subkultur auf gleiche Weise aus der ersten Subkultur angelegt und ebenfalls 42 h bis 48 h bebrütet. Aus dieser zweiten Subkultur darf auf gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden. Die zweite und (sofern hergestellt) dritte Subkultur sind die Gebrauchskulturen.

Ist das Anlegen der zweiten Subkultur an einem bestimmten Tag nicht möglich, darf eine 72-h-Subkultur für nachfolgende Subkulturen unter der Voraussetzung verwendet werden, dass die Subkultur während der 72 h im Brutschrank (5.3.2.3) verblieben ist.

Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

5.4.1.3.2 *Aspergillus niger* (Schimmelpilz)

Bei *Aspergillus niger* wird nur die erste auf MEA (5.2.2.3) in Roux-Flaschen (5.3.2.15) gewachsene Subkultur verwendet und 9 bis 11 Tage bebrütet. Eine weitere Subkultivierung ist nicht erforderlich.

5.4.1.3.3 Andere Prüfkeime (Hefen oder Schimmelpilze)

Bei zusätzlichen Prüfkeimen muss jedes Abweichen von diesem Verfahren zur Kultivierung der Prüfkeime (Hefe oder Schimmelpilz) oder zur Herstellung der Suspensionen aufgezeichnet werden, wobei die Gründe im Prüfbericht anzugeben sind.

5.4.1.4 Prüfsuspension („N“)

5.4.1.4.1 *Candida albicans*

- a) 10 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) werden mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3.1) werden ösenweise Zellen in das Verdünnungsmittel (5.2.2.4) gegeben. Die Suspension der Zellen im Verdünnungsmittel sollte durch Reiben der Öse an der nassen Wand des Kolbens erfolgen, um die Zellen vor dem Eintauchen in das Verdünnungsmittel voneinander zu trennen. Unter Verwendung eines mechanischen Schüttelgerätes [5.3.2.6 b)] wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in ein Reagenzglas überführt.
- b) Die Anzahl der Zellen in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) auf $1,5 \times 10^7$ KBE/ml⁴⁾ bis $5,0 \times 10^7$ KBE/ml ($1,5 \times 10^8$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml beim modifizierten Verfahren – 5.5.4) eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mit einem geeigneten Verfahren abgeschätzt wird. Diese Prüfsuspension ist im Wasserbad bei 20 °C aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden. Die Temperatur ist entsprechend 5.5.1.1 a) und 5.5.1.4 erst unmittelbar vor Prüfbeginn einzustellen.

ANMERKUNG Die Verwendung eines Spektrophotometers zur Einstellung der Zellzahl wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, optische Wegstrecke der Küvette 10 mm). Jedes Laboratorium sollte deshalb Kalibrierdaten erarbeiten, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte gewöhnlich zwischen 0,200 und 0,350 liegen. Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

- c) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) Verdünnungen von 10^{-5} und 10^{-6} (von 10^{-6} und 10^{-7} beim modifizierten Verfahren – 5.5.4) hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

4) KBE/ml = koloniebildende Einheit(en) je Milliliter.

Von jeder Verdünnung wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird etwa die Hälfte jeder 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen pipettiert (d. h. als Doppelbestimmung = vier Platten) und 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlter MEA (5.2.2.3) werden zugegeben.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe, in Anteile etwa gleicher Größe aufgeteilt, auf einer geeigneten Anzahl von an der Oberfläche getrockneten MEA-Platten (5.2.2.3) (mindestens zwei) ausgespatelt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.4.2 *Aspergillus niger*

Zur Vorbereitung der Prüfsuspension mit *Aspergillus niger* ist der Verfahrensablauf wie folgt.

- a) Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3.2) werden Zellen in 10 ml steriler 0,05-prozentiger (W/V) Polysorbat-80-Lösung in Wasser (5.2.2.2) suspendiert. Die Conidiosporen werden mit einem Stab oder Spatel aus Glas von der Oberfläche der Kultur abgelöst. Die Suspension wird in einen Erlenmeyerkolben überführt und zusammen mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) für 1 min leicht geschüttelt. Die Suspension wird durch eine Glasfilterfritte (5.3.2.14) filtriert.
- b) Unmittelbar nach der Herstellung und kurz vor der Prüfung ist eine mikroskopische Untersuchung bei 400facher Vergrößerung durchzuführen, um das Nichtvorhandensein von Mycelbruchstücken und ausgekeimten Sporen nachzuweisen (mindestens zehn Gesichtsfelder sind auf das Nichtvorliegen von beidem zu prüfen).

Wenn ausgekeimte Sporen vorhanden sind, ist die Suspension zu verwerfen.

Wenn Mycelien vorhanden sind, ist ein Waschvorgang (Zentrifugieren) wie folgt durchzuführen. Die filtrierte Suspension wird in Zentrifugenröhrchen überführt. Die filtrierte Suspension wird 20 min bei $2\,000\,g_N$ zentrifugiert (5.3.2.13). Die Conidiosporen werden mindestens zweimal durch erneute Suspension in Verdünnungsmittel (5.2.2.4) und nachfolgendes Zentrifugieren gewaschen. Wenn Mycelien immer noch vorhanden sind, sollte der Waschvorgang wiederholt werden.

- c) Die Anzahl der Sporen in der Suspension wird mit Verdünnungsmittel (5.2.2.4) auf $1,5 \times 10^7$ KBE/ml bis 5×10^7 KBE/ml ($1,5 \times 10^8$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml beim modifizierten Verfahren – 5.5.4) eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mit einem geeigneten Verfahren abgeschätzt wird. Diese Suspension muss innerhalb von 4 h verwendet werden. Diese Prüfsuspension darf nicht länger als 2 Tage im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt werden und ist kurz vor der Prüfung erneut auf das Nichtvorhandensein ausgekeimter Sporen [siehe b)] zu überprüfen. In jedem Fall wird die Temperatur erst unmittelbar vor Beginn der Prüfung (5.5.2, 5.5.3 oder 5.5.4) nach 5.5.1.4 eingestellt.

ANMERKUNG Die Verwendung eines Zellzählgerätes zur Einstellung der Zellzahl wird dringend empfohlen. Bei Verwendung einer geeigneten Zählkammer sind die Anweisungen detailliert zu befolgen.

Jedes Laboratorium sollte deshalb Kalibrierdaten erarbeiten, um das Verhältnis zwischen den mit dem Zählgerät ermittelten Zahlen und den Zahlen (5.4.1.6) herzustellen, die im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren [5.4.1.4.2 e)] bestimmt wurden. Erfahrene Laboratorien fanden eine bessere Angleichung an das geforderte Validierungsniveau, wenn die mit dem Gerät gemessene Zellzahl in der Sporensuspension um 10 % bis 50 % höher war als die beabsichtigte Zahl.

- d) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) Verdünnungen von 10^{-5} und 10^{-6} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

Von jeder Verdünnung wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird etwa die Hälfte jeder 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen (5.3.2.9) pipettiert (d. h. als Doppelbestimmung = vier Platten) und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf (45 ± 1) °C abgekühlter MEA (5.2.2.3) zugegeben.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird etwa ein Viertel jeder 1,0-ml-Probe auf einer geeigneten Anzahl (mindestens vier) von an der Oberfläche getrockneten MEA-Platten (5.2.2.3) (d. h. als Doppelbestimmung = mindestens acht Platten) ausgespatelt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.5 Validierungssuspension (N_V und N_{VB})

- a) Zur Herstellung der Validierungssuspension wird die Prüfsuspension (siehe 5.4.1.4.1 und 5.4.1.4.2) mit Verdünnungsmittel (5.2.2.4) so verdünnt, dass sich Zahlen von $3,0 \times 10^2$ KBE/ml bis $1,6 \times 10^3$ KBE/ml ergeben [etwa ein Viertel (1 + 3) der Verdünnung 10^{-4}].

ANMERKUNG Beim modifizierten Verfahren (5.5.4) handelt es sich um das gleiche Verfahren, das zu $3,0 \times 10^3$ KBE/ml bis $1,6 \times 10^4$ KBE/ml führt.

Bei der Kontrolle des Neutralisationsmediums (5.5.2.4) muss die Prüfsuspension (5.4.1.4) mit Verdünnungsmittel verdünnt werden, um $3,0 \times 10^4$ KBE/ml bis $1,6 \times 10^5$ KBE/ml zu erreichen (etwa ein Viertel (1 + 3) der Verdünnung 10^{-2}). („ N_{VB} “).

Diese Validierungssuspensionen (N_V und N_{VB}) sind ebenso wie die Prüfsuspension [5.4.1.4.1 b) und 5.4.1.4.2 c)] aufzubewahren und anzuwenden.

- b) Zur Auszählung wird mit Verdünnungsmittel (5.2.2.4) eine Verdünnung von 10^{-1} (Verdünnung von 10^{-2} beim modifizierten Verfahren) hergestellt, für die Validierungssuspension zur Zählung der Kontrolle des Neutralisationsmediums wird jedoch eine Verdünnung von 10^{-3} hergestellt [siehe a)]. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Danach wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und zur Beimpfung im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren verwendet [bei *Candida albicans* 5.4.1.4.1 c); bei *Aspergillus niger* 5.4.1.4.2 d)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.6 Bebrüten und Auszählen der Prüf- und Validierungssuspensionen

Die Platten werden 42 h bis 48 h bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die (aus irgendeinem Grund) nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt und Anzahl der KBE wird bestimmt. Nur bei *Aspergillus niger*: Die Platten werden erneut 20 h bis 24 h bebrütet und – falls die Anzahl der Kolonien zugenommen hat – für einen dritten zusätzlichen Zeitraum von 20 h bis 24 h bebrütet. Platten, die keine gut voneinander abgesetzten Kolonien mehr zeigen, werden nicht erneut ausgezählt. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt. Wenn die Anzahl zugenommen hat, wird für die weitere Auswertung nur die höhere Anzahl verwendet.

Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, für alle Koloniezahlen über 165 bzw. 330 wird jedoch „> 165“ (bei Schimmelpilzen) oder „> 330“ (bei Hefen) aufgezeichnet und die V_C -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.

Die Anzahl der KBE je ml Prüfsuspension „ N “ und Validierungssuspensionen „ N_V “ und „ N_{VB} “ (Kontrolle des Neutralisationsmediums 5.5.2.4) wird nach dem in 5.6.2.3 und 5.6.2.5 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.4.2 Produktprüflösungen

Die Konzentration einer Produktprüflösung muss das 1,25fache der gewünschten Prüfkonzentration betragen, da sie während der Prüfung und während der Verfahrensvalidierung (5.5.2 oder 5.5.3) auf 80 % verdünnt wird.

Produktprüflösungen sind in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) herzustellen, wobei eine Konzentration im wirksamen Bereich und eine Konzentration im nicht wirksamen Bereich (5.8.2) liegen muss. Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden, wobei die höchste geprüfte Konzentration 80 % beträgt. Weisen gebrauchsfertige Produkte, d. h. Produkte, die bei ihrer Verwendung nicht verdünnt werden, nicht die erforderliche Reduktion (Abschnitt 4, 5.9) auf, kann ein modifiziertes Verfahren (5.5.4) angewendet werden, um eine höhere Produktkonzentration (97 %) zu prüfen.

Verdünnungen gebrauchsfertiger Produkte sind mit Wasser (5.2.2.2) statt mit Wasser standardisierter Härte herzustellen. Händewaschprodukte werden zuvor stets mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) verdünnt, um eine Verdünnung mit 62,5 % zu erzielen. Beim modifizierten Verfahren (5.5.4) ist eine Verdünnung mit 51,5 % herzustellen. Die Lösung simuliert die Zugabe von Leitungswasser in der Praxis (1:1). Ein derartiges Produkt wird dennoch als „gebrauchsfertiges Produkt“ angesehen. Das modifizierte Verfahren (5.5.4) ist nicht anwendbar, da 62,5 % die höchstzulässige Konzentration (50 %), multipliziert mit 1,25, darstellt.

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand gelöst, indem mindestens $1,0 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ des Produkts in einen Messkolben eingewogen werden und mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) aufgefüllt wird. Die folgenden Verdünnungen (= niedrigere Konzentrationen) sind in Messkolben (5.3.2.12) auf der Basis von Volumenanteilen mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) herzustellen.

Bei flüssigen Produkten müssen die Verdünnungen des Produkts mit Wasser standardisierter Härte auf der Basis von Volumenanteilen in Messkolben (5.3.2.12) hergestellt werden.

Die Produktprüflösungen sind frisch herzustellen und innerhalb von 2 h in der Prüfung zu verwenden. Sie müssen eine physikalisch homogene Zubereitung ergeben, die während des gesamten Verfahrensablaufs stabil bleibt. Wenn während des Verfahrens durch Bildung eines Niederschlags oder einer Ausflockung (z. B. infolge der Zugabe der Belastungssubstanz) eine sichtbare Inhomogenität auftritt, ist dies im Prüfbericht festzuhalten.

ANMERKUNG Die Auszählung von in einen Niederschlag oder eine Ausflockung eingebetteten Mikroorganismen ist schwierig und unzuverlässig.

Die im Prüfbericht angegebene Konzentration des Produkts muss die gewünschte Prüfkonzentration sein. Die Prüfkonzentration ist als Konzentration Masse je Volumen oder Volumen je Volumen anzugeben, und alle Einzelheiten der Produktproben im Lieferzustand sind festzuhalten.

5.5 Verfahrensablauf zur Bewertung der fungiziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Prüfbedingungen (obligatorische und zusätzliche)

Neben den obligatorischen Bedingungen für Temperatur, Einwirkzeit, Belastungssubstanzen und Prüfkeime dürfen entsprechend der für das Produkt vorgesehenen praktischen Anwendung (Abschnitt 4) zusätzliche Prüfbedingungen (einschließlich Prüfkeimen) ausgewählt werden:

a) Temperatur θ (in °C):

Die obligatorischen und zusätzlichen Prüftemperaturen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt.

Die zulässige Abweichung für jede gewählte Temperatur beträgt $\pm 1 \text{ °C}$.