

DIN EN 1650

ICS 71.100.35

Einsprüche bis 2018-07-11
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 1650:2013-08

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder
levuroziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in
den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche
Einrichtungen –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche und Englische Fassung prEN 1650:2018**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeastcidal activity of chemical
disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German and English version prEN 1650:2018

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide des
antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire,
dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);
Version allemande et anglaise prEN 1650:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-05-11 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

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

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

Gesamtumfang 100 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 1650:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-02-03 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.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 1650:2013-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Prüfbedingungen und Prüfanforderungen für die Händedesinfektion und Händewaschung wurden mit EN 13624 harmonisiert. Tabelle 1 (Untersuchungsbedingungen für allgemeine Desinfektionszwecke) und Tabelle 2 (Untersuchungsbedingungen für Händehygiene) wurden im Abschnitt 4 (Anforderungen) aufgenommen;
- b) Unterabschnitte 5.2.2.8.5 bis 5.2.2.8.8 (Belastungssubstanzen für Brauereien, Erfrischungsgetränke, Kosmetika und Umlaufreinigung) wurden gestrichen. Es wurde ein Satz aufgenommen, um für spezielle Anwendungen zusätzliche Belastungssubstanzen zuzulassen;
- c) im Unterabschnitt 5.5.1.1 (Untersuchungsbedingungen) wurden die obligatorischen Bedingungen (Temperatur und Einwirkzeit) gestrichen. Der Text wurde, unter Einhaltung bestimmter Zeitintervalle und Temperaturschritte, mit EN 13624 harmonisiert;
- d) Unterabschnitt 5.9.3 (Levurozide Wirkung für allgemeine Zwecke) wurde gestrichen;
- e) Norm wurde redaktionell überarbeitet und den derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

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

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

Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas — Test method and requirements (phase 2, step 1)

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Anforderungen	8
5 Prüfverfahren	9
5.1 Kurzbeschreibung	9
5.2 Materialien und Reagenzien	10
5.2.1 Prüforganismen	10
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	10
5.3 Geräte und Glasgeräte	13
5.3.1 Allgemeines	13
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und besonders folgende Geräte:	14
5.4 Herstellung der Prüforganismussuspensionen und Produktprüflösungen	15
5.4.1 Prüforganismussuspensionen (Prüfungs- und Validierungssuspension)	15
5.4.2 Produktprüflösungen	20
5.5 Verfahren zur Beurteilung der fungiziden oder levuroziden Wirkung des Produkts	20
5.5.1 Allgemeines	20
5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	22
5.5.3 Membranfiltrationsverfahren	24
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	26
5.6.1 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen	26
5.6.2 Berechnung	27
5.7 Verifizierung des Verfahrens	30
5.7.1 Allgemeines	30
5.7.2 Kontrolle der gewichteten Mittelwerte der Auszählungen	30
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	30
5.7.4 Mikroskopische Beobachtung	31
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	31
5.8.1 Reduktion	31
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	31
5.8.3 Limitierender Prüforganismus und fungizide/levurozide Konzentration	31
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	32
5.9 Interpretation der Ergebnisse – Schlussfolgerung	32
5.9.1 Allgemeines	32
5.9.2 Fungizide Wirkung für allgemeine Zwecke	32
5.9.3 Levurozide Wirkung für allgemeine Zwecke	32
5.9.4 Levurozide Wirkung für Handhygiene	32
5.10 Prüfbericht	32
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	35
Anhang B (informativ) Beispiele von Neutralisationsmedien für die verbleibende antimikrobielle Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika sowie Spülflüssigkeiten	36

Anhang C (informativ) Graphische Darstellungen des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens und des Membranfiltrationsverfahrens.....	38
C.1 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	38
C.2 Membranfiltrationsverfahren	40
Anhang D (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht	42
Anhang E (informativ) Präzision des Prüfergebnisses.....	47
Literaturhinweise.....	50

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 1650:2018) 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 1650:2008+A1:2013 ersetzen.

Die wesentlichen Änderungen im Hinblick auf EN 1650:2008+A1:2013 sind:

- Einbeziehung der Handhygiene;
- die Prüfbedingungen und Prüfanforderungen für Händedesinfektionsmittel und Handwaschmittel wurden mit EN 13624 harmonisiert;
- Belastungssubstanzen für Brauereien, Softdrinks, kosmetische Mittel und Umlaufreinigung wurden gelöscht. Ein Satz zur Genehmigung zusätzlicher Belastungssubstanzen für spezifische Anwendungen wurde hinzugefügt;
- Die obligatorischen Untersuchungsbedingungen (Temperatur und Einwirkzeit) wurden gelöscht. Der Text wurde unter Beibehaltung der spezifischen Zeitintervalle und Temperaturschritte mit EN 13624 harmonisiert.

Einleitung

Diese Europäische Norm legt ein Verfahren für einen Suspensionsversuch zur Feststellung fest, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum in den im Anwendungsbereich beschriebenen Gebieten eine fungizide oder levurozide Wirkung aufweist oder nicht.

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 Zwecken dienen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produkten ermöglichen. Jede in diesem Versuch festgestellte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht festgelegten Untersuchungsbedingungen. Bei einigen Anwendungsarten können jedoch die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt abweichen, deshalb müssen möglicherweise zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die fungizide oder levurozide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die bei Verdünnung in Wasser standardisierter Härte oder – im Falle gebrauchsfertiger Produkte – in Wasser eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung bilden. Die Produkte können nur bei einer Konzentration von höchstens 80 % geprüft werden, da durch die Zugabe der Prüforganismen und der Belastungssubstanz immer eine bestimmte Verdünnung auftritt.

Dieses Dokument gilt für Produkte, die im Lebensmittelbereich, in der Industrie, im Haushalt und in öffentlichen Einrichtungen benutzt werden; ausgenommen sind Bereiche und Situationen, in denen die Desinfektion medizinisch angezeigt ist, und Produkte, die auf lebenden Geweben benutzt werden, hier wiederum außer denen, die zur Handhygiene in den vorstehend genannten Bereichen verwendet werden. Es werden mindestens folgende Bereiche abgedeckt:

a) Verarbeitung, Vertrieb und Verkauf von:

1) Lebensmitteln tierischer Herkunft:

- Milch und Milcherzeugnisse;
- Fleisch und Fleischprodukte;
- Fisch, Meerestiere und zugehörige Erzeugnisse;
- Eier und Eierprodukte;
- Tiernahrung;
- usw.

2) Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft:

- Getränke;
- Obst, Gemüse und zugehörige Erzeugnisse (einschließlich Zucker, Destillationsprodukte usw.);
- Mehl, gemahlene und gebackene Produkte;
- Tiernahrung;
- usw.

b) öffentliche Einrichtungen und Haushaltsbereiche:

- Verpflegungseinrichtungen;
- öffentliche Bereiche;
- öffentliche Verkehrsmittel;
- Schulen;
- Kindergärten;
- Geschäfte;
- Sportstätten;
- Abfallbehälter (Mülltonnen usw.);
- Hotels;
- Wohngebäude;
- klinisch nicht relevante Bereiche in Krankenhäusern;
- Büroräume;
- usw.

c) andere industrielle Bereiche:

- Verpackungsmaterial;
- Biotechnologie (Hefe, Proteine, Enzyme usw.);
- Pharmazeutika;
- Kosmetika und Toilettenartikeln;
- Textilien;
- Luft- und Raumfahrtindustrie, Computerindustrie;
- usw.

EN 14885 legt im Einzelnen den Zusammenhang zwischen den verschiedenen Prüfungen sowie zu den „Anwendungsempfehlungen“ fest.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren dient zur Bestimmung der Wirkung handelsüblicher Zubereitungen oder Wirkstoffe unter den Bedingungen, unter denen sie angewendet werden.

ANMERKUNG 2 Dieses 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 Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

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

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

3 Begriffe

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

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

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

4 Anforderungen

Das Produkt muss mindestens eine dezimal-logarithmische (lg-)Reduktion der Lebendkeimzahl um 4 Stufen ergeben, wenn es mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) oder - im Falle gebrauchsfertiger Produkte - mit Wasser (5.2.2.2) verdünnt und nach Abschnitt 5 unter simulierten Bedingungen niedriger Belastung (0,3 g/l Rinderserumalbuminlösung - 5.2.2.8.2) oder simulierten Bedingungen hoher Belastung (3 g/l Rinderserumalbuminlösung - 5.2.2.8.3) entsprechend der praktischen Anwendung und unter den angewandten Prüfbedingungen geprüft wurde, wie in 5.5.1.1 sowie in den nachstehenden Tabellen 1 und 2 beschrieben.

Tabelle 1 — Untersuchungsbedingungen für Desinfektion bei allgemeiner Verwendung

Prüfbedingungen	levurozide Wirkung	fungizide Wirkung
Prüforganismus (siehe 5.2.1) obligatorisch	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus brasiliensis</i> (früher <i>A. Niger</i>)
Beispiel zusätzlicher Prüfmikro- organismen	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (für Brauereien) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> (für Brauereien)	jeder zutreffende Prüforganismus
Prüftemperatur	im Bereich von 4 °C bis 40 °C	im Bereich von 4 °C bis 40 °C
Einwirkzeit	im Bereich von 1 min und zwischen 5 min und 60 min (von 1 min bis 5 min in Intervallen von 1 min und von 5 min bis 60 min in Intervallen von 5 min), ausschließlich mit Intervallen von 5 min	im Bereich von 1 min bis 60 min ausschließlich mit Intervallen von 5 min
Bedingungen niedriger Belastung	0,3 g/l Rinderserumalbumin für <i>C. albicans</i>	0,3 g/l Rinderserumalbumin für <i>C. albicans</i> und <i>A.</i> <i>brasiliensis</i>
Bedingungen hoher Belastung	3,0 g/l Rinderserumalbumin für <i>C. albicans</i>	3,0 g/l Rinderserumalbumin für <i>C. albicans</i> und <i>A.</i> <i>brasiliensis</i>
zusätzlich	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz
lg-Reduktion aus einer Wasser- kontrolle (dezimal-loga- rithmisch)	≥ 4 lg	≥ 4 lg
Die empfohlene Einwirkzeit für die Nutzung des Produkts liegt in der Verantwortung des Herstellers.		

Tabelle 2 — Untersuchungsbedingungen für Handhygiene

Prüfbedingungen	levurozide Wirkung
Prüforganismus (siehe 5.2.1) obligatorisch	<i>Candida albicans</i>
Prüftemperatur	20° C
Einwirkzeit	30 s oder 60 s
Bedingungen niedriger Belastung (für hygienische Händedesinfektionsmittel)	0,3 g/l Rinderserumalbumin
Bedingungen hoher Belastung (für hygienische Handwaschmittel)	3,0 g/l Rinderserumalbumin
Ig-Reduktion aus einer Wasserkontrolle (dezimal-logarithmisch)	≥ 4 lg für Händedesinfektionsmittel 2 lg für Handwaschmittel

Sofern angezeigt, muss zusätzlich die spezifische fungizide oder levurozide Wirkung unter Anwendung weiterer Belastungssubstanzen und Prüforganismen (nach 5.2.1, 5.2.2.8 und 5.5.1.1) bestimmt werden, um vorgesehene produktspezifische Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Probe des Produkts, entweder im Lieferzustand und/oder mit Wasser standardisierter Härte (oder für gebrauchsfertige Produkte mit Wasser) verdünnt, wird zu einer Prüfsuspension aus Pilzen (Hefezellen oder Schimmelpilzsporen) in einer Lösung mit Belastungssubstanz gegeben. Das Gemisch wird für die angewandte Einwirkzeit bei der gewählten Prüftemperatur gehalten. Nach Ablauf dieser Einwirkzeit wird ein aliquoter Anteil entnommen, und die fungizide und/oder fungistatische Wirkung in dieser Teilmenge wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder inaktiviert. Das Verfahren der Wahl ist dabei das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Wenn kein geeignetes Neutralisationsmedium gefunden werden kann, wird die Membranfiltration angewendet. Die Anzahl der überlebenden Pilze in jeder Probe wird bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahlen berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird mit vegetativen Zellen von *Candida albicans* und Sporen von *Aspergillus brasiliensis* (fungizide Wirkung) oder nur den vegetativen Zellen von *Candida albicans* (levurozide Wirkung) als Prüforganismen durchgeführt.

5.1.3 Zusätzliche Prüforganismen können verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die fungizide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden Stämme als Prüforganismen bestimmt werden:¹⁾

- | | |
|-----------------------------------|------------|
| — <i>Candida albicans</i> | ATCC 10231 |
| — <i>Aspergillus brasiliensis</i> | ATCC 16404 |

Die levurozide Wirkung darf nur mit *Candida albicans* bewertet werden.

ANMERKUNG Zu Verweisungen auf Stämme aus einigen anderen Kultursammlungen siehe Anhang A.

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

Wenn nötig, dürfen zusätzliche Stämme für spezifische Anwendungen gewählt werden, wie z. B. für Brauereien:

- | | |
|---|-----------|
| — <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | DSM 1333 |
| — <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> | DSM 70487 |

Wenn zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, müssen sie unter optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Zeit, Atmosphäre, Medien), die im Prüfbericht zu dokumentieren sind, 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 durch ein Referenz-Zentrum klassifiziert wurden, müssen ihre Identifizierungsmerkmale angegeben werden. Außerdem müssen sie von dem Prüflaboratorium 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 Europäischen 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.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, zur Herstellung von Kulturmedien handelsübliche wasserfreie Materialien zu verwenden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten genau befolgt werden.

ANMERKUNG Für jedes Kulturmedium und Reagenz ist der maximale Anwendungszeitraum festzulegen.

¹⁾ Die ATCC-Nummern sind Sammlungsnummern für Stämme, die von der American Type Culture Collection (ATCC) vertrieben werden. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.2.2.2 Wasser

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

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

ANMERKUNG 1 Die Sterilisation ist nicht erforderlich, wenn 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]) verwendet werden.

ANMERKUNG 3 Hinsichtlich des Verfahrens für die Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.7.

5.2.2.3 Malzextraktagar (MEA)

Malzextraktagar, bestehend aus:

Malzextrakt	30,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	auf 1 000,0 ml

Der Malzextrakt sollte lebensmittelunbedenklich (z. B. Cristomalzpulver von Difal) oder entsprechend sein, das nicht stark gereinigt ist und das nicht auf Maltose basiert (z. B. Malzextrakt von OXOID)²⁾. Sollte es jedoch Probleme geben, mindestens 75 % stachelige Sporen herzustellen, siehe 5.4.1.4.2.

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

ANMERKUNG Im Falle des Auftretens von Problemen mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) ist es möglicherweise erforderlich, dem MEA Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält eine Anleitung zu den Neutralisationsmedien, die verwendet werden können.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

Trypton aus Casein, pankreatisch verdaut	1,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g
Wasser (5.2.2.2)	auf 1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Verdünnungsmittels $7,0 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

2) Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

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 Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.6 Spülflüssigkeiten (für Membranfiltration)

Die Spülflüssigkeit muss für das zu prüfende Produkt nach 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.3 validiert sein. Die Spülflüssigkeit muss steril, mit der Filtermembran kompatibel und unter den in 5.5.3 beschriebenen Prüfbedingungen durch die Filtermembran filtrierbar sein.

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

5.2.2.7 Hartes Wasser 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) aufgelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die 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 ist mit Wasser (5.2.2.2) unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lösung ist im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens einen Monat aufzubewahren;
- 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 ist im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens eine Woche aufzubewahren;
- in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) gegeben, dazu werden 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A und anschließend 8,0 ml Lösung B gegeben. Es wird durchmischt und mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert 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 verwendet werden.

ANMERKUNG Bei der Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produkts zum Wasser standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas unter 375 mg/l bezogen auf Calciumcarbonat (CaCO_3).

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz muss entsprechend 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 definiert werden.

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

5.2.2.8.2 Niedrige Belastung (Rinderserumalbuminlösung – geringe Konzentration)

0,3 g der Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) werden in 100 ml Wasser (5.2.2.2) aufgelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7), die Lösung ist im Kühlschrank (5.3.2.8) aufzubewahren und innerhalb eines Monats zu verwenden.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins im Prüfverfahren (5.5) beträgt 0,3 g/l.

5.2.2.8.3 Hohe Belastung (Rinderserumalbuminlösung – hohe Konzentration)

3,0 g der Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) werden in 100 ml Wasser (5.2.2.2) aufgelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7), die Lösung ist im Kühlschrank (5.3.2.8) aufzubewahren und innerhalb eines Monats zu verwenden.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins im Prüfverfahren (5.5) beträgt 3,0 g/l.

5.2.2.8.4 Milch (Molkereien usw.)

Magermilch, garantiert frei von Antibiotika und Zusatzstoffen sowie im Verhältnis von 100 g Pulver je Liter Wasser (5.2.2.2) rekonstituiert, muss wie folgt hergestellt werden:

— es wird eine Lösung von 100 g Milchpulver in 1 000 ml Wasser (5.2.2.2) hergestellt. Diese wird für 30 min bei $(105 \pm 3)^\circ\text{C}$ [oder für 5 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$] erhitzt.

Die Endkonzentration der rekonstituierten Milch im Prüfverfahren (5.5) beträgt 10,0 g/l der rekonstituierten Milch.

5.3 Geräte und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme von steril gelieferten werden alle Glasgeräte und alle Geräteteile, die mit den Kulturmedien und den 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 Heißluftsterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung³⁾ und besonders folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation

- a) zur Dampfsterilisation ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min bei (121^{+3}_0) °C gehalten werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluftsterilisator, 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, einstellbar auf (20 ± 1) °C, auf (45 ± 1) °C (um den MEA für den Fall des Gussplattenverfahrens im geschmolzenen Zustand zu halten) und auf zusätzliche Prüftemperaturen ± 1 °C (5.5.1).

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

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer 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 Schüttelgerät, z. B. Vortex®-Mischer⁴⁾;
- 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 Mindestvolumen von 50 ml ausgestattet sein. Es muss geeignet sein für die Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von $0,45 \mu\text{m}$ für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7), Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2 und 5.2.2.8.3) und Saccharose (5.2.2.8.6) und für den Fall der Anwendung des Membranfiltrationsverfahrens (5.5.3).

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

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

5.3.2.9 Graduierte Messpipetten, mit Nennvolumina von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml oder kalibrierte automatische Pipetten.

³⁾ Sterile Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

⁴⁾ Ein Vortex®-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

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 Glasfilterfritte, mit einer Porosität von 40 µm bis 100 µm nach ISO 4793.

5.3.2.14 Flaschen mit belüfteten Verschlusssteilen.

5.4 Herstellung der Prüforanismussuspensionen und Produktprüflösungen

5.4.1 Prüforanismussuspensionen (Prüfungs- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüforanismus müssen zwei verschiedene Suspensionen hergestellt werden: die „Prüfsuspension“ zur Durchführung der Prüfung und die „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrollversuche und der Verfahrensvalidierung.

5.4.1.2 Aufbewahrung und Stammkulturen der Prüforanismen

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

5.4.1.3 Gebrauchskultur der Prüforanismen

5.4.1.3.1 *Candida albicans* (Hefe)

Um die Gebrauchskultur von *Candida albicans* (5.2.1) herzustellen, wird aus der Stammkultur (5.4.1.2) durch Ausstrich auf MEA-Schrägar (5.2.2.3) oder MEA-Platten (5.3.2.10) eine Subkultur angelegt und bebrütet (5.3.2.3). Nach 42 h bis 48 h wird aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise eine zweite Subkultur angelegt und 42 h bis 48 h bebrütet. Aus dieser zweiten Subkultur darf auf die gleiche Weise eine dritte angelegt werden. Die zweite und (sofern angelegt) dritte Subkultur ist (sind) die Gebrauchskultur(en).

Sofern es nicht möglich ist, die zweite Subkultur an einem bestimmten Tag anzulegen, darf eine 72-h-Subkultur für das nachfolgende Anlegen von Subkulturen verwendet werden, vorausgesetzt, die Subkultur wurde während der 72 h im Brutschrank (5.3.2.3) aufbewahrt.

Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden

5.4.1.3.2 *Aspergillus brasiliensis* (vorher *A. Niger*) (Schimmelpilz)

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

Am Ende der Bebrütung müssen alle Kulturen eine dunkelbraune oder schwarze Oberfläche aufweisen. Kulturen mit einem Auftreten von seltenen, kleinen weißen oder grauen Flächen können aufbewahrt werden (siehe Bild 1).



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

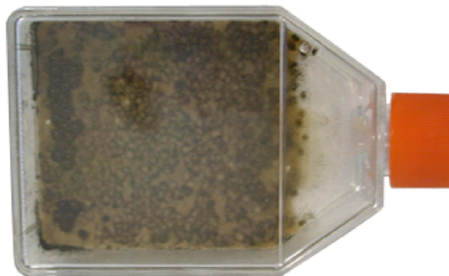


Bild 2 — Foto Nr. 2: *A. brasiliensis* ATCC 16404 nach 7 Tagen der Bebrütung bei 30 °C [ungeeignete (nicht verwendbare) Kultur]

5.4.1.3.3 Andere Prüforganismen (Hefen oder Schimmelpilze)

Bei zusätzlichen Prüforganismen muss jede Abweichung von diesem Verfahren zur Kultivierung der Hefen oder Schimmelpilze oder zur Herstellung der Suspensionen aufgezeichnet werden, wobei die Gründe im Prüfbericht anzugeben sind.

5.4.1.4 Prüfsuspensionen („N“)

5.4.1.4.1 *Candida albicans*

Folgendes Verfahren wird zur Herstellung der *Candida albicans*-Prüfsuspension angewendet:

- a) 10 ml des Verdünnungsmittels (5.2.2.4) werden zusammen mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) in einen 100-ml-Kolben gegeben. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3.1) werden Zellen ösenweise in das Verdünnungsmittel (5.2.2.4) überführt. Das Suspendieren der Zellen im Verdünnungsmittel sollte durch Reiben der Öse an der nassen Wand des Kolbens erfolgen, um die Zellen vor dem Eintauchen in das Verdünnungsmittel voneinander zu trennen. Unter Verwendung eines mechanischen Schüttelgeräts [5.3.2.6 b)] wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in ein anderes Röhrchen überführt.
- b) Die Anzahl der Zellen in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) auf $1,5 \times 10^8$ KBE/ml⁵⁾ bis $5,0 \times 10^7$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mit einem geeigneten Verfahren abgeschätzt wird. Diese Prüfsuspension wird im Wasserbad bei der Prüftemperatur θ (5.5.1.1) aufbewahrt und innerhalb von 2 h verwendet.

ANMERKUNG Die Anwendung eines Spektrophotometers zur Einstellung der Zellzahl wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm –Küvette mit 10 mm optischer Weglänge). Jedes Laboratorium erarbeitet deshalb für jeden Prüforganismus Kalibrierdaten, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte im Allgemeinen zwischen 0,200 und 0,350 zu finden sind. Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

- c) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) Verdünnungen von 10^{-5} und 10^{-6} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

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

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in eine gesonderte Petrischale überführt, und es werden 15 ml bis 20 ml geschmolzener MEA (5.2.2.3) zugegeben, der auf (45 ± 1) °C abgekühlt wurde.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe – in annähernd gleich große Teilmengen aufgeteilt – auf einer angemessenen Anzahl (mindestens zwei) von oberflächengetrockneten Platten verteilt, die MEA (5.2.2.3) enthalten.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.4.2 *Aspergillus brasiliensis* (vorher *A. Niger*) (Schimmelpilz)

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

- a) Unter Verwendung der Gebrauchskultur (5.4.1.3.2) werden die Sporen in 10 ml einer sterilen Polysorbat 80-Lösung (Massenkonzentration 0,05 %) in Wasser (5.2.2.2) suspendiert. Die Conidiosporen werden mit einem Glasstab oder Spatel von der Oberfläche der Kultur abgelöst. Die Suspension wird in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) 1 min leicht per Hand geschüttelt. Die Suspension wird durch eine Glasfilterfritte (5.3.2.13) filtriert.
- b) Die mikroskopische Untersuchung bei 400-facher Vergrößerung ist unmittelbar nach der Herstellung durchzuführen, um:
 - 1) das Vorhandensein einer hohen Konzentration (mindestens 75 % an stacheligen Sporen) von charakteristischen, reifen Sporen, d. h. stachelige Sporen (im Vergleich zu glatten Sporen) [siehe Bild 3 und Bild 4] nachzuweisen;

5) KBE/ml: koloniebildende Einheit(en) je Milliliter

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

Bei Vorhandensein von Myzelien ist mit einer zweiten gefritteten Filtration fortzufahren.

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

ANMERKUNG Sollten 75 % stachelige Sporen nicht erreicht werden, dann können aufgrund von *Aspergillus brasiliensis*-Kulturen oder verwendeter Medien diese Sporen hergestellt werden. In dieser Situation wird es notwendig sein, den gleichen Stamm von einer anderen Kultursammlung zu beziehen und/oder MEA von einem anderen Lieferanten zu verwenden.

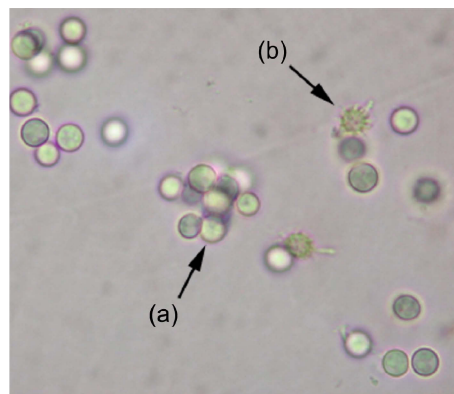


Bild 3 — Foto Nr. 3: Beobachtung von Conidiosporen unter dem Lichtmikroskop: Vorhandensein von glatten (a) und stacheligen (b) Sporen [ungeeignete (nicht verwendbare) Suspension]

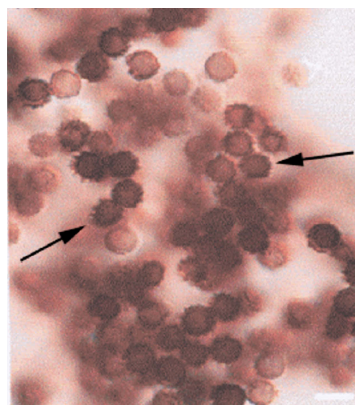


Bild 4 — Foto Nr. 4: Beobachtung von Conidiosporen unter dem Lichtmikroskop: Hohe Konzentration von charakteristischen, reifen Sporen mit stacheligem Aussehen (geeignete Suspension)

- c) Die Anzahl der Sporen in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) auf $1,5 \times 10^7$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^7$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mittels eines geeigneten Verfahrens abgeschätzt wird. Diese Suspension ist innerhalb von 4 h in einem Wasserbad (5.3.2.2), eingestellt auf $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, zu verwenden. In jedem Fall wird die Temperatur erst unmittelbar vor Beginn der Prüfung (5.5.2 oder 5.5.3) nach 5.5.1.4 eingestellt.

Die Verwendung einer Zellzählgerätes zur Einstellung der Zellzahlen wird dringend empfohlen. Bei der Verwendung einer geeigneten Zählkammer ist es notwendig, die Anweisungen genau zu befolgen.

Jedes Laboratorium sollte deshalb Kalibrierdaten erstellen, die die Beziehung zwischen den Ergebnissen aus dem Zählgerät und den Ergebnissen (5.4.1.6) aus den Gussplatten- oder Oberflächenverfahren beschreiben. Erfahrene Laboratorien fanden eine bessere Anpassung an die erforderliche Anzahl von Sporen, wenn die Sporenzahl im Gerät 10 % bis 50 % über der erzielten Anzahl lag.

- d) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) Verdünnungen von 10^{-5} und 10^{-6} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

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

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird etwa die Hälfte jeder 1,0-ml-Probe in eine gesonderte Petrischale überführt (d. h. Doppelbestimmung = vier Platten), und es werden 15 ml bis 20 ml geschmolzener MEA (5.2.2.3) zugegeben, der auf $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird etwa ein Viertel jeder 1,0-ml-Probe auf die entsprechende Anzahl (mindestens vier) oberflächengetrockneter Platten verteilt, die MEA (5.2.2.3) enthalten (d. h. Doppelbestimmung = acht Platten).

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.5 Validierungssuspension („Nv“)

- a) Zur Herstellung der Validierungssuspension werden von der Prüfsuspension (5.4.1.4.1 und 5.4.1.4.2) mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) Verdünnungen hergestellt, um eine Pilzzahl von $3,0 \times 10^2$ KBE/ml bis $1,6 \times 10^3$ KBE/ml [etwa ein Viertel $(1 + 3)$ der Verdünnung 10^{-4}] zu erhalten.
- b) Zur Auszählung wird mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) eine Verdünnung 10^{-1} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Eine Probe von 1,0 ml wird als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren beimpft [mit *Candida albicans*, 5.4.1.4.1c); mit *Aspergillus brasiliensis*, 5.4.1.4.2)].
- c) Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.6 Bebrütung und Auszählung der Prüf- und Validierungssuspensionen

Die Vorgehensweise beim Bebrüten und Auszählen der Prüf- und der Validierungssuspension ist wie folgt:

- a) Die Platten werden 42 h bis 48 h bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die aus irgendeinem Grunde nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die KBE auf den Platten werden gezählt, um die Gesamtanzahl der KBE zu bestimmen.

Nur für *Aspergillus brasiliensis*: Die Platten werden für weitere 20 h bis 24 h bebrütet und – falls die Anzahl der Kolonien zugenommen hat – für eine dritte Zeitdauer von weiteren 20 h bis 24 h. Platten, die keine gut voneinander abgesetzten Kolonien mehr aufweisen, werden nicht erneut ausgezählt. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt. Wenn die Anzahl zugenommen hat, wird nur die höhere Anzahl für die weitere Auswertung verwendet.

- b) Für jede Platte wird die genaue Koloniezahl erfasst, es wird aber „> 165“ (für Schimmelpilze) oder „> 330“ (für Hefen) für alle Zählungen größer als 165 bzw. 330 aufgezeichnet, und es werden die V_c -Werte nach 5.6.2.2 bestimmt.

- c) Die Anzahl der KBE/ml in der Prüfsuspension „N“ und in der Validierungssuspension „Nv“ wird nach den in 5.6.2.3 und 5.6.2.5 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.4.2 Produktprüflösungen

Die Konzentration einer Produktprüflösung muss dem 1,25-Fachen der gewünschten Prüfkonzentration entsprechen, weil sie während der Prüfung und während der Verfahrensvalidierung (5.5.2 oder 5.5.3) auf 80 % verdünnt wird. Produktprüflösungen müssen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt werden, um eine Konzentration im Wirkungsbereich und eine Konzentration im unwirksamen Bereich (5.8.2) zu erfassen. Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden, in diesem Fall beträgt die höchste geprüfte Konzentration 80 %.

Lösungen von gebrauchsfertigen Produkten, d. h. Produkten, die zur Anwendung nicht verdünnt werden, müssen mit Wasser (5.2.2.2) hergestellt werden.

Handwaschprodukte müssen mit einer 50 %igen Konzentration als höchste Konzentration (1 : 1-Lösung zur Simulation realer Nutzungsbedingungen) geprüft und daher in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) mit einer 62,5 %igen Konzentration vorverdünnt werden.

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand aufgelöst, indem mindestens $1,0 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ des Produkts in einen Messkolben eingewogen werden und mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) aufgefüllt wird. Die nachfolgenden Verdünnungen (niedrigere Konzentrationen) müssen in Messkolben (5.3.2.12) im Verhältnis Volumen zu Volumen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) hergestellt werden.

Bei flüssigen Produkten müssen die Verdünnungen des Produkts mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) im Verhältnis Volumen zu Volumen 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 (z. B. durch den Zusatz der Belastungssubstanz), muss dies im Prüfbericht festgehalten werden.

ANMERKUNG Das Zählen von in einer Ausfällung oder Ausflockung eingebetteten Mikroorganismen ist schwierig und unzuverlässig.

Die im Prüfbericht angegebene Konzentration des Produkts muss die erwünschte Prüfkonzentration sein. Die Prüfkonzentration wird als Massenanteil in Prozent oder als Volumenanteil in Prozent angegeben, ebenso werden Einzelheiten der Produktprobe im Lieferzustand angegeben.

5.5 Verfahren zur Beurteilung der fungiziden oder levuroziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Untersuchungsbedingungen

Für die Desinfektion und Handhygiene bei allgemeiner Verwendung gelten die Untersuchungsbedingungen in Tabelle 1 und 2:

Die empfohlene Einwirkzeit für die Nutzung des Produkts liegt in der Verantwortung des Herstellers.

Bei Einwirkzeiten gleich oder kürzer als 5 min gilt eine Grenzabweichung von 10 s. Bei längeren Einwirkzeiten gilt eine Grenzabweichung von 1 min.

5.5.1.2 Auswahl des Prüfverfahrens (Verdünnungs-Neutralisations oder Membranfiltration)

Das Verfahren der Wahl ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (5.5.2). Zur Ermittlung eines geeigneten Neutralisationsmediums 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 des Laboratoriums und veröffentlichten Daten ausgewählt wird.

Sollte dieses Neutralisationsmedium nicht valide sein, wird die Validierungsprüfung mit einem alternativen Neutralisationsmedium unter Berücksichtigung der Angaben in Anhang B wiederholt.

Wenn sich beide Neutralisationsmedien als nicht valide erweisen, darf das Verfahren der Membranfiltration (5.5.3) angewendet werden.

ANMERKUNG Unter besonderen Umständen kann es erforderlich sein, dem MEA (5.2.2.3) Neutralisationsmedium zuzufügen.

5.5.1.3 Allgemeine Anweisungen für Validierungs- und Prüfverfahren

Die Neutralisation und/oder Aufhebung der fungiziden und/oder fungistatischen Wirkung des Produkts 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 (Kontrolle der Untersuchungsbedingungen, Kontrolle des Neutralisationsmediums oder Filtrationskontrolle und Verfahrensvalidierung) müssen gleichzeitig mit der Prüfung und mit dem gleichen Neutralisationsmedium – oder der gleichen Spülflüssigkeit – wie in der Prüfung durchgeführt werden.

Im Falle von gebrauchsfertigen Produkten wird anstelle von Wasser standardisierter Härte Wasser (5.2.2.2) verwendet.

Wenn aufgrund von Problemen mit der Neutralisation dem für die Validierungs- und Kontrollverfahren verwendeten MEA ein Neutralisationsmedium zugefügt wurde (5.5.1.2), muss der in der Prüfung verwendete MEA 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 (5.2.2.7) und Belastungssubstanz (5.2.2.8)] werden vor der Prüfung im auf θ eingestellten Wasserbad (5.3.2.2) auf die Prüftemperatur θ (5.5.1.1) eingestellt. Die Stabilisierung der Temperatur der Reagenzien auf θ wird überprüft.

Das Neutralisationsmedium (5.2.2.5) oder die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) und das Wasser (5.2.2.2) müssen an die gewählte Temperatur angeglichen werden.

Im Falle von gebrauchsfertigen Produkten muss das Wasser (5.2.2.2) zusätzlich an die Temperatur θ angeglichen werden.

5.5.1.5 Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Prüforganismen

Beim Einfüllen der Prüf- oder Validierungssuspensionen (5.4.1) darf der obere Teil der Wandung des Reagenzglases nicht berührt werden.

5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren⁶⁾

5.5.2.1 Allgemeines

Das Prüf- sowie die Kontroll- und Validierungsverfahren (siehe 5.5.2.2 bis 5.5.2.5) müssen zeitgleich und für jede Untersuchungsbedingung (5.5.1.1) getrennt durchgeführt werden.

5.5.2.2 Prüfung „Na“ – Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Konzentrationen

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

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

Nach Ablauf dieser Zeit werden 8,0 ml einer der Produktprüflösungen (5.4.2) zugegeben. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe wieder in Gang gesetzt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)], und das Röhrchen wird für die gewählte Einwirkzeit t [5.5.1.1)] 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 1,0-ml-Probe des Prüfgemischs „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 ein auf die gewählte Temperatur eingestelltes Wasserbad gegeben. Nach einer Neutralisationszeit von 10 s (5 s bei Einwirkzeiten gleich oder kürzer als 1 min) wird durchmischt, und es wird sofort eine Probe von 1,0 ml des neutralisierten Prüfgemischs „Na“ (enthält das Neutralisationsmedium, Produktprüflösung, Belastungssubstanz und Prüfsuspension) als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplatten- oder des Oberflächenverfahrens beimpft.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in eine gesonderte Petrischale pipettiert, und es werden 15 ml bis 20 ml geschmolzener MEA (5.2.2.3) zugegeben, der auf $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe – in annähernd gleich große Teilmengen aufgeteilt – auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) an der Oberfläche getrockneter Platten ausgestrichen, die MEA (5.2.2.3) enthalten.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

- c) Die Arbeitsgänge a) und b) werden zeitgleich unter Verwendung der weiteren Produktprüflösungen durchgeführt.
- d) Die Arbeitsgänge a) bis c) werden unter Anwendung der gewählten Untersuchungsbedingungen (5.5.1.1) durchgeführt.

Für Handwaschmittel müssen zwei zusätzliche Dezimalverdünnungen plattiert werden.

⁶⁾ Zur graphischen Darstellung des Verfahrens siehe C.1.

5.5.2.3 Kontrolle der Untersuchungsbedingungen „A“ – Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimtötender Wirkungen unter den Untersuchungsbedingungen

Die Vorgehensweise bei der Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimtötender Wirkungen unter den Untersuchungsbedingungen 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 min $\pm$ 10 s in ein auf eine Temperatur von θ eingestelltes Wasserbad gestellt.

Nach Ablauf dieser Zeit werden 8,0 ml Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) zugegeben. [Im Falle von gebrauchsfertigen Produkten wird anstelle von Wasser standardisierter Härte Wasser (5.2.2.2) verwendet]. Bei Beginn der Zugabe wird die Stoppuhr erneut in Gang gesetzt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)], und das Röhrchen wird 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 1,0-ml-Probe dieses Gemischs „A“ als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplatten- oder des Oberflächenverfahrens beimpft [5.5.2.2 b)].

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 wird bei Beginn der Zugabe in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)], und das Röhrchen wird für 10 s (5 s bei Einwirkzeiten gleich oder kürzer als 1 min) 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 1,0-ml-Probe dieses Gemischs „B“ als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplatten- oder des Oberflächenverfahrens beimpft [5.5.2.2 b)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

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

Folgendes Verfahren wird zur Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens angewendet:

- a) 1,0 ml der in der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Belastungssubstanz wird in ein Röhrchen pipettiert. 1,0 ml des Verdünnungsmittels (5.2.2.4) wird zugegeben; anschließend wird die Stoppuhr in Gang gesetzt, und es werden 8,0 ml der Produktprüflösung nur der höchsten in der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Konzentration zugegeben. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)], und das Röhrchen wird 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 Gemischs in ein Röhrchen mit 8,0 ml des (in 5.5.2.2 verwendeten) Neutralisationsmediums 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 10 s (5 s bei Einwirkzeiten gleich oder kürzer als 1 min) 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 $30 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$ 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 1,0-ml-Probe des Gemischs „C“ als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplatten- oder Oberflächenverfahrens [5.5.2.2 b)] beimpft.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

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

Die Vorgehensweise beim Bebrüten und Auszählen des Prüfgemischs sowie der Kontroll- und Validierungsgemische ist wie folgt:

- a) Die Platten werden 42 h bis 48 h bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die (aus irgendeinem Grund) nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die KBE auf den Platten werden gezählt, um die Gesamtanzahl der koloniebildenden Einheiten zu bestimmen.

Nur für *Aspergillus brasiliensis*: Die Platten werden erneut für 20 h bis 24 h bebrütet und – falls die Anzahl der Kolonien zugenommen hat – für eine dritte weitere Zeitdauer von 20 h bis 24 h. Platten, die keine gut voneinander abgesetzten Kolonien mehr aufweisen, werden nicht erneut gezählt. 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; es wird aber „> 165“ (für Schimmelpilze) oder „> 330“ (für Hefen) für alle Zählungen größer als 165 bzw. 330 aufgezeichnet, und die V_c -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der KBE/ml im Prüfgemisch „Na“ und die in den Validierungsgemischen „A“, „B“ und „C“ wird nach den in 5.6.2.4 und 5.6.2.6 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.5.3 Membranfiltrationsverfahren⁷⁾

5.5.3.1 Allgemeines

Die Prüf- und die Kontroll- und Validierungsverfahren (5.5.3.2 bis 5.5.3.5) müssen zeitgleich und für jede Untersuchungsbedingung (5.5.1.1) getrennt durchgeführt werden.

Jedes Membranfiltrationsgerät muss mit einer Membran mit einer Porenweite von $0,45 \mu\text{m}$ und einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm (5.3.2.7) ausgestattet sein und mit 50 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) gefüllt werden. Die für das Filtrieren erforderliche Zeit muss – sofern 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 fungiziden oder levuroziden Konzentrationen

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

- a) Siehe 5.5.2.2 a).

⁷⁾ Zur graphischen Darstellung des Verfahrens siehe C.2.

- b) Nach Ablauf von t wird eine 0,1-ml-Probe des Prüfgemischs „Na“ als Doppelbestimmung entnommen, und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Die Filtration wird sofort durchgeführt. Es werden mindestens 150 ml und nicht mehr als 500 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) durchfiltriert. Wenn die Spülflüssigkeit kein Wasser ist, wird das Verfahren damit beendet, dass 50 ml Wasser (5.2.2.2) filtriert werden. Anschließend wird jede Membran auf die Oberfläche gesonderter MEA-Platten überführt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

- c) Siehe 5.5.2.2 c).

- d) Siehe 5.5.2.2 d).

5.5.3.3 Kontrolle der Untersuchungsbedingungen „A“ – Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimtötender Wirkungen unter den Untersuchungsbedingungen

Die Vorgehensweise bei der Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimtötender Wirkungen unter den Untersuchungsbedingungen ist wie folgt:

- a) Siehe 5.5.2.3 a).

- b) Nach Ablauf von t wird eine 1,0-ml-Probe dieses Gemischs „A“ als Doppelbestimmung entnommen, und jede 1,0-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Die Filtration wird sofort sowie zusätzlich mit 50 ml Wasser (5.2.2.2) durchgeführt. Anschließend wird jede Membran auf die Oberfläche gesonderter MEA-Platten (5.2.2.3) überführt.

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

ANMERKUNG Der Grund für die Aufteilung der Probe ist der obere Grenzwert für die Auszählung [5.6.2.2a)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

5.5.3.4 Filtrationskontrolle „B“ – Validierung des Filtrationsvorganges

Die Vorgehensweise bei der Validierung des Filtrationsverfahrens ist wie folgt:

0,1 ml der Validierungssuspension (5.4.1.5) wird als Doppelbestimmung entnommen (Suspension für die Kontrolle „B“), und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt.

Die Filtration wird sofort durchgeführt. Die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) wird auf die gleiche Weise durchfiltriert wie in der Prüfung [5.5.3.2 b)]. Wenn die Spülflüssigkeit kein Wasser ist, wird das Verfahren damit beendet, dass 50 ml Wasser (5.2.2.2) filtriert werden. Anschließend wird jede Membran auf die Oberfläche gesonderter MEA-Platten (5.2.2.3) überführt.

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

ANMERKUNG Der Grund für die Aufteilung der Probe ist der obere Grenzwert für die Auszählung [5.6.2.2a)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

5.5.3.5 Verfahrenvalidierung „C“ – Validierung des Membranfiltrationsverfahrens oder Zählung der Pilze auf den Membranen, die zuvor mit dem Gemisch aus Produkt und Belastungssubstanz in Kontakt waren

Das Verfahren für die Validierung des Membranfiltrationsverfahrens oder die Zählung der Pilze 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 Validierungsgemischs „C“ als Doppelbestimmung entnommen, und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Die Filtration wird sofort durchgeführt. Die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) wird auf die gleiche Weise durchfiltriert wie in der Prüfung [5.5.3.2 b)], anschließend werden die Membranen mit 50 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) bedeckt, und es wird 0,1 ml Validierungssuspension (5.4.1.5) zugegeben. Es wird sofort erneut sowie zusätzlich mit 50 ml Wasser (5.2.2.2) filtriert, anschließend wird jede Membran auf die Oberfläche gesonderter MEA-Platten (5.2.2.3) überführt.

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

ANMERKUNG Der Grund für die Aufteilung der Probe ist der obere Grenzwert für die Auszählung [5.6.2.2a)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

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

Die Vorgehensweise beim Bebrüten und Auszählen des Prüfgemischs sowie der Kontroll- und Validierungsgemische ist wie folgt:

- a) Die Platten werden 42 h bis 48 h bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die aus irgendeinem Grunde nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Kolonien auf den Membranen werden ausgezählt.

Nur für *Aspergillus brasiliensis*: Die Platten werden erneut für 20 h bis 24 h bebrütet und – falls die Anzahl der Kolonien zugenommen hat – für eine dritte weitere Zeitdauer von 20 h bis 24 h. 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 nur die höhere Anzahl für die weitere Auswertung verwendet.

- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, es wird aber „> 55“ (für Schimmelpilze) oder „> 165“ (für Hefen) für alle Zählungen größer als 55 bzw. 165 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 den in 5.6.2.4 und 5.6.2.6 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.6 Versuchsdaten und Berechnung

5.6.1 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen

5.6.1.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen und Prüfgemische

N und N_v stellen die Pilzsuspensionen dar, N_a ist das fungizide Prüfgemisch, A (Kontrolle der Untersuchungsbedingungen), B (Kontrolle des Neutralisationsmediums oder Filtrationskontrolle), C (Verfahrenvalidierung) sind die verschiedenen Kontrollprüfgemische.

N , N_v , N_0 , N_{v0} , N_a sowie A , B und C sind jeweils die Anzahl der je ml in den verschiedenen Prüfgemischen ausgezählten Zellen entsprechend Tabelle 3.

Tabelle 3 — Anzahl der je ml in den verschiedenen Prüfgemischen ausgezählten Zellen

	Anzahl der Zellen je ml in den Pilzsuspensionen	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 nach 30 min (C)
Prüfung	N Prüfsuspension	N_0 (= $N/10$)	N_a (vor Neutralisation oder Filtration)
Kontrollen	N_v Validierungssuspension	N_{v0} (= $N_v/10$)	A, B, C

5.6.1.2 Vc-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 “ und je 1,0-ml-Probe der Kontrollen 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 stellt die Berechnung der Reduktion R (5.8.1) dar.

5.6.2.2 Bestimmung der V_c -Werte

Die V_c -Werte werden wie folgt bestimmt:

- a) Die üblichen Grenzwerte für die Auszählung von Pilzen auf Agarplatten liegen zwischen 15 und 150 Kolonien für Schimmelpilze und zwischen 15 und 300 Kolonien für Hefen. In dieser Europäischen Norm ist eine Abweichung von 10 % zulässig, damit betragen die Grenzwerte 14 und 165 für Schimmelpilze und 14 und 330 für Hefen. Auf Membranen weichen die üblichen Grenzwerte ab: 50 für Schimmelpilze und 150 für Hefen, daher liegen die Grenzwerte mit der 10 %-Abweichung bei 55 für Schimmelpilze und 165 für Hefen;

ANMERKUNG 1 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 einer Platte), z. B. ergeben drei Platten mit je 1 ml Probe und mit 3 KBE, 8 KBE und 5 KBE einen V_c -Wert von 16. Die oberen Grenzwerte (55, 165 und 330) spiegeln die Ungenauigkeit beim Zählen zusammenfließender Kolonien wider und die Wachstumshemmung durch Erschöpfung der Nährsubstanzen. Sie beziehen sich nur auf die Auszählung einer Platte und nicht notwendigerweise auf die Probe.

- b) Bei der Auszählung der Prüfsuspension „ N “ (5.4.1.4), der Validierungssuspension „ N_v “ (5.4.1.5) und allen Auszählungen beim Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (5.5.2.6) werden die V_c -Werte entsprechend der Anzahl der je 1 ml Probe verwendeten Platten ermittelt und aufgezeichnet (5.6.1.2).

ANMERKUNG 2 Wenn zur Bestimmung des V_c -Wertes mehr als eine Platte je 1 ml Probe verwendet wurde, sind die Keimzahlen je Platte aufzuzeichnen.

Wenn die Auszählung einer Platte einen Wert größer als 165 (oder 330) ergeben hat, wird das Ergebnis als „> 165“ (oder „> 330“) aufgezeichnet. Wenn mehr als eine Platte je 1 ml Probe verwendet wurde und mindestens eine der Platten eine Anzahl größer 165 (oder 330) aufweist, wird dieser V_c -Wert im Prüfbericht als „> Summe der Auszählungen“ angegeben (z. B. für „> 165, 132, 144“ wird angegeben „> 441“).

Wenn ein V_c -Wert kleiner als 14 ist, wird die Anzahl angegeben, jedoch für die weitere Berechnung (im Fall von N_a) durch „< 14“ ersetzt.

Beim Membranfiltrationsverfahren (5.5.3) sind die Auszählungen auf den Membranen die V_c -Werte (5.6.1.2). Die V_c -Werte unterhalb des unteren Grenzwerts (14) oder oberhalb des oberen Grenzwerts (165 oder 55) werden wie vorstehend beschrieben angegeben.

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

5.6.2.3 Berechnung von N und N_0

N ist die Anzahl von Zellen je ml in der Prüfsuspension (5.4.1.4, 5.6.1.1).

Da zwei Verdünnungen der Prüfsuspensionen (5.4.1.4 in Verbindung mit 5.4.1.6) ausgewertet werden, wird die Anzahl der KBE/ml als gewichteter Mittelwert nach folgender Gleichung (1) berechnet:

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

Dabei ist

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

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

BEISPIEL
$$N = \frac{139 + 154 + 14 + 17}{(2 + 0,1 \times 2)10^{-5}} = \frac{324}{2,2 \times 10^{-5}} = 1,47 \times 10^7 = 1,5 \times 10^7 \text{ (KBE/ml)}$$

N_0 ist die Anzahl der Zellen je ml im Prüfgemisch [5.5.2.2 a)] zu Beginn der Einwirkzeit (Zeit „null“ = 0). Sie beträgt aufgrund der zehnfachen Verdünnung durch die Zugabe von Produkt und Belastungssubstanz ein Zehntel des gewichteten Mittelwerts von N .