

DIN EN 17387



ICS 11.080.20; 71.100.35

Einsprüche bis 2019-07-17

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Oberflächen-Versuch zur Bestimmung der bakteriziden
und/oder levuroziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer
Desinfektionsmittel auf nicht porösen Oberflächen im
humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen ohne mechanische Behandlung
(Phase 2, Stufe 2);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17387:2019**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or yeasticidal
and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in medical area –
Part rev: Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2);
German and English version prEN 17387:2019

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de surface non poreuse pour l'évaluation de l'activité bactéricide et/ou
levuricide et/ou fongicide des désinfectants chimiques utilisés en médecine –
Méthode d'essai sans action mécanique et prescriptions (phase 2, étape 2);
Version allemande et anglaise prEN 17387:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-05-17 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, Saatwinkler Damm 42/43,
13627 Berlin.

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

Gesamtumfang 82 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17387:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Oberflächen-Versuch zur Bestimmung der bakteriziden und/oder levuroziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel auf nicht porösen Oberflächen im humanmedizinischen Bereich — Prüfverfahren und Anforderungen ohne mechanische Behandlung (Phase 2, Stufe 2)

Antiseptiques et désinfectants chimiques — Essai quantitatif de surface non-poreuse pour l'évaluation de l'activité bactéricide et/ou levuricide et/ou fongicide des désinfectants chimiques utilisés en médecine — Méthode d'essai sans action mécanique et prescriptions (phase 2, étape 2)

Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or yeasticidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in medical area — Part rev: Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2)

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokument-Stage: CEN-Umfrage

Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	7
4 Anforderungen	7
5 Prüfverfahren	8
5.1 Kurzbeschreibung	8
5.2 Materialien und Reagenzien	8
5.2.1 Prüforganismen	8
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	9
5.2.3 Prüfoberfläche	12
5.3 Gerät und Glasgeräte	13
5.3.1 Allgemeines	13
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte:	13
5.4 Herstellung der Prüforganismensuspensionen und der Produktprüflösungen	14
5.4.1 Prüforganismensuspensionen	14
5.4.2 Produktprüflösungen	20
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der bakteriziden, levuroziden und fungiziden Wirkung des Produkts	21
5.5.1 Auswahl der Untersuchungsbedingungen	21
5.5.2 Versuchsdurchführung	21
5.5.3 Auszählen der Prüfmischungen	25
5.6 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse	26
5.6.1 Berechnung der Daten	26
5.6.2 Verifizierung der Methodik	27
5.6.3 Darstellung der Ergebnisse	28
5.6.4 Fazit	28
5.7 Prüfbericht	29
Anhang A (informativ) Entsprechende referenzierte Stämme	31
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien	32
Anhang C (informativ) Darstellung der Ergebnisse mit dem Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	34
Anhang D (informativ) Bakterizide Wirkung auf Oberflächen für allgemeine Zwecke unter Bedingungen niedriger Belastung	36
Anhang E (informativ) Trocknung durch Vakuum-Exsikkator — Gebrauchsanweisung	38
E.1 Beschreibung	38
E.2 Vorgehensweise	38
E.3 Andere Arten von Exsikkatoren	39
Anhang F (informativ) Präzision des Prüfergebnisses	41
Literaturhinweise	42

Bilder

Bild 1 — Foto Nr. 1: Beispiele adäquater Kulturen von <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 nach 7 Tagen der Bebrütung bei 30 °C	15
Bild 2 — Foto Nr. 2: Beispiel einer inadäquaten (nicht verwendbaren) Kultur von <i>A. brasiliensis</i> ATCC 16404 nach 7 Tagen der Bebrütung bei 30 °C	16
Bild 5 — Beimpfung des Trägers	22
Bild 6 — Sichtbar getrocknetes Inokulum	22
Bild 7 — Auf beimpften Keimträger aufgebrachtes Produkt	23
Bild E.1 — Aufbau eines Exsikkators.....	38
Bild E.2 — Beispiel für eine weitere Exsikkatorart	40

Tabellen

Tabelle 1 — Untersuchungsbedingungen	7
--	---

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17387:2019) 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

Dieses Dokument legt ein Oberflächenprüfverfahren zur Feststellung fest, ob ein chemisches Desinfektionsmittel in den im Anwendungsbereich beschriebenen Gebieten (Abschnitt 1) auf nichtporösen Oberflächen ohne mechanische Einwirkung eine bakterizide und/oder fungizide oder levurozide Wirkung aufweist oder nicht.

Dieses Verfahren ist ein Laborversuch und simuliert praxisnahe Anwendungsbedingungen. Die gewählten Bedingungen (Einwirkzeit, Temperatur und Mikroorganismen auf Oberflächen usw.) spiegeln Parameter wider, wie sie in der Praxis vorkommen, einschließlich der Bedingungen, die die Wirkung von Desinfektionsmitteln beeinflussen können.

Die Bedingungen sollen allgemeinen Zwecken dienen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produkten ermöglichen.

Unter besonderen Bedingungen können die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt jedoch abweichen. In diesem Fall sind zusätzliche Prüfbedingungen erforderlich.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die bakterizide und levurozide und zusätzlich auch fungizide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte als homogene, physikalisch stabile Zubereitung vorliegen bzw. bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser verdünnt werden.

ANMERKUNG 1 Verdünnungen sind erforderlich, da drei Konzentrationen im aktiven bis nichtaktiven Bereich geprüft werden.

Dieses Dokument gilt für Produkte, die ohne mechanische Einwirkung zur Desinfektion nichtporöser Oberflächen im humanmedizinischen Bereich verwendet werden.

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

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

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

EN 14885 legt im Einzelnen die Beziehungen der verschiedenen Prüfungen untereinander und zu den Anwendungsempfehlungen fest.

Mit diesem Dokument ist es möglich, die Wirkung von Produkten wie handelsüblichen Formulierungen oder Wirkstoffen unter den Bedingungen, unter denen sie verwendet werden, auf Bakterien und/oder Pilze zu bestimmen und entspricht somit einer Prüfung der Phase 2, Schritt 2.

Dieses Verfahren schließt die Bewertung der Wirkung von Produkten gegen Mykobakterien und bakterielle Sporen aus.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Aufbewahrung von Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

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

3 Begriffe

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

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

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

4 Anforderungen

Das Produkt muss bei der Prüfung nach Tabelle 1 und 5.5 eine dezimal-logarithmische Reduktion (lg) um mindestens fünf Stufen für Bakterien und eine dezimal-logarithmische Reduktion (lg) um mindestens vier Stufen für Pilze aufweisen.

Tabelle 1 — Untersuchungsbedingungen

Prüfbedingungen	Bakterizide Wirkung	Levurozide Wirkung	Fungizide Wirkung
Mindestspektrum der Prüforganismen	Staphylococcus aureus Enterococcus hirae Pseudomonas aeruginosa	Candida albicans	Aspergillus brasiliensis Candida albicans
zusätzlich	jeder zutreffende Prüforganismus		
Prüftemperatur	entsprechend der Empfehlung des Herstellers, jedoch von (4 ± 1) °C bis (30 ± 1) °C Für Prüfungen bei Raumtemperatur muss der Bereich bei (20 ± 2,5) °C liegen		
Einwirkzeit	nach den Empfehlungen des Herstellers, aber mindestens 1 min und nicht länger als 5 min oder 60 min ^a (von 1 min bis 5 min in Intervallen von 1 min und von 5 min bis 60 min in Intervallen von 5 min)		
Belastungssubstanz			
Bedingungen niedriger Belastung	0,3 g/l Rinderserumalbuminlösung		
Bedingungen hoher Belastung	3,0 g/l Rinderserumalbuminlösung plus 3,0 ml Erythrozyten		
zusätzlich	alle relevanten Substanzen		
^a Die in dieser Tabelle angegebenen Einwirkzeiten für Oberflächendesinfektionsmittel werden auf der Grundlage der praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts ausgewählt. Die empfohlene Einwirkzeit für die Anwendung des Produkts liegt in der Verantwortung des Herstellers. Produkte, die zur Desinfektion von Oberflächen vorgesehen sind, die wahrscheinlich mit dem Patienten und/oder dem medizinischen Personal in Kontakt kommen, und Oberflächen, die häufig von verschiedenen Personen berührt werden, was zu einer Übertragung von Mikroorganismen auf den Patienten führt, sind mit einer Einwirkzeit von höchstens 5 min zu prüfen. Das Gleiche gilt für Fälle, bei denen die Einwirkzeit des Produktes aus praktischen Gründen begrenzt sein muss. Produkte für alle weiteren, als die oben angeführten Oberflächen dürfen mit einer Einwirkzeit von höchstens 60 min geprüft werden.			
ANMERKUNG Für die zusätzlichen Bedingungen kann die als ein Ergebnis festgelegte Konzentration geringer sein als eine unter den Mindestprüfbedingungen erhaltene Konzentration.			

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Eine Prüfsuspension von Bakterien oder Pilzen in einer Lösung mit Belastungssubstanzen wird auf eine Edelstahl-Prüfoberfläche aufgebracht und getrocknet. Eine Probe des zu prüfenden Produkts wird so aufgetragen, dass sie die getrockneten Prüforganismen vollständig bedeckt. Die Oberfläche wird bei der in Abschnitt 4 und 5.5.1 festgelegten Temperatur und Einwirkzeit gehalten. Am Ende dieser Einwirkzeit wird die Oberfläche auf ein zuvor validiertes Neutralisationsmedium übertragen, um jegliche Produktaktivität zu unterdrücken. Es wird die Anzahl der von der Oberfläche gewonnenen überlebenden Prüforganismen quantitativ bestimmt.

Des Weiteren wird die Anzahl der Bakterien und Pilze auf einer Prüfoberfläche bestimmt, die anstelle des zu prüfenden Produkts mit Wasser definierter Härte behandelt wurde. Die durch das Produkt bewirkte Reduktion der Lebendkeimzahl wird als Differenz zwischen den Ergebnissen der beiden Prüfoberflächen berechnet.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die bakterizide Wirkung muss mit den folgenden Stämmen bewertet werden¹:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6 538;
- *Enterococcus hirae* ATCC 10 541;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15 442.

Die fungizide Wirkung muss mit den folgenden Stämmen bewertet werden¹:

- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16 404.
- *Candida albicans* ATCC 10 231;

Die levurozide Wirkung muss mit dem folgenden Stamm bewertet werden¹:

- *Candida albicans* ATCC 10 231.

Falls für besondere Anwendungen erforderlich, dürfen zusätzliche Stämme gewählt werden.

ANMERKUNG Bezüglich der entsprechenden Stammnummern in einigen anderen Kultursammlungen siehe Anhang A.

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

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

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

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

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

Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern, wird empfohlen, kommerziell erhältliche wasserfreie Materialien zur Herstellung von Kulturmedien zu verwenden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten genau befolgt werden.

Für jedes Kulturmedium und Reagenz sollte eine zeitliche Begrenzung der Verwendung festgelegt werden.

Alle festgelegten pH-Werte werden bei (20 ± 1) °C gemessen.

5.2.2.2 Wasser

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

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

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

5.2.2.3 Trypton-Soja-Agar (TSA)

Zur Erhaltung von Bakterienstämmen und zur Bestimmung der Lebendkeimzahl.

Trypton, Casein, tryptisch verdaut	15,0 g
Sojapepton, papainisch verdautes Sojabohnenmehl	5,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	auf 1 000 ml;

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.6) des Mediums $7,2 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.4 Malzextraktagar (MEA)

Zur Erhaltung von Pilzstämmen, Sporenbildung und zur Bestimmung der Lebendkeimzahl.

Malzextrakt [lebensmittelunbedenklich (z. B. Cristomalzpulver von Difal) oder ein entsprechender Extrakt, der nicht stark gereinigt ist und der nicht auf Maltose basiert (z. B. Malzextrakt von OXOID)] ²	30,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	auf 1 000 ml;

Sollte es jedoch Probleme geben, so sind mindestens 75 % stachelige Sporen herzustellen, siehe 5.4.1.3.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.6) des Mediums $5,6 \pm 0,2$ betragen.

Wenn Probleme mit der Neutralisation (5.5.2.3 und 5.5.2.4) auftreten, ist es möglicherweise erforderlich, dem MEA Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält eine Anleitung zu Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen. Es wird empfohlen, kein Neutralisationsmedium zu verwenden, das zu einer Trübung im Agar führt.

5.2.2.5 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchloridlösung, bestehend aus:

Trypton, Casein, tryptisch verdaut	1,0 g
Natriumchlorid	8,5 g
Wasser (5.2.2.2)	auf 1 000 ml;

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.6) des Verdünnungsmittels $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.6 Neutralisationsmedium

Das Neutralisationsmedium muss für das zu prüfende Produkt in Übereinstimmung mit 5.5.2.3 und 5.5.2.4 validiert sein. Das Neutralisationsmedium muss steril sein.

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

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

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

- Herstellung von Lösung A: Es werden 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.19) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird unter aseptischen Bedingungen auf

² Die Malzextrakte von Difal und OXOID sind Beispiele für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

1 000 ml mit Wasser (5.2.2.2) aufgefüllt. Die Lösung darf im Kühlschrank (5.3.2.15) nicht länger als einen Monat gelagert werden;

- Herstellung von Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.19). Die Lösung darf im Kühlschrank (5.3.2.15) nicht länger als eine Woche gelagert werden;
- Es werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.13) gefüllt und zunächst 6,0 ml Lösung A, dann 8,0 ml Lösung B hinzugegeben. Die erhaltene Lösung wird gemischt und mit Wasser auf 1 000 ml (5.2.2.2) aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers (5.3.2.6) standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen. Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt.

Das Wasser standardisierter Härte ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

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

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Allgemeines

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

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in der zweifachen in der Prüfung verwendeten Endkonzentration hergestellt werden.

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

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

Das Verfahren zur Herstellung und Sterilisation sowie die Zusammensetzung sind im Prüfbericht (5.7) zu vermerken.

5.2.2.8.2 Rinderserumalbumin-Lösung

Rinderserumalbumin-Lösungen für die Prüfbedingungen müssen wie folgt hergestellt werden.

a) Herstellung für Bedingungen niedriger Belastung:

- 0,3 g Rinderserumalbumin (Cohn-Fraktion V für Dubos-Medium) werden in 100 ml Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.5) aufgelöst;
- die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.19);
- mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.5) wird auf 1/5 verdünnt;
- die Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb eines Monats verbraucht.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins im Prüfverfahren (5.5.2) beträgt 0,3 g/l.

b) Herstellung für Bedingungen hoher Belastung

- in 97 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.5) werden 3,00 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst;
- die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.19);
- es werden mindestens 8,0 ml frisches steriles defibriniertes Schafsblut hergestellt. Das Schafsblut wird für 10 min bei 800 g_N (5.3.2.14) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Erythrozyten in Verdünnungsmittel (5.2.2.5) resuspendiert;
- dieser Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt, bis der Überstand farblos ist;
- 3 ml der angereicherten (gepackten) Schaf-Erythrozyten werden in den 97 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung (siehe oben) resuspendiert.
- Mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.5) wird auf 1/5 verdünnt.
- Um eine Kontamination zu verhindern, sollte dieses Gemisch in Portionen aufgeteilt, die wahrscheinlich an einem Tag verbraucht werden, und in gesonderten Behältern im Kühlschrank (5.3.2.15) für höchstens 7 Tage gelagert werden.

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

5.2.3 Prüfoberfläche

Die Prüfoberfläche ist eine flache Scheibe (2 cm Durchmesser) aus Edelstahl 304 mit beidseitigem Veredlungsgrad 2b. Es darf nur eine Seite der Scheibe verwendet werden. Die Scheiben dürfen nur einmal verwendet werden.

Zur Reinigung sind die Scheiben für 60 Minuten in ein Becherglas (Mindestvolumen: 50 ml) zu legen, das mindestens 20 ml Decon® einer Volumenkonzentration von 5 %³ enthält. Die Scheiben werden sofort zweimal für jeweils 10 Sekunden mit Wasser (5.2.2.2) gespült, um das Reinigungsmittel vollständig zu entfernen. Die Scheiben dürfen nicht trocknen.

ANMERKUNG Um einen ausreichenden Wasserfluss bereitzustellen, kann ein sterilisiertes, Flüssigkeit spendendes Druckgefäß mit passenden Schläuchen und Anschlüssen oder ein anderes geeignetes Verfahren verwendet werden, welches so reguliert wird, dass es etwa 2 000 ml Wasser je Minute abgibt.

Zur Dekontamination werden die Scheiben 15 min lang in ein Bad mit Isopropanol einer Volumenkonzentration von 70 % getaucht. Die Scheiben werden entfernt und durch Verdampfen unter laminarem Luftstrom getrocknet.

3 Decon® ist ein Beispiel für ein im Handel erhältliches geeignetes Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.3 Gerät und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

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

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

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung⁴ und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Gerät zur Sterilisation (feuchte und trockene Hitze)

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

5.3.2.2 Kammer oder Schrank mit Temperaturregelung, einstellbar auf die Prüftemperatur von $(\theta \pm 1)$ °C (für andere Prüftemperaturen als die Umgebungstemperatur).

5.3.2.3 Wasserbäder, einstellbar auf (20 ± 1) °C, auf (45 ± 1) °C und auf zusätzliche Prüftemperaturen $(\theta \pm 1)$ °C (5.5.1)

5.3.2.4 Brutschrank (für bakterizide Wirkung), einstellbar auf (36 ± 1) °C oder (37 ± 1) °C. Ein Brutschrank einstellbar auf (37 ± 1) °C darf verwendet werden, wenn ein Brutschrank einstellbar auf (36 ± 1) °C nicht verfügbar ist. Bei allen Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung muss die gleiche Temperatur verwendet werden

5.3.2.5 Brutschrank (für fungizide oder levurozide Wirkung), einstellbar auf eine Temperatur von (30 ± 1) °C

5.3.2.6 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei (20 ± 1) °C

5.3.2.7 Stoppuhr

5.3.2.8 Schüttler

- a) elektromechanisches Rührwerk, z. B. Vortex®-Mischer⁵;
- b) mechanisches Schüttelgerät

4 Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

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

- 5.3.2.9 **Behälter: Reagenzgläser**, Kulturflaschen oder Glaskolben mit geeignetem Nennvolumen
- 5.3.2.10 **Graduierte Messpipetten** mit den Nennvolumen von 10 ml, 1 ml, 0,1 ml, 0,05 ml und 0,001 ml oder kalibrierte automatische Pipetten
- 5.3.2.11 **Petrischalen** in den Größen 90 mm bis 100 mm
- 5.3.2.12 **Glasperlen** (Durchmesser: ≤ 5 mm)
- 5.3.2.13 **Messkolben**
- 5.3.2.14 **Zentrifuge** (800 g_N)
- 5.3.2.15 **Kühlschrank**, einstellbar auf 2 °C bis 8 °C
- 5.3.2.16 **Pinzetten**
- 5.3.2.17 **Schrank mit mikrobiologisch gefilterter laminarer Luftströmung**
- 5.3.2.18 **Glasfilterfritte**: Porosität von 40 μm bis 100 μm (ISO 4793)
- 5.3.2.19 **Membranfiltrationsgerät**, aus einem mit den zu filternden Substanzen kompatiblen Material

Das Gerät muss mit einem Filterhalter mit einem Mindestvolumen von 50 ml ausgestattet sein. Er muss zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser zwischen 47 mm und 50 mm und mit einer Porengröße von 0,45 μm für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) geeignet sein.

5.3.2.20 **Vakuumexsikkator**

Die Vakuumquelle darf eine Pumpe oder eine zentrale Vorrichtung sein und sollte ein Vakuum von 20 in bis 25 in Quecksilbersäule erzielen (508 Torr bis 635 Torr; 677 mbar bis 847 mbar; 68 000 Pa bis 85 000 Pa; Umrechnungstabellen für andere Einheiten sind im Internet zu finden). Hinsichtlich weiterer Einzelheiten zur Vorgehensweise siehe Anhang E.

ANMERKUNG Andere Arten von Exsikkatoren sind zulässig, wenn sie unabhängig vom Einsatzort zu den gleichen Ergebnissen führen.

5.3.2.21 **Kolben mit belüfteten Verschlusssteilen**: Roux-Flaschen oder ähnliche Kolben.

5.4 **Herstellung der Prüforganismensuspensionen und der Produktprüflösungen**

5.4.1 **Prüforganismensuspensionen**

5.4.1.1 **Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüforganismen**

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

5.4.1.2 Gebrauchskultur der Prüfororganismen

a) Bakterien

Um die Gebrauchskultur der Prüfororganismen herzustellen, ist eine Subkultur von der Stammkultur (5.4.1.1) durch Ausstrich auf TSA-Schrägagarrröhrchen (5.2.2.3) anzulegen und zu bebrüten (5.3.2.4). 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 gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden. Die zweite und (sofern angelegt) dritte Subkultur ist (sind) die Gebrauchskultur(en).

Wenn es nicht möglich ist, eine 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.

Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

Bei zusätzlichen Stämmen (5.2.1) muss jedes Abweichen von diesem Verfahren zur Kultivierung der Bakterien oder zur Herstellung der Suspensionen aufgezeichnet werden, wobei die Gründe im Prüfbericht anzugeben sind.

b) Pilze

Um die Gebrauchskultur von *Candida albicans* (5.2.1) herzustellen, wird von der Stammkultur (5.4.1.1) eine Subkultur durch Ausstrich auf MEA -Schrägagarrröhrchen (5.2.2.4) angelegt und bebrütet (5.3.2.5). Nach 42 h bis 48 h wird aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise eine zweite Subkultur angelegt und 42 h bis 48 h bebrütet. Aus dieser zweiten Subkultur darf auf gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden. Die zweite und (sofern angelegt) dritte Subkultur ist (sind) die Gebrauchskultur(en).

Für *Aspergillus brasiliensis* (5.2.1) wird nur die erste auf MEA (5.2.2.4) in Petrischalen (5.3.2.11) oder Kolben mit belüfteten Verschlusssteilen (5.3.2.21) gewachsene Subkultur verwendet und bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 7 d bis 9 d bebrütet. Die Herstellung weiterer Subkulturen ist nicht notwendig. Während der Bebrütung sind die Petrischalen nicht aufeinander zu schichten, damit die Temperaturhomogenisierung verbessert wird.

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



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

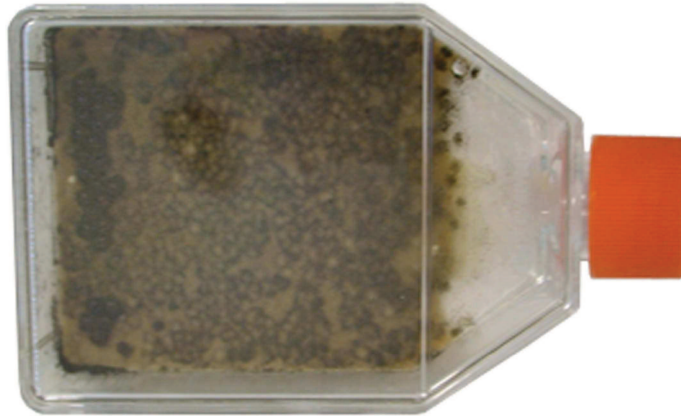


Bild 2 — Foto Nr. 2: Beispiel einer inadäquaten (nicht verwendbaren) Kultur von *A. brasiliensis* ATCC 16404 nach 7 Tagen der Bebrütung bei 30 °C

5.4.1.3 Prüfsuspensionen

a) Bakterien-Prüfsuspension

Es werden 10 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.5) mit 5 g Glasperlen (5.3.2.12) in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.2) werden ösenweise Zellen in das Verdünnungsmittel überführt. Die Suspension der Zellen sollte erfolgen, indem die Öse in das Verdünnungsmittel eingetaucht und an der Wand des Kolbens gerieben wird, um die Zellen abzulösen. Unter Verwendung eines mechanischen Schüttelgeräts [5.3.2.8 b)] wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in einen anderen Kolben (5.3.2.13) übertragen. Die Zellzahl in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel auf $1,5 \times 10^9$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^9$ KBE/ml eingestellt. Die Anzahl der KBE (koloniebildenden Einheiten) wird mit einem Spektralphotometer oder einer anderen geeigneten Methode abgeschätzt. Diese Suspension ist im Wasserbad bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden.

b) Pilz-Prüfsuspension

1) *Candida albicans*

10 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.5) werden mit 5 g Glasperlen in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.2) werden ösenweise Zellen in das Verdünnungsmittel überführt. Die Suspension der Zellen sollte erfolgen, indem die Öse in das Verdünnungsmittel eingetaucht und an der Wand des Kolbens gerieben wird, um die Zellen abzulösen. Unter Verwendung eines mechanischen Schüttelgeräts [5.3.2.8 b)] wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in einen anderen Kolben übertragen. Die Zellzahl in der Suspension wird für Prüfungen unter Bedingungen niedriger Belastung mit dem Verdünnungsmittel auf $1,5 \times 10^8$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml eingestellt, die Anzahl der Einheiten wird mit einem Spektralphotometer oder einer anderen geeigneten Methode abgeschätzt. Diese Suspension ist im Wasserbad bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden.

2) *Aspergillus brasiliensis*

Unter Verwendung der Gebrauchskultur (5.4.1.2) werden die Zellen in 10 ml einer sterilen Polysorbat-80-Lösung (Massenkonzentration 0,05 %) ⁶ in Wasser (5.2.2.2) suspendiert. Die Conidiosporen werden mit einem sterilen Glasstab oder Spatel von der Oberfläche der Kultur abgelöst. Die Suspension wird in einen Kolben überführt und mit 5 g Glasperlen (5.3.2.12) 1 min leicht von Hand geschüttelt. Die Suspension wird durch eine Glasfilterfritte (5.3.2.18) filtriert.

Die mikroskopische Untersuchung bei 400-facher Vergrößerung ist unmittelbar nach der Herstellung durchzuführen, um:

- das Vorhandensein einer hohen Konzentration (mindestens 75 % an stacheligen Sporen) von charakteristischen, reifen Sporen, d. h. stachelige Sporen (im Vergleich zu glatten Sporen) [Bild 3 und Bild 4] nachzuweisen;
- das Nichtvorhandensein von Sporenauskeimung (es sind mindestens 10 Zählfelder zu prüfen) nachzuweisen;
- das Nichtvorhandensein von Myzelfragmenten (es sind mindestens 10 Zählfelder zu prüfen) nachzuweisen;
- Bei Vorhandensein ausgekeimter Sporen ist die Suspension zu verwerfen.

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

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

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

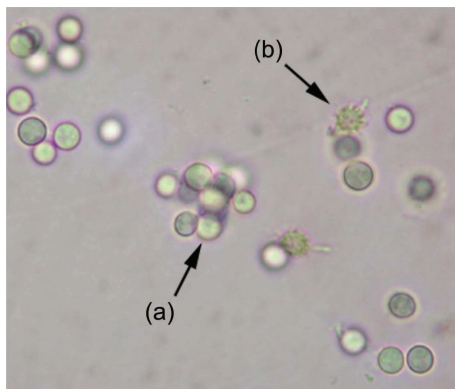


Bild 3 — Foto-Nr. 3: Beobachtung von Conidiosporen unter dem Lichtmikroskop: Vorliegen glatter (a) und stacheliger (b) Sporen [inadäquate (nicht verwendbare) Suspension]

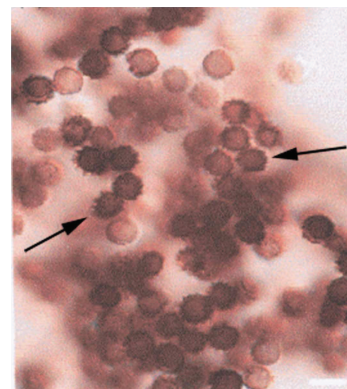


Bild 4 — Foto-Nr. 4: Beobachtung von Conidiosporen unter dem Lichtmikroskop: Hohe Konzentration von charakteristischen, reifen Sporen mit stacheligem Aussehen (adäquate Suspension)

6 Polysorbat 80 ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

Die Anzahl der Sporen in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.5) auf $1,5 \times 10^8$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mittels eines beliebigen geeigneten Verfahrens abgeschätzt wird. Diese Suspension ist innerhalb von 4 h in einem Wasserbad (5.3.2.3), eingestellt auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, anzuwenden. Auf jeden Fall wird die Temperatur nach 5.5.1 erst unmittelbar vor Beginn der Prüfung (5.5.2) eingestellt.

Die Verwendung einer Zellszählvorrichtung zur Einstellung der Zellzahlen wird dringend empfohlen. Bei der Verwendung einer geeigneten Zählkammer sind die Anweisungen genau zu befolgen.

5.4.1.4 Herstellen der Bakterien- und Pilz-Prüfsuspensionen

Die eingestellten Bakteriensuspensionen (5.4.1.3) werden mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.5) durch Reihenverdünnungen mit Verdünnungsmittel auf 10^{-7} bis 10^{-8} und die Schimmelpilzsporen-Suspension (5.4.1.3) sowie *Candida albicans* durch Reihenverdünnungen mit Verdünnungsmittel auf 10^{-6} bis 10^{-7} verdünnt. Die Suspension wird gemischt [5.3.2.8 a)].

Für Bakterien und *Candida albicans* wird von jeder Verdünnung eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft.

- 1) Bei Verwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen (5.3.2.11) überführt; dann wird für die Bakterien 15 ml bis 20 ml geschmolzenes TSA (5.2.2.3) und für *Candida albicans* 15 ml bis 20 ml geschmolzenes MEA (5.2.2.3), die jeweils auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurden, zugegeben.
- 2) Bei Verwendung des Oberflächenverfahrens wird etwa ein Viertel jeder 1,0-ml-Probe auf die entsprechende Anzahl (mindestens zwei) oberflächengetrockneter Platten verteilt, die für Bakterien TSA (5.2.2.3) und für *Candida albicans* MEA (5.2.2.4) aufweisen.

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

- 1) Bei Verwendung des Gussplattenverfahrens wird jeweils etwa die Hälfte der 1,0-ml-Probe auf einzelne Petrischalen überführt (d. h. Doppelbestimmung = vier Platten) und 15 ml bis 20 ml geschmolzener MEA (5.2.2.4), der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde, zugegeben.
- 2) Bei Verwendung des Oberflächenverfahrens wird etwa ein Viertel jeder 1,0-ml-Probe auf die entsprechende Anzahl (mindestens vier) oberflächengetrockneter Platten mit MEA (5.2.2.4) verteilt (d. h. Doppelbestimmung = mindestens acht Platten).

Zur Resuspension der Sporen ist die Prüfsuspension unmittelbar vor der Verwendung zu mischen [5.3.2.8 a)].

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.5.

5.4.1.5 Bebrüten und Auszählen der Bakterien- und Pilz-Prüfsuspensionen

a) Auszählen der Bakterien-Prüfsuspensionen

Für die Bakterienstämme werden die Platten bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder bei $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 18 h bis 24 h bebrütet. Platten, die aus irgendeinem Grund nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden weitere 18 h bis 24 h bebrütet. Platten, die keine auszählbaren Kolonien mehr aufweisen, sind nicht erneut zu zählen. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt.

b) Auszählen der Pilz-Prüfsuspensionen

Platten mit Pilzstämmen werden bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ für 18 h bis 24 h (*Candida albicans*) oder für 42 h bis 48 h (*Aspergillus brasiliensis*) bebrütet. Platten, die aus irgendeinem Grund nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt, und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wird bestimmt. Danach werden die Platten weitere 18 h bis 24 h bebrütet. Platten, die keine gut voneinander abgesetzten Kolonien mehr aufweisen, dürfen nicht erneut ausgezählt werden. Die verbleibenden Platten werden erneut ausgezählt. Bei *Aspergillus brasiliensis* wird weitere 18 h bis 24 h bebrütet und erforderlichenfalls weitere 18 h bis 24 h, vorausgesetzt, die Anzahl der zählbaren Kolonien (einzeln abgesetzte Kolonien) nimmt zu.

Es wird die höchste Anzahl von Kolonien für jede 1-ml-Probe bestimmt.

Zur Berechnung einschließlich der Bestimmung des gewichteten Mittelwerts siehe 5.4.1.6 und 5.4.1.7.

5.4.1.6 Bestimmung der V_C -Werte

Die V_C -Werte werden wie folgt bestimmt.

- a) Die Ergebnisberechnung berücksichtigt nur Platten mit 15 bis 300 Kolonien für Bakterien und Hefen und 15 bis 150 Kolonien für den Schimmelpilzbereich. Es wird eine Abweichung von 10 % akzeptiert. Damit liegen die Grenzwerte bei 14 und 330 für Bakterien und Hefen bzw. bei 14 und 165 für Schimmelpilze.

ANMERKUNG Grundlage des unteren Grenzwertes (14) ist die Tatsache, dass die Variabilität zunimmt, je kleiner die in der Probe (1 ml oder 0,1 ml) gezählten Keimzahlen sind, und daher können nachfolgende Berechnungen zu falschen Ergebnissen führen. Der untere Grenzwert bezieht sich nur auf die Probe (und nicht notwendigerweise auf die Keimzahl auf einer Platte), z. B. ergeben drei Platten je 1 ml Probe mit 3 KBE, 8 KBE und 5 KBE einen V_C -Wert von 16. Die oberen Grenzwerte (330, 165) spiegeln die Ungenauigkeit beim Zählen zusammenfließender Kolonien und die Wachstums- hemmung durch Erschöpfung der Nährsubstanzen wider. Sie beziehen sich nur auf die Auszählung auf einer Platte und nicht notwendigerweise auf die Probe.

- b) Zur Auszählung der Prüfsuspension N (5.4.1) für alle Auszählungen im Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (5.5.2) werden die V_C -Werte aus der Anzahl der Platten, die für 1 ml der Probe verwendet wurden, bestimmt und aufgezeichnet.

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

Wenn die Keimzahl auf einer Platte höher als 330 ist, wird die Zahl im Prüfbericht als „> 330“ angegeben. Wenn mehr als eine Platte je 1 ml Probe verwendet worden ist und mindestens eine der Platten eine höhere Keimzahl als 330 aufweist, wird dieser V_C -Wert im Prüfbericht als „größer als die Summe der Keimzahlen“ angegeben; z. B. wird für „> 330, 310, 302“ im Prüfbericht „> 942“ angegeben.

Falls ein V_C -Wert kleiner als 14 ist, wird die Zahl angegeben (ist aber für weitere Berechnungen im Fall von N_a durch „< 14“ zu ersetzen).

- c) Nur V_C -Werte, die innerhalb der Grenzwerte für die Zählung liegen, werden bei nachfolgenden Berechnungen berücksichtigt.

5.4.1.7 Berechnung von N

N ist die Anzahl von Zellen je ml in der Prüfsuspension (5.4.1, 5.6.1).

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

$$N = \frac{\lg 0,025 \times c}{(n_1 + 0,1n_2) \times d}$$

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_C -Werte;
- n_1 die Anzahl der berücksichtigten V_C -Werte in der niedrigeren Verdünnung, d. h. 10^{-6} für Pilze und 10^{-7} für Bakterien;
- n_2 die Anzahl der berücksichtigten V_C -Werte in der höheren Verdünnung, d. h. 10^{-7} für Pilze und 10^{-8} für Bakterien;
- d der der geringeren Verdünnung entsprechende Verdünnungsfaktor, z. B. 10^{-6} für Pilze und 10^{-7} für Bakterien.

5.4.2 Produktprüflösungen

Produktprüflösungen müssen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt werden, wobei eine Konzentration im wirksamen Bereich und eine Konzentration im unwirksamen Bereich liegen muss. Jedoch sind Verdünnungen gebrauchsfertiger Produkte in Wasser (5.2.2.2) anstatt in Wasser standardisierter Härte herzustellen.

Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden.

Bei flüssigen Produkten müssen die Verdünnungen des Produkts im Verhältnis Volumen zu Volumen in Messkolben (5.3.2.13) hergestellt werden.

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand gelöst, indem mindestens $1\text{ g} \pm 10\text{ mg}$ des Produkts in einen Messkolben eingewogen werden und mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) aufgefüllt wird. Die nachfolgenden Verdünnungen (= niedrigere Konzentrationen) müssen in Messkolben (5.3.2.13) im Verhältnis Volumen zu Volumen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) hergestellt werden.

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

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

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

5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der bakteriziden, levuroziden und fungiziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Auswahl der Untersuchungsbedingungen

Die Auswahl von Temperatur, Einwirkzeit und Belastungssubstanzen muss nach dem praktischen Gebrauch für das Produkt (Abschnitt 4, Tabelle 1) wie folgt vorgenommen werden:

a) Temperatur θ (in °C):

Die zu prüfenden Temperaturen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 angegeben. Die zulässige Abweichung für jede gewählte Temperatur beträgt ± 1 °C. Für Prüfungen bei Raumtemperatur muss der Bereich bei $(20 \pm 2,5)$ °C liegen.

b) Einwirkzeit t (in min):

Die zu prüfenden Einwirkzeiten sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt. Die zulässige Grenzabweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt ± 10 s, außer bei 1 min, wo sie ± 5 s beträgt.

c) Belastungssubstanz:

Die zu prüfende Belastungssubstanz ist 0,3 g/l Rinderserumalbumin-Lösung (5.2.2.8.2) unter Bedingungen mit niedriger Belastung (5.2.2.8.2) oder 3,0 g/l Rinderserumalbumin-Lösung plus 3,0 ml Erythrozyten (5.2.2.8.2) unter Bedingungen mit höherer Belastung nach Abschnitt 4, Tabelle 1, entsprechend den praktischen Anwendungen;

d) Prüforganismen:

Staphylococcus aureus, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus brasiliensis* und *Candida albicans* entsprechend Abschnitt 4, Tabelle 1 und 5.2.1. Es dürfen zusätzliche Prüforganismen geprüft werden.

5.5.2 Versuchsdurchführung

5.5.2.1 Prüfung N_d — Bestimmung der bakteriziden/levuroziden/fungiziden Konzentrationen

Das Verfahren zur Bestimmung der bakteriziden/levuroziden/fungiziden Konzentrationen ist wie folgt:

a) Zur Vorbereitung der mikrobiellen Suspension wird 1,0 ml der Belastungssubstanz (5.2.2.8) in ein Reagenzglas pipettiert.

Es wird 1,0 ml der Prüfsuspension (5.4.1.3) zugegeben. Die Stoppuhr wird sofort in Gang gesetzt, es wird durchmischt und das Reagenzglas für $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ in ein Wasserbad (5.3.2.3) oder in einen auf die gewählte Prüftemperatur $(\theta \pm 1)$ °C eingestellten Schrank (5.3.2.2) gestellt.

Unmittelbar vor der Zugabe sollte die Prüfsuspension gut vermischt werden, um die Organismen vollständig zu resuspendieren.

b) Die Prüfoberflächen (5.2.3) werden in eine sterile Petrischale gegeben, wobei sicherzustellen ist, dass sich die Schale in horizontaler Lage befindet. Die Prüfoberflächen werden durch Beimpfen mit 0,05 ml der mikrobiellen Prüfsuspension (5.5.3.1 a) auf jede Prüfoberfläche hergestellt (Bild 5). Die Oberflächen werden bei 37 °C getrocknet, bis die Prüforganismen sichtbar trocken sind (Bild 6). Bedingt durch die unterschiedlichen Umgebungsbedingungen im Laboratorium und unterschiedlich gestaltete Brut-schränke (z. B. mit oder ohne Ventilator) erfolgt das Trocknen der Prüfoberflächen mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten.

Alternativ werden die Oberflächen in einer offenen Petrischale in aufrechter Position bei $(20 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ (Raumtemperatur im Labor) in einem Vakuum-Exsikkator (5.3.2.20) für nicht länger als 60 min getrocknet. Es ist sicherzustellen, dass die Petrischale teilweise geöffnet ist, indem ihr Deckel leicht gegenüber der Mittelposition verschoben wird. Es ist darauf zu achten, dass der Exsikkator ordnungsgemäß abgedichtet ist. Der Ausgang des Exsikkators wird an eine Vakuumquelle angeschlossen und die Evakuierung der Luft begonnen, um ein Vakuum von 20 in bis 25 in Quecksilbersäule zu erreichen.

Aus diesem Grund wird keine spezifische Dauer für den Trocknungsvorgang angegeben. Die Mindestzeit, die erforderlich ist, bis die Prüforganismen sichtbar trocken sind, sollte in jedem Laboratorium individuell festgelegt werden. Die Trocknungsdauer sollte 60 min nicht überschreiten. Den Prüfoberflächen ist zu ermöglichen, dass sie sich bei Einsatz eines temperaturgeregelten Schanks (5.3.2.2) auf die ausgewählte Prüftemperatur θ [5.5.1a)] einstellen.



Bild 5 — Beimpfung des Trägers



Bild 6 — Sichtbar getrocknetes Inokulum

- c) 0,1 ml jeder zu prüfenden Produktprüflösung (5.4.2) werden auf separate getrocknete Oberflächen pipettiert, wobei sicherzustellen ist, dass das getrocknete Inokulum vom Prüfprodukt vollständig bedeckt wird. (Bild 7) Die Oberflächen werden in einen temperaturgeregelten Schrank (5.3.2.2) mit der gewählten Prüftemperatur θ [5.5.1a)] und Einwirkzeit t [5.5.1b)] gestellt.

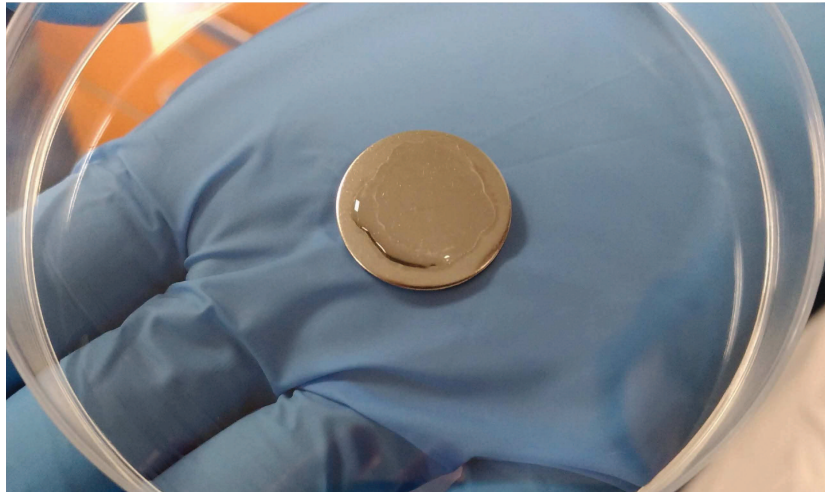


Bild 7 — Auf beimpften Keimträger aufgebrachtes Produkt

- d) Am Ende von t wird jede der Oberflächen (N_d) in einen separaten Behälter mit 10 ml Neutralisationsmedium (5.2.2.6) zusammen mit einer ausreichenden Anzahl von Glasperlen (5.3.2.12) (z. B. 5 g), die die Oberfläche stützen, gegeben. Die Oberflächen sollten mit der geimpften Oberfläche nach unten in Kontakt mit den Perlen platziert werden. Die Behälter sind für mindestens 1 min zu schütteln. Das Schütteln sollte ausreichend intensiv sein, um sicherzustellen, dass sich die Prüfoberfläche ständig über die Perlen bewegt. Nach der Neutralisationsdauer von $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ wird eine Reihe von Zehnfachverdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-2} der neutralisierten Mischung im Verdünnungsmittel (5.2.2.5) hergestellt. Von der neutralisierten Mischung und jeder Verdünnung wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft.
- 1) Bei Verwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen pipettiert; dann wird für die Bakterien 15 ml bis 20 ml geschmolzenes TSA (5.2.2.3) und für die Pilze 15 ml bis 20 ml geschmolzenes MEA (5.2.2.4), die jeweils auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurden, zugegeben.
 - 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in etwa gleiche Anteile geteilt und auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) an der Oberfläche getrockneter TSA-Platten (5.2.2.3) ausgestrichen.
- Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.4.
- e) Nach Bergen der Prüfoberfläche (N_{ts}) wird das Neutralisationsmedium abtropfen gelassen und die Prüfoberfläche mit 10 ml Wasser (5.2.2.2) gespült. Die Prüfoberfläche wird für Bakterien in eine Petrischale mit 10 ml verfestigtem TSA (5.2.2.3) und für Pilze in eine Petrischale mit 10 ml verfestigtem MEA (5.2.2.4) überführt und mit der Prüfoberfläche nach oben auf den Agar gelegt. Es werden 10 ml TSA (5.2.2.3) und/oder MEA (5.2.2.4) hinzugefügt, der/die nach dem Schmelzen auf 45°C abgekühlt wurde(n).
- f) Die Arbeitsgänge a) bis e) werden zeitgleich unter Verwendung der anderen Produktprüflösungen durchgeführt.
- g) Die Arbeitsgänge a) bis f) werden unter Anwendung der anderen obligatorischen Untersuchungsbedingungen und gegebenenfalls von anderen zusätzlichen Untersuchungsbedingungen (5.5.1) durchgeführt.