

DIN EN 17272

ICS 11.080.20; 71.100.35

Einsprüche bis 2018-09-27

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitative Keimträgerprüfung zur luftübertragenen Raumdesinfektion
durch automatisierte Verfahren –
Bestimmung der bakteriziden, fungiziden, levuroziden, sporiziden,
tuberkuloziden, mykobakteriziden, viruziden und Phagen-Wirksamkeit im
humanmedizinischen Bereich, Veterinärbereich, in den Bereichen
Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17272:2018**

Chemical Disinfectants and Antiseptics –
Quantitative Carrier test for Airborne Room Disinfection by Automated Processes –
Determination of Bactericidal, Fungicidal, Yeastocidal, Sporocidal, Tuberculocidal,
Mycobactericidal, Virucidal and Phagocidal Activities in the Medical Area, Veterinary Area and
Food, Industrial, Domestic and Institutional Areas –
Test Methods and Requirements (Phase 2, Step 2);
German and English version prEN 17272:2018

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de porteur pour la désinfection de l'air des pièces par des processus
automatisés –
Détermination de l'activité bactéricide, fongicide, levuricide, sporicide, tuberculocide,
mycobactéricide, virucide et phagocide en médecine, dans le domaine vétérinaire, de
l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité –
Méthodes d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2);
Version allemande et anglaise prEN 17272:2018

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2018-07-27 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, 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 134 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED)

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17272:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Normenausschuss 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.

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitative Keimträgerprüfung zur luftübertragenen Raumdesinfektion durch automatisierte Verfahren — Bestimmung der bakteriziden, fungiziden, levuroziden, sporiziden, tuberkuloziden, mykobakteriziden, viruziden und Phagen-Wirksamkeit im humanmedizinischen Bereich, Veterinärbereich, in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)

Antiseptiques et désinfectants chimiques — Essai quantitatif de porteur pour la désinfection de l'air des pièces par des processus automatisés — Détermination de l'activité bactéricide, fongicide, levuricide, sporicide, tuberculocide, mycobactéricide, virucide et phagocide en médecine, dans le domaine vétérinaire, de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité — Méthodes d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2)

Chemical Disinfectants and Antiseptics — Quantitative Carrier test for Airborne Room Disinfection by Automated Processes — Determination of Bactericidal, Fungicidal, Yeasticidal, Sporicidal, Tuberculocidal, Mycobactericidal, Virucidal and Phagocidal Activities in the Medical Area, Veterinary Area and Food, Industrial, Domestic and Institutional Areas — Test methods and requirements (Phase 2, Step 2)

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9d

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	7
4.1 Prüfungen der Wirksamkeit	7
4.2 Verteilungsprüfungen	9
5 Prüfverfahren	9
5.1 Kurzbeschreibung	9
5.1.1 Vorprüfung zur Validierung des Fehlens der Residualwirkung	9
5.1.2 Prüfung	9
5.2 Materialien und Reagenzien	10
5.2.1 Prüfkeime	10
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	11
5.2.3 Verwendete mikrobielle Keimträger	16
5.3 Geräte und Glasgeräte	17
5.3.1 Allgemeines	17
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte	17
5.4 Herstellung und Auszählung von Prüfsuspensionen	19
5.4.1 Herstellung von Prüfsuspensionen (Bakterien, Hefen, Schimmelpilze, Sporen und Mykobakterien)	19
5.4.2 Herstellung von Suspensionen in Belastungssubstanzen	21
5.4.3 Auszählen von in Belastungssubstanz hergestellten Suspensionen	25
5.4.4 Herstellung und Auszählung von Viren-Suspensionen	28
5.4.5 Herstellung und Auszählung von Prüfsuspensionen (Wirtsbakterien- und Bakteriophagen-Suspensionen)	29
5.5 Verfahren zur Bewertung der Prozessaktivität	33
5.5.1 Verfahren zur Bewertung der Prozessaktivität entsprechend den vom Hersteller bereitgestellten Anwendungsbedingungen (Bakterien, Hefen, Sporen, Viren, Bakteriophagen und Mykobakterien)	33
5.5.2 Prüfungen der viruziden Wirkung	43
5.5.3 Verfahren zur Bewertung der mykobakteriziden Wirkung des Verfahrens	46
5.6 Untersuchungsdaten und Berechnungen (Bakterien, Hefen, Schimmelpilze, bakterielle Sporen und Bakteriophagen und Mykobakterien)	46
5.6.1 Allgemeines	46
5.6.2 Koloniezählung und Schwellengrenzwerte	47
5.6.3 Bestimmung der Anzahl von Mikroorganismen N in Suspensionen von Bakterien, Hefen, Schimmelpilzen, bakteriellen Sporen, Mykobakterien und Phagen (5.4)	47
5.6.4 Bestimmung der Anzahl von Mikroorganismen T auf Kontrollkeimträgern (5.5.1.2)	48
5.6.5 Ermittlung von in der Vorprüfung erhaltenen Werten (5.5.1.3)	48
5.6.6 Bestimmung der Anzahl von Mikroorganismen und Plaques auf Prüfkeimträgern nach der direkten Einwirkung und dezimal-logarithmische Reduktion d (5.5.1.4.3)	48
5.7 Angabe der Ergebnisse	50
5.8 Prüfbericht	52

Anhang A (normativ) Zusammenfassung von Prüfzielen und -bedingungen	55
A.1 Prüfungen der Wirksamkeit.....	55
A.2 Verteilungsprüfungen.....	57
Anhang B (normativ) Abstände zwischen Desinfektionsgerät und Keimträger	58
Anhang C (normativ) Belastungssubstanzen	59
Anhang D (normativ) Herstellung von <i>Bacillus subtilis</i> -Sporen-Stammsuspensionen	62
D.1 Materialien und Reagenzien.....	62
D.1.1 Trypton-Glucose-Bouillon (TGB).....	62
D.1.2 Fleisch-Hefeextrakt-Agar (MEA).....	62
D.1.3 Zentrifuge mit einer Beschleunigung von 10 000 <i>g</i>	62
D.2 Herstellung von <i>Bacillus</i> -Sporen-Stammsuspensionen	62
Anhang E (normativ) Schematische Darstellungen des Prüfverfahrens	64
Literaturhinweise.....	68

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17272:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Einleitung

Der Zweck dieses Dokuments besteht in der Beschreibung eines Verfahrens zur Bewertung der desinfizierenden Wirkung von luftübertragenen Desinfektionsverfahren unter einer speziellen Reihe von Versuchsbedingungen.

Die betreffenden Verfahren umfassen die Verfahren, in denen chemische Desinfektionsmittel in dispergierter gasförmiger, dampfförmiger und/oder aerosolierter Form verwendet werden.

Dieses Dokument enthält keine Verfahren, bei denen die Wirkungsweise auf Eintauchen und/oder Einwirkung basiert und optional mit einem mechanischen Wischvorgang verbunden ist. Die vorstehend angegebenen Auswirkungen führen zu einem vollständigen oder teilweisen Ablösen aller Mikroorganismen von der Keimträgerfläche wie in diesem Dokument festgelegt, ohne diese Mikroorganismen zu inaktivieren.

Es muss klargestellt werden, dass jede(r) automatische luftübertragene Desinfektionszyklus/-anwendung einzigartig ist und der Zweck dieser Norm darin besteht, eine festgelegte Herausforderung darzustellen, die erfüllt werden muss, damit das automatische luftübertragene Desinfektionssystem als ein wirksames Verfahren angesehen wird. Dieses genormte Verfahren sollte deshalb als ein geeigneter Ausgangspunkt angesehen werden und nicht als Validierung für alle vorgesehenen Behandlungen mit einem bestimmten automatischen luftübertragenen Desinfektionssystem.

1 Anwendungsbereich

Das beschriebene Verfahren ist zur Bestimmung der desinfizierenden Wirkung von 1) im humanmedizinischen Bereich, 2) im veterinärmedizinischen Bereich, 3) in den Bereichen Lebensmittel, Industrie und öffentliche Einrichtungen verwendeten Prozessen ausgelegt, in denen chemische Verfahren angewendet werden.

Das Ziel der beschriebenen Verfahren besteht im Desinfizieren der Oberflächen der gesamten Fläche, einschließlich der Außenflächen der in diesen Räumen befindlichen Ausrüstung. Speziell für die Desinfektion von Medizinprodukten ausgelegte Luftbehandlungen und Produkte oder Prozesse sind vom Anwendungsbereich dieses Dokuments ausgeschlossen.

Die beschriebenen Prüfverfahren und Volumina stellen die festgelegte Herausforderung dar. Selbst wenn ein automatisches luftübertragenes Desinfektionssystem alle oder Teile der in diesem Dokument beschriebenen Prüfungen bestanden hat, sollten das System und deren bereitgestellte Zyklen anschließend im eigenen zu desinfizierenden umschlossenen Raum validiert werden, indem entsprechende biologische oder chemische Indikatoren verwendet werden.

Dieses Dokument legt Verfahren der Phase 2, Stufe 2 fest, die wie folgt ausgelegt sind:

- zur Überprüfung unter genormten Laborbedingungen, die sich der Praxis annähern, dass die vorgeschlagenen luftübertragenen Desinfektionsverfahren das Ziel erreichen, für das sie entwickelt wurden;
- für den Quervergleich der verschiedenen Verfahren unter reproduzierbaren Bedingungen;

- für die Bereitstellung einer Versuchsanordnung innerhalb festgelegter Grenzen, wenn die Praxisbedingungen von denen abweichen, die im nachfolgenden Text festgelegt sind.

Das Verfahren gilt für im humanmedizinischen Bereich, veterinärmedizinischen Bereich und in den Bereichen Lebensmittel, Industrie und öffentliche Einrichtungen verwendete Prozesse (WG 1, WG 2 und WG 3).

Es gilt für den durch automatische Prozesse erhaltenen Desinfektionsprozess des gesamten umschlossenen Raums (d. h. ohne Bedienperson, die das Desinfektionsmittel manuell aufbringt). Dieses Dokument umfasst die Desinfektion von porenfreien Oberflächen, aber nicht der Luft.

Dieses Verfahren kann als Grundlage für Anwendungen in Laboren hinsichtlich biologischer Sicherheit angewendet werden.

Das Verfahren wird zur qualitativen Bestimmung des Prozesses angewendet, d. h. für die zur Umsetzung erforderliche Reihe von Bestandteilen und Verbrauchsmaterialien. Zum Beispiel kann für chemische Prozesse die Kombination von Prüfkörper und Produkt nicht getrennt werden.

Dieses Dokument gilt für Prozesse, für die die Wirkung bei den folgenden Kategorien von Mikroorganismen ausgewiesen wird:

- vegetative Bakterien einschließlich Mykobakterien,
- bakterielle Sporen,
- Hefen,
- Schimmelpilzsporen, und
- Viren.

Jede Wirkung kann unabhängig voneinander ausgewiesen werden, das Bestehen der Prüfungen bezüglich der bakteriziden als auch der levuroziden Wirkung, deren Beschreibung in Anhang A enthalten ist, stellt jedoch die Mindestanforderung für die Beanspruchung der Übereinstimmung dar.

Eine für jeden Anwendungsbereich geprüfte Wirkung darf nur ausgewiesen werden, wenn die Kriterien für alle mit dieser Wirkung verbundenen festgelegten Organismen erfüllt werden.

Das vorgeschlagene Verfahren umfasst zwei Teile:

- Teil 1 - Wirksamkeitsprüfung: vorgesehen zur Sicherstellung, dass die Mindestanforderungen an die Wirksamkeit für jede ausgewiesene Wirkungsart und für die angestrebte(n) Anwendung(en) (WG 1 und/oder WG 2 und/oder WG 3) erreicht werden.
- Teil 2 - Verteilungsprüfung: vorgesehen zur Sicherstellung der Wirksamkeit des Prozesses im gesamten umschlossenen Raum. Sie wird mit einem Referenz-Mikroorganismus an 4 Probenahmestellen durchgeführt.

Die in diesem Dokument beschriebenen Prüfungen basieren auf der Bestimmung der logarithmischen Reduktion von verschiedenen Arten von Bakterien, Hefen, Schimmelpilzen, bakteriellen Sporen, Bakteriophagen oder Viren und Mykobakterien unter einer festgelegten Reihe von Bedingungen. Da die Auswahl an ausgewählten Mikroorganismen für einige Anwendungen zu gering sein könnte, darf sie durch andere Stämme ergänzt werden, die auf der in diesem Dokument beschriebenen Versuchsanordnung basieren, indem die Bedingungen entsprechend den Bedürfnissen der in Betracht gezogenen praktischen Anwendung(en) geändert werden.

Bei den festgelegten Prüfbedingungen kann die Anzahl der Prüfpositionen der Keimträger entsprechend den besonderen Bedürfnissen einer bestimmten Anwendung oder lokalen Bedürfnissen erhöht werden.

Der Hersteller:

- legt die Begrenzungen hinsichtlich der Nutzung und Vorsichtsmaßnahmen bei der Anwendung des Verfahrens fest;
- stellt sicher, dass die dokumentierten Prüfbedingungen für die empfohlene(n) Verfahrensweise(n) repräsentativ sind.

Das Ziel dieses Dokuments besteht in der Simulation von praktischen Bedingungen einer luftübertragenen Desinfektion in einer Laborsituation; entsprechend des nachstehend festgelegten Verfahrens werden obligatorische Bedingungen festgelegt. Zusätzliche Bedingungen werden ebenfalls vorgeschlagen.

Der Prüfbericht legt die Bedingungen fest, unter denen die Prüfungen durchgeführt werden und fasst diese zusammen.

Die Prozesse werden im Allgemeinen nach einem Reinigungsverfahren eingeführt und danach entsprechend den Anwendungsbereichen unter Bedingungen niedriger Belastung oder bei einem niedrigen Verschmutzungsgrad geprüft. Bei einigen spezifischen Anwendungen und entsprechend den Empfehlungen des Herstellers können in Gegenwart anderer Belastungssubstanzen unter zusätzlichen Bedingungen auch andere Bewertungsverfahren in Betracht gezogen werden.

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 folgenden Begriffe.

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

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

3.1 chemisches Verfahren

Verfahren, bei dem der Wirkstoff eine chemische Substanz ist, die in gasförmiger, flüssiger oder fester Form diffundiert; das Verfahren schließt das chemische Produkt und das Diffusionssystem ein, die nicht getrennt bewertet werden können

3.2

automatisches luftübertragenes Desinfektionsverfahren

Verfahren, bei dem ein Gas, Dampf und/oder Aerosol ohne die Notwendigkeit menschlichen Eingreifens aus einer Freisetzungsquelle diffundiert (d.h. ein luftübertragenes Desinfektionsverfahren), wobei das luftübertragende Desinfektionsverfahren auf Oberflächen und nicht zur Desinfektion der Luft selbst angewendet wird

3.3

desinfizierende Wirkung eines luftübertragenen Desinfektionsverfahrens

biozides Verfahren mit dem Vermögen, die Anzahl der lebensfähigen Mikroorganismen zu verringern, die unter den in diesem Dokument beschriebenen Bedingungen mit den von festgelegten Stämmen, die zu sieben Gruppen von Mikroorganismen gehören: Bakterien, Bakteriensporen, Hefen, Schimmelpilze, Viren, Bakteriophagen und Mykobakterien, unter festgelegten Bedingungen erhaltenen Daten rückgewonnen und gezählt werden können

Anmerkung 1 zum Begriff: Die in der nachfolgenden Auflistung enthaltenen Wirkungen sollten festgelegt werden: bakterizide, sporizide, fungizide, levurozide, viruzide Wirkung, viruzide Wirkung gegenüber bakteriophager, tuberkulozider und mykobakterizider Wirkung.

3.4

Verteilungsprüfung

Anordnung von mikrobiologischen Belastungskeimträgern auf eine Weise, die sicherstellt, dass die Kombination von Prüfkörper und Produkt die ausgewiesene desinfizierende Wirkung im gesamten umschlossenen Raum erreicht; sie wird nach der Prüfung der Wirksamkeit oder parallel zu dieser durchgeführt

3.5

ergänzende obligatorische Bedingungen

Prüfbedingungen, die anstelle der obligatorischen Bedingungen angewendet werden, wenn die praktische Anwendung des Verfahrens und die Herstellerangaben klar und eindeutig außerhalb obligatorischen Prüfbedingungen liegen

3.6

sensitiver Stamm

Verlust beim Trocknen von mehr als 1,5 lg nach der Trocknungsphase, außerhalb der Einwirkdauer

4 Anforderungen

4.1 Prüfungen der Wirksamkeit

Das Verfahren, das einer Prüfung unter den in 5.5.4.2 festgelegten obligatorischen Versuchsbedingungen unterzogen wird, muss zu folgenden Reduktionsraten, angegeben als Logarithmus zur Basis 10, führen:

Bakterizide Wirkung:

- für den humanmedizinischen Bereich eine Reduktion von 5 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei den 4 angewendeten Bakterienstämmen (siehe 5.2.1.2, 5.2.1.3, 5.2.1.4, 5.2.1.5);
- für den Veterinärbereich eine Reduktion von 5 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei den 5 angewendeten Bakterienstämmen (siehe 5.2.1.1, 5.2.1.2, 5.2.1.3, 5.2.1.4, 5.2.1.6). Wie vorstehend
- für den Laborbereich der Lebensmittelindustrie eine Reduktion von 5 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei den 4 angewendeten Bakterienstämmen (siehe 5.2.1.1, 5.2.1.2, 5.2.1.3, 5.2.1.4). Wie vorstehend.

Sporizide Wirkung:

- für den humanmedizinischen Bereich, Veterinärbereich und Laborbereich der Lebensmittelindustrie eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei dem angewendeten, Sporen bildenden Bakterienstamm (siehe 5.2.1.7).

Fungizide Wirkung:

- für den humanmedizinischen Bereich, Veterinärbereich und Laboratorien der Lebensmittelindustrie eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei den beiden angewendeten Pilzstämmen (Hefe und Schimmelpilz) (siehe 5.2.1.8, 5.2.1.9).

Levurozide Wirkung:

- für den humanmedizinischen Bereich, Veterinärbereich und Laboratorien der Lebensmittelindustrie eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei dem angewendeten Hefestamm (siehe 5.2.1.8).

Viruzide Wirkung:

- für den humanmedizinischen Bereich und Laboratorien der Lebensmittelindustrie eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei den beiden angewendeten Stämmen (siehe 5.2.1.10, 5.2.1.11);
- für den Veterinärbereich eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei dem angewendeten Bakterienstamm (siehe 5.2.1.12).

Viruzide Wirkung gegenüber Bakteriophagen:

- für den humanmedizinischen Bereich, Veterinärbereich und Laboratorien der Lebensmittelindustrie eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei den beiden angewendeten Stämmen (siehe 5.2.1.13, 5.2.1.14).

Mykobakterizide Wirkung:

- für den humanmedizinischen Bereich und Laboratorien der Lebensmittelindustrie eine Reduktion von 4 lg oder größer auf Prüfkeimträgern im Vergleich zu nicht dem Verfahren ausgesetzten Kontrollkeimträgern bei den beiden angewendeten Stämmen (siehe 5.2.1.15, 5.2.1.16)

Die Anforderungen und Prüfverfahren sind in Anhang A zusammengefasst.

Die vorgesehenen Reduktionsraten werden als logarithmische Werte zur Basis 10 angegeben und sind von der Anwendung abhängig.

Die in der Tabelle in Anhang A angegebenen Reduktionsraten sind die Mindestreduktionsraten, die im Vergleich zu den Kontrollkeimträgern, die dem Prozess nicht ausgesetzt sind, auf Prüfkeimträgern erhalten werden müssen.

Diese Wirkungen dürfen unabhängig voneinander bestimmt werden, d. h. durch gesondertes Prüfen der unterschiedlichen mikrobiologischen Gruppen; die Prüfungen müssen nicht alle gleichzeitig durchgeführt werden.

Diese sieben Wirkungen müssen unter den in 5.5 festgelegten genormten Referenzversuchsbedingungen bestimmt werden.

Zusätzliche spezielle bakterizide, sporizide, fungizide, levurozide, viruzide (menschliche Viren), bakterio-phagizide und mykobakterizide Wirkungen können, wie jeweils anwendbar, bei anderen Zustandsgrößen bestimmt werden, von der Einwirkzeit bis hin zu Keimträgerart, Mikroorganismen, Volumen des Prüfraums oder Temperatur und Feuchte, um Bedingungen zu berücksichtigen, die bei den speziellen Anwendungen vorherrschen, die die Prozesse bereitstellen sollen.

Diese zusätzlichen Bedingungen müssen im Prüfbericht beschrieben, aufgezeichnet und angegeben werden.

4.2 Verteilungsprüfungen

Die Reduktion der Anzahl lebensfähiger Bakterienzellen im gesamten umschlossenen Raum muss mit *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 = CIP 4.83 (5.2.1.2) bestimmt werden, um auf jedem Prüfkeimträger eine Reduktion von mindestens 5 lg zu erhalten. Keimträger müssen in Übereinstimmung mit Anhang A, Teil 2 angeordnet werden. Die Prüfbedingungen müssen die in den Prüfungen der Wirksamkeit angewendeten reproduzieren.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Vorprüfung zur Validierung des Fehlens der Residualwirkung

Das Ziel der Vorprüfung besteht darin, zu identifizieren, ob es aufgrund des über die Keimträger in die Subkulturmedien (in Agarplatten und auf Membranen) überführten verbliebenen Desinfektionsmittels eine Residualwirkung gibt und um ein Verfahren zur Beseitigung dieser Wirkung zu finden. Es ist die eigentliche Prüfung, in der bestimmt wird, ob eher irgendeine tatsächliche bakterizide, fungizide, levurozide, sporizide, viruzide, einschließlich der gegenüber Bakteriophagen, und mykobakterizide Wirkung vorliegt als eine einfache örtlich begrenzte wachstumshemmende Wirkung.

Nicht kontaminierte Keimträger werden einer Einwirkung von Gas, Dampf und/oder Aerosol ausgesetzt.

Rückgewinnung in 100 ml (20 ml für viruzide Wirkung) steriles Flüssigmedium und Prüfen auf bakterio-statische Wirkung (oder fungistatische Wirkung oder Wirkungen in Bezug auf Sporenkeimungshemmung oder Verringerung der Zellanfälligkeit) aufgrund des an den Keimträgern anhaftenden Desinfektionsmittels, das eine hemmende Wirkung im Agarmedium und auf den Membranfiltern oder eine Verringerung des Restvirustiters erzeugen könnte.

5.1.2 Prüfung

Unter Anwendung von Mikroorganismen-Suspensionen werden 50 µl auf einen inerten Keimträger aufgetragen, der wie 5.2.3 beschrieben vorbereitet wurde.

Das Inokulum wird wie in 5.5.1.2.1 beschrieben ausgestrichen und an der Luft trocknen gelassen, danach wird die Keimträgerreihe unter den festgelegten Bedingungen unter direkter Einwirkung gehalten, wobei das Produkt durch das geprüfte Verfahren diffundiert wird.

Bakterien, Mykobakterien, Hefen, Schimmelpilze, Sporen, Viren oder Bakteriophagen werden durch Abschaben, Schütteln und erforderlichenfalls Ultraschallbehandlung, unter Verwendung der Keimträger in der Rückgewinnungsflüssigkeit rückgewonnen:

- bei Bakterien, Mykobakterien, Hefen, Schimmelpilzen und Sporen Verdünnung und Beimpfung von Agarplatten eines Teils der Rückgewinnungsflüssigkeit. Bebrütung mit anschließender Zählung der Kolonien. Membranfiltration der verbliebenen Rückgewinnungsflüssigkeit, danach Spülen zum Entfernen von so viel Desinfektionsmittel wie möglich. Membran wird auf das Agarmedium überführt. Keimträger wird im Agarmedium angeordnet. Bebrütung mit anschließender abschließender Zählung der Kolonien;

- bei Viren, Verdünnung eines Teils der Rückgewinnungsflüssigkeit und Prüfen auf lebensfähigen Virus durch Bebrütung und Bestimmung des Virustiters.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfkeime

In Abhängigkeit von der angestrebten Wirkung müssen bei den Prüfungen alle oder einige der folgenden Stämme verwendet werden.

Diese Stämme können aus biologischen Kultursammlungen von Referenzzentren bezogen werden. Die Prüfstämme sind:

Für Prüfungen der bakteriziden Wirkung:

- 5.2.1.1 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 = CIP 103-467 (DSM937);
- 5.2.1.2 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 = CIP 4.83 (DSM 799);
- 5.2.1.3 *Enterococcus hirae* ATCC 10541 = CIP 5855 (DSM3320);
- 5.2.1.4 *Escherichia coli* ATCC 10536 = CIP 54127 (DSM682);
- 5.2.1.5 *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 = CIP 70.34 (DSM30007);
- 5.2.1.6 *Proteus vulgaris* ATCC 13315 = CIP 58.60 (DSM30118).

Für Prüfungen der sporiziden Wirkung:

- 5.2.1.7 Sporen von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 = CIP 52 62.

Für Prüfungen der levuroziden Wirkung:

- 5.2.1.8 *Candida albicans* ATCC 10231 = IP 4872 (DSM 1386).

Für Prüfungen der fungiziden Wirkung:

- 5.2.1.8 *Candida albicans* ATCC 10231 = IP 4872 (DSM 1386);
- 5.2.1.9 *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 = IP 1431-83 (DSM1988).

Für Prüfungen der viruziden Wirkung:

- 5.2.1.10 Murines Parvovirus, Crawford-Stamm, ATCC VR-1346, kultiviert auf Zelllinie A9;
- 5.2.1.11 Adenovirus Typ 5, Stamm adenoid, ATCC VR-5. Adenovirus, kultiviert auf HeLa-Zellen oder anderen Linien mit geeigneter Anfälligkeit;
- 5.2.1.12 Porzines Parvovirus NADL2, Stamm auf ST-Zellen oder anderer entsprechender Zelllinie kultiviert.

Für Prüfungen der viruziden Wirkung gegenüber Bakteriophagen:

- 5.2.1.13 Bakteriophage für *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* P001 (DSM 4262);
- 5.2.1.14. Bakteriophage für *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* P008 (DSM 10567).

Die Vermehrung dieser beiden Phagen muss durch den folgenden Wirtstamm erreicht werden: *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* F7/2 (DSM 4366).

Für die mykobakterizide Wirkung:

- 5.2.1.15. *Mycobacterium avium* ATCC 15769 = CIP 105415;
- 5.2.1.16 *Mycobacterium terrae* ATCC 15755 (tuberkulozide Wirkung).

Beide Organismen müssen geprüft werden, außer für den Veterinärbereich, in dem nur *Mycobacterium avium* erforderlich ist.

Diese Stämme können aus biologischen Kultursammlungen von Referenzzentren bezogen werden.

Verwendung anderer Mikroorganismen

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

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in diesem Dokument angegebenen Massen chemischer Substanzen beziehen sich auf die wasserfreien Salze.

Wasserhaltige Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um dadurch folgende Differenzen in den relativen Molekulargewichten auszugleichen.

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

5.2.2.2 Kulturmedien für Bakterien, Hefen, Schimmelpilze, Sporen und Mykobakterien

5.2.2.2.1 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes und darf nicht entmineralisiertes Wasser sein.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

ANMERKUNG 1 Steriles destilliertes Wasser ist für die Vorbereitung von Suspensionsversuchen notwendig. Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. zur Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG 2 Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionszwecke verwendet werden.

5.2.2.2.2 Agar für die Keimzahlbestimmung (Trypton-Soja-Agar: TSA)

Für die Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Bakterienzellen (5.2.1.1 bis 5.2.1.6)

Trypton, tryptisch verdautes Casein	15,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	5,0 g

NaCl	5,0 g
Agar	15,0 g
Wasser bis auf	1 000 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($7,2 \pm 0,2$) betragen, wenn er bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gemessen wird.

Bei Bedarf wird dem Medium ein Neutralisationsmedium zugesetzt (und die Zugabe im Prüfbericht aufgezeichnet).

5.2.2.3 Agar für die Aufbewahrung von Stämmen 5.2.1.1 bis 5.2.1.6 (siehe 5.2.2.1.2) ohne Neutralisationsmedium

5.2.2.3.1 Verdünnungsmittel für mikrobielle Suspensionen

Bakterien, Pilze, Hefe und Sporen

Kochsalz-Trypton-Lösung:

— Trypton, tryptisch verdautes Casein	1,0 g
— Natriumchlorid	8,5 g
— Wasser (siehe 5.2.2.1.2) bis auf	1 000 ml

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

Mykobakterien: **Kochsalz-Trypton-Lösung (siehe 5.2.2.1.4.1) oder destilliertes Wasser (siehe 5.2.2.1.1)**

Das Verdünnungsmittel darf zwischen den Prüfkeimen und dem zu prüfenden Desinfektionsmittelprodukt keine Beeinträchtigungen hervorrufen.

5.2.2.3.2 Malzextrakt-Agar (MEA)

Für die Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Hefe- und Schimmelpilzzellen (5.2.1.8. und 5.2.1.9).

Malzextrakt (technische Reinheit)	30,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (siehe 5.2.2.1.2) bis auf	1 000 ml

Der Malzextrakt muss Lebensmittelqualität (z. B. Cristomalt Powder, erhältlich bei Difal) oder eine gleichwertige Qualität besitzen, darf nicht hochrein sein und nicht nur Maltose enthalten (z. B. Malzextrakt, erhältlich bei OXOID).

ANMERKUNG Diese Informationen werden von AFNOR zum Zwecke der Benutzerfreundlichkeit dieses Dokuments zur Verfügung gestellt und stellt keine Verpflichtung von AFNOR gegenüber diesem Produkt dar; gleichwertige Produkte können verwendet werden, wenn nachgewiesen wurde, dass sie zu den gleichen Ergebnissen führen.

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

Bei Bedarf wird dem Medium ein Neutralisationsmedium zugesetzt (und die Zugabe im Prüfbericht aufgezeichnet).

5.2.2.3.3 Medium für die Aufbewahrung von Stämmen 5.2.1.8 bis 5.2.1.9 (siehe 5.2.2.1.6) ohne Neutralisationsmedium (5.2.2.1.5)

5.2.2.3.4 Flüssigkeit zur Gewinnung von Mikroorganismen und zum Spülen der Membran

Zusammensetzung:

Trypton, tryptisch verdautes Casein	1,0 g
Natriumchlorid	8,5 g
Wasser (siehe 5.2.2.1.2) bis auf	1 000 ml

Herstellung

Natriumchlorid und Trypton werden in Wasser gelöst. Ein beliebiges, speziell für das zu untersuchende Desinfektionsmittel ausgelegtes Neutralisationsmittel, wird zugegeben.

Das Verdünnungsmittel wird in Chargen von großem Volumen hergestellt und danach in geeignete kleinere Kolben verteilt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven.

Bei Mykobakterien (5.2.2.1.1) wird stattdessen Wasser verwendet.

5.2.2.3.5 Rekonstituierte Milch zur Herstellung des Arbeitsinokulums

Die rekonstituierte Magermilch (1,5 % Fett) wird wie folgt hergestellt:

Magermilchpulver, garantiert frei von Antibiotika und Zusatzstoffen, wird im Verhältnis von 100 g Pulver je 1 l destilliertes Wasser rekonstituiert.

Es wird 30 min bei $(105 \pm 3)^\circ\text{C}$ (oder 5 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$) sterilisiert

5.2.2.3.6 Agar für Mykobakterien (siehe 5.2.1.15. und 5.2.1.16)

Middlebrook-Cohn-7H10-Medium +10 % Ölsäure-Albumin-Dextrose-Komplex (OADC) (nachfolgend als 7H10 angeführt)

Zur Bestimmung der Anzahl lebensfähiger Mykobakterien:

— Middlebrook-7H10-Agar	19 g;
— Glycerol	5 ml;
— Wasser (siehe 5.2.2.1.2) bis auf	895 ml

Zur vollständigen Auflösung wird bis zum Sieden erhitzt. Nach 10 min Sterilisation im Autoklaven erfolgt Abkühlen auf 50°C bis 55°C in einem Wasserbad.

Unter aseptischen Bedingungen werden 100 ml Middlebrook-Medium mit OADC-Anreicherung zugegeben. Endgültiger pH-Wert = 6,6, bei 20°C .

5.2.2.3.7 Medium für Sporen (Stamm 5.2.1.7)

Trypton-Soja-Agar (TSA). Für die Bestimmung der Anzahl von lebensfähigen Bacillussporen:

Trypton, tryptisch verdautes Casein	15,0 g
Sojapepton, Papain-Auflösung von Sojabohnenmehl	5,0 g

Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (siehe 5.2.2.1.2) bis auf	1 000 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven (5.3.2.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($7,2 \pm 0,2$) betragen, wenn er bei (20 ± 1) °C gemessen wird.

Für Sporen dürfen andere Medien verwendet werden: siehe Anhang D.

5.2.2.4 Kulturmedien und Reagenzien zur Vorbereitung des Virus (Stämme 5.2.1.10 bis 5.2.1.12)

5.2.2.4.1 Wachstum und Aufbewahrung von Medien

Es sollte Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) oder ein gleichwertiges Medium verwendet werden, ergänzt mit einer geeigneten Konzentration von mykoplasmafreiem inaktiviertem fetalen Kälberserum, Antibiotika und weiteren Wachstumsfaktoren je nach Erfordernis (siehe EN 14476 und EN 14675).

5.2.2.4.2 Kulturmedien und Reagenzien zur Vorbereitung von Bakteriophagen (Stämme 5.2.1.13 bis 5.2.1.14)

5.2.2.4.2.1 M17-Kulturbouillon

Für die Aufbewahrung des Wirtsbakterienstammes, die Vermehrung von Bakteriophagen und die Herstellung des Phagen-Verdünnungsmittels:

Phytonpepton (aus Sojamehl)	5,0 g;
Polypepton (aus Casein und Tiergewebe)	5,0 g;
Rinderextraktpulver	5,0 g;
Hefeextrakte	2,5 g;
D(+)-Lactose	5,0 g;
Ascorbinsäure	0,5 g;
Natrium- β -Glycerophosphat	19,0 g;
Magnesiumsulfat, 7 H ₂ O	0,2 g;
Wasser (siehe 5.2.2.1.2) bis auf	1 000 ml

Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($7,0 \pm 0,2$) betragen, wenn er bei (20 ± 1) °C gemessen wird.

Wenn M17-Bouillon das bei der Herstellung des Neutralisationsmediums verwendete Verdünnungsmittel ist (siehe EN 13610), sollte doppelt konzentriert hergestellte M17-Bouillon verwendet werden (d. h. die Konzentration aller den 1 000 ml Wasser zugegebenen Bestandteile sollte verdoppelt werden).

5.2.2.4.3 M17-Agar (Unterschichtagar)

Unterschichtagar für das quantitative Zählen von Lysebereichen (Plaques), die von einzelnen infektiösen Bakteriophagenpartikeln in dem Bakterienrasen der Wirtsbakterien erhalten werden.

15 g Agar werden zu 1 000 ml M17-Bouillon gegeben. Der Agar wird durch Sieden unter ständigem Rühren gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($7,0 \pm 0,2$) betragen, wenn er bei 20 °C gemessen wird. Wenn der Agar auf (45 ± 1) °C abgekühlt ist, werden 10 ml einer sterilen 1 mol/l CaCl_2 -Stammlösung (siehe 5.2.2.3.6) zugegeben. Es wird leicht gemischt und 15 ml bis 18 ml Agar in Petrischalen gefüllt.

5.2.2.4.4 Überschichtungsagar (Deckagar, Weichagar)

Für das Zählen der Bakteriophagen: 6,5 g Agar werden in 1 000 ml M17-Bouillon gelöst (es wird unter ständigem Rühren bis zum Sieden erwärmt). Der geschmolzene Agar wird in Reagenzgläser gefüllt (2,5 ml bis 3 ml je Reagenzglas).

Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

5.2.2.4.5 Phagen-Verdünnungsmittel (basierend auf 1 : 4 verdünnter Ringerlösung)

Zur Herstellung der Verdünnungsreihen, die für die Bestimmung des Titters der Phagensuspensionen (Zählen der von dem Phagen stammenden Lysebereichen) vorgesehen sind:

1 : 4 verdünnte Ringerlösung:

- Natriumchlorid 2 250 g;
- Kaliumchlorid 0,105 g;
- Calciumchlorid, wasserfrei 0,060 g;
- Natriumhydrogencarbonat 0,050 g;
- Wasser (siehe 5.2.2.1.2) bis auf 1 000 ml.

10 ml M17-Kulturbouillon werden 90 ml 1 : 4 verdünnte Ringerlösung hinzugegeben.

Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren. Vor Gebrauch wird 1 ml einer 1 mol/l CaCl_2 -Stammlösung zu 100 ml Verdünnungsbouillon hinzugegeben.

ANMERKUNG Ringerlösung kann aus fertigen Tabletten nach den Empfehlungen des Herstellers hergestellt werden.

5.2.2.4.6 SM-Pufferlösung

Zur Resuspension und Aufbewahrung der intakten Phagenpartikel:

- TRIS/HCl 2,4 g;
- NaCl 5,8 g;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2,5 g;
- Wasser (siehe 5.2.2.1.2) bis auf 1 000 ml.

Der pH-Wert der Pufferlösung wird auf ($7,4 \pm 0,1$) eingestellt. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

5.2.2.4.7 CaCl_2 -Stammlösungen (1 mol/l und 0,05 mol/l)

Es werden entweder 110,99 g oder 5,55 g wasserfreies CaCl_2 in Wasser (5.2.2.1.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt, um die 1 mol/l bzw. die 0,05 mol/l Stammlösung herzustellen. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

5.2.2.4.8 Milchsäurelösung (10 % Volumenkonzentration)

Sie dient zur Ansäuerung von Milch mit niedrigem Fettgehalt für die Zubereitung von Sauermolke.

Eine Stammlösung mit 90 % Volumenkonzentration aus Milchsäure wird mit Wasser (siehe 5.2.2.1.2) verdünnt, um eine Gebrauchslösung mit 10 % Volumenkonzentration herzustellen. Dafür werden 8 Anteile Wasser zu einem Anteil Stammlösung gegeben. Die Sterilisation erfolgt durch Autoklavieren.

5.2.2.5 Belastungssubstanzen (siehe Anhang C)

5.2.2.5.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz(en) sollte(n) nach dem Anwendungsbereich des Verfahrens ausgewählt werden (siehe Anhang C).

Wenn bei sensitiven Stämmen (*) eine übermäßige Trocknungsverlustgeschwindigkeit (z. B. Referenzstämme wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* und/oder andere zusätzliche Stämme wie *Proteus hauseri*) festgestellt wird, ist zur Begrenzung des Trocknungsverlustes das Hinzufügen von Magermilch mit einer Verdünnung von 1 : 20 zu der (den) empfohlenen Belastungssubstanz(en) zulässig.

Die Belastungssubstanz(en) muss (müssen) steril sein und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem 10-Fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

Das Verfahren der Herstellung und Sterilisation sowie die Zusammensetzung müssen im Prüfbericht aufgezeichnet werden.

(*) Unter sensitiven Stämmen werden die Bakterien- und Hefestämme verstanden, die die Anforderung der Norm bezüglich der Keimzahl des Kontrollinokulums nach der Kombination der Trocknungsphase (45 min) und der Einwirkzeit (innerhalb einer Grenze von 15 h, was einer üblichen nächtlichen Einwirkung über Nacht in einer industriellen Umgebung entspricht) üblicherweise nicht erfüllen.

5.2.2.5.2 Bedingungen für im humanmedizinischen Bereich verwendeten Desinfektionsmitteln (siehe Anhang C): Belastungssubstanzen

5.2.2.5.3 Bedingungen für im Veterinärbereich verwendeten Desinfektionsmitteln (siehe Anhang C): Belastungssubstanzen

5.2.2.5.4 Bedingungen für im Bereich Lebensmittelindustrie verwendeten Desinfektionsmitteln (siehe Anhang C): Belastungssubstanzen

5.2.3 Verwendete mikrobielle Keimträger

5.2.3.1 Allgemeines

Für jede Prüfung müssen neue Keimträger verwendet werden.

5.2.3.2 Genormte Keimträger

Scheiben aus nichtrostendem Stahl 1 4301 (EN 10088-1), Durchmesser 3 cm bis 4 cm, nach EN 10088-2 als Sorte 2B bewertet, beidseitig poliert.¹⁾ Die Oberflächen sollten so eben wie möglich sein; es wird nichtrostender Stahl mit einer Dicke von 1,2 mm oder 1,5 mm verwendet. Sie dürfen nur einmal verwendet und müssen dann verworfen werden.

Vor der Verwendung sollten die Flächen 60 min in einem Becherglas (Mindestfassungsvermögen: 50 ml) angeordnet werden, das mindestens 20 ml Decon®¹⁾ mit einer Volumenkonzentration von 5 % (V/V) enthält. Die Scheiben werden danach sofort 10 s unter laufendem frisch destilliertem Wasser gespült.

Die Fläche darf zwischenzeitlich in keiner Weise trocknen. Die Scheiben dürfen nur mit einer Pinzette gehandhabt werden. Die Prüfflächen werden weitere 10 s unter fließendem Wasser gespült, um die vollständige Entfernung des Detergens sicherzustellen. Um einen ausreichenden Wasserstrom zu erreichen, kann ein Druckgefäß mit geeignetem Schlauch und Verbindungen oder ein anderes geeignetes Verfahren zur Lieferung einer sterilisierten Flüssigkeit verwendet werden, mit dem die Zufuhr auf etwa 2 000 ml je min eingestellt werden kann. Für die Dekontamination wird die saubere Scheibe für 15 min in ein Bad mit Isopropanol mit einer Volumenkonzentration von 70 % (V/V) gegeben. Die Scheibe wird herausgenommen und mittels Verdunstung in einem laminaren Luftstrom getrocknet.

5.2.3.3 Zusätzliche Keimträger

Unter der Voraussetzung, dass er porenfrei und im Prüfbericht genau beschrieben ist, darf jeder Keimträger benutzt werden.

Die Keimträger müssen zum Ausstreichen eines 50 µl-Inokulums auf einer Oberfläche mit einer Fläche von 3 cm² (2 cm Durchmesser) geeignet sein. Die Umsetzbarkeit des Ausstreichens auf diesem Keimträger wird verifiziert. Sie müssen danach dafür geeignet sein, dass sie in einen 150-ml- bis 500-ml-Behälter und zum Plattieren in eine Petrischale eingebracht werden können.

Die Anforderungen an die Reinigung, Desinfektion und/oder Sterilisation müssen entsprechend dem Keimträgerformat und der Art des Materials bestimmt und genau im Prüfbericht angegeben werden.

5.3 Geräte und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

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

- durch feuchte Hitze im Autoklaven [5.3.2.1 a)],
- durch trockene Hitze im Heißluftsterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte

5.3.2.1 Sterilisator

- a) zur Sterilisation durch feuchte Hitze ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min bei (121_{+3}^{-0}) °C gehalten werden kann;

1) Decon® ist ein Beispiel eines geeigneten handelsüblichen Produktes. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

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

5.3.2.2 Wasserbad, thermostatisch geregeltes Bad bei $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$.

5.3.2.3 Brutschränke

- Bakteriologischer Brutschrank, mit oder ohne Luftaustausch, geregelt auf $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, was für die Trocknung von kontaminierten Keimträgern in weniger als 2 h entscheidend ist.
- Brutschrank (für bakterizide Wirkung), einstellbar auf eine Temperatur von entweder $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Brutschrank (für levurozide, fungizide, sporizide, viruzide, viruzide Wirkung gegenüber bakteriophager Wirkung), einstellbar auf eine Temperatur von $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$.
- CO_2 -Brutschrank (95 % Luft, 5 % CO_2), einstellbar auf eine Temperatur von entweder $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ zur Bebrütung von Zellkulturen und Viren.

5.3.2.4 pH-Messgerät mit einer Fehlergrenze von $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, für die Messung des pH-Werts der Agarmedien sollte eine Einstichelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

5.3.2.5 Stoppuhr

5.3.2.6 Mechanisches oder elektromechanisches Schüttelgerät

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem mit den zu filtrierenden Substanzen kompatiblen Material.

Das Gerät muss mit einem analytischen Filterhalter mit einem Mindestvolumen von 50 ml ausgestattet sein. Es muss für die Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von $0,22\ \mu\text{m}$ geeignet sein.

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

5.3.2.8 Kühlschrank, Temperatur einstellbar auf 2°C und 8°C

5.3.2.9 Kalibrierte Messpipetten mit Nennvolumina von 10 ml, 2 ml, 1 ml und 0,1 ml. Kalibrierte automatische Pipetten dürfen verwendet werden.

5.3.2.10 Petrischalen in den Größen 90 mm bis 100 mm im Durchmesser und 55 mm für die Membranen

5.3.2.11 Glasperlen (Durchmesser: 3 mm bis 4 mm)

5.3.2.12 Glasfilterfritte, Porenweite im Bereich zwischen $40\ \mu\text{m}$ und $100\ \mu\text{m}$ (ISO 4793) = Porenweite 2

5.3.2.13 Laborzentrifuge, mit einer Beschleunigung von $2\ 000\ g$ ($4\ 000\ g$ für Bakteriophagen)

5.3.2.14 Roux-Flasche mit geradem Hals

5.3.2.15 Analysenwaage mit entsprechendem Betriebsbereich

5.3.2.16 Spektralphotometer, ausgestattet mit einem Monochromator

5.3.2.17 Vakuumpumpe

5.3.2.18 sterile Membranfilter mit hydrophobem Gitternetz, 0,45 µm Porenweite (Durchmesser 47 mm bis 50 mm), aus Celluloseester oder jeglichem an das Prüfprodukt angepassten anderen Werkstoff

5.3.2.19 Vorrichtung zum Halten der Keimträger bei einem festgelegten Abstand zur Quelle

5.3.2.20 Mikroskop, vorzugsweise ein Phasenkontrastmikroskop (für die Prüfungen der sporiziden Wirkung) und Umkehrmikroskop für die viruzide Wirkung

5.3.2.21 Pinzette

5.3.2.22 Reagenzgläser (Durchmesser 18 mm oder 20 mm)

5.3.2.23 Behälter: Kolben oder Gefäße mit entsprechendem Fassungsvermögen

5.3.2.24 Erlenmeyerkolben mit breiterem Rand, Fassungsvermögen 250 ml oder 500 ml

5.3.2.25 Kolben mit Schraubverschluss

5.3.2.26 Mikropipetten mit Einwegspitzen, die 0,05 ml = 50 µl, zum Auftragen des Inokulums abgeben

5.3.2.27 Ultraschall-Schwinger, zwischen 30 kHz und 43 kHz

5.3.2.28 Magnetrührer, um die Zellen vor dem Abimpfen in Suspension zu halten

5.3.2.29 Petrischalen, sterile Reagenzgläser, Kulturgefäße mit geeignetem Fassungsvermögen

5.3.2.30 Messkolben, kalibriert bei 20 °C

5.3.2.31 Sterile 96-Well Mikrotiterplatten, 6- bis 8-Well-Platten für die Zellkultur und Gefäße mit der Zellkultur.

5.3.2.32 Eismaschine oder handelsübliches Eis zum Kühlen des Zellerhaltungsmediums und der Reaktionsgemische während der Prüfung

5.3.2.33 Becken als Eisbad mit Eis und Wasser

5.3.2.34 Biologische Sicherheitswerkbank der Klasse II (darf ebenfalls während des Trocknungsvorgangs des Inokulums verwendet werden)

5.3.2.35 Tiefkühleinrichtung mit Temperaturen von höchstens –70 °C

5.3.2.36 Trockenvorrichtung mit Unterdruckmanometer oder Verwendung von MSS mit Luftaustausch als Alternative für den Trocknungsvorgang des Inokulums auf Keimträgern

5.3.2.37 Hochgeschwindigkeitshomogenisator, z. B. Potter-Homogenisator:

5.4 Herstellung und Auszählung von Prüfsuspensionen

5.4.1 Herstellung von Prüfsuspensionen (Bakterien, Hefen, Schimmelpilze, Sporen und Mykobakterien)

5.4.1.1 Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüfkeimen

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

5.4.1.2 Gebrauchskultur der Prüfkeime

5.4.1.2.1 Bakterien- und Schimmelpilzsuspensionen

a) Bakterien

Um die Gebrauchskultur der Prüfkeime herzustellen, wird eine Subkultur von der Stammkultur auf TSA angelegt und bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet.

Nach 18 h bis 24 h wird aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise eine zweite Subkultur angelegt und 18 h bis 24 h bebrütet. Aus dieser zweiten Subkultur darf auf die gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden.

ANMERKUNG 1 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 verblieben ist. In diesem Fall wird eine weitere 24-h-Subkultur vor der Durchführung der Prüfung hergestellt.

Bei zusätzlichen Stämmen muss jede von diesem Bakterienkulturrenverfahren oder Prüfsuspensionsherstellungsverfahren auftretende Abweichung mit der Begründung im Prüfbericht aufgezeichnet werden.

Es wird bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet.

b) Schimmelpilze und Hefen

Um die Gebrauchskultur von *Candida albicans* herzustellen, wird eine Subkultur von der Stammkultur auf MEA hergestellt und bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet. Nach 42 h bis 48 h wird aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise eine zweite Subkultur angelegt und 18 h bis 24 h bebrütet. Aus dieser zweiten Subkultur darf auf gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden.

ANMERKUNG 2 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 72-h-Subkultur für die nachfolgenden Subkulturen unter der Voraussetzung verwendet werden, dass die Subkultur während der 72 h im Brutschrank verblieben ist. In diesem Fall wird eine weitere 48-h-Subkultur vor der Durchführung der Prüfung hergestellt. Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

Bei *Aspergillus brasiliensis* wird die erste auf MEA in Roux-Flaschen gewachsene Subkultur verwendet und sieben bis neun Tage bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet.

5.4.1.2.2 Sporensuspensionen

Von den Sporen werden keine Subkulturen angelegt, werden aber in Form einer Stammsuspension aufbewahrt (siehe Anhang D).

5.4.1.2.3 Mykobakteriensuspensionen

Für die Herstellung der Gebrauchskultur von *Mycobacterium avium* und *Mycobacterium terrae* wird eine erste Subkultur aus der Stammlösung angelegt (5.4.1.1):

Es werden mindestens zwei Platten mit 7H10-Medium (siehe 5.2.2.1.9) beimpft und in einem Brutschrank bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet (um zu verhindern, dass die Platten austrocknen, wird ein

CO₂-Brutschrank verwendet oder die Platten in Polyethylenbeuteln angeordnet oder mit isolierendem Klebeband abgedichtet in einen Wärmeschrank gelegt, um zu verhindern, dass das Medium austrocknet, und bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet.

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.

Bei zusätzlichen Prüfstämmen muss jede von diesem Mykobakterienkulturrenverfahren oder Prüfsuspensionsherstellungsverfahren auftretende Abweichung, zusammen mit der Begründung, die eine derartige Abweichung rechtfertigt, im Prüfbericht aufgezeichnet werden.

5.4.2 Herstellung von Suspensionen in Belastungssubstanzen

5.4.2.1 Bakterienstämme 5.2.1.1 bis 5.2.1.6

Es werden 10 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.1.4) mit 5 g Glasperlen in einen 100-ml-Kolben gefüllt.

Eine Ösenfüllung der Gebrauchskultur wird in das Verdünnungsmittel (5.2.2.1.4) überführt.

Das Suspendieren der Zellen im Verdünnungsmittel sollte durch Reiben der Öse an der Wand des Kolbens erfolgen, um die Zellen vor dem Eintauchen in das Verdünnungsmittel voneinander zu trennen. Unter Verwendung eines mechanischen Schüttelgeräts wird der Kolben 3 min geschüttelt.

Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in ein anderes Röhrchen überführt.

Die Anzahl der Zellen in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.1.4) eingestellt, wobei die Anzahl der Einheiten entweder spektralphotometrisch oder durch ein anderes geeignetes Verfahren auf zwischen 5×10^7 KBE/ml und 2×10^9 KBE/ml geschätzt wird.

Diese Prüfsuspension wird im Wasserbad bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufbewahrt und nach der Herstellung innerhalb von 2 h verwendet.

Bei der Trocknung von sensitiven Mikroorganismenstämmen (siehe Definition in 5.2.2.4), z. B. Referenzstämmen wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und/oder zusätzlichen Stämmen wie *Proteus hauseri* können methodische Anpassungen wie folgt zulässig sein, wenn die Normbedingungen nicht erreicht werden können.

Diese Anpassungen erfolgen zusätzlich zu der (den) Belastungssubstanz(en).

Erster Schritt zur Anpassung²⁾: Hinzufügen von Magermilch zur (zu den) Belastungssubstanz(en) mit einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 20.

Zweiter Schritt zur Anpassung²⁾: zulässig, wenn Normbedingungen nicht erreicht werden können, wenn der erste Schritt zur Anpassung erfolgt ist.

2) Der erste oder zweite Schritt zur Anpassung könnte weggelassen werden und direkt mit dem zweiten oder dritten Schritt zur Anpassung für Stämme, deren Sensitivität gegenüber Trocknung und Einwirkdauer im Vorfeld nachgewiesen wurde, fortgefahren werden.

Erhöhen des Ausgangsinokulums bis auf 5×10^9 , um nach der Trocknung und Einwirkzeit einen endgültige Prüftiter von 10^6 zu erhalten.

Im Anschluss Hinzufügen der Belastungssubstanz(en), um davon eine 1 : 10-Verdünnung zu erhalten (siehe Anhang C).

Dritter Schritt zur Anpassung: zulässig, wenn Normbedingungen nicht erreicht werden können, wenn der zweite Schritt zur Anpassung erfolgt ist.

Erhöhen des Ausgangsinokulums bis auf 5×10^9 und Hinzufügen von Magermilch²⁾ zur (zu den) Belastungssubstanz(en) mit einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 20: Der erste oder zweite Schritt zur Anpassung könnte weggelassen werden und direkt der zweite oder dritte Schritt zur Anpassung für Stämme, deren Sensitivität gegenüber Trocknung und Einwirkdauer im Vorfeld nachgewiesen wurde, angewendet werden.

5.4.2.2 Bakterielle Sporen 5.2.1.7

- Stammprüfsuspension des Sporen-Stamms: die Stammsuspension von *Bacillus subtilis*-Sporen wird in Übereinstimmung mit Anhang D im Prüflabor hergestellt.
- Prüfsporen-Suspension: zum Herstellen der Prüfsporen-Suspension wird die Sporen-Stammsuspension mit Verdünnungsmittel 5.2.2.1.5 verdünnt.

Dieser Suspension wird die Belastungssubstanz zugegeben, um ein Verdünnungsverhältnis von 1 : 10 zwischen Belastungssubstanz und Suspension zu erhalten. Die endgültige Sporentiter muss zwischen 2×10^5 KBE/ml und 5×10^5 KBE/ml liegen. Das Labor, das die Prüfungen durchführt, muss die Genauigkeit der für Vorprüfungen erhaltenen Titer sicherstellen.

Diese Prüfsuspension wird im Wasserbad bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufbewahrt und innerhalb von 2 h verwendet.

Eine mikroskopische Untersuchung mit 400facher Vergrößerung muss unmittelbar nach dem Herstellungsschritt und unmittelbar vor der Prüfung durchgeführt werden, um das Fehlen von vegetativen Zellen und keimfähigen Sporen zu belegen.

Im Falle, dass 1 % keimfähige Sporen vorhanden sind, muss die Suspension verworfen werden.

5.4.2.3 Stamm *Candida albicans* 5.2.1.8

Es werden 10 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.1.4) mit 10 g Glasperlen in einen 100-ml-Kolben gefüllt.

Die Gebrauchskultur wird ösenweise in das Verdünnungsmittel überführt. Das Suspendieren der Zellen im Verdünnungsmittel sollte durch Reiben der Öse an der Wand des Kolbens erfolgen, um die Zellen vor dem Eintauchen in das Verdünnungsmittel voneinander zu trennen. Unter Verwendung eines mechanischen Schüttelgeräts wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in ein anderes Röhrchen überführt. Die Anzahl der Zellen in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel eingestellt, wobei die Anzahl der Einheiten entweder spektralphotometrisch oder durch ein anderes geeignetes Verfahren abgeschätzt wird.

Dieser Suspension wird entsprechend dem in Anhang C festgelegten Fall die Belastungssubstanz zugegeben, um ein Verdünnungsverhältnis von 1 : 10 zu erhalten. Der endgültige Titer von *Candida albicans* muss zwischen 2×10^7 KBE/ml und 1×10^8 KBE/ml liegen.

Diese Prüfsuspension wird im Wasserbad bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufbewahrt und nach der Herstellung innerhalb von 2 h verwendet.

Bei der Trocknung von sensitiven Mikroorganismenstämmen (siehe Definition in 5.2.2.4), z. B. einem Referenzstamm wie *Candida albicans* und/oder zusätzlichen Stämmen können methodische Anpassungen

wie folgt zulässig sein, wenn die Normbedingungen nicht erreicht werden können (Reduktion des Kontrolltiters um mehr als 1,5 lg und endgültiger Kontrolltiter nach der Trocknung und der Einwirkzeit geringer als 10^5):

Erster Schritt zur Anpassung²⁾:

Erster Schritt zur Anpassung: Hinzufügen von Magermilch zur (zu den) Belastungssubstanz(en) mit einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 20.

Zweiter Schritt zur Anpassung²⁾: zulässig, wenn festgelegte Normbedingungen nicht erreicht werden können, wenn der erste Schritt zur Anpassung erfolgt ist.

Erhöhen des Ausgangsinokulums bis auf 5×10^8 , um einen endgültigen Prüftiter von 10^5 nach der Trocknung und Einwirkzeit zu erhalten.

Im Anschluss Hinzufügen der Belastungssubstanz(en), um davon eine 1 : 10-Verdünnung zu erhalten.

Dritter Schritt zur Anpassung: zulässig, wenn Normbedingungen nicht erreicht werden können, wenn der zweite Schritt zur Anpassung erfolgt ist.

Erhöhen des Ausgangsinokulums bis auf 5×10^8 und Hinzufügen von Magermilch zur (zu den) Belastungssubstanz(en) mit einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 20.

5.4.2.4 Stamm *Aspergillus brasiliensis* 5.2.1.9

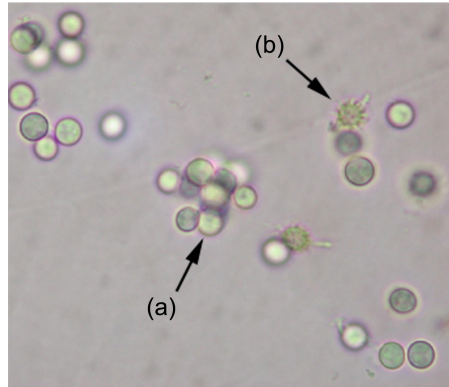
Die Zellen der Gebrauchskultur werden in 10 ml einer sterilen Polysorbat-80-Lösung mit einer Massenkonzentration von 0,05 % (m/V) in Wasser 5.2.2.1.5 suspendiert. Die Konidiosporen werden mit einem sterilen Glasspatel von der Oberfläche der Kultur gelöst. Die Suspension wird zusammen mit den Glasperlen in einen Erlenmeyerkolben überführt und 1 min leicht geschüttelt. Die Suspension wird durch eine Glasfilterfritte filtriert.

Unmittelbar nach der Herstellung der Prüfsuspension wird eine mikroskopische Untersuchung mit einer 400-fachen Vergrößerung durchgeführt, um Folgendes sicherzustellen:

- 1) das Vorhandensein einer hohen Konzentration (mindestens 75 % (fein)stachelige Sporen) an charakteristischen reifen Sporen, d. h. (fein)stachelige Sporen (im Vergleich zu glatten Sporen); [siehe Bild 1 und Bild 2];
- 2) das Fehlen von Sporenkeimung (mindestens 10 Sichtfelder werden überprüft);
- 3) falls gekeimte Sporen vorliegen, wird die Suspension verworfen;
- 4) das Nichtvorhandensein von Myzelbruchstücken (mindestens 10 Sichtfelder werden überprüft).

Bei Vorhandensein von Myzelien wird eine zweite, durch eine Glasfilterfritte durchgeführte Filtration durchgeführt.

Falls immer noch Myzelien vorliegen, wird die Suspension verworfen.



Legende

- (a) glatte Sporen
- (b) (fein)stachelige Sporen

Bild 1 — Ansicht von Konidiosporen mithilfe eines Lichtmikroskops — Vorhandensein von glatten und (fein)stacheligen Sporen (unzulässige Suspension)

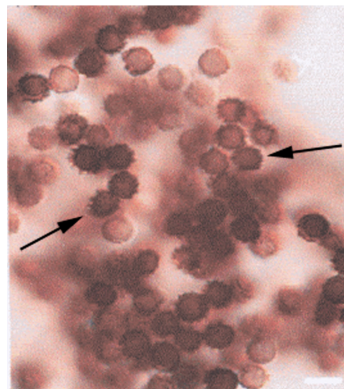


Bild 2 — Ansicht von Konidiosporen mithilfe eines Lichtmikroskops — Hohe Konzentration von charakteristischen reifen Sporen mit (fein)stacheligem Erscheinungsbild (zulässige Suspension)

Die Unfähigkeit, 75 % (fein)stachelige Sporen zu erhalten, kann durch die *Aspergillus brasiliensis*-Kultur oder das Medium, das zur Erzeugung dieser Sporen verwendet wird, bedingt sein. In diesen Fällen sollte eine Kultur aus einer anderen Kultursammlung und/oder ein Malzextraktagar von einem anderen Lieferanten verwendet werden.

Danach wird durch das Hinzufügen von sterilem Wasser (5.2.2.1.5) die Anzahl von Sporen in der Suspension eingestellt, wobei die Anzahl von koloniebildenden Einheiten durch ein geeignetes Mittel geschätzt wird.

Diese Prüfsuspension darf nicht länger als 2 Tage und bei einer Temperatur in einem Bereich von 2 °C bis 80 °C aufbewahrt werden.

Die Prüfsuspension wird erneut unmittelbar vor der Anwendung gemischt, um die Sporen erneut in Suspension zu halten.

Diese Suspension wird entsprechend dem in 5.2.2.4.1.1, 5.2.2.4.1.2 und 5.2.2.4.1.3 festgelegten Fall so ergänzt, dass eine Milch-/Suspension-Verdünnung von 1 : 20 oder eine Belastungssubstanz-/Suspension-Verdünnung von 1 : 10 erhalten wird. Der endgültige *Aspergillus brasiliensis*-Titer muss zwischen 5×10^6 KBE/ml und 1×10^7 KBE/ml liegen. Das Labor, das die Prüfungen durchführt, muss die Genauigkeit der für die Vorprüfung erhaltenen Titer sicherstellen.

5.4.2.5 Stämme von *Mycobacterium avium* und *Mycobacterium terrae* 5.2.1.15 und 5.2.1.16

a) Es wird eine homogene Suspension von der Gebrauchskultur (5.4.1.2.3) hergestellt, indem Folgendes angewendet wird

- Homogenisieren mit Glasperlen. Mit einer Kunststofföse werden Prüfkeime von mindestens zwei Platten der Gebrauchskultur (5.4.1.2.3) in ein mit Schraubverschluss versehenes Röhrchen mit konischem Boden überführt, das 6 g bis 7 g Glasperlen (5.3.2.11) enthält. Die Prüfkeime werden zusammen mit 2 ml Wasser (5.2.2.1.2) homogenisiert, indem mindestens 5 min gemischt (5.3.2.6) wird, um eine homogene Verteilung auf den Perlen und an den meisten Stellen der Innenfläche des mit einem Schraubverschluss versehenen Röhrchens (5.3.2.22) sicherzustellen. 10 ml Wasser (5.2.2.1.1) werden tropfenweise zugegeben und durch Mischen (5.3.2.6) in Suspension gehalten. Nach einer Sedimentationsphase von 20 min wird der Überstand in ein Röhrchen überführt.
- oder Homogenisierung mit dem Potter-Gerät (5.3.2.37). Mit einer Pipette werden 5,0 ml Wasser (5.2.2.1.2) auf jede Platte (mindestens zwei) Gebrauchskultur (5.4.1.2.3) überführt und die Prüfkeime mit einem Glasspatel entnommen. Die gesamte Flüssigkeit von den Platten wird in ein 25-ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Es werden bis zu 18 ml Wasser (5.2.2.1.2) zugegeben. Es wird dreimal hintereinander mit Wasser (5.2.2.1.2) gespült (es wird jedes Mal 15 min bei 2 000 g_N zentrifugiert). Nach jedem Zentrifugieren wird der Überstand entfernt, durch Mischen in Suspension gehalten und mit Wasser bis zum ursprünglichen Volumen aufgefüllt.

Nach der letzten Zentrifugation wird der Überstand entfernt und die Sedimente in einen 15-ml-Behälter des Potter-Homogenisators (5.3.2.37) überführt. Es wird mit Wasser (5.2.2.1.2) auf 15 ml aufgefüllt. Es wird gemischt, mit Eis gekühlt und 15 min homogenisiert.

Nach einer Sedimentationsphase von 20 min, bei der es erforderlich ist, dass genug Eis zum Kühlen vorhanden ist, wird der Überstand in ein Röhrchen überführt.

ANMERKUNG Andere Homogenisierungsverfahren sind unter der Voraussetzung zulässig, dass die Anzahl von koloniebildenden Einheiten je erhaltenen Milliliter geeignet und für die Dauer der Prüfung stabil ist und dass die mikroskopische Untersuchung zeigt, dass die Suspension ebenso homogen ist wie nach den beiden vorstehend beschriebenen Verfahren.

b) Dem Überstand werden die Belastungssubstanzen für die in den drei Wirkungsbereichen verwendeten Desinfektionsmittel zugegeben.

Neun Volumenanteile Überstand werden mit einem Volumenanteil Belastungssubstanz gemischt.

Die Anzahl der Zellen in der Prüfsuspension wird mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.1.5) eingestellt. Die Anzahl von Zellen darf mithilfe eines Spektralphotometers oder Nephelometers geschätzt werden.

Der endgültige Titer der Prüfsuspension muss zwischen 1×10^7 KBE/ml und 1×10^8 KBE/ml liegen.

Diese Prüfsuspension wird im Wasserbad bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ aufbewahrt und nach der Herstellung am selben Tag verwendet.

5.4.3 Auszählen von in Belastungssubstanz hergestellten Suspensionen

5.4.3.1 Bakterien

Auszählen von bakteriellen Prüfsuspensionen:

Die eingestellten Bakteriensuspensionen (siehe 5.4.2.1) werden mit Verdünnungsmittel 5.2.2.1.5 auf die Verdünnungsstufen 10^{-6} , 10^{-7} und 10^{-8} verdünnt.

Zählungen werden parallel durch Gussplattenverfahren N1 und Filtration N2 durchgeführt.

Gussplattenverfahren: Es wird von jeder Verdünnung eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und zur Beimpfung im Gussplattenverfahren N1 verwendet. Für die Prüfung auf Bakterien wird jeweils 1,0 ml der Probe in getrennte Petrischalen pipettiert und 15 ml bis 20 ml geschmolzener TSA, der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde, zugegeben.

Filtration: Es wird von jeder Verdünnung eine Probe N_2 von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und jede dieser 1,0-ml-Proben in einen gesonderten Membranfiltrationssatz (5.3.2.7) überführt. Es wird sofort filtriert. Während der Filtration wird genau wie bei der Prüfung (5.5.1.4.3) Spülflüssigkeit (5.2.2.1.8) durchgespült. Danach wird jede Membran auf die Oberfläche des Agarmediums (5.2.2.1.3) gelegt.

Für die Bakterienstämme werden die Platten 24 h bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet. Alle Platten, die (aus irgendeinem Grund) nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden für weitere 24 h bebrütet. Platten, die keine gut voneinander abgesetzten Kolonien mehr zeigen, werden nicht erneut gezählt. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt.

Die Anzahl N_1 der durch Beimpfung von Agarplatten und die Anzahl N_2 der durch Filtration erhaltenen Kolonien werden gezählt; die Zählung muss parallel erfolgen.

5.4.3.2 Hefen und Schimmelpilze

Auszählen von fungiziden Prüfsuspensionen:

Die eingestellten Schimmelpilzsuspensionen (siehe 5.4.2.3 und 5.4.2.4) werden mit Verdünnungsmittel 5.2.2.1.5 auf die Verdünnungsstufen 10^{-5} , 10^{-6} und 10^{-7} verdünnt.

Zählungen werden parallel durch Gussplattenverfahren N_1 und Filtration N_2 durchgeführt.

Gussplattenverfahren: Es wird von jeder Verdünnung eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und zur Beimpfung im Gussplattenverfahren N_1 verwendet. Für die Prüfung auf Pilze wird jeweils 1,0 ml der Probe in getrennte Petrischalen pipettiert und 15 ml bis 20 ml geschmolzener Agar MEA, der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde, zugegeben.

Filtration: Es wird von jeder Verdünnung eine Probe N_2 von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und jede dieser 1,0-ml-Proben in einen gesonderten Membranfiltrationssatz (5.3.2.7) überführt. Es wird sofort filtriert. Während der Filtration wird genau wie bei der Prüfung (5.5.4.3) Spülflüssigkeit (5.2.2.1.8) durchgespült. Danach wird jede Membran auf die Oberfläche des Agarmediums (5.2.2.1.6) gelegt.

Bei *Aspergillus brasiliensis* wird die Probe in zwei, drei oder vier ungefähr gleich große aliquote Anteile geteilt und jeder aliquote Anteil wird in eine getrennte Membranfiltrationseinheit (5.3.2.7) überführt, was bedeutet, dass für jede Probe in Doppelbestimmung vier, sechs oder acht Membranen beimpft werden.

ANMERKUNG Der Grund für das Aufteilen der Probe ist die obere Grenze der Keimzahl (5.6.2).

Bei den Pilzstämmen werden die Platten 24 h bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ bei *Candida albicans* und 42 h bis 48 h bei *Aspergillus brasiliensis* bebrütet. Alle Platten, die (aus irgendeinem Grund) nicht auszählbar sind, werden verworfen. Auf den Platten werden Zählungen durchgeführt und die Anzahl der KBE bestimmt. Die Platten werden für weitere 24 h bebrütet. Platten, die keine gut voneinander abgesetzten Kolonien mehr zeigen, werden nicht erneut gezählt. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt.

Bei *Aspergillus brasiliensis* wird die Bebrütung für weitere 20 h bis 24 h durchgeführt und wenn die Anzahl der Kolonien (kleine Kolonien) sich erhöht hat, noch einmal um 20 h bis 24 h.

Die Anzahl N_1 der durch Beimpfung von Agarplatten und N_2 die Anzahl von durch Filtration erhaltenen Kolonien wird bestimmt; die Zählung muss parallel erfolgen.

5.4.3.3 Sporen

Zum Auszählen der Prüfsuspension von Sporen werden 10^{-4} - und 10^{-5} -Suspensionen mithilfe des Verdünnungsmittels (5.2.2.1.5) hergestellt.

Zählungen werden parallel mithilfe des Gussplattenverfahrens N1 und Filtration N₂ durchgeführt.

Gussplattenverfahren: Es wird von jeder Verdünnung eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und jede dieser 1,0-ml-Proben in getrennte Petrischalen (5.3.2.7) überführt; danach werden zwischen 12 ml und 15 ml geschmolzener TSA (siehe 5.2.2.1.2), der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde, zugegeben.

Filtration: Es wird von jeder Verdünnung eine Probe N₂ von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und jede dieser 1,0-ml-Proben in einen gesonderten Membranfiltrationssatz (5.3.2.7) überführt. Es wird sofort filtriert. Während der Filtration wird genau wie bei der Prüfung (5.5.4.3) Spülflüssigkeit (5.2.2.1.8) durchgespült. Danach wird jede Membran auf die Oberfläche des Agarmediums (5.2.2.1.11) gelegt.

Die Petrischalen werden 3 Tage bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ bebrütet. Für jede Platte wird die höchste Koloniezahl bestimmt. Die Anzahl der KBE/ml in der Prüfsuspension wird berechnet.

Die Anzahl N1 der durch Beimpfung von Agarplatten und N₂ die Anzahl von durch Filtration erhaltenen Kolonien wird bestimmt; die Zählung muss parallel erfolgen.

5.4.3.4 Mykobakterien

Auszählen und Bebrütung der Prüfsuspension in Gegenwart von Belastungssubstanzen

- a) Bezüglich des Auszählens der Prüfsuspension erfolgt die Bestimmung parallel auf der Oberfläche (N1) und durch Filtration (N₂)

Von der Prüfsuspension werden mithilfe eines Verdünnungsmittels (5.2.2.1.5) Verdünnungsstufen von 10^{-5} und 10^{-6} hergestellt. Es wird gemischt (5.3.2.6).

Oberfläche:

Es wird von jeder Verdünnung eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen. Jede Probe wird in zwei Anteile von etwa gleichem Umfang geteilt; diese werden auf getrockneten Platten aus 18 ml bis 20 ml 7H10-Medium auf der Oberfläche (5.2.2.1.10) verteilt, d. h. insgesamt vier Platten mit je 1,0 ml als Doppelbestimmung.

Filtration:

Es wird von jeder Verdünnung eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und zwei Anteile von etwa gleichem Umfang jeder Probe werden in ein Membranfiltrationsgerät (5.3.2.7) überführt.

Es wird filtriert und mit 50 ml Spülwasser (5.2.2.1.7) gespült.

Alle Membranen (insgesamt vier) werden auf die Oberfläche von Platten gelegt, die 18 ml bis 20 ml 7H10-Agar enthält.

- b) Bebrütung

Die Platten werden 21 h bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ bzw. $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.4.1.2.3) bebrütet. Alle nicht auszählbaren Platten werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt, um die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) auf jeder Platte zu bestimmen.

Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet:

Auf Agar: Immer wenn die Anzahl höher als 300 ist, wird die Zahl 330 aufgezeichnet.

Wenn ein Wert geringer als 14 ist, wird die genaue Anzahl aufgezeichnet (bei anschließenden Berechnungen wird diese Zahl jedoch durch „14“ ersetzt).

Auf Membranen: Immer wenn die Anzahl höher als 330 ist, wird die Zahl 165 aufgezeichnet.

Wenn ein Wert geringer als 14 ist, wird die genaue Anzahl aufgezeichnet (bei anschließenden Berechnungen wird diese Zahl jedoch durch „< 14“ ersetzt).

Die Anzahl der KBE/ml in den Prüfsuspensionen N1 und N₂ wird mithilfe des in diesem Dokument in 5.6 angegebenen Verfahrens berechnet.

5.4.4 Herstellung und Auszählung von Viren-Suspensionen

5.4.4.1 Virus-Stammsuspension

Das Virus muss im großen Maßstab vermehrt werden, um eine Viren-Suspension zu erhalten, die die gleichen Eigenschaften wie die Standard-Virussuspension hat. Zu Sicherheitszwecken sind nur 10 Passagen des ursprünglichen Virus zugelassen.

Propagieren und Herstellung der Virussuspension siehe 5.5.2.

Die Virussuspension wird in aliquoten Anteilen bei –70 °C oder vorzugsweise bei –196 °C in Flüssigstickstoff aufbewahrt.

5.4.4.2 Virus-Prüfsuspension

Die Virus-Stammsuspension wird in einer geeigneten Wirtszellenlinie vermehrt und ist dazu fähig, eine hohe Konzentration von Viruspartikeln zu erzeugen. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugieren (400 g für 15 min) abgetrennt. Diese Herstellung wird als „Virus-Prüfsuspension“ bezeichnet.

Die Virus-Prüfsuspension wird während der Prüfung unverdünnt verwendet.

Der Virussuspension-Titer muss zwischen 1×10^7 PBE/ml und 1×10^9 PBE/ml liegen oder ausreichend hoch sein, um für eine Bestimmung der Titer-Reduktion um 10^4 geeignet zu sein.

In einigen Ausnahmefällen darf die Virussuspension mit geeigneten Verfahren (d. h. Ultrazentrifugation) konzentriert werden.

Um eine Aggregation zu verhindern, kann eine Ultraschallbehandlung erforderlich sein.

Zur Verifizierung der Qualität der Virussuspension darf für eine hohe Reproduzierbarkeit ein Protein-Assay (d. h. Lowry-Verfahren) durchgeführt werden.

Beim Virussuspension-Titer muss der durch den Trocknungsschritt des kontaminierten Keimträgers verursachte Verlust (5.5.1.2.1 und 5.5.2) berücksichtigt werden.

5.4.4.3 Infektiositätstest

5.4.4.3.1 Titration bei zytopathischer Wirkung (Grenzverdünnungsverfahren)

Virustitration auf suspendierten Zellen in Mikrotiterplatten

Die Virussuspension wird durch 1 : 10-Verdünnungen mit einem Volumen von 0,1 ml Virussuspension und einem geeigneten Volumen Kulturmedium (z. B. MEM + 2 % FCS) verdünnt. Pipettenspitzen müssen nach jedem Verdünnungsschritt gewechselt werden.

Von jeder Verdünnung wird 0,1 ml in sechs oder acht Wells einer Mikrotiterplatte gegeben, beginnend mit der höchsten Verdünnung. Es wird 0,1 ml Zellkultursuspension mit einer Dichte, die die Ausbildung eines einschichtigen Zellrasens (90 %) innerhalb von zwei Tagen ermöglicht, zugegeben. Sechs oder acht Wells werden als Zellkontrolle verwendet und erhalten keine Virussuspension.

Nach Ablauf der ausreichenden Bebrütungsdauer (entsprechend der Art des Virus wird die zytopathische Wirkung der Viren mit einem Umkehrmikroskop untersucht.

5.4.4.3.2 Virustitration auf im Voraus angelegten einschichtigen Zellrasen in Mikrotiterplatten

0,1 ml jeder Verdünnung wird in sechs oder acht Wells einer Mikrotiterplatte, die konfluente Zellen (90 %) enthält, in einen einschichtigen Zellrasen überführt, der kein Medium enthält. Die letzte Reihe der sechs oder acht Wells erhält 0,1 ml Kulturmedium (MEM + 2 % FCS) und wird zu Zellkontrollzwecken verwendet.

Nach 1 h Bebrütung bei 37 °C wird jedem Well 0,1 ml Zellkulturmedium zugegeben und die Platten werden bei 37 °C für eine geeignete Dauer bebrütet. Die zytopathische Wirkung wird mit einem Umkehrmikroskop untersucht.

5.4.4.3.3 Verfahren der Plaquebestimmung

Kunststoffplatten-Wells (Durchmesser 30 mm bis 35 mm) mit konfluenten Zellen von einschichtigen Zellrasen werden einmal mit phosphatgepufferter Lösung (en: phosphate buffer solution: PBS) gewaschen und mit jeweils 0,2 ml der Reihenverdünnungen des Virus in einem Kulturmedium (MEM 2 % FCS) beimpft. Je Lösung werden in der Regel drei Wells verwendet.

Nach einer Adsorptionsphase von 1 h bei 37 °C, in der die Zellen des einschichtigen Zellrasens durch Neigen der Platten alle 8 min bis 10 min feucht gehalten werden, wird das Inokulum entfernt und die Zellen des einschichtigen Zellrasens werden einmal mit phosphatgepufferter Lösung (PBS) gewaschen. Anschließend werden die Wells mit 3 ml einer Mischung aus 2 % geschmolzener Agarose oder einem anderen geeigneten halbfesten Medium und 2fach konzentriertem MEM mit 4 % FCS überschichtet.

Die Kulturen werden in einem CO₂-Brutschrank (siehe 5.2.5.3) 2 Tage bis 3 Tage bei 37 °C bebrütet.

Nach Überlagerung mit einer zweiten Schicht (2 ml) mit derselben Zusammensetzung wie die erste, die zusätzlich 5 % einer verdünnten Lösung von Neutralrot (1 : 1 000) enthält, und einer weiteren Bebrütung (im Dunkeln) für 24 h bis 48 h bei 37 °C in einem CO₂-Brutschrank (siehe 5.2.5.3) können die Plaques ausgezählt werden.

Die Zählung kann auch nach Hinzufügen von Kristallviolett erfolgen. Die Zellen des einschichtigen Zellrasens werden durch Zugabe von 2 ml 10 % Trichloressigsäure (TCA) auf die Agarschicht 10 min bis 15 min lang bei Raumtemperatur fixiert. Die Agarschicht wird dann entfernt, und es werden 2 ml 0,1 % Kristallviolett in 20 % Ethanol hinzugegeben. Nach 10 min bis 15 min bei Raumtemperatur werden die gesamten Wells mit Wasser gewaschen, und die Plaques (weiße Flecken) werden gezählt.

ANMERKUNG Die CPE-Bestimmung kann als Alternative zum Verfahren der Plaquebestimmung verwendet werden.

5.4.5 Herstellung und Auszählung von Prüfsuspensionen (Wirtsbakterien- und Bakteriophagen-Suspensionen)

5.4.5.1 Wirtsbakterien-Stammkultur

Die rekonstituierte Magermilch wird mit einem Volumenanteil von 1 % mit Kultur in Flüssigmedium oder mit einer Ösenfüllung Bakterien vom Schrägagar oder Agarplatten aus M17-Agar beimpft, 2 h bei (30 ± 1) °C bebrütet und diese Wirtsstamm-Stammkultur in rekonstituierter Magermilch in einem Kühlschrank aufbewahrt, der auf eine Temperatur zwischen 2 °C und 8 °C eingestellt ist. In einem zweiwöchigen Intervall werden diese Stammkulturen über Nacht bei (30 ± 1) °C wachsen gelassen; die Vorgehensweise wird wiederholt, um eine frische Stammkultur zu erhalten.

Wenn eine längere Aufbewahrung erforderlich ist, werden die Kulturen in Magermilch bei Temperaturen zwischen -18 °C und -20 °C oder niedriger eingefroren.

Es dürfen auch gefriergetrocknete Kulturen verwendet werden.

5.4.5.2 Wirtsbakterien-Gebrauchskultur

Zum Herstellen der Gebrauchskultur der Wirtsbakterien wird eine Subkultur aus der Stammkultur in M17-Kulturbouillon (siehe 5.2.2.3.1) hergestellt und bei $(30 \pm 1)\text{ °C}$ bebrütet. Es wird Inokulum mit einem Volumenanteil von 1 % von einer Kultur in Flüssigmedium mit einer Ösenfüllung Bakterien vom Schrägagar oder Agarplatten aus M17-Agar verwendet.

Nach 16 h bis 24 h wird aus der ersten Subkultur eine zweite Subkultur in M17-Kulturbouillon (1 % Volumenanteil Inokulum) angelegt und 16 h bis 24 h bei $(30 \pm 1)\text{ °C}$ 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 herzustellen, darf eine 48-h-Subkultur zur Herstellung dieser zweiten Subkultur unter der Voraussetzung benutzt werden, dass die Subkultur nach einer Bebrütung für 2 h bei $(30 \pm 1)\text{ °C}$ in einem Kühlschrank aufbewahrt wurde, der auf eine Temperatur zwischen 2 °C und 8 °C eingestellt wurde. In diesem Fall sollte vor dem Fortfahren eine dritte Subkultur hergestellt werden, die 16 h bis 24 h bebrütet werden muss. Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

5.4.5.3 Bakteriophagen-Stammsuspension

0,1 ml Referenzphagenlysat und 0,1 ml Gebrauchskultur der Wirtsbakterien (16-h- bis 24-h-Kultur in M17-Bouillon) werden in ein Reagenzglas gegeben. Zu der Probe werden 10 mmol/l CaCl_2 gegeben, indem 0,05 ml einer sterilen 50 mmol/l CaCl_2 -Stammlösung (siehe 5.2.2.3.6) zugegeben werden. Es wird kurz gerührt und 10 min bei Raumtemperatur (d. h. 20 °C bis 21 °C) bebrütet, damit die Phagen an den Bakterienzellen adsorbieren können.

10 ml M17-Bouillon (auf $(30 \pm 1)\text{ °C}$ vorgewärmt) werden in das Reagenzglas gegeben, kurz gemischt und bei einer Temperatur von $(30 \pm 1)\text{ °C}$ (siehe 5.3.2.3) bebrütet, bis Zell-Lyse auftritt. Das Wachstum der Wirtsbakterien (d. h. Trübung) und die Zell-Lyse müssen entweder mit bloßem Auge oder vorzugsweise durch Messen der optischen Dichte der Kultur in einem geeigneten Spektralphotometer bei einer festgelegten Wellenlänge (z. B. 620 nm) beobachtet werden.

Auf die gleiche Weise wird ein Kontrollreagenzglas vorbereitet, jedoch wird das Phagenlysat durch 0,1 ml M17-Bouillon (siehe 5.2.2.3.1) ersetzt. Die Trübungen im Reagenzglas und im Kontrollröhrchen werden verglichen.

Nach der Lyse der Wirtsbakterien in dem den Phagen enthaltenden Reagenzglas wird der die Phagen enthaltende Überstand durch ein Membranfilter (Porenweite $0,45\text{ }\mu\text{m}$) gegeben.

Bis zum Gebrauch werden die Phagenstämme bei 4 °C bis 8 °C aufbewahrt.

5.4.5.4 Bakteriophagensuspension mit hohem Titer

Aus den Bakteriophagen-Stammsuspensionen (siehe 5.4.5.3) werden Dezimalverdünnungen in Phagenverdünnungsmittel (siehe 5.2.2.3.4) hergestellt. Dafür wird 1,0 ml der Phagen-Stammsuspension zu 9,0 ml Phagenverdünnungsmittel gegeben. Es wird gemischt und die folgenden Verdünnungen werden auf die gleiche Weise bis zur Verdünnungsstufe 10^{-5} hergestellt.

Es wird eine Probe von 0,1 ml von jeder Verdünnungsstufe als Doppelbestimmung entnommen und jede 0,1-ml-Probe in ein gesondertes Reagenzglas überführt. Es werden 0,3 ml einer 16-h- bis 24-h-Bakterienkultur, die in M17-Kulturbouillon gewachsen ist, zugegeben. Es wird 0,1 ml einer 50 mmol/l CaCl_2 -Lösung (siehe 5.2.2.3.6) zugegeben, kurz gemischt und 10 min bei Raumtemperatur bebrütet, damit die Phagen an den Bakterienzellen adsorbieren können.

Es werden 2,5 ml bis 3,0 ml M17-Überschichtungsagar (siehe 5.2.2.3.3), der zuvor in einem siedenden Wasserbad oder in einem Mikrowellenofen geschmolzen und danach in einem Wasserbad von $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt worden ist, zugegeben. Es wird kurz gemischt, und dann werden die Proben gleichmäßig auf M17-Unterschicht-Agarplatten (siehe 5.2.2.3.2) verteilt. Für eine gleichmäßige Verteilung der Proben sollten die Platten von Hand langsam geneigt werden, bevor der Überschichtungsagar erhärtet.

Es müssen alle notwendigen Maßnahmen getroffen werden, um ein unkontrolliertes Überhitzen im Mikrowellenofen zu verhindern, was zu einem übermäßigen unkontrollierten Sieden des verflüssigten Agars führen kann. Die Verschlüsse der Behälter sollten unverschraubt sein, um jede Gefahr einer Explosion zu verhindern.

Die Platten werden mindestens 6 h bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder über Nacht 16 h bis 24 h bebrütet.

Die Platten werden auf das Auftreten von gleichmäßigen klaren Lysebereichen (Plaques), die von den Phagen stammen, im Bakterienrasen untersucht.

ANMERKUNG 1 Plaques des Phagen P008 weisen glatte Ränder und einen Durchmesser von 1 mm bis 2 mm auf. Plaques des Phagen P001 sind größer (2 mm bis 3 mm Durchmesser) und von trüben Halos umgeben (EN 13610).

Aus den mit den Kaskadenverdünnungen beimpften Platten werden die ausgewählt, die eine konfluente Lyse aufweisen. Auf diesen Platten müssen die Plaques einander berühren, und es darf lediglich ein feines Gespinnst von nicht-lysierten Zellen sichtbar sein.³⁾ Es dürfen keine Platten ausgewählt werden, auf denen kein Bakterienrasen mehr vorhanden ist oder auf denen sich einzelne Plaques nicht berühren (d. h. auf denen die Plaques vollständig getrennt sind), da von diesen Platten keine Lysate mit hohem Titer gewonnen werden können.

Die Phagenproben³⁾ werden von den Agarplatten, die konfluente Lyse zeigen, durch Abschaben des Weichagars mit einem sterilen gebogenen Glasstab gewonnen und in ein Zentrifugenröhrchen oder einen Kolben überführt.

Jede Platte wird mit 5 ml SM-Pufferlösung (siehe 5.2.2.3.5) sorgfältig abgespült und diese Pufferlösungen werden in die den Platten entsprechenden Reagenzgläser (zum Zentrifugieren) gegossen.

Die Reagenzgläser werden gelegentlich für mindestens 15 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt.

Der Weichagar und die Zelltrümmer werden in einer Tischzentrifuge sedimentiert (d. h. 15 min bei 4 000 g).

Der Überstand muss durch ein Membranfilter (siehe 5.3.2.7) filtriert werden.

Plaques desselben Stammes, die jedoch von verschiedenen Platten gewonnen wurden, müssen vor der Bestimmung des Phagentiters vereinigt werden.

ANMERKUNG 2 Ein Phagenlysat, das nach diesem Verfahren hergestellt wurde, ist im Wesentlichen frei von einer Proteinkontamination. Im Allgemeinen liegen die erhaltenen Phagentiter im Bereich von 1×10^{10} PBE/ml bis 5×10^{11} PBE/ml).

3) Eine konfluente Lyse tritt üblicherweise auf Agarplatten auf, die mit den Verdünnungsstufen 10^{-3} oder 10^{-4} beimpft wurden.

Die Bakteriophagensuspension mit hohem Titer wird bis zu drei Monate bei 2 °C bis 8 °C aufbewahrt.

Für das Auszählen von Bakteriophagensuspensionen mit hohem Titer werden Reihenverdünnungen im Phagen-Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.3.4) hergestellt. Dafür wird 1,0 ml der Bakteriophagensuspensionen mit hohem Titer zu 9,0 ml Phagen-Verdünnungsmittel gegeben. Es wird gemischt und die folgenden Verdünnungen werden auf die gleiche Weise bis zur Verdünnungsstufe 10^{-9} hergestellt. Es wird eine Probe von 0,1 ml von den Verdünnungsstufen 10^{-8} und 10^{-9} als Doppelbestimmung entnommen und jeweils 0,1 ml Probe in ein gesondertes Reagenzglas überführt. Es werden 0,3 ml einer 16-h- bis 24-h-Bakteriengebrauchskultur, die in M17-Bouillon (siehe 5.4.4.3.1.6) gewachsen ist, zugegeben. Es wird 0,1 ml einer 0,05 mol/l CaCl_2 -Lösung (siehe 5.2.2.3.6) zugegeben, kurz gemischt und 10 min bei Raumtemperatur bebrütet, damit die Phagen an den Wirtsbakterienzellen adsorbieren können.

Es werden 2,5 ml bis 3 ml M17-Überschichtungsagar (siehe 5.2.2.3.3), der zuvor in einem siedenden Wasserbad oder in einem Mikrowellenofen geschmolzen und dann in einem Wasserbad von (45 ± 1) °C abgekühlt worden ist, zugegeben. Es wird kurz gemischt, und dann werden die Proben gleichmäßig auf M17-Unterschicht-Agarplatten (siehe 5.2.2.3.2) verteilt. Für eine gleichmäßige Verteilung der Proben sollten die Platten von Hand langsam geneigt werden, bevor der Überschichtungsagar erhärtet.

5.4.5.5 Herstellung der Bakteriophagen-Prüfsuspension

Vor Durchführung des Prüfverfahrens zur Bestimmung der viruziden Wirkung von Produkten wird der Phagentiter der Bakteriophagensuspension mit hohem Titer (siehe 5.4.5.4) auf 8×10^8 PBE/ml und 3×10^9 PBE/ml mit SM-Pufferlösung (siehe 5.2.2.3.5) eingestellt, um die endgültige Bakteriophagen-Prüfsuspension herzustellen, die für die Umsetzung des Verfahrens geeignet ist.

Vor der Durchführung der tatsächlichen Prüfung wird der tatsächliche Phagentiter verifiziert, indem Reihenverdünnungen der Bakteriophagen-Prüfsuspension mit Phagen-Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.3.4) hergestellt werden. Dafür werden je 1,0 ml Bakteriophagen-Prüfsuspensionen zu 9,0 ml Phagen-Verdünnungsmittel gegeben. Es wird gemischt und die folgenden Verdünnungen werden auf dieselbe Weise bis zur Verdünnungsstufe 10^{-7} hergestellt. Es wird eine Probe von 0,1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-6} und 10^{-7} als Doppelbestimmung entnommen und jeweils 0,1 ml Probe in ein gesondertes Reagenzglas überführt. Es werden 0,3 ml einer 16-h- bis 24-h-Bakteriengebrauchskultur, die in M17-Bouillon (siehe 5.4.5.2) gewachsen ist, zugegeben. Es wird 0,1 ml einer 50 mmol/l CaCl_2 -Lösung (siehe 5.2.2.3.6) zugegeben, kurz gemischt und 10 min bei Raumtemperatur bebrütet, damit die Phagen an den Wirtsbakterienzellen adsorbieren können.

Es werden 2,5 ml bis 3 ml M17-Überschichtungsagar (siehe 5.2.2.3.3), der zuvor in einem siedenden Wasserbad oder in einem Mikrowellenofen geschmolzen und dann in einem Wasserbad von 45 °C abgekühlt worden ist, zugegeben. Es wird kurz gemischt, und dann werden die Proben gleichmäßig auf M17-Unterschicht-Agarplatten (siehe 5.2.2.3.2) verteilt. Für eine gleichmäßige Verteilung der Proben sollten die Platten von Hand langsam geneigt werden, bevor der Überschichtungsagar erhärtet.

Es müssen alle notwendigen Maßnahmen getroffen werden, um ein unkontrolliertes Überhitzen im Mikrowellenofen zu verhindern, was zu einem übermäßigen unkontrollierten Sieden des verflüssigten Agars führen kann. Die Verschlüsse der Behälter sollten unverschraubt sein, um jede Gefahr einer Explosion zu verhindern.

5.4.5.6 Vorbereitung von Phagen in Belastungssubstanzen

Der Bakteriophagen-Prüfsuspension wird das Sauermolkenpulver oder die Magermilch hinzugegeben, um eine 1:10-Verdünnung zu erhalten. Der endgültige Phagentiter muss zwischen 8×10^8 PBE/ml und 3×10^{10} PBE/ml liegen.

Diese Prüfsuspension wird im Wasserbad bei (20 ± 1) °C aufbewahrt und innerhalb von 2 h verwendet.

Beim Auszählen in Sauermolke oder Magermilch werden die Verfahrensweisen wie in 5.4.5.5 beschrieben eingehalten.

5.5 Verfahren zur Bewertung der Prozessaktivität

5.5.1 Verfahren zur Bewertung der Prozessaktivität entsprechend den vom Hersteller bereitgestellten Anwendungsbedingungen (Bakterien, Hefen, Sporen, Viren, Bakteriophagen und Mykobakterien)

5.5.1.1 Versuchsbedingungen (obligatorisch, ergänzend obligatorisch und zusätzlich)

Neben den obligatorischen Bedingungen dürfen ergänzend obligatorische und zusätzliche Versuchsbedingungen entsprechend der vorgesehenen praktischen Anwendung und den Herstellerangaben an das Verfahren ausgewählt werden, d. h.:

a) Einwirkzeit (Einwirkung auf das Desinfektionsverfahren):

- Einwirkzeit darf entsprechend den Empfehlungen des Herstellers schwanken;

b) Temperatur:

- obligatorische Prüftemperatur: (20 ± 2) °C zu Beginn der Prüfung;
- ergänzend obligatorische Prüftemperaturen (im Falle, dass die übliche Praxis nicht den vorstehend angegebenen Temperaturbedingungen entspricht).

Die ergänzend obligatorische Temperatur sollte nur angewendet werden, wenn die Herstellerangaben an die Anwendung deutlich und eindeutig keine obligatorischen Prüfparameter enthalten. Dies wird die obligatorische Temperatur ersetzen.

- jede andere Temperatur entsprechend den Anforderungen der unterschiedlichen Wirkungsbereiche. Der Grund für die Wahl dieser Temperatur sollte im Prüfbericht angegeben sein und in der Verantwortung des Herstellers liegen.

c) Luftfeuchte:

- relative Luftfeuchte bei der obligatorischen Prüfung: 50 % bis 75 % relative Luftfeuchte nur für Bereiche, die bei diesen Luftfeuchten arbeiten und spezifische Leitfäden zu Beginn der Prüfung nicht einhalten;
- relative Luftfeuchtwerte bei der ergänzenden obligatorischen Prüfung (im Falle, dass die übliche Praxis nicht den vorstehend angegebenen relativen Feuchtebedingungen entspricht): jede andere relative Luftfeuchte entsprechend den Anforderungen der unterschiedlichen Wirkungsbereichen. Der Grund für die Wahl dieser relativen Luftfeuchte sollte im Prüfbericht angegeben sein und in der Verantwortung des Herstellers liegen.

Die ergänzend obligatorische Luftfeuchte sollte nur angewendet werden, wenn die Herstellerangaben an die Anwendung deutlich und eindeutig keine obligatorischen Prüfparameter enthalten. Dies wird die obligatorische Temperatur ersetzen.

d) Volumen des Prüfraums

Die Prüfungen müssen basierend auf den Angaben des Entwicklers des Verfahrens durchgeführt werden.

- obligatorische Größe des Prüfraums: 30 m³ bis 150 m³;

- aufgrund der Wichtigkeit und des Einflusses von Oberflächen-Größen-Verhältnissen müssen ergänzende obligatorische Prüfungen in einem umschlossenen Raum durchgeführt werden, dessen Volumen diesem Bereich entspricht, wenn der Entwickler des Verfahrens angibt, dass kleine umschlossene Räume (0,25 bis 4) m³ eingeschlossen sind;
- wenn das Verfahren nur Volumen von mehr als 4 m³ ausweist, dann muss nur die obligatorische Prüfung für große umschlossene Räume durchgeführt werden.

Die nachstehend aufgeführte Tabelle beschreibt die erforderlichen Prüfungen in Übereinstimmung mit den Volumenangaben des Herstellers bezüglich des vorgesehenen Verwendungszwecks fest:

Tabelle 1 — Angaben des Herstellers hinsichtlich des vorgesehenen Verwendungszwecks

Angabe des Herstellers	Größen	
	Kleine umschlossene Räume	Größere umschlossene Räume
Obligatorisches Prüfvolumen	Zwischen 0,25 m ³ und 4,0 m ³	> 4 m ³
Erforderliche Prüfungen	Prüfungen unter obligatorischen Bedingungen in einem umschlossenen Raum zwischen 0,25 m ³ und 4,0 m ³	Prüfungen unter obligatorischen Bedingungen in einem umschlossenen Raum zwischen 30 m ³ und 150 m ³
Verteilungsprüfung	Es ist eine Verteilungsprüfung nach Anhang A, Teil 2 durchzuführen	Es ist eine Verteilungsprüfung nach Anhang A, Teil 2 durchzuführen

Wenn ein System nicht entsprechend den obligatorischen Bedingungen geprüft werden kann, weil es physisch nicht dazu in der Lage ist, bei einem Raumvolumen von 30 m³ bis 150 m³ zu funktionieren, muss es in Übereinstimmung mit den in dieser Norm festgelegten Mikroorganismen und Bedingungen bei einem größeren Volumen geprüft werden.

e) Keimträgerart, Ausrichtung und Anordnung:

- obligatorische Keimträger: Scheiben aus nichtrostendem Stahl;
- zusätzliche Keimträger: jeder porenfreie Keimträger, unter der Voraussetzung, dass er im Prüfbericht beschrieben ist.

Automatischer Desinfektionsprozess:

Für die Prüfung der Wirksamkeit

- obligatorische Ausrichtung und Lage für große umschlossene Räume: Abstand nach Anhang B auf einer Höhe zwischen 1 m und 1,5 m, vertikale Lage, auf der dem Desinfektionssystem oder der Desinfektionsquelle abgewandten Seite
- obligatorische Ausrichtung und Lage für kleine umschlossene Räume: auf einer Höhe, die 50 % der mittleren vertikalen Höhe des umschlossenen Raums entspricht und in einem Abstand vom Desinfektionssystem oder der Desinfektionsquelle, die mehr als 40 % der Diagonalen des umschlossenen Raums beträgt. Die Keimträger müssen sich in vertikaler Lage, auf der dem Desinfektionssystem oder der Desinfektionsquelle abgewandten Seite befinden.
- zusätzliche Ausrichtung und Lage: jede Anordnung entsprechend der vorgesehenen praktischen Anwendung des Verfahrens.

ANMERKUNG Für die Verteilungsprüfung (siehe Anhang A).

f) Art der Mikroorganismen

- obligatorische Prüfkeime: siehe 5.2.1;
- zusätzliche Prüfkeime: alle Mikroorganismen entsprechend der vorgesehenen praktischen Anwendung des Verfahrens.

g) Belastungssubstanzen

Bei einigen spezifischen Anwendungen und entsprechend den Empfehlungen des Herstellers dürfen in Gegenwart anderer Belastungssubstanzen unter zusätzlichen Bedingungen auch andere Bewertungsverfahren in Betracht gezogen werden.

5.5.1.2 Prüfung des Überlebens von Mikroorganismen auf Keimträgern (Prüfung der Wirksamkeit und Verteilungsprüfung)

5.5.1.2.1 Allgemeines

Die Prüfungen müssen parallel zur eigentlichen Prüfung erfolgen.

5.5.1.2.2 Kontamination und Trocknung der Keimträger

Die in sterilen Petrischalen angeordneten Keimträger (5.2.3.1) werden durch Auftragen von 0,05 ml = 50 µl Suspension [5.4.3 b)] in einem einzelnen Tropfen in der Mitte des Keimträgers kontaminiert.

Danach wird das Inokulum gleichmäßig auf dem Keimträger ausgestrichen und bedeckt dann einen Bereich von $(3 \pm 0,5) \text{ cm}^2$.

Für diesen Zweck wird eine sterile Impföse verwendet; das Inokulum wird von der Mitte aus mit mehreren Kreisbewegungen ausgestrichen, um einen gleichmäßigen kreisförmigen Bereich mit einem Durchmesser von etwa 2 cm abzudecken. Die Öse muss zwischen jedem Ausstreichvorgang gewechselt werden.

Für jeden Stamm werden 3 identische Ausführungen jedes Keimträgers zur Prüfung des Überlebens kontaminiert.

Danach werden die Keimträger getrocknet.

Die Keimträger sind nach 5.3.2.3 zu trocknen. Die Keimträger werden in einer Petrischale mit geöffnetem Deckel angeordnet und dann höchstens 120 min bei einer Temperatur von höchstens 37 °C getrocknet (Proben, die nach diesem Zeitraum nicht trocken sind, können für die Prüfungen nicht verwendet werden).

Das für diese Prüfungen verantwortliche Labor ist dazu verpflichtet, den Zustand des aufgetragenen Materials regelmäßig zu überwachen, damit es keiner unnötigen Trocknung ausgesetzt wird. Sobald sie sichtbar trocken sind, werden die Keimträger entnommen und der Deckel der Petrischale wieder geschlossen.

Vor der Trocknung der Keimträger ist es wichtig die folgenden Punkte zu berücksichtigen: die Empfindlichkeit gegenüber der Trocknung von Prüfkeimen kann erheblich voneinander abweichen. Zusätzlich muss bei der Einstellung des Suspensionstiters der mögliche Verlust während des Trocknungsschritts berücksichtigt werden. Die Zielwerte für die Kontrolltiter nach der Trocknung und Einwirkung sind in der zusammenfassenden Tabelle in Anhang D festgelegt.

ANMERKUNG 1 Es wurde während der Prüfungen festgestellt, dass eine niedrige Temperatur $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$ und eine schonende Trocknung für sensitive Keime weniger traumatisch sind.

Nachdem die Trocknung durchgeführt wurde, beginnt die Einwirkzeit des Desinfektionsverfahrens (von Herstellern festgelegter Zeitraum mit unterschiedlicher Länge, um eine Inaktivierung der Mikroorganismen zu erreichen). Kontrollkeimträger dürfen dem Desinfektionsmittel nicht ausgesetzt werden und müssen während des Zeitraums der Einwirkzeit im Labor aufbewahrt werden. Am Ende der Einwirkdauer muss auf zwei Keimträgern (siehe 5.5.1.2.2) eine Auszählung durchgeführt werden.

ANMERKUNG 2 Da der auf den Kontrollkeimträgern erhaltene Erstitter und die Anzahl nicht lebensfähiger Mikroorganismen auf der Oberfläche des Inokulums (Verlust N-T) Auswirkungen auf die Ergebnisse und die Schlussfolgerungen bezüglich der Konformität mit dem Dokument haben, kann es für einige Verfahren erforderlich sein, die Erstitter genau knapp oberhalb der durch die Norm festgelegten Grenzwerte einzustellen. Auf ähnliche Weise sollte das Trocknungsverfahren sorgfältig ausgewählt werden, insbesondere für Mikroorganismen, deren Empfindlichkeit gegenüber Trocknung bekannt ist.

Im Falle von Prüfungen, die am gleichen Verfahren durchgeführt werden und gegensätzliche Schlussfolgerungen bezüglich der Konformität mit dem Dokument ergeben, ist es empfehlenswert, die Prüfungen mit einem Trocknungsverfahren zu wiederholen, bei dem der geringste Verlust erzielt wird und mit einem Titer, der auf den niedrigsten Wert eingestellt ist.

Unabhängig vom gewählten Trocknungsverfahren sollte es im Prüfbericht dokumentiert und dazu geeignet sein, einen Keimtiter und eine Menge an Belastungssubstanz in Übereinstimmung mit den im Dokument angegebenen Kriterien zu erhalten.

5.5.1.2.3 Keimzahlen auf den Keimträgern

Am Ende der Trocknungszeit werden die zwei Keimträger in ihren mit einem Deckel versehenen Platten für die vorgesehene Prüfdauer (Einwirkdauer) unter den Bedingungen von Temperatur und relativer Luftfeuchte belassen, die so genau wie möglich die Bedingungen an der Stelle widerspiegeln, an der das tatsächliche Desinfektionsverfahren durchgeführt wird.

Am Ende des Zeitraums, der der Einwirkdauer entspricht, werden die zwei im Labor gelagerte Keimträger in zwei mit einem Schraubverschluss versehene Röhrchen überführt, die 100 ml sterile Rückgewinnungsflüssigkeit (5.2.2.1.8) enthalten.

Es wird einige Sekunden mit der Hand geschüttelt. Mit einem Glasstab, einer Pipettenspitze oder Glasperlen (Durchmesser 5 mm) in der Rückgewinnungsflüssigkeit wird jede Oberfläche des Keimträgers mindestens 1 min abgeschabt, um die Mikroorganismen zu lösen. Dieser Abschabeschritt darf ergänzt werden, indem die Probe 1 min eine Behandlung durch einen Ultraschall-Schwinger durchläuft (die Leistung und Frequenz des angewendeten Schwingers wird festgelegt und es wird vor der Benutzung eine Überprüfung auf eventuelle antimikrobielle Wirkungen durchgeführt). Wenn der Ultraschall-Schwinger für die Prüfungen verwendet wird, muss er auch für die Kontrollläufe unter den gleichen Bedingungen verwendet werden.

Nach einem weiteren kurzen Schütteln wird 1 ml der Rückgewinnungsflüssigkeit in 9 ml Verdünnungsmittel 5.2.2.1.4 gelöst und es werden Reihenverdünnungen durchgeführt, bis die Verdünnungsstufe 10^{-3} erreicht ist (Verdünnung muss entsprechend den Titern der hergestellten Suspensionen eingestellt werden). Zwei Reihen mit 1 ml der auf diese Weise erhaltenen Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} der Rückgewinnungsflüssigkeit werden in Petrischalen überführt, um die Auszählung durch Ausplattieren auf Agarmedium 5.2.2.1.2 für die Stämme 5.2.1.1 bis 5.2.1.6, durch Ausplattieren auf Agarmedium 5.2.2.1.5 für die Stämme 5.2.1.8 und 5.2.1.9, durch Ausplattieren auf Agarmedium 5.2.2.1.10 für die Stämme 5.2.1.7 und durch Ausplattieren auf Agarmedium 5.2.2.1.9 für die Stämme 5.2.1.15 und 5.2.1.16 durchzuführen.

Nach Ablauf der Einwirkzeit wird bei Mykobakterien (5.2.1.15 und 5.2.1.16) jeder Keimträger in 100 ml Rückgewinnungsflüssigkeit (5.2.2.1.7) überführt.

Es wird einige Sekunden mit der Hand geschüttelt und mit einem sterilen Glasstab jede Oberfläche des Keimträgers abgeschabt, um jegliche verbliebenen trockenen Suspensionsrückstände zu lösen.

Nach einem letzten kurzen Schütteln wird 1 ml der Lösung in 9 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.1.4) gelöst und es werden weitere Reihenverdünnungen durchgeführt, bis die Verdünnungsstufe 10^{-3} erreicht ist.

Eine Probe mit 1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} als Doppelbestimmung wird nach dem Verfahren der Oberflächenausstrichzählung [5.4.3.4 a)] entnommen. Bebrütung von 7 H10-Agar nach 5.4.3.4 b).

Für jeden Stamm werden die Koloniezahlen im Agarmedium gezählt, die Mittelwerte für jede der im Vorfeld aufgelisteten Verdünnungen bestimmt, und das Ergebnis als jeweiliger Anteil der Anzahl der auf den Keimträgern (= T) rückgewonnenen Bakterien, Hefen, Schimmelpilze und bakteriellen Sporen angegeben.

Der Verlust der Lebensfähigkeit (Trocknung + Einwirkung) darf im Prüfbericht berechnet und aufgezeichnet werden (N – T).

5.5.1.2.4 Bakteriophagenzahlen auf den Keimträgern

Am Ende der Trocknungszeit werden die drei Keimträger in ihren mit einem Deckel versehenen Platten für die vorgesehene Prüfdauer (Einwirkdauer) unter den Bedingungen von Temperatur und relativer Luftfeuchte belassen, die so genau wie möglich die Bedingungen an der Stelle widerspiegeln, an der das tatsächliche Desinfektionsverfahren durchgeführt wird.

Am Ende des Zeitraums, der dem Einwirken entspricht, werden die zwei im Labor gelagerten Keimträger in zwei konische Behälter überführt, die 100 ml sterile Rückgewinnungsflüssigkeit (5.2.2.1.8) enthalten.

Es wird einige Sekunden mit der Hand geschüttelt. Mit einem Glasstab oder einer Pipettenspitze wird jede Oberfläche des Keimträgers mindestens 1 min abgeschabt, um die Bakteriophagen zu lösen.

ANMERKUNG Die Verwendung eines Ultraschall-Schwingers hilft beim Lösen der Phagen vom Keimträger.

Nach einem weiteren kurzen Schütteln wird 1 ml der Rückgewinnungsflüssigkeit in 9 ml Phagen-Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.3.4) gelöst und es werden weitere Reihenverdünnungen durchgeführt, bis die Verdünnungsstufe 10^{-3} erreicht ist (Verdünnung muss entsprechend den Titern der hergestellten Suspensionen eingestellt werden).

Es wird eine Probe mit 0,1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-2} und 10^{-3} als Doppelbestimmung entnommen und jede dieser Proben in ein gesondertes Reagenzglas überführt. Es werden 0,3 ml einer 16-h- bis 24-h-Bakteriengebrauchskultur, die in M17-Bouillon (5.4.5.2) gewachsen sind, zugegeben.

Es wird 0,1 ml einer 50 mmol/l CaCl_2 -Lösung (siehe 5.2.2.3.6) zugegeben, kurz gemischt und 10 min bei Raumtemperatur bebrütet, damit die Phagen an den Wirtsbakterienzellen adsorbieren können.

Es werden 2,5 ml bis 3 ml M17-Überschichtungsagar (siehe 5.2.2.3.3), der zuvor in einem siedendem Wasserbad geschmolzen und dann in einem Wasserbad von $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt worden ist, zugegeben. Es wird kurz gemischt, und dann werden die Proben gleichmäßig auf M17-Unterschicht-Agarplatten (siehe 5.2.2.3.2) verteilt. Für eine gleichmäßige Verteilung der Proben sollten die Platten von Hand langsam geneigt werden, bevor der Überschichtungsagar erhärtet.

Für jeden Stamm wird die Anzahl der Phagen im Agarmedium gezählt, die Mittelwerte für jede der im Vorfeld aufgelisteten Verdünnungen bestimmt, und das Ergebnis als jeweiliger Anteil der Anzahl der auf den Keimträgern (= T) rückgewonnenen Phagen angegeben.

5.5.1.3 Vorprüfung zur Validierung des Fehlens der Residualwirkung (Prüfung der Wirksamkeit und Verteilungsprüfung)

5.5.1.3.1 Rückgewinnung von Desinfektionsmittelrückständen auf den Keimträgeroberflächen und Prüfen auf eventuelle antimikrobielle Wirkungen

Es werden mindestens drei Keimträger geprüft:

- in einem Abstand wie in der Tabelle in Anhang B festgelegt; das Inokulum befindet sich in vertikaler Lage auf der dem Desinfektionssystem oder der Desinfektionsquelle abgewandten Seite.

Vorbereitung der Keimträger

Mit einer kalibrierten Präzisionspipette werden 0,05 ml = 50 µl entweder 1 : 20 verdünnte rekonstituierte Milch oder nur 1 : 10 (Volumenanteile) verdünnte Belastungssubstanz in Verdünnungsmittel 5.2.2.1.4 eingebracht.

Bei wie in 5.2.2.4 festgelegten sensitiven Mikroorganismen werden 50 µl 1 : 5 verdünnte rekonstituierte Milch bei Prüfungen eingebracht, bei denen diese Option gewählt wird.

Die Keimträger werden wie in 5.5.1.2.1 beschrieben an der Luft trocknen gelassen.

Direkte Einwirkung der Keimträger auf das geprüfte Produkt

Die Keimträger werden im Prüfraum dem luftgetragenen Desinfektionsmittel ausgesetzt.

Rückgewinnung des abgeschiedenen Desinfektionsmittels

Nach Ablauf der vom Hersteller ausgewiesenen Einwirkzeit werden die Keimträger entfernt und in 100 ml Rückgewinnungsflüssigkeit überführt.

Dies ergibt Lösung S für diese Rückgewinnungslösung (Validierung der Neutralisation des Produkts).

Bei Mykobakterien (5.2.1.15 und 5.2.1.16):

Kontamination der Keimträger

Zwei in Petrischalen angeordnete sterilisierte Keimträger werden durch Auftragen von 0,05 ml = 50 µl Verdünnungsmittel beimpft, das die rekonstituierte Belastungssubstanz enthält, die auf die in der Prüfung (5.2.2.4.1.2) verwendete Endkonzentration eingestellt ist.

Neun Volumenanteile Verdünnungsmittel werden mit einem Volumenanteil Belastungssubstanz gemischt.

Das Mikrotröpfchen wird ausgestrichen und getrocknet.

Direkte Einwirkung der Keimträger auf das geprüfte Produkt

Die Keimträger werden dem Produkt der gleichen Einwirkzeit ausgesetzt, um die gleiche Anhaftung des Desinfektionsmittels auf dem Keimträger zu erhalten.

Rückgewinnung des auf dem Keimträger aufgetragenen Desinfektionsmittels

Nach Ablauf der Einwirkzeit werden die Keimträger in 100 ml Rückgewinnungsflüssigkeit (5.2.2.1.8) überführt, um das wie vorstehend beschrieben am Keimträger anhaftende Desinfektionsmittel zu resuspendieren.

Dies ergibt Lösung S für die Rückgewinnungslösung.

5.5.1.3.2 Screening in Bezug auf eine hemmende Wirkung im Agarmedium

In einer Petrischale werden 1 ml Verdünnung von Mikroorganismussuspensionen entsprechend des in 5.4.3 beschriebenen Zählverfahrens und 1 ml der in 5.5.1.3.1 erhaltenen Lösung S zugegeben, ohne dass eine gegenseitige Einwirkung der beiden Flüssigkeiten aufeinander möglich ist.

Bei Bakteriophagen wird (für die betreffenden Verdünnungen) das gleiche wie in 5.5.1.2.3 beschriebene Zählverfahren verwendet.

Das Agarmedium für den einem Screening unterzogenen Stamm wird gegossen, gut gemischt, gekühlt und bebrütet.

Die Anzahl n_1 der erhaltenen Kolonien wird mit der Anzahl N_1 verglichen, die im Agarmedium gezählt wurde, das keiner Einwirkung durch diese Rückgewinnungsflüssigkeit des verbliebenen Desinfektionsmittels ausgesetzt war, wobei die Verdünnung der für n_1 gewählten entspricht.

Bei Mykobakterien (5.2.1.15 und 5.2.1.16) wird 1 ml der Rückgewinnungslösung S in zwei Anteile von etwa gleichem Umfang aufgeteilt und die 7H10-Agarplatten (5.2.2.1.10) damit beimpft. Es wird an der Luft trocknen gelassen, danach wird auf der Oberfläche des gleichen Agarmediums 1 ml der Verdünnungsstufe 10^{-5} oder 10^{-6} mithilfe des Verfahrens der Oberflächenausstrichzählung [5.4.3.4 a)] in Anteile mit gleichem Umfang aufgeteilt.

Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.3.4 b).

Die Anzahl n_1 der erhaltenen Kolonien wird mit der Anzahl N_1 verglichen, die in der Prüfsuspension gezählt wurde.

5.5.1.3.3 Screening in Bezug auf eine hemmende Wirkung in Membranfiltern

98 ml der in Schritt 5.5.1.3.1 erhaltenen Lösung S werden durch ein Membranfilter gegeben und dreimal mit 50 ml Rückgewinnungsflüssigkeit gespült (5.2.2.1.8), um sämtliche Produkte zu entfernen.

Die Membran wird ein viertes Mal in 50 ml Rückgewinnungsflüssigkeit (5.2.2.1.8) getaucht und 1 ml der auf 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} und/oder 10^{-8} verdünnten Suspension zugegeben. Es wird filtriert und die Membran zum Auszählen in das Agarmedium eingebracht.

Diese Prüfung wird als Doppelbestimmung durchgeführt und für jeden Prüfstamm wiederholt.

Nach der Bebrütung wird die Anzahl der entwickelten Kolonien gezählt und der Mittelwert n_2 der beiden durchgeführten Prüfungen aufgezeichnet.

N_2 wird mit der Anzahl der erhaltenen Kolonien bei der gewählten Verdünnungsstufe verglichen, wenn 1 ml der Verdünnungsstufen 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} und/oder 10^{-8} der verdünnten Suspensionen auf Membranen filtriert werden, die keiner Einwirkung durch das Desinfektionsmittel ausgesetzt sind.

Das Filtrationsverfahren gilt nicht für Bakteriophagen und darf deshalb nicht durchgeführt werden.

Bei Mykobakterien (5.2.1.15 und 5.2.1.16) werden 98 ml Lösung S durch ein Membranfilter gegeben und dreimal mit 50 ml Flüssigkeit gespült.

Die Membran wird mit 50 ml Spülflüssigkeit erneut eingetaucht und 1 ml der Verdünnungsstufe 10^{-5} oder 10^{-6} zugegeben, filtriert und die Membran auf 7H10-Agarmedien (siehe 5.2.2.1.10) überführt.