

DIN EN 16616



ICS 11.080.20

Entwurf

Einsprüche bis 2021-01-27
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 16616:2015-10

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Chemothermische Wäschedesinfektion –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche und Englische Fassung prEN 16616:2020**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Chemical-thermal textile disinfection –
Test method and requirements (phase 2, step 2);
German and English version prEN 16616:2020

Désinfectants chimiques et antiseptiques –
Désinfection thermochimique du textile –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2);
Version allemande et anglaise prEN 16616:2020

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2020-11-27 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 Saatwinkler Damm 42/43, 13627 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 108 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16616:2020) 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 16616:2015-10 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) den Anwendungsbereich an den Anwendungsbereich der WG 1 angepasst;
- b) in Abschnitt 4 die Anforderungen für die Tests der Phase 2, Stufe 1 gestrichen;
- c) in 5.2.2.4 Wasser für die Prüfung und die Referenzkontrolle hinzugefügt;
- d) das Beispiel für Waschmaschinen aus 5.3.2.18 der früheren Fassung in den neuen Anhang D „Beispiel einer Waschmaschine“ aufgenommen;
- e) das Gerät Potter S 1 hinzugefügt (5.3.2.22);
- f) 5.4.3.1 bis 5.4.3.3 an andere aktuelle Normen angepasst;
- g) die Beschreibung der Neutralisation (5.5.1.2) neu formuliert, ein Verweis auf die Tests der Phase 2, Stufe 1 hinzugefügt;
- h) in 5.4.3.1 und 5.4.3.2 eine Information über die Verwendung eines Spektrophotometers zur Zählung der Zellzahlen von Mykobakterien hinzugefügt (ANMERKUNG);
- i) Dokumentation und Begründung zur Wahl des Neutralisationsmittels im Prüfbericht (5.5.1.2, 5.10) aufgenommen;
- j) eine Referenzkontrolle hinzugefügt (5.5.2.3);
- k) RII gestrichen (5.5.2.5);
- l) in 5.6.1.1 die Tabelle korrigiert und an die aktuellen Prüfungen angepasst;
- m) in 5.6.2.1 zwei Absätze hinzugefügt (bisher 5.6.2.3);
- n) in 5.6.2.2.2 die V_c -Werte pro Träger ausgedrückt (bisher pro ml);
- o) in 5.6.2.3 die Berechnung von N und N_0 hinzugefügt, die Formel korrigiert;

- p) in 5.6.2.4 die Berechnung in Werte pro Träger geändert, die Formel korrigiert und der gewichtete Mittelwert in allen Berechnungen hinzugefügt;
- q) in 5.6.2.4 die Anforderungen für N_w korrigiert;
- r) in 5.6.2.6 die Berechnung geändert: nur N_w wird berechnet, RI wird nicht gezählt und RII , B und C werden in der Norm nicht mehr verwendet;
- s) das Beispiel in 5.7.2 korrigiert;
- t) 5.7.3 an die Prüfungen in der aktuellen Version angepasst;
- u) Anhang A an EN 12353 angepasst;
- v) Anhang C korrigiert;
- w) Anlage E „Zubereitung von hartem Wasser zur Verwendung im Prüf- und Referenzverfahren“ hinzugefügt;
- x) Anhang F „Beispiel für einen Prüfbericht“ hinzugefügt;
- y) Anhang G „Beispiel für das Beladen der Waschmaschine“ hinzugefügt;
- z) die Norm redaktionell überarbeitet, nicht mehr benötigte Abschnitte der früheren Ausgabe gestrichen (5.2.2.6, 5.4.2, 5.5.1.4 sowie 5.5.2.6 bis 5.5.2.8).

— Leerseite —

<i>Titel de:</i>	Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Chemothermische Wäschedesinfektion — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)
<i>Titel en:</i>	Chemical disinfectants and antiseptics — Chemical-thermal textile disinfection — Test method and requirements (phase 2, step 2)
<i>Titel fr:</i>	Désinfectants chimiques et antiseptiques — Désinfection thermochimique du textile — Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	8
4 Anforderungen	9
5 Prüfverfahren	9
5.1 Kurzbeschreibung	9
5.2 Materialien und Reagenzien	10
5.2.1 Prüforganismen	10
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	11
5.3 Apparate und Glasgeräte	14
5.3.1 Allgemeines	14
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	14
5.4 Herstellung der Prüforganismus-Suspensionen (Prüfsuspension)	17
5.4.1 Allgemeines	17
5.4.2 Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüforganismen	17
5.4.3 Gebrauchskultur und Prüforganismen	17
5.4.4 Prüfsuspension (N)	18
5.4.5 Beimpfung der Keimträger	22
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der mikrobiziden Wirkung des Produkts	22
5.5.1 Allgemeines	22
5.5.2 Verfahren	24
5.6 Prüfdaten und Berechnung	26
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen	26
5.6.2 Berechnung	27
5.7 Verifizierung des Verfahrens	30
5.7.1 Allgemeines	30
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	30
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	30
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	31
5.8.1 Keimreduktion	31
5.8.2 Wiederholungen	31
5.9 Interpretation der Ergebnisse – Schlussfolgerung	31
5.9.1 Allgemeines	31
5.9.2 Mikrobizide Wirkung	31
5.10 Prüfbericht	32
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	34
Anhang B (informativ) Geeignete Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten	36
B.1 Allgemeines	36
B.2 Neutralisationsmedien	36
B.3 Dem Agar für die Keimzählung zugesetzte Neutralisationsmedien	37
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung des Prüfverfahrens	38

Anhang D (informativ) Beispiel für die Spezifikation einer Waschmaschine.....	39
Anhang E (informativ) Vorbereitung von Wasser standardisierter Härte für die Verwendung im Prüf- und Referenzverfahren.....	40
Anhang F (informativ) Prüfbericht (Beispiel)	41
Anhang G (informativ) Beispiel für die Beladung der Waschmaschine	48
Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Sicherheits- und Leistungsanforderungen der abzudeckenden Verordnung (EU) 2017/745	51
Literaturhinweise.....	53

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 16616:2020) 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 16616:2015 ersetzen.

Dieses Dokument wurde im Rahmen eines Normungsauftrages erarbeitet, den die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelsassoziation CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien.

Zum Zusammenhang mit EU-Richtlinien siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokuments ist.

Das Dokument wurde überarbeitet, um es an den aktuellen Stand der Wissenschaft anzupassen, um Fehler und Mehrdeutigkeiten zu korrigieren, um es hinsichtlich Gliederung und Formulierungen an andere bereits bestehende oder in Vorbereitung befindliche Prüfverfahren von CEN/TC 216 anzugleichen und die Lesbarkeit und Verständlichkeit der Norm zu verbessern. Nachfolgend sind die wesentlichen technischen Änderungen gegenüber der letzten Ausgabe aufgelistet:

- der Anwendungsbereich wurde an den Anpassungsbereich der WG 1 angepasst;
- in Abschnitt 4 wurden die Anforderungen an Prüfungen der Phase 2, Stufe 1 gelöscht;
- in 5.1 wurden einige redaktionelle Änderungen vorgenommen;
- in 5.2.2.4 wurde Wasser für die Prüfung und Referenzkontrolle hinzugefügt;
- die alte Fassung von 5.2.2.6 wurde gelöscht, weil sie in der Norm nicht verwendet wurde;
- das Beispiel für eine Waschmaschine in 5.3.2.18 der vorherigen Fassung wurde in Anhang D verschoben;
- der Homogenisator S 1 nach Potter-Elvehjem wurde hinzugefügt (5.3.2.22);
- 5.4.3.1, 5.4.3.2 und 5.4.3.3 wurden an andere aktuelle Normen angepasst;
- 5.4.4 wurde überarbeitet (redaktionelle Änderungen und bessere Beschreibung);
- die Beschreibung der Neutralisation (5.5.1.2) wurde neu formuliert, eine Verweisung auf Prüfungen der Phase 2, Stufe 1 wurde hinzugefügt;
- in 5.4.3.1 und 5.4.3.2 wurde die Angabe zur Verwendung eines Spektrophotometers zur Bestimmung der Zellzahlen von Mykobakterien hinzugefügt (ANMERKUNG);
- in 5.4.5 wurden einige redaktionelle Änderungen vorgenommen;
- 5.4.2 (alte Fassung) wurde gelöscht;
- die Wahl des Neutralisationsmediums (5.5.1.2) muss im Prüfbericht dokumentiert und begründet werden;
- 5.5.1.4 der alten Fassung wurde gelöscht, da nicht mehr erforderlich;

- in 5.5.2.1 wurde eine neue ANMERKUNG hinzugefügt;
- in 5.5.2.2 wurden eine ANMERKUNG und die Verweisung auf Anhang G hinzugefügt; c) wurde gelöscht, da nicht mehr erforderlich;
- die Referenzkontrolle wurde hinzugefügt (5.5.2.3);
- RII wurde gelöscht (5.5.2.5);
- 5.5.2.6, 5.5.2.7 und 5.5.2.8 wurden gelöscht, eine Verweisung auf Prüfungen der Phase 2, Stufe 1 wurde hinzugefügt;
- in 5.5.2.9 wurden einige redaktionelle Änderungen vorgenommen;
- in 5.6.1.1 wurde die Tabelle korrigiert und an die aktuellen Prüfungen angepasst;
- in 5.6.2.1 wurden zwei Absätze hinzugefügt (zuvor 5.6.2.3);
- in 5.6.2.2 werden die V_c -Werte je Keimträger angegeben (zuvor je ml);
- in 5.6.2.3 wurde die Berechnung von N und N_0 hinzugefügt, die Gleichung wurde korrigiert;
- in 5.6.2.4 wurde die Berechnung zu Werten je Keimträger geändert, die Gleichung wurde korrigiert und der gewichtete Mittelwert wurde in alle Berechnungen neu aufgenommen;
- in 5.6.2.4 wurden die Anforderungen für N_w korrigiert;
- 5.6.2.5 wurde gelöscht, eine Verweisung auf die Prüfung der Phase 2, Stufe 1 wurde hinzugefügt;
- die Berechnung in 5.6.2.6 wurde geändert: nur N_w wird berechnet, RI wird nicht ausgezählt und RII, B und C werden in der Norm nicht mehr verwendet;
- das Beispiel in 5.7.2 wurde korrigiert;
- 5.7.3 wurde an die Prüfungen in der aktuellen Version angepasst;
- in 5.8.1 wurden einige redaktionelle Änderungen vorgenommen;
- in 5.10 wurde ein neuer Prüfbericht hinzugefügt;
- Anhang A wurde an EN 12353 angepasst;
- Anhang C wurde korrigiert;
- Hinzufügung eines neuen Anhangs D „Beispiel einer Waschmaschine“;
- Hinzufügung eines neuen Anhangs E „Vorbereitung von Wasser standardisierter Härte für die Verwendung im Prüf- und Referenzverfahren“;
- Hinzufügung eines neuen Anhangs F „Beispiel eines Prüfberichts“;
- Hinzufügung eines neuen Anhangs G „Beispiel für die Beladung der Waschmaschine“.

Die bei dieser Überarbeitung vorgenommenen Änderungen wirken sich nicht auf die Prüfergebnisse aus, die unter Anwendung der Version EN 16616:2015 erzielt wurden. Diese Ergebnisse sind weiterhin gültig, es sei denn die Reduktion der Referenzkontrolle N_w war größer als 3 lg-Einheiten und/oder und die Berechnung der Ergebnisse erfolgte auf die falsche Weise der Version 2015.

Einleitung

Dieses Dokument legt eine Keimträgerprüfung zur Feststellung, ob ein Einzelwaschmittel zur Desinfektion oder eine Kombination von Produkten zur Behandlung von kontaminierten Textilien die notwendige mikrobizide Wirkung aufweist oder nicht, fest. Dieses Dokument ist ausschließlich dafür vorgesehen, den desinfektionsbezogenen Teil des Waschprozesses zu validieren.

Diese Laboratoriumsprüfung berücksichtigt praktische Anwendungsbedingungen des Produkts, zu denen die Einwirkzeit, die Temperatur, die Prüforganismen und die Belastungssubstanzen gehören, d. h. Bedingungen, die dessen Wirkung in praktischen Situationen beeinflussen könnten.

Die Bedingungen sollen allgemeinen Ansprüchen genügen und einen Vergleich zwischen mikrobiologischen Laboratorien und Arten von Wasch- und Desinfektionsmitteln ermöglichen. Jede durch diese Prüfung ermittelte wirksame Dosierung des chemischen Desinfektionsmittels entspricht ausschließlich den gewählten Prüfbedingungen. Wenn die tatsächlichen Bedingungen schwanken, sind zur Bestimmung der wirksamen Dosierung zusätzliche Prüfungen in mikrobiologischen Laboren notwendig. Für Gebrauchsanweisungen sind die Hersteller von Wasch- oder Desinfektionsmitteln verantwortlich.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die mikrobizide Wirkung eines festgelegten Desinfektionsprozesses zur Behandlung von kontaminierten Textilien fest. Dieses Verfahren wird unter Einsatz einer in 5.3.2.18 festgelegten Waschmaschine durchgeführt und bezieht sich auf den Desinfektionsschritt ohne Vorwaschen. Dieses Verfahren ist nicht auf bestimmte Arten von Textilien beschränkt. Die Anweisungen des Lieferanten werden als ausreichend angenommen, um die vollständige Durchführung (z. B. Dosierung des Desinfektionsmittels in einer beliebigen Waschphase, z. B. Hauptwaschgang, Spülen, Desinfektion bei 40 °C) des in diesem Dokument beschriebenen Verfahrens zu ermöglichen.

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

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

und könnten auch am Arbeitsplatz und im häuslichen Bereich gegeben sein.

Eingeschlossen sein könnten auch Einrichtungen wie Wäschereien und Küchen, die der direkten Versorgung der Patienten dienen.

Das beschriebene Verfahren dient der Bestimmung der Wirksamkeit eines Produkts oder einer Kombination von Produkten unter den Bedingungen, unter denen es/sie angewendet wird/werden. Es ist eine Laborprüfung der Phase 2, Stufe 2, der die Bedingungen der Produktanwendung simuliert.

ANMERKUNG Dieses Verfahren entspricht einer Prüfung der Phase 2, Stufe 2 (siehe EN 14885).

EN 14885 legt im Einzelnen die Beziehungen der verschiedenen Prüfungen untereinander und 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 Prüforganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

EN 13624, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

EN 13727, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

EN 14348, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der mykobakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich einschließlich der Instrumentendesinfektionsmittel — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

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:

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

3.1

Flottenverhältnis

Verhältnis der Masse der trockenen Textilien in Kilogramm zum Volumen der Waschflotte in Liter (m/V)

3.2

Desinfektionsprozess

Prozess, der die praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts zur Desinfektion von Textilien berücksichtigt, zu denen die Einwirkzeit, die Temperatur, die Prüforganismen und die Belastungssubstanzen gehören

3.3

Behandlung von kontaminierten Textilien

Handhabung von Textilien in Übereinstimmung mit dem Desinfektionsprozess, um desinfizierte Textilien zu erhalten

4 Anforderungen

Die Prüfergebnisse müssen den grundlegenden Grenzwerten (siehe 5.7.3) entsprechen.

Tabelle 1 — Mindestprüfbedingungen und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Temperatur zur Wäschedesinfektion < 60 °C	Temperatur zur Wäschedesinfektion ≥ 60 °C
Prüforganismus	<i>E. coli</i> K12 <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. aureus</i> <i>C. albicans</i>	<i>E. faecium</i> ^b
Zusätzlicher Prüforganismus Fungizide Wirkung Tuberkulozide Wirkung Mykobakterizide Wirkung	<i>A. brasiliensis</i> <i>M. terrae</i> <i>M. terrae</i> und <i>M. avium</i>	
Temperatur	wie vom Hersteller empfohlen und < 60 °C ^a	wie vom Hersteller empfohlen und ≥ 60 °C ^a
Einwirkzeit	wie vom Hersteller empfohlen	wie vom Hersteller empfohlen
Belastungssubstanz	Schafsblut	Schafsblut
ANMERKUNG Die Einbeziehung von Bakteriensporen und Viren wurde erörtert. Für die technische Durchführbarkeit ist eine Weiterentwicklung notwendig.		
^a Die Temperatur und die Einwirkzeit müssen auf der Grundlage der praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts ausgewählt werden und liegen in der Verantwortung des Herstellers.		
^b Dies schließt die bakterizide, levurozide, fungizide, tuberkulozide und mykobakterizide Wirkung mit ein.		

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Die Keimträger aus Baumwollgewebe (5.3.2.16) werden mit einer Prüfsuspension von Mikroorganismen in defibriniertem Schafsblut (5.2.2.12) kontaminiert. Nach dem Trocknen werden die Keimträger in Baumwolltücher überführt und anschließend wird der Desinfektionsprozess in der Waschmaschine bei Prüftemperaturen entweder $t < 60\text{ °C}$ oder $t \geq 60\text{ °C}$ durchgeführt. Der Prozess bezieht sich auf den Desinfektionsschritt ohne Vorwäsche. Am Ende des Desinfektionsschrittes des Verfahrens sind die Tücher mit den Keimträgern zu entnehmen. Jeder Keimträger wird in ein getrenntes Röhrchen mit Neutralisationsmedium (5.2.2.11) und Glasperlen (5.3.2.11) überführt. Die Mikroorganismen sollten durch Schütteln von den Keimträgern zurückgewonnen werden. Die Anzahl der überlebenden Mikroorganismen in jeder Probe wird bestimmt und die (Keim-)Reduktionsrate berechnet.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

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

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442;
- *Escherichia coli* (K12) NCTC 10538;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538;
- *Enterococcus hirae* ATCC 10541;
- *Enterococcus faecium* ATCC 6057.

Die levurozide/fungizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden Prüforganismen zu bewerten:

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

Die tuberkulozide/mykobakterizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden Prüforganismen zu bewerten:

- *Mycobacterium terrae* ATCC 15755;
- *Mycobacterium avium* ATCC 15769.

ANMERKUNG Für entsprechende Stammnummern in einigen anderen Kultursammlungen siehe Anhang A.

Die geforderten Bebrütungstemperaturen für diese Prüforganismen betragen $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.3) [*C. albicans* und *A. brasiliensis*: $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$]. Die gleiche Temperatur ist für alle Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrollen und Validierung anzuwenden.

Wenn zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, sind diese unter den im Prüfbericht vermerkten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre und Medien) zu bebrüten. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den festgelegten Stämmen/Arten entsprechen, ist deren Eignung zur Bereitstellung der geforderten Inokula zu verifizieren. Wenn diese zusätzlichen Prüforganismen 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.

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

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 das Wachstum der Prüforganismen wirken.

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

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

5.2.2.2 Wasser zur Herstellung von Medien

Das Wasser muss frisch destilliertes und darf nicht nur entmineralisiertes Wasser sein. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

ANMERKUNG 1 Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. für die Herstellung der Kulturmedien benötigt wird und anschließend sterilisiert wird.

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

5.2.2.3 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte für Validierungsprüfungen

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 Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, könnte das zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall ist mit Wasser (5.2.2.2) unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bei 2 °C bis 8 °C bis zu einem Monat aufbewahren.
- Herstellung von Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in Wasser (5.2.2.2) 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) bei 2 °C bis 8 °C 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 gegeben werden mit Hilfe einer Pipette (5.3.2.9) 6,0 ml Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B. Nach Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, $7,0 \pm 0,2$ 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.

5.2.2.4 Wasser für die Prüfung und Referenzkontrolle

Es ist Wasser von Trinkwasserqualität erforderlich (das Wasser sollte bei 36 °C und 22 °C weniger als 100 KBE/ml Bakterien enthalten). Die Wasserhärte muss im Laborprotokoll aufgezeichnet und im Prüfbericht dokumentiert werden. Die endgültige Wasserhärte muss mindestens 4 mmol/l Erdalkalitionen (Mg^{2+} und Ca^{2+}) betragen. Die Temperatur des zulaufenden Wassers sollte zwischen 12 °C und 20 °C liegen.

ANMERKUNG 1 In Annex E wird beschrieben, wie die Wasserhärte für die Prüfung und das Referenzverfahren mittels Lösung A und Lösung B aus 5.2.2.3 eingestellt wird. Die Wasserhärte lässt sich mit Hilfe von handelsüblichen Test-Kits messen.

ANMERKUNG 2 Zur Dokumentation der Wasserhärte können Daten des Wasserversorgers verwendet werden.

5.2.2.5 Trypton-Soja-Agar (TSA)

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

Wenn Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auftreten, könnte es erforderlich sein, dem TSA Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält eine Anleitung zu Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen.

5.2.2.6 Trypton-Soja-Bouillon (TSB)

Trypton, pankreatisch verdautes Casein	15,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	5,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 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 Mediums, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $7,2 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.7 Hirn-Herz-(Glucose)-Agar (en: Brain Heart Infusion; BHI Agar)

BEISPIEL

Hirn-Herz-Aufguss (brain heart infusion)	12,5 g
Rinderherzaufguss	5,0 g
Proteose-Pepton	10,0 g
Glucose	2,0 g

Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat	2,5 g
Agar	10,0 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 Mediums, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $7,2 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.8 Malzextrakt-Agar (MEA)

Malzextrakt	30,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	3,0 g
Agar	15,0 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 Mediums, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $5,6 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.9 Middlebrook-Cohn-7H10-Medium einschließlich 10 % OADC (7H10)

Middlebrook-7H10-Agar	19,0 g
Glycerol	5,0 ml
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 900,0 ml

Zur vollständigen Auflösung wird bis zum Sieden erhitzt. Nach 10 min Sterilisation im Autoklaven [5.3.2.1 a)] wird auf $50 ^\circ\text{C}$ bis $55 ^\circ\text{C}$ abgekühlt. Unter aseptischen Bedingungen werden 100 ml Middlebrook-Medium mit OADC-Anreicherung zugegeben. Der endgültige pH-Wert des Mediums muss, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $6,6 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.10 Verdünnungsmittel

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, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.11 Neutralisationsmedium

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

5.2.2.12 Steriles defibriniertes Schafsblut

Das sterile defibrinierte, aus mehr als einem Schaf gewonnene Schafsblut (aseptische Blutentnahme und Vorbereitung) kann von einem kommerziellen Lieferanten bezogen werden.

5.3 Apparate 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 Autoklaven [5.3.2.1 a)];
- b) durch trockene Hitze im Heißluftsterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²

und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation (feuchte und trockene Hitze)

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf (20 ± 1) °C, (36 ± 1) °C oder (37 ± 1) °C, (45 ± 1) °C (um das Medium im Fall des Gussplattenverfahrens im verflüssigten Zustand zu halten) und zusätzliche Prüftemperaturen ± 1 °C; Temperaturen bis (70 ± 1) °C müssen einstellbar sein.

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf (30 ± 1) °C oder (36 ± 1) °C. Bei allen Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrollen 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 (20 ± 1) °C.

Zur Messung des pH-Wertes der Agarmedien (5.2.2.5 bis 5.2.2.9) sollte eine Einstichelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

5.3.2.5 Stoppuhr, eine digitale Stoppuhr wird empfohlen.

5.3.2.6 Schüttelgeräte

- a) Elektromechanisches Rührwerk, z. B. Vortex®-Mischer³;
- b) Orbitalschüttelgerät (mit 400 min^{-1}).

² Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

³ Vortex®-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

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 µm für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.3).

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 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 Zentrifuge (3 000 g_N).

5.3.2.14 Röhrchen mit Schraubverschluss und konischem Boden (mit einem Fassungsvermögen von 50 ml, Durchmesser: etwa 28 mm).

5.3.2.15 Zylinderförmiges Glasfläschchen mit Schraubgewinde (mit einem Fassungsvermögen von etwa 15 ml bis 50 ml) für die Rückgewinnung der Prüforganismen aus den Keimträgern.

5.3.2.16 Keimträger aus Baumwolle, 1 cm²: Die Keimträger werden unter Verwendung von Standardbaumwollgewebe hergestellt, das sorgfältig in 1 cm² große Stücke geschnitten, dreimal in doppelt destilliertem Wasser gekocht und im Autoklaven [siehe 5.3.2.1 a)] sterilisiert wurde. Aus praktischen Gründen werden die 1-cm²-Keimträger während des Prüfverfahrens in der Waschmaschine in die Taschen eines größeren Baumwolltuchs gegeben.

ANMERKUNG 1 Die Aufnahme der Prüfsuspension kann verbessert werden, wenn die Keimträger nach dem Autoklavieren nicht getrocknet werden.

Flächengewicht:	(170 ± 10) g/m ² (tatsächlich 160 g/m ²)
-----------------	---

Faserstoff (Kette und Schuss):	Baumwolle, doppelt gerippt
--------------------------------	----------------------------

Faserlänge (Kette und Schuss):	mindestens 27 mm
--------------------------------	------------------

Garnfeinheit (Kette und Schuss):	(295 ± 10) dtex
----------------------------------	-----------------

Garndrehung (Kette und Schuss):	Z-Drehung (700 ± 25) t/m
---------------------------------	--------------------------

Bindung:	Leinwandbindung 1
----------	-------------------

Fadendichte:	jeweils 270 Fäden/dm
--------------	----------------------

Das Baumwollkontrollgewebe muss gebleicht, ohne Appretur und darf nicht optisch aufgehellt sein.

Nach drei Waschvorgängen sollte die Höchstzugkraft, nass, in Kettrichtung (63 ± 5) daN betragen.

ANMERKUNG 2 Nach DIN 53919-1 [3] geprüfetes Baumwollgewebe erfüllt die Anforderungen.

5.3.2.17 Ballastbeladung der Waschmaschine und Vorbereitung der Ballastbeladung

Als Ballastbeladung sind Textilien aus Polycotton (65 % Polyester/35 % Baumwolle) zu verwenden. Für spezielle Zwecke können Textilien aus Baumwolle (100 %) verwendet werden.

ANMERKUNG 1 Die gebundene Flotte ist bei reiner Baumwolle höher als bei Polycotton.

Menge der Ballastbeladung: 70 % $\pm$ 10 % des maximalen Fassungsvermögens (in kg).

Die Ballastbeladung sollte 30 min bei 80 °C bis 90 °C ohne Zusätze gewaschen werden, gefolgt von mindestens 3 Spülgängen und einer Sterilisation im Autoklaven vor dem ersten Gebrauch.

Die Ballastbeladung sollte in nicht mehr als 100 Waschzyklen (einschließlich Vorbereitungs- und Desinfektionszyklen) verwendet werden.

Nach der Prüfung der Desinfektion sollte die Ballastbeladung 30 min bei 80 °C bis 90 °C gewaschen werden, gefolgt von mindestens 5 Spülgängen (jeweils mindestens 5 min) vor dem Gebrauch.

ANMERKUNG 2 Die Ballastbeladung kann zusätzlich im Autoklaven sterilisiert werden.

ANMERKUNG 3 Wenn im letzten Spülgang Schaum vorliegt, ist möglicherweise zusätzliches Spülen notwendig.

5.3.2.18 Waschmaschine und Vorbereitung der Waschmaschine

Durch die Waschmaschine und zusätzliche Ausrüstung müssen die folgenden Spezifikationen sichergestellt werden:

- a) die Aufheizzeit von 40 °C bis zum Erreichen von 60 °C ist $\leq$ 15 min;
- b) thermostatische Temperaturregelung $\pm 0,5$ °C im Temperaturbereich von 30 °C bis 90 °C;
- c) die Einschalttemperatur liegt ≤ 4 °C unterhalb der Abschalttemperatur, Genauigkeit beim Abschalten ± 1 °C;
- d) der Zeitgeber muss programmierbar sein;
- e) Ausrüstung für die Kalibrierung der Wasserzufuhr, z. B. ein durchsichtiges Röhrchen zur Überprüfung des Wasserstands in der Waschmaschine;
- f) die getrennte Zugabe von Waschmittel und Desinfektionsmittel muss möglich sein. Eine Dosierungsmöglichkeit für pulverförmige und flüssige Tenside ist notwendig;
- g) es muss die Möglichkeit bestehen, die Programmfolge zu einem beliebigen Zeitpunkt zu unterbrechen und Proben zu entnehmen;
- h) Wasserzufuhr: die Wasserzufuhr sollte mit einer Toleranz von $\pm 0,5$ l oder $\pm 0,5$ kg geregelt werden (das kann zum Beispiel mit einem Wasserzähler oder einer Brückenwaage erreicht werden).

Es wird empfohlen, die Waschmaschine in einem klimatisierten Raum bei kontrollierten Umgebungsbedingungen mit einem Temperaturbereich von 20 °C bis 25 °C und einer relativen Luftfeuchte zwischen 40 % und 60 % aufzustellen.

Vor jedem Prüflauf sollte die Maschine einmal 30 min bei 80 °C bis 90 °C ohne Zusätze betrieben werden. Für die Vorbereitung der Waschmaschine wird keine Ballastbeladung benötigt.

Es wird empfohlen, während der Prüfläufe die entsprechenden Maschinenparameter aufzuzeichnen, um eine ordnungsgemäße Arbeitsweise der Maschine und des Prozesses sicherzustellen. Das schließt die Temperatur der Waschflotte, die Menge an zulaufendem Wasser, das Profil des Richtungswechsels und, wenn möglich, den Ein/Aus-Zustand des Heizelementes ein.

5.3.2.19 Frittenfilter mit einer Porenweite von 40 µm bis 100 µm (siehe ISO 4793).

5.3.2.20 Kulturkolben nach Roux oder gleichartige Kolben.

5.3.2.21 Glaswolle für die Filtration.

5.3.2.22 Homogenisator S 1 nach Potter-Elvehjem.

5.4 Herstellung der Prüforganismus-Suspensionen (Prüfsuspension)

5.4.1 Allgemeines

Für jeden Prüforganismus ist eine Prüfsuspension zur Durchführung der Prüfung herzustellen.

5.4.2 Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüforganismen

Die Prüforganismen und deren Stammkulturen sind nach EN 12353 herzustellen und aufzubewahren.

5.4.3 Gebrauchskultur und Prüforganismen

5.4.3.1 Bakterien

Um die Gebrauchskultur der Bakterien herzustellen, ist eine Subkultur von der Stammkultur durch Ausstrich auf mindestens etwa drei TSA-Platten (5.2.2.5) [*E. faecium*: es kann auch BHI (5.2.2.7) verwendet werden] anzulegen und bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ zu bebrüten (5.3.2.3).

Nach 18 h bis 24 h Bebrütung bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ wird aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise eine zweite Subkultur angelegt und für 18 h bis 24 h bebrütet. Aus dieser zweiten Subkultur darf auf gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden. Die zweite und (falls hergestellt) dritte Subkultur sind die Gebrauchskulturen.

Eine vierte Subkultur darf nicht verwendet werden.

5.4.3.2 Mykobakterien

Um die Gebrauchskultur der Mykobakterien herzustellen, ist eine Subkultur von der Stammkultur durch Ausstrich auf mindestens etwa drei 7H10-Platten (5.2.2.9) anzulegen und 21 Tage bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ zu bebrüten (5.3.2.3).

Die erste Kultur ist die Gebrauchskultur. Eine Subkultur darf nicht verwendet werden.

Im Fall von *M. terrae* ist es möglich, Keimträger mit einer Haltbarkeitsdauer von 12 Wochen herzustellen (Lagerungsbedingungen siehe 5.4.5). Zur Herstellung von 100 Keimträgern mit *M. terrae* sind 10 Petrischalen zu verwenden.

5.4.3.3 Hefe- und Schimmelpilze

***Candida albicans* (Hefepilz)**

Um die Gebrauchskultur von *Candida albicans* herzustellen, ist eine Subkultur von der Stammkultur durch Ausstrich auf MEA (5.2.2.8) anzulegen und bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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 (sofern angelegt) dritte Subkultur sind die Gebrauchskulturen.

Eine vierte Subkultur darf nicht verwendet werden.

Aspergillus brasiliensis (Schimmelpilz)

Um die Gebrauchskultur von *Aspergillus brasiliensis* herzustellen, ist eine Subkultur von der Stammkultur durch Ausstrich auf MEA (5.2.2.8) anzulegen und bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ zu bebrüten (5.3.2.3). Bei *Aspergillus brasiliensis* wird nur die erste auf MEA (5.2.2.8) in Kulturkolben nach Roux (5.3.2.20) gewachsene Subkultur verwendet und 7 Tage bis 9 Tage bebrütet. Es ist keine weitere Subkultivierung erforderlich.

Am Ende der Bebrütung müssen alle Kulturen eine dunkelbraune oder schwarze Oberfläche mit nur wenigen, kleinen weißen oder grauen Flecken aufweisen, siehe EN 13624.

5.4.4 Prüfsuspension (N)

5.4.4.1 Prüfsuspension von Bakterien

Zur Ernte der Bakterien werden 5 ml oder 10 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung in die Platten bzw. Kulturkolben nach Roux pipettiert und die Bakterien werden weggeschwemmt und resuspendiert. Bei Bedarf wird die Suspension mittels Filtration durch Glaswolle (5.3.2.21) gereinigt. Das Filtrat wird in aliquoten Anteilen in Röhrchen mit Schraubverschluss überführt und 15 min bei $3\,000\,g_N$ zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird entfernt und das Pellet wird mit einem geeigneten Volumen von 0,9 %iger NaCl-Lösung gemischt. Die Anzahl der Zellen in der Suspension muss mindestens $1,5 \times 10^9$ KBE/ml⁴ betragen.

Die Verwendung eines Spektrophotometers zur Bestimmung der Zellzahl wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, Küvette mit 10 mm optischer Weglänge). Jedes Laboratorium sollte deshalb für jeden Prüforganismus Kalibrierdaten erarbeiten, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte zwischen 2 200 und 2 400 zu finden sind. Um reproduzierbare Ergebnisse dieser Messung zu erreichen, ist es notwendig, die Prüfsuspension zu verdünnen, z. B. 1 + 9. Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

ANMERKUNG Zur Herstellung von 10 Keimträgern werden zwei Petrischalen oder ein Kulturkolben nach Roux benötigt.

Bei *P. aeruginosa* wird die Zentrifugierung bei $4\,700\,g_N$ empfohlen.

Um eine Prüfsuspension mit der geeigneten Anzahl an KBE/ml zu erhalten, wird erneut zentrifugiert und mit defibriniertem Schafsblut (5.2.2.12) im gleichen Volumen resuspendiert.

Eine Öseneinheit dieser Prüfsuspension wird auf einer geeigneten Agarplatte ausgestrichen und zur Kontrolle auf Reinheit bebrütet.

Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.10 bzw. das primär verwendete Kulturmedium) Verdünnungen von 10^{-7} und 10^{-8} hergestellt. Es wird durchgemischt [5.3.2.6 a)]. Von jeder Verdünnung wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft.

Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1-ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlter TSA (5.2.2.5) zugegeben [*E. faecium*: es kann auch BHI (5.2.2.7) verwendet werden].

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

Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in Anteile etwa gleicher Größe aufgeteilt und auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) von an der Oberfläche getrockneten TSA-Platten (5.2.2.5) ausgestrichen [*E. faecium*: es kann auch BHI (5.2.2.7) verwendet werden].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.5.

5.4.4.2 Prüfsuspension von Pilzen (N)

5.4.4.2.1 *Candida albicans*

Zur Ernte der Zellen werden 5 ml oder 10 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung in die Platten bzw. Kulturkolben nach Roux pipettiert und die Zellen werden weggeschwemmt und resuspendiert. Die Suspension wird in aliquoten Anteilen in Röhrchen mit Schraubverschluss überführt und 15 min bei 3 000 g_N zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird entfernt und das Pellet wird mit einem geeigneten Volumen von 0,9 %iger NaCl-Lösung gemischt. Die Anzahl der Zellen in der Suspension muss mindestens $1,5 \times 10^8$ KBE/ml betragen.

Die Verwendung eines Spektrophotometers zur Bestimmung der Zellzahl wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, Küvette mit 10 mm optischer Weglänge). Jedes Laboratorium sollte deshalb für jeden Prüforganismus Kalibrierdaten erarbeiten, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte zwischen 2 200 und 2 400 zu finden sind. Um reproduzierbare Ergebnisse dieser Messung zu erreichen, ist es notwendig, die Prüfsuspension zu verdünnen, z. B. 1 + 9. Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

Um eine Prüfsuspension mit der geeigneten Anzahl an KBE/ml zu erhalten, wird erneut zentrifugiert und mit defibriniertem Schafsblut (5.2.2.12) im gleichen Volumen resuspendiert.

Eine Öseneinheit dieser Prüfsuspension wird auf einer geeigneten Agarplatte ausgestrichen und zur Kontrolle auf Reinheit bebrütet.

Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.10) Verdünnungen von 10^{-6} und 10^{-7} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

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

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf (45 ± 1) °C abgekühlter MEA (5.2.2.8) zugegeben.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in Anteile etwa gleicher Größe aufgeteilt und auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) von an der Oberfläche getrockneten MEA-Platten (5.2.2.8) ausgestrichen.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.5.

5.4.4.2.2 *Aspergillus brasiliensis*

Der Verfahrensablauf zur Herstellung der Prüfsuspension mit *Aspergillus brasiliensis* ist wie folgt:

- a) Von der Gebrauchskultur (5.4.3.3) werden die Konidiosporen in 10 ml steriler 0,05 %iger (m/V) Polysorbat-80-Lösung in Wasser (5.2.2.2) suspendiert. Die Konidiosporen werden mit einem Stab oder Spatel aus Glas von der Oberfläche der Kultur abgelöst. Die Suspension wird in einen Kolben überführt und zusammen mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) mit der Hand eine Minute leicht geschüttelt. Die Suspension wird durch ein Frittenfilter (5.3.2.19) filtriert;

- b) Unmittelbar nach der Herstellung ist eine mikroskopische Untersuchung bei 400-facher Vergrößerung durchzuführen, um nachzuweisen:
- das Vorhandensein einer hohen Konzentration charakteristischer reifer Konidiosporen, d. h. stachelige Konidiosporen (im Gegensatz zu glatten Sporen). Siehe Bild 1 und Bild 2.

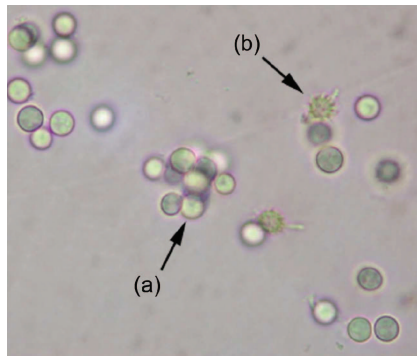


Bild 1 — Beobachtung von Konidiosporen unter dem Lichtmikroskop: Vorhandensein von glatten (a) und stacheligen Sporen (b) [ungeeignete (nicht verwendbare) Suspension]

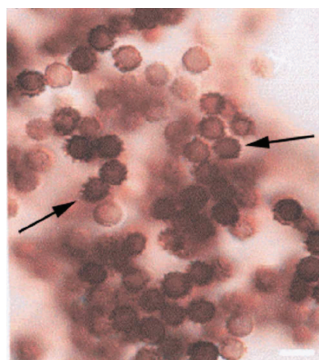


Bild 2 — Beobachtung von Konidiosporen unter dem Lichtmikroskop: Hohe Konzentration von charakteristischen reifen Sporen mit stacheligem Aussehen (geeignete Suspension)

- Sollten 75 % stachelige Konidiosporen nicht erreicht werden, könnte das auf den verwendeten *Aspergillus*-Stamm oder das Medium zurückzuführen sein. Deshalb ist ein anderer Stamm zu verwenden, vorzugsweise von einem anderen Lieferanten, und/oder ein anderes Medium probeweise zu verwenden;
- die nicht vorhandene Auskeimung von Konidiosporen (mindestens 10 Gesichtsfelder sind zu prüfen);
- wenn ausgekeimte Konidiosporen vorhanden sind, ist die Suspension zu verwerfen;
- das Nichtvorhandensein von Myzelbruchstücken (mindestens 10 Gesichtsfelder sind zu prüfen).

Wenn Myzelien vorhanden sind, ist mit einer zweiten gefrittierten Filtration fortzufahren. Wenn immer noch Myzelien vorhanden sind, ist die Suspension zu verwerfen.

- c) Die Anzahl der Konidiosporen in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.10) auf mindestens $1,5 \times 10^8$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mit einem geeigneten Verfahren geschätzt wird. Diese Suspension muss innerhalb von 4 h in einem auf $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ geregelten Wasserbad (5.3.2.2) verwendet werden. In jedem Fall wird die Temperatur nach 5.5.1.1 erst unmittelbar vor Beginn der Prüfung (5.5.2) eingestellt.

Die Verwendung eines Zellzählgerätes zur Einstellung der Zellzahl wird dringend empfohlen. Bei Verwendung einer geeigneten Zählkammer sind die Anweisungen genau zu befolgen.

Jedes Laboratorium sollte deshalb Kalibrierdaten erarbeiten, um das Verhältnis zwischen den mit dem Zählgerät ermittelten Keimzahlen und den Keimzahlen (5.5.2.5) herzustellen, die im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren [5.5.2.2 c)] bestimmt wurden. Erfahrene Laboratorien fanden eine bessere Angleichung an die geforderte Anzahl von Konidiosporen, wenn die mit dem Gerät gemessene Zellzahl in der Konidiosporensuspension um 10 % bis 50 % höher war als die angestrebte Zahl.

- d) Um eine Prüfsuspension mit der geeigneten Anzahl an KBE/ml zu erhalten, wird erneut zentrifugiert und mit defibriniertem Schafsblut (5.2.2.12) im gleichen Volumen resuspendiert.
- e) Eine Öseneinheit dieser Prüfsuspension wird auf einer geeigneten Agarplatte ausgestrichen und zur Kontrolle auf Reinheit bebrütet.
- f) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.10) Verdünnungen von 10^{-6} und 10^{-7} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

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

Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird etwa die Hälfte jeder 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen pipettiert (d. h. als Doppelbestimmung = vier Platten) und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ abgekühlter MEA (5.2.2.8) zugegeben.

Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird etwa ein Viertel jeder 1,0-ml-Probe auf einer geeigneten Anzahl (mindestens vier) von an der Oberfläche getrockneten MEA-Platten (5.2.2.8) (d. h. als Doppelbestimmung – mindestens acht Platten) ausgestrichen.

Das bei der Auszählung der Prüfsuspension angewendete Verfahren muss bei allen weiteren Auszählungen angewendet werden (5.5.2.2 bis 5.5.2.4).

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.5.

5.4.4.3 Prüfsuspension von Mykobakterien (M)

- a) Zur Ernte der Mykobakterien sollte Wasser mit 0,1 % Polysorbat 80 verwendet werden. Die Suspension wird in aliquoten Anteilen in Röhrchen mit Schraubverschluss überführt und 15 min bei 4 °C und $2\ 000\ g_N$ zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Der Schritt ist zweimal zu wiederholen. Aus den Gebrauchskulturen (5.4.3.2) wird eine geeignete homogene Suspension hergestellt, entweder:
 - durch Homogenisierung mit Glasperlen: Das Pellet wird in einem geeigneten Volumen resuspendiert und in ein Röhrchen mit konischem Boden und mit Schraubverschluss (5.3.2.14) überführt, das 6 g bis 7 g trockene Glasperlen (5.3.2.11) enthält. Die Prüforganismen werden durch mindestens 5-minütiges Mischen [5.3.2.6 a)] homogenisiert, um sie homogen auf den Perlen und dem größten Teil der Innenfläche des Röhrchens mit Schraubverschluss zu verteilen. Tropfenweise werden 5 ml Wasser (5.2.2.2) zugegeben und die Keime durch Mischen resuspendiert. Nach 20 min Absetzen wird der Überstand in ein Röhrchen überführt.
 - oder durch Homogenisierung mit dem Homogenisator S 1 nach Potter-Elvehjem (5.3.2.22): Das Pellet wird in 2 ml Wasser mit 0,1 % Polysorbat 80 resuspendiert. Diese Suspension wird mit dem Potter-Homogenisator S 1 unter Kühlen mit Eis 15 min homogenisiert.

ANMERKUNG Andere Homogenisierungsverfahren sind unter der Voraussetzung zulässig, dass die erhaltene Anzahl der KBE/ml geeignet und während der Untersuchungsdauer stabil ist und dass die mikroskopische Untersuchung zeigt, dass die Suspension so homogen ist wie nach den beiden vorstehend beschriebenen Verfahren.

Die Verwendung eines Spektrophotometers zur Bestimmung der Zellzahl wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, Küvette mit 10 mm optischer Weglänge). Jedes Laboratorium sollte deshalb für jeden Prüforganismus Kalibrierdaten erarbeiten, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte zwischen 2 200 und 2 400 zu finden sind. Um reproduzierbare Ergebnisse dieser Messung zu erreichen, ist es notwendig, die Prüfsuspension zu verdünnen, z. B. 1 + 9. Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

- b) Die Anzahl der Zellen in der Suspension muss mit Wasser mindestens $1,5 \times 10^9$ KBE/ml betragen. Diese Prüfsuspension ist bei 20 °C zu halten und am Tag der Herstellung zu verbrauchen. Um eine Prüfsuspension mit der geeigneten Anzahl an KBE/ml zu erhalten, wird erneut zentrifugiert und mit defibriniertem Schafsblut (5.2.2.12) im gleichen Volumen resuspendiert.
- c) Eine Öseneinheit dieser Prüfsuspension wird auf einer geeigneten Agarplatte ausgestrichen und zur Kontrolle auf Reinheit bebrütet.
- d) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit Wasser (5.2.2.2) Verdünnungen von 10^{-7} und 10^{-8} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Von jeder Verdünnung wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und, in nahezu gleiche Mengen geteilt, auf zwei gesonderte Platten (5.3.2.10), die 7H10 (5.2.2.9) enthalten, überführt, d. h. zwei Platten je 1,0-ml-Probe, vier Platten für die Doppelbestimmung der 1,0-ml-Proben (beim Oberflächenverfahren).

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.5.

5.4.5 Beimpfung der Keimträger

Die Keimträger werden in die Prüfsuspension eingetaucht und mit einer sterilen Pinzette wiederholt umgedreht, um sie vollständig zu benetzen und alle Luftblasen zu entfernen. Die Keimträger sollten für 15 min in der Suspension bleiben. Anschließend werden die Keimträger ohne Verzögerung mit einer Pinzette zum Trocknen bei Raumtemperatur auf Filterpapier in offene Petrischalen für 1 h bis 3 h in eine Sicherheitswerkbank überführt, bis sie sichtbar trocken sind.

ANMERKUNG Keimträger mit *P. aeruginosa* können ohne Lüfter getrocknet werden, bis sie sichtbar trocken sind (nach etwa 16 h), wenn die Bakterien-KBE nicht 5.7.3 entspricht.

Mit z. B. *E. faecium* oder *M. terrae* kontaminierte Keimträger können bis zu 12 Wochen verwendet werden, wenn sie bei Raumtemperatur und einer relativen Luftfeuchte von 20 % (gesättigte Calciumchloridlösung) getrocknet und bei Raumtemperatur und einer relativen Luftfeuchte von 45 % (gesättigte Kaliumcarbonatlösung) in einem geschlossenen Behälter, z. B. einem Exsikkator, aufbewahrt werden.

Die vorbereiteten Keimträger sind unmittelbar nach Ende der Trocknungszeit zu verwenden (mit Ausnahme von *E. faecium*, *M. terrae*). Die Trocknungszeit ist im Prüfbericht zu erfassen.

Jeder Keimträger wird anschließend mit einer sterilen Pinzette in eine Tasche des Baumwolltuchs (5.3.2.16) überführt (eine für jeden Prüforganismus).

5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der mikrobiziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Prüfbedingungen (obligatorische und zusätzliche)

- a) Prozesse bei Temperaturen $t < 60$ °C

— Prüforganismen:

- bakterizide Wirkung: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (K12), *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus hirae*;
- levurozide Wirkung: *Candida albicans*;
- fungizide Wirkung (zusätzlich): *Aspergillus brasiliensis*;
- tuberkulozide Wirkung (zusätzlich): *Mycobacterium terrae*;
- mykobakterizide Wirkung (zusätzlich): *Mycobacterium avium* und *Mycobacterium terrae*.

Neben den obligatorischen Prüforganismen dürfen zusätzliche Prüforganismen entsprechend der für das Produkt erwogenen praktischen Verwendung gewählt werden.

- Prüftemperatur:

Die Prüfungen werden bei den Prozesstemperaturen durchgeführt.

- Belastungssubstanz:

Die zu prüfende obligatorische Belastungssubstanz ist steriles defibriniertes Schafsblut (siehe 5.2.2.12) (12,5 ml Schafsblut je kg Wäsche).

b) Prozesse bei Temperaturen $t \geq 60\text{ °C}$

- Prüforganismus: *Enterococcus faecium*.

- Prüftemperatur:

Die Prüfungen werden bei den Prozesstemperaturen durchgeführt.

- Belastungssubstanz:

Die zu prüfende obligatorische Belastungssubstanz ist steriles defibriniertes Schafsblut (siehe 5.2.2.12) (12,5 ml Schafsblut je kg Wäsche).

5.5.1.2 Auswahl des Neutralisationsmediums

Die Validierung der Neutralisation und die Verifizierung des Nichtvorliegens einer Toxizität des Neutralisationsmediums (5.2.2.11) müssen während der entsprechenden Prüfungen der Phase 2, Stufe 1 nach EN 13727, EN 13624 und/oder EN 14348 durchgeführt werden.

Unter besonderen Umständen kann es erforderlich sein, dem Wachstumsmedium (5.2.2.5, 5.2.2.7, 5.2.2.8, 5.2.2.9) ein Neutralisationsmedium zuzusetzen.

Die Wahl des Neutralisationsmediums muss im Prüfbericht dokumentiert und begründet werden.

5.5.1.3 Allgemeine Anweisungen für Validierungs- und Kontrollverfahren

Die Neutralisation und/oder Aufhebung der mikrobiziden Wirkung des Produkts muss für jeden der verwendeten Prüforganismen und für jede Prüfbedingung (Belastungssubstanz, Temperatur, Einwirkzeit) kontrolliert und validiert werden. Diese Verfahren (Kontrolle der Prüfbedingungen, Kontrolle des Neutralisationsmediums und Verfahrensvalidierung) müssen mit dem gleichen Neutralisationsmedium wie in der Prüfung durchgeführt werden.

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

5.5.1.4 Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Prüforganismen

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

5.5.2 Verfahren⁵

5.5.2.1 Allgemeines

Die Ballastbeladung ist in 5.3.2.17 festgelegt. Die Art der eingesetzten Waschmaschine muss im Prüfbericht genau angegeben werden und die in 5.3.2.18 angeführten Anforderungen erfüllen.

Die Dosierung des Waschmittels und des Desinfektionsmittels sowie die Flottenparameter werden nach den Anweisungen des Herstellers eingestellt.

Ein zeitabhängiges Temperaturprofil des gesamten Zyklus muss aufgezeichnet und im Prüfbericht angegeben werden.

ANMERKUNG Die Temperaturmessung mit einem gesonderten kalibrierten Datenerfassungsgerät, das in der Ballastbeladung angeordnet wird, wird bevorzugt. Es können auch andere kalibrierte Geräte, z. B. kalibrierte Sensoren, verwendet werden.

Die Desinfektionszeit beginnt, wenn die geforderte Waschtemperatur erreicht ist. Während des Desinfektionsprozesses muss auf Temperaturabweichungen geachtet werden. Schwankungen müssen im Prüfbericht genau angegeben werden.

5.5.2.2 Prüfung N_a (Bestimmung der mikrobiziden Konzentrationen) und der unbehandelten Kontrolle N_0 (Keimzahl auf den Keimträgern)

- a) Die Waschmaschine wird mit Textilien (siehe 5.3.2.17, entsprechend der empfohlenen Ballastbeladung), den Keimträgern aus Baumwolle (zwei Tücher mit Keimträgern, eins mit 10 kontaminierten Keimträgern je Prüforganismus und eins mit 6 nicht kontaminierten Keimträgern) und 12,5 ml defibriniertem Schafsblut (5.2.2.12) je kg Ballastbeladung vor dem Wasserzulauf befüllt.

ANMERKUNG Anhang G enthält eine Tabelle und ein Beispiel, wie die Waschmaschine beladen wird.

- b) Der Reinigungs- und Desinfektionszyklus muss in Übereinstimmung mit dem vorab festgelegten Verfahren [Anwendungskonzentration der Produkte (Waschpulver und Desinfektionsmittel oder kombiniertes Desinfektionsmittel + Waschpulver)], der Prozesstemperatur, Einwirkzeit, dem Behandlungsverfahren und Flottenverhältnis durchgeführt werden.

Nach Abschluss des Desinfektionsschrittes, d. h. vor dem Spülen der Textilien, muss der Waschprozess abgebrochen werden und die Tücher mit den Keimträgern sind unverzüglich zu entnehmen, und die Keimträger sind unmittelbar in Glasfläschchen (eins je Keimträger) mit 5 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.11) und mit Glasperlen (siehe 5.3.2.11) zu überführen. Die Überführung muss in weniger als 5 min erreicht sein und die dafür benötigte Zeit muss dokumentiert werden.

Nach 10-minütigem Mischen [5.3.2.6 b)] werden 1 ml des unverdünnten Gemischs und außerdem 1 ml einer Verdünnung von 10^{-1} und von 10^{-2} überführt.

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

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

Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1-ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter TSA (5.2.2.5) zugegeben; *E. faecium*: es kann auch BHI (5.2.2.7) verwendet werden; *C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA (5.2.2.8) und für Mykobakterien: 7H10 (5.2.2.9), auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt).

Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in Anteile etwa gleicher Größe aufgeteilt und auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) von an der Oberfläche getrockneten TSA-Platten (5.2.2.5) ausgestrichen.

Das Kulturmedium muss das Gleiche sein, das für die Herstellung der Stamm- und Gebrauchskulturen verwendet wurde.

Zusätzlich werden die Baumwoll-Keimträger auch in getrennten Guss- oder Ausstrichplatten angeordnet.

- i) Für jeden Prüflauf muss die Keimzahl von mindestens 3 nicht behandelten Keimträgern bestimmt werden.

Der Mittelwert der 3 unbehandelten Keimträger (N_0) für jeden Prüflauf dient als Grundlage für die Berechnung der Keimreduktion nach der Einwirkung.

Nach 10-minütigem Mischen [5.3.2.6 b)] werden 1 ml von Verdünnungen von 10^{-5} bis 10^{-7} der Bakterien- und Mykobakteriensuspension sowie 1 ml von Verdünnungen von 10^{-4} bis 10^{-6} von *P. aeruginosa*, *E. coli* und der Pilz-Prüforganismen überführt.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.5.

5.5.2.3 Referenzkontrolle N_w (Prüfung ohne Waschmittel oder Desinfektionsmittel)

Um die mechanische Wirkung des Waschprozesses nachzuweisen, ist ein Referenzverfahren einmal mit 10 kontaminierten Keimträgern je Prüforganismus (N_w) und 6 nicht kontaminierten (sterilen) Keimträgern ohne Verwendung eines Wasch- oder Desinfektionsmittels durchzuführen.

Das Referenzverfahren für Prozesse $< 60^\circ\text{C}$ muss bei 40°C , einem Flottenverhältnis von 1 : 5 und einer Einwirkzeit von 20 min durchgeführt werden. Das Referenzverfahren für Prozesse $\geq 60^\circ\text{C}$ muss bei 60°C , einem Flottenverhältnis von 1 : 5 und einer Einwirkzeit von 15 min durchgeführt werden.

Die in 5.5.2.2 angeführten Anweisungen sind einzuhalten (aber es sind geeignete Verdünnungen zu verwenden, z. B. 10^{-3} bis 10^{-5}).

5.5.2.4 Kontrolle RI (nicht kontaminierter Keimträger aus Baumwolle im Prüfverfahren und im Referenzverfahren)

Zusätzlich zu den kontaminierten Keimträgern in einem Prüflauf müssen 6 nicht kontaminierte Baumwoll-Keimträger dem Verfahren unterzogen werden.

Nach Abschluss des Desinfektionsschrittes, d. h. vor dem Spülen der Textilien, muss der Waschprozess abgebrochen werden und die Tücher mit den Keimträgern sind unverzüglich zu entnehmen, und die Keimträger sind unmittelbar in Glasfläschchen (eins je Keimträger) mit 5 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.11) und mit Glasperlen (siehe 5.3.2.11) zu überführen. Die Überführung muss in weniger als 5 min erreicht sein und die dafür benötigte Zeit muss dokumentiert werden.

Nach 10-minütigem Mischen [5.3.2.6 b)] wird 1 ml des unverdünnten Gemischs überführt.

Die Keimträger und von dem unverdünnten Gemisch eine Probe von 1,0 ml werden als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft.

Beim Prüfverfahren darf kein Wachstum von Prüforganismen nachgewiesen werden, während beim Referenzverfahren ein Wachstum nachgewiesen werden muss (qualitative Analyse).

5.5.2.5 Bebrütung und Auszählung

- a) Die Platten der Prüforganismen ohne Kontakt mit dem Desinfektionsmittel werden für 48 h (*C. albicans*: 72 h, *A. brasiliensis*: 7 Tage bis 9 Tage, *P. aeruginosa* im Gussplattenverfahren 5 Tage, Mykobakterien: 21 Tage) bebrütet (5.3.2.3), siehe 5.2.1. Die Kultur mit den Prüforganismen nach dem Kontakt mit dem Desinfektionsmittel müssen mindestens 7 Tage länger als die reguläre Bebrütungszeit bebrütet werden. Alle Platten, die aus irgendeinem Grund nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wird bestimmt.

Es wird empfohlen, die Mykobakterien in Kunststoffbeuteln zu bebrüten.

- b) Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird > 330 (> 165 für *Aspergillus brasiliensis*) für alle Koloniezahlen über 330 (165 für *Aspergillus brasiliensis*) aufgezeichnet; die V_C -Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.
- c) Die Anzahlen der KBE/ml in der Prüfsuspension N werden nach dem in 5.6.2.3 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.
- d) Die Anzahlen auf den Keimträgern in den Prüfgemischen N_a und N_0 und in der Referenzkontrolle N_w werden nach den in 5.6.2.2 b) und 5.6.2.3 bis 5.6.2.5 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.6 Prüfdaten und Berechnung

5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen

5.6.1.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen und Prüfgemische

Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Suspensionen und Prüfgemische.

Tabelle 2 — Suspensionen und Prüfgemische

	Anzahl der Zellen in den mikrobiellen Suspensionen KBE/ml	Anzahl der Zellen aus den Referenzkontrollen KBE/Keimträger	Nicht kontaminierte r Keimträger	Anzahl der Zellen je unbehandelte m Keimträger (KBE/Keimträger)	Anzahl der überlebenden Zellen je behandeltem Keimträger (KBE/Keimträger)
Prüfung und Referenzkontrollen	N	N_w	RI^a	N_0	N_a
^a Nur qualitative Analyse.					

5.6.1.2 V_C -Werte

Alle Prüfdaten werden im Bericht als V_C -Werte angegeben. Ein V_C -Wert ist die Anzahl der je 1,0 ml Probe gezählten KBE für N bzw. die Anzahl multipliziert mit 5 für N_0 , N_w , N_a .

ANMERKUNG Die Keimträger werden in 5 ml Neutralisationsmedium überführt. Es wird nur 1 ml des Gemischs auf einer Agarplatte analysiert.

5.6.2 Berechnung

5.6.2.1 Allgemeines

Der erste Schritt bei der Berechnung ist die Bestimmung der V_C -Keimzahlen, der zweite Schritt die Berechnung von N , N_0 , N_a und N_W . Der dritte Schritt ist die Berechnung der Keimreduktion R (5.8.1).

Die berechneten Ergebnisse werden auf zwei signifikante Stellen gerundet. Wenn die letzte Ziffer kleiner als 5 ist, wird die vorhergehende Ziffer nicht geändert; wenn die letzte Ziffer größer oder gleich 5 ist, wird die vorhergehende Ziffer um eine Einheit erhöht. Es ist schrittweise vorzugehen, bis zwei signifikante Stellen erreicht sind.

Im Ergebnis wird die Anzahl der KBE/Keimträger als Zahl zwischen 1,00 und 9,90, multipliziert mit der entsprechenden Zehnerpotenz, angegeben.

5.6.2.2 Bestimmung der V_C -Keimzahlen

Die V_C -Keimzahlen werden wie folgt bestimmt.

- a) Die üblichen Grenzwerte für die Auszählung von Bakterien auf Agarplatten liegen zwischen 15 und 300 Kolonien. In diesem Dokument ist eine Abweichung von 10 % zulässig, so dass die Grenzwerte 14 und 330 Kolonien, bei *Aspergillus brasiliensis* 14 und 165 Kolonien betragen. Keimzahlen < 14 sind zulässig, wenn keine höhere Keimzahl 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 könnten 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 eine V_C -Keimzahl von 16. Die oberen Grenzwerte (330, 165) spiegeln die Ungenauigkeit beim Zählen zusammenfließender Kolonien wider und die Wachstumshemmung aufgrund Nährstoffverarmung. Sie beziehen sich nur auf die Auszählung auf einer Platte und nicht notwendigerweise auf die Probe.

- b) Für die Auszählung der Prüfsuspension N (5.4.4) werden die V_C -Keimzahlen entsprechend der Anzahl der je 1 ml Probe verwendeten Platten bestimmt und aufgezeichnet (5.6.1.2); für alle anderen Auszählungen der Prüfungen und Referenzkontrolle (N_0 , N_a , N_W) (5.5.2.5) werden die V_C -Keimzahlen entsprechend der Anzahl der je 1 ml Probe verwendeten Platten bestimmt, aufgezeichnet und mit 5 multipliziert (5.6.1.2).

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

Wenn die Keimzahl auf einer Platte höher als 330 ist, wird die Zahl 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, wird dieser V_C -Wert im Prüfbericht als „mehr als die Summe der Keimzahlen“ angegeben; z. B. wird für „ > 330 , 310, 302“ im Prüfbericht „ > 942 “ angegeben.

Wenn eine V_C -Keimzahl kleiner als 14 ist und keine andere Keimzahl > 14 vorliegt, wird die Zahl angegeben und die Berechnung erfolgt mit der tatsächlichen V_C -Keimzahl.

- c) Es werden nur V_C -Keimzahlen 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 und N_0

N ist die Anzahl der Zellen je ml in der Prüfsuspension (5.4.4).

Da zwei Verdünnungen der Prüfsuspension (5.4.4) ausgewertet werden, wird die Anzahl der KBE/ml als die gewichtete mittlere Keimzahl nach folgender Gleichung berechnet:

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

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- n_1 die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung, z. B. 10^{-6} (bei Bakterien und Mykobakterien) bzw. 10^{-5} (bei Hefe- und Schimmelpilzen), berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- n_2 die Anzahl der bei der stärkeren Verdünnung, z. B. 10^{-7} (bei Bakterien und Mykobakterien) bzw. 10^{-6} (bei Hefe- und Schimmelpilzen), berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- d der der geringeren Verdünnung entsprechende Verdünnungsfaktor.

N_0 ist der Mittelwert der Anzahl der Zellen je ml auf drei unbehandelten Keimträgern [5.5.2.2 d)], multipliziert mit 5.

Da zwei Verdünnungen von N_0 (5.4.4) ausgewertet werden, wird die Anzahl der KBE/Keimträger als die gewichtete mittlere Keimzahl nach folgender Gleichung berechnet:

$$N_0 = \frac{c}{(n_1 + 0,1 \times n_2)d} \times 5 \quad (2)$$

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- n_1 die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung, z. B. 10^{-5} , berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- n_2 die Anzahl der bei der stärkeren Verdünnung, z. B. 10^{-6} , berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- d der der geringeren Verdünnung entsprechende Verdünnungsfaktor.

BEISPIEL:

$$\frac{168 + 215 + 14 + 25}{(2 + 0,1 \times 2)10^{-6}} = \frac{422}{2,2 \times 10^{-6}} = 1,918\,18 \times 10^8 = 1,92 \times 10^8 \text{ (in KBE/ml)}$$

Für die Zahl der KBE/Keimträger wird wegen des Verdünnungsfaktors bei der Verdünnung mit Neutralisationsmedium mit 5 multipliziert:

$$1,92 \times 10^8 \times 5 = 9,60 \times 10^8 \text{ KBE/Keimträger}$$

5.6.2.4 Berechnung von N_a

N_a ist die Anzahl der überlebenden Zellen je Keimträger [5.5.2.2 b)] am Ende der Einwirkzeit und vor der Neutralisation.

Da zwei Verdünnungen von N_a (5.4.4) ausgewertet werden, wird die Anzahl der KBE je Keimträger als die gewichtete mittlere Keimzahl nach folgender Gleichung berechnet.

- a) Der Mittelwert für jede Verdünnungsstufe $N_a^0, N_a^{-1}, N_a^{-2}$ wird nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$N_a^0, N_a^{-1}, N_a^{-2} = \frac{c}{(n_1 + 0,1 \times n_2)d} \times 5 \quad (3)$$

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- n_1 die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung, z. B. 10^{-1} , berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- n_2 die Anzahl der bei der stärkeren Verdünnung, z. B. 10^{-2} , berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- d der der geringeren Verdünnung entsprechende Verdünnungsfaktor.

Wenn eine V_C -Keimzahl oder beide V_C -Keimzahlen der Doppelbestimmung unterhalb des unteren oder oberhalb des oberen Grenzwerts liegen, werden die Ergebnisse als „weniger als“ oder „mehr als“ angegeben.

- b) Zur Berechnung von N_a sind nur die Ergebnisse für $N_a^0, N_a^{-1}, N_a^{-2}$ zu verwenden, bei denen eine V_C -Keimzahl oder beide V_C -Keimzahlen innerhalb der Auszählgrenzen liegt (liegen).
- c) Zur Berechnung von N_a als gewichteter Mittelwert werden höchstens 2 aufeinanderfolgende Verdünnungen verwendet.

5.6.2.5 Berechnung von N_w

N_w ist die Anzahl der überlebenden Zellen je Keimträger in der Referenzkontrolle (5.5.2.3).

Da zwei Verdünnungen von N_w (5.4.4) ausgewertet werden, wird die Anzahl der KBE je Keimträger als die gewichtete mittlere Keimzahl nach folgender Gleichung berechnet.

N_w wird nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$N_w = \frac{c}{(n_1 + 0,1 \times n_2)d} \times 5 \quad (4)$$

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- n_1 die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung, z. B. 10^{-4} , berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- n_2 die Anzahl der bei der stärkeren Verdünnung, z. B. 10^{-5} , berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- d der der geringeren Verdünnung entsprechende Verdünnungsfaktor.