

DIN EN 13624



ICS 11.080.20

Entwurf

Einsprüche bis 2019-09-05
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 13624:2013-12

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder
levuroziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche und Englische Fassung prEN 13624:2019**

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);
German and English version prEN 13624:2019

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 et anglaise prEN 13624:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-07-05 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-
Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de,
sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an named@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann
im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-
Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED), 10772 Berlin, Saatwinkler Damm 42/43,
13627 Berlin.

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

Gesamtumfang 120 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 13624:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

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

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 13624:2013-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Aufnahme eines neuen Anhangs ZA, die Referenz bezieht sich auf die Medizinprodukteverordnung (anstelle auf die Richtlinie über Medizinprodukte) (Europäisches Vorwort und Anhang ZA);
- b) Aufnahme der Wäschedesinfektion (siehe Tabelle 1, 5.5.1.3);
- c) die Mengen für die hohe Belastung für gebrauchsfertige Produkte wurden reduziert [5.2.2.8.4 b)];
- d) Klarstellung, dass für alle Produkte mit einer Einwirkzeit von 10 min oder weniger eine Neutralisationszeit von 10 s verwendet werden muss [5.5.2.2. c) und 5.5.2.5. b)];
- e) Erläuterung von alternativen Kontrollen für die chemothermische Desinfektion (5.5.2.3);
- f) der Verweis auf CIP-Nummern für Pilzstämme wurde gelöscht (Anhang A);
- g) Harmonisierung des Textes mit EN 13727;
- h) Norm redaktionell überarbeitet.

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 yeastocidal 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

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	7
5.1 Kurzbeschreibung	7
5.2 Materialien und Reagenzien	8
5.3 Apparate und Glasgeräte	12
5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüforganismen und der Produktprüflösungen	13
5.5 Verfahrensablauf zur Bewertung der fungiziden und levuroziden Wirkung des Produkts	19
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	28
5.7 Verifizierung des Verfahrens	34
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	35
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	36
5.10 Prüfbericht	38
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Stammsammlungen	40
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten	41
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung der Prüfverfahren	43
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichtes	51
Anhang E (informativ) Präzision der Prüfergebnisse	55
Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Sicherheits- und Leistungsanforderungen der abzudeckenden Verordnung (EU) 2017/745	59
Literaturhinweise	60

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 13624:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 13624:2013 ersetzen.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

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

Dieses Dokument wurde überarbeitet, um dieses an den letzten Stand der Wissenschaften anzupassen, Fehler und Mehrdeutigkeiten zu korrigieren, es mit der Struktur und dem Wortlaut der anderen existierenden und in Vorbereitung befindlichen Prüfmethoden des CEN/TC 216 zu harmonisieren, die Lesbarkeit zu verbessern und dadurch den Text besser verständlich zu machen. Nachfolgenden werden die wesentlichen technischen Änderungen seit der letzten Ausgabe aufgelistet:

- Aufnahme eines neuen Anhangs ZA, die Referenz bezieht sich auf die Medizinprodukteverordnung (anstelle auf die Richtlinie über Medizinprodukte) (Europäisches Vorwort und Anhang ZA);
- Aufnahme der Wäschedesinfektion (siehe Tabelle 1, 5.5.1.3);
- die Mengen für die hohe Belastung für gebrauchsfertige Produkte wurden reduziert [5.2.2.8.4 b)];
- Klarstellung, dass für alle Produkte mit einer Einwirkzeit von 10 min oder weniger eine Neutralisationszeit von 10 s verwendet werden muss [5.5.2.2. c) und 5.5.2.5. b)];
- Erläuterung von alternativen Kontrollen für die chemothermische Desinfektion (5.5.2.3);
- der Verweis auf CIP-Nummern für Pilzstämme wurde gelöscht (Anhang A);
- Harmonisierung des Textes mit EN 13727;
- Korrektur von redaktionellen Fehlern.

Die Änderungen dieser Überarbeitung haben keinen Einfluss auf die Prüfergebnisse, die mit Bezug auf die Version EN 13624:2013 erhalten wurden. Diese Ergebnisse sind weiterhin gültig.

Einleitung

Dieses Dokument 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 Prüforganismen und die Belastungssubstanzen gehören, d. h. Bedingungen, die dessen Wirkung in praktischen Situationen beeinflussen können. Jede in diesem Versuch ermittelte Anwendungskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht den gewählten Versuchsbedingungen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument 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 Prüforganismen und der Belastungssubstanz stets eine gewisse Verdünnung bewirkt wird.

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

Dieses Dokument 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 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 Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

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

ISO 4793:1980, *Laboratory sintered (fritted) filters — Porosity grading, classification and designation*

3 Begriffe

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

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>

4 Anforderungen

Bei Prüfung nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 muss das Produkt eine Verminderung der Keimzahl um mindestens 4 dezimallogarithmische (lg) Stufen nachweisen (für hygienische Händewaschung eine Verminderung um mindestens 2 lg Stufen).

Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüf- bedingungen	Hygienische Hände- desinfektion und Händewaschung	Chirurgische Hände- desinfektion und Händewaschung	Instrumenten- desinfektion	Oberflächen- desinfektion	Wäsche- desinfektion ^d
Mindest- spektrum von Prüf- organismen	<i>Candida albicans</i> (vegetative Zellen)	<i>Candida albicans</i> (vegetative Zellen)	a) fungizide Wirkung: <i>Aspergillus brasiliensis</i> (Conidiosporen) <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen) b) levurozide Wirkung: <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen)	a) fungizide Wirkung: <i>Aspergillus brasiliensis</i> (Conidiosporen) <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen) b) levurozide Wirkung: <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen)	a) fungizide Wirkung: <i>Aspergillus brasiliensis</i> (Conidiosporen) <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen) b) levurozide Wirkung: <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen)
zusätzlich	jeder zutreffende Prüforganismus				
Prüf- temperatur	entsprechend der Empfehlung des Herstellers, jedoch				
	bei 20 °C	bei 20 °C	bei 20 °C oder darüber	zwischen 4 °C und 30 °C	bei 20 °C oder darüber
Einwirkzeit	entsprechend der Empfehlung des Herstellers,				
	jedoch zwischen	jedoch nicht länger als			
	30 s und 60 s	1 min und 5 min	60 min	5 min oder 60 min ^a	Einwirkzeit entsprechend der Empfehlung des Herstellers

Prüfbedingungen	Hygienische Händedesinfektion und Händewaschung	Chirurgische Händedesinfektion und Händewaschung	Instrumentendesinfektion	Oberflächendesinfektion	Wäschedesinfektion ^d
Belastungssubstanz					
niedrige Belastung	0,3 g/l Rinderalbuminlösung (hygienische Händedesinfektion) ^b	0,3 g/l Rinderalbuminlösung (chirurgische Händedesinfektion) ^b	0,3 g/l Rinderalbuminlösung	0,3 g/l Rinderalbuminlösung	
hohe Belastung	3,0 g/l Rinderalbuminlösung plus 3,0 ml Erythrozyten (hygienische Händewaschung) ^c	3,0 g/l Rinderalbuminlösung plus 3,0 ml Erythrozyten (chirurgische Händewaschung) ^c	und/oder 3,0 g/l Rinderalbuminlösung plus 3,0 ml Erythrozyten	und/oder 3,0 g/l Rinderalbuminlösung plus 3,0 ml Erythrozyten	3,0 g/l Rinderalbuminlösung plus 3,0 ml Erythrozyten
zusätzlich	—	—	jede zutreffende Substanzen	jede zutreffende Substanzen	—
ANMERKUNG Für die zusätzlichen Bedingungen kann die als ein Ergebnis festgelegte Konzentration geringer sein als eine unter den Mindestprüfbedingungen erhaltene Konzentration.					
^a Die in dieser Tabelle angegebenen Einwirkzeiten für Oberflächendesinfektionsmittel werden auf der Grundlage der praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts ausgewählt. 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, und Oberflächen, die häufig von verschiedenen Personen berührt werden, was zu einer Übertragung von Mikroorganismen auf den Patienten führt, sind mit einer Einwirkzeit von höchstens 5 min zu prüfen. Das Gleiche gilt für Fälle, bei denen die Einwirkzeit des Produktes aus praktischen Gründen begrenzt sein muss. Produkte für alle weiteren, als die oben angeführten Oberflächen dürfen mit einer Einwirkzeit von höchstens 60 min geprüft werden. ^b Die hygienische und chirurgische Händedesinfektion muss mindestens unter den Bedingungen niedriger Belastung geprüft werden. ^c Die hygienische und chirurgische Händewaschung muss mindestens unter den Bedingungen hoher Belastung geprüft werden. ^d Für weitere Informationen siehe EN 16616, Abschnitt 4					

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

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 und 5.5.1.1 festgelegten Werten für Temperatur und Einwirkzeit gehalten. 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 Produkte für die Händewaschung 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 vegetativen Zellen von *Candida albicans* und die Conidiosporen von *Aspergillus brasiliensis* (fungizide Wirkung) oder nur der vegetativen Zellen von *Candida albicans* (levurozide Wirkung) als Prüforganismen verwendet (Abschnitt 4, Tabelle 1).

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

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die fungizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden Stämme von Prüforganismen zu bewerten, ausgewählt nach Abschnitt 4 (Tabelle 1)¹:

- *Candida albicans* ATCC 10231;
- *Aspergillus brasiliensis* (früher „*A. niger*“) ATCC 16404.

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

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

Die erforderliche Bebrütungstemperatur für diese Prüforganismen beträgt $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.3).

Werden zusätzliche Prüforganismen verwendet, müssen diese unter optimalen Wachstumsbedingungen bebrütet werden (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien), die im Prüfbericht zu dokumentieren sind. Entsprechen die gewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den festgelegten Stämmen, muss ihre Eignung zur Bereitstellung der erforderlichen Inokula verifiziert werden. Wurden diese zusätzlichen Prüforganismen 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.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in diesem Dokument angegebenen Massen chemischer Substanzen beziehen sich auf die wasserfreien Salze. Wasserhaltige Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um dadurch folgende Differenzen in den relativen Molekulargewichten auszugleichen.

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

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.

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

Alle festgelegten pH-Werte werden bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gemessen.

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

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes und darf nicht entmineralisiertes Wasser sein. Steht kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung, kann Wasser für Injektionszwecke (siehe Literaturhinweis [2]) 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.

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

5.2.2.3 Malzextraktagar (MEA)

Malzextraktagar bestehend aus:

Malzextrakt [lebensmittelunbedenklich (z. B. Cristomalzpulver von Difal) oder entsprechend, das nicht stark gereinigt ist und das nicht auf Maltose basiert (z. B. Malzextrakt von OXOID) ²⁾	30,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis 1 000,0 ml

Sterilisation im Autoklaven (5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums $5,6 \pm 0,2$ betragen.

Beim Auftreten von Problemen bei der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3), 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.

Sollte es jedoch Probleme geben mindestens 75 % stachelige Sporen herzustellen, siehe 5.4.1.4.2.

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 (5.3.2.4) des Mediums $7,0 \pm 0,2$ betragen.

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.

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

2) Malzextrakt von OXOID ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

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.

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 (5.3.2.4) des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen. 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 375 mg/l, 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 (dem 50-Fachen im Falle der modifizierten Methode, siehe 5.2.2.8.4).

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 3,00 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 5-fach höheren Konzentrationen herzustellen, bei hoher Belastung maximal 50 ml, um Probleme bei der Filtration zu vermeiden.

- 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) – 7,5 g (statt 1,5 g) Rinderserumalbumin werden in 42,5 ml (statt 48,5 ml) Verdünnungsmittel aufgelöst. Vorbereitung von mindestens 20 ml (statt 4,0 ml) Schafsblut. 7,5 ml (statt 1,5 ml) der gepackten Schaf-Erythrozyten werden in 42,5 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung (siehe oben) resuspendiert, um 50 ml zu erhalten.

5.2.2.9 Steriles defibriniertes Schafsblut

Das defibrinierte Schafsblut sollte steril sein (aseptischer Aderlass und Vorbereitung), aus mehr als einem Schaf gewonnen sein und kann von einem kommerziellen Lieferanten bezogen 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 Laborausrüstung³

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, mit einer Kalibrierungenauigkeit kleiner als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei (20 ± 1) °C. Zur Ermittlung des pH-Wertes des Agars (5.2.2.3) sollte eine Stichelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

5.3.2.5 Stoppuhr.

5.3.2.6 Schüttelgeräte

- a) Schnellschüttelgerät, elektromechanisch, z. B. Vortex[®]-Mischer⁴;
- 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 maximalen 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.

3) Einweggeräte sind eine zulässige Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

4) 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.

5.3.2.8 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).

5.3.2.14 Flaschen mit belüfteten Verschlusssteilen: Roux-Flaschen oder ähnliche Kolben.

5.3.2.15 Frittenfilter mit einer Porenweite von 40 µm bis 100 µm, entsprechend ISO 4793:1980, Abschnitt 2.

5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüforganismen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Suspensionen der Prüforganismen (Prüf- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüforganismus 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 Prüforganismen

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

5.4.1.3 Gebrauchskultur der Prüforganismen

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-Schrägagar Röhrchen 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 brasiliensis* (Schimmelpilz)

Für *Aspergillus brasiliensis* (5.2.1) wird nur die erste auf MEA (5.2.2.3) in Petrischalen (5.3.2.10) oder Flaschen mit belüfteten Verschlusssteilen (5.3.2.14) gewachsene Subkultur verwendet und für 7 Tage bis 9 Tage bebrütet. Die Herstellung weiterer Subkulturen ist nicht notwendig. Während der Bebrütung sind die Petrischalen nicht aufeinander zu schichten, um die Temperaturhomogenisierung zu verbessern.

Am Ende der Bebrütung müssen alle Kulturen eine dunkelbraune oder schwarze Oberfläche mit nur wenigen kleinen weißen oder grauen Flecken aufweisen.

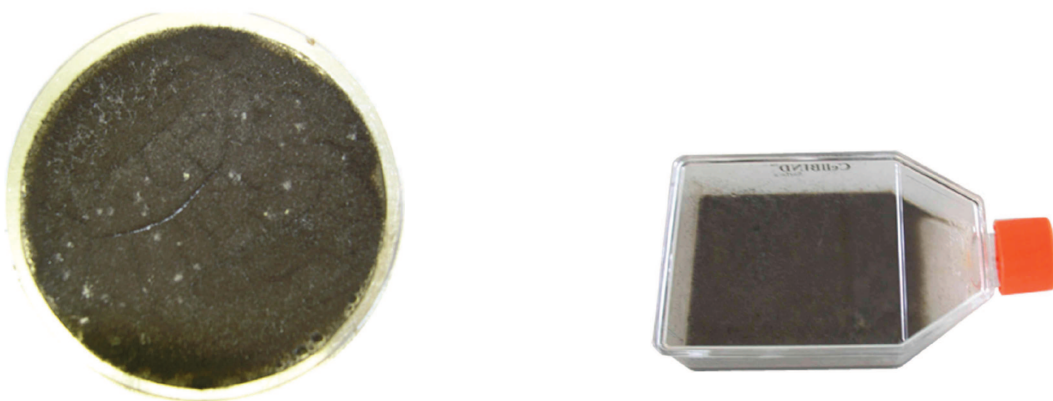


Bild 1 — Foto Nr. 1: Beispiele für geeignete Kulturen des *A. brasiliensis* ATCC 16404 nach 7 Tagen der Bebrütung bei 30 °C

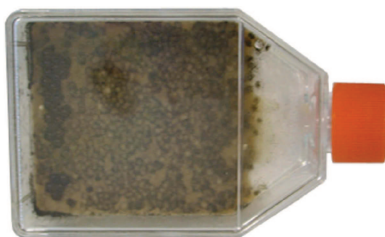


Bild 2 — Foto Nr. 2: Beispiel für ungeeignete (nicht verwendbare) Kulturen des *A. brasiliensis* ATCC 16404 nach 7 Tagen der Bebrütung bei 30 °C

5.4.1.3.3 Andere Prüforganismen (Hefen oder Schimmelpilze)

Bei zusätzlichen Prüforganismen muss jedes Abweichen von diesem Verfahren zur Kultivierung der Hefen oder Schimmelpilze 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*

- 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/ml⁵ 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.

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. Um reproduzierbare Ergebnisse dieser Messung zu erreichen, kann es erforderlich sein, die Prüfsuspension zu verdünnen, z. B. 1 + 9.

ANMERKUNG 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)].

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 und 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf (45 ± 1) °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.

Die zur Auszählung der Prüfsuspension angewendete Verfahrensweise ist bei allen anderen Auszählungen, 5.4.1.5 d), 5.5.2.2 c) und d), 5.5.2.3 b), 5.5.2.4 b) und 5.5.2.5 b), anzuwenden.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.4.2 *Aspergillus brasiliensis*

Folgendes Verfahren wird zur Herstellung der *Aspergillus brasiliensis*-Prüfsuspension angewendet:

- a) Unter Verwendung der Gebrauchskultur (5.4.1.3.2) werden die Conidiosporen in 10 ml einer sterilen Polysorbat 80-Lösung (Massenkonzentration 0,05 %) in Wasser (5.2.2.2) suspendiert. Die Conidiosporen werden mit einem sterilen Glasstab oder Spatel von der Oberfläche der Kultur abgelöst. Die Suspension wird in einen Kolben überführt und mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) 1 min lang leicht per Hand geschüttelt. Die Suspension wird durch eine Glasfilterfritte (5.3.2.15) filtriert.
- b) Die mikroskopische Untersuchung bei 400-facher Vergrößerung ist unmittelbar nach der Herstellung durchzuführen, um:
 - 1) das Vorhandensein einer hohen Konzentration von charakteristischen, reifen Conidiosporen, d. h. stachelige Sporen (im Vergleich zu glatten Sporen) nachzuweisen. Siehe Bild 3 und Bild 4.

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

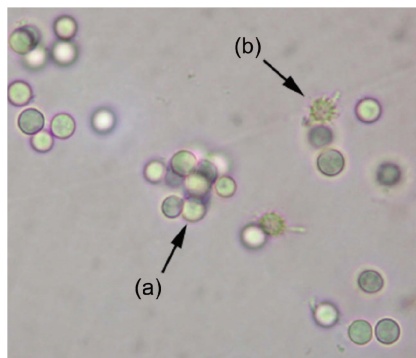


Bild 3 — Foto Nr. 3: Beobachtung von Conidiosporen unter dem Lichtmikroskop: Vorhandensein von glatten (a) und stacheligen (b) Sporen [ungeeignete (nicht verwendbare) Suspension]

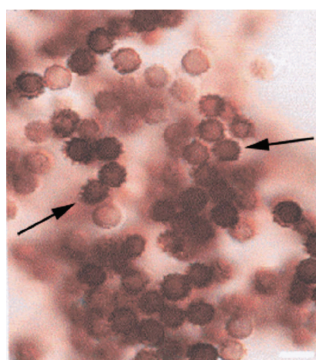


Bild 4 — Foto Nr. 4: Beobachtung von Conidiosporen unter dem Lichtmikroskop: Hohe Konzentration von charakteristischen, reifen Sporen mit stacheligem Aussehen (geeignete Suspension)

Wenn weniger als 75 % der Sporensproten vorhanden sind, kann dies auf den verwendeten *Aspergillus*-Stamm oder auf das Medium zurückzuführen sein. In dieser Situation wird es notwendig sein, einen anderen Keim, vorzugsweise von einem anderen Lieferanten, und/oder andere Medien zu verwenden;

- 2) das Nichtvorhandensein von Sporenauskeimung (es sind mindestens zehn Zählfelder zu prüfen) nachzuweisen;
- 3) bei Vorhandensein ausgekeimter Sporen, die Suspension zu verwerfen;
- 4) das Nichtvorhandensein von Myzelfragmenten (es sind mindestens zehn Zählfelder zu prüfen) nachzuweisen.

Bei Vorhandensein von Myzelien ist mit einer zweiten gefritzten Filtration fortzufahren. Sollten noch immer Myzelien vorhanden sein, ist die Suspension zu verwerfen.

- c) Die Anzahl der Conidiosporen 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 und in einem Wasserbad kontrolliert auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufbewahrt werden (5.3.2.2) 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.

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 [d)] 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} (10^{-6} und 10^{-7} beim modifizierten Verfahren, 5.5.4) 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 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.

Die zur Auszählung der Prüfsuspension angewendete Verfahrensweise ist bei allen anderen Auszählungen, 5.4.1.5 d), 5.5.2.2 c) und d), 5.5.2.3 b), 5.5.2.4 b) und 5.5.2.5 b), anzuwenden.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.5 Validierungssuspension (N_V und N_{VB})

- a) Zur Herstellung der Validierungssuspension (N_V) wird die Prüfsuspension N (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 die gleiche Verfahrensweise, aber nur ein Viertel $(1 + 3)$ der Verdünnung 10^{-4} wird verwendet, dies entspricht $3,0 \times 10^3$ KBE/ml bis $1,6 \times 10^4$ KBE/ml.

- b) Bei der Kontrolle des Neutralisationsmediums N_{VB} (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}].
- c) 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.
- d) Zur Auszählung wird mit Verdünnungsmittel (5.2.2.4) eine Verdünnung von 10^{-1} , im Fall des modifizierten Verfahren (5.5.4) eine 10^{-2} Verdünnung, und im Fall der Validierungssuspension N_{VB} [siehe b)] eine Verdünnung von 10^{-3} , hergestellt. 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* siehe 5.4.1.4.1 c); bei *Aspergillus brasiliensis* siehe 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

- a) 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 brasiliensis*: 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.
- b) 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.
- c) 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 (= tatsächliche Prüfkonzentration), 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, in diesem Fall ist die höchste prüfbare Konzentration 80 %. Gebrauchsfertige Produkte sind immer bei 97 % [modifiziertes Verfahren (5.5.4)] zu prüfen. In diesem Fall beträgt die „tatsächliche Prüfkonzentration“ 97 %.

Verdünnungen gebrauchsfertiger Produkte sind mit Wasser (5.2.2.2) statt mit Wasser standardisierter Härte herzustellen. Produkte für die Händewaschung werden zuvor stets mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) verdünnt, um eine Lösung mit 62,5 % zu erzielen. 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 und levuroziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Prüfbedingungen

Die Versuchsbedingungen dürfen entsprechend der für das Produkt vorgesehenen praktischen Anwendungsbedingungen (Abschnitt 4) ausgewählt werden:

- a) Temperatur θ (in °C):
Die zu prüfenden Prüftemperaturen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt.
Die zulässige Abweichung für jede gewählte Temperatur beträgt ± 1 °C.
- b) Einwirkzeit t (in min):
Die zu prüfenden Einwirkzeiten sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt.
Die zulässige Abweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt ± 10 s, außer bei 1 min oder weniger, wo sie ± 5 s beträgt.
- c) Belastungssubstanzen:
Die zu prüfende Belastungssubstanz ist Rinderserumalbuminlösung 0,30 g/l (5.2.2.8.2) bei niedriger Belastung oder bei hoher Belastung ein Gemisch von 3 ml/l Schaf-Erythrozyten und 3,0 g/l Rinder-serumalbuminlösung (5.2.2.8.3) – entsprechend Abschnitt 4, Tabelle 1 und dem praktischen Anwendungsgebiet. Zusätzliche Belastungssubstanzen dürfen für spezifische Anwendungsgebiete geprüft werden.
- d) Prüforganismen:
 - 1) die Prüforganismen für die Prüfung der fungiziden Wirkung sind: *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis*, wie in Abschnitt 4, Tabelle 1 und 5.2.1 beschrieben;
 - 2) der Prüforganismus für die Prüfung der levuroziden Wirkung ist: *Candida albicans*, wie in Abschnitt 4, Tabelle 1 und 5.2.1 beschrieben.

Zusätzliche Prüforganismen dürfen geprüft werden.

5.5.1.2 Wahl des Prüfverfahrens

Das vorzuziehende Verfahren ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Zur Bestimmung eines geeigneten Neutralisationsmediums wird die Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens (5.5.2.2, 5.5.2.3 und 5.5.2.4 in Verbindung mit 5.5.2.5) unter Verwendung eines Neutralisationsmediums durchgeführt, das nach der Erfahrung des Laboratoriums und entsprechenden veröffentlichten Daten ausgewählt wird.

Ist dieses Neutralisationsmedium nicht valide, muss die Validierungsprüfung mit einem alternativen Neutralisationsmedium unter Berücksichtigung der Angaben in Anhang B durchgeführt werden.

Ist keines der beiden Neutralisationsmedien valide, darf das Membranfiltrationsverfahren (5.5.3) angewendet werden.

Unter besonderen Umständen kann es erforderlich sein, dem MEA (5.2.2.3) ein Neutralisationsmedium zuzusetzen.

5.5.1.3 Allgemeine Anweisungen für Validierungs- und Kontrollverfahren

- a) Die Neutralisation und/oder Beseitigung der fungiziden und/oder fungistatischen Wirkung des Produkts muss/müssen für jeden der verwendeten Prüforganismen und für jede Versuchsbedingung (Belastungssubstanz, Temperatur, Einwirkzeit) kontrolliert und validiert werden, jedoch nur bei der höchsten Produktprüfkonzentration. Diese Verfahren (Kontrolle der Prüfbedingungen, Kontrolle der Neutralisation oder Filtration und Verfahrensvalidierung) müssen gleichzeitig mit der Prüfung und mit dem gleichen Neutralisationsmedium – bzw. der gleichen Spülflüssigkeit – wie in der Prüfung durchgeführt werden.
- b) Im Fall gebrauchsfertiger Produkte ist Wasser (5.2.2.2) statt Wasser standardisierter Härte zu verwenden, wobei die Ausnahme hinsichtlich Produkte für die Händewaschung zu berücksichtigen ist (5.1.1, ANMERKUNG).
- c) Wurde aufgrund von Problemen bei der Neutralisation dem für die Validierungs- und Kontrollverfahren verwendeten MEA Neutralisationsmedium zugesetzt (5.5.1.2), muss der in der Prüfung verwendete MEA ebenfalls die gleiche Menge dieses Neutralisationsmediums enthalten.
- d) Chemothermische Desinfektionsverfahren sind in mehreren Anwendungsbereichen relevant. Erhöhte Temperaturen können beispielsweise dazu beitragen, die Menge an Chemikalien zu reduzieren, die zur Erreichung des gewünschten Ziels erforderlich ist. Während für das bakterizide und viruzide Wirkungsspektrum relevante spezifische thermoresistente Prüforganismen für Prüftemperaturen $\geq 40\text{ °C}$ und einige Anwendungsbereiche definiert wurden, wurde dies für andere Wirkungsspektren und Anwendungsbereiche noch nicht erreicht. Es kann jedoch wünschenswert sein, Daten für z. B. die levurozide, fungizide und/oder mykobakterizide Wirkung der chemothermischen Desinfektion bereitzustellen. Aufgrund der begrenzten Temperaturbeständigkeit dieser Prüforganismen kann dies zu ungültigen Kontrollen der Versuchsbedingungen führen (Kontrolle A/Wasserkontrolle in einigen Prüfungen). Solche Prüfungen können geeignete Ergebnisse z. B. für die levurozide, fungizide und/oder mykobakterizide Wirkung unter chemothermischen Bedingungen liefern. In solchen Fällen sind die Kontrolle A und/oder die Wasserkontrolle bei der Anwendungstemperatur und bei 20 °C parallel durchzuführen. Wenn die Kontrolle A und/oder die Wasserkontrolle bei 20 °C die Gültigkeit der Prüfung und die Wirksamkeit bei erhöhten Temperaturen belegen, kann das Produkt als aktiv angesehen werden.

Durch die Implementierung der zusätzlichen Kontrolle A (und gegebenenfalls der Wasserkontrolle) bei 20 °C gilt der verwendete Standard als validiert für alle Temperaturen unterhalb der Temperaturen, von denen bekannt ist, dass sie für die gewählte Einwirkzeit lediglich eine thermische Desinfektion bewirken.

5.5.1.4 Temperatureinstellung

Alle Reagenzien [Produktprüflösungen (5.4.2), Prüfsuspension (5.4.1.4), Validierungssuspension (5.4.1.5), Verdünnungsmittel (5.2.2.4), Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) und Belastungssubstanz (5.2.2.8)] werden vor der Prüfung in einem auf θ eingestellten Wasserbad (5.3.2.2) auf die Prüftemperatur θ [5.5.1.1a)] gebracht. Die Festlegungen in 5.4.1.4.1 b) und 5.4.1.4.2 c) sind zu berücksichtigen. Die Stabilisierung der Reagenzien hinsichtlich der Prüftemperatur θ ist zu kontrollieren.

Das Neutralisationsmedium (5.2.2.5) oder die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) sowie das Wasser (5.2.2.2) sind auf eine Temperatur von $(20 \pm 1)\text{ °C}$ einzustellen.

Im Fall gebrauchsfertiger Produkte muss zusätzlich das Wasser (5.2.2.2) auf die Prüftemperatur θ eingestellt werden.

5.5.1.5 Vorsichtsmaßnahme beim Umgang mit Prüforganismen

Bei der Zugabe der Prüf- oder Validierungssuspensionen (5.4.1) darf der obere Teil der Innenseiten der Reagenzgläser nicht berührt werden.

5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren⁶

5.5.2.1 Allgemeines

Das Prüfverfahren und die Kontroll- und Validierungsverfahren (5.5.2.2 bis 5.5.2.5) müssen gleichzeitig durchgeführt werden.

5.5.2.2 Prüfung N_a – Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Konzentrationen

Der Verfahrensablauf zur Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Konzentrationen ist wie folgt:

- a) 1,0 ml Belastungssubstanz (5.2.2.8) wird in ein Reagenzglas pipettiert. Es wird 1,0 ml Prüfsuspension (5.4.1.4) zugegeben. Die Stoppuhr (5.3.2.5) wird sofort in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas für $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in ein auf die gewählte Prüftemperatur θ [5.5.1.1 a)] eingestelltes Wasserbad gestellt.
- b) Nach Ablauf dieser Zeit werden 8,0 ml einer der Produktprüflösungen (5.4.2) zugegeben. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe wieder in Gang gesetzt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas für die gewählte Einwirkzeit t [5.5.1.1 b)] in ein auf θ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende von t wird die Lösung erneut durchmischt [5.3.2.6 a)].
- c) Nach Ablauf von t wird eine 1,0-ml-Probe des Prüfgemisches N_a in ein Röhrchen mit 8,0 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.5) und 1,0 ml Wasser (5.2.2.2) überführt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und der Ansatz in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. Sofort nach einer Neutralisationszeit von $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ [im Falle einer Einwirkzeit von 10 min oder kürzer nur $(10 \pm 1) \text{ s}$] wird eine Probe von 1,0 ml des neutralisierten Prüfgemisches N_a (enthaltend Neutralisationsmedium, Produktprüflösung, Belastungssubstanz und Prüfsuspension) 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 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.
- d) Zusätzlich sind 0,5 ml dieses Gemisches in ein Reagenzglas mit 4,5 ml Neutralisationsmittel zu überführen, um eine Verdünnung von $10^{-1} N_a$ herzustellen, bei Produkten für die hygienische Händewaschung ist durch zusätzliches Mischen und Verdünnen eine Verdünnung von $10^{-2} N_a$ herzustellen. Proben von 1,0 ml sind jedem Reagenzglas mit Verdünnung als Doppelbestimmung zu entnehmen und unter Anwendung des Gussplattenverfahrens oder des Oberflächenverfahrens zu beimpfen.

Im Fall von Produkten für die hygienischen Händewaschung kann nur die 10^{-2} Verdünnung von N_a (und nicht die 100 [siehe 5.5.2.2. c)] und die 10^{-1} Verdünnung) beimpft und bebrütet werden.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

6) Zu einer graphischen Darstellung dieses Verfahrens siehe Bild C.1 und Bild C.2.

- e) Die Arbeitsgänge a) bis d) werden gleichzeitig mit den anderen Produktprüflösungen durchgeführt.
- f) Die Arbeitsgänge a) bis e) werden unter Anwendung der weiteren obligatorischen und gegebenenfalls der sonstigen zusätzlichen Prüfbedingungen (5.5.1.1) durchgeführt.

5.5.2.3 Kontrolle der Prüfbedingungen A — Validierung der gewählten Prüfbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorhandenseins keimabtötender Wirkungen in den Prüfbedingungen

Zur Validierung der gewählten Prüfbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimtötender Wirkungen in den Prüfbedingungen ist der Verfahrensablauf wie folgt:

- a) 1,0 ml der in der Prüfung verwendeten Belastungssubstanz (5.5.2.2) wird in ein Reagenzglas pipettiert. 1,0 ml Validierungssuspension N_V (5.4.1.5) wird zugegeben. Die Stoppuhr wird sofort in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas für $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in ein auf θ eingestelltes Wasserbad gestellt.
- b) Nach Ablauf dieser Zeit werden 8,0 ml Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) [im Fall gebrauchsfertiger Produkte (mit Ausnahme von Produkten für die Händewaschung (5.4.2)!) statt des Wassers standardisierter Härte: Wasser (5.2.2.2)] zugegeben. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe wieder in Gang gesetzt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas für die Dauer t in ein auf θ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende von t wird die Lösung erneut durchmischt [5.3.2.6 a)].
- c) Nach Ablauf von t wird eine 1,0-ml-Probe dieses Gemisches A als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft [5.5.2.2 c)].
- d) Wenn die begrenzte Temperaturbeständigkeit der Prüforganismen zu ungültigen Kontrollen der Versuchsbedingungen führen kann (Kontrolle A/Wasserkontrolle in einigen Prüfungen), können solche Prüfungen geeignete Ergebnisse liefern, z. B. levurozide und/oder fungizide Ergebnisse unter chemisch-thermischen Bedingungen. In solchen Fällen sind die Kontrolle A und/oder die Wasserkontrolle bei der Anwendungstemperatur und bei 20°C parallel durchzuführen. Wenn die Kontrolle A und/oder die Wasserkontrolle bei 20°C die Gültigkeit der Prüfung und die Wirksamkeit bei erhöhten Temperaturen belegen, kann das Produkt als aktiv angesehen werden.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

5.5.2.4 Kontrolle des Neutralisationsmediums B — Verifizierung des Nichtvorhandenseins einer Toxizität des Neutralisationsmediums

Zur Verifizierung des Nichtvorliegens einer Toxizität des Neutralisationsmediums ist der Verfahrensablauf wie folgt:

- a) 9,0 ml des in der Prüfung verwendeten Neutralisationsmediums (5.5.2.2) werden in ein Reagenzglas pipettiert. 1,0 ml Validierungssuspension [5.4.1.5 b)], die $3,0 \times 10^4 \text{ KBE/ml}$ bis $1,6 \times 10^5 \text{ KBE/ml}$ (N_{VB}) enthält, wird zugegeben. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. 0,5 ml dieses Gemisches wird in ein Reagenzglas überführt, das 4,5 ml des Neutralisationsmediums enthält, um eine Verdünnung von $10^{-1} N_{VB}$ herzustellen; dieses Verfahren ist zu wiederholen, um eine Verdünnung von $10^{-2} N_{VB}$ herzustellen. Die Reagenzgläser mit der Verdünnung von $10^{-2} N_{VB}$ werden $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ [für Einwirkzeiten von 10 min oder kürzer nur $(10 \pm 1) \text{ s}$] in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende dieser Zeit wird die Lösung erneut durchmischt [5.3.2.6 a)].

ANMERKUNG Die im Verhältnis zu den Prüforganismen große Menge Neutralisationsmedium spiegelt die zusätzlichen Verdünnungen mit Neutralisationsmedium wider — bei N_a [5.5.2.2 c) und d)] 10^{-1} und bei Produkten für die Händewaschung 10^{-1} und 10^{-2} .

- b) Nach Ablauf dieser Zeit wird eine 1,0-ml-Probe dieses Gemisches *B* (Verdünnung von $10^{-2} N_{VB}$) als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft [5.5.2.2 c)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

5.5.2.5 Verfahrensvalidierung *C* — Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens

Zur Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens ist der Verfahrensablauf wie folgt:

- a) 1,0 ml der in der Prüfung verwendeten Belastungssubstanz (5.5.2.2) wird in ein Reagenzglas pipettiert. 1,0 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) wird zugegeben und dann die Stoppuhr in Gang gesetzt, 8,0 ml Produktprüflösung nur der höchsten in der Prüfung verwendeten Konzentration (5.5.2.2) werden zugegeben. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas für die Dauer t in ein auf θ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende von t wird die Lösung erneut durchmischt [5.3.2.6 a)].
- b) Nach Ablauf von t wird 1,0 ml des Gemisches in ein Reagenzglas mit 8,0 ml (in 5.5.2.2 verwendetem) Neutralisationsmedium überführt. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe erneut in Gang gesetzt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas 5 min $\pm$ 10 s [im Falle einer Einwirkzeit von 10 min oder kürzer nur (10 $\pm$ 1) s] in ein auf (20 $\pm$ 1) °C eingestelltes Wasserbad gestellt. Es wird 1,0 ml der Validierungssuspension (5.4.1.5) hinzugefügt. Die Stoppuhr wird mit Beginn der Zugabe gestartet und es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Das Reagenzglas wird für (30 $\pm$ 1) min in ein auf (20 $\pm$ 1) °C eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende dieser Zeit wird erneut durchmischt [5.3.2.6 a)]. Nach Ablauf dieser Zeit wird eine 1,0-ml-Probe des Gemisches *C* als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft [5.5.2.2 c)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

5.5.2.6 Bebrütung und Auszählung des Prüfgemisches und der Kontroll- und Validierungsgemische

Zur Bebrütung und Auszählung des Prüfgemisches, des Kontroll- und des Validierungsgemisches ist der Verfahrensablauf wie folgt:

- a) 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 brasiliensis*: 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.
- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien festgehalten, aber für alle Zahlen größer als 165 (bei Schimmelpilzen) oder größer als 330 (bei Hefen) wird > 165 bzw. > 330 aufgezeichnet; die V_c -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der KBE/ml im Prüfgemisch N_a und in den Validierungsgemischen *A*, *B* und *C* wird nach den in 5.6.2.4 und 5.6.2.6 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.5.3 Membranfiltrationsverfahren⁷

5.5.3.1 Allgemeines

Das Prüfverfahren und die Kontroll- und Validierungsverfahren (5.5.3.2 bis 5.5.3.5) müssen gleichzeitig durchgeführt werden.

Jedes Membranfiltrationsgerät (5.3.2.7) muss mit 50 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) gefüllt sein. Falls sie in Sonderfällen mehr als 1 min beträgt, muss die für das Filtrieren erforderliche Zeit im Prüfbericht angegeben werden. Beim Überführen der Membranen auf die Oberfläche einer Agarplatte sollte sorgfältig darauf geachtet werden, dass sich die Prüforganismen beim Auflegen auf die Platte auf der oberen Seite der Membran befinden und ein Lufteinschluss zwischen Membran und Agaroberfläche vermieden wird.

5.5.3.2 Prüfung N_a — Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Konzentration

Die Vorgehensweise bei der Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Konzentrationen ist wie folgt:

- a) Siehe 5.5.2.2 a) und b);
- b) Nach Ablauf von t wird eine 0,1-ml-Probe des Prüfgemisches N_a (bei Produkten für die hygienische Händewaschung 1 μ l) als Doppelbestimmung entnommen, und jede 0,1-ml-Probe (1- μ l-Probe) wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Die Filtration erfolgt sofort. Es werden mindestens 150 ml, höchstens jedoch 500 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) durchfiltriert. Ist die Spülflüssigkeit kein Wasser, wird das Verfahren damit beendet, dass 50 ml Wasser (5.2.2.2) durchfiltriert werden. Dann werden alle Membranen auf die Oberfläche gesonderter MEA-Platten überführt.

Bei der Menge von 1 μ l wird die 100fache Verdünnung von N_a [Verdünnung von 10^{-2} in 5.5.2.2 d)] berücksichtigt, die die Messung einer Reduktion um 2 lg Stufen ermöglicht. Wenn es nicht möglich ist, 1 μ l zu pipettieren, darf zum Beispiel vorab 1 ml in 1 000 ml verdünnt werden (oder 100 μ l in 100 ml) und 1 ml dieses Gemischs in das Membranfiltrationsgerät gegeben werden.

- c) Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6;
- d) Siehe 5.5.2.2 e);
- e) Siehe 5.5.2.2 f).

5.5.3.3 Kontrolle der Prüfbedingungen A — Validierung der gewählten Prüfbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimabtötender Wirkungen in den Prüfbedingungen

Zur Validierung der gewählten Prüfbedingungen und/oder zur Verifizierung des Nichtvorliegens keimabtötender Wirkungen in den Prüfbedingungen ist der Verfahrensablauf wie folgt.

- a) Siehe 5.5.2.3 a) und b).
- b) Nach Ablauf von t wird eine 1,0-ml-Probe des Gemisches A als Doppelbestimmung entnommen und jede 1,0-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Die Filtration erfolgt sofort sowie zusätzlich mit 50 ml Wasser (5.2.2.2). Dann werden alle Membranen auf die Oberfläche gesonderter MEA-Platten (5.2.2.3) überführt.

⁷⁾ Zu einer graphischen Darstellung dieses Verfahrens siehe Bild C.3 und Bild C.4.

Im Fall von *Aspergillus brasiliensis* wird die Probe in zwei, drei oder vier Anteile annähernd gleicher Größe aufgeteilt und jeder Anteil in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt, d. h. für Doppelbestimmungen müssen vier, sechs oder acht Membranen beimpft werden.

ANMERKUNG Der Grund für die Aufteilung der Proben ist die obere Auszählgrenze [5.6.2.2 a)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

5.5.3.4 Kontrolle der Filtration B – Validierung des Filtrationsverfahrens

Zur Validierung des Filtrationsverfahrens wird wie folgt vorgegangen:

0,1 ml der Validierungssuspension N_V [5.4.1.5 a)] (Achtung: nicht N_{VB} wie in 5.5.2.4 beschrieben!) wird als Doppelbestimmung entnommen (Suspension für die Kontrolle B) und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt.

Die Filtration erfolgt sofort. Die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) wird auf die gleiche Weise durchfiltriert wie in der Prüfung [5.5.3.2 b)]. Ist die Spülflüssigkeit kein Wasser, wird das Verfahren damit beendet, dass 50 ml Wasser (5.2.2.2) durchfiltriert werden. Dann werden alle Membranen auf die Oberfläche gesonderter MEA-Platten (5.2.2.3) überführt.

Im Fall von *Aspergillus brasiliensis* wird die Probe in zwei, drei oder vier Anteile annähernd gleicher Größe aufgeteilt und jeder Anteil in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt, d. h. für Doppelbestimmungen müssen vier, sechs oder acht Membranen beimpft werden.

ANMERKUNG Der Grund für die Aufteilung der Proben ist die obere Auszählgrenze [5.6.2.2 a)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

5.5.3.5 Verfahrensvalidierung C — Validierung des Membranfiltrationsverfahrens oder Zählung der Pilze auf den Membranen, die vorher mit dem Gemisch von Produkt und Belastungssubstanz in Kontakt gewesen sind

Zur Validierung des Membranfiltrationsverfahrens oder zum Auszählen der Pilze auf den Membranen, die zuvor mit dem Produkt in Kontakt waren, ist der Verfahrensablauf wie folgt:

- a) Siehe 5.5.2.5 a).
- b) Nach Ablauf von t wird 0,1 ml des Validierungsgemisches C als Doppelbestimmung entnommen und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Die Filtration erfolgt sofort. Die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) wird auf gleiche Weise durchfiltriert wie in der Prüfung [5.5.3.2 b)]. Dann werden die Membranen mit 50 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) bedeckt und 0,1 ml Validierungssuspension N_V [5.4.1.5 a)] wird zugegeben. Es wird erneut sofort filtriert und zusätzlich mit 50 ml Wasser (5.2.2.2), dann werden alle Membranen auf die Oberfläche gesonderter MEA-Platten (5.2.2.3) überführt.

Im Fall von *Aspergillus brasiliensis* wird die Probe in zwei, drei oder vier Anteile annähernd gleicher Größe aufgeteilt und jeder Anteil in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt, d. h. für Doppelbestimmungen müssen vier, sechs oder acht Membranen beimpft werden.

ANMERKUNG Der Grund für die Aufteilung der Proben ist die obere Zählungsgrenze [5.6.2.2 a)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

5.5.3.6 Bebrütung und Auszählung des Prüfgemisches und der Validierungsgemische

Zur Bebrütung und Auszählung des Prüfgemisches und der Gemische für die Kontrolle und Validierung ist der Verfahrensablauf wie folgt:

- a) 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 Kolonien auf den Membranen werden ausgezählt.

Nur bei *Aspergillus brasiliensis*: 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.

- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien festgehalten, aber für alle Zahlen größer als 55 (bei Schimmelpilzen) oder größer als 165 (bei Hefen) wird > 55 bzw. > 165 aufgezeichnet; die V_c -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der KBE je ml im Prüfgemisch N_a und in den Validierungsgemischen A , B und C wird nach den in 5.6.2.4 und 5.6.2.6 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.5.4 Modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte

5.5.4.1 Allgemeines

Wird bei der Prüfung eines gebrauchsfertigen Produkts nach 5.5.2 oder 5.5.3 nicht die erforderliche Keimzahlreduktion nachgewiesen, darf das folgende modifizierte Prüfverfahren durchgeführt werden. Die Prüfsuspension N und die Validierungssuspension N_V sind in 10fach höheren Konzentrationen herzustellen, als in 5.4.1.4 und 5.4.1.5 beschrieben.

Die Belastungssubstanz ist in 5fach höheren Konzentrationen herzustellen, als in 5.2.2.8.4 beschrieben.

Die Konzentration des Produkts beim modifizierten Prüfverfahren beträgt nur 97 %.

5.5.4.2 Modifiziertes Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren

Im Folgenden sind ausschließlich die Änderungen gegenüber 5.5.2 beschrieben. Siehe auch Bild C.5 und Bild C.6.

5.5.4.2.1 Prüfung N_a

0,2 ml der 5fach konzentrierten Belastungssubstanz (5.2.2.8.4) werden in ein Reagenzglas pipettiert. 0,1 ml der 10fach konzentrierten Prüfsuspension (5.4.1.4) wird zugegeben. Die Stoppuhr (5.3.2.5) wird sofort in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas für 2 min $\pm$ 10 s in ein auf die gewählte Prüftemperatur [5.5.1.1 a)] eingestelltes Wasserbad gestellt.

Nach Ablauf dieser Zeit werden 9,7 ml der unverdünnten Produktprüflösung (5.4.2) zugegeben. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe wieder in Gang gesetzt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas für die gewählte Einwirkzeit t [5.5.1.1 b)] in ein auf θ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende von t wird die Lösung erneut durchmischt [5.3.2.6 a)]. Die Anweisungen in 5.5.2.2 c) und d), ggf. f) sind zu befolgen.

5.5.4.2.2 Kontrolle der Prüfbedingungen A — Validierung der gewählten Prüfbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorhandenseins keimabtötender Wirkungen in den Prüfbedingungen

0,2 ml der bei der Prüfung verwendeten Belastungssubstanz (5.5.4.2.1) werden in ein Reagenzglas pipettiert. 0,1 ml der 10fach konzentrierten Prüfsuspension [5.4.1.5 a)] wird zugegeben, wie für dieses modifizierte Prüfverfahren beschrieben. Die Stoppuhr wird sofort in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas für $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in ein auf θ eingestelltes Wasserbad gestellt.

Nach Ablauf dieser Zeit werden 9,7 ml Wasser (5.5.2.2) zugegeben. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe wieder in Gang gesetzt. Die Anweisungen in 5.5.2.3 b) (die beiden letzten Sätze) und c) sind zu befolgen.

5.5.4.2.3 Neutralisationskontrolle B — Verifizierung des Nichtvorhandenseins einer Toxizität des Neutralisationsmediums

Das in 5.5.2.4 beschriebene Verfahren ist zu befolgen.

5.5.4.2.4 Verfahrensvalidierung C — Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens

- a) 0,2 ml der bei der Prüfung verwendeten Belastungssubstanz (5.5.4.2.1) werden in ein Reagenzglas pipettiert. 0,1 ml des Verdünnungsmittels (5.2.2.4) wird zugegeben und dann werden mit Einschalten der Stoppuhr 9,7 ml der Produktprüflösung zugegeben. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas für t in ein auf θ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende von t wird erneut durchmischt [5.3.2.6 a)].
- b) Nach Ablauf von t sind 1,1 ml des Gemisches in ein Reagenzglas mit 8,8 ml Neutralisationsmedium (verwendet in 5.5.4.2.1) zu überführen. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe wieder in Gang gesetzt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ [bei Produkten für die Händedesinfektion und Händewaschung nach nur $(10 \pm 1) \text{ s}$] in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. 0,1 ml der 10fach konzentrierten Validierungssuspension [5.4.1.5 a)] wird zugegeben, wie für dieses modifizierte Prüfverfahren beschrieben. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe in Gang gesetzt, und es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Das Reagenzglas wird für $(30 \pm 1) \text{ min}$ in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende von t wird erneut durchmischt [5.3.2.6 a)]. Nach Ablauf dieser Zeit wird eine Probe von 1,0 ml des Gemisches C als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren [5.5.2.2 c)] abgeimpft.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

5.5.4.3 Modifiziertes Membranfiltrationsverfahren

5.5.4.3.1 Allgemeines

Im Folgenden sind ausschließlich die Änderungen gegenüber 5.5.3 beschrieben, siehe auch Bild C.7 und Bild C.8.

5.5.4.3.2 Prüfung N_a

5.5.4.2.1 ist zu befolgen, jedoch nur bis zum Ende der Durchmischung nach 5.5.3.2 b), dann sind 5.5.3.2 c) und e) zu befolgen.

5.5.4.3.3 Kontrolle der Prüfbedingungen A — Validierung der gewählten Prüfbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorhandenseins keimabtötender Wirkungen in den Prüfbedingungen

5.5.4.2.2 ist zu befolgen, jedoch nur bis zum Ende von 5.5.2.3 a), dann ist 5.5.3.3 b) zu befolgen.

5.5.4.3.4 Filtrationskontrolle *B* – Validierung des Filtrationsverfahrens

0,01 ml der Validierungssuspension N_V [5.4.1.5 a)] (Achtung: nicht N_{VB} wie in 5.5.2.4 beschrieben!) wird in Doppelbestimmung entnommen (Suspension für Kontrolle *B*) und jede 0,01-ml-Probe in eine separate Membranfiltrationsvorrichtung überführt (5.5.3.1). 5.5.3.4 ist zu befolgen.

5.5.4.3.5 Verfahrensvalidierung *C* — Validierung des Membranfiltrationsverfahrens oder Zählung der Pilze auf den Membranen, die vorher mit dem Gemisch von Produkt und Belastungssubstanz in Kontakt gewesen sind

- a) 5.5.4.2.4 a) ist zu befolgen.
- b) Nach Ablauf von t wird erneut durchmischt und 0,01 ml des Validierungsgemisches *C* sind in Doppelbestimmung zu entnehmen und jede 0,01-ml-Probe wird in eine separate Membranfiltrationsvorrichtung überführt (5.5.3.1). Sofort Filtrieren. Die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) wird auf die gleiche Weise durchfiltriert wie in der Prüfung [5.5.3.2 b)]; dann werden die Membranen mit 50 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) bedeckt und 0,01 ml der 10fach konzentrierten Validierungssuspension [5.4.1.4 b) und 5.4.1.5] wird zugegeben. Es wird sofort erneut filtriert und zusätzlich mit 50 ml Wasser (5.2.2.2), dann werden alle Membranen auf die Oberflächen gesonderter MEA-Platten (5.2.2.3) überführt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

5.6 Versuchsdaten und Berechnung

5.6.1 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen

5.6.1.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen und Prüfgemische

N , N_V und N_{VB} sind die Pilzsuspensionen, N_a ist das fungizide Prüfgemisch, *A* (Kontrolle der Prüfbedingungen), *B* (Kontrolle des Neutralisationsmediums oder Filtrationskontrolle) und *C* (Verfahrensvalidierung) sind die verschiedenen Kontrollprüfgemische.

N , N_V , N_{VB} , N_0 , N_{V0} , N_a sowie *A*, *B* und *C* sind jeweils die Anzahl der je ml in den verschiedenen Prüfgemischen gezählten Zellen entsprechend Tabelle 2.

Tabelle 2 — Anzahl der je ml in den unterschiedlichen Prüfgemischen gezählten Zellen

	Zellzahl je ml in den Pilzsuspensionen	Zellzahl je ml in den Prüfgemischen zu Beginn der Einwirkzeit (Zeit 0)	Zahl der überlebenden Zellen je ml in den Prüfgemischen am Ende der Kontaktzeit t (<i>A</i>), oder nach 5 min (<i>B</i>) bzw. 30 min (<i>C</i>)
Prüfung	N Prüfsuspension	$N_0^a (= N/10)$	N_a (vor Neutralisation oder Filtration)
Kontrollen	N_V Validierungssuspension N_{VB} Validierungssuspension für Kontrolle <i>B</i>	$N_{V0}^a (= N_V/10 = N_{VB}/1\ 000)$	<i>A</i> , <i>B</i> , <i>C</i>
^a Beim modifizierten Verfahren (5.5.4) gilt $N_0 = N/100$ und $N_{V0} = N_V/100$.			

5.6.1.2 Bestimmung der V_c -Werte

Alle Versuchsdaten werden im Bericht als V_c -Wert angegeben:

- a) beim Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (Prüfung und Kontrollen) ist ein V_c -Wert die Anzahl der je 1,0 ml Probe gezählten KBE;
- b) beim Membranfiltrationsverfahren ist ein V_c -Wert die Anzahl der je 0,1 ml Probe des Prüfgemisches N_a (1,0 μ l im Falle der hygienischen Händewaschung), für die Filtrationskontrolle (B) und die Verfahrensvalidierung (C) sowie je 1,0 ml Probe für die Kontrolle der Prüfbedingungen A (für das modifizierte Verfahren 5.5.4.3 gilt 0,1 ml für N_a , 1,0 ml für A und 0,01 ml für B und C).

5.6.2 Berechnung

5.6.2.1 Allgemeines

Der erste Schritt bei der Berechnung ist die Bestimmung der V_c -Werte, der zweite die Berechnung von N , N_0 , N_a , N_V , N_{V0} sowie A, B und C. Der dritte Schritt ist die Berechnung der Keimreduktion R (5.8).

5.6.2.2 Bestimmung der V_c -Werte

Die V_c -Werte werden wie folgt bestimmt:

- a) Die üblichen Grenzwerte für die Auszählung von Pilzen auf Agarplatten liegen zwischen 15 und 150 Kolonien für Schimmelpilze sowie zwischen 15 und 300 Kolonien bei Hefen. Nach dieser Europäischen Norm ist eine Abweichung von 10 % zulässig, so dass die Grenzwerte zwischen 14 und 165 für Schimmelpilze und zwischen 14 und 330 für Hefen liegen. Auf Membranen sind die üblichen oberen Grenzwerte anders: 50 für Schimmelpilze und 150 für Hefen, d. h. einschließlich 10 % Abweichung: 55 für Schimmelpilze und 165 für Hefen.

ANMERKUNG Grundlage des unteren Grenzwertes (14) ist die Tatsache, dass die Abweichungen zunehmen, je kleiner die in der Probe (1 ml bzw. 0,1 ml) gezählten Keimzahlen sind, so dass nachfolgende Berechnungen zu falschen Ergebnissen führen können. Der untere Grenzwert bezieht sich nur auf die Probe (und nicht notwendigerweise auf die Keimzahl auf einer Platte), z. B. ergeben drei Platten je 1 ml Probe mit 3 KBE, 8 KBE und 5 KBE einen V_c -Wert von 16. Die oberen Grenzwerte (55, 165 und 330) widerspiegeln die Ungenauigkeit beim Zählen zusammenfließender Kolonien und die Wachstumshemmung aufgrund Nährstoffverarmung. Sie beziehen sich nur auf die Keimzahl auf einer Platte und nicht notwendigerweise auf die Probe.

- b) Bei der Auszählung der Prüfsuspension N (5.4.1.6), der Validierungssuspension N_V und N_{VB} (5.4.1.6) und allen Zählungen beim Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (5.5.2.6) werden die V_c -Werte entsprechend der Anzahl der je 1-ml-Probe (oder Proben anderer Volumen für die Membranfiltrationsmethode und/oder für Produkte der hygienischen Händewaschung) verwendeten Platten (5.6.1.2) ermittelt und aufgezeichnet.

Ist mehr als eine Platte je 1 ml Probe zur Bestimmung des V_c -Wertes verwendet worden, sollten die Keimzahlen je Platte festgehalten werden.

Wenn die Keimzahl auf einer Platte höher als 165/330 ist, wird die Zahl im Prüfbericht als „> 165“/„> 330“ angegeben. Wenn mehr als eine Platte je Probe verwendet wurde und mindestens eine der Platten eine höhere Keimzahl als 165 (oder 330) aufweist, werden diese V_c -Werte im Prüfbericht als „> Summe der Keimzahlen“ angegeben (z. B. wird für „> 330, 310, 302“ „> 942“ angegeben).

Ist ein V_c -Wert niedriger als 14, wird die Zahl im Prüfbericht angegeben [für die weiteren Berechnungen (N_a) wird jedoch „< 14“ eingesetzt].

Beim Membranfiltrationsverfahren (5.5.3) gelten die Zählwerte auf den Membranen als V_c -Werte (5.6.1.2). V_c -Werte unterhalb des unteren (14) oder oberhalb des oberen Grenzwertes (55/165) sind im Prüfbericht anzugeben.

- c) Für die weitere Berechnung werden nur V_c -Werte innerhalb der jeweiligen Auszählgrenzen berücksichtigt, außer im Fall von N_a (5.6.2.4).

5.6.2.3 Berechnung von N und N_0

N ist die Zellzahl je ml in der Prüfsuspension (5.4.1.4, 5.6.1.1).

Da zwei Verdünnungen der Prüfsuspension (5.4.1.4 in Verbindung mit 5.4.1.6) ausgewertet werden, wird die Summe der KBE/ml als gewichtete mittlere Keimzahl unter Anwendung der folgenden Gleichung berechnet:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2)10^{-5}} \quad (1)$$

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;
 n_1 die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung berücksichtigten V_c -Werte, d. h. 10^{-5} ;
 n_2 die Anzahl der bei der höheren Verdünnung berücksichtigten V_c -Werte, d. h. 10^{-6} ;
 10^{-5} der der geringsten Verdünnung entsprechende Verdünnungsfaktor.

Die geringere Verdünnung ist 10^{-6} und die höhere Verdünnung ist 10^{-7} beim modifizierten Verfahren (5.5.4).

Beim modifizierten Verfahren (5.5.4) ist N 10fach höher und daher sind die Verdünnungen 10fach höher herzustellen (10^{-6} statt 10^{-5} und 10^{-7} statt 10^{-6}).

Die oben angegebenen Gleichungen sollten entsprechend angepasst werden.

Die berechneten Ergebnisse werden auf zwei signifikante Stellen gerundet. Dabei wird, falls die letzte Ziffer kleiner als 5 ist, die vorhergehende Ziffer nicht verändert; falls die letzte Ziffer größer als 5 ist, wird die vorhergehende Ziffer um eine Einheit erhöht; falls die letzte Ziffer gleich 5 ist, wird die vorhergehende Ziffer auf die nächste gerade Zahl gerundet. Es wird schrittweise vorgegangen, bis zwei signifikante Stellen erreicht sind. Im Ergebnis wird die Anzahl der KBE/ml als Zahl zwischen 1,0 und 9,9, multipliziert mit der entsprechenden Zehnerpotenz, angegeben.

BEISPIEL

$$N = \frac{168 + 213 + 20 + 25}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-5}} = \frac{426}{2,2 \times 10^{-5}} = 1,9364 \times 10^7 = 1,9 \times 10^7 \text{ (in KBE/ml)}$$

N_0 ist die Anzahl der Zellen je ml im Prüfgemisch [5.5.2.2 a)] am Anfang der Einwirkzeit (Zeit „null“ = 0). Sie beträgt ein Zehntel des gewichteten Mittelwertes von N aufgrund der zehnfachen Verdünnung durch die Zugabe von Produkt und Belastungssubstanz. Beim modifizierten Verfahren (5.5.4) beträgt sie ein Hundertstel, da nur 0,1 ml von N in der Prüfung verwendet werden.

5.6.2.4 Berechnung von N_a

N_a ist die Anzahl der überlebenden Zellen je ml im Prüfgemisch [5.5.2.2 a) oder 5.5.3.2 a)] am Ende der Einwirkzeit und vor der Neutralisation oder Membranfiltration. Sie ist zehnmal so hoch wie die V_c -Werte aufgrund der Zugabe von Neutralisationsmedium und Wasser [5.5.2.2 b)] oder als die Werte des Probenolumens von 0,1 ml [5.5.3.2 b)] beim Membranfiltrationsverfahren.

- a) Der Mittelwert für jeden Verdünnungsschritt N_a^0 , N_a^{-1} und bei Produkten für die Händewaschung zusätzlich N_a^{-2} ist unter Verwendung der folgenden Gleichung zu berechnen:

$$N_a^0, N_a^{-1}, N_a^{-2} = 10 \, c/n \quad (2)$$

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;
 n die Anzahl der berücksichtigten V_c -Werte.

Liegt einer der oder liegen beide V_c -Werte der Doppelbestimmung entweder unterhalb des unteren oder oberhalb des oberen Grenzwertes, werden die Ergebnisse als „weniger als“ oder „mehr als“ angegeben.

- a1** V_c -Werte der Doppelbestimmung N_a^{-1} : 2, 16

BEISPIEL 1

$$N_a^{-1} = \frac{(<14 + 16) \times 10}{2} \times 10 = < 150 \times 10^1 = < 1\,500 = < 1,5 \times 10^3$$

- a2** V_c -Werte der Doppelbestimmung N_a^{-2} (Membranfiltration): > 165, > 165

BEISPIEL 2

$$N_a^{-2} = \frac{(>165 + >165) \times 100}{2} \times 10 = > 1\,650 \times 10^2 = > 165\,000 = > 1,6 \times 10^5$$

- a3** V_c -Werte der Doppelbestimmung (zwei Ausstrichplatten je 1,0-ml-Probe): > 660, 600

BEISPIEL 3

$$N_a^0 = \frac{(>660 + 600) \times 10}{2} = > 6\,300 = > 6,3 \times 10^3$$

- b) Für die Berechnung von N_a sind nur die Ergebnisse für N_a^0 , N_a^{-1} und N_a^{-2} zu verwenden, bei denen einer oder beide V_c -Werte innerhalb der Zählungsgrenzen liegen. Ausnahmen und Regeln für Sonderfälle:

ANMERKUNG Obwohl Verdünnungen von 10^{-2} nur hergestellt werden, wenn Produkte für die hygienische Händewaschung zu prüfen sind, schließen die folgenden Beispiele diese Verdünnungsstufe ein.

- b1** Weisen alle vorhergehenden Verdünnungen von N_a Mittelwerte von „mehr als“ auf, ist ausschließlich die höchste Verdünnung (10^{-1} , bei Produkten für die Händewaschung 10^{-2}) als Ergebnis für N_a einzusetzen.

BEISPIEL 4

	V_{c1}	V_{c2}	Mittelwert $\times 10$	
N_a^0	> 660	> 660	> 6 600	$N_a = > 6\,600 \times 10^2 = > 6,6 \times 10^5$
N_a^{-1}	> 660	> 660	> 6 600	
N_a^{-2}	> 660	> 660	> 6 600	

b2 Weisen alle vorhergehenden Verdünnungen von N_a Mittelwerte von „weniger als“ auf, ist ausschließlich die niedrigste Verdünnung (10^0) als Ergebnis für N_a einzusetzen.

BEISPIEL 5

	V_{c1}	V_{c2}	Mittelwert $\times 10$	
N_a^0	< 14	18	< 160	$N_a = < 160 \times 10^0 = < 1,6 \times 10^2$
N_a^{-1}	< 14	< 14	< 140	
N_a^{-2}	< 14	< 14	< 140	

b3 Liegt einer der oder liegen beide V_c -Werte der Doppelbestimmung in nur einer Verdünnung von N_a innerhalb der Zählungsgrenzen, sind diese Ergebnisse als N_a zu verwenden.

BEISPIEL 6 (Membranfiltration, *Aspergillus brasiliensis*):

	V_{c1}	V_{c2}	Mittelwert $\times 10$	
N_a^0	> 55	> 55	> 550	$N_a = 730 \times 10^1 = 7,3 \times 10^3$
N_a^{-1}	46	27	730	
N_a^{-2}	< 14	< 14	< 140	

b4 Weist die höhere Verdünnung in zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungen von N_a einen Mittelwert von „weniger als“ und die niedrigere Verdünnung einen Mittelwert von „mehr als“ auf, ist ausschließlich die niedrigere Verdünnung als N_a -Wert zu verwenden.

BEISPIEL 7

	V_{c1}	V_{c2}	Mittelwert $\times 10$	
N_a^0	> 660	> 660	> 6 600	$N_a = > 6\,600 \times 10^0 = > 6,6 \times 10^3$
N_a^{-1}	< 14	29	< 215	
N_a^{-2}	< 14	< 14	< 140	

c) Für die Berechnung von N_a als gewichteter Mittelwert sind höchstens zwei aufeinander folgende Verdünnungen zu verwenden. Ausnahmen und Regeln für Sonderfälle:

c1 Liegt einer der oder liegen beide V_c -Werte der Doppelbestimmung in drei oder mehr aufeinander folgenden Verdünnungen von N_a (einschließlich N_a^0) innerhalb der Zählungsgrenzen (z. B. N_a^{-2} : 17, 23; N_a^{-1} : 120, 135; N_a^0 : 308, > 330), ist die gesamte Prüfung ungültig (5.7.1).

c2 Weisen zwei aufeinander folgende Verdünnungen von N_a V_c -Werte der Doppelbestimmung innerhalb der Zählungsgrenzen auf, ist N_a als gewichteter Mittelwert unter Verwendung von Gleichung (3) zu berechnen:

$$N_a = \frac{c \times 10}{2,2 \times 10^Z} \quad (3)$$

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;
- Z der Verdünnungsfaktor, der der niedrigeren Verdünnung entspricht; z. B. ist N_a^0 die niedrigere Verdünnung im Vergleich zu N_a^{-1} .

c3 Liegen beide V_c -Werte der Doppelbestimmung der höheren Verdünnung in zwei aufeinander folgenden Verdünnungen von N_a innerhalb der Zählungsgrenzen und weist einer der V_c -Werte einen Mittelwert von „mehr als“ auf, ist N_a als gewichteter Mittelwert unter Verwendung von Gleichung (3) zu berechnen, siehe **c2**:

BEISPIEL 8

	V_{c1}	V_{c2}	Mittelwert $\times 10$
N_a^0	> 538	320	> 4 290
N_a^{-1}	46	57	515
N_a^{-2}	< 14	< 14	< 140

$$N_a = \frac{(>538 + 320 + 46 + 57) \times 10}{2,2 \times 10^0} = > 4\,368,18 = > 4,4 \times 10^3$$

c4 Weist einer der Doppelbestimmungswerte der höheren Verdünnung in zwei aufeinanderfolgenden Verdünnungen von N_a „< 14“ auf, ist ausschließlich die niedrigere Verdünnung als N_a -Wert zu verwenden.

BEISPIEL 9

	V_{c1}	V_{c2}	Mittelwert $\times 10$
N_a^0	> 660	> 660	> 6 600
N_a^{-1}	569	> 660	> 6 145
N_a^{-2}	< 14	26	< 200

$$N_a = > 6\,145 \times 10^1 = > 6,1 \times 10^4$$

5.6.2.5 Berechnung von N_V , N_{V0} und N_{VB}

N_V ist die Anzahl der Zellen je ml in der Validierungssuspension [5.4.1.5 a)]. Sie ist zehnmal so hoch wie die Zellzahl als V_c -Werte aufgrund des Verdünnungsschritts von 10^{-1} [5.4.1.5 b)].

N_{V0} ist die Anzahl der Zellen je ml in den Gemischen A, B und C zu Beginn der Einwirkzeit (Zeit 0) (5.6.1.1). Im Fall der Kontrolle eines Neutralisierungsmediums B im Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (5.2.2.4) ist es die Anzahl der Zellen je ml nach 100facher Verdünnung. N_{V0} ist ein Zehntel des Mittelwertes der berücksichtigten V_c -Werte von N_V [5.4.1.6 c)], sofern N_{VB} ein Tausendstel ist.

N_V , N_{V0} und N_{VB} werden unter Verwendung der folgenden Gleichungen berechnet:

$$N_V = 10 \, c/n \quad (4)$$

$$N_{VB} = 1 \, 000 \, c/n \quad (5)$$

$$N_{V0} = c/n \quad (6)$$

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;
- n die Anzahl der berücksichtigten V_c -Werte.

5.6.2.6 Berechnung von A , B und C

A , B und C sind die jeweilige Anzahl der überlebenden Zellen bei der Kontrolle der Prüfbedingungen A (5.5.2.3 oder 5.5.3.3), der Kontrolle des Neutralisationsmediums B (5.5.2.4) oder des Filtrationsvorgangs (5.5.3.4) und bei der Verfahrensvalidierung C (5.5.2.5 oder 5.5.3.5) am Ende der Einwirkzeit t (A) oder der festgelegten Zeiten 5 min (B) und 30 min (C). Sie entsprechen dem Mittelwert der berücksichtigten V_c -Werte der Gemische A , B und C .

A , B und C werden nach folgender Gleichung berechnet:

$$A, B, C = c/n \quad (7)$$

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;
- n die Anzahl der berücksichtigten V_c -Werte.

5.7 Verifizierung des Verfahrens

5.7.1 Allgemeines

Eine Prüfung ist valide, wenn:

- alle Ergebnisse die Kriterien von 5.7.3 erfüllen; und
- die Anforderungen von 5.8.2 erfüllt sind; und
- sie nicht durch ein in 5.6.2.4 c), erster Sonderfall (c1) beschriebenes Ergebnis ungültig gemacht wird.

Siehe auch 5.5.1.3 d).

5.7.2 Kontrolle der gewichteten Mittelwerte der Auszählungen

Bei Ergebnissen, die als gewichteter Mittelwert zweier aufeinander folgender Verdünnungen berechnet werden (z. B. N), darf der Quotient des Mittelwertes der beiden Ergebnisse nicht größer sein als 15 und nicht kleiner als 5. Ergebnisse unterhalb des unteren Grenzwertes werden als Zahl des unteren Grenzwertes (14) gewertet. Ergebnisse oberhalb des jeweiligen oberen Grenzwertes [5.6.2.2 b)] werden als Zahl des oberen Grenzwertes gewertet.