

DIN EN 14349



ICS 71.100.35

Entwurf

Einsprüche bis 2023-03-06
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 14349:2013-02

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Oberflächenversuch zur Bestimmung der bakteriziden
Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den
Veterinärbereich auf nicht-porösen Oberflächen ohne mechanische
Wirkung –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche und Englische Fassung prEN 14349:2022**

Chemical disinfectants and antiseptics –

Quantitative surface test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area on non-porous surfaces without mechanical action –

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

German and English version prEN 14349:2022

Antiseptiques et désinfectants chimiques –

Essai quantitatif de surface pour l'évaluation de l'activité bactéricide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire sur des surfaces non poreuses sans action mécanique;

Version allemande et anglaise prEN 14349:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-01-06 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

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

Gesamtumfang 79 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 14349:2022) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

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

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

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

Änderungen

Gegenüber DIN EN 14349:2013-02 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Harmonisierung der Struktur und des Wortlautes mit anderen (bereits bestehenden oder in Vorbereitung befindlichen) Prüfverfahren des CEN/TC 216 sowie Verbesserung der Lesbarkeit der Norm, um sie dadurch verständlicher zu machen;
- b) Unterabschnitt 3.2 „Symbole und Abkürzungen“ neu aufgenommen;
- c) Tabelle 1 wurde geändert;
- d) Literaturhinweise wurden erweitert;
- e) Norm redaktionell überarbeitet und an die derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Oberflächenversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich auf nicht-porösen Oberflächen ohne mechanische Wirkung – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)

Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative surface test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area on non-porous surfaces without mechanical action – Test method and requirements (phase 2, step 2)

Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai quantitatif de surface pour l'évaluation de l'activité bactéricide des antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire sur des surfaces non poreuses sans action mécanique

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe und Abkürzungen	6
3.1 Begriffe	6
3.2 Symbole und Abkürzungen	6
4 Anforderungen	7
5 Prüfverfahren	8
5.1 Kurzbeschreibung	8
5.2 Materialien und Reagenzien	8
5.2.1 Prüforganismen	8
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	8
5.2.3 Prüfoberfläche	11
5.3 Geräte und Glasgeräte	11
5.3.1 Allgemeines	11
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	12
5.4 Herstellung der Prüforganismensuspensionen und der Produktprüflösungen	13
5.4.1 Prüforganismensuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)	13
5.4.2 Produktprüflösungen	14
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produkts	15
5.5.1 Allgemeines	15
5.5.2 Prüfverfahren (Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren)	16
5.5.3 Beurteilung des Agars mit den Prüfoberflächen	21
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	21
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen	21
5.6.2 Berechnung	22
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 und Präzision	25
5.8.1 Reduktion	25
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	26
5.8.3 Limitierender Prüforganismus und bakterizide Konzentration	26
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	26
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	26
5.9.1 Allgemeines	26
5.9.2 Bakterizide Wirkung für allgemeine Zwecke	26
5.9.3 Eignung für bestimmte Anwendungsgebiete	27
5.10 Prüfbericht	27
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	29
Anhang B (informativ) Beispiele von Neutralisationsmedien für die verbleibende antimikrobielle Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika	30
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung des Verfahrens	32
Anhang D (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht	36
Literaturhinweise	39

Bilder

Bild 1 — Beimpfter Keimträger	17
Bild 2 — Sichtbar trockenes Inokulum	17
Bild 3 — Auf beimpften Keimträger aufgebrachtes Produkt	18
Bild C.1 — Prüfung (Na)	32
Bild C.2 — Kontrollversuch mit Wasser (Nw)	33
Bild C.3 — Validierung — Kontrolle hinsichtlich der Toxizität des Neutralisationsmediums (B) .	34
Bild C.4 — Validierung — Verfahrensvalidierung (C)	35

Tabellen

Tabelle 1 — Prüfbedingungen	7
Tabelle 2 — Anzahl der je 0,025 ml oder Prüfoberfläche in den unterschiedlichen Prüfgemischen ausgezählten Zellen	21
Tabelle B.1	30

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 14349:2023) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 14349:2012 ersetzen.

Durch die Verwendung der früheren Fassung EN 14349 erhaltene Daten dürfen weiter verwendet werden.

Das Dokument wurde überarbeitet, um offensichtliche Fehler und Zweideutigkeiten zu beheben, den Aufbau und die Formulierungen mit dem/denen weiteren Prüfungen des CEN/TC 216 (bestehend oder in Vorbereitung) zu harmonisieren sowie die Lesbarkeit der Norm und damit ihre Verständlichkeit zu verbessern.

Einleitung

Dieses Dokument legt einen Oberflächenversuch zur Ermittlung fest, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum in dem/den im Anwendungsbereich beschriebenen Bereich und Gebieten eine bakterizide 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 Laboren und Produktarten ermöglichen. Jede in dieser Prüfung festgestellte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht den festgelegten Untersuchungsbedingungen. Für einige Anwendungszwecke können die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt jedoch abweichen und deshalb müssen zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die bakterizide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte oder — im Fall gebrauchsfertiger Produkte — mit Wasser eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung bilden.

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 im Veterinärbereich zur Desinfektion nicht-poröser Oberflächen ohne mechanische Wirkung angewendet werden, d. h. bei der Aufzucht, Haltung, Produktion 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 Dieses Verfahren entspricht einer Prüfung der Phase 2, Stufe 2.

Dieses Verfahren schließt die Bewertung der Wirkung gegen Hefen, Pilzsporen, Mykobakterien und bakterielle Sporen aus.

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 und Abkürzungen

3.1 Begriffe

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

3.2 Symbole und Abkürzungen

c	die Summe der berücksichtigten V_C -Werte
KBE	koloniebildende Einheiten
d	die berücksichtigte Verdünnungsstufe, Verdünnungsfaktor für die geringere Verdünnung
n	die Anzahl der berücksichtigten V_C -Werte
N	Anzahl der Zellen je ml in der Prüfsuspension
N_w	Anzahl der von der Prüfoberfläche gewonnenen KBE im Kontrollversuch mit Wasser
B	Auszählung der KBE in der Kontrolle des Neutralisationsmediums
N_a	Anzahl der von der Prüfoberfläche gewonnenen KBE im Versuch
C	Auszählung der KBE in der Verfahrensvalidierung

N_{ts}	Anzahl der auf der Prüfoberfläche verbleibenden koloniebildenden Einheiten
R	Reduktion
V	das auf die Platte abgeimpfte Volumen, angegeben in ml
Nv	die Validierungssuspension

4 Anforderungen

Bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) 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 g/l Rinderserumalbumin) oder Verschmutzung hohen Grades (10 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Rinderserumalbumin) auf einer Oberfläche muss für das Produkt eine dezimal-logarithmische (lg-)Reduktion um mindestens 4 Stufen nachgewiesen werden.

Tabelle 1 — Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Bakterizide Wirkung auf nicht-porösen Oberflächen ohne mechanische Wirkung im Veterinärbereich
Mindestspektrum an Prüforganismen	<i>Enterococcus hirae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
zusätzlich	jeder relevante Prüforganismus
Prüftemperatur	Entsprechend der Empfehlung des Herstellers, jedoch zwischen
Mindestens	4 °C ± 1 °C
Höchstens	40 °C ± 1 °C
	In Intervallen von 5 °C
Einwirkzeit	
Mindestens	1 min ± 5 s
Höchstens	120 min ± 10 s
	In Intervallen von 30 s von 30 s bis 5 min und in Intervallen von 5 min von 5 min bis 120 min
Belastungssubstanz	
Verschmutzung niedrigen Grades	3,0 g/l Rinderserumalbumin
Verschmutzung hohen Grades	10 g/l Hefeextrakt plus 10 g/l Rinderserumalbumin
zusätzlich	jede relevante Substanz
Die in dieser Tabelle angegebenen Einwirkzeiten für Oberflächendesinfektionsmittel werden auf der Grundlage der praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts ausgewählt. Die empfohlene Einwirkzeit für die Anwendung des Produktes liegt in der Verantwortung des Herstellers. ANMERKUNG Bei den zusätzlichen Bedingungen kann die als Ergebnis festgelegte Konzentration niedriger sein als die unter den Mindestprüfbedingungen erhaltene Konzentration.	

Jede zusätzliche spezifische bakterizide Wirkung muss nach 5.2.1 und 5.5.1.1 bestimmt werden, um besondere bestimmungsgemäße Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Eine Prüfsuspension von Bakterien in einer Lösung mit Belastungssubstanzen (5.2.2.7) wird auf eine Prüfoberfläche aus nichtrostendem Stahl abgeimpft und trocknen gelassen. Eine Probe des zu prüfenden Produkts wird so aufgebracht, dass sie die getrockneten Prüforganismen vollständig bedeckt. Die Oberfläche wird bei der in Abschnitt 4 und 5.5.2 festgelegten Temperatur und Einwirkzeit gehalten. Nach Ablauf der Einwirkzeit wird die Oberfläche in ein zuvor validiertes Neutralisationsmedium überführt, um jegliche Produktwirkung unverzüglich zu unterdrücken. Die Anzahl überlebender Prüforganismen, die von der Oberfläche zurückgewonnen werden können, wird quantitativ bestimmt.

Des Weiteren wird die Anzahl der Bakterien auf einer Prüfoberfläche bestimmt, die statt mit dem zu prüfenden Produkt mit Wasser standardisierter Härte (oder im Falle von gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser) behandelt wurde, und die durch das Produkt bewirkte Reduktion der Lebendkeimzahl wird als Differenz zwischen den Ergebnissen der beiden Prüfoberflächen berechnet.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

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

- *Enterococcus hirae*;
- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Staphylococcus aureus*.

ANMERKUNG Bezüglich Verweisungen auf Stämme in einigen Kultursammlungen siehe Anhang A.

Die erforderliche Bebrütungstemperatur für diese Prüforganismen liegt bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ oder $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (5.3.2.3). Für alle während eines Versuchs sowie dessen 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 Prüflabor oder der nationalen Kultursammlung für fünf Jahre als Referenzprobe zurückgestellt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in dieser Norm angegebenen Massen chemischer Substanzen beziehen sich auf die wasserfreien Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um daraus folgende Differenzen in den relativen Molekülmassen zu berücksichtigen.

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

Wenn die zusätzlichen Stämme nicht auf den Kulturmedien (5.2.2.3) wachsen oder nicht mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) verwendet werden können, müssen zusätzliche Medien verwendet und im Prüfbericht angegeben werden, ebenso wie zusätzliche Bebrütungsbedingungen.

Zur Verbesserung der Vergleichspräzision wird empfohlen, handelsübliche wasserfreie Materialien zur Herstellung von Kulturmedien zu verwenden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Produkte sollten genauestens eingehalten werden.

Gebrauchsfertige Medien dürfen verwendet werden, wenn sie mit den notwendigen Anforderungen übereinstimmen.

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

5.2.2.2 Wasser

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

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Eine Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG Das Verfahren zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte ist in 5.2.2.6 beschrieben.

5.2.2.3 Trypton-Soja-Agar (TSA)

Trypton-Soja-Agar, bestehend aus:

- Trypton, pankreatisch verdautes Casein 15,0 g;
- Sojapepton, papainisch verdautes Sojabohnenmehl 5,0 g;
- Natriumchlorid (NaCl) 5,0 g;
- Agar 15,0 g;
- Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml.

Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

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

Wenn Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auftreten, ist es möglicherweise erforderlich, dem TSA Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält eine Anleitung zu den Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen. Es wird empfohlen, kein Neutralisationsmedium zu verwenden, das zu einer Trübung im Agar führt.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

- Trypton, pankreatisch verdautes Casein 1,0 g;
- Natriumchlorid (NaCl) 8,5 g;
- Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml.

Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Verdünnungsmittels, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, $7,0 \pm 0,2$ 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. Das Neutralisationsmedium muss steril sein.

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

5.2.2.6 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 verdünnt. Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird mit Wasser (5.2.2.2) unter aseptischen Bedingungen 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 verdünnt. 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 verdünnt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.4). 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 zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte, angegeben als Calciumcarbonat (CaCO_3), im Reagenzglas unter 375 mg/l.

5.2.2.7 Belastungssubstanzen

5.2.2.7.1 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 Doppelten der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

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

ANMERKUNG Der Begriff „Belastungssubstanz“ wird auch dann verwendet, wenn es sich um mehrere Substanzen handelt.

5.2.2.7.2 Verschmutzung niedrigen Grades (Rinderserumalbumin-Lösung)

0,6 g Rinderserumalbumin V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) werden in 100 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst.

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) beträgt 3 g/l.

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

In einem 250-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 10 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. Das Gemisch wird in eine saubere, trockene Flasche überführt und im Autoklaven [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Danach wird auf $20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ abkühlen gelassen.

25 ml dieser Lösung werden in einen 50-ml-Messkolben (5.3.2.12) pipettiert und 10 ml Wasser (5.2.2.2) zugegeben. 1 g Rinderserumalbumin, Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) wird unter Schütteln in der Lösung im Kolben 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; das Gemisch wird in 10-ml-Portionen im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verwendet.

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

5.2.3 Prüfoberfläche

Scheiben aus nichtrostendem Stahl 304 (von 2 cm Durchmesser) (Literaturhinweise [2], [3]), beidseitig auf Grad 2b poliert. Die Oberflächen sollten eben sein.

Die Oberflächen sollten nur einmal verwendet werden und es darf nur eine Seite der Scheibe verwendet werden. Die Scheiben dürfen nur mit der Pinzette gehandhabt werden.

Vor der Verwendung sollten die Oberflächen für 60 min in ein Becherglas (Mindestfassungsvermögen 50 ml) gelegt werden, das mindestens 20 ml Decon[®] 1 mit einer Volumenkonzentration von 5 % enthält. Die Scheiben werden unverzüglich 10 s mit Wasser (5.2.2.2) gespült.

Die Oberfläche darf zwischenzeitlich in keiner Weise trocknen. Die Scheiben werden weitere 10 s mit Wasser gespült, um die vollständige Beseitigung des Detergens sicherzustellen. Um einen ausreichenden Wasserfluss bereitzustellen, kann ein steriles, Flüssigkeit spendendes Druckgefäß mit passenden Schläuchen und Anschlüssen oder ein anderes geeignetes Verfahren verwendet werden, welches so reguliert wird, dass es etwa 2 000 ml Wasser je min abgibt. Die sauberen Scheiben werden für 15 min in ein Bad mit Isopropanol mit einer Volumenkonzentration von 70 % gelegt. Die Scheiben werden herausgenommen und durch Verdunsten unter laminarem Luftstrom (5.3.2.15) getrocknet.

5.3 Geräte und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme steril gelieferter werden alle Glasgeräte und alle Geräteteile, die mit den Kulturmedien und Reagenzien oder der Probe in Berührung kommen, 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)].

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

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²

Und besonders folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation (feuchte und trockene Hitze)

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, wie durch die Prüfbedingungen gefordert, und (45 ± 1) °C (um den TSA im verflüssigten Zustand zu halten, beim Gussplattenverfahren).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf (36 ± 1) °C oder (37 ± 1) °C (5.2.1).

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

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

5.3.5.6 Stoppuhr.

5.3.5.7 Schüttelgeräte

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

5.3.5.8 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem Material, das mit den zu filtrierenden Substanzen verträglich ist, mit einem Filterhalter von mindestens 50 ml Nutzvolumen und geeignet zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von 0,45 µm für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) und Rinderserumalbumin (5.2.2.7.2 und 5.2.2.7.3).

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

5.3.5.10 Messpipetten, mit einem Nennvolumen von 10 ml, 1 ml, 0,1 ml und 0,05 ml, oder kalibrierte automatische Pipetten.

5.3.5.11 Petrischalen, (Platten) mit einem Durchmesser von 90 mm bis 100 mm.

5.3.5.12 Glasperlen, (Durchmesser von 3 mm bis 4 mm).

5.3.5.13 Messkolben.

5.3.5.14 Temperaturregelte Kammer, einstellbar auf Prüftemperaturen.

5.3.5.15 Behälter: Reagenzgläser, Kulturflaschen oder Kolben mit geeignetem Fassungsvermögen

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 Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produkts durch CEN.

5.3.5.16 Laminarer Luftstrom: Mikrobiologische Sicherheitswerkbank mit gefilterter laminarer Luftströmung

5.4 Herstellung der Prüfor organismsuspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüfor organismsuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüfor organismus muss eine Suspension hergestellt werden: diese wird als „Prüfsuspension“ der Bakterien zur Durchführung der Prüfung und als „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrollversuche und der Verfahrensvalidierung verwendet.

5.4.1.2 Stammkulturen von Prüfor organismen

Die Prüfor organismen und deren Stammkulturen müssen nach EN 12353 hergestellt und aufbewahrt werden.

5.4.1.3 Gebrauchskultur der Prüfor organismen

Zur Herstellung der Gebrauchskultur der Prüfor organismen (5.2.1) wird aus der Stammkultur (5.4.1.2) eine Subkultur durch Ausstreichen auf Schrägagar oder Platten aus TSA (5.2.2.3) angelegt und bebrütet (5.3.2.3). Nach 18 h bis 24 h wird aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise eine zweite Subkultur angelegt und 18 h bis 24 h bebrütet. Aus dieser zweiten Subkultur darf auf die gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden. Die zweite und (falls angelegt) dritte Subkultur ist (sind) die Gebrauchskultur(en).

Wenn es nicht möglich ist, die zweite Subkultur an einem bestimmten Tag anzulegen, darf eine 48-h-Subkultur für die nachfolgenden Subkulturen unter der Voraussetzung verwendet werden, dass die Subkultur während der 48 h im Brutschrank (5.3.2.3) verblieben ist.

Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

Bei zusätzlichen Prüfor organismen müssen alle Abweichungen von diesem Verfahren zur Kultivierung der Bakterien oder zur Herstellung der Suspensionen aufgezeichnet werden, wobei die Gründe dafür im Prüfbericht anzugeben sind.

5.4.1.4 Prüfsuspension („N“)

- a) Es werden 10 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) in einen 100-ml-Kolben (5.3.2.12) gegeben. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3) werden ösenweise Zellen in das Verdünnungsmittel (5.2.2.4) überführt. Die Suspension der Zellen im Verdünnungsmittel sollte erfolgen, indem die Öse an der feuchten Wand des Kolbens gerieben wird, um die Zellen vor dem Eintauchen in das Verdünnungsmittel voneinander zu trennen. Mit dem mechanischen Schüttelgerät [5.3.2.6 b)] wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird von den Glasperlen abgesaugt und in ein Röhrchen überführt.
- b) Mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) wird die Zellzahl in der Suspension auf $1,5 \times 10^9$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^9$ KBE/ml⁴ eingestellt, wobei die Anzahl der KBE/ml mit einem Spektralphotometer oder einem anderen geeigneten Verfahren geschätzt wird. Diese Suspension wird im Wasserbad bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufbewahrt und innerhalb von 2 h verwendet.

Die Einstellung der Temperatur erfolgt nach [5.5.1.1 a)] und 5.5.1.4 erst unmittelbar vor Beginn der Prüfung.

- c) Zur Auszählung der Bakterien-Prüfsuspension werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) Verdünnungen von 10^{-7} und 10^{-8} hergestellt.

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

Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

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

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf (45 ± 1) °C abgekühlter TSA (5.2.2.3) zugegeben;
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe — in Anteile etwa gleicher Größe aufgeteilt — auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) von an der Oberfläche getrockneten TSA-Platten (5.2.2.3) ausgestrichen.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.5 Bebrütung und Auszählung der Prüf- und Validierungssuspensionen

- a) Die Platten werden 20 h bis 24 h bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die aus irgendeinem Grund nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die KBE auf den Platten werden ausgezählt und die Gesamtanzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wird bestimmt. Die Platten werden weitere 20 h bis 24 h 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 für die weitere Auswertung nur die höhere Koloniezahl verwendet.
- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird > 330 für alle Koloniezahlen über 330 aufgezeichnet; die V_C -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der KBE je 0,025 ml in der Prüfsuspension N wird nach den in 5.6.2.3 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

ANMERKUNG Auf die Oberfläche werden 0,05 ml eines Gemisches gegeben, das zu gleichen Teilen aus der Prüfsuspension und der Belastungssubstanz besteht, folglich werden 0,025 ml Prüfsuspension hinzugegeben.

5.4.2 Produktprüflösungen

Produktprüflösungen müssen in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) hergestellt werden, um eine Konzentration im wirksamen Bereich und eine Konzentration im unwirksamen Bereich (5.8.2) zu erfassen. Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden. Verdünnungen von gebrauchsfertigen Produkten, d. h. Produkten, die zur Anwendung nicht verdünnt werden, müssen mit Wasser (5.2.2.2) anstelle von Wasser standardisierter Härte hergestellt werden.

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand gelöst, indem mindestens $1,0 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ des Produkts in einen Messkolben eingewogen wird und dieser mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) aufgefüllt wird. Die nachfolgenden Verdünnungen (= niedrigere Konzentrationen) müssen in Messkolben (5.3.2.12) im Verhältnis Volumen zu Volumen mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) hergestellt werden.

Bei flüssigen Produkten müssen die Verdünnungen des Produkts mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) in Messkolben (5.3.2.12) im Verhältnis Volumen zu Volumen 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.

Die im Prüfbericht angegebene Konzentration des Produkts muss die gewünschte Prüfkonzentration sein. Die Prüfkonzentration wird als Massenkonzentration oder Volumenanteil/-Konzentration angegeben; ebenso werden Einzelheiten der Produktprobe im Lieferzustand angegeben.

5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Untersuchungsbedingungen

Die Untersuchungsbedingungen dürfen entsprechend der für 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):

Die zu prüfenden Einwirkzeiten sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt.

Die zulässige Abweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt ± 10 s, außer bei 1 min oder weniger, hier gilt ± 5 s.

c) Belastungssubstanz:

Die zu prüfenden Belastungssubstanzen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1, festgelegt.

d) Prüforganismen:

Enterococcus hirae, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* (Abschnitt 4, Tabelle 1 und 5.2.1).

Zusätzliche Prüforganismen dürfen geprüft werden.

5.5.1.2 Neutralisation

Zur Bestimmung eines geeigneten Neutralisationsmediums wird die Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens (5.5.2.4 und 5.5.2.5 in Verbindung mit 5.5.2.6) mit einem geeigneten Neutralisationsmedium durchgeführt, das nach der Erfahrung des Labors und veröffentlichten Daten ausgewählt wird.

Ist dieses Neutralisationsmedium nicht geeignet, wird die Validierungsprüfung mit einem alternativen Neutralisationsmedium unter Berücksichtigung der Angaben in Anhang B wiederholt.

Unter bestimmten Umständen kann es erforderlich sein, dem TSA (5.2.2.3) Neutralisationsmedium hinzuzufügen.

5.5.1.3 Allgemeine Anweisungen für Validierungs- und Kontrollverfahren

Die Neutralisation und/oder Aufhebung der bakteriziden und/oder bakteriostatischen Wirkung des Produkts müssen/muss 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 (Kontrollversuch mit Wasser, Kontrolle des Neutralisationsmediums und Verfahrensvalidierung) müssen gleichzeitig mit der Prüfung und mit dem gleichen Neutralisationsmedium wie in der Prüfung durchgeführt werden.

Wenn aufgrund von Problemen bei der Neutralisation dem für die Validierungs- und Kontrollverfahren verwendeten TSA (5.5.1.2) ein Neutralisationsmedium zugesetzt wurde, muss der für die Prüfung verwendete TSA ebenfalls die gleiche Menge dieses Neutralisationsmediums enthalten.

5.5.1.4 Temperaturangleichung

Die beimpften und getrockneten Scheiben aus nichtrostendem Stahl sowie alle Reagenzien (Produktprüflösungen (5.4.2), Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6)) werden vor der Prüfung im Wasserbad (5.3.2.2) und/oder in der temperaturgeregelten Kammer (5.3.2.13), eingestellt auf θ , an die Prüftemperatur θ [5.5.1.1 a)] angeglichen. Die Stabilisierung der Temperatur der Reagenzien bei θ wird überprüft.

Das Neutralisationsmedium (5.2.2.5) und das Verdünnungsmittel (5.2.2.4) müssen auf eine Temperatur von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestellt werden.

5.5.2 Prüfverfahren (Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren)⁵

5.5.2.1 Allgemeines

Das Prüfverfahren sowie die Kontroll- und Validierungsverfahren (5.5.2.2, 5.5.2.3, 5.5.2.4 und 5.5.2.5) müssen gleichzeitig durchgeführt werden.

5.5.2.2 Prüfung „ N_a “ — Bestimmung der bakteriziden Konzentrationen

Der Verfahrensablauf zur Bestimmung bakterizider Konzentrationen ist wie folgt:

- a) Zur Herstellung einer mikrobiellen Prüfsuspension wird 1,0 ml Belastungssubstanz (5.2.2.7) in ein Reagenzglas pipettiert. Es wird 1,0 ml Prüfsuspension (5.4.1.5) zugegeben. Die Stoppuhr (5.3.2.5) wird sofort in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas für $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in ein Wasserbad oder eine temperaturgeregelte Kammer, eingestellt auf die gewählte Prüftemperatur θ [5.5.1.1 a)], gestellt.

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

- b) Die Prüfoberflächen (5.2.3) werden in eine sterile Petrischale (5.3.2.10) gelegt, wobei die waagerechte Lage der Petrischale sichergestellt wird. Die Prüfoberflächen werden durch Abimpfen von 0,05 ml mikrobieller Prüfsuspension [5.5.2.2 a)] auf jede Prüfoberfläche vorbereitet. Das Inokulum darf dabei nicht über die Oberfläche verteilt werden. Die Oberflächen werden bei 37°C getrocknet, bis sie sichtbar trocken sind.

Es ist selbstverständlich, dass das Trocknen der Prüfoberflächen aufgrund der Umgebungsbedingungen im Labor und der Konstruktion des Brutschranks (z. B. mit oder ohne Ventilator) mit unterschiedlicher Geschwindigkeit erfolgen wird. Aus diesem Grund wird keine Zeitdauer angegeben und die erforderliche Mindestzeit, bis die Oberflächen sichtbar trocken sind, sollte für jedes Labor ermittelt werden. Die Trocknungszeit sollte 60 min nicht überschreiten; tritt dies auf, müssen alternative Trocknungsbedingungen angewendet werden.

Alternativ werden die Oberflächen in einer offenen Petrischale angeordnet, um mit der beimpften Seite nach oben in einem Vakuumexsikkator bei 18°C bis 25°C für nicht länger als 60 Minuten zu trocknen. Es wird sichergestellt, dass die Petrischale teilweise geöffnet ist, indem der Deckel leicht gegenüber der Mittenposition verschoben wird. Es wird überprüft, dass der Exsikkator ordnungsgemäß abgedichtet ist. Der Ausgang des Exsikkators wird an eine Vakuumquelle angeschlossen und mit der Evakuierung der Luft begonnen, um ein Vakuum von 20 mmHg bis 25 mmHg (508 Torr bis 635 Torr; 677 mbar bis 847 mbar; 6 8000 Pascal bis 85 000 Pascal; Umrechnungstabellen für andere Einheiten sind problemlos im Internet zu finden) zu erreichen.

⁵ Zu einer graphischen Darstellung dieses Verfahrens siehe C.1.



Bild 1 — Beimpfter Keimträger

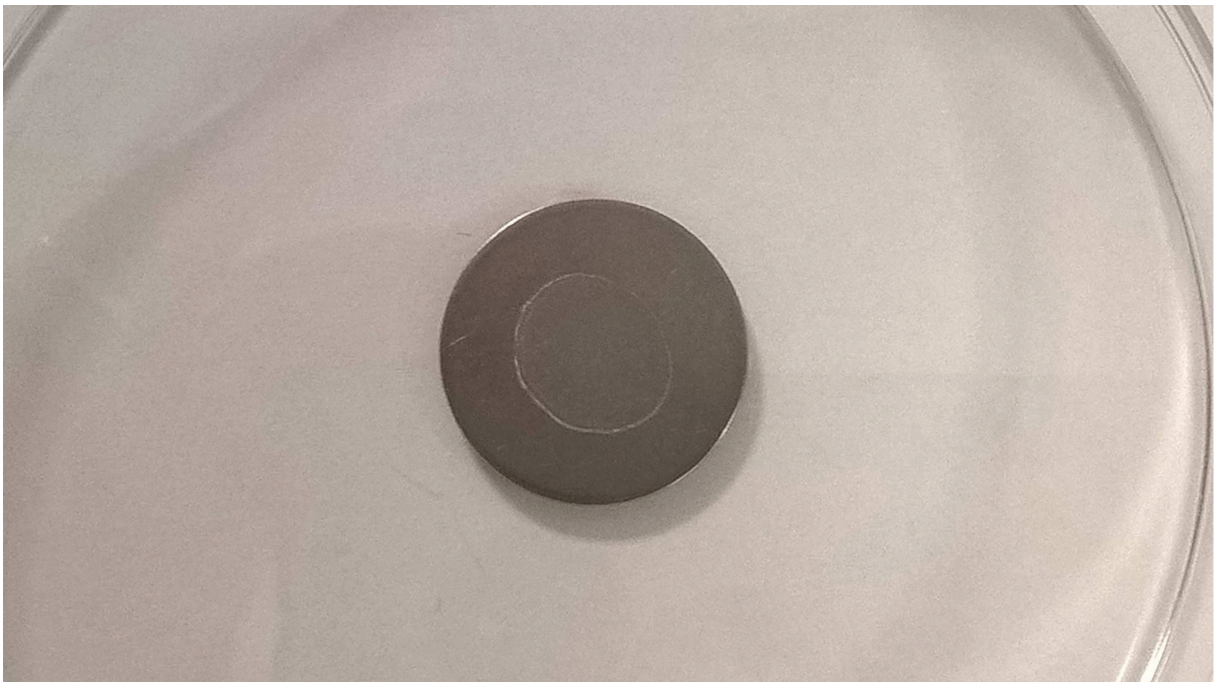


Bild 2 — Sichtbar trockenes Inokulum

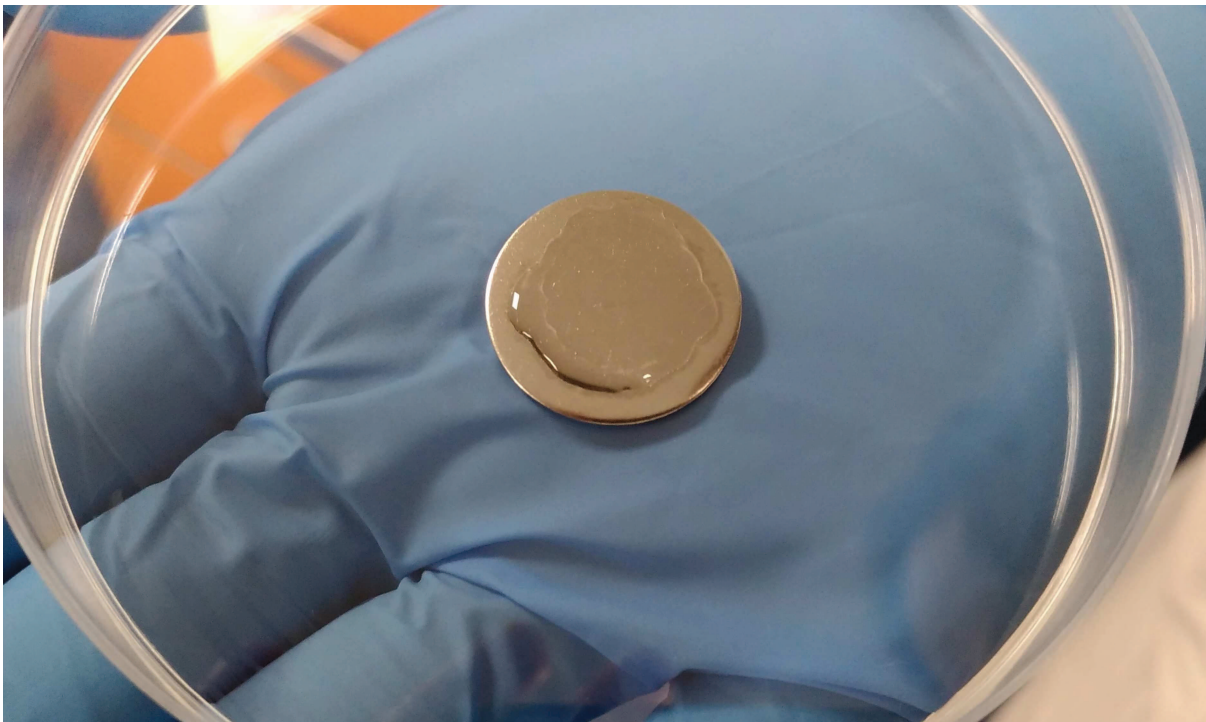


Bild 3 — Auf beimpften Keimträger aufgebrachtes Produkt

- c) Für die Prüfung des Desinfektionsmittels (N_a) wird 0,1 ml jeder zu untersuchenden Produktprüflösung (5.4.2) auf gesonderte getrocknete Oberflächen pipettiert, wobei sichergestellt wird, dass das getrocknete Inokulum vollständig durch das Prüfprodukt bedeckt wird.

Die Oberflächen werden für die gewählte Einwirkzeit t in eine temperaturgeregelter Kammer (5.3.2.13) gelegt, die auf die gewählte Prüftemperatur θ eingestellt ist.

- d) Nach Ablauf von t wird jede der Oberflächen (N_a) in einen gesonderten Behälter (5.3.2.14) gelegt, der 10 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.5) und ausreichend Glasperlen (5.3.2.11) enthält, um die Oberfläche zu tragen. Die Oberflächen sollten mit der beimpften Fläche nach unten in Kontakt mit den Perlen angeordnet werden. Die Behälter werden mindestens 1 min geschüttelt. Das Schütteln sollte kräftig genug erfolgen, um sicherzustellen, dass die Prüfoberfläche sich ständig über die Perlen bewegt. Es wird sichergestellt, dass die Perlen sich frei bewegen können.

Nach der Neutralisationszeit von $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ wird vom neutralisierten Gemisch eine dekadische Verdünnungsreihe im Verdünnungsmittel (5.2.2.4) von 10^{-1} bis 10^{-2} hergestellt. Eine 1,0-ml-Probe des neutralisierten Gemisches und von jeder der Verdünnungen wird als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen pipettiert und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlter TSA (5.2.2.3) zugegeben.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe — in Anteile etwa gleicher Größe aufgeteilt — auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) von an der Oberfläche getrockneten TSA-Platten (5.2.2.3) ausgestrichen.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

- e) Die Prüfoberfläche („ N_a “) wird entnommen, das Neutralisationsmedium ablaufen gelassen und die Oberfläche wird mit 10 ml Wasser (5.2.2.2) gespült. Sie wird in eine Petrischale (5.3.2.10) überführt, die 10 ml

verfestigten TSA (5.2.2.3) enthält, und mit der zu prüfenden Seite nach oben auf den Agar gelegt. 10 ml verflüssigter und auf 45 °C abgekühlter TSA (5.2.2.3) werden darüber gegeben.

- f) Die Arbeitsgänge a) bis e) werden unter Verwendung der anderen Produktprüflösungen zeitgleich durchgeführt.
- g) Die Arbeitsgänge a) bis f) werden — gegebenenfalls — unter Anwendung der anderen Untersuchungsbedingungen (5.5.1.1) durchgeführt.

5.5.2.3 Kontrollversuch mit Wasser „ N_w “

Der Verfahrensablauf zur Bestimmung der Kontrolle mit Wasser ist wie folgt:

ANMERKUNG Die Kontrolle „A“ – Kontrolle der Untersuchungsbedingungen „A“ (Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimtötender Wirkungen unter den Prüfbedingungen) unterscheidet sich von Suspensionsversuchen der Phase 2, Stufe 1 durch die Tatsache, dass sie direkt im Kontrollversuch mit Wasser „ N_w “ bestimmt wird.

- a) Eine Prüfoberfläche (5.2.3) wird in eine sterile Petrischale (5.3.2.10) gelegt, wobei die waagerechte Lage der Petrischale sichergestellt wird. Auf die Prüffläche werden 0,05 ml mikrobielle Prüfsuspension [5.5.2.2 a)] abgeimpft. Das Inokulum darf dabei nicht über die Oberfläche verteilt werden. Die Oberfläche wird bei 37 °C getrocknet, bis sie sichtbar trocken ist [5.5.2.2 b)].
- b) Für den Kontrollversuch mit Wasser (N_w) wird 0,1 ml Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) oder Wasser (5.2.2.2) im Fall von gebrauchsfertigen Produkten auf die Prüfoberfläche pipettiert, wobei sichergestellt wird, dass das getrocknete Inokulum vollständig durch das Wasser bedeckt wird.

Die Oberfläche wird in eine temperaturgeregelte Kammer (5.3.2.13) gelegt, die auf die gewählte Prüftemperatur eingestellt ist.

- c) Nach Ablauf von t wird die Oberfläche „ N_w “ in einen Behälter (5.3.2.14) überführt, der 10 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.5) und ausreichend Glasperlen (5.3.2.11) enthält, um die Oberfläche zu tragen. Die Oberfläche sollte mit der beimpften Oberfläche nach unten in Kontakt mit den Perlen angeordnet werden. Die Behälter werden mindestens 1 min geschüttelt. Das Schütteln sollte kräftig genug erfolgen, um sicherzustellen, dass die Prüfoberfläche sich ständig über die Perlen bewegt. Es wird sichergestellt, dass die Perlen sich frei bewegen können.

Nach einer Neutralisationszeit von $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ wird vom neutralisierten Gemisch eine dekadische Verdünnungsreihe im Verdünnungsmittel (5.2.2.4) von 10^{-1} bis 10^{-5} hergestellt. Eine 1,0-ml-Probe der Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-5} wird als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft [5.5.2.2. d)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

- d) Die Prüfoberfläche („ N_w “) wird entnommen, das Neutralisationsmedium ablaufen gelassen und die Oberfläche wird mit 10 ml Wasser (5.2.2.2) gespült. Sie wird in eine Petrischale überführt, die 10 ml verfestigten TSA (5.2.2.3) enthält, und mit der zu prüfenden Seite nach oben auf den Agar gelegt. 10 ml verflüssigter und auf 45 °C abgekühlter TSA (5.2.2.3) werden darüber gegeben.

5.5.2.4 Kontrolle des Neutralisationsmediums „B“ – Verifizierung des Nichtvorliegens einer Toxizität des Neutralisationsmediums

Zur Verifizierung des Nichtvorliegens einer Toxizität des Neutralisationsmediums wird wie folgt verfahren:

- a) Es wird eine beimpfte Prüfoberfläche vorbereitet [5.5.2.2 a)].

- b) In einen Behälter (5.3.2.14) mit hinreichend Glasperlen (5.3.2.11), um die Prüfoberfläche zu tragen, werden 10 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.5) pipettiert. Dann wird 0,1 ml Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) oder Wasser (5.2.2.2) im Fall von gebrauchsfähigen Produkten zugegeben. Alles wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und 5 min $\pm$ 10 s in einem auf (20 $\pm$ 1) °C eingestellten Wasserbad (5.3.2.2) belassen.
- c) Die beimpfte und getrocknete Prüfoberfläche wird in den Behälter überführt und mit der beimpften Oberfläche nach unten in Kontakt mit den Perlen (5.3.2.11) angeordnet. Die Behälter werden mindestens 1 min geschüttelt. Das Schütteln sollte kräftig genug erfolgen, um sicherzustellen, dass die Prüfoberfläche sich ständig über die Perlen bewegt. Es wird sichergestellt, dass die Perlen sich frei bewegen können und dass genügend Perlen vorhanden sind, um die Oberfläche zu tragen.
- d) Nach einer Neutralisationszeit von 5 min $\pm$ 10 s wird vom neutralisierten Gemisch „B“ im Verdünnungsmittel (5.2.2.4) eine dekadische Verdünnungsreihe mit Verdünnungen von 10^{-3} bis 10^{-5} hergestellt. Von jeder der Verdünnungen werden Proben von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft [5.5.2.2 d)].
- e) Die Prüfoberfläche wird entnommen, das Neutralisationsmedium ablaufen gelassen und die Oberfläche wird mit 10 ml Wasser (5.2.2.2) gespült. Sie wird in eine Petrischale überführt, die 10 ml verfestigten TSA (5.2.2.3) enthält, und mit der zu prüfenden Seite nach oben auf den Agar gelegt. 10 ml verflüssigter und auf 45 °C abgekühlter TSA (5.2.2.3) werden darüber gegeben.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

5.5.2.5 Verfahrensvalidierung „C“ — Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens

Zur Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens wird wie folgt verfahren:

- a) Es wird eine Prüfoberfläche vorbereitet [5.5.2.2 a)].
- b) In einen Behälter (5.3.2.14) mit hinreichend Glasperlen (5.3.2.11), um die Prüfoberfläche zu tragen, werden 10 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.5) pipettiert. Dann wird 0,1 ml der höchsten in der Prüfung verwendeten Produktkonzentration (5.5.2.2) zugegeben. Alles wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und der Behälter wird für die Einwirkzeit t in ein auf die Temperatur θ eingestelltes Wasserbad gestellt. Kurz vor dem Ende von t wird erneut durchmischt [5.3.2.6 a)].
- c) Nach Ablauf der Neutralisationsdauer wird die beimpfte Prüfoberfläche in den Behälter überführt und mit der beimpften Fläche nach unten in Kontakt mit den Perlen (5.3.2.11) angeordnet.

Die Behälter werden mindestens 1 min geschüttelt. Es wird sichergestellt, dass die Perlen sich frei bewegen können und dass genügend Perlen vorhanden sind, um die Oberfläche zu tragen.

- d) Nach 5 min $\pm$ 10 s wird vom neutralisierten Gemisch „C“ im Verdünnungsmittel (5.2.2.4) eine dekadische Verdünnungsreihe mit Verdünnungen von 10^{-3} bis 10^{-5} hergestellt. Von jeder der Verdünnungen werden Proben von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft [5.5.2.2 d)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

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

Beim Bebrüten und Auszählen des Prüfgemisches sowie der Kontroll- und Validierungsgemische wird wie folgt verfahren:

- a) Die Platten werden 20 h bis 24 h bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die (aus irgendeinem Grund) nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten auf jeder Platte wird bestimmt. Die Platten werden weitere 20 h bis 24 h bebrütet. Platten, die keine gut

voneinander abgesetzten Kolonien mehr aufweisen, werden nicht erneut ausgezählt. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt. Wenn sich die Anzahl erhöht hat, wird für die weitere Auswertung nur die höhere Koloniezahl verwendet.

- b) Für die Durchführung der Berechnung werden nur die Platten verwendet, die eine Koloniezahl im Bereich von 15 bis 300 aufweisen. Eine Abweichung von 10 % ist zulässig, so dass die Grenzwerte 14 KBE und 330 KBE betragen.

Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird > 330 für alle Koloniezahlen über 330 aufgezeichnet; die V_C -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.

- c) Die Anzahl der KBE/ml im Prüfgemisch N_a , im Kontrollversuch mit Wasser N_w und in den Validierungsgemischen „B“ und „C“ wird nach dem in 5.6.2.4 bzw. 5.6.2.5 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.5.3 Beurteilung des Agars mit den Prüfoberflächen

Die Agarplatten mit den Prüfoberflächen (5.5.2.2 und 5.5.2.3) werden 20 h bis 24 h bebrütet (5.3.2.3). Es wird auf Bakterienkolonien untersucht und die Platten werden weitere 20 h bis 24 h bebrütet. Die Platten, die gut voneinander abgesetzten Kolonien aufweisen, werden ausgezählt; die Verifizierung erfolgt nach 5.7.3.

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 ist die mikrobielle Suspension und die Validierungssuspension (N_v), N_a ist das bakterizide Prüfgemisch, N_w ist das Prüfgemisch im Kontrollversuch mit Wasser, B (Kontrolle des Neutralisationsmediums) und C (Verfahrensvalidierung) sind die unterschiedlichen Kontrollprüfgemische.

ANMERKUNG 1 Die Kontrolle „A“ – Kontrolle der Untersuchungsbedingungen „A“ (Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimtötender Wirkungen unter den Prüfbedingungen) unterscheidet sich von Suspensionsversuchen der Phase 2, Stufe 1 durch die Tatsache, dass sie direkt im Kontrollversuch mit Wasser bestimmt wird.

N ist die Anzahl der je 0,025 ml Bakterien-Prüfsuspension und Validierungssuspension ausgezählten Zellen; N_a , N_w und B , C sind die Anzahlen der je ml in den unterschiedlichen Prüfgemischen ausgezählten Zellen.

Tabelle 2 — Anzahl der je 0,025 ml oder Prüfoberfläche in den unterschiedlichen Prüfgemischen ausgezählten Zellen

	Anzahl der Zellen je 0,025 ml in der Prüfsuspension	Anzahl der überlebenden Zellen je Oberfläche nach Ablauf der Einwirkzeit t
Prüfung	N	N_a
Kontrollen	N , N_v	N_w , B , C

ANMERKUNG 2 N wird je 0,025 ml berechnet, N und N_v sind in der vorliegenden Norm gleich.

5.6.1.2 V_C -Werte

Alle Versuchsdaten werden im Bericht als V_C -Werte angegeben:

— Im Verfahren (Prüfung und Kontrollen) ist ein V_C -Wert die Anzahl der je 1,0-ml-Probe gezählten KBE.

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_a , N_w , B und C . Der dritte Schritt ist die Berechnung der Reduktion 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 Bakterien auf Agarplatten liegen zwischen 15 und 300. In diesem Dokument ist eine Abweichung von 10 % zulässig, so dass die Grenzwerte 14 und 330 betragen.

ANMERKUNG Grundlage für den unteren Grenzwert (14) ist die Tatsache, dass die Variabilität zunimmt, je kleiner die für die Probe (1,0 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 1,0 ml Probe mit 3 KBE, 8 KBE und 5 KBE einen V_C -Wert von 16. Der obere Grenzwert (330) spiegelt die Ungenauigkeit bei der Auszählung zusammenfließender Kolonien und die Wachstumshemmung durch Erschöpfung der Nährsubstanzen wider. Er bezieht 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) und für alle Keimzahlen beim Verfahren (5.5.2.6) werden die V_C -Werte entsprechend der Anzahl der je 1,0 ml Probe verwendeten Platten bestimmt und aufgezeichnet (5.6.2.4 und 5.6.2.5).

Wenn zur Bestimmung des V_C -Wertes mehr als eine Platte je 1,0 ml Probe verwendet wurde, sollte die Keimzahl je Platte aufgezeichnet werden.

Wenn die Keimzahl auf einer Platte höher ist als 330, wird die Zahl im Prüfbericht als „> 330“ angegeben. Wenn mehr als eine Platte je 1,0 ml Probe verwendet worden ist und mindestens eine von ihnen eine höhere Keimzahl als 330 aufweist, wird dieser V_C -Wert im Prüfbericht als „> Summe der Keimzahlen“ angegeben, z. B. wird für „> 330, 310, 302“ im Prüfbericht „> 942“ angegeben.

Wenn ein V_C -Wert kleiner als 14 ist, wird die Zahl angegeben (für die weiteren Berechnungen im Fall von N_a wird jedoch „< 14“ eingesetzt).

- c) Es werden nur V_C -Werte innerhalb der Auszählgrenzen für die weitere Berechnung berücksichtigt, außer im Fall von N_a (5.6.2.4).

5.6.2.3 Berechnung von N

N ist die Anzahl der Zellen je 0,025 cml in der mikrobiellen Prüfsuspension (5.5.2.2a). Aufgrund der Verdünnung durch Zugabe gleicher Teile Belastungssubstanz und der Verwendung von 0,05 ml als Inokulum ist die Anzahl geringer als in der Bakterien-Prüfsuspension.

Da zwei Verdünnungen der mikrobiellen Prüfsuspension (5.5.2.2a) ausgewertet werden, wird die Anzahl der KBE/0,025 ml als gewichteter Mittelwert der Keimzahl nach der folgenden Gleichung (1) berechnet:

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

Dabei ist

c die Summe der berücksichtigten V_C -Werte;

n_1 die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung, d. h. 10^{-7} , berücksichtigten V_C -Werte;