

DIN EN 13704

ICS 71.100.35

Entwurf

Einsprüche bis 2017-03-13
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 13704:2002-05

**Chemische Desinfektionsmittel –
Quantitativer Suspensionversuch zur Bestimmung der sporiziden Wirkung
chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie,
Haushalt und öffentliche Einrichtungen –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche und Englische Fassung prEN 13704:2017**

Chemical disinfectants –

Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas –

Test method and requirements (phase 2, step 1);

German and English version prEN 13704:2017

Désinfectants chimiques –

Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité sporicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité –

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

Version allemande et anglaise prEN 13704:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2017-01-13 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, 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 80 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 13704:2017) wurde von der Arbeitsgruppe 3 *Lebensmittelhygiene und Anwendung im Haushalt und öffentlichen Einrichtungen* (Sekretariat: Italien, UNI) des Technischen Komitees CEN/TC 216 *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika*, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird, unter Beteiligung deutscher Experten erarbeitet.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-02-03 AA *Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich (DTL)*, (Spiegelausschuss zu CEN/TC 216/WG 3) im DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN 13704 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 13704:2002-05 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Aufnahme von EN 14885 in die normativen Verweisungen;
- b) Abschnitt „Begriffe“ (3) überarbeitet (für die Anwendung des Dokumentes gelten die Begriffe nach EN 14885);
- c) Anforderungen (4) überarbeitet (Tabelle 1 „Mindestprüfungen und zusätzliche Prüfbedingungen“ neu aufgenommen);
- d) Abschnitt „Prüfverfahren“ (5) technisch überarbeitet;
- e) Anhang A (normativ) „Herstellung von *Bacillus*-Sporen-Stammsuspensionen“ überarbeitet;
- f) Anhang B (normativ) „Validierung des Verdünnungs-Neutralisations- und des Membranfiltrationsverfahrens“ überarbeitet;
- g) Anhang C (informativ) „Herstellung einer Stammlösung von *Clostridium sporogenes*-Sporen“ überarbeitet;
- h) Anhang F (informativ) „Beispiel für einen typischen Prüfbericht“ überarbeitet;
- i) Anhang G (informativ) „Referenzstämme in nationalen Sammlungen“ aktualisiert;
- j) Anhang H (informativ) „Informationen zur Anwendung und Interpretation von Europäischen Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ wurde gestrichen;
- k) Literaturhinweise aktualisiert;
- l) Norm redaktionell überarbeitet und den derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Chemische Desinfektionsmittel — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der sporiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)

Désinfectants chimiques — Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité sporicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité — Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1)

Chemical disinfectants — Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas — 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 2.8f

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Anforderungen	8
5 Prüfverfahren	8
5.1 Kurzbeschreibung	8
5.2 Materialien und Reagenzien	9
5.2.1 Prüforganismen	9
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	9
5.3 Geräte und Glasgeräte	11
5.3.1 Allgemeines	11
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laboratoriumsausrüstung) und im Besonderen die folgenden Geräte:	12
5.4 Herstellung der Sporensuspensionen und Prüflösungen	13
5.4.1 Sporensuspensionen	13
5.4.2 Produktprüflösung	14
5.5 Verfahren	15
5.5.1 Auswahl der Untersuchungsbedingungen	15
5.5.2 Prüfverfahren für die Bewertung der sporiziden Wirkung des Produktes	16
5.5.3 Validierung des Verdünnungs-Neutralisationsverfahrens und des Membranfiltrationsverfahrens	18
5.6 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse	18
5.6.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen und Prüfgemische	18
5.6.2 Berechnung	19
5.7 Verifizierung des Verfahrens	23
5.7.1 Allgemeines	23
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	24
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	24
5.7.4 Angabe der Ergebnisse	24
5.8 Schlussfolgerung	25
5.9 Prüfbericht	25
Anhang A (normativ) Herstellung von <i>Bacillus</i> -Sporen-Stammsuspensionen	27
A.1 Material und Reagenzien	27
A.1.1 Trypton-Glucose-Bouillon (TGB)	27
A.1.2 Hefeextrakt-Agar (MYA)	27
A.1.3 Zentrifuge mit einer Beschleunigung von 10 000 <i>g</i>	27
A.2 Herstellung der <i>Bacillus</i> -Sporen-Stammsuspension	27
Anhang B (normativ) Validierung des Verdünnungs-Neutralisations- und des Membranfiltrationsverfahrens	29
B.1 Kurzbeschreibung	29
B.2 Herstellung der Sporensuspension	29
B.3 Herstellung der Produktprüflösung	29

B.4	Prüfung zur Validierung	29
B.4.1	Verdünnungs-Neutralisationsverfahren	29
B.4.2	Membranfiltrationsverfahren	31
B.5	Validierung	33
Anhang C (informativ) Herstellung einer Stammlösung von <i>Clostridium sporogenes</i> -Sporen		34
C.1	Nährmedien und Reagenzien	34
C.1.1	Trypton-Bouillon (TB)	34
C.1.2	Trypton-Agar (TA)	34
C.1.3	Fleisch-Glucose-Hefe-Agar (MGYA)	34
C.1.4	Steriles Paraffin	35
C.2	Geräte und Glasgeräte	35
C.3	Herstellung von regenerierten Medien und Bebrütungsbedingungen	35
C.4	Herstellung einer <i>Clostridium</i> -Sporen-Stammsuspension	35
Anhang D (informativ) Neutralisationsmedien		36
Anhang E (informativ) Spülflüssigkeiten		37
Anhang F (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht		38
Anhang G (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen		40
G.1	<i>Bacillus subtilis</i>	40
G.2	<i>Bacillus cereus</i>	40
G.3	<i>Clostridium sporogenes</i>	40
Literaturhinweise		41

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 13704:2017) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 13704:2002 ersetzen.

Es wurde überarbeitet, um die Kontrollen zur Sporenanfälligkeit aufzunehmen, um besser die Durchführung der Sporenherstellung zu beschreiben und das Auszählen und die Darstellung der Ergebnisse mit den anderen aktuellen Normen des CEN/TC 216 zu harmonisieren.

In dieser Norm sind die Anhänge A und B normativ. Die Anhänge C, D, E, F und G sind informativ.

Einleitung

Diese Europäische Norm beschreibt ein Suspensionsprüfverfahren, mit dem festgestellt werden kann, ob ein chemisches Desinfektionsmittel für die in Abschnitt 1 beschriebenen Bereiche eine sporizide Wirkung aufweist oder nicht.

Dieses Verfahren ist ein Laborversuch und simuliert praxisnahe Anwendungsbedingungen. Die gewählten Bedingungen (Einwirkzeit, Temperatur, Organismen in Suspension 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 Untersuchungsbedingungen.

Die Bedingungen genügen den allgemeinen Ansprüchen und wurden so ausgewählt, dass sie einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten erlauben.

Unter besonderen Bedingungen können die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt jedoch abweichen. In diesem Fall sind zusätzliche Prüfbedingungen erforderlich.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren (Phase 2, Stufe 1) und die Mindestanforderungen an die sporizide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und in öffentlichen Einrichtungen fest, die mit Wasser standardisierter Härte eine homogene, physikalisch stabile Lösung ergeben. Ausgenommen davon sind Bereiche und Situationen mit medizinisch indizierter Desinfektion und Produkte, die auf lebenden Geweben benutzt werden, mit Ausnahme derjenigen für die Handhygiene in den oben angegebenen Bereichen.

Diese Europäische Norm gilt mindestens für den folgenden Anwendungsbereich:

a) Verarbeitung, Vertrieb und Verkauf von:

1) Lebensmitteln tierischer Herkunft:

- Milch und Milchprodukte;
- Fleisch und Fleischprodukte;
- Fisch, Meerestiere und daraus hergestellte Erzeugnisse;
- Eier und Eiprodukte;
- Tiernahrung;
- usw.;

2) Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft:

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

b) öffentliche Einrichtungen und Haushaltsbereiche:

- Verpflegungseinrichtungen;
- öffentliche Bereiche;
- öffentliche Verkehrsmittel;
- Schulen;
- Kindergärten;
- Geschäfte;
- Sportstätten;

- Abfallbehälter (Mülltonnen usw.);
- Hotels;
- Wohngebäude;
- klinisch nicht relevante Bereiche von Krankenhäusern;
- Büroräume;
- usw.;

c) andere industrielle Bereiche:

- Verpackungsmaterial;
- Biotechnologie (Hefe, Proteine, Enzyme usw.);
- Hersteller von Pharmazeutika;
- Hersteller von Kosmetika und Toilettenartikeln;
- Hersteller von Textilien;
- Weltraumforschungsindustrie und Computerindustrie;
- usw.

Bei Anwendung dieser Europäischen Norm ist die Bestimmung der sporiziden Wirkung des unverdünnten Produktes nicht möglich, da immer eine bestimmte Verdünnung durch Zugabe der Impfkultur und der Belastungssubstanz auftritt. Produkte können nur bei einer Konzentration von 80 % oder darunter geprüft werden.

ANMERKUNG Das beschriebene Verfahren bestimmt die Wirksamkeit gewerblich hergestellter Rezepturen oder anderer Wirkstoffe auf Sporen unter Anwendungsbedingungen.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

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

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

3 Begriffe

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

4 Anforderungen

Das Produkt muss bei einer nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 durchgeführten Prüfung eine dezimal-logarithmische (lg)-Reduktion um mindestens 3 Stufen aufweisen.

Tabelle 1 — Mindestprüfbedingungen und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen für die Oberflächendesinfektion	
Mindestspektrum von Prüforganismen	<i>Bacillus subtilis</i>
Zusätzliche sporizide Wirkung gegen Anaerobier	<i>Clostridium sporogenes</i>
Zusätzliche sporizide Wirkung gegen Aerobier	<i>Bacillus cereus</i>
Erforderliche Reduktion	$\geq \log 3$
Prüftemperatur	Entsprechend der Empfehlung des Herstellers, jedoch zwischen 4 °C und 30 °C
Einwirkzeit	Entsprechend der Empfehlung des Herstellers, jedoch zwischen 1 min und 60 min (in diesem Bereich sind nur Kontaktzeiten von 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 und 60 min zulässig)
Belastungssubstanz	Niedrige Belastung: 0,3 g/l Rinderserumalbumin-Lösung Hohe Belastung: 3,0 g/l Rinderserumalbumin-Lösung

Andere zusätzliche Stämme und zusätzliche Prüfbedingungen dürfen entsprechend des Produktanspruches geprüft werden.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Prüfsuspension von Bakteriensporen in einer Lösung einer Belastungssubstanz, die die niedrige und/oder hohe Belastung simuliert, wird zu einer vorbereiteten Probe des zu testenden Produkts gegeben, das in Wasser standardisierter Härte gelöst ist (in Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten). Das Gemisch wird für die jeweilige Einwirkzeit ± 10 s auf der jeweiligen Prüftemperatur ± 1 °C gehalten (geforderte Prüfbedingungen). Beträgt die Einwirkzeit 1 min, muss die zulässige Abweichung ± 5 s betragen.

Nach Ablauf dieser Einwirkzeit wird eine aliquote Menge entnommen; die in dieser Probenmenge vorhandene sporizide Wirkung wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. Das Vorzugsverfahren ist die Verdünnungs-Neutralisation. Sollte kein geeignetes Neutralisationsmedium gefunden werden kann, wird die Membranfiltration verwendet. Die Anzahl der überlebenden Bakteriensporen in jeder Probe wird bestimmt und die Verminderung der Lebendkeimzahlen wird berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird mit Sporen von *Bacillus subtilis* durchgeführt. Zusätzliche Prüfstämme werden festgelegt. Der Stamm *Bacillus cereus* wird wegen seiner höheren Resistenz gegen einige Biozide, z. B. Peressigsäure und Wasserstoffperoxid, als zusätzlicher aerober Prüfstamm angegeben. Bei der Prüfung von

Desinfektionsmitteln auf der Basis von PAA und/oder H₂O₂ sollte *Bacillus cereus* parallel zu *Bacillus subtilis* geprüft werden, da der erstere Stamm eine höhere Resistenz aufweisen kann.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die sporizide Wirkung muss mit Sporen des folgenden Bakterienstamms bewertet werden:

— *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ¹⁾.

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

— *Bacillus cereus* ATCC 12826 ¹⁾ CIP 105151;

— *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, CIP 79.39 ¹⁾.

ANMERKUNG 1 Bezüglich der entsprechenden Stammsammlungsnummern in einigen anderen Kultursammlungen siehe Anhang G.

ANMERKUNG 2 Bezüglich besonderer Kultur- und Handhabungsbedingungen für *Clostridium sporogenes* siehe Anhang C.

ANMERKUNG 3 Es ist bekannt, dass *Bacillus cereus*-Stämme aus verschiedenen Quellen unterschiedliches Sporulationsverhalten aufweisen können, insbesondere der Stamm CIP 105151 scheint besser zu sporulieren.

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 Inokula verifiziert werden. Wenn diese geprüften zusätzlichen Stämme nicht durch ein Referenzzentrum klassifiziert wurden, müssen ihre Identifikationsmerkmale angegeben werden. Zusätzlich müssen sie 5 Jahre von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kulturensammlung als Referenzprobe aufbewahrt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Die Reagenzien müssen analysenrein und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein.

5.2.2.2 Wasser

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

¹⁾ ATCC 6633, ATCC 12826 und ATCC 19404 sind die Sammelnummern von Stämmen, die von der American Type Culture Collection vertrieben werden. CIP 79.39 ist die Sammelnummer von Sporen, die von der Collection de l'Institut Pasteur vertrieben werden. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Produkte durch CEN. Gleichwertige Stämme anderer Kultursammlungen dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

Es wird im Autoklaven (5.3.2.1) sterilisiert. Eine Sterilisation ist nicht erforderlich, wenn das Wasser z. B. für die Herstellung von Nährmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird. Falls destilliertes Wasser geeigneter Qualität nicht zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionslösungen verwendet werden.

Zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.6.

5.2.2.3 Glucose-Hefeextrakt-Agar (GYA)

Für das Auszählen von lebensfähigen *Bacillus*-Sporen:

Aminosäuren, ohne Vitamine, hergestellt durch Säurehydrolyse von Casein	1,0 g
Lösliche Stärke	1,0 g
Glucose	2,5 g
Hefeextrakt	5,0 g
FeSO ₄	0,1 g
MnSO ₄ , H ₂ O	0,000 1 g
Agar	15,0 g
Wasser (siehe 5.2.2.2)	1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven (5.3.2.4). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($6,8 \pm 0,2$) betragen, gemessen bei 20 °C.

5.2.2.4 Neutralisationsmedium

Das Neutralisationsmedium muss für das zu prüfende Produkt nach dem im Anhang D beschriebenen Verfahren validiert werden. Das Neutralisationsmedium muss steril sein.

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

5.2.2.5 Spülflüssigkeit (für Membranfiltration)

Die Flüssigkeit muss steril, mit der Filtermembran verträglich und für die Filtration durch die Filtermembran unter den in Anhang B beschriebenen Prüfbedingungen geeignet sein.

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

5.2.2.6 Wasser standardisierter Härte für die Verdünnung der Produkte

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

- Herstellung von Lösung A: 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl₂) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl₂) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven (5.3.2.1 a) sterilisiert. Die Sterilisation im Autoklaven, falls angewendet, kann zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird die Lösung unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung darf im Kühlschrank (5.3.2.15) nicht länger als einen Monat gelagert werden;
- Herstellung von Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilfiltriert. Die Lösung darf im Kühlschrank (5.3.2.15) nicht länger als eine Woche gelagert werden;

- Es werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) gefüllt und zunächst 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A, dann 8,0 ml Lösung B hinzugegeben. Die erhaltene Lösung wird gemischt und mit Wasser auf 1 000 ml Wasser (5.2.2.2) aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $(7,0 \pm 0,2)$ gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.4) betragen. Falls erforderlich, muss der pH-Wert mithilfe einer Natriumhydroxidlösung (NaOH) einer Konzentration von etwa 40 g/l (ungefähr 1 mol/l) oder mithilfe einer Salzsäurelösung (HCl) einer Konzentration von etwa 36,5 g/l (ungefähr 1 mol/l) eingestellt werden.

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 Produktes zu diesem Wasser standardisierter Härte zu einer Änderung der Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte, ausgedrückt als Calciumcarbonat (CaCO_3), unter 375 mg/l im Reagenzglas.

5.2.2.7 Belastungssubstanz

5.2.2.7.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz muss steril sein und mit einer 10fach höheren Konzentration, als für die Prüfung benötigt wird, zubereitet werden.

5.2.2.7.2 Rinderserumalbumin-Lösung

Rinderserumalbumin-Lösung für die Prüfbedingungen muss wie folgt hergestellt werden:

- 0,30 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) werden in 100 ml Wasser (5.2.2.2) aufgelöst;
- die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilfiltriert.

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

5.2.2.7.3 Hohe Belastung

3,00 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) werden in 97 ml Wasser (5.2.2.2) aufgelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7).

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

5.3 Geräte und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme steril gelieferter Geräte werden alle Glasgeräte und alle Apparateile, die mit den Kulturmedien, den Reagenzien oder der Probe in Berührung kommen, nach einem der folgenden Verfahren sterilisiert:

- a) in einem Autoklaven (siehe 5.3.2.1) bei $121 ^\circ\text{C}$ für eine Haltezeit von mindestens 15 min;
- b) in einem Heißluft-Sterilisator (siehe 5.3.2.1) bei $180 ^\circ\text{C}$ für eine Haltezeit von mindestens 30 min, bei $170 ^\circ\text{C}$ für eine Haltezeit von mindestens 1 h oder bei $160 ^\circ\text{C}$ für eine Haltezeit von mindestens 2 h.

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laboratoriumsausrüstung²⁾ und im Besonderen die folgenden Geräte:

5.3.2.1 Sterilisatoren

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf eine Temperatur von (20 ± 1) °C, (45 ± 1) °C, (75 ± 1) °C und auf Prüftemperaturen ± 1 °C (siehe 5.5.1).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf (30 ± 1) °C und (37 ± 1) °C.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei 25 °C oder gleichwertig.

5.3.2.5 Stoppuhr.

5.3.2.6 Schüttelmischer (elektromechanisches Rührgerät, d. h. Vortex®-Mischer³⁾).

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät (bei Verwendung dieses Verfahrens) aus einem Material, das mit dem zu prüfenden Produkt verträglich ist, mit einem Filterhalter, der ein Nutzvolumen von mindestens 50 ml haben muss und der für die Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und mit einer Porenweite von 0,45 µm geeignet ist.

Die verwendete Vakuumquelle muss einen gleichmäßigen Filtrationsdurchsatz erzeugen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen auf der Membran zu erzielen und um ein zu langes Filtrieren zu vermeiden, muss das Gerät so eingestellt sein, dass 100 ml der Spülflüssigkeit in 20 s bis 40 s filtriert werden.

5.3.2.8 Behältnisse: Reagenzgläser oder Glaskolben mit geeignetem Nennvolumen.

5.3.2.9 Graduierte Messpipetten mit Nennvolumina von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml. Kalibrierte automatische Pipetten dürfen verwendet werden.

5.3.2.10 Petrischalen 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 Roux-Flaschen aus Glas mit geradem Hals.

5.3.2.14 Mikroskop, vorzugsweise ein Phasenkontrastgerät mit einem Vergrößerungsfaktor von mindestens 400.

2) Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

3) Ein Vortex®-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN.

5.3.2.15 Kühlschranks, einstellbar auf eine Temperatur von $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

5.3.2.16 Bechergläser für die Anaerobiose, mit Sauerstoffentfernungssystem oder einem beliebigen anderen System, das zur Herstellung von Anaerobiose geeignet ist.

5.4 Herstellung der Sporensuspensionen und Prüflösungen

5.4.1 Sporensuspensionen

5.4.1.1 Sporen-Stammsuspension des Prüforganismus

Bacillus subtilis-Sporen-Stammsuspensionen für die besonderen Zwecke dieser Norm können von einer nationalen Kultursammlung bezogen oder vom Prüflaboratorium hergestellt werden.

Wenn die *Bacillus subtilis*-Sporen-Stammsuspension im Prüflaboratorium hergestellt wird, muss die Suspension nach Anhang A hergestellt werden.

Die Lebensfähigkeit und die Empfindlichkeit der einzelnen Sporen-Chargen werden bei *Bacillus*-Sporen nach mindestens 4-wöchiger Lagerung bei $2 ^\circ\text{C}$ bis $8 ^\circ\text{C}$ überprüft. Es werden Glutaraldehyd und Peressigsäure in festgelegten Konzentrationen verwendet. Die Prüfungen werden nach dem Verdünnungs-Neutralisationsverfahren (5.5.2.2) durchgeführt und es wird Wasser (5.2.2.2) anstelle einer Belastungssubstanz (5.2.2.7) verwendet. Die Validierung muss mit einer Suspension durchgeführt werden, die auf $1,5 \times 10^6$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^6$ KBE/ml eingestellt ist.

Voruntersuchungen haben für $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ übereinstimmend ergeben:

Bei *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ohne Belastungssubstanz:

- 3,0 % (v/v) – 30 min: Glutaraldehyd-Lösung sollte eine Reduktion von < 3 lg10-Stufen bewirken
- 10,0 % (v/v) – 30 min: Glutaraldehyd-Lösung sollte eine Reduktion von ≥ 3 lg10-Stufen bewirken
- 0,001 % (v/v) – 30 min: Peressigsäure-Lösung sollte eine Reduktion von < 3 lg10-Stufen bewirken
- 0,05 % (v/v) – 30 min: Peressigsäure-Lösung sollte eine Reduktion von ≥ 3 lg10-Stufen bewirken

Bei *Bacillus subtilis* ATCC 12826 ohne Belastungssubstanz:

- 0,5 % (v/v) – 15 min: Glutaraldehyd-Lösung sollte eine Reduktion von < 3 lg10-Stufen bewirken
- 3,0 % (v/v) – 15 min: Glutaraldehyd-Lösung sollte eine Reduktion von ≥ 3 lg10-Stufen bewirken
- 0,05 % (v/v) – 30 min: Peressigsäure-Lösung sollte eine Reduktion von < 3 lg10-Stufen bewirken
- 0,50 % (v/v) – 30 min: Peressigsäure-Lösung sollte eine Reduktion von ≥ 3 lg10-Stufen bewirken

Für die Validierung sollte ein spezielles Standard-Biozid verwendet werden. Geeignete Substanzen sind z. B.: Glutaraldehyd — Produktname: BIOBAN™ GA 50 antimikrobielles Mittel, DOW Chemical Company Ltd, Diamond House, Lotus Park, Kingsbury Crascent, TW18 3 AG Staines, Middlesex, Großbritannien. Peressigsäure — Produktname: PES 5/25 (Mischung von 5 % Peressigsäure und 25 % Wasserstoffperoxid), Stockmeier Chemie Eilenburg GmbH und Co. KG, Gustav-Adolf-Ring 5, D-04838 Eilenburg. Lagerung bei $4 ^\circ\text{C}$ bis $8 ^\circ\text{C}$.

Zur Herstellung der Sporen-Stammsuspension für zusätzliche Stämme (siehe 5.2.1) wird verwiesen auf:

- Anhang A für *Bacillus cereus* ATCC 12826; CIP 105151;
- Anhang C für *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, CIP 79.39.

5.4.1.2 Sporen-Prüfsuspensionen

Die Sporen-Prüfsuspension wird aus der Sporen-Stammsuspension (siehe 5.4.1.1) durch Verdünnung mit Wasser (siehe 5.2.2.2) hergestellt. Die Anzahl der Sporen in der Prüfsuspension muss auf $1,5 \times 10^6$ bis 5×10^6 KBE/ml eingestellt werden, wobei die Anzahl der Einheiten durch ein geeignetes Hilfsmittel bestimmt wird.

Die Prüfsuspension wird im Wasserbad auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gehalten und innerhalb von 2 h verwendet.

Die mikroskopische Untersuchung bei 400-facher Vergrößerung muss unmittelbar nach der Herstellung der Sporen-Prüfsuspension und dann kurz vor der Prüfung erfolgen, um das Nichtvorhandensein von vegetativen Zellen und auskeimenden Sporen nachzuweisen.

Bei Vorhandensein ausgekeimter Sporen ist die Suspension zu verwerfen.

Zur Auszählung der Sporen-Prüfsuspension werden Verdünnungen mit der 10^{-4} -fachen und der 10^{-5} -fachen Konzentration der Prüfsuspension (siehe 5.4.1.3) mit Wasser (siehe 5.2.2.2) hergestellt. Es wird gemischt (siehe 5.3.2.6). Proben für die Doppelbestimmung von je 1,0 ml jeder Verdünnung werden auf gesonderte Petrischalen (siehe 5.3.2.10) überführt und 12 ml bis 15 ml geschmolzenes GYA (siehe 5.2.2.3), das auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt ist, werden zugegeben.

5.4.1.3 Auszählen der Sporen-Prüfsuspension

Die Petrischalen werden 3 Tage bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ (siehe 5.3.2.3) bebrütet. Für jede Platte wird die höchste Anzahl von Kolonien V_c bestimmt. Die Anzahl der KBE/ml⁴⁾ (siehe 5.6) in der Prüfsuspension (N) wird mit dem in 5.6.1.2 angegebenen Verfahren berechnet.

5.4.1.4 Validierungssuspension („ N_v “, „ N_{v0} “)

- Zur Herstellung der Validierungssuspension („ N_v “) wird die Prüfsuspension (5.4.1.2) mit Wasser (5.2.2.2) verdünnt, so dass Keimzahlen von $3,0 \times 10^2$ KBE/ml bis $1,6 \times 10^3$ KBE/ml [etwa ein Viertel (1+3) der Verdünnung mit der 10^{-3} -fachen Konzentration] erhalten werden.
- Diese Validierungssuspension wird unter denselben Bedingungen aufbewahrt und verwendet wie die Prüfsuspension (5.4.1.2).

Zum Auszählen der N_v wird mit Wasser (5.2.2.2) eine Verdünnung mit der 10^{-1} -fachen Konzentration hergestellt und gemischt. Davon werden Proben für die Doppelbestimmung von je 1,0 ml entnommen und zur Beimpfung im Gussplattenverfahren oder im Oberflächenverfahren verwendet (nur *Bacillus*) (5.4.1.4).

Bebrüten und Auszählung, siehe 5.5.2.2.3.

N_v ist die Anzahl der Zellen je ml in der Validierungssuspension. Infolge des Verdünnungsschrittes auf die 10^{-1} -fache Konzentration ist sie um den Faktor 10 höher als die als V_c -Wert ausgedrückte Keimzahl [5.4.1.4 b)].

N_{v0} ist die Keimzahl je ml in den Gemischen A, B und C zu Beginn der Einwirkzeit.

5.4.2 Produktprüflösung

Einzelheiten der Produktproben im Lieferzustand müssen festgehalten werden.

4) KBE/ml: koloniebildende Einheiten je ml.

Produktprüflösungen müssen in Wasser standardisierter Härte (siehe 5.2.2.6) in drei verschiedenen Konzentrationen hergestellt werden, um eine Konzentration im wirksamen und eine im unwirksamen Bereich zu erfassen. Die Konzentration der Produktprüflösung muss das 1,25-fache der geforderten Prüfkonzentration betragen.

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand aufgelöst, indem mindestens $(1\,000 \pm 10)$ mg in einen Messkolben eingewogen und mit Wasser standardisierter Härte (siehe 5.2.2.6) verdünnt wird. Die folgenden Verdünnungen müssen in Messkolben (siehe 5.3.2.12) auf der Basis von Volumenanteilen in Wasser standardisierter Härte (siehe 5.2.2.6) hergestellt werden.

Bei flüssigen Produkten müssen Verdünnungen des Produktes mit Wasser standardisierter Härte (siehe 5.2.2.6) auf der Basis von Volumenanteilen in Messkolben (siehe 5.3.2.12) hergestellt werden.

Bei gebrauchsfertig gelieferten Produkten muss Wasser (siehe 5.2.2.2) für die Herstellung der zweiten und dritten Verdünnung verwendet werden.

Bei einer Verdünnung des Produktes in Wasser standardisierter Härte (oder in Wasser, siehe 5.2.2.2) muss sich eine physikalisch homogene stabile Zubereitung ergeben. Falls während der Prüfung ein Niederschlag oder Ausflockung auftritt, muss dies im Prüfbericht erwähnt werden.

Die Produktprüflösungen und deren Verdünnungen müssen frisch hergestellt und innerhalb von 60 min verwendet werden.

Weist ein Produkt eine geringe Stabilität auf, sollte die Verbrauchszeit verkürzt werden.

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

5.5 Verfahren

5.5.1 Auswahl der Untersuchungsbedingungen

Die Versuchsbedingungen können entsprechend der praktischen Anwendung ausgewählt werden, für die das Produkt vorgesehen ist (Abschnitt 4):

- a) Temperatur θ (in °C):
Die zu prüfenden Temperaturen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 angegeben.
Die zulässige Abweichung für die gewählten Temperaturen beträgt ± 1 °C.
- b) Einwirkzeit t (in min):
Die zu prüfenden Einwirkzeiten sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 angegeben.
Die zulässige Abweichung für die gewählten Einwirkzeiten beträgt ± 10 s (± 5 s, wenn die Einwirkzeit 1 min beträgt).
- c) Belastungssubstanz:
Die zu prüfende Belastungssubstanz ist 0,30 g/l Rinderserumalbumin-Lösung (5.2.2.7.2) unter Bedingungen mit geringer Belastung oder 3,0 g/l Rinderserumalbumin-Lösung (5.2.2.7.3) unter Bedingungen mit höherer Belastung – nach Abschnitt 4, Tabelle 1 und den praktischen Anwendungen. Den speziellen praktischen Anwendungen des Produkts entsprechend dürfen weitere Belastungssubstanzen geprüft werden. Das Produkt darf unter den verwendeten Untersuchungsbedingungen keinen Niederschlag bilden.

Jede gewählte Untersuchungsbedingung (θ , t , Stämme) muss nach Anhang B validiert sein. Es ist zulässig, nur die längste Einwirkzeit und die stärkste Verdünnung der Produktprüflösung zu validieren.

5.5.2 Prüfverfahren für die Bewertung der sporiziden Wirkung des Produktes

5.5.2.1 Allgemeines

Das Vorzugsverfahren ist das Verdünnungs-Neutralisationsverfahren. Zur Bestimmung eines geeigneten Neutralisationsmediums ist folgendes Verfahren durchzuführen. Die Validierung des Verdünnungs-Neutralisationsverfahrens (B.4.1) wird mit einem geeigneten Neutralisationsmedium, gewählt nach Laborerfahrung und veröffentlichten Daten, durchgeführt.

Wenn dieses Neutralisationsmedium nicht validiert ist, wird die Validierungsprüfung mit einem alternativen Neutralisationsmedium wiederholt, das aus einem Gemisch von Polysorbat 80 (30 g/l), Saponin (30 g/l), L-Histidin (1 g/l), Lecithin (3 g/l), Natriumthiosulfat (5 g/l) entweder in Wasser (siehe 5.2.2.2) oder in Phosphat-Pufferlösung (0,002 5 mol/l) besteht. Falls beide Neutralisationsmedien nicht validiert sind, darf anstelle des Verdünnungs-Neutralisationsverfahrens das Membranfiltrationsverfahren angewendet werden.

Die Inaktivierung der sporiziden Wirkung des Produktes muss für jeden der geprüften Stämme und für jede der gewählten Untersuchungsbedingungen (siehe 5.5.1) validiert werden.

5.5.2.2 Verdünnungs-Neutralisationsverfahren

5.5.2.2.1 Allgemeines

Vor der Prüfung werden alle Reagenzien (Produktprüflösungen, Sporen-Prüfsuspension, Belastungssubstanz) in dem auf eine Temperatur von $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ geregelten Wasserbad (siehe 5.3.2.2) auf eine Prüftemperatur von $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestellt. Es wird überprüft, ob sich die Temperatur der Reagenzien bei $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ stabilisiert hat. Das Neutralisationsmedium (5.2.2.4) und das Wasser (siehe 5.2.2.2) müssen auf eine Temperatur von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestellt werden.

5.5.2.2.2 Prüfverfahren für die sporizide Wirkung von Produkten

1,0 ml Belastungssubstanz (siehe 5.2.2.7) wird in ein Reagenzglas pipettiert. Von der Sporen-Prüfsuspension mit $1,5 \times 10^6$ KBE/ml bis 5×10^6 KBE/ml ⁵⁾ wird 1,0 ml zugegeben (siehe 5.4.1.2).

Es wird sofort eine Stoppuhr in Gang gesetzt, gemischt (siehe 5.3.2.6) und das Reagenzglas $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in das Wasserbad mit einer Temperatur von $\theta^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ gestellt. Nach Ablauf der Einwirkzeit werden 8,0 ml von jeweils einer der Produktprüflösungen zugegeben. Es wird sofort die Stoppuhr erneut in Gang gesetzt, gemischt (siehe 5.3.2.6) und das Reagenzglas die entsprechende Einwirkzeit $(t \pm 10) \text{ s}$ ($\pm 5 \text{ s}$, wenn die Einwirkzeit 1 min beträgt) in das Wasserbad mit einer auf $\theta^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ geregelten Temperatur gestellt.

Beim Hinzufügen von Sporensuspensionen sollte sorgfältig darauf geachtet werden, dass der obere Teil der Innenseite des Reagenzglases nicht berührt wird.

Unmittelbar vor Ende der Einwirkzeit wird gemischt (siehe 5.3.2.6). Nach Ablauf der Einwirkzeit wird 1,0 ml des Prüfgemisches in ein Röhrchen mit 8,0 ml Neutralisationsmedium (siehe 5.2.2.4) und 1,0 ml Wasser (siehe 5.2.2.2) gegeben. Es wird gemischt (siehe 5.3.2.6) und das Röhrchen in ein geregeltes Wasserbad mit einer Temperatur von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gestellt.

Nach Ablauf der Neutralisationszeit von $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ werden sofort Proben für die Doppelbestimmung von je 1,0 ml neutralisierter Mischung (Neutralisationsmedium, Produktprüflösung, Belastungssubstanz, Sporen-Prüfsuspension) entnommen. Die beiden 1,0-ml-Proben werden in gesonderte Petrischalen (siehe 5.3.2.10) übertragen und es werden sofort 12 ml bis 15 ml geschmolzenes GYA (siehe 5.2.2.3), das auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt ist, zugegeben.

5) KBE/ml: koloniebildende Einheiten je ml.

Dieser Ablauf wird ebenso mit den anderen Produktprüflösungen durchgeführt.

5.5.2.2.3 Bebrüten und Auszählen des Prüfgemisches

Die Petrischalen werden 3 Tage bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ (siehe 5.3.2.3) bebrütet.

Für jede Platte wird die höchste Anzahl von Kolonien V_c bestimmt.

Es wird die Anzahl von KBE/ml in dem Prüfgemisch (N_a) mit dem in 5.6.2 angegebenen Verfahren berechnet.

Für die Berechnung der Lebendkeimzahl des Prüfgemisches ist der Verdünnungsfaktor 10^{-1} . Es werden zwei Verdünnungen im Verhältnis 1/10 durchgeführt.

5.5.2.3 Membranfiltrationsverfahren

5.5.2.3.1 Allgemeines

Vor der Prüfung werden alle Reagenzien (Produktprüflösungen, Sporen-Prüfsuspension, Belastungssubstanz) in dem auf eine Temperatur von $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ geregelten Wasserbad (siehe 5.3.2.2) auf eine Prüftemperatur von $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestellt. Es wird überprüft, ob sich die Temperatur der Reagenzien bei $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ stabilisiert hat. Die Spülflüssigkeit (siehe 5.2.2.5) und das Wasser (5.2.2.2) müssen auf eine Temperatur von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestellt werden.

5.5.2.3.2 Prüfverfahren für die sporizide Wirkung von Produkten

1,0 ml Belastungssubstanz (siehe 5.2.2.7) wird in ein Reagenzglas pipettiert. Von der Sporen-Prüfsuspension (siehe 5.4.1.3) wird 1,0 ml zugegeben.

Es wird sofort eine Stoppuhr in Gang gesetzt, gemischt (siehe 5.3.2.6) und das Reagenzglas $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in das Wasserbad mit einer Temperatur von $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ gestellt. Nach Ablauf der Einwirkzeit werden 8,0 ml von einer der Produktprüflösungen zugegeben. Es wird sofort die Stoppuhr erneut in Gang gesetzt, gemischt (siehe 5.3.2.6) und das Reagenzglas die entsprechende Einwirkzeit $(t \pm 10) \text{ s}$ in das Wasserbad mit einer auf $(\theta \pm 1)^\circ\text{C}$ geregelten Temperatur gestellt.

Unmittelbar vor Ende der gewählten Einwirkzeit wird gemischt (siehe 5.3.2.6). Nach Ablauf der gewählten Einwirkzeit werden zwei Proben von je 0,1 ml des Prüfgemisches mit der Pipette entnommen und jede der Proben in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät übertragen, die mit einer Membran versehen sind und 50 ml Spülflüssigkeit (siehe 5.2.2.5) enthalten. Es wird sofort filtriert. Die Zeit für das Übertragen und Filtrieren sollte 1 min nicht überschreiten. Eine Dauer von mehr als 1 min muss im Prüfbericht angegeben werden. Es wird mit mindestens 150 ml, jedoch nicht mehr als 500 ml Spülflüssigkeit (siehe 5.2.2.5) gespült. Es wird mit 50 ml Wasser (siehe 5.2.2.2) filtriert und gespült, und dann werden die Membranen auf die Oberfläche von zwei separaten GYA-Platten (siehe 5.2.2.3) übertragen.

Beim Übertragen sollte sorgfältig darauf geachtet werden, dass sich die Sporen beim Auflegen auf die GYA-Platten auf der oberen Seite der Membran befinden und ein Lufteinschluss zwischen Membran und Agaroberfläche vermieden wird.

Dieser Ablauf wird ebenso mit den anderen Produktprüflösungen durchgeführt.

5.5.2.3.3 Bebrüten und Auszählen des Prüfgemisches

Die Petrischalen werden 3 Tage bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ (siehe 5.3.2.3) bebrütet.

Für jede Platte wird die höchste Anzahl von Kolonien V_c bestimmt.

Es wird die Anzahl von KBE/ml in dem Prüfgemisch (N_a) mit dem in 5.6.2 angegebenen Verfahren berechnet.

5.5.3 Validierung des Verdünnungs-Neutralisationsverfahrens und des Membranfiltrationsverfahrens

Das Verdünnungs-Neutralisations- und das Membranfiltrationsverfahren müssen für jeden der Prüforganismen nach Anhang B validiert worden sein.

Die Validierungsprüfung (siehe Anhang B) muss auch zur gleichen Zeit wie das Prüfverfahren (siehe 5.5) durchgeführt werden, wobei nur die höchste Konzentration, die längste Einwirkzeit und dieselben Bedingungen (Sporen-Prüfsuspension, Produktprüflösung, Neutralisationsmedium oder Spülflüssigkeit) wie bei der Prüfung (siehe 5.5.2.2 oder 5.5.2.3) verwendet werden.

5.6 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse

5.6.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen und Prüfgemische

5.6.1.1 Allgemeines

N , N_0 und N_v stehen für die Sporensuspension, N_a für das sporizide Prüfgemisch, A (Kontrolle der Untersuchungsbedingungen), B (Kontrolle des Neutralisationsmediums oder Filtrationskontrolle) und C (Verfahrensvalidierung) stehen für die verschiedenen Kontrollprüfgemische.

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

N , N_v , N_0 , N_a , A, B und C sind die Anzahl der gezählten Zellen je ml in den verschiedenen Prüfgemischen entsprechend Tabelle 1.	Anzahl der Zellen je ml in der Sporensuspension	Anzahl der Zellen je ml in den Prüfgemischen zu Beginn der Einwirkzeit (Zeit 0)	Anzahl der überlebenden Zellen je ml in den Prüfgemischen am Ende der Einwirkzeit t (A) oder nach 5 min (B) oder 30 min (C)
Prüfung	N Prüfsuspension	$N_0 (= N/10)$	N_a (nach Neutralisation oder Filtration)
Kontrollen	N_v Validierungssuspension	$N_{v0} (= N_v/10)$ Validierungssuspension	A, B, C

5.6.1.2 V_c -Werte

Alle Versuchsdaten werden als V_c -Werte angegeben:

- beim Verdünnungs-Neutralisationsverfahren (Prüfung und Kontrollen) ist der V_c -Wert die Anzahl der gezählten koloniebildenden Einheiten je 1,0 ml Probe;
- beim Membranfiltrationsverfahren gibt der V_c -Wert die Anzahl der gezählten koloniebildenden Einheiten je 0,1 ml Probe des Prüfgemisches N_a , bei der Filtrationskontrolle (B) und Verfahrensvalidierung (C) und je 1,0 ml Probe bei der Kontrolle der Untersuchungsbedingung A an.

5.6.2 Berechnung

5.6.2.1 Allgemeines

Der erste Schritt bei der Berechnung ist die Bestimmung der V_c -Werte, der zweite Schritt die Berechnung von N , N_0 , N_a , N_v , N_{v0} , 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 Grenzwerte für das Auszählen von Bakterien auf Agarplatten liegen in der Regel zwischen 15 und 300. Nach dieser Europäischen Norm ist eine Abweichung von 10 % zulässig, so dass die Grenzwerte bei 14 und 330 liegen. Auf Membranen gilt ein anderer oberer Grenzwert: 150, d. h. mit 10 % Abweichung: 165.

ANMERKUNG Grundlage des unteren Grenzwertes (14) ist die Tatsache, dass die Abweichung zunimmt, je kleiner die in der Probe (1 ml oder 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 Auszählung 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 (330 und 165) spiegeln die Ungenauigkeit beim Zählen zusammenfließender Kolonien und Wachstumshemmung durch Erschöpfung der Nährsubstanzen wider. Sie beziehen sich nur auf die Auszählung auf einer Platte und nicht notwendigerweise auf die Probe.

- b) Für die Auszählung der Prüfsuspension N (5.4.1.3, Anhang A), der Validierungssuspension N_v (5.4.1.3, Anhang A) und für alle Auszählungen beim Verdünnungs-Neutralisationsverfahren (5.5.2.2.2 und 5.6.1.2, Anhang B) werden die V_c -Werte entsprechend der Anzahl der je 1 ml Probe (5.6.1.2) verwendeten Platten bestimmt und aufgezeichnet.

Wenn zur Bestimmung des V_c -Werts mehr als eine Platte je 1 ml Probe verwendet worden ist, sollten die Keimzahlen je Platte aufgezeichnet werden.

- c) Falls die Keimzahl auf einer Platte höher als 330 ist, wird diese Zahl als „> 330“ angegeben. Wenn mehr als eine Platte je 1 ml Probe verwendet worden ist und auf mindestens eine der Platten eine höhere Keimzahl als 330 aufweist, wird dieser V_c -Wert im Prüfbericht als „größer als die Summe der Keimzahlen“ angegeben; z. B. wird für > 330, 310, 302 im Prüfbericht „> 942“ angegeben.
- d) Falls ein V_c -Wert kleiner als 14 ist, wird die Zahl angegeben (aber für weitere Berechnungen im Fall von N_a durch „< 14“ zu ersetzen).
- e) Beim Membranfiltrationsverfahren (5.5.2.3.2) gelten die Auszählungen auf den Membranen als V_c -Werte (5.6.1.2). Die V_c -Werte unterhalb des unteren Grenzwertes (14) oder oberhalb des oberen Grenzwertes (165) werden im Prüfbericht, wie oben beschrieben, angegeben.
- f) 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 Anzahl der Zellen in der Prüfsuspension (5.4.1.3; 5.6.1.2).

Da zwei Verdünnungen der Prüfsuspension (5.4.1.3) ausgewertet werden, wird die Anzahl der KBE/ml als die gewichtete mittlere Keimzahl nach folgender Gleichung berechnet:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1 n_2) 10^{-4}} \quad (1)$$

Dabei ist:

c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;

n_1 die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung, d. h. 10^{-4} , berücksichtigten V_c -Werte;

n_2 die Anzahl der bei der höheren Verdünnung, d. h. 10^{-5} , berücksichtigten V_c -Werte;

10^{-4} der der geringeren Verdünnung entsprechende Verdünnungsfaktor.

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

BEISPIEL

$$N = \frac{168 + 213 + 20 + 25}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-4}} = \frac{426}{2,2 \times 10^{-4}} = 1,9363 \times 10^6 = 1,9 \times 10^6 \text{ (KBE/ml)}$$

N_0 ist die Anzahl der Zellen je ml im Prüfgemisch zu Beginn der Einwirkzeit (Zeit „null“ = 0). Wegen der zehnfachen Verdünnung durch Zugabe des Produkts und der Belastungssubstanz beträgt der Wert von N_0 ein Zehntel des gewichteten Mittelwertes von N .

5.6.2.4 Berechnung von N_a

N_a ist die Anzahl der überlebenden Zellen je ml des Prüfgemisches (5.5.2.2.2 oder 5.5.2.3.2) am Ende der Einwirkzeit und nach der Neutralisation oder der Membranfiltration. Aufgrund der Zugabe von Neutralisationsmedium und Wasser (5.5.2.2.2) oder wegen des Probenvolumens von 0,1 ml (5.5.2.3.2) beim Membranfiltrationsverfahren ist der Wert von N_a zehnmal höher als die V_c -Werte.

a) Anhand der folgenden Gleichung wird für jeden Verdünnungsschritt der Mittelwert N_a^0 , N_a^{-1} bzw. N_a^{-2} berechnet:

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

Dabei ist:

c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;

n die Anzahl der berücksichtigten V_c -Werte.

Falls einer oder beide V_c -Werte aus der Doppelbestimmung entweder unterhalb des unteren Grenzwertes oder oberhalb des oberen Grenzwertes liegt/liegen, werden die Ergebnisse als „weniger als“ oder „mehr als“ ausgedrückt.

BEISPIELE

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

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

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

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

a3 V_c -Werte aus der Doppelbestimmung (zwei Gussplatten je 1,0 ml Probe): > 330, 300

$$N_a^0 = \frac{(> 330 + 300) \times 10}{2} = > 3\,150 = > 3,2 \times 10^3$$

b) Zur Berechnung von N_a werden nur die Ergebnisse für N_a^0 , N_a^{-1} , N_a^{-2} verwendet, bei denen einer oder beide V_c -Werte innerhalb der Grenzwerte für die Zellzählung liegen. Ausnahmen und Regeln bei Sonderfällen werden im Folgenden erläutert.

b1 Wenn sich bei allen folgenden Verdünnungen von N_a Mittelwerte von „mehr als“ ergeben, wird nur die höchste Verdünnung (10^{-1}) als Ergebnis für N_a herangezogen.

BEISPIEL 1

	V_{c1}	V_{c2}	Mittelwert $\times 10$	
N_a^0	> 330	> 330	> 3 300	$N_a = > 3\,300 \times 10^2 = > 3,3 \times 10^5$
N_a^{-1}	> 330	> 330	> 3 300	
N_a^{-2}	> 330	> 330	> 3 300	

b2 Wenn sich bei allen folgenden Verdünnungen von N_a Mittelwerte von „weniger als“ ergeben, wird nur die niedrigste Verdünnung (10^0) als Ergebnis für N_a herangezogen.

BEISPIEL 2

	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 Wenn einer oder beide V_c -Werte aus der Doppelbestimmung bei nur einer Verdünnung von N_a innerhalb der Grenzwerte für die Zellzählung liegen, wird dieses Ergebnis als N_a verwendet.

BEISPIEL 3

	V_{c1}	V_{c2}	Mittelwert $\times 10$	
N_a^0	> 330	> 330	> 3 300	$N_a = 1\,015 \times 10^1 = 1,0 \times 10^4$
N_a^{-1}	96	107	1 015	

N_a^{-2} < 14 < 14 < 140

b4 Ergibt sich für die höhere von zwei aufeinander folgenden Verdünnungen von N_a ein Mittelwert von „weniger als“ und für die geringere Verdünnung ein Mittelwert von „mehr als“, wird nur die geringere Verdünnung als N_a -Wert verwendet.

BEISPIEL 4

	V_{c1}	V_{c2}	Mittelwert $\times 10$	
N_a^0	> 330	> 330	$> 3\,300$	$N_a = > 3\,300 \times 10^0 = > 3,3 \times 10^3$
N_a^{-1}	< 14	29	< 215	
N_a^{-2}	< 14	< 14	< 140	

c) Es werden höchstens 2 aufeinander folgende Verdünnungen für die Berechnung von N_a als gewichteten Mittelwert verwendet. Ausnahmen und Regeln bei Sonderfällen werden im Folgenden erläutert.

c1 Liegen einer oder beide V_c -Werte aus der Doppelbestimmung von drei oder mehr aufeinander folgenden Verdünnungen von N_a (einschließlich N_a^0) innerhalb der Grenzwerte für die Zellzählung (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 Liegen bei zwei aufeinander folgenden Verdünnungen von N_a die V_c -Werte aus der Doppelbestimmung innerhalb der Grenzwerte für die Zellzählung, wird N_a anhand der folgenden Gleichung (3) als gewichteter Mittelwert berechnet:

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

Dabei ist:

c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;

Z der Verdünnungsfaktor für die geringere Verdünnung, z. B. N_a^0 ist im Vergleich zu N_a^{-1} die geringere Verdünnung.

c3 Liegen bei zwei aufeinander folgenden Verdünnungen von N_a beide V_c -Werte der höheren Verdünnung innerhalb der Grenzwerte für die Zellzählung und ein V_c -Wert der geringeren Verdünnung ist „mehr als“, wird N_a mit der Gleichung (3) als gewichteter Mittelwert berechnet, siehe **c2**.

BEISPIEL 5

	V_{c1}	V_{c2}	Mittelwert $\times 10$	
N_a^0	> 330	320	$> 3\,250$	$N_a = \frac{(> 330 + 320 + 46 + 57) \times 10}{2,2 \times 10^0} = > 3\,422,72 = > 3,4 \times 10^3$
N_a^{-1}	46	57	515	
N_a^{-2}	< 14	< 14	< 140	

c4 Ist bei zwei aufeinander folgenden Verdünnungen von N_a einer der Doppelwerte für die höhere Verdünnung „ < 14 “, wird nur die geringere Verdünnung als Ergebnis für N_a verwendet.