

DIN EN 16615



ICS 11.080.20

Einsprüche bis 2023-01-11
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 16615:2015-06

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitatives Prüfverfahren zur Bestimmung der bakteriziden und
levuroziden und/oder fungiziden und/oder tuberkuloziden und/oder
mykobakteriziden Wirkung auf nicht-porösen Oberflächen mit
mechanischer Einwirkung mit Hilfe von Tüchern oder Mopps im
humanmedizinischen Bereich (4-Felder-Test) –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche und Englische Fassung prEN 16615:2022**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative test method for the evaluation of bactericidal and yeasticidal and/or fungicidal
and/or tuberculocidal and/or mycobactericidal activity on non-porous surfaces with
mechanical action employing wipes or mops in the medical area (4-field test) –
Test method and requirements (phase 2, step 2);
German and English version prEN 16615:2022

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Méthode d'essai quantitative pour l'évaluation de l'activité bactéricide et levuricide et/ou
fongicide et/ou tuberculocide et/ou mycobactéricide des surfaces non poreuses, avec action
mécanique à l'aide de lingettes ou de serpillières dans le domaine médical (essai à 4 zones) –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2);
Version allemande et anglaise prEN 16615:2022

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2022-11-11 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 named@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 Medizin (NAMed), 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 111 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16615:2022) 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 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed).

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 16615:2015-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Anhang ZA wurde gestrichen, die Harmonisierung des Dokuments ist entfallen;
- b) N_0 wurde gestrichen;
- c) Harmonisierung des Textes mit EN 13727;
- d) Einführung verschiedener Anwendungsformen;
- e) Einführung unterschiedlicher Tupfermaterialien;
- f) Umsetzung der Festlegungen für die Raumtemperatur;
- g) Kontrollversuch mit Wasser wird immer mit Wasser standardisierter Härte durchgeführt (= Prozess- und Verfahrensvalidierung);
- h) Polysorbat 80 sollte 1 g statt 1 ml eingewogen werden;
- i) Einführung der apparativen Vorreinigung von Oberflächen mit 2-Propanol statt n-Propanol;
- j) Korrektur von Fehlern bei Berechnungen und von redaktionellen Fehlern;
- k) Einführung zusätzlicher Prüfflächen;
- l) Einführung von Standard-Wischtuch (Tuch) und spezifiziertem Wischtuch;
- m) Aufnahme der Prüfungen auf fungizide, tuberkulozide und mykobakterizide Wirkung;
- n) Kontrollversuch mit Wasser: Prüffeld 1 ist bei der Berechnung des Kontrollversuchs mit Wasser zu berücksichtigen (Übernahme des CEN/TR 17825);
- o) Aufnahme der neuen Anhänge E und F.

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitatives Prüfverfahren zur Bestimmung der bakteriziden und levuroziden und/oder fungiziden und/oder tuberkuloziden und/oder mykobakteriziden Wirkung auf nicht-porösen Oberflächen mit mechanischer Einwirkung mit Hilfe von Tüchern oder Mopps im humanmedizinischen Bereich (4-Felder-Test) – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)

Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative test method for the evaluation of bactericidal and yeas-ticidal and/or fungicidal and/or tuberculocidal and/or mycobactericidal activity on non-porous surfaces with mechanical action employing wipes or mops in the medical area (4-field test) – Test method and requirements (phase 2, step 2)

Antiseptiques et désinfectants chimiques – Méthode d'essai quantitative pour l'évaluation de l'activité bactéri-cide et levuricide et/ou fongicide et/ou tuberculocide et/ou mycobactéricide des surfaces non poreuses, avec action mécanique à l'aide de lingettes ou de serpillières dans le domaine médical (essai à 4 zones) – Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	7
4 Anforderungen	7
5 Prüfverfahren	8
5.1 Kurzbeschreibung	8
5.2 Materialien und Reagenzien	9
5.2.1 Prüforganismus	9
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	10
5.3 Apperate und Glasgeräte	14
5.4 Herstellung der Prüforganismussuspensionen und der Produktprüflösungen	18
5.4.1 Prüforganismussuspensionen	18
5.4.2 Produktprüflösung	24
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der bakteriziden und levuroziden und/oder fungiziden und/oder tuberkuloziden und/oder mykobakteriziden Wirkung des Produkts	25
5.5.1 Allgemeines	25
5.5.2 Verfahren	27
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	31
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen	31
5.6.2 Berechnung	32
5.7 Verifizierung des Verfahrens	36
5.7.1 Allgemeines	36
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	36
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	36
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	37
5.8.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen/Prüfgemische	37
5.8.2 V_C -Werte	37
5.8.3 Limitierender Prüforganismus sowie bakterizide und levurozide Konzentration	38
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	39
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	40
5.10 Prüfbericht	41
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	43
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien	44
Anhang C (informativ) Graphische Darstellungen des Prüfverfahrens	46
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts	49
Anhang E (informativ) Alternativer Trocknungsendpunkt	53
Anhang F (informativ) Zusätzliche Prüftemperatur	55
Literaturhinweise	56

Bilder

Bild 1 — PVC-Freischäumplatte (20 cm × 50 cm, Dicke 2 mm), FOREX classic, seidenmatte Oberfläche, einseitig folienbeschichtet, Artikelnummer SFSFOXC020RW1F, mit 4 Feldern markiert	16
Bild 2 — Schematische Darstellung der Markierungen und des Wischdurchgangs über vier Prüffelder auf der Prüffläche	17

Bild 3 — Beispiele für geeignete Kulturen von <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 nach 7 d Bebrütung bei 30 °C	19
Bild 4 — Beispiele für ungeeignete (nicht verwendbare) Kulturen von <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 nach 7 d Bebrütung bei 30 °C	20
Bild 5 — Beobachtung von Konidiosporen unter einem Lichtmikroskop: Vorliegen von glatten (a) und stacheligen (b) Sporen [ungeeignete (nicht verwendbare) Suspension]	22
Bild 6 — Beobachtung von Konidiosporen unter einem Lichtmikroskop: Hohe Konzentration von charakteristischen reifen Sporen mit stacheligem Aussehen (geeignete Suspension)	22
Bild 7 — Schieben des Einheitsgewichts von Hand über die Prüfflächen, ohne zusätzlichen Druck auszuüben	29
Bild C.1 — Graphische Darstellung des Prüfverfahrens (N_a)/ Kontrollversuch mit Wasser (N_W) — bakterizide, mykobakterizide Wirkung	46
Bild C.2 — Graphische Darstellung des Prüfverfahrens (N_a)/ Kontrollversuch mit Wasser (N_W) — levurozide Wirkung	47
Bild C.3 — Validierung	48
Bild E.1 — Beispiel für eine Trocknungskurve von <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442, nach EN 13697:2015 getrocknet. Die rote Linie zeigt den Mindestwert von N_C bei Bakterien als Prüforganismen an.	53
Bild E.2 — Mit 0,05 µl Prüfsuspension beimpfte Prüfflächen nach einer Trocknungszeit von a) 0 min, b) 15 min (4 µl bis 8 µl verbleibende Prüfsuspension), c) 25 min Trocknungszeit (= sichtbar trockene Prüffläche)	54

Tabellen

Tabelle 1 — Versuchsbedingungen	8
Tabelle 2 — Anzahl der je ml oder je 25 cm ² in den verschiedenen Prüfgemischen ausgezählten KBE	31
Tabelle 3 — Prüfplan	39

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16615:2022) 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 16615:2015 ersetzen.

Das Dokument wurde überarbeitet, um es an den neuesten Stand der Wissenschaft anzupassen, um Fehler und Unklarheiten zu korrigieren, um die Gliederung und den Wortlaut mit anderen bereits vorliegenden oder in Vorbereitung befindlichen Prüfverfahren von CEN/TC 216 zu harmonisieren und um die Lesbarkeit der Norm zu verbessern und sie dadurch besser verständlich zu machen.

Im Folgenden werden die wesentlichen technischen Änderungen seit der letzten Ausgabe aufgeführt:

- Anhang ZA wurde gestrichen, die Harmonisierung des Dokuments ist entfallen;
- N_0 wurde gestrichen;
- Harmonisierung des Textes mit EN 13727;
- Einführung verschiedener Anwendungsformen;
- Einführung verschiedener Tupfermaterialien;
- Einführung der Definition der Raumtemperatur;
- Kontrollversuch mit Wasser wird immer mit Wasser standardisierter Härte durchgeführt (= Prozess- und Verfahrensvalidierung);
- Polysorbat 80 sollte auf 1 g statt auf 1 ml eingewogen werden;
- Implementierung der apparativen Vorreinigung von Oberflächen mit 2-Propanol statt n-Propanol;
- Korrektur von Fehlern bei Berechnungen und von redaktionellen Fehlern;
- Einführung zusätzlicher Prüfflächen;
- Einführung von Standard-Wischtuch (Tuch) und spezifiziertem Wischtuch
- Einführung von fungizider, tuberkulozider und mykobakterizider Wirkung;
- Kontrollversuch mit Wasser: Prüffeld 1 ist bei der Berechnung des Kontrollversuchs mit Wasser zu berücksichtigen;
- Aufnahme von Anhang E und Anhang F.

Die Änderungen dieser Überarbeitung haben keinen Einfluss auf die unter Bezugnahme auf die Fassung EN 16615:2015 erhaltenen Prüfergebnisse. Diese Ergebnisse sind weiterhin gültig.

Einleitung

Dieses Dokument legt einen Keimträgerversuch zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel zur Anwendung auf Oberflächen durch Aufbringen mit Tüchern im Rahmen der im Anwendungsbereich beschriebenen Anwendungsgebiete eine bakterizide und levurozide Wirkung aufweist, fest.

Der Laboratoriumsversuch simuliert praxisnahe Anwendungsbedingungen, wie z. B. Einwirkzeit, Temperatur und Belastungssubstanzen, einschließlich des vorherigen Antrocknens von festgelegten Prüforganismen auf einer Prüffläche als Träger und des Abwischens des Produkts auf der Prüffläche mit einem Tuch. Die Bedingungen sollen allgemeinen Ansprüchen genügen. Wenn jedoch bei einigen Anwendungsarten die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt abweichen, dürfen oder müssen möglicherweise zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

Jede durch diese Prüfung ermittelte Gebrauchskonzentration des Produkts entspricht festgelegten Versuchsbedingungen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die bakterizide und levurozide, fungizide, tuberkulozide und/oder mykobakterizide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte bzw. – bei gebrauchsfertigen Produkten – bei der Verdünnung mit Wasser als homogene, physikalisch stabile Zubereitung vorliegen.

Dieses Dokument gilt für Produkte, die im medizinischen Bereich zur Desinfektion von nicht-porösen Oberflächen, einschließlich Oberflächen auf Medizinprodukten, durch (Ab-)Wischen verwendet werden – unabhängig davon, ob sie in der Richtlinie 93/42/EWG über Medizinprodukte erfasst sind oder nicht.

Aufgrund der neuen Verfahren zur Anwendung von Oberflächendesinfektionsmitteln wie vorgetränkten Tüchern wurde diese Norm erstellt, um die verschiedenen Anwendungsmethoden zu behandeln.

prEN 16615 gilt für vier Verfahren zur Anwendung von Produkten zum (Ab-)Wischen:

- a) Tränken eines nicht-spezifizierten Tuchs oder Mopps mit dem Produkt;
- b) Sprühen des Produkts auf ein nicht-spezifiziertes Tuch bzw. einen nicht spezifizierten Mopp oder ein spezifiziertes Tuch bzw. einen spezifizierten Mopp;
- c) Tränken spezifizierter Tücher oder Mopps mit dem Produkt entsprechend den Herstellerempfehlungen durch den Anwender;
- d) Vortränken spezifizierter Tücher oder Mopps als gebrauchsfertige Tücher oder Mopps durch den Hersteller.

Bei allen Anwendungsarten wird der Kontrollversuch mit Wasser mit dem Standardtuch (5.3.2.17.1) durchgeführt, da es sich um eine Prozess- oder Verfahrenskontrolle handelt.

Dieses Dokument gilt nicht für Produkte, die auf Oberflächen gesprüht oder geschwemmt werden, ohne dass während der Einwirkzeit ein Wischen erfolgt. In diesem Fall gelten die Verfahren der Phase 2, Stufe 2 ohne mechanische Einwirkung.

Die Prüffläche (5.3.2.16) wurde als Standardoberfläche gewählt, sodass alle nicht-porösen Oberflächen abgedeckt sind. Dieses Dokument gilt nicht für die Prüfung des Einflusses unterschiedlicher Oberflächen.

Dieses Dokument gilt für Bereiche und unter Bedingungen, wo eine Desinfektion aus medizinischen Gründen angezeigt ist. Indikationen dieser Art liegen z. B. bei der Patientenbetreuung in

- Krankenhäusern, kommunalen medizinischen Einrichtungen und im Dentalbereich,
- medizinischen Einrichtungen in Schulen, Kindergärten und Heimen

vor und können auch am Arbeitsplatz und im häuslichen Bereich gegeben sein. Eingeschlossen sein können auch Einrichtungen wie Wäschereien und Küchen, die der direkten Versorgung der Patienten dienen.

ANMERKUNG Dieses Verfahren entspricht einer Prüfung der Phase 2, Stufe 2.

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

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*

3 Begriffe

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

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/>

3.1

gebrauchsfertiges Tuch

vorgetränktes Tuch

Tuch mit Desinfektionsmittel, das vom Tuchhersteller am Herstellungsort zum Tuch hinzugefügt wird

3.2

getränktes Tuch

Tuch mit Desinfektionsmittel, das vom Anwender zum Tuch hinzugefügt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Beispiele sind u. a. ein in Desinfektionsmittel getauchtes Tuch oder ein trockenes Tuch, das mit Desinfektionsmittel besprüht wurde.

4 Anforderungen

Bei dem Produkt, das mit Wasser standardisierter Härte bzw. – bei gebrauchsfertigen Produkten – mit Wasser verdünnt wird, muss in einer Prüfung entsprechend Tabelle 1 und Abschnitt 5 auf dem Prüffeld 1 eine dezimal-logarithmische (lg-)Reduktion um mindestens 5 Stufen bei Bakterien und eine dezimal-logarithmische (lg-)Reduktion um mindestens 4 Stufen bei Pilzen und Mykobakterien nachgewiesen werden.

Der Mittelwert der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) je 25 cm² auf den Prüffeldern 2 bis 4 des zu prüfenden Produkts muss gleich oder weniger als 50 betragen, der Mittelwert der Anzahl der KBE je 25 cm² auf den Prüffeldern 1 bis 4 des Kontrollversuchs mit Wasser muss gleich oder mehr als 10 betragen. Details zur Präzision und zur Wiederholung werden in 5.8.4 und EN 14885 angegeben.

Tabelle 1 — Versuchsbedingungen

Prüfbedingungen	Bakterizide Wirkung	Levurozide Wirkung	Fungizide Wirkung	Tuberkulozide Wirkung	Mykobakterizide Wirkung
Mindestens zu prüfendes Spektrum an Prüforganismen	Staphylococcus aureus Enterococcus hirae Pseudomonas aeruginosa	Candida albicans	Aspergillus brasiliensis Candida albicans	Mycobacterium terrae	Mycobacterium avium Mycobacterium terrae
Zusätzlich	jeglicher relevanter Prüforganismus				
Prüftemperatur	entsprechend den Empfehlungen des Herstellers, jedoch zwischen (4 ± 1) °C und (30 ± 1) °C. Bei Prüfungen, die bei Raumtemperatur durchgeführt werden, muss der Bereich (21,5 ± 3,5) °C eingehalten werden.				
Einwirkzeit	entsprechend den Empfehlungen des Herstellers, jedoch mindestens 1 min und nicht länger als 5 min oder 60 min ^a (von 1 min bis 5 min in Abständen von 1 min und von 5 min bis 60 min in Abständen von 5 min)				
Belastungssubstanz					
Bedingungen niedriger Belastung	0,3 g/l Rinderserumalbumin				
Bedingungen hoher Belastung	3,0 g/l Rinderserumalbumin plus 3,0 ml/l Erythrozyten				
Zusätzlich	jegliche relevante Substanz				
ANMERKUNG Bei den zusätzlichen Bedingungen kann die als Ergebnis festgestellte Konzentration niedriger sein als die unter den Mindestprüfbedingungen erhaltene Konzentration.					
^a Die in dieser Tabelle angegebenen Einwirkzeiten für die Oberflächendesinfektionsmittel sind auf der Basis der praktischen Bedingungen des Produkts gewählt. Die empfohlene Einwirkzeit für die Verwendung des Produkts liegt in der Verantwortung des Herstellers. Produkte zur Desinfektion von Oberflächen, die wahrscheinlich mit dem Patienten und/oder dem medizinischen Personal in Kontakt kommen, sowie von Oberflächen, die häufig von verschiedenen Personen berührt werden, was eine Übertragung von Mikroorganismen auf den Patienten bewirkt, müssen mit einer Einwirkzeit von höchstens 5 min geprüft werden. Gleiches gilt, wenn die Einwirkzeit des Produkts aus praktischen Gründen begrenzt werden muss. Produkte für andere Oberflächen als den oben angegebenen dürfen mit einer Einwirkzeit von höchstens 60 min geprüft werden.					

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Prüffläche wird mit 4 in einer Reihe nebeneinander liegenden Quadraten von 5 cm × 5 cm, den „Prüffeldern“, markiert. Prüffeld 1 auf der Prüffläche wird mit einer Prüfsuspension von Bakterien, Hefen, Pilzsporen oder Mykobakterien in einer Lösung von Belastungssubstanzen beimpft. Das Inokulum wird trocknen gelassen. Ein Tuch wird mit einer Probe des Produkts im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) (oder Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten) verdünnten Produkts getränkt. Die Prüffläche wird mit dem getränkten Tuch über die vier markierten Prüffelder hinweg gewischt, beginnend vor dem Prüffeld 1, wobei unmittelbar nach Prüffeld 4 gewendet und zurück zum Startpunkt gewischt wird. Parallel wird ein Kontrollversuch mit Wasser [5.5.2.2 h)] durchgeführt: Ein Tuch wird mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) anstelle des Produkts auf die gleiche Weise getränkt, um sicherzustellen, dass die Prüforganismen auf den 4 Feldern verteilt werden und ihre Anzahl einen bestimmten Wert erreicht.

ANMERKUNG Für die Zwecke dieses Dokuments können Verweisungen auf „Abwischen“, „Tuch“ und „abgewischt“ mit „Wischen“, „Mopp“ und „gewischt“ gleichgesetzt werden, wenn das Normverfahren angewendet wird, um ein Bodenwischverfahren zu prüfen.

Temperatur, Verschmutzung und Einwirkzeit werden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers angewendet. Am Ende der Einwirkzeit werden die Prüforganismen von jedem Prüffeld mit befeuchteten FLOQS-wabs zurückgewonnen. Die Tupfer werden in ein Röhrchen eingebracht, das eine Bouillon und ein Neutralisationsmedium enthält, und die Prüforganismen werden durch Schütteln vom Tupfer abgetrennt. Die Anzahl der überlebenden Prüforganismen in jeder Probe wird bestimmt und die Keimreduktion wird berechnet, indem die Ergebnisse des Kontrollversuchs zur Trocknung D_{ct} und die mit dem Produkt erhaltenen Ergebnisse verglichen werden. Die Prüfung wird unter Verwendung von *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. hirae* und *C. albicans* (Mindestprüfbedingung) und/oder *A. brasiliensis* und/oder *M. terrae* und/oder *M. avium* (optionale Prüfbedingung) als Prüforganismen durchgeführt.

5.1.2 Zusätzliche Prüforganismen (nur Bakterien- oder Pilzstämmen), Einwirkzeiten und Belastungssubstanzen können verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismus

Die bakterizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden als Prüforganismen ausgewählten Stämme¹ zu bewerten:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442;
- *Enterococcus hirae* ATCC 10541.

Die levurozide Wirkung ist unter Verwendung des folgenden als Prüforganismus ausgewählten Stamms¹ zu bewerten:

- *Candida albicans* ATCC 10231.

Die fungizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden als Prüforganismen ausgewählten Stämme¹ zu bewerten:

- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404;
- *Candida albicans* ATCC 10231.

Die tuberkulozide Wirkung ist unter Verwendung des folgenden als Prüforganismus ausgewählten Stamms¹ zu bewerten:

- *Mycobacterium terrae* ATCC 15755.

Die mykobakterizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden als Prüforganismen ausgewählten Stämme¹ zu bewerten:

- *Mycobacterium terrae* ATCC 15755;

1 Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von diesen Kultursammlungen geliefert werden. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

— *Mycobacterium avium* ATCC 15769.

Zum Verweis auf Stämme in einigen anderen Kultursammlungen siehe Anhang A.

Wenn zusätzliche Prüfororganismen verwendet werden, sind diese unter den im Prüfbericht vermerkten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre und Medien) zu bebrüten. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüfororganismen nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, ist deren Eignung zur Bereitstellung der geforderten Inokula zu verifizieren. Wenn diese zusätzlichen Prüfororganismen nicht an einem Referenzzentrum klassifiziert wurden, sind deren Identifizierungsmerkmale anzugeben. Darüber hinaus müssen sie von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kultursammlung für fünf Jahre als Referenzprobe zurückgestellt werden.

Die geforderte Bebrütungstemperatur für diese Prüfbakterien beträgt $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.3). Die gleiche Temperatur (36°C oder 37°C) ist für alle Bebrütungen während deren Kontrolle und Validierung anzuwenden. Die geforderte Bebrütungstemperatur für *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis* beträgt $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.3).

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in diesem Dokument 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 den Prüforganismus wirken.

Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien handelsübliche wasserfreie Materialien verwendet werden, wenn sie den nachstehend angeführten Mischungsverhältnissen entsprechen. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten genau befolgt werden.

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

Alle festgelegten pH-Werte werden bei $(21,5 \pm 3,5)^\circ\text{C}$ (5.3.2.4) gemessen.

5.2.2.2 Wasser

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

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

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

5.2.2.3 Medium

a) Soja-Agar (TSA)

- Trypton, tryptisch verdautes Casein 15,0 g;
- Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl 5,0 g;
- Natriumchlorid (NaCl) 5,0 g;

- Agar 15,0 g;
- Wasser (5.2.2.2) bis auf 1 000,0 ml.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklav (5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums $7,2 \pm 0,2$ betragen.

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

b) **Malzextrakt-Agar (MEA)**

Malzextrakt-Agar, bestehend aus:

- Malzextrakt [Lebensmittelqualität (z. B. Christomalt-Pulver von Difal) oder ein gleichwertiger Extrakt, der nicht hochrein ist und nicht nur auf Maltose basiert (z. B. Malzextrakt von OXOID)]² 30,0 g;
- Agar 15,0 g;
- Wasser (5.2.2.2) bis auf 1 000,0 ml.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklav (5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums $5,6 \pm 0,2$ betragen.

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

Bei Problemen mit der Bildung von mindestens 75 % stacheligen Konidiosporen, siehe 5.4.1.4 b 2).

c) **Medium Middlebrook and Cohn 7H10 mit 10 % OADC-Anreicherung (MCO)**

- Agarpulver Middlebrook 7H10 19,0 g;
- Glycerol [1] 5,0 ml;
- Wasser (5.2.2.2) bis auf 900,0 ml.

Zum vollständigen Auflösen wird die Lösung bis zum Siedepunkt erwärmt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklav (5.3.1), und anschließend wird auf 50 °C bis 55 °C abgekühlt. Unter aseptischen Bedingungen werden 100 ml Middlebrook-OAOC-Anreicherung zugesetzt. In jede Petrischale (Platte) (5.3.2.10) werden 18 ml bis 20 ml gefüllt. Der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums muss $6,6 \pm 0,2$ betragen.

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

d) **Bouillon Middlebrook 7H10 mit 10 % ADC-Anreicherung (MADC-Bouillon)**

2 Diese Malzextrakte von Difal und OXOID sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

- Bouillonpulver Middlebrook 7H10 4,7 g;
- Glycerol [1] 100,0 ml;
- Wasser (5.2.2.2) 750,0 ml.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklav (5.3.1), und anschließend wird auf 45 °C abgekühlt. Unter aseptischen Bedingungen werden 100 ml Middlebrook-ADC-Anreicherung zugesetzt, und mit sterilisiertem Wasser (5.2.2.2) wird auf 1 000,0 ml aufgefüllt. Der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums muss $6,6 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

a) Allgemeines Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung:

- Trypton, tryptisch 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 Autoklav (5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des allgemeinen Verdünnungsmittels $7,0 \pm 0,2$ betragen.

b) Verdünnungsmittel mit Glycerol (nur für *Pseudomonas aeruginosa*)

Trypton-Natriumchlorid-Glycerol-Lösung:

- Trypton, tryptisch verdautes Casein 1,0 g
- Natriumchlorid (NaCl) 8,5 g
- Glycerol [1] 2,0 g
- Wasser (5.2.2.2) bis auf 1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklav (5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Verdünnungsmittels $7,0 \pm 0,2$ betragen.

Dieses modifizierte Verdünnungsmittel [5.2.2.4 b)] sollte nur für die Herstellung der Prüfsuspension von *Pseudomonas aeruginosa* (5.4.1.4) verwendet werden. Alle weiteren Verdünnungen sollten mit dem allgemeinen Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] durchgeführt werden.

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

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

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

5.2.2.6 Steriles defibriniertes Schafsblut

Steriles defibriniertes Schafsblut kann von einem kommerziellen Lieferanten bezogen werden.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

a) Allgemeines Wasser standardisierter Härte

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

- Herstellung von Lösung A: Es werden 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklav [5.3.2.1 a)]. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird mit Wasser (5.2.2.2) unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einem Monat aufbewahren.
- Herstellung von Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in Wasser gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einer Woche aufbewahren.
- 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) werden in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) gegeben, dazu werden 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B gegeben. Nach dem Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert (5.3.2.4) des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen (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 ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

Bei 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, angegeben als Calciumcarbonat (CaCO_3), im Reagenzglas unter 375 mg/l.

b) Wasser standardisierter Härte mit Zugabe von Polysorbat 80

Es wird das in 5.2.2.7 a) beschriebene Verfahren verwendet. Am Ende wird 1 g Polysorbat 80 je Liter zugegeben. Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration. Das Wasser standardisierter Härte mit der Zugabe von Polysorbat 80 ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

5.2.2.8 Belastungssubstanzen

5.2.2.8.1 Allgemeines

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

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

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

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

5.2.2.8.2 Bedingungen niedriger Belastung (Rinderserumalbuminlösung — geringe Konzentration)

In 100 ml allgemeinem Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] werden 0,3 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7); die Lösung ist in einem Kühlschrank (5.3.2.8) aufzubewahren und innerhalb von 1 Monat zu verbrauchen.

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

5.2.2.8.3 Bedingungen hoher Belastung (Gemisch von Rinderserumalbuminlösung in hoher Konzentration mit Schaf-Erythrozyten)

In 97 ml allgemeinem Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] werden 3,0 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert.

Es werden mindestens 8,0 ml frisches steriles defibriniertes Schafsblut (5.2.2.6) hergestellt. Das Schafsblut wird bei 800 g_N für 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Erythrozyten im allgemeinen Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] resuspendiert. Dieser Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt, bis der Überstand farblos ist. 3,0 ml der angereicherten (gepackten) Schaf-Erythrozyten werden in den 97 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung (siehe oben) resuspendiert. Um eine Kontamination zu verhindern, sollte dieses Gemisch in Portionen aufgeteilt werden, die wahrscheinlich an einem Tag verwendet werden, und in gesonderten Behältern in einem Kühlschrank bei 2 °C bis 8 °C für höchstens 7 Tage gelagert werden.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins und der Schaf-Erythrozyten im Prüfverfahren (5.5) muss 3,0 g/l bzw. 3,0 ml/l betragen.

5.3 Apperate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme steril gelieferter sind alle Glasgeräte und alle Geräteteile, die mit den Kulturmedien und Reagenzien oder der Probe in Berührung kommen, nach einem der folgenden Verfahren zu sterilisieren:

- a) durch feuchte Hitze im Autoklav [5.3.2.1 a)];
- b) durch trockene Hitze im Heißluftsterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung³

und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation durch feuchte bzw. trockene Hitze:

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf $(21,5 \pm 3,5)^{\circ}\text{C}$ und $(45 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ [um den TSA im Fall des Gussplattenverfahrens im verflüssigten Zustand zu halten] oder auf $(55 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ [zur MCO-Herstellung und auf zusätzliche Prüftemperaturen $\pm 1^{\circ}\text{C}$ (5.5.1)].

³ Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (Bakterien und Mykobakterien) oder auf $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ (Hefen und Pilze). Bei allen Bebrütungen der Bakterien während einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung muss die gleiche Temperatur verwendet werden.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei $(21,5 \pm 3,5)^\circ\text{C}$. Zur Messung des pH-Wertes 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, mit einem Filterhalter von mindestens 50 ml Nutzvolumen und geeignet zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von $0,45\ \mu\text{m}$ für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) und Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2 und 5.2.2.8.3).

Die verwendete Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen auf der gesamten Membran zu erzielen und eine zu lange Filtration zu vermeiden, muss das Gerät so eingestellt werden, dass die Filtration von 100 ml Spülflüssigkeit in 20 s bis 40 s erreicht wird.

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

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

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 Zentrifuge ($800\ g_N$).

5.3.2.14 Rechteckige Glasspatel (4 cm Kantenlänge).

5.3.2.15 Öse (aus Metall oder Kunststoff).

5.3.2.16 Prüffläche, aus PVC mit oder ohne PUR- (Polyurethan-)Oberflächenvergütung, Dicke 2 mm, Maße $20\text{ cm} \times 50\text{ cm}$. Die Prüfflächen werden vor Gebrauch mit 70%igem 2-Propanol gereinigt. Um eine gleichmäßige Vorreinigung sicherzustellen, wird ein Standard-Wischtuch mit 16 ml 70 % (Volumenanteil) 2-Propanol getränkt, und unter Verwendung des Einheitsgewichts wird einmal hin und her über die Prüffläche gewischt [bei FOREX-Material siehe 5.3.2.16 b), dabei wird bei der ersten Verwendung die folienfreie Fläche und bei der zweiten Prüfung die Fläche nach Entfernen der Folie gereinigt]. Nach dem Trocknen werden mit einem Bleistift oder Permanentmarker vier Quadrate als Prüffelder 1 bis 4 markiert, wobei jedes die Maße $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ aufweist und alle in einer Reihe mit einem Abstand zueinander von 5 cm angeordnet sind. Die Reihe sollte sich annähernd in der Mitte der Prüffläche befinden (siehe Bild 1 und Bild 2). Die Kontrollversuche zur Trocknung D_{c0} und D_{ct} werden auf einer kleineren Prüffläche mit den Mindestmaßen $7\text{ cm} \times 13\text{ cm}$ durchgeführt,

4 Vortex[®]-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

auf der zwei Quadrate von 5 cm × 5 cm markiert werden. Jede Platte (bei FOREX Plattenseite) darf nur einmal verwendet werden, eine Wiederverwendung ist nicht zulässig.

Beispiel für die Prüffläche:

- a) Mipolam Troplan PUR Evercare™, (Artikelnummer 85931006, Gerflor Mipolam GmbH, Mülheimer Straße 27, 53840 Troisdorf, Deutschland)⁵.
- b) PVC-Freischaumplatte (20 cm × 50 cm, Dicke 2 mm), FOREX classic, seidenmatte Oberfläche, einseitig folienbeschichtet (Artikelnummer SFSFOXC020RW1F, thyssenkrupp Plastics, Widdersdorfer Str. 158, 50825 Köln, Deutschland)⁶.

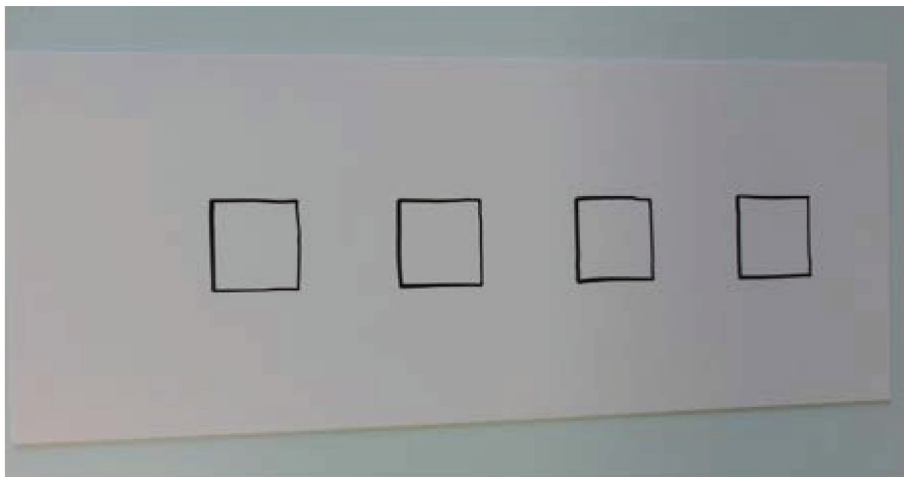
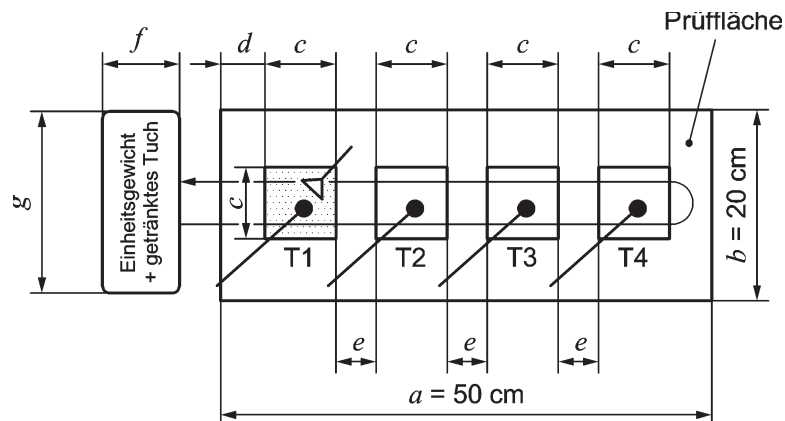


Bild 1 — PVC-Freischaumplatte (20 cm × 50 cm, Dicke 2 mm), FOREX classic, seidenmatte Oberfläche, einseitig folienbeschichtet, Artikelnummer SFSFOXC020RW1F, mit 4 Feldern markiert

5 Diese Prüffläche ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient lediglich zur Unter-
richtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

6 Diese Prüffläche ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient lediglich zur Unter-
richtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.



Legende

Schematische Darstellung der Prüffläche:

$a = 50 \text{ cm}$

$b = 20 \text{ cm}$

mit vier Prüffeldern T1 bis T4 (5 cm × 5 cm) und einem vorgegebenen Bereich der Wischbereichslänge:

$c = 5 \text{ cm}$

$d = 10 \text{ cm}$

$e = 5 \text{ cm}$

Größe des Einheitsgewichts:

$f = 8,6 \text{ cm}$

$g = 12,1 \text{ cm}$

Prüffeld 1 wird mit 0,05 ml des Gemisches aus Prüforganismen und Belastungssubstanz ($1,5$ bis $5,0 \times 10^9$ KBE/ml Bakterien und Mykobakterien, was einer endgültigen Keimzahl auf dem Prüffeld 1 von $6,75 \times 10^7$ KBE bis $2,25 \times 10^8$ KBE entspricht; bei *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis* $1,5$ bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml, was einer endgültigen Keimzahl auf dem Prüffeld 1 von $6,75 \times 10^6$ KBE bis $2,25 \times 10^7$ KBE entspricht) beimpft. Der Pfeil stellt den Reinigungsdurchgang mit dem Tuch dar (siehe Anhang C). Der Startpunkt liegt vor dem Prüffeld 1 und die Wendung erfolgt unmittelbar nach dem Prüffeld 4. Der Endpunkt des Wischvorgangs ist der Startpunkt, nachdem Prüffeld 1 zum zweiten Mal passiert wurde.

Bild 2 — Schematische Darstellung der Markierungen und des Wischdurchgangs über vier Prüffelder auf der Prüffläche

5.3.2.17 Wischtuch

5.3.2.17.1 Standard-Wischtuch (Tuch): Für die Prüfung nach 5.5.2.2 a) und für den Kontrollversuch mit Wasser [5.5.2.2 h)] wird ein Standard-Wischtuch mit den Maßen 16,5 cm × 30 cm und der Zusammensetzung 55 % Zellstoff, 45 % Polyethylenterephthalat (PET) verwendet; (Beispiel: Tork Fusselarme Reinigungstücher, Artikelnummer 190491, Hersteller: SCA Tork)⁷. Die Tücher werden nur einmal verwendet.

5.3.2.17.2 Spezifiziertes Wischtuch (Tuch): Bei gebrauchsfertigen Systemen oder Systemen mit getränktem Wischtuch wird das spezifizierte Wischtuch in Kombination mit dem Desinfektionsmittel verwendet. Der Hersteller beschreibt genau ihre Zusammensetzung und die Art und Weise, wie die Tücher zu verwenden sind (z. B. die Anzahl der Schichten). Die Tücher werden nur einmal verwendet.

5.3.2.18 Einheitsgewicht, Granitblock oder vergleichbares inertes Material, 12,1 cm lang, 8,6 cm breit und 8,6 cm hoch (die Höhe kann bei anderen Materialien abweichen), mit einer Masse von (2,3 bis 2,5) kg. Die Ver-

7 Dieses Tuch ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

wendung des Einheitsgewichts normt das Wischverfahren und simuliert den durchschnittlichen Druck beim Wischen in der Praxis.

5.3.2.19 Tupfer (steril, nur zum Einmalgebrauch), der saugfähige Teil muss aus Nylon (FLOQSwabs) **oder reiner Baumwolle** hergestellt sein und frei von Substanzen, die die Wirkung der Produktprüflösung möglicherweise hemmen oder unterstützen, sowie frei von Substanzen, die sich hemmend auf die Prüforganismen auswirken, sein. (Empfehlung für Wattetupfer aus Nylon: FLOQSwabs Copan Diagnostics Inc., Artikelnummer 502CS01, Empfehlung für Wattetupfer aus Baumwolle: Greiner BioOne GmbH, Artikelnummer 421084)⁸.

5.3.2.20 Parafilm (nur zum Einmalgebrauch); um die untere horizontale Oberfläche und die vertikalen Oberflächen des Einheitsgewichts vor Kontamination beim Wischvorgang zu schützen, wird ein Parafilm verwendet, der diese Teile abdeckt. Dieser Parafilm muss nach jedem Wischvorgang durch einen neuen ersetzt werden (Beispiel: Parafilm[®] M (100 mm) Artikelnummer 7016 05, BRAND GMBH + CO. KG, Postfach 11 55, 97861 Wertheim, Deutschland)⁹.

5.3.2.21 Gummi (Breite 1 cm, Durchmesser 8,5 cm), zur Befestigung des Tuchs am Einheitsgewicht

5.3.2.22 Kulturflaschen mit belüfteten Verschlüssen: Roux-Flaschen oder ähnliche Flaschen

5.3.2.23 Spektrophotometer oder andere geeignete Technik

5.3.2.24 Mikroskop

5.3.2.25 Frittenfilter: Porosität von 40 µm bis 100 µm (ISO 4793, [3])

5.3.2.26 Röhrchen mit Spitzboden und Schraubverschluss, Fassungsvermögen 50 ml (Durchmesser ungefähr 28 mm)

5.3.2.27 Zählkammer

5.4 Herstellung der Prüforganismussuspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüforganismussuspensionen

5.4.1.1 Allgemeines

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

5.4.1.2 Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüforganismen

Der Prüforganismus und dessen Stammkulturen sind nach EN 12353 herzustellen und aufzubewahren.

5.4.1.3 Gebrauchskultur der Prüforganismen

5.4.1.3.1 Bakterien

Um die Gebrauchskultur der Prüforganismen (5.2.1) herzustellen, ist eine Subkultur von der Stammkultur (5.4.1.2) durch Ausstrich auf TSA-Schrägararröhrchen oder -Platten [5.2.2.3 a)] anzulegen und zu bebrüten (5.3.2.3). Nach 18 h bis 24 h wird aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise eine zweite

⁸ Diese Tupfer sind Beispiele für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

⁹ Parafilm ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

Subkultur angelegt und 18 h bis 24 h bebrütet. Aus dieser zweiten Subkultur darf auf gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden. Die zweite und/oder dritte Subkultur ist (sind) die Gebrauchskultur(en).

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

Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

5.4.1.3.2 Pilze

a) *Candida albicans* (Hefe)

Um die Gebrauchskultur von *Candida albicans* (5.2.1) herzustellen, ist eine Subkultur von der Stammkultur (5.4.1.2) durch Ausstrich auf MEA-Schräglagar-Röhrchen [5.2.2.3 b)] anzulegen und zu bebrüten (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 gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden. Die zweite und die (gegebenenfalls angelegte) 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 nachfolgenden 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.

b) *Aspergillus brasiliensis* (Schimmelpilz)

Für *Aspergillus brasiliensis* (5.2.1) wird nur die erste Subkultur verwendet, die auf MEA [5.2.2.3 b)] in Petrischalen (5.3.2.10) oder Kulturflaschen mit belüftetem Verschluss (5.3.2.22) gezüchtet wurde, und 7 d bis 9 d lang bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet. Es ist keine weitere Subkultivierung erforderlich. Stapeln der Petrischalen während der Bebrütung könnte zu einer inhomogenen Temperaturverteilung führen.

Am Ende der Bebrütung müssen alle Kulturen eine dunkelbraune oder schwarze Oberfläche mit nur wenigen kleinen weißen oder grauen Flecken aufweisen. (Bild 3). Ein Beispiel für eine ungeeignete (nicht verwendbare) Kultur ist in Bild 4 dargestellt.

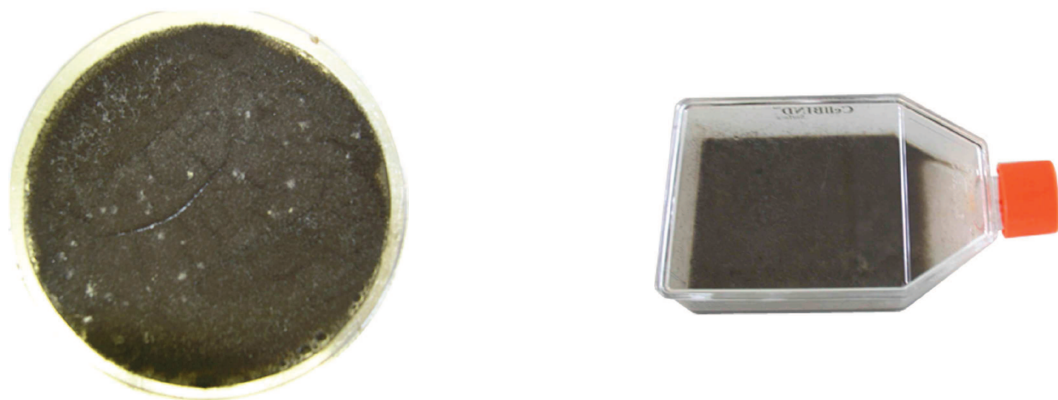


Bild 3 — Beispiele für geeignete Kulturen von *A. brasiliensis* ATCC 16404 nach 7 d Bebrütung bei 30 °C

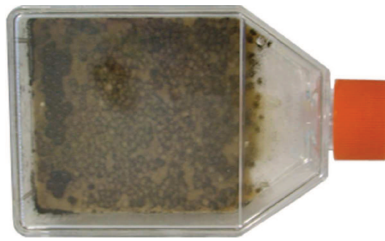


Bild 4 — Beispiele für ungeeignete (nicht verwendbare) Kulturen von *A. brasiliensis* ATCC 16404 nach 7 d Bebrütung bei 30 °C

5.4.1.3.3 Mykobakterien

Zur Herstellung der Gebrauchskultur von *Mycobacterium terrae* bzw. *Mycobacterium avium* (5.2.1), wird eine Subkultur direkt aus den aufgetauten Kryogegefäßen [siehe EN 12353 (5.6)] durch Ausstrich auf mindestens zwei MCO-haltige Platten [(5.2.2.3 c)] angelegt und bebrütet (5.3.2.3). Nach 21 Tagen wird aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise eine zweite Subkultur angelegt und 21 Tage bebrütet. Die erste und/oder zweite Subkultur ist (sind) die Gebrauchskultur(en).

Eine dritte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

5.4.1.4 Prüfsuspension (N)

a) Prüfsuspension mit Bakterien

Es werden 10 ml allgemeines Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3) werden ösenweise (5.3.2.15) Zellen in das allgemeine Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] überführt. Das Suspendieren der Zellen im Verdünnungsmittel sollte durch Reiben der Öse an der feuchten 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 Röhrchen überführt.

Im Fall von *Pseudomonas aeruginosa* wird statt des allgemeinen Verdünnungsmittels das Verdünnungsmittel mit Glycerol [5.2.2.4 b)] verwendet.

Die Anzahl der Zellen in der Suspension wird mit dem allgemeinen Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] auf $1,5 \times 10^9$ KBE/ml¹⁰ bis $5,0 \times 10^9$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der Einheiten mit einem geeigneten Verfahren geschätzt wird. Diese Prüfsuspension ist im Wasserbad bei 20 °C aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden. Die Temperatur ist nach 5.5.1.1 a) und 5.5.1.4 erst unmittelbar vor Prüfbeginn einzustellen.

Im Fall von *Pseudomonas aeruginosa* wird statt des allgemeinen Verdünnungsmittels das Verdünnungsmittel mit Glycerol [5.2.2.4 b)] verwendet.

Die Verwendung eines Spektrophotometers (5.3.2.23) zur Einstellung der Zellzahl wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, Küvette mit 10 mm optischer Weglänge). Jedes Laboratorium sollte deshalb für jeden Prüforganismus eine Kalibrierkurve erstellen, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte im Allgemeinen zwischen 0,150 und 0,460 zu finden sind. Um reproduzierbare Ergebnisse dieser Messung zu erreichen, kann es erforderlich sein, die Prüfsuspension zu verdünnen, z. B. 1 + 9.

ANMERKUNG Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

¹⁰ KBE/ml = koloniebildende Einheit(en) je Milliliter.

b) Prüfsuspension mit Pilzsporen

- 1) *Candida albicans* (Vorschlag: Die Verwendung eines glycerolhaltigen Verdünnungsmittels, wie bei *P. aeruginosa*, könnte hilfreich sein)

Es werden 10 ml allgemeines Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3) werden ösenweise (5.3.2.15) Zellen in das allgemeine Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] überführt. Das Suspendieren der Zellen im Verdünnungsmittel sollte durch Reiben der Öse an der feuchten 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 Röhrchen überführt. Die Anzahl der Zellen in der Suspension wird mit dem allgemeinen Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] auf $1,5 \times 10^8$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der Einheiten mit einem geeigneten Verfahren geschätzt wird. Diese Prüfsuspension ist im Wasserbad bei 20 °C aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden. Die Temperatur ist nach 5.5.1.1 a) und 5.5.1.4 erst unmittelbar vor Prüfbeginn einzustellen.

- 2) *Aspergillus brasiliensis*

Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3) werden die Zellen in 10 ml steriler 0,05%iger (Massenkonzentration) Polysorbat 80¹¹-Lösung in Wasser (5.2.2.2) suspendiert. Mit einem sterilen Glasstab oder -spatel werden die Konidiosporen von der Oberfläche der Kultur abgelöst. Die Suspension wird in einen Kolben überführt und zusammen mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) eine Minute lang behutsam von Hand geschüttelt. Die Suspension wird durch ein Frittenfilter (5.3.2.25) filtriert.

Unmittelbar nach der Herstellung wird eine mikroskopische (5.3.2.24) Untersuchung bei 400-facher Vergrößerung durchgeführt, um Folgendes nachzuweisen:

- das Vorhandensein einer hohen Konzentration (mindestens 75 % stachelige Sporen) von charakteristischen reifen Sporen, d. h. stacheligen Sporen (im Gegensatz zu glatten Sporen) (Bild 5 und Bild 6);
- das Nichtvorhandensein von Sporenkeimen (mindestens 10 Sehfelder prüfen);
- das Nichtvorhandensein von Myzelfragmenten (mindestens 10 Sehfelder prüfen);

Wenn gekeimte Sporen vorhanden sind, wird die Suspension verworfen.

Wenn Myzelien vorhanden sind, wird eine zweite Frittenfiltration durchgeführt.

Wenn dann immer noch Myzelien vorhanden sind, wird die Suspension verworfen.

Wenn keine 75 % stachelige Sporen erzielt werden, kann dies an der *Aspergillus-brasiliensis*-Kultur oder den zur Herstellung dieser Sporen verwendeten Medien liegen. In diesem Fall wird es erforderlich sein, die Kultur aus einer anderen Kultursammlung zu beziehen und/oder einen MEA von einem anderen Anbieter zu verwenden.

11 Polysorbat 80 ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

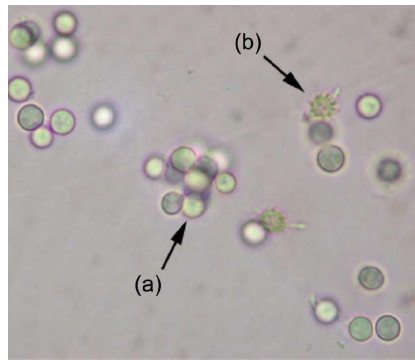


Bild 5 — Beobachtung von Konidiosporen unter einem Lichtmikroskop: Vorliegen von glatten (a) und stacheligen (b) Sporen [ungeeignete (nicht verwendbare) Suspension]

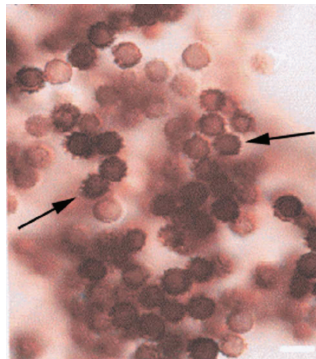


Bild 6 — Beobachtung von Konidiosporen unter einem Lichtmikroskop: Hohe Konzentration von charakteristischen reifen Sporen mit stacheligem Aussehen (geeignete Suspension)

Die Anzahl der Sporen in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] auf $1,5 \times 10^8$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der koloniebildenden Einheiten mit einem geeigneten Verfahren geschätzt wird. Die Suspension ist innerhalb von 4 h in einem auf $(21,5 \pm 3,5)$ °C eingestellten Wasserbad (5.3.2.2) zu verwenden. In jedem Fall ist die Temperatur entsprechend 5.5.1 erst unmittelbar vor Beginn der Prüfung (5.5.2) einzustellen.

Die Verwendung eines Zellzählgeräts zum Einstellen der Anzahl der Zellen wird dringend empfohlen. Bei Verwendung einer geeigneten Zählkammer (5.3.2.27) sind die Anweisungen ausdrücklich zu befolgen.

c) Prüfsuspension mit Mykobakterien

Es werden 10 ml allgemeines Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3) werden ösenweise (5.3.2.15) Zellen in das allgemeine Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] überführt. Das Suspendieren der Zellen im Verdünnungsmittel sollte durch Reiben der Öse an der feuchten 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 5 min geschüttelt. Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in ein Röhrchen überführt.

Mithilfe einer für den Einmalgebrauch bestimmten Kunststofföse (5.3.2.15) werden die Prüforganismen von mindestens zwei Platten der Gebrauchskultur (5.4.1.3) in ein Spitzbodenröhrchen mit Schraubverschluss (5.3.2.26), das 6 g bis 7 g trockene Glasperlen (5.3.2.11) enthält, überführt. Die Prüforganismen werden homogenisiert, indem mindestens 5 min lang gemischt wird (siehe 5.3.2.6), um sie in homogener Weise auf den Perlen und auf dem größten Teil der Innenfläche des Schraubverschlussröhrchens zu verteilen. 10 ml Wasser (5.2.2.2) werden tropfenweise hinzugefügt und die Prüforganismen durch Mischen

resuspendiert (5.3.2.6). Nach einer Absetzzeit von 20 min wird die Suspension durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in ein Röhrchen überführt.

Andere Homogenisierungsverfahren sind zulässig, sofern die Anzahl der erhaltenen KBE je ml geeignet und während der Dauer der Prüfung stabil ist und die mikroskopische Untersuchung zeigt, dass die Suspension ebenso homogen wie nach den beiden vorstehend beschriebenen Verfahren ist.

Es dürfen keine grenzflächenaktiven Stoffe (Tenside) verwendet werden.

Die Anzahl der Zellen in der Suspension wird mit dem allgemeinen Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] auf $1,5 \times 10^9$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^9$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der Einheiten mit einem geeigneten Verfahren geschätzt wird. Diese Prüfsuspension ist im Wasserbad bei 20 °C aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden. Die Temperatur ist nach 5.5.1.1 a) und 5.5.1.4 erst unmittelbar vor Prüfbeginn einzustellen.

Die Verwendung eines Spektrophotometers (5.3.2.23) zur Einstellung der Zellzahl wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, Küvette mit 10 mm optischer Weglänge). Jedes Laboratorium sollte deshalb für jeden Prüforganismus eine Kalibrierkurve erstellen, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte im Allgemeinen zwischen 0,150 und 0,460 zu finden sind. Um reproduzierbare Ergebnisse dieser Messung zu erreichen, kann es erforderlich sein, die Prüfsuspension zu verdünnen, z. B. 1+9.

- 1) Für die Auszählung der Prüfsuspension [5.4.1.4 a) bis c)] werden 10^{-7} - und 10^{-8} -Verdünnungen (bzw. für *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis* 10^{-6} - und 10^{-7} -Verdünnungen) der Prüfsuspension unter Verwendung des allgemeinen Verdünnungsmittels [5.2.2.4 a)] angesetzt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].
- 2) Von jeder Verdünnung wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft.
 - i) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1-ml-Probe in gesonderte Petrischalen (d. h. bei einer Doppelbestimmung = zwei Platten) überführt, und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf (45 ± 1) °C abgekühlter TSA [5.2.2.3 a)] bei Bakterien, verflüssigter MEA [5.2.2.3 b)] bei *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis* oder verflüssigtes MCO [5.2.2.3 c)] bei Mykobakterien zugegeben.
 - ii) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in Anteile etwa gleicher Größe aufgeteilt und auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei, d. h. bei einer Doppelbestimmung mindestens vier Platten) von an der Oberfläche getrockneten TSA-Platten [5.2.2.3 a)] bei Bakterien, MEA-Platten [5.2.2.3 b)] bei *Candida albicans* und *Aspergillus brasiliensis* oder MCO-Platten [5.2.2.3 c)] bei Mykobakterien ausgestrichen.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.5 Validierungssuspension (N_V)

- a) Zur Herstellung der Validierungssuspension wird die Prüfsuspension (5.4.1.4) mit dem allgemeinen Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] so verdünnt, dass sich $3,0 \times 10^2$ KBE/ml bis $1,6 \times 10^3$ KBE/ml ergeben (etwa ein Viertel (1 + 3) der Verdünnung 10^{-6} bei Bakterien und Mykobakterien bzw. der Verdünnung 10^{-5} bei Hefen und Schimmelpilzen).

ANMERKUNG Die Kontrolle des Neutralisationsmediums in dieser Prüfung unterscheidet sich von der Kontrolle des Neutralisationsmediums N_{VB} in den Suspensionsprüfungen der Phase 2, Stufe 1 (EN 13727, EN 13624 und EN 14348), da die Prüforganismen in der Prüfung N_a nicht mit einer höheren Konzentration des Neutralisationsmediums konfrontiert werden. Deshalb wird keine 10-fach konzentrierte Validierungssuspension für die Kontrolle des Neutralisationsmediums hergestellt.

- b) Die Validierungssuspension ist auf die gleiche Weise wie die Prüfsuspension [5.4.1.4 b)] zu erhalten und zu verwenden.

- c) Zur Auszählung wird mit dem allgemeinen Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] eine Verdünnung von 10^{-1} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Eine Probe von 1,0 ml wird als Doppelbestimmung entnommen und zur Beimpfung im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren [5.4.1.4 d) 1) oder d) 2)] verwendet.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.6 Bebrüten und Auszählen der Prüfsuspensionen

- a) Die Platten werden 20 h bis 24 h bebrütet (5.3.2.3), bei *Candida albicans* 40 h bis 48 h. Alle Platten, die (aus irgendeinem Grund) nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt und die Anzahl der KBE wird bestimmt. Danach werden die Platten für weitere 20 h bis 24 h bebrütet (nicht bei *Candida albicans*). Platten, die keine gut voneinander abgesetzten KBE mehr aufweisen, dürfen nicht erneut ausgezählt werden. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt. Wenn sich die Anzahl erhöht hat, darf nur die höhere Zahl für die weitere Auswertung verwendet werden.
- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der KBE aufgezeichnet, aber es wird > 330 für alle KBE-Zahlen über 330 aufgezeichnet; die V_c -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der KBE/ml in der Prüfsuspension N und in der Validierungssuspension N_V wird nach den in 5.6.2.3 und 5.6.2.5 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.4.2 Produktprüflösung

Produktprüflösungen sind in mindestens zwei unterschiedlichen Konzentrationen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) herzustellen, um eine Konzentration im Wirkungsbereich und eine Konzentration im unwirksamen Bereich zu erfassen.

Verdünnungen gebrauchsfertiger Produkte, d. h. von Produkten, die bei ihrer Verwendung nicht verdünnt werden, sind in Wasser (5.2.2.2) anstatt in Wasser standardisierter Härte herzustellen. Die Konzentration der Verwendung (vom Hersteller festgelegt) muss als eine der obligatorischen Prüfkonzentrationen geprüft werden.

Bei vorgetränkten Tüchern oder gebrauchsfertigen Tüchern, bei denen eine Verdünnung nicht möglich ist, muss der unwirksame Bereich bei einer kürzeren Einwirkzeit nachgewiesen werden. Wenn die angegebene Einwirkzeit 1 min beträgt, muss zusätzlich die Einwirkzeit von 5 min geprüft werden. In diesem Fall ist es nicht notwendig, einen unwirksamen Bereich nachzuweisen. Details zur Präzision und zur Wiederholung werden in 5.8.4 angegeben.

ANMERKUNG 1 Die kürzeste zu prüfende Einwirkzeit beträgt 1 min.

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

Bei flüssigen Produkten müssen die Verdünnungen des Produkts mit Wasser standardisierter Härte (oder Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten) im Verhältnis Volumen zu Volumen in Messkolben hergestellt werden.

Die Produktprüflösungen sind frisch herzustellen und innerhalb von 2 h in der Prüfung zu verwenden. Sie müssen eine physikalisch homogene Zubereitung ergeben, die während des gesamten Verfahrensablaufs stabil bleibt. Wenn im Verlauf des Verfahrens eine sichtbare Inhomogenität durch Bildung einer Ausfällung oder Ausflockung auftritt (z. B. infolge der Zugabe der Belastungssubstanz), muss dies im Prüfbericht angegeben werden.

Bei getränkten Tüchern oder gebrauchsfertigen Tüchern werden die vom Hersteller bereitgestellten Anweisungen befolgt.

ANMERKUNG 2 Die Auszählung in einer Ausfällung oder Ausflockung eingebetteter Mikroorganismen ist schwierig und unzuverlässig.

Die Prüfkonzentration ist als Massenkonzentration oder als Volumenkonzentration anzugeben, ebenso Einzelheiten der Produktprobe im Lieferzustand.

5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der bakteriziden und levuroziden und/oder fungiziden und/oder tuberkuloziden und/oder mykobakteriziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Versuchsbedingungen

Neben den Bedingungen für Temperatur, Einwirkzeit, Belastungssubstanz und Prüforganismus dürfen entsprechend der für das Produkt vorgesehenen praktischen Anwendung (Abschnitt 4) zusätzliche Versuchsbedingungen ausgewählt werden:

a) Temperatur θ (in °C):

Die Prüftemperatur ist entweder Raumtemperatur ($21,5\text{ °C} \pm 3,5\text{ °C}$) oder liegt zwischen 4 °C und $15,5\text{ °C}$ oder zwischen $27,5\text{ °C}$ und 30 °C ; für jede Temperatur innerhalb der beiden Temperaturbereiche beträgt die zulässige Abweichung $\pm 2,5\text{ °C}$;

b) Einwirkzeit t (in min):

- 1) Die zu prüfenden Einwirkzeiten sind die vom Hersteller empfohlenen Zeiten, jedoch nicht länger als 60 min; die zulässige Abweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt $\pm 10\text{ s}$; außer bei 1 min – hier beträgt sie $\pm 5\text{ s}$.
- 2) Die Einwirkzeiten für die Oberflächendesinfektionsmittel werden auf der Basis der praktischen Bedingungen des Produkts gewählt. Die empfohlene Einwirkzeit für die Verwendung des Produkts liegt in der Verantwortung des Herstellers. Produkte, die bestimmt sind zur Desinfektion von Oberflächen, die voraussichtlich in Kontakt mit dem Patienten und/oder dem medizinischen Personal kommen, und von Oberflächen, die häufig von verschiedenen Personen berührt werden, was zu der Übertragung von Mikroorganismen auf den Patienten führen kann, müssen mit einer Einwirkzeit von maximal 5 min geprüft werden. Gleiches gilt, wenn die Einwirkzeit des Produkts aus praktischen Gründen begrenzt werden muss. Produkte für andere Oberflächen als den oben angegebenen dürfen mit einer Einwirkzeit von höchstens 60 min geprüft werden.
- 3) Die minimale Einwirkzeit ist 1 min (vom Beginn der Applikation bis zum Beginn des Rückgewinnungsprozesses). Die Rückgewinnung wird auf höchstens 1 min begrenzt, da das Produkt weiter wirken könnte.

c) Belastungssubstanz:

Die zu prüfende Belastungssubstanz ist entweder $0,3\text{ g/l}$ Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2) bei Bedingungen niedriger Belastung oder bei Bedingungen hoher Belastung ein Gemisch von 3 ml/l Schaf-Erythrozyten und 3 g/l Rinderserumalbumin (5.2.2.8.3) – nach Abschnitt 4 und nach den praktischen Anwendungsbedingungen. Zusätzliche Belastungssubstanzen dürfen entsprechend den spezifischen Anwendungsgebieten geprüft werden.

d) Luftfeuchte (in %): muss bei jeder Prüfung dokumentiert werden

e) Prüforganismen für die bakterizide Wirkung (5.2.1):

- 1) *Staphylococcus aureus*;
- 2) *Pseudomonas aeruginosa*;

- 3) *Enterococcus hirae*.
- f) Prüforganismus für die levurozide Wirkung (5.2.1):
- 1) *Candida albicans*.
- g) Prüforganismen für die fungizide Wirkung (5.2.1):
- 1) *Aspergillus brasiliensis*;
- 2) *Candida albicans*.
- h) Prüforganismen für die tuberkulozide Wirkung (5.2.1):
- 1) *Mycobacterium terrae*.
- i) Prüforganismen für die mykobakterizide Wirkung (5.2.1):
- 1) *Mycobacterium avium*;
- 2) *Mycobacterium terrae*.

5.5.1.2 Auswahl des Neutralisationsmediums

Die Neutralisation und/oder Aufhebung der bakteriziden und levuroziden und/oder fungiziden und/oder tuberkuloziden und/oder mykobakteriziden und/oder bakteriostatischen und levurostatischen und/oder fungistatischen und/oder tuberkulostatischen und/oder mykobakteristatischen Wirkung des Produkts muss für jeden der verwendeten Prüforganismen kontrolliert und validiert werden, jedoch nur bei der höchsten Produktprüfkonzentration. Diese Verfahren (Kontrolle des Neutralisationsmediums und Verfahrensvalidierung) müssen *einmal vor* der Prüfung 5.5.2.2 durchgeführt werden.

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

Sollte dieses Neutralisationsmedium nicht valide sein, ist die Validierungsprüfung mit einem alternativen Neutralisationsmedium folgender Zusammensetzung zu wiederholen: Polysorbat 80 (30 g/l), Saponin (30 g/l), L-Histidin (1 g/l), Lecithin (3 g/l) und Natriumthiosulfat (5 g/l), gelöst entweder im allgemeinen Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] oder in Phosphatpufferlösung mit 0,25 mol/l (siehe Anhang B).

Unter besonderen Umständen kann es erforderlich sein, dem TSA [5.2.2.3 a)] oder MEA [5.2.2.3 b)] ein Neutralisationsmedium zuzusetzen. Falls dem TSA/MEA Neutralisationsmedium zugesetzt wird, sollte dem in der Prüfung verwendeten TSA/MEA die gleiche Menge zugesetzt werden.

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

5.5.1.3 Allgemeine Anweisungen für Validierungs- und Kontrollverfahren

Im Fall gebrauchsfertiger Produkte ist Wasser (5.2.2.2) anstelle von Wasser standardisierter Härte zu verwenden.

5.5.1.4 Temperaturangleichung

Alle Reagenzien [Produktprüflösungen (5.4.2), Prüfsuspension (5.4.1.4), Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a) und 5.2.2.4 b)], 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 a)] eingestellt. Zu beachten sind die Festlegungen in 5.4.1.4 b). Die Stabilisierung der Temperatur der Reagenzien auf θ ist zu überprüfen. Im Fall gebrauchsfertiger Produkte muss zusätzlich das Wasser (5.2.2.2) auf θ eingestellt werden.

Das Neutralisationsmedium (5.2.2.5) ist auf eine Temperatur von $(21,5 \pm 3,5)^\circ\text{C}$ einzustellen.

5.5.1.5 Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Prüforganismen

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

5.5.1.6 Beimpfung der Prüffläche

Je Einwirkzeit, Belastungssubstanz und Prüforganismus wird eine Prüffläche (5.3.2.16) für jede Konzentration der Produktprüflösung plus eine für den Kontrollversuch mit Wasser (N_W) und eine für den Kontrollversuch zur Trocknung vorbereitet. Die Prüffläche für den Kontrollversuch zur Trocknung kann kleiner sein (5.3.2.16). Für das mit zwei Konzentrationen des Produkts (5.4.2) mindestens zu prüfende Spektrum an Prüforganismen werden acht „normale“ (5.3.2.16) und vier kleine Prüfflächen benötigt. Für den Kontrollversuch mit Wasser werden mindestens 4 „normale“ Prüfflächen benötigt. Details zur Präzision und zur Wiederholung werden in 5.8.4 und EN 14885 angegeben.

1,0 ml Belastungssubstanz (5.2.2.8) wird in ein Röhrchen pipettiert. Es werden 9,0 ml Prüfsuspension (5.4.1.4) zugegeben. Der Ansatz wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und 0,05 ml dieses Gemischs werden punktförmig auf jedes Prüffeld 1, das auf den Prüfflächen markiert ist (5.3.2.16), und auf die beiden Prüffelder D_{c0} , d. h. „Kontrollversuch zur Trocknung bei einer Einwirkzeit von null“, und D_{ct} , d. h. „Kontrollversuch zur Trocknung bei einer Einwirkzeit von „ t'''' “ (kleinere Prüfflächen), pipettiert. Die rechteckigen Glasspatel (5.3.2.14), die für die Verteilung der Prüfsuspension verwendet werden (je einer für D_{c0} , D_{ct} und für Feld 1), sollten zunächst auf einer Blindprobe verwendet werden, um sicherzustellen, dass Feld 1 mit einer ausreichenden Menge an Prüfsuspension kontaminiert ist. Die aufgetragenen Punkte werden mit einem rechteckigen Glasspatel (5.3.2.14) – beginnend mit D_{c0} – gleichmäßig über die markierten Flächen verteilt. Das Inokulum wird bei der Prüftemperatur bis zur sichtbaren Trocknung trocken gelassen (höchstens 60 min), andernfalls ist die Prüfung zu verwerfen und die Raumbedingungen (z. B. Luftfeuchte) sind zu überprüfen. Die Prüfflächen sind unmittelbar nach Ende der Trocknungszeit zu verwenden.

Die genaue Trocknungszeit ist im Prüfbericht zu erfassen.

5.5.2 Verfahren

5.5.2.1 Allgemeines

Zu einer graphischen Darstellung dieses Verfahrens siehe Anhang C.

- Die Prüfung, die Kontrollversuche und die Validierungsverfahren (siehe 5.5.2.2 bis 5.5.2.5) müssen mit der gleichen Versuchsanordnung durchgeführt werden. Wird die Arbeit von mehr als einer Person ausgeführt, muss jede Verfahrensweise (Beimpfen, Verteilen oder Rückgewinnung der Prüforganismen von den verschiedenen Prüffeldern) von der gleichen Person durchgeführt werden.
- Der Kontrollversuch mit Wasser und die Kontrollversuche zur Trocknung dürfen nur einmal durchgeführt werden, wenn verschiedene Konzentrationen eines Produkts und/oder verschiedene Belastungssubstanzen parallel/gleichzeitig geprüft werden. Für jede Temperatur, Einwirkzeit und jeden Prüforganismus sind getrennt voneinander ein Kontrollversuch mit Wasser und Kontrollversuche zur Trocknung durchzuführen.
- Für jede nach 5.5.1.6 vorbereitete Prüffläche – mit Ausnahme der Prüffläche für die Kontrollversuche zur Trocknung – muss ein Tuch als Werkzeug für die mechanische Einwirkung (5.3.2.17) vorbereitet werden.
- Die getränkten Tücher müssen unmittelbar vor und unmittelbar nach dem Wischvorgang gewogen werden – siehe 5.5.2.2 –, um die Menge der auf der Prüffläche freigesetzten Flüssigkeit zu messen.

- e) Für jedes Prüffeld einer „normalen“ Prüffläche (5.3.2.16) wird ein Röhrchen mit 5 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.5) vorbereitet, d. h. vier Röhrchen für eine „normale“ Prüffläche.
- f) Die Tücher (5.3.2.17) sollten einmal oder, wenn vom Hersteller empfohlen, mehr als einmal gefaltet werden.

5.5.2.2 Prüfung N_a (Bestimmung der bakteriziden und levuroziden und/oder fungiziden und/oder tuberkuloziden und/oder mykobakteriziden Konzentrationen) und Kontrollversuch mit Wasser N_W

- a) Das Standardtuch (5.3.2.17.1) wird vor dem Wischvorgang mindestens etwa 30 min in einer Petrischale (5.3.2.10) mit 16 ml der Produktprüflösung getränkt, d. h. vor dem erwarteten Ende der Trocknungszeit (5.5.1.6). Andere Volumina der Produkte und längere Tränkzeiten sind entsprechend den Herstellerangaben erlaubt, wenn diese Abweichung(en) klar im Prüfbericht und besonders in den Schlussfolgerungen beschrieben werden. Das Tuch wird auf das Einheitsgewicht gelegt, und der Wischvorgang [5.5.2.2 d)] wird begonnen.
- b) Im Falle von spezifizierten Wischtüchern (5.3.2.17.2), z. B. gebrauchsfertigen vorbefeuchteten Tüchern oder Systemen mit getränkten Wischtüchern, bei denen ein vom Produkthersteller spezifiziertes trockenes Tuchmaterial vom Anwender mit der Produktlösung getränkt wird, werden die Tücher entsprechend den Anweisungen des Herstellers vorbereitet, bevor mit dem Wischvorgang [5.5.2.2 d)] begonnen wird. In solchen Fällen muss der Kontrollversuch mit Wasser mit dem Tuch (5.3.2.17.1) entsprechend 5.5.2.2 g) durchgeführt werden.

Wenn als die Nutzungsdauer von getränkten Tüchern durch den Anwender eine Zeitspanne von mehr als einem Arbeitstag angegeben wird, muss am Ende der angegebenen Zeitspanne ein zweiter Prüflauf unter Verwendung des Prüforganismuses mit der höchsten Resistenz durchgeführt werden.

- c) Im Falle von Produkten, die für das Sprühen auf (spezifizierte oder nicht spezifizierte) Tücher oder Mopps vorgesehen sind, wird die realistisch anwendbare Mindestmenge an Produkt je Tuch nach den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Diese Menge muss auf das spezifizierte oder das „Standardtuch“ (5.3.2.17) aufgetragen werden, wobei die Größe des in der Praxis eingesetzten Tuchs oder Mopps im Verhältnis zur Menge des „sprühfähigen“ Produkts zu berücksichtigen ist. Die in der Prüfung verwendete Menge des Produkts muss als Volumen/Masse je Tuch im Prüfbericht dokumentiert werden.
- d) Es wird das Einheitsgewicht (5.3.2.18) verwendet und die Bodenseite mit Parafilm (5.3.2.20) geschützt. Die mit Parafilm geschützte Seite des Einheitsgewichts wird mit dem Tuch abgedeckt, das mit einem Gummi (5.3.2.21) befestigt wird. Das Einheitsgewicht wird durch Schieben von der Seite bewegt, sodass durch das Halten des Einheitsgewichts kein zusätzlicher Druck ausgeübt wird. Der Wischvorgang wird vor Prüffeld 1 begonnen, dann wird eine Sekunde in Richtung des Feldes 4 gewischt, unmittelbar nach Prüffeld 4 wird auf dieser Position gewendet und für eine weitere Sekunde zurück zum Feld 1 gewischt (Bild 1 und Bild 7). Nachdem das Prüffeld 1 zum zweiten Mal passiert wurde, wird, nachdem zwei Sekunden vergangen sind, die Stoppuhr gestartet. Die Prüffläche wird für die gewählte Einwirkzeit t [5.5.1.1 b)] ruhen gelassen



Bild 7 — Schieben des Einheitsgewichts von Hand über die Prüfflächen, ohne zusätzlichen Druck auszuüben

- e) Am Ende von t wird ein Tupfer (5.3.2.19) mit Neutralisationsmedium (5.2.2.5) aus dem relevanten Röhrchen mit Neutralisationsmedium [5.5.2.1 e)] getränkt. Die gesamte Oberfläche von Prüffeld 1 wird mit dem Tupfer (ein Tupfer je Prüffeld) abgerieben und der Tupfer wird im Röhrchen mit Neutralisationsmedium ausgewaschen. Das Rückgewinnungsverfahren wird mit dem ausgewaschenen Tupfer wiederholt, anschließend wird die untere Hälfte (oder weniger) des Tupfers abgeschnitten und der getränkte Teil wird in das Röhrchen mit Neutralisationsmedium [5.5.2.1 e)] gegeben. Anschließend wird das Rückgewinnungsverfahren mit einem zweiten (trockenen) Tupfer wiederholt, bis das Prüffeld sichtbar trocken ist. Die untere Hälfte dieses Tupfers wird ebenfalls abgeschnitten und in das Röhrchen mit Neutralisationsmedium gegeben. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Für das gesamte Rückgewinnungsverfahren mit den beiden Tupfern darf nicht mehr als 1 min je Prüffeld benötigt werden. Diese Verfahrensweise wird bei den Prüffeldern 2, 3 und 4 wiederholt, d. h., es werden 8 Tupfer je „normaler“ Prüffläche benötigt. Die Teile des Tupfers, die später in das Röhrchen mit Neutralisationsmedium überführt werden, dürfen nie berührt werden.
- f) Nach einer Neutralisationszeit von 5 min (10 s bei Einwirkzeiten < 10 min) wird durchmischt und sofort eine Probe von 1,0 ml des neutralisierten Prüfgemischs N_a als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren [5.4.1.4 d)] abgeimpft. Bei Mykobakterien wird eine Probe von 1,0 ml des neutralisierten Prüfgemischs N_a als Doppelbestimmung und eine Verdünnung von 10^{-1} in Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren [5.4.1.4 d)] abgeimpft.
- g) Die Arbeitgänge a) bis e) werden unter Verwendung der anderen Produktprüflösung(en) bei der gleichen Einwirkzeit durchgeführt.
- h) Kontrollversuch mit Wasser N_W : Die Arbeitgänge a) bis e) werden durchgeführt, aber anstelle der Produktprüflösung wird Wasser standardisierter Härte [5.2.2.7 a)] unter Zugabe von 0,1 % Polysorbat 80 verwendet. Zur Auszählung wird mit dem allgemeinen Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] eine Verdünnung von 10^{-1} hergestellt. Abweichungen von dem geforderten Volumen und der geforderten Tränkzeit in a) sind nicht erlaubt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Es wird eine Probe von 1,0 ml der unverdünnten Probe und der Verdünnung von 10^{-1} in Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren [5.4.1.4 d) 1) oder 2)] abgeimpft.
- i) Kontrollversuche zur Trocknung: Das Rückgewinnungsverfahren von den Prüffeldern D_{c0} und D_{ct} ist das gleiche Verfahren wie in [5.5.2.2 e)] beschrieben. Die Rückgewinnung von Feld D_{c0} beginnt unmittelbar nach dem Trocknungsvorgang nach 5.5.1.6. Die Rückgewinnung von Feld D_{ct} beginnt jedoch unmittelbar nach Ablauf der Einwirkzeit t . Die Rückgewinnung von D_{ct} wird nach der Rückgewinnung N_a von den Prüffeldern 1 bis 4 durchgeführt. Zur Auszählung werden mit dem Verdünnungsmittel [5.2.2.4 a)] Verdünnungen von 10^{-4} und von 10^{-5} (für Hefen und Schimmelpilze von 10^{-3} und 10^{-4}) hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Es wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren [5.4.1.4 d) 1) oder 2)] abgeimpft.
- j) Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.5.

- k) Die Arbeitsgänge a) bis f) werden unter Anwendung der anderen Mindestprüfbedingungen und gegebenenfalls von anderen zusätzlichen Versuchsbedingungen (5.5.1.1) durchgeführt.

5.5.2.3 Kontrolle des Neutralisationsmediums *B* — Verifizierung des Nichtvorliegens einer Toxizität des Neutralisationsmediums

Die folgende Prüfung darf weggelassen werden, wenn eine valide Kontrolle *B* des Neutralisationsmittels entsprechend den Prüfungen der Phase 2, Stufe 1 nach EN 14885 durchgeführt wurde. Wenn keine Ergebnisse vorliegen, muss die Prüfung nur einmal vor der eigentlichen Prüfung (5.5.2.2) durchgeführt werden.

8,0 ml des Neutralisationsmediums – das auch in der Prüfung (5.5.2.2) verwendet wird – und 1,0 ml Wasser (5.2.2.2) werden in ein Röhrchen pipettiert. Es wird 1,0 ml Validierungssuspension (N_V) (5.4.1.5) zugegeben. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Röhrchen wird für 5 min $\pm$ 10 s in ein auf (21,5 $\pm$ 3,5) °C eingestelltes Wasserbad gestellt. Unmittelbar vor dem Ende dieser Zeit wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

Nach Ablauf dieser Zeit wird eine 1,0-ml-Probe dieses Gemischs *B* als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft [5.5.2.2 f)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.5.

5.5.2.4 Verfahrensvalidierung *C* — Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens

Die folgende Prüfung darf weggelassen werden, wenn eine valide Verfahrensvalidierung *C* entsprechend den Prüfungen der Phase 2, Stufe 1 (siehe EN 14885) durchgeführt wurde. Diese Prüfung muss nur einmal vor der Prüfung selbst (5.5.2.2) für jeden Prüforganismus nach 5.5.1.2 durchgeführt werden.

8,8 ml des Neutralisationsmediums – das auch in der Prüfung (5.5.2.2) verwendet wird – werden in ein Röhrchen pipettiert und 0,2 ml Produktprüflösung nur der höchsten in der Prüfung verwendeten Konzentration (5.5.2.2) werden hinzugefügt. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)] und das Röhrchen wird für 5 min $\pm$ 10 s in ein auf (21,5 $\pm$ 3,5) °C eingestelltes Wasserbad gestellt. Bei Produkten mit einer Einwirkzeit von 10 min oder weniger beträgt die Neutralisationszeit 10 s $\pm$ 1 s anstelle von 5 min $\pm$ 10 s. Es wird 1,0 ml Validierungssuspension (N_V) (5.4.1.5) zugegeben. Die Stoppuhr wird bei Beginn der Zugabe in Gang gesetzt, es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Das Röhrchen wird für 30 min $\pm$ 1 min in ein auf (21,5 $\pm$ 3,5) °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 dieses Gemischs *C* als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft [5.5.2.2 f)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.5.

ANMERKUNG 1 Die Menge der Produktprüflösung wird als die Höchstmenge je Prüffeld berechnet (25 cm² von 540 cm² abgewischter Oberfläche sind 4,6 %). 4,6 % von 2,0 ml Produktprüflösung (die nach dem Wischen höchstens auf der Oberfläche verbleiben) sind etwa 0,1 ml und je 10 ml Neutralisationsmedium (der Zahlenwert ist zu verdoppeln, wenn in der Prüfung nur 5 ml Neutralisationsmedium verwendet werden). Da die Freisetzung eines beliebigen Produkts höchstens 12,5 % beträgt, ist die Höchstmenge je Prüffeld und 10 ml Neutralisationsmedium 0,2 ml.

ANMERKUNG 2 Die Belastungssubstanz wurde nicht berücksichtigt, da die Menge je Prüffeld höchstens 0,000 23 ml (4,6 % von 0,005 ml, die auf Prüffeld 1 aufgebracht und dann über 540 cm² verteilt werden) beträgt und somit vernachlässigbar ist. Außerdem wird erwartet, dass die Belastungssubstanz die Wirkung des Neutralisationsmediums unterstützt. Da die Belastungssubstanz bei der Validierung *C* nicht verwendet wird, ist die Einwirkzeit *t* ebenfalls nicht von Bedeutung.

Wenn kein Neutralisationsmedium gefunden werden kann, das in der Lage ist, innerhalb der festgelegten Zeit von 5 min (oder 10 s bei bestimmten Produkten) zu neutralisieren, kann die Neutralisationszeit erhöht werden. Die zusätzliche Zeit, die zur Neutralisation erforderlich ist, muss bei der Einwirkzeit in 5.5.2.2 eingerechnet werden.

5.5.2.5 Bebrütung und Auszählung des Prüfgemischs

- a) Die Platten werden bei Bakterien 20 h bis 24 h, bei *Candida albicans* und/oder *Aspergillus brasiliensis* 40 h bis 48 h und bei Mykobakterien 21 Tage bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die (aus irgendeinem Grund) nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt und die Anzahl der KBE wird bestimmt. Danach werden die Platten weitere 20 h bis 24 h bebrütet (nicht bei *Candida albicans* und Mykobakterien). Platten, die keine gut voneinander abgesetzten KBE mehr aufweisen, dürfen nicht erneut ausgezählt werden. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt. Wenn sich die Anzahl erhöht hat, darf nur die höhere Zahl für die weitere Auswertung verwendet werden.
- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der KBE aufgezeichnet, aber für alle KBE-Zahlen über 330 (bei Bakterien, Mykobakterien), 165 (bei Hefen) bzw. 55 (bei Schimmelpilzen) wird entsprechend > 330 , > 165 bzw. > 55 aufgezeichnet; die V_c -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahl der KBE/ml in den Prüfgemischen von N_a und N_W wird nach den in 5.6.2.3, 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 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen

5.6.1.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen und Prüfgemische

N und N_V stellen die Anzahl der Zellen je ml in den Bakterien-, Hefe-, Pilz- und/oder Mykobakteriensuspensionen dar, N_a steht für die Anzahl der Zellen (der überlebenden Keime) je ml bei dem bakteriziden, levuroziden, fungiziden, tuberkuloziden oder mykobakteriziden Prüfgemisch, N_W steht für die Anzahl der Zellen je ml Prüfgemisch beim Kontrollversuch mit Wasser. B (Kontrolle des Neutralisationsmediums) und C (Verfahrensvalidierung) sind die verschiedenen Kontrollprüfgemische.

N_{V0} , N_a sowie B und C sind die Anzahlen der je ml oder je 25 cm^2 ausgezählten KBE in den verschiedenen Prüfgemischen nach Tabelle 2.

Tabelle 2 — Anzahl der je ml oder je 25 cm^2 in den verschiedenen Prüfgemischen ausgezählten KBE

	Anzahl der KBE je ml in den Bakterien-, Hefe-, Pilz- und Mykobakteriensuspensionen	Anzahl der KBE je 25 cm^2 auf dem Prüffeld 1, D_{c0} sofort nach der Trocknung (Zeit 0) und D_{ct} nach der Trocknung und am Ende der Einwirkzeit (Zeit t); Bei N_{V0} Anzahl der KBE je ml im Prüfgemisch zu Beginn der Einwirkzeit (Zeit 0)	Anzahl der überlebenden Zellen auf den Prüffeldern 1 bis 4 je 25 cm^2 am Ende der Einwirkzeit t und je ml nach 5 min (B) oder 30 min (C)
Prüfung	N Prüfsuspension	$D_{c0} (= N/22,22)$ $D_{ct} (= N/22,22)$	N_a, N_W (vor der Neutralisation)
Kontrollen	N_V Validierungssuspension	$N_{V0} (= N_V/10)$	B, C

5.6.1.2 V_c -Werte

Alle Versuchsdaten werden im Bericht als V_c -Werte angegeben:

- beim Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (Prüfung und Kontrollen) ist ein V_c -Wert die Anzahl der je 1,0 ml Probe gezählten KBE.

5.6.2 Berechnung

5.6.2.1 Allgemeines

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

5.6.2.2 Bestimmung der V_c -Werte

Die V_c -Werte werden wie folgt bestimmt.

- a) Die üblichen Grenzwerte für die Auszählung von KBE auf Agarplatten liegen zwischen 15 und 300 KBE. In dieser Europäischen Norm ist eine Abweichung von 10 % zulässig, so dass die Grenzwerte 14 und 330 KBE betragen. Für die Felder 1 bis 4 sind auch Werte < 14 annehmbar, wenn kein höherer Zählwert vorliegt.

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, und daher können nachfolgende Berechnungen zu falschen Ergebnissen führen. Der untere Grenzwert bezieht sich nur auf die Probe (und nicht notwendigerweise auf die Keimzahl auf einer Platte), z. B. ergeben drei Platten je 1 ml Probe mit 3 KBE, 8 KBE und 5 KBE einen V_c -Wert von 16. Der obere Grenzwert (330) spiegelt die Ungenauigkeit beim Zählen zusammenfließender KBE wider und die Wachstumshemmung durch Erschöpfung der Nährsubstanzen. Er bezieht sich nur auf die Auszählung auf einer Platte und nicht notwendigerweise auf die Probe.

- b) Für die Auszählung der Prüfsuspension N (5.4.1.6), der Validierungssuspension N_V (5.4.1.6) und für alle Auszählungen des Verfahrens (5.5.2) werden die V_c -Werte nach der Anzahl der je 1 ml Probe verwendeten Platten (5.6.1.2) bestimmt und aufgezeichnet.

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

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

Wenn ein V_c -Wert kleiner als 14 ist und kein anderer Wert > 14 vorliegt, wird die Zahl angegeben und mit dem tatsächlichen V_c -Wert gerechnet.

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

5.6.2.3 Berechnung von N

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

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 gewichteter Mittelwert der Keimzahl nach folgender Gleichung berechnet:

$$N = \frac{c}{(n_1 + 0,1n_2) 10^{-7}} \quad (1)$$

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_c -Werte;
 n_1 die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung, d. h. 10^{-7} , berücksichtigten V_c -Werte;
 n_2 die Anzahl der bei der stärkeren Verdünnung, d. h. 10^{-8} , berücksichtigten V_c -Werte;