

DIN EN 14204



ICS 71.100.35

Einsprüche bis 2024-06-26
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 14204:2013-02

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der mykobakteriziden
Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den
Veterinärbereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche und Englische Fassung prEN 14204:2024**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical
disinfectants and antiseptics used in the veterinary area –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German and English version prEN 14204:2024

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité mycobactéricide des
antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);
Version allemande et anglaise prEN 14204:2024

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-04-26 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument 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.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 75 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Das Dokument prEN 14204:2024 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 14204:2013-02 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Vereinheitlichung der Struktur und des Wortlautes mit anderen quantitativen Suspensionsverfahren des CEN/TC 216;
- b) redaktionelle Änderungen.

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der mykobakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)

Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area – Test method and requirements (phase 2, step 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité mycobactéricide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire – Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	7
5.1 Kurzbeschreibung	7
5.2 Materialien und Reagenzien	7
5.2.1 Prüforganismen	7
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	8
5.3 Geräte und Glasgeräte	11
5.3.1 Allgemeines	11
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und besonders folgende Geräte:	11
5.4 Herstellung der Mykobakterien-Prüfsuspension und der Produktprüflösungen	12
5.4.1 Prüforganismussuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)	12
5.4.2 Produktprüflösungen	14
5.5 Verfahren zur Beurteilung der mykobakteriziden Wirkung des Produkts	15
5.5.1 Allgemeines	15
5.5.2 Prüfverfahren – Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	16
5.5.3 Prüfverfahren – Membranfiltrationsverfahren	18
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	20
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen	20
5.6.2 Berechnung	21
5.7 Verifizierung des Verfahrens	25
5.7.1 Allgemeines	25
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	25
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	25
5.8 Angabe der Ergebnisse	26
5.8.1 Reduktion	26
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	26
5.8.3 Mykobakterizide Konzentration	26
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	26
5.9.1 Allgemeines	26
5.9.2 Mykobakterizide Wirkung für allgemeine Zwecke	26
5.9.3 Eignung für bestimmte Anwendungsgebiete	27
5.10 Prüfbericht	27
Anhang A (informativ) Referenzstamm in nationalen Sammlungen	29
Anhang B (informativ) Beispiele von Neutralisationsmedien für die verbleibende antimikrobielle Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika und Spülflüssigkeiten	30
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens	32
Anhang D (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht	34
Literaturhinweise	38

Bilder

Bild C.1	32
Bild C.2	33

Tabellen

Tabelle 1 — Prüfbedingungen	7
Tabelle 2 — Anzahl der je ml in den verschiedenen Prüfgemischen ausgezählten Zellen	21
Tabelle B.1 — Beispiele	30

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 14204:2024) 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 ersetzt EN 14204:2012 und wurde überarbeitet, um den Aufbau und die Formulierungen mit anderen (bereits vorliegenden oder in Vorbereitung befindlichen) quantitativen Suspensionsversuchen von CEN/TC 216 zu harmonisieren.

Mit der vorherigen Fassung dieser Norm erhaltene Ergebnisse sind weiterhin gültig.

Einleitung

Dieses Dokument legt einen Suspensionsversuch fest zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum in dem im Anwendungsbereich beschriebenen Bereich eine mykobakterizide Wirkung aufweist.

Dieser Laborversuch berücksichtigt praktische Anwendungsbedingungen für das Produkt, einschließlich Einwirkzeit, Temperatur, Prüforganismen und Belastungssubstanzen, d. h. Bedingungen, die die Wirkung des Produkts in praktischen Situationen beeinflussen können.

Die Bedingungen sollen allgemeinen Ansprüchen genügen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten ermöglichen. Jede in dieser Prüfung festgestellte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht den gewählten Untersuchungsbedingungen. Für einige Anwendungszwecke können jedoch die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt abweichen, und deshalb müssen zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die mykobakterizide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die bei der Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte oder — im Fall von gebrauchsfertigen Produkten — mit Wasser als homogene, physikalisch stabile Zubereitung vorliegen.

Produkte können nur bei einer Konzentration von 80 % oder weniger geprüft werden, da immer eine bestimmte Verdünnung durch Zugabe der Prüforganismen und der Belastungssubstanz erfolgt.

Das beschriebene Verfahren ist für die Bestimmung der Wirkung von handelsüblichen Zubereitungen oder Wirkstoffen unter den Bedingungen, unter denen sie verwendet werden, bestimmt.

Dieses Dokument gilt für Produkte, die zur Instrumentendesinfektion durch Eintauchen, zur Oberflächendesinfektion durch Abwischen, Besprühen, Überfluten oder auf sonstige Weise sowie zur Sitzendesinfektion im Veterinärbereich verwendet werden, d. h. bei der Aufzucht, Haltung, Produktion, in veterinärmedizinischen Versorgungseinrichtungen und beim Transport von Tieren sowie bei der Tierkörperbeseitigung, außer wenn die Tiere nach der Tötung durch Zuführung in die weiterverarbeitende Industrie in die Nahrungsmittelkette eintreten.

EN 14885 legt im Einzelnen die Beziehung der verschiedenen Prüfungen untereinander sowie zu den „Anwendungsempfehlungen“ fest.

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

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*

3 Begriffe

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

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>

4 Anforderungen

Bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) oder – im Fall gebrauchsfertiger Produkte – mit Wasser (5.2.2.2) und Prüfung in Übereinstimmung mit Tabelle 1 und Abschnitt 5, unter Simulierung von Verschmutzung niedrigen Grades (3,0 g/l Rinderserumalbumin) oder Verschmutzung hohen Grades (10 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Rinderserumalbumin) oder unter anderen Prüfbedingungen muss für das Produkt eine dezimal-logarithmische (lg-)Reduktion um mindestens 4 Stufen (Reduktion um 4 lg) nachgewiesen werden.

Tabelle 1 — Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Mykobakterizide Wirkung
Mindestspektrum des Zielorganismus	<i>Mycobacterium avium</i>
zusätzlich	jeder relevante Prüforganismus
Prüftemperatur mindestens höchstens	$(5 \pm 1) ^\circ\text{C}$ $(40 \pm 1) ^\circ\text{C}$
Einwirkzeit mindestens höchstens	$1 \text{ min} \pm 5 \text{ s}$ $120 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$
Belastungssubstanz Verschmutzung niedrigen Grades Verschmutzung hohen Grades	3,0 g/l Rinderserumalbumin 10 g/l Hefeextrakt plus 10 g/l Rinderserumalbumin
zusätzlich	jede relevante Substanz

Eine beliebige zusätzliche spezifische mykobakterizide Wirkung muss nach 5.2.1 und 5.5.1.1 bestimmt werden, um besondere bestimmungsgemäße Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Probe des Produktes im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (oder bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser) verdünnten Produktes wird zu einer Prüfsuspension von Mykobakterien in einer Lösung einer Belastungssubstanz gegeben.

Das Gemisch wird für die prüfungsbezogene Einwirkzeit t bei der Prüftemperatur θ gehalten. Nach Ablauf dieser Einwirkzeit wird ein aliquoter Anteil entnommen und die mykobakterizide Wirkung in dieser Teilmenge wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt.

Das Verfahren der Wahl ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Wenn kein geeignetes Neutralisationsmedium gefunden werden kann, wird die Membranfiltration angewendet. Die Anzahl der überlebenden Mykobakterien in jeder Probe wird bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahlen wird berechnet.

5.1.2 Für das allgemeine Desinfektionsprodukt wird die Prüfung mit *Mycobacterium avium* als Prüforganismus durchgeführt.

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

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die mykobakterizide Wirkung muss unter Verwendung des folgenden Stammes als Prüforganismen bewertet werden:

E DIN EN 14204:2024-06
prEN 14204:2024 (D)

Mycobacterium avium ATCC® 15769™¹

ANMERKUNG Bezüglich der entsprechenden Stamm(sammlungs)nummern in einigen anderen Kultursammlungen siehe Anhang A.

Die erforderliche Bebrütungstemperatur für diesen Prüforganismus liegt bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.3). Für alle während einer Prüfung sowie deren Kontrolle und Validierung durchgeführten Bebrütungen muss die gleiche Temperatur (entweder 36°C oder 37°C) angewendet werden.

Wenn zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, müssen sie unter den im Prüfbericht angeführten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Zeit, Atmosphäre, Medien) bebrütet werden. Wenn die gewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss ihre Eignung zur Bereitstellung der erforderlichen Inokula verifiziert werden. Wenn diese zusätzlichen Prüforganismen nicht in einem Referenz-Zentrum klassifiziert wurden, müssen ihre Identifizierungsmerkmale angegeben werden. Außerdem müssen sie von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kultursammlung für fünf Jahre zu Referenzzwecken aufbewahrt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in diesem Dokument angegebenen Massen von chemischen Substanzen beziehen sich auf wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um daraus resultierende Differenzen in den relativen Molekülmassen zu berücksichtigen.

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

Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern, wird empfohlen, dass handelsübliche wasserfreie Materialien zur Herstellung von Kulturmedien verwendet werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten strengstens befolgt werden.

Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte eine Haltbarkeitsdauer festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes Wasser sein und darf kein demineralisiertes Wasser sein.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

Hinsichtlich des Verfahrens zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.7.

ANMERKUNG 1 Eine Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG 2 Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionszwecke (siehe Literaturhinweis [1], Pharmakopöe) verwendet werden.

¹ Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, geliefert von den American Type Culture Collections (ATCC). Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.2.2.3 Middlebrook-Cohn-7H10-Medium + 10 % Ölsäure-Albumin-Dextrose-Komplex (OADC) (im Text als 7H10 angeführt)

7H10, bestehend aus:

- Middlebrook-7H10-Agar 19 g;
- Glycerol 5 ml;
- Wasser (5.2.2.2) bis auf 895 ml.

Zur vollständigen Auflösung wird bis zum Sieden erhitzt. Nach 10 min Sterilisation im Autoklaven [5.3.2.1 a)] erfolgt Abkühlen auf 50 °C bis 55 °C. Unter aseptischen Bedingungen werden 100 ml Middlebrook-Medium mit OADC-Anreicherung zugegeben. Der endgültige pH-Wert muss $6,6 \pm 0,2$, gemessen bei 25 °C, betragen.

Wenn Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auftreten, kann es notwendig sein, dem 7H10 ein Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält eine Anleitung zu den Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

- Trypton, pankreatisch verdautes Casein 1,0 g;
- Natriumchlorid (NaCl) 8,5 g;
- Wasser (siehe 5.2.2.2) bis auf 1 000 ml;
- Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [siehe 5.3.2.1 a)];
- Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums, gemessen bei (20 ± 1) °C, $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

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

In Anhang B sind Angaben zu Neutralisationsmedien aufgeführt, die sich für einige Kategorien von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.6 Spülflüssigkeit (für die Membranfiltration)

Die Spülflüssigkeit muss für das zu prüfende Produkte nach 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.3 validiert sein.

Sie muss steril, mit der Filtermembran verträglich und unter den in 5.5.3 beschriebenen Prüfbedingungen für die Filtration durch die Filtermembran geeignet sein.

In Anhang B sind Angaben zu Spülflüssigkeiten aufgeführt, die sich für einige Kategorien von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

Die Vorgehensweise bei der Herstellung von 1 000 ml Wasser standardisierter Härte ist wie folgt:

- Herstellung von Lösung A: 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Wenn das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem

Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens einen Monat aufbewahrt.

- Herstellung von Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7). Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens eine Woche aufbewahrt.
- In einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) gegeben, dazu werden 6,0 ml Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B gegeben. Nach Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, betragen. Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von 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 Bei Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produktes zum Wasser standardisierter Härte in jedem Reagenzglas zu einer anderen endgültigen Wasserhärte. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte, angegeben als Calciumcarbonat (CaCO_3), im Reagenzglas unter 375 mg/l.

5.2.2.8 Belastungssubstanzen

5.2.2.8.1 Allgemeines

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

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem 10-Fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

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

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

5.2.2.8.2 Verschmutzung niedrigen Grades (Rinderserumalbumin-Lösung)

In einem 100-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 3,0 g Rinderserumalbumin-Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) in 90 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst. Es wird mit Wasser (5.2.2.2) bis zur Marke aufgefüllt.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7), die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verwendet.

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

5.2.2.8.3 Verschmutzung hohen Grades (Gemisch aus Rinderserumalbumin-Lösung und Hefeextrakt)

In einem 250-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 50,0 g Hefeextrakt-Pulver in 150 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst und es wird gewartet, bis der Schaum sich aufgelöst hat. Es wird mit Wasser (5.2.2.2) bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in eine saubere trockene Flasche überführt und im Autoklaven [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Es wird auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ abkühlen gelassen.

25 ml dieser Lösung werden in einen 50-ml-Messkolben pipettiert und 10 ml Wasser (5.2.2.2) werden zugegeben. 5,0 g Rinderserumalbumin-Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) werden unter Schütteln in der Lösung gelöst und es wird gewartet, bis der Schaum sich aufgelöst hat. Mit Wasser (5.2.2.2) wird bis zur Marke aufgefüllt und durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert; die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verwendet.

Die Endkonzentration im Prüfverfahren (5.5) beträgt 10,0 g/l Hefeextrakt und 10,0 g/l Rinderserumalbumin.

5.3 Geräte und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

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

- a) durch feuchte Hitze im Autoklaven [5.3.2.1 a)];
- b) durch trockene Hitze im Heißluft-Sterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung² und besonders folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation

- a) Zur Sterilisation durch feuchte Hitze ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min bei (121^{+3}_0) °C gehalten werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluft-Sterilisator, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min bei (180^{+5}_0) °C, für eine Mindesthaltezeit von 1 h bei (170^{+5}_0) °C oder für eine Mindesthaltezeit von 2 h bei (160^{+5}_0) °C gehalten werden kann.

5.3.2.2 Wasserbäder, entsprechend den Prüfbedingungen einstellbar auf Temperaturen zwischen (5 ± 1) °C und (40 ± 1) °C.

5.3.2.3 Brutschrank mit CO₂-Atmosphäre, einstellbar auf (36 ± 1) °C oder (37 ± 1) °C. Falls kein Brutschrank mit CO₂-Atmosphäre zur Verfügung steht, darf ein auf (36 ± 1) °C oder (37 ± 1) °C einstellbarer Brutschrank verwendet werden.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei (20 ± 1) °C.

Für die Messung des pH-Werts der Agarmedien (5.2.2.3) sollte eine Einstichelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

5.3.2.5 Stoppuhr

5.3.2.6 Schüttelgerät

- a) Elektromechanisches Rührwerk, z. B. Vortex®-Mischer³;
- b) mechanisches Schüttelgerät.

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

Das Gerät muss mit einem Filterhalter mit einem Volumen von mindestens 50 ml ausgestattet sein. Es muss geeignet sein zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite

2 Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

3 Ein Vortex®-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.

von 0,45 µm für die Filtration von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) und Rinderserumalbumin (5.2.2.7.2 und 5.2.2.7.3) und für den Fall der Anwendung des Membranfiltrationsverfahrens (5.5.3).

Die verwendete Vakuumquelle muss eine gleichmäßige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen auf der Membran zu erreichen und einen zu lange andauernden Filtrationsvorgang zu vermeiden, muss das Gerät so eingestellt werden, dass die Filtration von 100 ml Spülflüssigkeit in 20 s bis 40 s erfolgt.

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

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

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

5.3.2.11 Glasperlen, mit einem Durchmesser von 3 mm bis 4 mm.

5.3.2.12 Messkolben.

5.3.2.13 Hochgeschwindigkeits-Homogenisator, z. B. Potter®-Gerät⁴.

5.3.2.14 Behälter, Reagenzgläser, Kolben oder Kulturflaschen mit geeignetem Fassungsvermögen.

5.3.2.15 Rührchen mit Schraubverschluss und konischem Boden.

5.4 Herstellung der Mykobakterien-Prüfsuspension und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüforganismussuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüforganismus sind zwei verschiedene Suspensionen herzustellen: die „Prüfsuspension“ zur Durchführung der Prüfung und die „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrollversuche und der Verfahrensvalidierung.

5.4.1.2 Aufbewahrung des Prüforganismus

Der Prüforganismus und die Stammkulturen müssen nach EN 12353 vorbereitet/hergestellt und aufbewahrt werden.

5.4.1.3 Gebrauchskultur des Prüforganismus

Zur Herstellung einer Gebrauchskultur des Prüforganismus (5.2.1) wird aus der Stammkultur (5.4.1.2) eine Subkultur durch Ausstreichen auf mindestens zwei Platten mit 7H10-Medium (5.2.2.3) angelegt und bebrütet (5.3.2.3). Wenn kein Brutschrank mit CO₂-Atmosphäre verwendet wird, müssen die Platten durch Verpacken in Polyethylenbeutel oder durch dichten Verschluss mit isolierendem Klebeband vor dem Austrocknen des Mediums geschützt werden.

Nach 21 Tagen wird auf die gleiche Weise aus der ersten Subkultur eine zweite Subkultur angelegt und 21 Tage bebrütet.

4 Ein Potter®-Gerät ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.

Die erste und/oder zweite Subkultur ist (sind) die Gebrauchskultur(en). Eine dritte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

Bei zusätzlichen Stämmen muss jedes Abweichen von diesem Verfahren zur Kultivierung der Mykobakterien oder zur Herstellung der Suspensionen aufgezeichnet werden, wobei die Gründe dafür im Prüfbericht anzugeben sind.

5.4.1.4 Prüfsuspension (N)

- a) Aus der Gebrauchskultur (5.4.1.3) wird eine geeignete homogene Suspension nach einem der folgenden Verfahren hergestellt:
- entweder Homogenisierung mittels Glasperlen: unter Anwendung einer Einwegöse aus Kunststoff werden die Prüforganismen von mindestens zwei Platten der Gebrauchskultur (5.4.1.3) in ein Röhrchen mit Schraubverschluss und konischem Boden (5.3.2.15) überführt, das 6 g bis 7 g trockene Glasperlen (5.3.2.11) enthält. Die Prüforganismen werden zusammen mit 2 ml Wasser (5.2.2.2) durch mindestens 5-minütiges Mischen [5.3.2.6 a)] homogenisiert, um sie homogen auf den Perlen und den meisten Anteilen der Innenfläche des Röhrchens mit Schraubverschluss zu verteilen. Tropfenweise werden 10 ml Wasser (5.2.2.2) zugegeben und die Organismen durch Mischen [5.3.2.6 a)] wieder in Suspension gebracht. Nach einer Absetzzeit von 20 min wird der Überstand in ein Röhrchen überführt.
 - oder Homogenisierung mittels des Potter-S1-Geräts: 5,0 ml Wasser (5.2.2.2) werden auf jede der Platten (mindestens zwei) der Gebrauchskultur (5.4.1.3) pipettiert und die Prüforganismen werden mit einem Glasspatel entnommen. Die gesamte Flüssigkeit von den Platten wird in ein 25-ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Bis zu 18 ml Wasser (5.2.2.2) werden zugegeben. Es werden drei aufeinanderfolgende Spülungen mit Wasser (5.2.2.2) durchgeführt (es wird jedes Mal bei etwa 2 000 g_N für 15 min zentrifugiert). Nach jedem Zentrifugieren wird der Überstand verworfen, es wird durch Mischen [5.3.2.6 a)] erneut suspendiert und mit Wasser (5.2.2.2) auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt.

Nach dem letzten Zentrifugieren wird der Überstand verworfen und das Sediment in ein 15-ml-Glasgefäß des Potter-S1-Geräts überführt. Es wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 15 ml aufgefüllt. Nach dem Durchmischen wird mit Eis gekühlt und 15 min homogenisiert.

Nach 20 min Absetzzeit, während der genügend Eis zur Kühlung zur Verfügung stehen sollte, wird der Überstand in ein Röhrchen überführt.

ANMERKUNG 1 Andere Homogenisierungsverfahren sind unter der Voraussetzung zulässig, dass die erhaltene Anzahl der koloniebildenden Einheiten je Milliliter geeignet und während der Prüfdauer stabil ist und dass die mikroskopische Untersuchung zeigt, dass die Suspension ebenso homogen ist wie nach den beiden vorstehend beschriebenen Verfahren.

Oberflächenaktive Substanzen (Tenside) dürfen nicht verwendet werden.

- b) Die Anzahl der Zellen in der (überstehenden) Suspension wird unter Verwendung von Wasser (5.2.2.2) auf $3,0 \times 10^8$ KBE/ml⁵ bis $8,0 \times 10^8$ KBE/ml eingestellt. Diese Prüfsuspension wird im Wasserbad bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufbewahrt und am Tag der Herstellung verwendet. Die Einstellung der Temperatur erfolgt nach 5.5.1.1 a) und 5.5.1.4 erst unmittelbar vor Beginn der Prüfung.

Die Verwendung eines Spektrophotometers zur Einstellung der Anzahl der Zellen wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, Küvette mit 10 mm optischer Weglänge). Jedes Laboratorium sollte deshalb eine Kalibrierkurve für jeden Prüforganismus erstellen, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte im Allgemeinen zwischen 0,200 und 0,400 zu finden sind. Um reproduzierbare Ergebnisse dieser Messung zu erreichen, kann es erforderlich sein, die Prüfsuspension zu verdünnen, z. B. 1 + 9.

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

ANMERKUNG 2 Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

- c) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit Verdünnungsmittel (5.2.2.4) Verdünnungen von 10^{-6} und 10^{-7} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].
- d) Eine Probe von je 1,0 ml von jeder Verdünnung wird als Doppelbestimmung entnommen. Jede Probe wird in zwei etwa gleiche Anteile geteilt und auf gesonderten, an der Oberfläche getrockneten Platten (5.3.2.10) ausgestrichen, die 18 ml bis 20 ml 7H10-Medium (5.2.2.3) enthalten, d. h. vier Platten für die Doppelbestimmung der 1,0-ml-Proben.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.5 Validierungssuspension (N_V)

- a) Zur Herstellung der Validierungssuspension wird die Prüfsuspension (5.4.1.4) mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) auf 3×10^2 KBE/ml bis $1,6 \times 10^3$ KBE/ml verdünnt.
- b) Zur Auszählung wird mit Verdünnungsmittel (5.2.2.4) eine Verdünnung von 10^{-1} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Eine Probe von 1,0 ml wird als Doppelbestimmung entnommen. Jede Probe wird in zwei etwa gleiche Anteile geteilt und auf gesonderten, an der Oberfläche getrockneten Platten (5.3.2.10) ausgestrichen, die 18 ml bis 20 ml 7H10-Medium (5.2.2.3) enthalten, d. h. vier Platten für die Doppelbestimmung der 1,0-ml-Proben.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.6 Bebrütung und Auszählung der Prüf- und Validierungssuspensionen

- a) Die Platten werden 21 Tage bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet (5.3.2.3). Alle nicht auszählbaren Platten werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt, um die Gesamtanzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) zu bestimmen. Danach werden die Platten weitere 7 Tage bebrütet. Platten, die keine gut voneinander abgesetzten Kolonien mehr aufweisen, dürfen nicht erneut ausgezählt werden. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt. Wenn sich die Anzahl erhöht hat, wird nur die höhere Anzahl für die weitere Auswertung verwendet.
- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird > 330 für alle Koloniezahlen über 330 aufgezeichnet, und die V_C -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der KBE/ml in der Prüfsuspension N und in der Validierungssuspension N_V wird nach dem in 5.6.2.3 bzw. 5.6.2.5 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.4.2 Produktprüflösungen

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

Produktprüflösungen müssen in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) hergestellt werden, um eine Konzentration im wirksamen Bereich und eine Konzentration im nicht wirksamen Bereich (5.8.2) einzubeziehen. Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden; in diesem Fall beträgt die höchste geprüfte Konzentration 80 %.

Verdünnungen von gebrauchsfertigen Produkten, d. h. Produkten, die bei ihrer Verwendung nicht verdünnt werden, müssen in Wasser (5.2.2.2) hergestellt werden.

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand gelöst, indem mindestens $1,0 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ des Produktes in einen Messkolben eingewogen und mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) aufgefüllt wird. Die nachfolgenden Verdünnungen (niedrigeren Konzentrationen) müssen in Messkolben (5.3.2.12) auf der Basis von Volumenanteilen mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) hergestellt werden.

Bei flüssigen Produkten müssen die Verdünnungen des Produkts mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) oder Wasser (5.2.2.2) bei gebrauchsfertigen Produkten auf der Basis von Volumenanteilen in Messkolben (5.3.2.12) hergestellt werden.

Die Produktprüflösungen müssen frisch hergestellt und innerhalb von 2 h in der Prüfung verwendet werden. Sie müssen eine physikalisch homogene Zubereitung ergeben, die während des gesamten Verfahrensablaufs stabil ist. Wenn im Verlauf des Verfahrens eine sichtbare Inhomogenität durch Bildung einer Ausfällung oder Ausflockung auftritt (zum Beispiel durch den Zusatz der Belastungssubstanz), muss dies im Prüfbericht aufgezeichnet werden.

ANMERKUNG Das Auszählen in einer Ausfällung oder Ausflockung eingebetteter Mikroorganismen ist schwierig und unzuverlässig.

Die im Prüfbericht angegebene Konzentration des Produktes muss die gewünschte Prüfkonzentration sein. Die Prüfkonzentration wird als Massenkonzentration oder Volumenkonzentration aufgezeichnet; ebenso werden Einzelheiten der Produktprobe im Lieferzustand aufgezeichnet.

5.5 Verfahren zur Beurteilung der mykobakteriziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Untersuchungsbedingungen

Die Untersuchungsbedingungen dürfen entsprechend der das Produkt vorgesehenen praktischen Anwendung (Abschnitt 4) ausgewählt werden:

a) Temperatur: θ (in °C);

Die zu prüfenden Temperaturen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt; die zulässige Abweichung für jede gewählte Temperatur beträgt ± 1 °C;

b) Einwirkzeit: t (in min und s);

Die zu prüfenden Einwirkzeiten sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt; die zulässige Abweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt ± 10 s, (außer bei 1 min, da beträgt sie ± 5 s);

c) Belastungssubstanz;

Die zu prüfende Belastungssubstanz ist in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt. Entsprechend speziellen Anwendungsgebieten dürfen zusätzliche Belastungssubstanzen geprüft werden.

d) Prüforganismus;

Die Prüforganismen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 und 5.2.1 festgelegt. Zusätzliche Prüforganismen dürfen geprüft werden.

5.5.1.2 Auswahl des Prüfverfahrens (Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren oder Membranfiltrationsverfahren)

Das Verfahren der Wahl ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (5.5.2). Um ein geeignetes Neutralisationsmedium zu bestimmen, wird die Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens (5.5.2.3, 5.5.2.4 und 5.5.2.5 in Verbindung mit 5.5.2.6) unter Verwendung eines Neutralisationsmediums durchgeführt, das nach der Erfahrung eines Laboratoriums und veröffentlichten Daten ausgewählt wurde.

Falls das Neutralisationsmedium nicht valide ist, wird die Validierungsprüfung unter Verwendung eines alternativen Neutralisationsmediums und unter Berücksichtigung der Angaben in Anhang B wiederholt.

Unter besonderen Umständen kann es notwendig sein, ein Neutralisationsmedium zum 7H10-Medium (5.2.2.3) hinzuzufügen. Falls Neutralisationsmedium zum 7H10-Medium hinzugefügt wurde, muss die gleiche Menge dem 7H10-Medium hinzugefügt werden, das im Prüfverfahren verwendet wird.

5.5.1.3 Allgemeine Anweisungen für Validierungs- und Kontrollverfahren

Die Neutralisation und/oder Aufhebung der mykobakteriziden und/oder mykobakteriostatischen Wirkung des Produkts müssen für jeden der verwendeten Prüforganismen und für jede Untersuchungsbedingung (Belastungssubstanz, Temperatur, Einwirkzeit) kontrolliert und validiert werden, und zwar nur bei der höchsten Produktprüfkonzentration.

Diese Verfahren (Kontrolle der Untersuchungsbedingung, Kontrolle des Neutralisationsmediums oder der Filtration und Verfahrensvalidierung) müssen gleichzeitig mit der Prüfung und mit dem gleichen Neutralisationsmedium – oder der gleichen Spülflüssigkeit – wie in der Prüfung durchgeführt werden.

Wenn aufgrund von Problemen bei der Neutralisation dem für die Validierungs- und Kontrollverfahren verwendete 7H10-Medium (5.2.2.3) ein Neutralisationsmedium zugesetzt wurde, muss das in der Prüfung verwendete 7H10-Medium ebenfalls die gleiche Menge dieses Neutralisationsmediums enthalten.

5.5.1.4 Temperaturangleichung

Alle Reagenzien (Produktprüflösungen (5.4.2), Prüfsuspension (5.4.1.4), Validierungssuspension (5.4.1.5), Verdünnungsmittel (5.2.2.4), Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) und Belastungssubstanz (5.2.2.7)) werden vor der Prüfung im auf θ eingestellten Wasserbad (5.3.2.2) an die Prüftemperatur [5.5.1.1 a)] angeglichen. Die Stabilisierung der Temperatur der Reagenzien bei θ wird überprüft.

Das Neutralisationsmedium (5.2.2.5) oder die Spülflüssigkeit (5.2.2.8) und das Wasser (5.2.2.2) müssen an eine Temperatur von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ angeglichen werden.

Bei gebrauchsfertigen Produkten muss das Wasser (5.2.2.2) zusätzlich an θ angeglichen werden.

5.5.1.5 Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Prüforganismen

Der obere Teil der Wandung des Reagenzglases darf bei der Zugabe der Prüf- oder Validierungssuspensionen (5.4.1) nicht berührt werden.

5.5.2 Prüfverfahren – Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren

5.5.2.1 Allgemeines

Die Prüf- sowie die Kontroll- und Validierungsverfahren (5.5.2.2 bis 5.5.2.6) müssen gleichzeitig und für jede Untersuchungsbedingung gesondert ausgeführt werden.

ANMERKUNG Zu einer graphischen Darstellung dieses Verfahrens siehe Anhang C.

5.5.2.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens-Prüfung Na — Bestimmung der mykobakteriziden Konzentration

Die Vorgehensweise zur Bestimmung der mykobakteriziden Konzentration ist wie folgt:

- a) 1,0 ml Belastungssubstanz (5.2.2.8) wird in ein Röhrchen pipettiert. Es wird 1,0 ml Prüfsuspension (5.4.1.4) zugegeben. Die Stoppuhr (5.3.2.5) wird sofort in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Röhrchen für $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in ein auf die gewählte Prüftemperatur θ [5.5.1.1 a)] eingestelltes Wasserbad gestellt.

Nach Ablauf dieser Zeit werden 8,0 ml einer der Produktprüflösungen (5.4.2) zugegeben. Bei Beginn der Zugabe wird die Stoppuhr erneut in Gang gesetzt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Röhrchen für

die gewählte Einwirkzeit t [5.5.1.1 b)] in das auf θ eingestellte Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende von t wird erneut durchmischt [5.3.2.6 a)].

- b) Nach Ablauf von t wird 1,0 ml des Prüfgemisches Na entnommen und in ein Röhrchen mit 8,0 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.5) und 1,0 ml Wasser (5.2.2.2) überführt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Röhrchen wird in das auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestellte Wasserbad gestellt. Nach einer Neutralisationszeit von $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ (bei Einwirkzeiten von 10 min oder kürzer, nach einer Neutralisationszeit von $5 \text{ min} \pm 1 \text{ s}$) wird sofort eine Probe von 1,0 ml des neutralisierten Prüfgemisches „ Na “ (das Neutralisationsmedium, Produktprüflösung, Belastungssubstanz und Prüfsuspension enthält) entnommen und in ein Reagenzglas mit 9,0 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) überführt. Eine Probe von 1,0 ml des neutralisierten und zehnfach verdünnten Prüfgemisches Na (das Neutralisationsmedium, Produktprüflösung, Belastungssubstanz und Prüfsuspension enthält) wird als Doppelbestimmung entnommen. Jede Probe wird in zwei etwa gleich große Anteile geteilt und unter Anwendung des Ausstrichplattenverfahrens auf 7H10-Platten (5.2.2.3) abgeimpft.

Bei Anwendung des Ausstrichplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe – aufgeteilt in etwa gleich große Anteile – auf einer entsprechenden Anzahl (mindestens zwei) an der Oberfläche getrockneter Platten ausgestrichen, die 7H10 enthalten.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

- c) Die Arbeitsgänge a) und b) werden unter Verwendung der anderen Produktprüflösungen zeitgleich durchgeführt.
- d) Die Arbeitsgänge a) bis c) werden unter Anwendung der anderen obligatorischen und gegebenenfalls der anderen zusätzlichen Untersuchungsbedingungen (5.5.1.1) durchgeführt.

5.5.2.3 Kontrolle der Untersuchungsbedingungen „A“ — Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimabtötender Wirkungen unter den Prüfbedingungen

Die Vorgehensweise bei der Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimabtötender Wirkungen unter den Prüfbedingungen ist wie folgt.

- a) 1,0 ml der in der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Belastungssubstanz wird in ein Röhrchen pipettiert. 1,0 ml der Validierungssuspension (5.4.1.5) wird zugegeben. Die Stoppuhr wird sofort in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Röhrchen wird für $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in ein auf θ eingestelltes Wasserbad gestellt.

Nach Ablauf dieser Zeit werden 8,0 ml Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) zugegeben. [Im Fall von gebrauchsfertigen Produkten: Wasser (5.2.2.2) anstelle von Wasser standardisierter Härte]. Bei Beginn der Zugabe wird die Stoppuhr erneut in Gang gesetzt. Nach dem Durchmischen [5.3.2.6 a)] wird das Röhrchen für t in ein auf θ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende von t wird erneut durchmischt [5.3.2.6 a)].

- b) Nach Ablauf von t wird eine Probe von 1,0 ml dieses Gemisches A als Doppelbestimmung entnommen; jede Probe wird in zwei etwa gleich große Anteile geteilt und unter Anwendung des Ausstrichplattenverfahrens auf 7H10-Platten (5.2.2.3) abgeimpft.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

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

Die Vorgehensweise bei der Verifizierung des Nichtvorliegens einer Toxizität des Neutralisationsmediums ist wie folgt:

- a) 8,0 ml des in der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Neutralisationsmediums und 1,0 ml Wasser (5.2.2.2) werden in ein Röhrchen pipettiert. 1,0 ml der Validierungssuspension (5.4.1.5) wird zugegeben. Die Stoppuhr

E DIN EN 14204:2024-06
prEN 14204:2024 (D)

wird bei Beginn der Zugabe in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Röhrchen wird für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende dieser Zeit wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

- b) Nach Ablauf dieser Zeit wird eine Probe dieses Gemisches *B* von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen; jede Probe wird in zwei etwa gleich große Anteile geteilt und unter Anwendung des Ausstrichplattenverfahrens auf 7H10-Platten (5.2.2.3) abgeimpft.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

5.5.2.5 Verfahrensvalidierung C — Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens

Die Vorgehensweise bei der Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens ist wie folgt.

- a) 1,0 ml der in der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Belastungssubstanz wird in ein Röhrchen pipettiert. Zugewogen werden 1,0 ml des Verdünnungsmittels (5.2.2.4) und dann, unter in Gang setzen einer Stoppuhr, 8,0 ml der Produktprüflösung lediglich der höchsten in der Prüfung (5.5.2.29) verwendeten Konzentration. Nach dem Durchmischen [5.3.2.6 a)] wird das Röhrchen für t in ein auf θ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende von t wird erneut durchmischt [5.3.2.6 a)].
- b) Nach Ablauf von t wird 1,0 ml des Gemisches in ein Röhrchen mit 8,0 ml des Neutralisationsmediums (5.2.2.5) überführt. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe sofort wieder in Gang gesetzt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)], und das Röhrchen wird für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ (bei Einwirkzeiten von 10 min oder kürzer nach $10 \text{ s} \pm 1 \text{ s}$) in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. 1,0 ml der Validierungssuspension (5.4.1.5) wird zugegeben. Bei Beginn der Zugabe wird eine Stoppuhr in Gang gesetzt und es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Das Röhrchen wird für die Einwirkzeit t in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende dieser Zeit wird erneut durchmischt [5.3.2.6 a)]. Nach Ablauf dieser Zeit wird eine Probe des Gemisches *C* von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen, jede Probe wird in zwei etwa gleich große Anteile geteilt und unter Anwendung des Ausstrichplattenverfahrens auf 7H10-Platten (5.2.2.3) abgeimpft.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

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

Die Vorgehensweise bei der Bebrütung und Auszählung des Prüfgemisches und der Kontroll- und Validierungsgemische ist wie folgt.

- a) Die Platten werden 21 Tage bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die (aus irgendeinem Grund) nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die KBE auf den Platten werden gezählt, um die Anzahl der koloniebildenden Einheiten zu bestimmen. Die Platten werden weitere 7 Tage bebrütet. Platten, die keine gut voneinander abgesetzten Kolonien mehr aufweisen, dürfen nicht erneut ausgezählt werden. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt. Wenn sich die Anzahl erhöht hat, wird nur die höhere Koloniezahl für die weitere Auswertung verwendet.
- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird > 330 für alle Koloniezahlen über 330 aufgezeichnet, und die V_C -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der KBE/ml im Prüfgemisch *Na* und in den Validierungsgemischen *A*, *B* und *C* wird nach dem in 5.6.2.4 und 5.6.2.5 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.5.3 Prüfverfahren – Membranfiltrationsverfahren

5.5.3.1 Allgemeines

Die Prüf- sowie die Kontroll- und Validierungsverfahren (5.5.3.2 bis 5.5.3.6) müssen gleichzeitig und für jede Untersuchungsbedingung (5.5.1.1) gesondert ausgeführt werden.

Jedes Membranfiltrationsgerät muss mit einer Membran mit einer Porenweite von 0,45 µm und einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm (5.3.2.7) ausgestattet und mit 50 ml der Spülflüssigkeit (5.2.2.8) gefüllt sein. Die für die Filtration erforderliche Zeit muss — falls sie in Ausnahmefällen mehr als eine Minute beträgt — im Prüfbericht angegeben werden. Beim Überführen der Membranen auf die Oberfläche einer Agarplatte sollte sorgfältig darauf geachtet werden, dass sichergestellt wird, dass sich die Prüforganismen beim Auflegen auf die Platte auf der oberen Seite der Membran befinden und dass ein Lufteinschluss zwischen Membran und Agaroberfläche vermieden wird.

5.5.3.2 Prüfung *Na* — Bestimmung der mykobakteriziden Konzentration

Die Vorgehensweise bei der Bestimmung der bakteriziden Konzentrationen ist wie folgt.

- a) Siehe 5.5.2.2 a).
- b) Nach Ablauf von t wird eine 0,1-ml-Probe des Prüfgemisches *Na* als Doppelbestimmung entnommen und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.3.2.7) überführt. Es wird sofort filtriert.

Unverzüglich wird eine weitere 1,0-ml-Probe des Prüfgemisches *Na* entnommen und in ein Röhrchen mit 9,0 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) überführt, es wird durchmischt, eine 0,1-ml-Probe des Prüfgemisches Na^{-1} wird als Doppelbestimmung entnommen und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.3.2.7) überführt.

Bei allen Filtrationen werden mindestens 150 ml, jedoch nicht mehr als 500 ml der Spülflüssigkeit (5.2.2.8) durchfiltriert. Wenn die Spülflüssigkeit kein Wasser ist, wird das Verfahren durch Filtrieren von 50 ml Wasser (5.2.2.2) abgeschlossen. Anschließend wird jede der Membranen auf die Oberfläche gesonderter Platten mit 7H10-Medium überführt.

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

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

Die Vorgehensweise bei der Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimabtötender Wirkungen unter den Prüfbedingungen ist wie folgt.

- a) Siehe 5.5.2.3 a).
- b) Nach Ablauf von t wird eine 1,0-ml-Probe dieses Gemisches *A* als Doppelbestimmung entnommen und jede 1,0-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.3.2.7) überführt. Es wird sofort und zusätzlich mit 50 ml Wasser (5.2.2.2) filtriert. Anschließend wird jede der Membranen auf die Oberfläche gesonderter Platten mit 7H10-Medium (5.2.2.3) überführt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6

5.5.3.4 Kontrolle der Filtration *B* — Validierung des Filtrationsverfahrens

Zur Validierung des Filtrationsverfahrens wird wie folgt verfahren.

- a) 0,1 ml der Validierungssuspension (5.4.1.5) wird als Doppelbestimmung entnommen und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.3.2.7) überführt.

- b) Es wird sofort filtriert. Die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) wird auf die gleiche Weise durchfiltriert wie bei der Prüfung [5.5.3.2 b)]. Wenn die Spülflüssigkeit kein Wasser ist, wird das Verfahren durch Filtrieren von 50 ml Wasser (5.2.2.2) abgeschlossen. Anschließend wird jede der Membranen auf die Oberfläche gesonderter Platten mit 7H10-Medium (5.2.2.3) überführt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6

5.5.3.5 Verfahrensvalidierung C — Validierung des Membranfiltrationsverfahrens oder Auszählung der Bakterien auf den Membranen, die zuvor mit dem Gemisch aus Produkt und Belastungssubstanz in Kontakt waren

Die Vorgehensweise bei der Validierung des Membranfiltrationsverfahrens oder der Auszählung der Bakterien auf den Membranen, die zuvor mit dem Gemisch aus Produkt und Belastungssubstanz in Kontakt waren, ist wie folgt.

- a) Siehe 5.5.2.5 a).
- b) Nach Ablauf von t wird 0,1 ml des Validierungsgemisches C als Doppelbestimmung entnommen und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Es wird sofort filtriert. Die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) wird auf die gleiche Weise durchfiltriert wie bei der Prüfung [5.5.3.2 b)], dann werden die Membranen mit 50 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) bedeckt und es wird 0,1 ml der Validierungssuspension (5.4.1.5) hinzugefügt. Es wird erneut sofort und zusätzlich mit 50 ml Wasser (5.2.2.2) filtriert; anschließend wird jede der Membranen auf die Oberfläche gesonderter Platten mit 7H10-Medium (5.2.2.3) überführt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6

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

Die Vorgehensweise bei der Bebrütung und Auszählung des Prüfgemisches und der Kontroll- und Validierungsgemische ist wie folgt.

- a) Die Platten werden 21 Tage bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die (aus irgendeinem Grund) nicht auszählbar sind, werden verworfen. Auf den Membranen werden die Kolonien ausgezählt.
- Die Platten werden weitere 7 Tage bebrütet. Platten, die keine gut voneinander abgesetzten Kolonien mehr aufweisen, dürfen nicht erneut ausgezählt werden. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt. Wenn sich die Anzahl erhöht hat, wird nur die höhere Anzahl für die weitere Auswertung verwendet.
- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird > 165 für alle Koloniezahlen über 165 aufgezeichnet, und die V_C -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten je Milliliter (KBE/ml) im Prüfgemisch N_a und in den Validierungsgemischen A , B und C wird nach den in 5.6.2.4 und 5.6.2.5 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.6 Versuchsdaten und Berechnung

5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen

5.6.1.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen und Prüfgemische

N und N_v sind die Mykobakteriensuspensionen, N_a ist das mykobakterizide Prüfgemisch, A (Kontrolle der Untersuchungsbedingungen), B (Kontrolle des Neutralisationsmediums oder der Filtration) und C (Verfahrensvalidierung) sind die verschiedenen Kontrollprüfgemische.

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

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

	Anzahl der Zellen je ml in den Mykobakterien-suspensionen	Anzahl der Zellen je ml in den Prüfgemischen zu Beginn der Einwirkzeit (Zeit = 0)	Anzahl der überlebenden Zellen je ml in den Prüfgemischen nach Ablauf der Einwirkzeit t (A) oder nach 5 min (B) oder 60 min (C)
Prüfung	N Prüfsuspension	$N_0 (= N/10)$	N_a (vor der Neutralisation)
Kontrollen	N_v Validierungssuspension	$N_{V0} (= N_v/10)$	A, B, C

5.6.1.2 V_C -Werte

Alle Versuchsdaten werden im Bericht als V_C -Werte angegeben:

- beim Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (Prüfung und Kontrollen) ist ein V_C -Wert die Anzahl der je 1,0-ml-Probe gezählten koloniebildenden Einheiten;
- beim Membranfiltrationsverfahren ist ein V_C -Wert die Anzahl der je 0,1-ml-Probe des Prüfgemischs N_a , bei der Filtrationskontrolle B und der Verfahrensvalidierung C sowie je 1,0-ml-Probe bei der Kontrolle der Untersuchungsbedingungen A gezählten koloniebildenden Einheiten.

5.6.2 Berechnung

5.6.2.1 Allgemeines

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

5.6.2.2 Bestimmung der V_C -Werte

Die V_C -Werte werden wie folgt bestimmt.

- a) Die üblichen Grenzwerte für die Auszählung von Mykobakterien auf Agarplatten liegen zwischen 15 und 300. In diesem Dokument ist eine Abweichung von 10 % zulässig, so dass die Grenzwerte 14 und 330 betragen. Auf Membranen weichen die üblichen oberen Grenzwerte ab: 150; folglich beträgt bei einer Abweichung von 10 % der Grenzwert 165.

ANMERKUNG Grundlage für den unteren Grenzwert (14) ist die Tatsache, dass die Variabilität zunimmt, je kleiner die in der Probe (1 ml oder 0,1 ml) gezählte Anzahl ist, und dass deshalb 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, 165) spiegeln die Ungenauigkeit beim Zählen konfluenter (zusammenfließender) Kolonien und die 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 (5.4.1.4), der Validierungssuspension N_v (5.4.1.5) und für alle Keimzahlen beim Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (5.5.2) werden die V_C -Werte entsprechend der Anzahl der je 1 ml Probe verwendeten Platten bestimmt und aufgezeichnet (5.6.1.2).