

DIN EN 13697



ICS 71.100.35

Einsprüche bis 2022-10-26
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 13697:2019-10

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Oberflächen-Versuch zur Bestimmung der bakteriziden und
levuroziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer
Desinfektionsmittel auf nicht porösen Oberflächen in den Bereichen
Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen ohne
mechanische Behandlung –
Prüfverfahren und Anforderungen ohne mechanische Behandlung
(Phase 2, Stufe 2);
Deutsche und Englische Fassung prEN 13697:2022**

Chemical disinfectants and antiseptics –

Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and yeasticidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas without mechanical action –

Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2);

German and English version prEN 13697:2022

Antiseptiques et désinfectants chimiques –

Essai quantitatif de surface non-poreuse pour l'évaluation de l'activité bactéricide et levurocide et/ou fongicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité sans action mécanique –

Méthode d'essai sans action mécanique et prescriptions (phase 2/étape 2);

Version allemande et anglaise prEN 13697:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-08-26 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 nal@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 Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 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 81 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 13697:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-08-04 AA „Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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.

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN 13697:2019-10 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Impfkultur unter niedriger Belastung für *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* wurde auf das vorherige Niveau nach EN 13697:2015 reduziert;
- b) eine genauere Überwachung des Trocknungsprozesses wurde in Anhang F (informativ) aufgenommen, um eine ausreichende Anzahl von überlebenden Zellen für gültige Ergebnisse zu erreichen;
- c) Aufnahme des Begriffs „levuroxid“ in den Titel des Dokuments;
- d) Klarstellung, dass 1 % rekonstituierte Milch als alleinige Verschmutzung in der Milchindustrie verwendet werden kann (keine Notwendigkeit, BSA zu testen);
- e) die Bezeichnungen der Variablen Nd, Nc, NC und NT wurden zur Harmonisierung mit anderen Normen des CEN/TC 216 in Na, A, B und C umbenannt;
- f) Erläuterung des Zählverfahrens in 5.5.3;
- g) Korrektur von Gleichung (2) und Gleichung (3) in 5.5.3;
- h) Norm redaktionell überarbeitet und an die derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Oberflächen-Versuch zur Bestimmung der bakteriziden und levuroziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel auf nicht porösen Oberflächen in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen ohne mechanische Behandlung – Prüfverfahren und Anforderungen ohne mechanische Behandlung (Phase 2, Stufe 2)

Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and yeasticidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas without mechanical action – Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2)

Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai quantitatif de surface non-poreuse pour l'évaluation de l'activité bactéricide et levurocide et/ou fongicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité sans action mécanique – Méthode d'essai sans action mécanique et prescriptions (phase 2/étape 2)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Anforderungen	8
5 Prüfverfahren	9
5.1 Kurzbeschreibung	9
5.2 Materialien und Reagenzien	9
5.2.1 Prüforganismen	9
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	10
5.2.3 Prüfoberfläche	13
5.3 Geräte und Glasgeräte	13
5.4 Herstellung der Prüforganismus-Suspensionen und der Produktprüflösungen	15
5.4.1 Prüforganismus-Suspensionen	15
5.4.2 Produktprüflösungen	18
5.5 Verfahrensablauf	19
5.5.1 Auswahl der Versuchsbedingungen	19
5.5.2 Prüfablauf	19
5.5.3 Auszählen der Prüfmischungen	23
5.6 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	25
5.6.1 Ermittlung von Daten: Auszählung der gewichteten Mittelwerte	25
5.6.2 Verifizierung des Verfahrens	26
5.6.3 Angabe der Ergebnisse	26
5.6.4 Schlussfolgerung	26
5.7 Prüfbericht	27
Anhang A (informativ) Entsprechende Referenzstämme	29
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien	31
Anhang C (informativ) Angabe der Ergebnisse nach dem Verdünnungs-Neutralisationsverfahren	33
Anhang D (informativ) Bakterizide Wirkung auf Oberflächen unter allgemeinen Anwendungsbedingungen (bei niedriger Belastung)	35
Anhang E (informativ) Präzision der Prüfergebnisse	36
Anhang F (informativ) Alternativer Endpunkt der Trocknung	37
Literaturhinweise	40

Bilder

Bild 1 — Beimpfter Träger	20
Bild 2 — Sichtbar getrocknete Impfkultur	21
Bild 3 — Auf beimpften Keimträger aufgebracht Produkt	21
Bild F.1 — Beispiel einer Trocknungskurve von <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442, getrocknet nach EN 13697:2019. Die rote Linie stellt den Mindestwert von A für bakterielle Prüforganismen dar	38
Bild F.2 — Mit 0,05 µl Prüfsuspension beimpfte Keimträger nach einer Trocknungszeit von a) 0 min, b) 15 min (2 µl bis 8 µl verbleibende Prüfsuspension), c) 25 min Trocknungszeit (= sichtbar trocken)	39

Tabellen

Tabelle 1 — Versuchsbedingungen 8
Tabelle C.1 — Prüfergebnisse 33

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 13697:2022) 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 13697:2015+A1:2019 ersetzen.

Im Vergleich zur Vorgängerversion EN 13697:2015+A1:2019 der Ausgabe EN 13697:2015 wurden die folgenden Änderungen vorgenommen:

- die Impfkultur unter Bedingungen niedriger Belastung für *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* wurde auf die vorherigen Zellzahlen wie in EN 13697:2015 verringert;
- eine genauere Überwachung des Trocknungsprozesses wurde als Anhang F (informativ) aufgenommen, um das Erreichen einer ausreichenden Anzahl überlebender Zellen für gültige Ergebnisse zu unterstützen;
- Aufnahme der levuroziden Wirkung in den Titel des Dokuments;
- Erläuterung, dass 1%ige rekonstituierte Milch als alleinige Verschmutzung (Belastungssubstanz) in der Milchwirtschaft verwendet werden kann (keine Notwendigkeit, BSA zu prüfen);
- zur Harmonisierung mit anderen Normen des CEN/TC 216 wurden die Bezeichnungen der Variablen Nd, Nc, NC und NT in Na, A, B und C umbenannt;
- Erläuterung des Zählverfahrens in 5.5.3;
- Korrektur von Gleichung (2) und Gleichung (3) in 5.5.3.

Die folgenden Änderungen in Version EN 13697:2015+A1:2019 im Vergleich zur Ausgabe EN 13697:2015 wurden beibehalten:

- Streichung obligatorischer und zusätzlicher Prüfbedingungen (siehe Tabelle 1 und 5.5.1);
- Aktualisierung der Herstellung von Rinderserumalbumin- und Magermilch-Lösungen (siehe 5.2.2.8.2);
- Anleitung zur Verwendung eines Vakuum-Exsikkators ergänzt;
- Erläuterung zur Bestimmung der mikrobiziden Konzentrationen durch Aktualisierung von 5.5.2.1 b) und Ergänzung von Bildern von Trägern.

Die nach EN 13697:2015 und EN 13697:2015+A1:2019 ermittelten Daten sind weiterhin gültig.

Einleitung

Dieses Dokument beschreibt ein Oberflächen-Prüfverfahren um festzustellen, ob ein als Desinfektionsmittel empfohlenes Produkt für die in Abschnitt 1 beschriebenen Bereiche eine bakterizide und/oder fungizide oder levurozide Wirkung auf nicht porösen Oberflächen aufweist oder nicht.

Dieses Dokument ist überarbeitet worden, um die für *P. aeruginosa* und *C. albicans* angenommenen Prüfparameter unter „niedrigen Belastungen“ zu ändern, die Bezeichnung der Prüfgrößen N, B, C, A, Na mit den anderen neuen Normen des CEN/TC 216 zu harmonisieren und Einzelheiten der Koloniezählung und -berechnung zu erläutern und/oder zu korrigieren.

Der Laborversuch simuliert praxisnahe Anwendungsbedingungen. Die ausgewählten Bedingungen (Einwirkzeit, Temperatur, Organismen auf Oberflächen usw.) spiegeln Parameter wider, wie sie in der Praxis vorkommen, einschließlich der Bedingungen, die die Wirkung von Desinfektionsmitteln beeinflussen können. Jede Anwendungskonzentration, die aus dieser Prüfung resultiert, entspricht festgelegten Versuchsbedingungen.

Die Bedingungen sollen allgemeinen Ansprüchen genügen und einen Vergleich zwischen Laboren und Produktarten ermöglichen.

Bei einigen Anwendungen können die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt jedoch abweichen, so dass zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden müssen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren (Phase 2, Stufe 2) und die Mindestanforderungen an die bakterizide und/oder fungizide oder levurozide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und in öffentlichen Einrichtungen fest, die mit Wasser standardisierter Härte oder – im Fall von gebrauchsfertigen Produkten – mit Wasser eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung ergeben; ausgenommen davon sind Bereiche und Situationen mit medizinisch indizierter Desinfektion und Produkte, die auf lebenden Geweben benutzt werden.

Dieses Dokument gilt mindestens für den folgenden Anwendungsbereich:

a) Verarbeitung, Vertrieb und Verkauf von:

1) Lebensmitteln tierischer Herkunft:

- i) Milch und Milchprodukte;
- ii) Fleisch und Fleischprodukte;
- iii) Fisch, Meerestiere und daraus hergestellte Erzeugnisse;
- iv) Eier und Eiprodukte;
- v) Tiernahrung;
- vi) usw.

2) Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft:

- i) Getränke;
- ii) Früchte, Gemüse und daraus hergestellte Erzeugnisse (einschließlich Zucker, Destillationsprodukte);
- iii) Mehl, gemahlene und gebackene Produkte;
- iv) Tiernahrung;
- v) usw.

b) gewerbliche Einrichtungen und Haushaltsbereiche:

- 1) Verpflegungseinrichtungen;
- 2) öffentliche Bereiche;
- 3) öffentliche Verkehrsmittel;
- 4) Schulen;
- 5) Kindergärten;
- 6) Geschäfte;
- 7) Sportstätten;
- 8) Abfallbehälter (Mülltonnen);

- 9) Hotels;
 - 10) Wohngebäude;
 - 11) klinisch nicht relevante Bereiche von Krankenhäusern;
 - 12) Büroräume;
 - 13) usw.
- c) andere industrielle Bereiche:
- 1) Verpackungsmaterial;
 - 2) Biotechnologie (Hefe, Proteine, Enzyme usw.);
 - 3) Hersteller von Pharmazeutika;
 - 4) Hersteller von Kosmetika und Toilettenartikeln;
 - 5) Hersteller von Textilien;
 - 6) Weltraumforschungsindustrie und Computerindustrie;
 - 7) usw.

Bei Anwendung dieses Dokuments ist die Bestimmung der bakteriziden oder fungiziden oder levuroziden Wirkung des unverdünnten Produkts möglich. Da vom aktiven bis zum nicht aktiven Bereich drei Konzentrationen geprüft werden, ist eine Verdünnung des Produkts erforderlich, deshalb bildet das Produkt eine homogene stabile Zubereitung mit Wasser standardisierter Härte.

In EN 14885 ist die Beziehung zwischen den einzelnen Prüfungen untereinander und zu den Anwendungsempfehlungen detailliert festgelegt.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren dient dazu, die Wirkung gewerblich hergestellter Zubereitungen oder anderer aktiver Substanzen auf Bakterien und/oder Pilze unter Anwendungsbedingungen zu bestimmen.

ANMERKUNG 2 Dieses Verfahren kann nicht zur Bestimmung der Wirkung der Produkte gegenüber Mykobakterien angewendet werden.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Aufbewahrung von Prüforganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

EN 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

Das Produkt muss mindestens eine 4 Dezimal-logarithmische (lg) Reduktion für Bakterien und mindestens eine 3 Dezimal-logarithmische (lg) Reduktion für Pilze aufweisen, wenn es nach Tabelle 1 und 5.5.1 geprüft wird.

Tabelle 1 — Versuchsbedingungen

Prüfbedingungen	Bakterizide Wirkung auf nicht porösen Oberflächen ohne mechanische Behandlung	Levurozide Wirkung auf nicht porösen Oberflächen ohne mechanische Behandlung	Fungizide Wirkung auf nicht porösen Oberflächen ohne mechanische Behandlung
Prüforganismen (siehe 5.2.1) Mindestspektrum von Prüforganismen	<i>Enterococcus hirae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus brasiliensis</i>
Prüforganismen zusätzlich (Beispiele)	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (für Brauereien) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> (für Brauereien)	alle relevanten Prüforganismen
Prüftemperatur	Im Bereich von $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$ bis $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$ Für Prüfungen bei Raumtemperatur muss der Bereich zwischen $18 ^\circ\text{C}$ und $25 ^\circ\text{C}$ liegen.	Im Bereich von $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$ bis $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$ Für Prüfungen bei Raumtemperatur muss der Bereich zwischen $18 ^\circ\text{C}$ und $25 ^\circ\text{C}$ liegen.	Im Bereich von $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$ bis $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$ Für Prüfungen bei Raumtemperatur muss der Bereich zwischen $18 ^\circ\text{C}$ und $25 ^\circ\text{C}$ liegen.
Einwirkzeit	im Bereich von 1 min bis 60 min (von 1 min bis 5 min in 1-min-Schritten und von 5 min bis 60 min in 5-min-Schritten)	im Bereich von 1 min bis 60 min (von 1 min bis 5 min in 1-min-Schritten und von 5 min bis 60 min in 5-min-Schritten)	im Bereich von 1 min bis 60 min (von 1 min bis 5 min in 1-min-Schritten und von 5 min bis 60 min in 5-min-Schritten)
Belastungssubstanz niedrige Belastung	0,3 g/l Rinderserumalbumin für <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Escherichia coli</i> und <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,3 g/l Rinderserumalbumin für <i>C. albicans</i>	0,3 g/l Rinderserumalbumin für <i>C. albicans</i> und <i>A. brasiliensis</i>
Belastungssubstanz hohe Belastung	3,0 g/l Rinderserumalbumin für <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus hirae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> und <i>Escherichia coli</i>	3,0 g/l Rinderserumalbumin für <i>C. albicans</i>	3,0 g/l Rinderserumalbumin für <i>C. albicans</i> und <i>A. brasiliensis</i>
Belastungssubstanz in der Milchwirtschaft	1,0%ige rekonstituierte Milch (= 1,0 g/l Milchpulver)	1,0%ige rekonstituierte Milch (= 1,0 g/l Milchpulver)	1,0%ige rekonstituierte Milch (= 1,0 g/l Milchpulver)
Belastungssubstanz zusätzlich	alle relevanten Substanzen	alle relevanten Substanzen	alle relevanten Substanzen

Tabelle 1 (fortgesetzt)

Prüfbedingungen	Bakterizide Wirkung auf nicht porösen Oberflächen ohne mechanische Behandlung	Levurozide Wirkung auf nicht porösen Oberflächen ohne mechanische Behandlung	Fungizide Wirkung auf nicht porösen Oberflächen ohne mechanische Behandlung
(dezimale) logarithmische (lg) Reduktion in Bezug auf die Wasserkontrolle	≥ 4 lg	≥ 3 lg	≥ 3 lg
Die angegebenen Prüfbedingungen (allgemeine Zwecke) sind keinesfalls als Anforderungen an die Anwendung eines Produkts oder als Anforderungen an die Bewertung und Akzeptanz der Produkte durch Aufsichtsbehörden vorgesehen. Die Einwirkzeit für das Produkt wird vom Hersteller festgelegt. Wenn besondere Anwendungen berücksichtigt werden müssen, muss zusätzlich die bakterizide/levurozide/fungizide Wirkung unter relevanten Bedingungen bezüglich Einwirkzeit, Temperatur, Stämmen und Belastungssubstanzen bestimmt werden.			

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Eine Prüfsuspension von Bakterien oder Pilzen in einer Lösung von Belastungssubstanzen wird auf eine Prüfoberfläche aus nichtrostendem Stahl abgeimpft und getrocknet. Eine zubereitete Probe des zu prüfenden Produkts wird so aufgebracht, dass sie den trockenen Film bedeckt. Die Oberfläche wird eine bestimmte Zeit auf einer festgelegten Temperatur gehalten. Die Oberfläche wird auf ein zuvor validiertes Neutralisationsmedium übertragen, so dass die Wirkung des Desinfektionsmittels sofort neutralisiert wird. Die Anzahl überlebender Keime, die von der Oberfläche rückgewonnen werden kann, wird quantitativ bestimmt.

Die Anzahl der Bakterien oder Pilze auf einer Oberfläche, die anstelle des Desinfektionsmittels mit Wasser standardisierter Härte behandelt wurde, wird ebenfalls bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahlen in Abhängigkeit vom Produkt wird durch Differenzbildung berechnet.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die bakterizide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden vier Stämme bewertet werden:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442¹;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538;
- *Enterococcus hirae* ATCC 10541;
- *Escherichia coli* ATCC 10536.

Die fungizide oder levurozide Wirkung muss mit den folgenden zwei Stämmen bewertet werden:

1 ATCC 15442, ATCC 6538, ATCC 10541, ATCC 10536, ATCC 10231, ATCC 16404 und ATCC 13311 sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von der American Type Culture Collections vertrieben werden. Diese Information dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte können verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

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

Falls für spezifische Anwendungen erforderlich, dürfen zusätzliche Stämme gewählt werden, zum Beispiel:

- *Salmonella typhimurium* ATCC 13311;
- *Lactobacillus brevis* DSM 6235;
- *Enterobacter cloacae* DSM 6234;
- *Saccharomyces cerevisiae* (für Brauereien) oder ATCC 9763 oder DSM 1333;
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (für Brauereien) DSM 70487.

ANMERKUNG Bezüglich der entsprechenden Stammsammlungsnummern in einigen anderen Kultursammlungen siehe Anhang A.

Wenn zusätzliche Stämme verwendet werden, müssen sie unter optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Zeit, Atmosphäre) bebrütet und im Prüfbericht vermerkt werden.

Wenn die ausgewählten zusätzlichen Stämme nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss ihre Eignung zur Bereitstellung der erforderlichen Impfkulturen verifiziert werden. Wenn diese geprüften zusätzlichen Stämme nicht durch ein Referenzzentrum klassifiziert wurden, müssen ihre Identifikationsmerkmale angegeben werden. Zusätzlich müssen sie fünf Jahre von dem Prüflabor oder der nationalen Kultursammlung als Referenzprobe aufbewahrt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Die Reagenzien müssen von analytischer Qualität und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frei von toxischen oder für Bakterien und Pilze hemmenden Substanzen sein. Es muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes Wasser und darf kein demineralisiertes Wasser sein.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven (siehe 5.3.2.1).

ANMERKUNG 1 Falls das Wasser während der Sterilisation der Reagenzien mitsterilisiert wird, ist dies nicht erforderlich.

ANMERKUNG 2 Falls destilliertes Wasser geeigneter Qualität nicht zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionszwecke (siehe Europäisches Arzneibuch) verwendet werden.

5.2.2.3 Trypton-Soja-Agar (TSA)

Für die Erhaltung von Bakterienstämmen und die Durchführung von Lebendkeimzählungen.

Trypton, pankreatisch verdautes Casein	15,0 g
Sojapepton, papainisch verdautes Sojabohnenmehl	5,0 g
NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (siehe 5.2.2.2)	1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven (siehe 5.3.2.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums $7,2 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei 20 °C.

5.2.2.4 Malzextrakt-Agar (MEA)

Für die Erhaltung von Pilzstämmen, die Sporenbildung und die Durchführung von Lebendkeimzählungen.

Malzextrakt (in Lebensmittelqualität), z. B. Cristomalzpulver von Difal	30,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (siehe 5.2.2.2)	1 000,0 ml

Der Malzextrakt sollte Lebensmittelqualität (z. B. Cristomalzpulver von Difal) haben oder dieser entsprechen, d. h. nicht stark gereinigt sein und nicht nur auf Maltose basierend (z. B. Malzextrakt von OXOID)². Sollte es jedoch Probleme geben, so sind mindestens 75 % stachelige Sporen herzustellen, siehe 5.4.1.4.2.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums $5,6 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei (20 ± 1) °C.

Falls Probleme mit der Neutralisation (5.5.2.3 und 5.5.2.4) auftreten, kann es notwendig sein, Neutralisationsmedium zum MEA zuzugeben. Anhang B enthält eine Anleitung über die Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen.

5.2.2.5 Verdünnungsmittel

Tryptonnatriumchloridlösung:

Trypton, pankreatisch verdautes Casein	1,0 g
NaCl	8,5 g
Wasser (siehe 5.2.2.2)	1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven (siehe 5.3.2.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert $7,0 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei 20 °C.

5.2.2.6 Neutralisationsmedium

Das Neutralisationsmedium muss für das zu prüfende Produkt nach 5.5.2.3 und 5.5.2.4 validiert sein. Das Neutralisationsmedium muss steril sein.

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

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte für die Verdünnung der Produkte

Wasser standardisierter Härte für die Verdünnung der Produkte muss wie folgt hergestellt werden:

- Lösung A: 19,84 g wasserfreies Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g wasserfreies Calciumchlorid (CaCl_2) werden in Wasser (siehe 5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.19) oder im Autoklaven (5.3.2.1 a). Die Sterilisation im Autoklaven, falls angewendet, kann zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung ist im Kühlschrank (5.3.2.15) nicht länger als einen Monat aufzubewahren.

2 Diese Information dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu identischen Ergebnissen führen.

- Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (siehe 5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml verdünnt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.19). Die Lösung ist im Kühlschrank (5.3.2.15) nicht länger als eine Woche aufzubewahren.

Zu 6,0 ml Lösung A, die sich in einem 1 000-ml-Messkolben befindet, werden mindestens 600 ml Wasser (siehe 5.2.2.2) hinzugegeben, dann werden 8,0 ml Lösung B hinzugefügt. Es wird gemischt und mit Wasser (siehe 5.2.2.2) auf 1 000 ml verdünnt.

Die Sterilisation erfolgt durch Hindurchleiten durch einen Filter mit einer maximalen effektiven Porengröße von 0,45 μm .

Bei einer Messung bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.6) muss der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte $7,0 \pm 0,2$ betragen. Erforderlichenfalls wird der pH-Wert unter Verwendung einer Lösung mit etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt.

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

ANMERKUNG Wenn die Produktprüflösungen (5.4.2) hergestellt werden, führt die Zugabe des Produkts zu diesem Wasser standardisierter Härte zu einer Änderung der in Form von Calciumcarbonat (CaCO_3) angegebenen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte unter 375 mg/l Calciumcarbonat.

5.2.2.8 Belastungssubstanzen

5.2.2.8.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz muss nach den Anwendungsbedingungen, die für das Produkt festgelegt wurden, ausgewählt werden.

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem 2-Fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

Für die zusätzlichen Belastungssubstanzen müssen die Ionen-Zusammensetzung (z. B. pH-Wert, Calcium- und/oder Magnesiumhärte) und chemische Zusammensetzung (z. B. mineralische Substanzen, Protein, Kohlenhydrate, Lipide, Detergenzien) vollständig definiert werden.

ANMERKUNG Der Begriff „Belastungssubstanz“ wird nur verwendet, wenn diese mehr als eine Substanz enthält.

Das Verfahren der Herstellung und Sterilisation sowie die Zusammensetzung müssen im Prüfbericht vermerkt werden (siehe 5.7).

5.2.2.8.2 Rinderserumalbumin-Lösungen

Rinderserumalbumin-Lösungen für die Prüfbedingungen müssen wie folgt hergestellt werden:

- Herstellung für niedrige Belastungen:
 - 0,06 g Rinderserumalbumin (Cohn-Fraktion V für Dubos-Medium) werden in 100 ml Wasser (siehe 5.2.2.2) aufgelöst;
 - Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (siehe 5.3.2.19) mit einer Porenweite von 0,45 μm ; die Lösung ist im Kühlschrank aufzubewahren und innerhalb eines Monats zu verwenden.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins beträgt im Prüfverfahren (siehe 5.5.2) 0,3 g/l.

- Herstellung für hohe Belastungen:

- 0,6 g Rinderserumalbumin (Cohn-Fraktion V für Dubos-Medium) werden in 100 ml Wasser (siehe 5.2.2.2) aufgelöst;
- Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (siehe 5.3.2.19) mit einer Porenweite von 0,45 µm; die Lösung ist im Kühlschrank aufzubewahren und innerhalb eines Monats zu verwenden.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins beträgt im Prüfverfahren (siehe 5.5.2) 3,0 g/l.

5.2.2.8.3 Milch (Molkereien)

Magermilchpulver, garantiert frei von Antibiotika oder Zusatzstoffen, muss im Verhältnis von 100 g Pulver je Liter Wasser (siehe 5.2.2.2) rekonstituiert werden. Die Gebrauchslösung muss wie folgt hergestellt werden:

- es wird eine Lösung mit einer Volumenkonzentration von 2,0 % in Wasser (siehe 5.2.2.2) durch Zugabe von 2 Teilen rekonstituierter Milch zu 98 Teilen Wasser hergestellt;
- es wird 30 min bei $(105 \pm 3)^\circ\text{C}$ (oder 5 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$) sterilisiert.

Die Endkonzentration der rekonstituierten Milch sollte bei der Prüfung (siehe 5.5.2) 1,0 % Volumenkonzentration oder während der Prüfung 1 g/l Milchpulver betragen.

5.2.3 Prüfoberfläche

Als Prüfoberfläche werden Scheiben (2 cm Durchmesser) aus nichtrostendem Stahl (AISI 304) mit einer Oberflächengüte der Qualität 2b auf beiden Seiten verwendet. Die Oberflächen sollten eben sein.

Die Oberflächen sollten nur einmal benutzt werden.

Vor der Anwendung sollten der Oberflächen für 60 min in ein Becherglas (Mindestvolumen: 50 ml) gegeben werden, das nicht weniger als 20 ml Decon^{®3} mit einer Volumenkonzentration von 5 % enthält. Die Scheiben werden danach sofort 10 s mit frischem fließendem destilliertem Wasser gespült.

Die Oberfläche darf nicht austrocknen. Die Scheiben dürfen nur mit einer Pinzette angefasst werden. Die Scheiben werden weitere 10 s mit Wasser (siehe 5.2.2.2) gespült, um eine vollständige Entfernung des oberflächenaktiven Detergens sicherzustellen. Um einen ausreichenden Wasserstrom zu erreichen, kann ein Druckgefäß mit geeignetem Schlauch und Verbindungen oder ein anderes geeignetes Verfahren zur Lieferung einer sterilisierten Flüssigkeit verwendet werden, mit dem die Zufuhr auf etwa 2 000 ml je min eingestellt werden kann. Für die Sterilisation wird die saubere Scheibe für 15 min in ein Bad mit einer Volumenkonzentration von 70 % Isopropanol gegeben. Die Scheibe wird herausgenommen und mittels Verdunstung in einem laminaren Luftstrom getrocknet.

5.3 Geräte und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme steril gelieferter Geräte 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) in einem Autoklaven (siehe 5.3.2.1) bei $121_0^{+3}^\circ\text{C}$ für eine Haltezeit von mindestens 15 min;
- b) in einem Heißluft-Sterilisator (siehe 5.3.2.1) bei 180°C für eine Haltezeit von mindestens 30 min, bei 170°C für eine Haltezeit von mindestens 1 h oder bei 160°C für eine Haltezeit von mindestens 2 h.

3 Decon[®] ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung⁴, insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Sterilisatoren

- a) zur Sterilisation durch Dampf ein Autoklav, der 15 min bei einer Temperatur von 121_0^{+3} °C gehalten werden kann;
- b) zur Behandlung mit trockener Hitze ein Heißluft- bzw. Warmluftofen, der für eine Haltezeit von mindestens 30 min bei 180 °C, für eine Haltezeit von mindestens 1 h bei 170 °C oder für eine Haltezeit von mindestens 2 h bei 160 °C gehalten werden kann.

5.3.2.2 Temperaturgeregelter Kammer, die auf Prüftemperaturen ($\theta \pm 1$) °C einstellbar ist.

5.3.2.3 Wasserbäder, einstellbar auf eine Temperatur von (20 ± 1) °C, (45 ± 1) °C und auf zusätzliche Prüftemperaturen $\theta \pm 1$ °C (siehe 5.5.1).

5.3.2.4 Brutschrank (für bakterizide Wirkung), einstellbar auf eine Temperatur von entweder (36 ± 1) °C oder (37 ± 1) °C. Ein Brutschrank mit einer Einstelltemperatur von (37 ± 1) °C darf verwendet werden, falls einer mit einer Betriebstemperatur von (36 ± 1) °C nicht zur Verfügung steht.

5.3.2.5 Brutschrank (für fungizide oder levurozide Wirkung), einstellbar auf (30 ± 1) °C.

5.3.2.6 pH-Messgerät, mit einer Fehlergrenze der Kalibrierung von 0,1 pH-Einheiten bei (20 ± 1) °C.

5.3.2.7 Stoppuhr.

5.3.2.8 Schüttelmischer (mechanische Schüttelvorrichtung oder elektromechanisches Rührgerät, z. B. Vortex[®]-Mischer⁵).

5.3.2.9 Behälter: Reagenzgläser, Kulturflaschen oder Kolben mit geeignetem Nennvolumen.

5.3.2.10 Messpipetten mit Nennvolumina von 10 ml, 1 ml, 0,1 ml und 0,05 ml oder kalibrierte automatische Pipetten.

5.3.2.11 Petrischalen in den Größen 90 mm bis 100 mm.

5.3.2.12 Glasperlen (Durchmesser: ≤ 5 mm).

5.3.2.13 Messkolben.

5.3.2.14 Mechanisches Schüttelgerät.

5.3.2.15 Kühlschrank, einstellbar auf eine Temperatur von 2 °C bis 8 °C.

5.3.2.16 Pinzette.

5.3.2.17 Mikrobiologische Sicherheitswerkbank mit gefilterter laminarer Luftströmung.

5.3.2.18 Glasfilterfritte: Porengröße von 40 µm bis 100 µm nach ISO 4793.

5.3.2.19 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem Material, das mit den zu filtrierenden Substanzen verträglich ist.

⁴ Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

⁵ Vortex[®] ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

Das Gerät muss mit einem Filterhalter von mindestens 50 ml Volumen ausgestattet sein. Es muss geeignet sein zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porengröße von 0,45 µm für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7).

5.3.2.20 Vakuum-Exsikkator, *Exsikkator* mit einem aktiven Trocknungsmittel. Die Vakuumquelle darf eine Pumpe oder eine zentrale Vorrichtung sein und sollte ein Vakuum von 20 mmHg bis 25 mmHg erzielen (508 Torr bis 635 Torr; 677 mbar bis 847 mbar; 68 000 Pa bis 85 000 Pa; Umrechnungstabellen für andere Einheiten sind im Internet leicht zu finden).

5.4 Herstellung der Prüforganismus-Suspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüforganismus-Suspensionen

5.4.1.1 Stammkulturen von Prüforganismen

Stammkulturen müssen nach den Anforderungen der EN 12353 aufbewahrt werden.

5.4.1.2 Gebrauchskulturen von Prüforganismen

a) Bakterien:

Um die Gebrauchskultur des Prüforganismus herzustellen, wird von der Stammkultur (siehe 5.4.1.1) eine Subkultur durch Ausstrich auf TSA-Schrägagar (siehe 5.2.2.3) angelegt und bebrütet (siehe 5.3.2.4). Nach 18 h bis 24 h wird eine zweite Subkultur aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise angelegt und 18 h bis 24 h bebrütet. Aus dieser zweiten Subkultur darf eine dritte Subkultur auf gleiche Weise angelegt werden.

ANMERKUNG 1 Die zweite und/oder dritte Subkultur sind die Gebrauchskulturen.

Falls die Anlegung einer zweiten Subkultur an einem bestimmten Tag nicht möglich ist, darf eine 48-h-Subkultur für die weitere Subkultivierung verwendet werden, vorausgesetzt, dass die Subkultur über eine Dauer von 48 h im Brutschrank aufbewahrt wurde. Unter diesen Umständen wird nach dem Fortfahren eine weitere 24-h-Subkultur angelegt. Eine vierte Subkultur ist nicht gestattet.

Für zusätzliche Stämme (siehe 5.2.1) muss jede Abweichung von diesem Verfahren der Kultivierung der Bakterien oder von der Herstellung der Suspensionen unter Angabe der Gründe im Prüfbericht angegeben werden.

b) Pilze:

Um die Gebrauchskultur von *Candida albicans* herzustellen, wird von der Stammkultur (siehe 5.4.1.1) eine Subkultur durch Ausstrich auf MEA-Schrägagar (siehe 5.2.2.4) angelegt und bebrütet (siehe 5.3.2.5). Nach 42 h bis 48 h wird eine zweite Subkultur aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise angelegt und 42 h bis 48 h bebrütet. Aus dieser zweiten Subkultur darf eine dritte Subkultur auf gleiche Weise angelegt werden.

ANMERKUNG 2 Die zweite und/oder dritte Subkultur sind die Gebrauchskulturen.

Bei *Aspergillus brasiliensis* (5.2.1) wird nur die erste Subkultur, die auf MEA (5.2.2.4) in Petrischalen oder Kolben mit belüfteten Kappen (5.3.2.17) angelegt wurde, verwendet und 7 Tage bis 9 Tage bei $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ bebrütet. Das Anlegen weiterer Subkulturen ist nicht erforderlich. Um eine gleichmäßige Temperaturverteilung zu verbessern, dürfen die Petrischalen während der Bebrütung nicht übereinander gestapelt werden.

Nach Ablauf der Bebrütung müssen alle Kulturen eine dunkelbraune oder schwarze Oberfläche aufweisen. Kulturen, die vereinzelte, kleine weiße oder graue Flächen aufweisen, können belassen werden.

5.4.1.3 Prüfsuspensionen

a) Bakterien-Prüfsuspension:

10 ml Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.5) werden mit 5 g Glasperlen (siehe 5.3.2.12) in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Von der Gebrauchskultur (siehe 5.4.1.2) werden Zellen ösenweise in das Verdünnungsmittel überführt. Die Suspension der Zellen sollte erfolgen, indem die Öse in das Verdünnungsmittel eingetaucht und an der Wand des Kolbens gerieben wird, um die Zellen abzulösen. Unter Verwendung eines mechanischen Schüttelgeräts (siehe 5.3.2.14) wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in einen anderen Kolben überführt. Die Zellzahl in der Suspension wird auf $1,5 \times 10^8$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml eingestellt.

Die Anzahl der Einheiten muss mit einem Spektralphotometer oder einem anderen geeigneten Verfahren geschätzt werden. Diese Suspension ist im Wasserbad bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden.

b) Pilz-Prüfsuspension:

1) *Candida albicans*:

10 ml Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.5) werden mit 5 g Glasperlen in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Von der Gebrauchskultur (siehe 5.4.1.2) werden Zellen ösenweise in das Verdünnungsmittel überführt. Die Suspension der Zellen sollte im Verdünnungsmittel erfolgen, indem die Öse in das Verdünnungsmittel eingetaucht und an der Wand des Kolbens gerieben wird, um die Zellen abzulösen. Unter Verwendung eines mechanischen Schüttelgeräts (5.3.2.14) wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in einen anderen Kolben überführt. Die Zellzahl in der Suspension wird für Prüfungen unter Bedingungen hoher Belastung mit dem Verdünnungsmittel auf $1,5 \times 10^7$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^7$ KBE/ml eingestellt; die Anzahl der Einheiten wird mit einem Spektralphotometer oder einem anderen geeigneten Verfahren geschätzt. Diese Suspension ist im Wasserbad bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden.

2) *Aspergillus brasiliensis*:

Die Zellen der Gebrauchskultur (siehe 5.4.1.2) werden in 10 ml einer sterilen Polysorbat 80⁶-Lösung mit einer Massenkonzentration von 0,05 % in Wasser (siehe 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 zusammen mit Glasperlen (siehe 5.3.2.12) eine Minute von Hand leicht geschüttelt. Die Suspension wird durch eine Glasfilterfritte (siehe 5.3.2.18) filtriert.

Unmittelbar nach der Herstellung der Prüfsuspension wird eine mikroskopische Untersuchung mit einer 400fachen Vergrößerung durchgeführt, um Folgendes aufzuzeigen:

- das Vorhandensein einer hohen Konzentration (mindestens 75 % stachelige Sporen) an charakteristischen reifen Conidiosporen, d. h. stachelige Sporen (im Vergleich zu glatten Sporen);
- das Fehlen von Sporenkeimung (mindestens 10 Sichtfelder sind zu überprüfen);
- das Fehlen von Myzelfragmenten (mindestens 10 Sichtfelder sind zu überprüfen).

Falls gekeimte Sporen vorliegen, ist die Suspension zu verwerfen.

Bei Vorhandensein von Myzelien ist mit einer zweiten Filtration durch einen Glasfritte fortzufahren.

6 Analytische Qualität, nicht hydrolysiert, entsprechend dem Europäischen Arzneibuch (European Pharmacopoeia), Band 1. TWEEN 80[®] ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

Sollten noch immer Myzelien vorhanden sein, ist die Suspension zu verwerfen.

Sollte ein Anteil von 75 % stacheliger Sporen nicht erreicht werden, kann es an der verwendeten *Aspergillus brasiliensis*-Kultur oder den zur Herstellung der Sporen verwendeten Medien liegen. In diesem Fall ist es notwendig, die Kultur aus einer anderen Kultursammlung zu beziehen und/oder MEA von einem anderen Lieferanten zu verwenden.

Mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.5) wird die Anzahl der Sporen in der Suspension auf $1,5 \times 10^7$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^7$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mittels eines geeigneten Verfahrens geschätzt wird. Die Suspension ist innerhalb von 4 h zu verwenden, wobei diese in einem geregelten Wasserbad konstant bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.3) zu halten ist. In jedem Fall wird die Temperatur erst unmittelbar vor Beginn der Prüfung (5.5.2) nach 5.5.1 eingestellt.

Die Verwendung einer Zellszählvorrichtung zur Einstellung der Zellzahl wird dringend empfohlen. Wird eine geeignete Zählkammer angewendet, sind die Anweisungen genau einzuhalten.

Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.5) Verdünnungen von 10^{-5} und 10^{-6} hergestellt. Es wird durchmischt (5.3.2.8).

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

- a) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird etwa eine Hälfte jeder 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt (d. h. als Doppelbestimmung = vier Platten) und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlter MEA (5.2.2.4) hinzugefügt.
- b) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird etwa ein Viertel jeder 1,0-ml-Probe auf einer geeigneten Anzahl (mindestens vier) an der Oberfläche getrockneter MEA-Platten (5.2.2.4) ausgestrichen (d. h. als Doppelbestimmung = mindestens acht Platten).

Die Prüfsuspension darf nicht länger als 2 Tage bei 2°C bis 8°C aufbewahrt werden.

Die Prüfsuspension muss unmittelbar vor Gebrauch geschüttelt (siehe 5.3.2.8) werden, um die Sporen wieder in Suspension zu bringen.

5.4.1.4 Auszählen der Bakterien- und Pilz-Prüfsuspensionen

Die eingestellten Bakterien-Suspensionen (siehe 5.4.1.3) werden (mittels Reihenverdünnungen) auf 10^{-6} und 10^{-7} verdünnt und die eingestellten Hefe- und Schimmelpilzsporen-Suspension (siehe 5.4.1.3) wird mit dem Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.5) auf 10^{-5} und 10^{-6} verdünnt. Die Suspension wird gemischt (siehe 5.3.2.8).

Eine Probe von 1,0 ml jeder Verdünnung wird als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplattenverfahren abgeimpft. Jede der 1,0-ml-Proben wird in gesonderte Petrischalen (siehe 5.3.2.11) pipettiert; dann wird für die Bakterien 15 ml bis 20 ml geschmolzener TSA (siehe 5.2.2.2) und für die Pilze 15 ml bis 20 ml geschmolzener MEA (siehe 5.2.2.3), die jeweils auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurden, zugegeben. Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe – aufgeteilt in etwa gleiche Anteile – auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) an der Oberfläche getrockneter Platten, die TSA oder MEA enthalten, ausgestrichen.

- a) Auszählen der Bakterien-Prüfsuspensionen

Für die Bakterienstämme werden die Platten bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 18 h bis 24 h bebrütet. Platten, die aus irgendeinem Grund nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt, und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wird bestimmt. Die Platten werden weitere 18 h bis 24 h bebrütet. Platten, die keine auszählbaren Mengen an Kolonien mehr aufweisen, sind nicht erneut auszuzählen. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt.

- b) Auszählen der Pilz-Prüfsuspensionen

Für die Pilzstämme werden die Platten bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 18 h bis 24 h (*Candida albicans*) oder für 42 h bis 48 h (*Aspergillus brasiliensis*) bebrütet. Platten, die aus irgendeinem Grund nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt, und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wird bestimmt. Die Platten werden weitere 18 h bis 24 h bebrütet. Platten, die keine gut voneinander abgesetzten Kolonien mehr aufweisen, sind nicht erneut auszuzählen. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt. Bei *Aspergillus brasiliensis* wird weitere 20 h bis 24 h bebrütet und erforderlichenfalls weitere 20 h bis 24 h, vorausgesetzt, die Anzahl der zählbaren Kolonien (einzeln abgesetzte Kolonien) nimmt zu.

Es wird die höchste Anzahl von Kolonien für jede 1-ml-Probe bestimmt.

Bezüglich der Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.5.

5.4.1.5 Auszählung des gewichteten Mittelwertes der Prüfsuspensionen

- a) Platten, die aus irgendeinem Grund nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt, und die Gesamtanzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wird bestimmt. Platten, die keine gut voneinander abgesetzten Kolonien mehr aufweisen, sind nicht erneut auszuzählen. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt. Falls sich die Anzahl erhöht hat, wird für die weitere Auswertung nur die höhere Zahl verwendet.
- b) Für die Berechnung der Ergebnisse werden nur die Platten berücksichtigt, die eine Kolonienzahl im Bereich von 15 bis 300 für Bakterien und Hefen und von 15 bis 150 für Schimmelpilze aufweisen. Eine Abweichung von 10 % ist zulässig, so dass die Grenzwerte 14 und 330 für Bakterien und Hefen und 14 bis 165 für Schimmelpilze betragen.

$$N = \text{Log} \frac{0,025 \times c}{(n_1 + 0,1n_2) \times d} \quad (1)$$

Dabei ist

c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;

n_1 die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung, z. B. bei 10^{-6} , berücksichtigten V_c -Werte;

n_2 die Anzahl der bei der stärkeren Verdünnung, z. B. bei 10^{-7} , berücksichtigten V_c -Werte;

d der Verdünnungsfaktor für die betrachtete geringere Verdünnung, z. B. 10^{-6} .

5.4.2 Produktprüflösungen

Es müssen alle Einzelheiten der Produktproben im Lieferzustand aufgezeichnet werden.

Produktprüflösungen müssen in Wasser standardisierter Härte (siehe 5.2.2.7) in mindestens drei verschiedenen Konzentrationen hergestellt werden, um eine Konzentration im wirksamen und eine im unwirksamen Bereich zu erfassen.

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand aufgelöst, indem mindestens $1\text{ g} \pm 10\text{ mg}$ in einem Messkolben eingewogen und mit Wasser standardisierter Härte (siehe 5.2.2.7) verdünnt wird. Die folgenden Verdünnungen müssen in Messkolben (siehe 5.3.2.13) auf der Basis von Volumenanteilen in Wasser standardisierter Härte (siehe 5.2.2.7) hergestellt werden.

Bei flüssigen Produkten müssen Verdünnungen des Produkts mit Wasser standardisierter Härte (siehe 5.2.2.7) auf der Basis von Volumenanteilen in Messkolben (siehe 5.3.2.13) hergestellt werden.

Ein Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden. Bei gebrauchsfertig gelieferten Produkten muss Wasser (siehe 5.2.2.2) für die Herstellung von Verdünnungen verwendet werden.

Bei einer Verdünnung des Produkts in Wasser standardisierter Härte muss sich eine physikalisch homogene stabile Zubereitung ergeben.

Die Produktprüflösung und deren Verdünnungen müssen frisch hergestellt und innerhalb von 2 h verwendet werden.

Die im Prüfbericht aufgeführte Produktkonzentration muss die Prüfkonzentration sein. Die Prüfkonzentration ist als Volumenkonzentration oder als Massenkonzentration anzugeben.

5.5 Verfahrensablauf

5.5.1 Auswahl der Versuchsbedingungen

Die Auswahl von Einwirktemperatur, Einwirkzeit und Belastungssubstanzen muss nach dem für das Produkt vorgesehenen praktischen Gebrauch (siehe Abschnitt 4, Tabelle 1) wie folgt vorgenommen werden:

a) Prüftemperatur, θ (°C):

- 1) Die Prüftemperaturen müssen im Bereich von (4 ± 1) °C bis (40 ± 1) °C liegen. Für Temperaturen abweichend von der Umgebungstemperatur sollte eine temperaturgeregelte Kammer verwendet werden. Für Prüfungen, die bei Raumtemperatur durchgeführt werden, muss der Bereich zwischen 18 °C und 25 °C liegen.

b) Einwirkzeit, t (min):

- 1) Die Einwirkzeiten müssen im Bereich von 1 min bis 5 min (± 5 s) in 1-min-Schritten und von 5 min bis 60 min (± 10 s) in 5-min-Schritten liegen.

c) Stämme:

- 1) Es müssen die unter 5.2.1 aufgeführten Prüforganismen verwendet werden.

d) Im Fall von Belastungssubstanzen:

- 1) Die zu prüfende Belastungssubstanz ist 0,3 g/l Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2) unter Bedingungen niedriger Belastung (5.2.2.8.2) oder 3,0 g/l Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2) unter Bedingungen hoher Belastung nach Abschnitt 4, Tabelle 1, entsprechend den praktischen Anwendungen;
- 2) Für Molkereianwendungen sollte Magermilch verwendet werden (siehe 5.2.2.8.3).

Das Produkt darf unter den verwendeten Versuchsbedingungen keinen sichtbaren Niederschlag bilden.

5.5.2 Prüfablauf

5.5.2.1 Prüfung „Na“ — Bestimmung der mikrobiziden Konzentrationen

Die mikrobiziden Konzentrationen werden wie folgt bestimmt:

- a) Zur Herstellung der mikrobiellen Prüfsuspension wird 1,0 ml der Belastungssubstanz (5.2.2.8) in ein Reagenzglas pipettiert. 1,0 ml der Prüfsuspension (5.4.1.3) wird hinzugefügt. Danach wird sofort die Stoppuhr gestartet, es wird durchmischt und das Reagenzglas für $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in einem Wasserbad oder einer Kammer mit Temperaturregelung (5.3.2.2) angeordnet, das/die auf die ausgewählte Prüftemperatur θ °C ± 1 °C eingestellt ist.

Unmittelbar vor der Zugabe sollte die Prüfsuspension gut gemischt werden, um die Keime wieder vollständig zu suspendieren.

- b) Die Prüfoberflächen (5.2.3) werden in eine sterile Petrischale gegeben, wobei sicherzustellen ist, dass sich die Schale in horizontaler Lage befindet. Die Prüfoberflächen werden durch Abimpfen von 0,05 ml der mikrobiellen Prüfsuspension [(5.5.2.1 a)] auf jede Prüfoberfläche hergestellt (siehe Bild 1). Die Oberflächen werden bei 37 °C getrocknet, bis sie sichtbar trocken sind (siehe Bild 2). Es wird davon ausgegangen, dass das Trocknen der Prüfoberflächen aufgrund der Umgebungsbedingungen im Labor und der Bauweise des Brutschranks (z. B. mit oder ohne Ventilator) unterschiedlich schnell erfolgt. Alternativ werden die Oberflächen zum Trocknen in einer offenen Petrischale, mit der beimpften Seite nach oben bei 18 °C bis 25 °C maximal 60 min in einem Vakuum-Exsikkator angeordnet.

Es ist sicherzustellen, dass die Petrischale teilweise geöffnet ist, indem ihr Deckel leicht gegenüber der Mittelposition verschoben wird. Es ist darauf zu achten, dass der Exsikkator ordnungsgemäß abgedichtet ist. Der Ausgang des Exsikkators wird an eine Vakuumquelle angeschlossen und die Evakuierung wird begonnen, um ein Vakuum von 20 mmHg bis 25 mmHg (508 Torr bis 635 Torr; 677 mbar bis 847 mbar; 68 000 Pa bis 85 000 Pa; Umrechnungstabellen für andere Einheiten sind im Internet zu finden) zu erreichen.

Aus diesem Grund wird keine Zeitdauer angegeben und die Mindestzeit, die erforderlich ist, bis die Oberflächen sichtbar trocken sind, sollte für jedes Labor individuell festgelegt werden. Die Trocknungszeit sollte 60 min nicht überschreiten. Den Prüfoberflächen ist zu ermöglichen, dass sie sich auf die ausgewählte Prüftemperatur ($\theta \pm 1$) °C einstellen.

In Anhang F (informativ) ist ein spezifisches Verfahren zur Überwachung des Trocknungsprozesses von empfindlichen Organismen (z. B. *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*) angeführt, das angewendet werden kann, um eine hinreichende Anzahl überlebender Zellen zu erhalten.



Bild 1 — Beimpfter Träger



Bild 2 — Sichtbar getrocknete Impfkultur

- c) 0,1 ml jeder zu untersuchenden Produktprüflösung (5.4.2) wird auf gesonderte getrocknete Oberflächen pipettiert, wobei sicherzustellen ist, dass die getrocknete Impfkultur vollständig mit dem Prüfprodukt bedeckt ist. Die Oberflächen werden in eine temperaturgeregelte Kammer (5.3.2.2) eingebracht, die auf die ausgewählten Werte für Prüftemperatur θ °C $\pm$ 1 °C und Einwirkzeit t eingestellt ist (siehe Bild 3).



Bild 3 — Auf beimpften Keimträger aufgebrachtes Produkt

- d) Am Ende der festgelegten Einwirkdauer t wird jede der Oberflächen (N_a) in einen gesonderten Behälter überführt, der 10 ml des Neutralisationsmediums (5.2.2.6) sowie so viele Glasperlen (z. B. 5 g) enthält, dass die jeweilige Prüffläche auf den Perlen aufliegt. Die Oberflächen sollten mit der beimpften Oberfläche nach unten so eingebracht werden, dass sie die Glasperlen berühren. Die Behälter werden mindestens 1 min geschüttelt. Das Schütteln sollte so intensiv erfolgen, dass eine ständige Bewegung der beimpften Prüfflächen über die Glasperlen sichergestellt ist. Nach einer Neutralisationszeit von $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ wird eine Reihe von 10fachen Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-2} der neutralisierten Mischung in dem Verdünnungsmittel (5.2.2.5) hergestellt. Eine 1,0 ml-Probe von der neutralisierten Mischung und von jeder der Verdünnungen wird als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplattenverfahrens oder des Oberflächenverfahrens abgeimpft.
- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen pipettiert, und für die Bakterien werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter TSA (5.2.2.3) und für die Pilze 15 ml bis 20 ml verflüssigter MEA (5.2.2.4), jeweils auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt, zugegeben.
 - 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe, aufgeteilt in etwa gleiche Anteile, auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) an der Oberfläche getrockneter Platten, die TSA (5.2.2.3) enthalten, ausgestrichen.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.

- e) Die Prüfoberfläche (N_t s) wird herausgenommen, das Neutralisationsmedium wird abtropfen gelassen und die Prüfoberfläche mit 10 ml Wasser (5.2.2.2) gespült. Die Prüfoberfläche wird in eine Petrischale mit 10 ml verfestigtem TSA (5.2.2.3) für Bakterien bzw. in eine Petrischale mit 10 ml verfestigtem MEA (5.2.2.4) für Pilze überführt und auf den Agar gelegt, wobei die Prüfseite nach oben weist. 10 ml TSA (5.2.2.3) und/oder MEA (5.2.2.4) werden geschmolzen, auf 45°C abgekühlt und dann hinzugegeben.
- f) Der in a) bis e) beschriebene Verfahrensablauf wird unter Verwendung der übrigen Produktprüflösungen zur gleichen Zeit durchgeführt.
- g) Der in a) bis f) beschriebene Verfahrensablauf wird unter Anwendung der übrigen obligatorischen und gegebenenfalls der übrigen zusätzlichen Versuchsbedingungen (5.5.1) durchgeführt.

5.5.2.2 Wasserkontrolle „A“

Der Ablauf zur Bestimmung der Wasserkontrolle ist wie folgt:

- a) Eine Prüfoberfläche (5.2.3) wird in eine sterile Petrischale gegeben, wobei sicherzustellen ist, dass sich die Schale in horizontaler Lage befindet. 0,05 ml der mikrobiellen Prüfsuspension [5.5.2.1 a)] werden auf die Prüfoberfläche abgeimpft. Die Oberfläche wird bei 37°C getrocknet, bis sie sichtbar trocken ist [5.5.2.1 b)].
- b) Für die Wasserkontrolle (A) wird 0,1 ml Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) oder Wasser (5.2.2.2) im Fall von gebrauchsfertigen Produkten auf die Prüfoberfläche pipettiert, wobei sicherzustellen ist, dass die getrocknete Impfkultur vollständig mit dem Wasser bedeckt ist. Die Prüffläche wird in eine temperaturge-regelte Kammer (5.3.2.2) eingebracht, die auf die ausgewählte Prüftemperatur $\theta \pm 1^\circ\text{C}$ eingestellt ist.
- c) Am Ende der festgelegten Einwirkdauer t wird die Oberfläche „A“ in einen Behälter überführt, der 10 ml des Neutralisationsmediums (5.2.2.6) sowie so viele Glasperlen (z. B. 5 g) enthält, dass die jeweilige Prüffläche auf den Perlen aufliegt. Die Oberflächen sollten mit der beimpften Oberfläche nach unten so eingebracht werden, dass sie die Glasperlen berühren. Die Behälter werden mindestens 1 min geschüttelt. Das Schütteln sollte so intensiv erfolgen, dass eine ständige Bewegung der beimpften Prüfflächen über die Glasperlen sichergestellt ist. Nach einer Neutralisationszeit von $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ wird eine Reihe von 10fachen Verdünnungen hergestellt. Für die Bakterienstämme werden Verdünnungen von 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} und für die Pilzstämme Verdünnungen von 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} hergestellt. Eine 1,0-ml-Probe dieser Verdünnungen wird als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplattenverfahrens oder des Oberflächenverfahrens abgeimpft.

- d) Die Prüfoberfläche („Nts“) wird herausgenommen, das Neutralisationsmedium wird abtropfen gelassen und die Prüfoberfläche mit 10 ml Wasser (5.2.2.2) gespült. Die Prüfoberfläche wird in eine Petrischale mit 10 ml verfestigtem TSA (5.2.2.3) für Bakterien bzw. in eine Petrischale mit 10 ml verfestigtem MEA (5.2.2.4) für Pilze überführt und auf den Agar gelegt, wobei die Prüfseite nach oben weist. 10 ml TSA (5.2.2.3) und/oder MEA (5.2.2.4) werden geschmolzen, auf 45 °C abgekühlt und dann hinzugegeben. Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.

5.5.2.3 Kontrolle des Neutralisationsmediums „B“ — Verifizierung des Nichtvorliegens einer Toxizität des Neutralisationsmediums

Das Nichtvorliegen einer Toxizität des Neutralisationsmediums wird wie folgt verifiziert:

- a) Eine beimpfte Prüfoberfläche wird hergestellt [5.5.2.1 a) und b)].
- b) 10 ml des Neutralisationsmediums (5.2.2.6) werden in einen Behälter pipettiert, der so viele Glasperlen enthält (z. B. 5 g), dass die jeweilige Prüfoberfläche auf den Perlen aufliegt. Dann werden 0,1 ml Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) oder Wasser (5.2.2.2) im Fall von gebrauchsfertigen Produkten hinzugefügt. Es wird gemischt und bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ einwirken gelassen.
- c) Nach Ablauf der Neutralisationsdauer wird die beimpfte und getrocknete Prüfoberfläche in den Behälter so überführt, dass die beimpfte Oberfläche nach unten zeigt und die Glasperlen (z. B. 5 g) berührt. Die Behälter werden mindestens 1 min geschüttelt. Das Schütteln sollte so intensiv erfolgen, dass eine ständige Bewegung der beimpften Prüfflächen über die Glasperlen sichergestellt ist.
- d) Für die Bakterienstämme werden Verdünnungen von 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} und für die Pilzstämme Verdünnungen von 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} hergestellt. Es wird eine Probe von 1,0 ml von jeder der Verdünnungen als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplattenverfahrens oder des Oberflächenverfahrens [5.5.2.2 d)] abgeimpft. Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.

5.5.2.4 Validierungsverfahren „C“ — Validierung des Verdünnungs-Neutralisationsverfahrens

Das Verdünnungs-Neutralisationsverfahren wird wie folgt validiert:

- a) Eine Prüfoberfläche wird hergestellt [5.5.2.1 a) und b)].
- b) 10 ml des Neutralisationsmediums (5.2.2.7) werden in einen Behälter pipettiert, der so viele Glasperlen enthält, dass die jeweilige Prüfoberfläche auf den Perlen aufliegt. Dann werden 0,1 ml der höchsten bei der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Produktkonzentration hinzugefügt. Es wird gemischt und bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ einwirken gelassen.
- c) Nach Ablauf der Neutralisationsdauer wird die beimpfte Prüfoberfläche in den Behälter so überführt, dass die beimpfte Oberfläche nach unten zeigt und die Glasperlen (z. B. 5 g) berührt. Die Behälter werden mindestens 1 min geschüttelt. Das Schütteln sollte so intensiv erfolgen, dass eine ständige Bewegung der beimpften Prüfflächen über die Glasperlen sichergestellt ist.
- d) Für die Bakterienstämme werden Verdünnungen von 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} und für die Pilzstämme Verdünnungen von 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} hergestellt. Es werden Proben von 1,0 ml von jeder der Verdünnungen als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplattenverfahrens oder des Oberflächenverfahrens abgeimpft.

5.5.3 Auszählen der Prüfmischungen

Für die Bakterienstämme werden die Platten bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 18 h bis 24 h bebrütet. Platten, die aus irgendeinem Grund nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt, und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wird bestimmt. Die Platten werden weitere 18 h bis 24 h bebrütet. Platten, die keine auszählbaren Mengen an Kolonien mehr aufweisen, sind nicht erneut auszuzählen. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt.