

DIN EN 1657



ICS 71.100.35

Einsprüche bis 2023-06-28
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 1657:2016-11

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder
levuroziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika
für den Veterinärbereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche und Englische Fassung prEN 1657:2023**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity of
chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German and English version prEN 1657:2023

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 vétérinaire –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);
Version allemande et anglaise prEN 1657:2023

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2023-04-28 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 94 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 1657:2023) 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 1657:2016-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Harmonisierung der Herstellung der Pilzsporensuspension mit anderen Fungizidprüfungen des CEN/TC 216;
- b) für die Aspergillus-Sporensuspension wurde eine zusätzliche Anforderung hinzugefügt;
- c) die Prüfbedingungen für Zitzendesinfektionsmittel wurden hinzugefügt;
- d) Norm redaktionell überarbeitet und an die derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

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

Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeas-ticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area – Test method and requi-rements (phase 2, step 1)

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

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	7
5.1 Kurzbeschreibung	7
5.2 Materialien und Reagenzien	8
5.2.1 Prüforganismen	8
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	8
5.3 Geräte und Glasgeräte	11
5.3.1 Allgemeines	11
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte:	11
5.4 Herstellung der Prüforganismus-Suspensionen und der Produktprüflösungen	13
5.4.1 Prüforganismus-Suspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)	13
5.4.2 Produktprüflösungen	17
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der fungiziden oder levuroziden Wirkung des Produkts	18
5.5.1 Allgemeines	18
5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	19
5.5.3 Membranfiltrationsverfahren	21
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	24
5.6.1 Erklärung der Begriffe und Abkürzungen	24
5.6.2 Berechnung	24
5.7 Verifizierung des Verfahrens	27
5.7.1 Allgemeines	27
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	27
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	28
5.7.4 Zusätzliche Grenzwerte für <i>Aspergillus brasiliensis</i>	28
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	28
5.8.1 Reduktion	28
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	28
5.8.3 Limitierender Prüforganismus und fungizide/levurozide Konzentration	28
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	29
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	29
5.9.1 Allgemeines	29
5.9.2 Fungizide Wirkung für allgemeine Zwecke	29
5.9.3 Fungizide Wirkung für besondere Zwecke	29
5.9.4 Levurozide Wirkung für allgemeine Zwecke	29
5.9.5 Levurozide Wirkung für besondere Zwecke	29
5.9.6 Levurozide Wirkung für Zitzendesinfektionsmittel	30
5.10 Prüfbericht	30
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	32
Anhang B (informativ) Geeignete Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten	33
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung von Prüfverfahren	35
C.1 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	35
C.2 Membranfiltrationsverfahren	37
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichtes	39
Anhang E (informativ) Präzision der Prüfergebnisse	45
Literaturhinweise	48

Bilder

Bild 1 — Foto Nr. 1: <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 nach 7 Tagen Bebrütung bei 30 °C	13
Bild 2 — Foto Nr. 2: Beispiel für eine ungeeignete (nicht brauchbare) Kultur von <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 nach 7 Tagen Bebrütung bei 30 °C	14
Bild 3 — Foto Nr. 3: Feststellung von Conidiosporen unter dem Lichtmikroskop: Vorliegen von glatten (a) und stacheligen (b) Sporen (unzureichende Menge an stacheligen Sporen) . .	15
Bild 4 — Foto Nr. 4: Feststellung von Conidiosporen unter dem Lichtmikroskop: Hohe Konzentration an charakteristischen reifen Sporen mit stacheliger Erscheinung (ausreichende Menge an stacheligen Sporen)	16
Bild C.1 — Prüfung (Na)	35
Bild C.2 — Validierung	36
Bild C.3 — Prüfung (Na)	37
Bild C.4 — Validierung	38
Bild E.1 — Präzision des für Pilze erhaltenen Reduktionsfaktors (in logarithmischer Form) . . .	46

Tabellen

Tabelle 1 — Obligatorische und zusätzliche Prüfbedingungen	7
Tabelle 2 — Anzahl der je ml in den verschiedenen Prüfgemischen gezählten Zellen	24
Tabelle B.1	33
Tabelle E.1 — Für Pilze verwendete theoretische Reduktionsfaktoren (in logarithmischer Form)	45
Tabelle E.2 — Präzision des für Pilze erhaltenen Reduktionsfaktors (in logarithmischer Form) .	46

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 1657:2023) 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 1657:2016 ersetzen.

Dieses Dokument wurde überarbeitet, um die Herstellung der Pilzsporensuspension mit anderen fungiziden Prüfungen des CEN/TC 216 zu harmonisieren und um Änderungen, die für alle Europäischen Normen gelten, einzuarbeiten.

Eine zusätzliche Anforderung ist für die *Aspergillus*-Sporensuspension hinzugefügt worden und deshalb müssen Ergebnisse, die mit EN 1657:2005 erzielt wurden und die diese zusätzliche Anforderung nicht erfüllen, durch Wiederholen der Prüfungen nach EN 1657:2015 bestätigt werden.

Die Prüfbedingungen für Zitzendesinfektionsmittel wurden hinzugefügt.

Einleitung

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

Dieser Laborversuch berücksichtigt die praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts, einschließlich Einwirkzeit, Temperatur, Prüforganismen und Belastungssubstanzen, d. h. Bedingungen, die dessen Wirkung bei der praktischen Anwendung beeinflussen können.

Die Bedingungen sollen den allgemeinen Ansprüchen genügen und einen Bezug zwischen Laboren und Produktarten ermöglichen. Jede in dieser Prüfung festgestellte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums bezieht sich auf genau festgelegte Untersuchungsbedingungen. Bei einigen Anwendungen können jedoch die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt abweichen, und deshalb müssen zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

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

Dieses Dokument gilt für Produkte für die Anwendung im Veterinärbereich, 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 gelangen.

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

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren ist zur Bestimmung der Wirkung von handelsüblichen Zubereitungen oder Wirkstoffen unter deren Anwendungsbedingungen vorgesehen.

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 Prüforganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

EN 14885:2022, *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 14885:2022.

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

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

4 Anforderungen

Bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) oder – im Fall gebrauchsfertiger Produkte – mit Wasser (5.2.2.2) und Prüfung nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 muss das Produkt unter Simulierung einer Verschmutzung niedrigen Grades (3,0 g/l Rinderalbumin) oder einer Verschmutzung hohen Grades (10 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Rinderserumalbumin) oder mit 10 g/l Magermilch für Zitzendesinfektionsmittel oder zusätzlicher Prüfbedingungen eine dezimallogarithmische (lg-) Reduktion der Keimzahl (der Lebendkeimzahl) um mindestens 4 Stufen nachweisen.

Tabelle 1 — Obligatorische und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Fungizide Wirkung	Levurozide Wirkung	Levurozide Wirkung für Zitzendesinfektionsmittel
Prüforganismen obligatorisch	<i>Aspergillus brasiliensis</i> <i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
zusätzlich	jeder geeignete Prüforganismus	jeder geeignete Prüforganismus	jeder geeignete Prüforganismus
Prüftemperatur	In Schritten von 5 °C		
Minimum	5 °C ± 1 °C	5 °C ± 1 °C	20 °C ± 1 °C
Maximum	40 °C ± 1 °C	40 °C ± 1 °C	30 °C ± 1 °C
Einwirkzeit Minimum Maximum	Von 30 s bis 5 min in Abständen von 30 s und von 5 min bis 120 min in Abständen von 5 min		
	1 min ± 5 s	1 min ± 5 s	1 min ± 5 s für Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken 30 s ± 5 s für Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken
	120 min ± 10 s ^a	120 min ± 10 s ^a	30 min ± 10 s für Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken 3 min ± 10 s für Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken
Belastungssubstanz			
Verschmutzung niedrigen Grades	3,0 g/l Rinderserumalbumin	3,0 g/l Rinderserumalbumin	Nach dem Melken: 10,0 g/l Milchpulver
Verschmutzung hohen Grades	10 g/l Hefeextrakt plus 10 g/l Rinderserumalbumin	10 g/l Hefeextrakt plus 10 g/l Rinderserumalbumin	Vor dem Melken: 3,0 g/l Rinderserumalbumin
zusätzlich	jede geeignete Substanz	jede geeignete Substanz	jede geeignete Substanz
Die in Tabelle 1 angegebenen obligatorischen Einwirkzeiten für Desinfektionsmittel wurden gewählt, um einen Vergleich von Standardbedingungen zu ermöglichen.			
ANMERKUNG Bei den zusätzlichen Bedingungen kann die als Ergebnis festgelegte Konzentration niedriger sein als die unter den obligatorischen Prüfbedingungen erhaltene Konzentration.			
^a Die empfohlene Einwirkzeit für die Anwendung des Produktes liegt in der Verantwortung des Herstellers.			

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

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Probe des Produkts wird im Lieferzustand und/oder verdünnt mit Wasser standardisierter Härte (oder mit Wasser für gebrauchsfertige Produkte) zu einer Prüfsuspension aus Pilzen (Hefezellen oder Schimmelpilzsporen) in einer Lösung einer Belastungssubstanz gegeben. Das Gemisch wird bei Temperaturen nach Tabelle 1 gehalten. Am Ende dieser Einwirkzeit wird ein Aliquot entnommen und die fungizide/levurozide und/oder fungistatische/levurostatische Wirkung in diesem Anteil wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. Das gewählte Verfahren ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren.

Falls kein geeignetes Neutralisationsmedium ermittelt werden kann, wird die Membranfiltration durchgeführt. In jeder Probe wird die Anzahl überlebender Pilze bestimmt und die Reduktion 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* (levoruzide Wirkung) als Prüforganismen durchgeführt (obligatorische Prüfbedingungen).

5.1.3 Zusätzliche und frei wählbare Einwirkzeiten und Temperaturen werden festgelegt. Zusätzliche Prüforganismen können angewendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die fungizide Wirkung muss mit folgenden Stämmen als Prüforganismen ermittelt werden¹:

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

Die levurozide Wirkung muss ausschließlich mit *Candida albicans* ermittelt werden.

ANMERKUNG Für Stammmummern in einigen anderen Stammsammlungen siehe Anhang A.

Die erforderliche Bebrütungstemperatur dieser Prüforganismen beträgt $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ (siehe 5.3.2.3). Die gleiche Temperatur muss bei allen Bebrütungen angewendet werden, die bei einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung vorgenommen werden.

Falls zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, müssen diese unter optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Zeit, Atmosphäre, Medien) bebrütet werden, die im Prüfbericht angegeben werden. Falls die ausgewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss deren Eignung zur Bereitstellung der erforderlichen *Inokula* nachgewiesen werden. Wenn diese zusätzlichen Prüforganismen nicht in einem Referenzzentrum klassifiziert sind, müssen deren Eigenschaften zur Identifikation angegeben werden. Zusätzlich müssen die Stämme von dem Prüflabor oder der nationalen Stammsammlung fünf Jahre als Referenzprobe aufbewahrt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in dieser Europäischen Norm angegebenen Massen chemischer Substanzen beziehen sich auf wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um daraus resultierende Differenzen in der relativen Molekülmasse zu berücksichtigen.

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

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

¹ ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern für Stämme, die von der American Type Culture Collection (ATCC) geliefert werden. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die diese Europäische Norm anwenden, und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte ein Verfallsdatum festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

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

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

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

ANMERKUNG 2 Falls kein destilliertes Wasser von geeigneter Qualität verfügbar ist, kann Wasser für Injektionen (siehe Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

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

5.2.2.3 Malzextrakt-Agar (MEA)

Malzextrakt-Agar, bestehend aus:

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

^a Der Malzextrakt sollte lebensmitteltauglich (empfohlen wird Cristomalzpulver von Difal) oder von entsprechender Qualität, nicht stark aufgereinigt und nicht nur auf Maltose basierend (empfohlen wird Malzextrakt von OXOID²), sein.

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 $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Falls Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auftreten, ist es möglicherweise erforderlich, dem MEA Neutralisationsmedium zuzusetzen. In Anhang B finden sich Angaben über Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

Trypton, pankreatisch verdautes Casein 1,0 g

Natriumchlorid (NaCl) 8,5 g

Wasser (5.2.2.2) bis 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 $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

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

2 Diese Angabe dient nur 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.

ANMERKUNG In Anhang B finden sich Angaben über Neutralisationsmedien, die sich für einige Produktkategorien als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.6 Spülflüssigkeit (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. Sie muss steril, mit der Filtermembran verträglich und durch diese unter den in 5.5.3 beschriebenen Prüfbedingungen filtrierbar sein.

ANMERKUNG In Anhang B finden sich Angaben über Spülflüssigkeiten, die sich für einige Produktkategorien als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung von Produkten

Zur Herstellung von 1 l Wasser standardisierter Härte kommt folgende Verfahrensweise zum Einsatz:

- 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. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)] sterilisiert.

Die Sterilisation im Autoklaven – falls angewendet – kann zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird mit Wasser (5.2.2.2) unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) nicht länger als 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) nicht länger als 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 (5.3.2.9) Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B gegeben. Es wird durchmischt und mit Wasser auf 1 000 ml verdünnt (5.2.2.2). Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.4), betragen. Falls erforderlich, 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 ist die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas niedriger als 300 mg/l Calciumcarbonat (CaCO_3).

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Allgemeines

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

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

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

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

5.2.2.8.2 Verschmutzung niedrigen Grades (Rinderserumalbumin-Lösung)

3,0 g Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) 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 3,0 g/l.

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

In einem 250-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 50,0 g Hefeextraktpulver in 150 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst und es wird gewartet, bis der Schaum sich aufgelöst hat. Danach wird mit Wasser (5.2.2.2) bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird in eine saubere trockene Flasche überführt und im Autoklaven [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Danach wird auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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) werden hinzugefügt. 5,0 g Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) werden unter Schütteln in der Lösung gelöst und es wird gewartet, bis der Schaum sich aufgelöst hat. Es wird mit Wasser (5.2.2.2) bis zur Marke aufgefüllt und durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert; die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verwendet.

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

5.2.2.8.4 Milch für Zitzendesinfektionsmittel

Magermilch, die garantiert frei von Antibiotika und Zusatzstoffen ist und rekonstituiert bei einer Rate von 100 g Pulver je Liter Wasser (5.2.2.2), 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 5 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ erwärmt.

Die Endkonzentration des Magermilchpulvers im Prüfverfahren (5.5) beträgt 10,0 g/l.

5.3 Geräte und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

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

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

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung³ und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation

- a) zur Sterilisation durch feuchte Hitze, ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min bei $(121^{+3})^\circ\text{C}$ gehalten werden kann;

3 Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

- 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 ± 1) °C, (10 ± 1) °C, (20 ± 1) °C, (30 ± 1) °C, (40 ± 1) °C und (45 ± 1) °C (um MEA im flüssigen Zustand zu halten, falls das Gussplattenverfahren angewendet wird) und auf weitere 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 kleiner 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 Schüttelgeräte

- a) Elektromechanisches Rührwerk, 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 Volumen von mindestens 50 ml ausgestattet sein. Es muss geeignet sein zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von 0,45 µm für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) und Rinderserumalbumin (5.2.2.8), und für den Fall der Anwendung des Membranfiltrationsverfahrens (5.5.3).

Die verwendete Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen. Für eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen auf der Membran und zur Vermeidung eines übermäßig langen Filtrationsvorgangs, muss das Gerät so eingestellt werden, dass 100 ml der Spülflüssigkeit in 20 s bis 40 s filtriert werden.

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

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

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

5.3.2.11 Glasperlen, Durchmesser 3 mm bis 4 mm.

5.3.2.12 Messkolben.

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

5.3.2.14 Kulturflaschen (Kulturkolben) mit belüfteten Verschlusskappen.

5.3.2.15 Mikroskop, geeignet für eine 400-fache Vergrößerung.

4 Ein Vortex[®]-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch CEN.

5.4 Herstellung der Prüforganismus-Suspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüforganismus-Suspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

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

5.4.1.2 Konservierung und Stammkulturen der Prüforganismen

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

5.4.1.3 Gebrauchskultur der Prüforganismen

5.4.1.3.1 *Candida albicans* (Hefe)

Zur Herstellung der Gebrauchskultur von *Candida albicans* (5.2.1) wird aus der Stammkultur (5.4.1.2) eine Subkultur durch Ausstrich auf Schrägagar oder Platten (5.3.2.10) aus MEA (5.2.2.3) 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 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 72-h-Subkultur für die folgenden Subkulturen unter der Voraussetzung verwendet werden, dass die Subkultur während der 72 h im Brutschrank (5.3.2.3) verblieben ist.

Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

5.4.1.3.2 *Aspergillus brasiliensis* (Schimmelpilz)

Bei *Aspergillus brasiliensis* (5.2.1) wird nur die erste Subkultur, die auf MEA (5.2.2.3) in Petrischalen oder Kulturflaschen mit belüfteten Verschlusskappen (5.3.2.14) angelegt wurde, verwendet und 7 Tage bis 9 Tage bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet. Das Anlegen weiterer Subkulturen ist nicht erforderlich. Um die gleichmäßige Temperaturverteilung zu verbessern, dürfen die Petrischalen während der Bebrütung nicht übereinander gestapelt werden. Am Ende der Bebrütung müssen alle Kulturen eine dunkelbraune oder schwarze Oberfläche aufweisen. Kulturen, die vereinzelte, kleine weiße oder graue Flächen aufweisen, dürfen verwendet werden (siehe Bild 1).



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

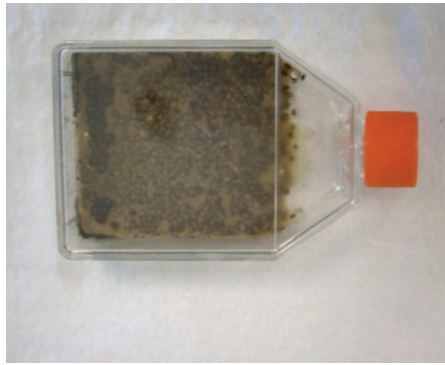


Bild 2 — Foto Nr. 2: Beispiel für eine ungeeignete (nicht brauchbare) Kultur von *A. brasiliensis* ATCC 16404 nach 7 Tagen Bebrütung bei 30 °C

5.4.1.3.3 Andere Prüforganismen (Hefen oder Schimmelpilze)

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

5.4.1.4 Prüfsuspension („N“)

5.4.1.4.1 *Candida albicans*

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

- 10 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) werden mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) in eine 100-ml-Kulturflasche gegeben. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3.1) werden ösenweise Zellen in das Verdünnungsmittel (5.2.2.4) überführt. Die Suspension der Zellen im Verdünnungsmittel sollte erfolgen, indem die Öse vor dem Eintauchen in das Verdünnungsmittel an der feuchten Wand der Kulturflasche gerieben wird, um die Zellen voneinander zu trennen. Mit dem mechanischen Schüttelgerät [5.3.2.6 b)] wird die Kulturflasche 3 min geschüttelt. Die Suspension wird von den Glasperlen abgesaugt und in ein Reagenzglas überführt.
- Mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) wird die Anzahl der Zellen in der Suspension auf $1,5 \times 10^7$ KBE/ml⁵ bis $5,0 \times 10^7$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mittels eines geeigneten Verfahrens abgeschätzt wird. Diese Prüfsuspension wird im Wasserbad bei der Prüftemperatur θ [5.5.1.1 a)] aufbewahrt und innerhalb von 2 h verwendet.

Die Verwendung eines Spektrophotometers zur Einstellung Anzahl der Zellen wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, Küvette mit 10 mm optischer Weglänge). Jedes Labor sollte deshalb Kalibrierdaten für jeden Prüforganismus erarbeiten, 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.

- 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 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplattenverfahrens (Plattengussverfahrens) oder Oberflächenverfahrens (Spatelplattenverfahrens) abgeimpft.

- 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 MEA (5.2.2.3) zugegeben.

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

- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe – aufgeteilt in etwa gleiche Anteile – auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) an der Oberfläche getrockneter MEA-Platten (5.2.2.3) ausgestrichen.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.4.2 *Aspergillus brasiliensis*

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 sterilen Glasstab oder Spatel von der Oberfläche der Kultur abgelöst. Die Suspension wird in eine Kulturflasche überführt und zusammen mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) eine Minute von Hand leicht geschüttelt. Die Suspension wird durch eine Glasfilterfritte (5.3.2.13) filtriert.
- b) Unmittelbar nach der Herstellung der Prüfsuspension wird eine mikroskopische Untersuchung mit einer 400-fachen Vergrößerung (5.3.2.15) durchgeführt, um Folgendes aufzuzeigen:

- 1) Das Vorhandensein einer hohen Konzentration (mindestens 75 %) an charakteristischen reifen Sporen, d. h. stachelige Sporen (im Vergleich zu glatten Sporen) [siehe Bild 3 und Bild 4].

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

- 2) Das Fehlen von Sporenkeimung (mindestens 10 Sichtfelder werden überprüft).
- 3) Falls gekeimte Sporen vorliegen, wird die Suspension verworfen.
- 4) Das Fehlen von Myzelfragmenten (mindestens 10 Sichtfelder werden überprüft).

Bei Vorhandensein von Myzelien wird mit einer zweiten Filtration durch eine Glasfilterfritte fortgefahren.

Sollten noch immer Myzelien vorhanden sein, wird die Suspension verworfen.

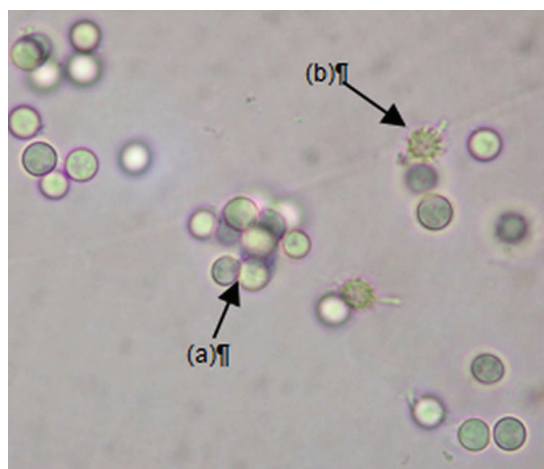


Bild 3 — Foto Nr. 3: Feststellung von Conidiosporen unter dem Lichtmikroskop: Vorliegen von glatten (a) und stacheligen (b) Sporen (unzureichende Menge an stacheligen Sporen)

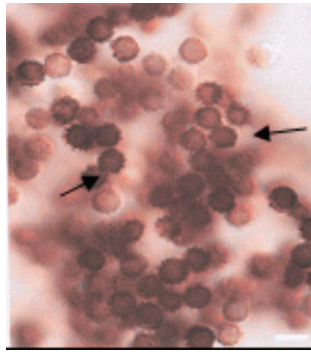


Bild 4 — Foto Nr. 4: Feststellung von Conidiosporen unter dem Lichtmikroskop: Hohe Konzentration an charakteristischen reifen Sporen mit stacheliger Erscheinung (ausreichende Menge an stacheligen Sporen)

- c) Mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) wird die Anzahl der Sporen in der Suspension auf $1,5 \times 10^7$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^7$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mittels eines geeigneten Verfahrens abgeschätzt wird. Die Suspension wird innerhalb von 4 h verwendet, wobei diese in einem auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.2) eingestellten Wasserbad gehalten wird. 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 Zellszählvorrichtung zur Einstellung der Anzahl der Zellen wird dringend empfohlen. Wird eine geeignete Zählkammer angewendet, sind die Anweisungen streng einzuhalten. Jedes Labor sollte deshalb Kalibrierdaten erarbeiten, um die Beziehung zwischen den mithilfe der Zählvorrichtung erhaltenen Keimzahlen und den Keimzahlen (5.4.1.6), die mit dem Gussplattenverfahren oder Oberflächenverfahren erhalten werden, zu ermitteln. Erfahrene Labore fanden heraus, dass eine bessere Annäherung an die geforderte Anzahl der Sporen erreicht wird, wenn die Keimzahl der Sporensuspension in der Vorrichtung 10 % bis 50 % höher liegt als die angestrebte Anzahl.

- 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 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplattenverfahrens oder Oberflächenverfahrens abgeimpft.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird etwa eine Hälfte jeder 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt (d. h. als Doppelbestimmung = vier Platten) und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlter MEA (5.2.2.3) hinzugefügt.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird etwa ein Viertel jeder 1,0-ml-Probe auf einer geeigneten Anzahl (mindestens vier) an der Oberfläche getrockneter MEA-Platten (5.2.2.3) ausgestrichen (d. h. als Doppelbestimmung = mindestens acht Platten).

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.5 Validierungssuspension („Nv“)

- a) Zur Herstellung der Validierungssuspension werden die Prüfsuspensionen (5.4.1.4.1 und 5.4.1.4.2) mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) verdünnt, bis 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}] erhalten wird.
- b) Zur Auszählung wird eine Verdünnung von 10^{-1} mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Es wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplattenverfahrens oder Oberflächenverfahrens abgeimpft [mit *Candida albicans*, 5.4.1.4.1 c); mit *Aspergillus brasiliensis*, 5.4.1.4.2 d)]. Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.6 Bebrütung und Auszählung der Prüf- und Validierungssuspensionen

Zur Bebrütung und Auszählung der Prüf- und Validierungssuspensionen ist der Verfahrensablauf 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 Platten werden ausgezählt und die Anzahl koloniebildender Einheiten wird bestimmt.

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

- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird „> 165“ (bei Schimmelpilzen) oder „> 330“ (bei Hefen) für alle Koloniezahlen über 165 bzw. 330 aufgezeichnet, und die Vc-Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der KBE je ml in der Prüfsuspension „N“ und in der Validierungssuspension „Nv“ wird mit 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 das 1,25-Fache der gewünschten Prüfkonzentration betragen, da sie während der Prüfung und während der Verfahrensvalidierung (5.5.2 oder 5.5.3) auf 80 % verdünnt wird. Produktprüflösungen müssen in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) hergestellt werden, um eine Konzentration im wirksamen Bereich und eine Konzentration im nicht wirksamen Bereich (5.8.2) miteinzubeziehen. Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden, in diesem Fall beträgt die höchste geprüfte Konzentration 80 %.

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

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand gelöst, indem mindestens 1,0 g ± 10 mg des Produkts in einen Messkolben eingewogen werden und das Volumen mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) aufgefüllt wird. Die folgenden Verdünnungen (niedrigere Konzentrationen) müssen in Messkolben (5.3.2.12) auf der Basis von Volumenanteilen mit 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) auf der Basis von Volumenanteilen in Messkolben (5.3.2.12) hergestellt werden.

Die Produktprüflösungen müssen frisch hergestellt und innerhalb von 2 h in der Prüfung verwendet werden. Sie müssen eine physikalisch homogene Zubereitung ergeben, die während des gesamten Verfahrensablaufs stabil bleibt. Wenn während des Verfahrens durch die Bildung eines Niederschlags oder einer Ausflockung (zum Beispiel durch die Zugabe der Belastungssubstanz) eine sichtbare Inhomogenität auftritt, muss das im Prüfbericht festgehalten werden.

ANMERKUNG Die Auszählung von Mikroorganismen, die in einem Niederschlag oder einer Ausflockung eingebettet sind, ist schwierig und unzuverlässig.

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

5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der fungiziden oder levuroziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Untersuchungsbedingungen (obligatorische und zusätzliche)

Neben der obligatorischen Temperatur, Einwirkzeit, den Belastungssubstanzen und den Prüforganismen dürfen zusätzliche Untersuchungsbedingungen (einschließlich Prüforganismen) entsprechend der vorgesehenen praktischen Anwendung des Produkts (Abschnitt 4) ausgewählt werden:

a) Temperatur (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 Zeit beträgt ± 10 s oder ± 5 s für Einwirkzeiten von 1 min oder weniger.

c) Belastungssubstanz:

Die obligatorische zu prüfende Belastungssubstanz ist 3,0 g/l Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2) und für Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken oder ein Gemisch von 10 g/l Rinderserumalbumin plus 10 g/l Hefeextrakt (5.2.2.8.3) bei Verschmutzung hohen Grades oder Magermilchpulver 10 g/l für Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken (5.2.2.8.4), nach Abschnitt 4, Tabelle 1 und entsprechend den praktischen Anwendungen. Bei speziellen Anwendungsgebieten dürfen zusätzliche Belastungssubstanzen geprüft werden.

d) Prüforganismen:

Aspergillus brasiliensis und *Candida albicans* (Abschnitt 4, Tabelle 1 und 5.2.1).

Zusätzliche Prüforganismen dürfen geprüft werden.

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

Das bevorzugte Verfahren ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (5.5.2). Zur Bestimmung 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) mit einem geeigneten Neutralisationsmedium durchgeführt, das nach der Erfahrung des Labors und/oder nach veröffentlichten Daten ausgewählt wird.

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

Unter besonderen Umständen kann es notwendig sein, ein Neutralisationsmedium zum MEA (5.2.2.3) hinzuzufügen.

5.5.1.3 Allgemeine Anweisungen für Validierungs- und Kontrollverfahren

Die Neutralisation und/oder Aufhebung der fungiziden und/oder fungistatischen Wirkung des Produkts muss (müssen) für jeden der verwendeten Prüforganismen und für jede Untersuchungsbedingung (Belastungssubstanz, Temperatur, Einwirkzeit) – nur mit der höchsten Produktprüfkonzentration – kontrolliert und

validiert werden. 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 – durchgeführt werden, das/die in der Prüfung verwendet wurde.

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

Falls aufgrund von Problemen bei der Neutralisation dem für die Validierungs- und Kontrollverfahren verwendeten MEA (5.5.1.2) ein Neutralisationsmedium zugesetzt worden ist, muss auch der für die Prüfung verwendete MEA 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 in einem auf θ eingestellten Wasserbad (5.3.2.2) auf die Prüftemperatur θ [5.5.1.1 a)] gebracht. Die Stabilisierung der Temperatur der Reagenzien bei θ wird überprüft.

Das Neutralisationsmedium (5.2.2.5) oder die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) und Wasser (5.2.2.2) müssen an eine Temperatur von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ angeglichen werden.

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

5.5.1.5 Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Prüforganismen

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

5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren⁶

5.5.2.1 Allgemeines

Die Prüf-, Kontroll- und Validierungsverfahren (5.5.2.2 bis 5.5.2.5) müssen gleichzeitig und für jede Untersuchungsbedingung gesondert ausgeführt werden (5.5.1.1).

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

Zur Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Konzentrationen ist der Verfahrensablauf wie folgt:

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

Nach Ablauf dieser Zeit werden 8,0 ml von einer der Produktprüflösungen (5.4.2) hinzugefügt. Die Stoppuhr wird mit Beginn der Zugabe erneut in Gang gesetzt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas wird für die gewählte Einwirkzeit t [5.5.1.1 b)] in ein auf θ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende der Einwirkzeit t wird erneut durchmischt [5.3.2.6 a)].

- b) Nach Ablauf der Einwirkzeit t wird eine Probe von 1,0 ml des Prüfgemisches „Na“ entnommen und in ein Reagenzglas mit 8,0 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.5) und 1,0 ml Wasser (5.2.2.2) überführt. Der Inhalt wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. Nach einer Neutralisationszeit von 5 min ($\pm 5 \text{ s}$ bei einer Einwirkzeit $> 10 \text{ min}$ und $\pm 10 \text{ s}$ bei einer Einwirk-

6 Zu einer graphischen Darstellung des Verfahrens siehe Anhang C.

zeit ≤ 10 min) wird erneut durchmischt [5.3.2.6 a)] und sofort eine Probe von 1,0 ml des neutralisierten Prüfgemisches „Na“ (enthält Neutralisationsmedium, Produktprüflösung, Belastungssubstanz und Prüfsuspension) als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplatten- oder Oberflächenverfahrens abgeimpft.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen pipettiert und 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf (45 ± 1) °C abgekühlter MEA (5.2.2.3) werden zugegeben.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe – aufgeteilt in etwa gleiche Anteile – auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) an der Oberfläche getrockneter MEA-Platten (5.2.2.3) ausgestrichen.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

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

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

Zur Validierung der ausgewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimabtötender Wirkungen unter den Prüfbedingungen ist der Verfahrensablauf wie folgt:

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

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

- b) Nach Ablauf der Einwirkzeit t wird eine 1,0-ml-Probe dieses Gemisches „A“ als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplatten- oder Oberflächenverfahrens abgeimpft [5.5.2.2 b)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

5.5.2.4 Kontrolle des Neutralisationsmediums „B“ — Verifizierung des Nichtvorhandenseins einer Toxizität des Neutralisationsmediums

Zur Verifizierung des Nichtvorhandenseins einer Toxizität des Neutralisationsmediums ist der Verfahrensablauf wie folgt:

- a) 8,0 ml des bei der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Neutralisationsmediums und 1,0 ml Wasser (5.2.2.2) werden in ein Reagenzglas pipettiert. 1,0 ml der Validierungssuspension (5.4.1.5) wird hinzugegeben. Mit Beginn der Zugabe wird die Stoppuhr in Gang gesetzt; es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas wird für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in ein auf (20 ± 1) °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 des Gemisches „B“ als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplatten- oder Oberflächenverfahrens abgeimpft [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

Zur Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens ist der Verfahrensablauf wie folgt:

- a) 1,0 ml der bei der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Belastungssubstanz wird in ein Reagenzglas pipettiert. 1,0 ml des Verdünnungsmittels (5.2.2.4) wird hinzugegeben und dann wird die Stoppuhr in Gang gesetzt; 8,0 ml der Produktprüflösung nur der höchsten in der Prüfung (5.5.2.2) verwendeten Konzentration werden hinzugegeben. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas wird für die Einwirkzeit t in ein auf θ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende der Einwirkzeit t wird erneut durchmischt [5.3.2.6 a)].
- b) Nach Ablauf der Einwirkzeit t wird 1,0 ml des Gemisches in ein Reagenzglas mit 8,0 ml (in 5.5.2.2 verwendetem) Neutralisationsmedium überführt. Die Stoppuhr wird mit Beginn der Zugabe erneut in Gang gesetzt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Reagenzglas wird für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. 1,0 ml der Validierungssuspension (5.4.1.5) wird hinzugegeben. Die Stoppuhr wird mit Beginn der Zugabe in Gang gesetzt und der Inhalt des Reagenzglases wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Das Reagenzglas wird für die Einwirkzeit t in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende dieser Zeit wird erneut durchmischt [5.3.2.6 a)]. Nach dem Ablauf dieser Zeit wird eine 1,0-ml-Probe des Gemisches „C“ als Doppelbestimmung entnommen und unter Anwendung des Gussplatten- oder Oberflächenverfahrens abgeimpft [5.5.2.2 b)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.6.

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

Zur Bebrütung und Auszählung des Prüfgemischs und der Kontroll- und Validierungsgemische ist der Verfahrensablauf 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 Platten werden ausgezählt und die Anzahl koloniebildender Einheiten wird bestimmt.

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

- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird „> 165“ (bei Schimmelpilzen) oder „> 330“ (bei Hefen) für alle Koloniezahlen über 165 bzw. 330 aufgezeichnet, und die Vc-Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der KBE je ml im Prüfgemisch „Na“ und in den Validierungsgemischen „A“, „B“ und „C“ werden mit 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-, Kontroll- und Validierungsverfahren (5.5.3.2 bis 5.5.3.5) müssen gleichzeitig und für jede Untersuchungsbedingung gesondert ausgeführt werden (5.5.1.1).

Jedes Membranfiltrationsgerät muss mit einer Membran mit einer Porenweite von $0,45 \mu\text{m}$ und einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm ausgestattet (5.3.2.7) und mit 50 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) gefüllt sein. Die

⁷ Zu einer graphischen Darstellung des Verfahrens siehe Anhang C.

für den Filtrationsvorgang benötigte Zeit – falls in Ausnahmefällen länger als 1 min – muss im Prüfbericht erfasst werden. Bei der Überführung der Membranen auf die Oberfläche einer Agarplatte sollte sorgfältig darauf geachtet werden, dass sich die Prüforganismen beim Auflegen auf die Platte auf der oberen Seite der Membran befinden und Lufteinschlüsse zwischen Membran und Agaroberfläche vermieden werden.

5.5.3.2 Prüfverfahren „Na“ — Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Konzentrationen

Zur Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Konzentrationen ist der Verfahrensablauf wie folgt:

- a) Siehe 5.5.2.2 a).
- b) Nach Ablauf der Einwirkzeit t wird eine 0,1-ml-Probe des Prüfgemisches „Na“ als Doppelbestimmung entnommen und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Es wird sofort filtriert. Es werden mindestens 150 ml, jedoch nicht mit mehr als 500 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6), durchfiltriert. Wenn die Spülflüssigkeit kein Wasser ist, wird das Verfahren durch Filtrieren mit 50 ml Wasser (5.2.2.2) abgeschlossen. Anschließend wird jede der Membranen auf die Oberfläche von gesonderten 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 ausgewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimabtötender Wirkungen unter den Prüfbedingungen

Zur Validierung der ausgewählten Untersuchungsbedingungen und/oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimabtötender Wirkungen unter den Prüfbedingungen ist der Verfahrensablauf wie folgt:

- a) Siehe 5.5.2.3 a).
- b) Nach Ablauf der Einwirkzeit t wird eine 1,0-ml-Probe des Prüfgemischs „A“ als Doppelbestimmung entnommen und jede 1,0-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Es wird sofort und zusätzlich mit 50 ml Wasser (5.2.2.2) filtriert. Anschließend wird jede der Membranen auf die Oberfläche von gesonderten MEA-Platten (5.2.2.3) überführt.

Bei *Aspergillus brasiliensis* wird die Probe in zwei, drei oder vier Anteile annähernd gleicher Größe geteilt und jeder Anteil wird 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 die obere Auszählgrenze [5.6.2.2 a)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

5.5.3.4 Kontrolle der Filtration „B“ — Validierung des Filtrationsvorgangs

Zur Validierung des Filtrationsvorganges ist der Verfahrensablauf 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.

Es wird sofort filtriert. 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 durch Filtrieren mit 50 ml Wasser (5.2.2.2) abgeschlossen. Anschließend wird jede der Membranen auf die Oberfläche von gesonderten MEA-Platten (5.2.2.3) überführt.

Bei *Aspergillus brasiliensis* wird die Probe in zwei, drei oder vier Anteile annähernd gleicher Größe geteilt und jeder Anteil wird 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 die obere Auszählgrenze [5.6.2.2 a)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

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

Zur Validierung des Membranfiltrationsverfahrens oder zum Auszählen der Pilze auf den Membranen, die zuvor mit dem Gemisch von Produkt und Belastungssubstanz in Kontakt waren, ist der Verfahrensablauf wie folgt:

- a) Siehe 5.5.2.5 a).
- b) Nach Ablauf der Einwirkzeit t wird 0,1 ml des Validierungsgemisches „C“ als Doppelbestimmung entnommen und jede 0,1-ml-Probe wird in ein gesondertes Membranfiltrationsgerät (5.5.3.1) überführt. Es wird sofort filtriert. Die Spülflüssigkeit (5.2.2.6) wird auf die gleiche Weise durchfiltriert wie in der Prüfung [5.5.3.2 b)], dann werden die Membranen mit 50 ml Spülflüssigkeit (5.2.2.6) bedeckt und 0,1 ml der Validierungssuspension (5.4.1.5) wird hinzugegeben. Sofort wird noch einmal filtriert und zusätzlich mit 50 ml Wasser (5.2.2.2), dann wird jede der Membranen auf die Oberfläche von gesonderten MEA-Platten (5.2.2.3) überführt.

Bei *Aspergillus brasiliensis* wird die Probe in zwei, drei oder vier Anteile annähernd gleicher Größe geteilt und jeder Anteil wird 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 die obere Auszählgrenze [5.6.2.2 a)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.3.6.

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

Zur Bebrütung und Auszählung des Prüfgemisches und der Kontroll- und Validierungsgemische ist der Verfahrensablauf 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 Kolonien auf den Membranen werden ausgezählt.

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

- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird „> 55“ (bei Schimmelpilzen) oder „> 165“ (bei Hefen) für alle Koloniezahlen über 55 bzw. 165 aufgezeichnet, und die V_c -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der KBE je ml im Prüfgemisch „Na“ und in den Validierungsgemischen „A“, „B“ und „C“ wird mit 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 der Begriffe und Abkürzungen

5.6.1.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen und Prüfgemische

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

N, N_v, N₀, N_{v0}, Na sowie A, B und C sind jeweils die Anzahl der je ml in den verschiedenen Prüfgemischen gezählten Zellen entsprechend Tabelle 2.

Tabelle 2 — Anzahl der je ml in den verschiedenen Prüfgemischen gezählten 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 am Ende der Einwirkzeit <i>t</i> oder nach 5 min (B) oder 30 min (C)
Prüfung	N Prüfsuspension	N ₀ (= N/10)	Na (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 als Vc-Werte angegeben:

- beim Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (Prüfung und Kontrollen) gibt ein Vc-Wert die Anzahl der gezählten koloniebildenden Einheiten je 1,0-ml-Probe an;
- beim Membranfiltrationsverfahren gibt ein Vc-Wert die Anzahl der gezählten koloniebildenden Einheiten je 0,1-ml-Probe des Prüfgemisches „Na“ und je 1,0-ml-Probe bei der Kontrolle A an.

5.6.2 Berechnung

5.6.2.1 Allgemeines

Der erste Schritt bei der Berechnung ist die Bestimmung der Vc-Werte, der zweite Schritt ist die Berechnung von N, N₀, Na, N_v, N_{v0}, A, B und C. Der dritte Schritt ist die Berechnung der Reduktion R (5.8.1).

5.6.2.2 Bestimmung von Vc-Werten

Die Vc-Werte werden wie folgt bestimmt:

- a) Die üblichen Grenzwerte für die Auszählung von Pilzen auf Agarplatten liegen für Schimmelpilze zwischen 15 und 150 Kolonien und für Hefen zwischen 15 und 300 Kolonien. Nach dieser Europäischen Norm ist eine Abweichung von 10 % zulässig, so dass die Grenzwerte bei Schimmelpilzen zwischen 14 und 165 und bei Hefen zwischen 14 und 330 liegen. Auf Membranen sind die üblichen oberen Grenzwerte anders: 50 für Schimmelpilze und 150 für Hefen, daher liegen die Grenzwerte mit der Abweichung von 10 % für Schimmelpilze bei 55 und für Hefen bei 165.

ANMERKUNG Grundlage des unteren Grenzwertes (14) ist die Tatsache, dass die Variabilität zunimmt, je kleiner die in der Probe (1 ml oder 0,1 ml) gezählten Keimzahlen sind, so dass nachfolgende Berechnungen zu falschen Ergebnissen

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

- b) Für die Auszählung der Prüfsuspension N (5.4.1.4), der Validierungssuspension N_v (5.4.1.5) und für alle Auszählungen im Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (5.5.2.6) werden die Vc-Werte entsprechend der Anzahl der je 1-ml-Probe (5.6.1.2) verwendeten Platten bestimmt und aufgezeichnet.

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

Falls die Keimzahl auf einer Platte höher als 165 (oder 330) ist, wird diese Zahl als „> 165“ (oder „> 330“) angegeben. Wenn mehr als eine Platte je 1-ml-Probe verwendet worden ist und mindestens eine der Platten eine höhere Keimzahl als 165 (oder 330) aufweist, wird dieser Vc-Wert im Prüfbericht als „> Summe der Keimzahlen“ angegeben (z. B. wird für „> 165, 132, 144“ im Prüfbericht „> 441“ angegeben).

Falls ein Vc-Wert kleiner als 14 ist, wird die Zahl im Prüfbericht angegeben (aber für weitere Berechnungen im Fall von Na wird „< 14“ eingesetzt).

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

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

5.6.2.3 Berechnung von N und N₀

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

Da zwei Verdünnungen der Prüfsuspension (5.4.1.4 in Verbindung mit 5.4.1.6) ausgewertet werden, wird die Anzahl der KBE/ml als die gewichtete mittlere Keimzahl nach folgender Gleichung berechnet:

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

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten Vc-Werte;
- n₁ die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung, d. h. 10⁻⁵, berücksichtigten Vc-Werte;
- n₂ die Anzahl der bei der höheren Verdünnung, d. h. 10⁻⁶, berücksichtigten Vc-Werte;
- 10⁻⁵ der der geringeren Verdünnung entsprechende Verdünnungsfaktor.

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

BEISPIEL

$$N = \frac{139 + 154 + 14 + 17}{(2 + 0,1 \times 2) 10^{-5}} = \frac{324}{2,2 \times 10^{-5}} = 1,4727 \times 10^7 = 1,5 \times 10^7 \text{ (KBE/ml)}$$

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 ein Zehntel des gewichteten Mittelwertes von N aufgrund der zehnfachen Verdünnung durch Zugabe des Produkts und der Belastungssubstanz.

5.6.2.4 Berechnung von N_a

N_a ist die Anzahl der überlebenden Zellen je ml im Prüfgemisch [5.5.2.2 a) oder 5.5.3.2 a)] am Ende der Einwirkzeit und vor der Neutralisation oder Membranfiltration. Aufgrund der Zugabe von Neutralisationsmedium und Wasser [5.5.2.2 b)] oder wegen des Probenvolumens von 0,1 ml [5.5.3.2 b)] beim Membranfiltrationsverfahren ist der Wert von N_a zehnmal höher als der V_c -Wert.

Der Wert von N_a wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$N_a = 10c/n \quad (2)$$

Dabei ist

c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;

n die Anzahl der berücksichtigten V_c -Werte.

Falls einer der beiden oder beide V_c -Werte aus der Doppelbestimmung entweder unterhalb des unteren Grenzwertes oder oberhalb des oberen Grenzwertes liegt/liegen, wird das Ergebnis als „weniger als“ oder „mehr als“ angegeben.

BEISPIEL

a) V_c -Werte aus der Doppelbestimmung: 2, 16

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

b) V_c -Werte aus der Doppelbestimmung (Gussplattenverfahren, *Aspergillus brasiliensis*): > 165, > 165

$$N_a = \frac{(> 165 + > 165) \times 10}{2} = > 1650 = > 1,6 \times 10^3$$

c) V_c -Werte aus der Doppelbestimmung (Membranfiltrationsverfahren, *Aspergillus brasiliensis*): 40, > 55

$$N_a = \frac{(40 + > 55) \times 10}{2} = > 475 = > 4,8 \times 10^2$$

d) V_c -Werte aus der Doppelbestimmung (zwei Ausstrichplatten, je 1,0-ml-Probe, *Candida albicans*): > 660, 600

$$N_a = \frac{(> 600 + 600) \times 10}{2} = > 6300 = > 6,3 \times 10^3$$

5.6.2.5 Berechnung von N_v und N_{v0}

N_v ist die Anzahl der Zellen je ml in der Validierungssuspension (5.4.1.5). Aufgrund des Verdünnungsschrittes von 10^{-1} (5.4.1.5) ist N_v zehnfach höher als die als V_c -Werte angegebenen Keimzahlen.

N_{V0} ist die Anzahl der Zellen je ml in den Gemischen A, B und C zu Beginn der Einwirkzeit (Zeit 0) (5.6.1.1). Sie beträgt ein Zehntel des Mittelwertes der V_c -Werte bei Berücksichtigung von N_v [5.4.1.6 c)]. N_v und N_{V0} werden nach den folgenden Gleichungen berechnet:

$$N_v = 10c/n \quad (3)$$

$$N_{V0} = c/n \quad (4)$$

Dabei ist

c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;

n die Anzahl der berücksichtigten V_c -Werte.

5.6.2.6 Berechnung von A, B und C

A, B und C sind die jeweilige Anzahl der überlebenden Zellen bei der Kontrolle der Untersuchungsbedingungen A (5.5.2.3 oder 5.5.3.3), der Kontrolle des Neutralisationsmediums B (5.5.2.4) oder der Filtrationskontrolle (5.5.3.4) und bei der Verfahrensvalidierung C (5.5.2.5 oder 5.5.3.5) am Ende der Einwirkzeit t (A) oder der festgelegten Zeiten 5 min (B) und t min (C). Sie entsprechen dem Mittelwert der berücksichtigten V_c -Werte der Gemische A, B und C.

A, B und C werden nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$A,B,C = c/n \quad (5)$$

Dabei ist

c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;

n die Anzahl der berücksichtigten V_c -Werte.

5.7 Verifizierung des Verfahrens

5.7.1 Allgemeines

Eine Prüfung ist gültig, wenn:

- alle Ergebnisse die Kriterien von 5.7.3 erfüllen und
- die Anforderungen von 5.8.2 erfüllt sind.

5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen

Bei Ergebnissen, die aus den gewichteten Mittelwerten von zwei aufeinander folgenden Verdünnungen berechnet wurden (z. B. „ N'' “), darf der Quotient des Mittelwerts der beiden Ergebnisse nicht höher als 15 und nicht niedriger als 5 sein. Bei Ergebnissen unterhalb des unteren Grenzwerts wird die Zahl des unteren Grenzwerts (14) verwendet. Bei Ergebnissen oberhalb des jeweiligen oberen Grenzwerts [5.6.2.2 b)] wird die Zahl des oberen Grenzwerts verwendet.

BEISPIEL Für N : Verdünnung 10^{-5} : ($> 165 + 150$) KBE; Verdünnung 10^{-6} : ($20 + 25$) KBE;
 $(165 + 150)/(20 + 25) = 315/45 = 7,0 =$ zwischen 5 und 15.

ANMERKUNG Wenn die auf den Platten erhaltenen Keimzahlen außerhalb der für die Bestimmung der V_c -Werte festgelegten Grenzwerte liegen [5.6.2.2 b)], wird empfohlen, den gewichteten Mittelwert wie vorstehend beschrieben zu überprüfen, jedoch nur die V_c -Werte zur Berechnung von N zu verwenden, die innerhalb der Auszählgrenzen liegen.