

DIN EN 17422

ICS 71.100.35

Einsprüche bis 2019-09-12

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Oberflächenversuch zur Beurteilung von
Zitendesinfektionsmittel für den Veterinärbereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17422:2019**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative surface test for the evaluation of teat disinfectants used in the veterinary area –
Test method and requirements (phase 2 step 2);
German and English version prEN 17422:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-07-12 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs
besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, 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 58 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17422:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Für die deutsche Mitarbeit ist der Arbeitsausschuss NA 057-08-04 AA „Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) verantwortlich.

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 Oberflächenversuch zur Beurteilung von Zitzendesinfektionsmittel für den Veterinärbereich — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)

Xxx — Xxx — Xxx

Chemical disinfectants and antiseptics — Quantitative surface test for the evaluation of teat disinfectants used in the veterinary area — Test method and requirements (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	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	6
5.1 Kurzbeschreibung	6
5.2 Materialien und Reagenzien	7
5.2.1 Prüforganismen	7
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	7
5.2.3 Prüfoberfläche – künstliche Haut	9
5.3 Geräte und Glasgeräte	10
5.3.1 Allgemeines	10
5.4 Herstellung der Prüforganismussuspension und Produktprüflösungen	11
5.4.1 Prüforganismussuspension (Prüf- und Validierungssuspension)	11
5.4.2 Produktprüflösung	12
5.5 Verfahren zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produkts	13
5.5.1 Allgemeines	13
5.5.2 Prüfverfahren	14
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	16
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen	16
5.6.2 Berechnung	17
5.7 Verifizierung des Verfahrens	20
5.7.1 Allgemeines	20
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	20
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	20
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	20
5.8.1 Reduktion	20
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	21
5.8.3 Limitierender Prüforganismus und bakterizide Konzentration	21
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	21
5.9 Interpretation der Ergebnisse – Schlussfolgerung	21
5.9.1 Allgemeines	21
5.9.2 Bakterizide Wirkung für die Zitrendesinfektion	22
5.10 Prüfbericht	22
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	24
Anhang B (informativ) Beispiele von Neutralisationsmedien für die verbleibende antimikrobielle Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika sowie Spülflüssigkeiten	25
Anhang C (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht	27
Literaturhinweise	30

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17422:2019) 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 beschreibt einen Oberflächenversuch, mit dem festgestellt werden soll, ob ein Zitzendesinfektionsmittel zur Anwendung auf der Zitzenhaut ohne mechanische Einwirkung im Veterinärbereich unter den in diesem Dokument festgelegten Laborbedingungen, die die Wirkung von Desinfektionsmitteln bei der praktischen Anwendung beeinflussen, eine bakterizide Wirkung aufweist oder nicht.

Der Laborversuch berücksichtigt praktische Anwendungsbedingungen für das Produkt, einschließlich Anwendung von Prüforganismen und Belastungssubstanzen auf einer künstlichen Hautoberfläche, Einwirkzeit und Temperatur, d. h. Bedingungen, die die Wirkung des Produkts in praktischen Situationen beeinflussen können. Das Verfahren beruht auf EN 16437, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Oberflächenversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich auf porösen Oberflächen ohne mechanische Wirkung — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)*.

In diesem Dokument wird künstliche menschliche Haut als Prüfoberfläche verwendet.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die bakterizide Wirkung von Zitzendesinfektionsmitteln fest, die bei Verdünnung in Wasser standardisierter Härte – oder im Falle gebrauchsfertiger Produkte – in Wasser als homogenes und physikalisch stabiles Präparat vorliegen.

Dieses Dokument gilt für Zitzendesinfektionsmittel, die auf der Zitzenhaut ohne mechanische Einwirkung als Desinfektionsmittel vor und/oder nach dem Melken im Veterinärbereich zum Einsatz kommen, d. h. bei der Aufzucht, Haltung, Produktion, in veterinärischen Pflegeeinrichtungen, beim Transport von Tieren sowie bei der Tierkörperbeseitigung aller Tiere mit Ausnahme der Tiere, die nach der Tötung direkt als Nahrungsmittel verwendet oder der weiterverarbeitenden Industrie zugeführt werden.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren soll der Bestimmung der Wirkung handelsüblicher Zubereitungen unter den Bedingungen dienen, unter denen sie in der Praxis angewendet werden.

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

ANMERKUNG 3 Es wurden zwei Arten künstlicher Haut in einem Ringversuch beurteilt, ohne einen wesentlichen Leistungsunterschied festzustellen. Davon wurde eine als Versuchsfläche gewählt, da sie im Handel erhältlich ist. Andere Arten künstlicher Haut können verfügbar und angewendet werden, wenn nachgewiesen ist, dass sie vergleichbare Ergebnisse zu einer in dieser Norm angeführten Art liefern.

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 1656, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

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:

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

4 Anforderungen

Das Produkt muss mindestens eine 4 Dezimal-logarithmische (lg) Reduktion (Desinfektionsmittel für nach dem Melken) oder 3 Dezimal-logarithmische (lg) Reduktion (Desinfektionsmittel für vor dem Melken) gegenüber einem Kontrollversuch mit Wasser aufweisen, wenn es nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 unter simulierten Bedingungen (hoher oder niedriger) Belastung (10,0 g Milchpulver oder 3,0 g/l Rinderserumalbumin) geprüft wird.

Tabelle 1 — Anforderungen

Prüfbedingungen	Bakterizide Wirkung auf künstlicher Haut ohne mechanische Wirkung	
Prüforganismus	— <i>Escherichia coli</i> — <i>Staphylococcus aureus</i>	
Prüftemperatur	(30 ± 1) °C	
Einwirkzeit	Minimal Bis zu 1 min in Intervallen von 30 s	Maximal Bei Zeiten > 1 min in Intervallen von 1 min
Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken	1 min ± 5 s	5 min ± 10 s
Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken	(30 ± 5) s	3 min ± 10 s
Belastungssubstanz	10,0 g/l Milchpulver 3,0 g/l Rinderserumalbumin	
Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken		
Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken		

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Eine Prüfsuspension von Bakterien gemischt mit der Belastungssubstanz wird auf die künstliche Hautoberfläche abgeimpft und für die Konditionierungsdauer bei 30 °C gehalten.

Nach dieser Konditionierungszeit wird die Hautoberfläche in das Produkt oder Verdünnungen des Produkts bei 30 °C für eine festgelegte Dauer eingetaucht, wie in Tabelle 1 festgelegt. Nach Ablauf dieser Einwirkzeit wird ein Neutralisationsmedium zugegeben, so dass die Wirkung des Desinfektionsmittels unmittelbar neutralisiert wird.

Durch Ultraschalleinwirkung werden die Bakterien von der Oberfläche entfernt. Die Anzahl überlebender Bakterien, die von der Prüffläche zurück gewonnen werden können, wird quantitativ bestimmt.

Die Anzahl der Bakterien auf einer mit Wasser anstelle des Desinfektionsmittels behandelten Oberfläche wird ebenfalls bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahl berechnet.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die bakterizide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden Stämme als Prüforganismen¹ bestimmt werden:

- *Escherichia coli* ATCC 10536
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

ANMERKUNG Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern der Stämme, die von der American Type Culture Collection (ATCC) vertrieben werden.

Verweisungen auf Stämme aus einigen anderen Kultursammlungen sind in Anhang A genannt.

Die erforderliche Bebrütungstemperatur für diese Prüforganismen liegt bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.3).

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle für dieses Verfahren 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.

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

Ein gebrauchsfertiges Medium darf verwendet werden, wenn es den Anforderungen entspricht.

Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte ein maximaler Anwendungszeitraum festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliert werden und darf kein demineralisiertes Wasser sein. Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, darf Wasser für Injektionszwecke verwendet werden (siehe Literaturhinweis [2]).

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

¹ Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern der Stämme, die von der American Type Culture Collection (ATCC) vertrieben werden. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.2.2.3 Trypton-Soja-Agar (TSA)

Trypton-Soja-Agar, bestehend aus:

Trypton aus Casein, pankreatisch verdaut	15,0 g;
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	5,0 g;
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g;
Agar	15,0 g;
Destilliertes Wasser	auf 1 000,0 ml.

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

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

Trypton aus Casein, pankreatisch verdaut	1,0 g;
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g;
Destilliertes Wasser	auf 1 000,0 ml.

Die Lösung wird in Teilmengen von 9 ml aufgeteilt und im Autoklaven sterilisiert, wie vorstehend beschrieben. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Verdünnungsmittels $7,0 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

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

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

5.2.2.6 Wasser standardisierter Härte

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

Herstellung von Lösung A:

19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) werden in destilliertem Wasser gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration oder im Autoklaven. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird mit Wasser unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) bei $2 ^\circ\text{C}$ bis $8 ^\circ\text{C}$ für höchstens einen Monat aufbewahrt.

Herstellung von Lösung B:

35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in destilliertem Wasser gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) bei $2 ^\circ\text{C}$ bis $8 ^\circ\text{C}$ für höchstens eine Woche aufbewahrt.

In einen sterilen 1 000 ml-Messkolben werden 600 ml bis 700 ml steriles destilliertes Wasser gegeben und dazu werden 6,0 ml Lösung A und anschließend 8,0 ml Lösung B gegeben. Es wird durchmischt und mit sterilem destilliertem Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt.

Das Wasser standardisierter Härte muss unter aseptischen Bedingungen frisch hergestellt und innerhalb von 12 h verwendet werden.

5.2.2.7 Belastungssubstanzen, die steril sein müssen und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem 2-Fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

5.2.2.7.1 Magermilch, garantiert frei von Antibiotika und Zusatzstoffen und wie folgt hergestellt:

- es wird eine Lösung von 20 g Milchpulver in 1 000 ml Wasser (5.2.2.2) hergestellt.
- Diese wird für 30 min bei $105^{+3}_0 ^\circ\text{C}$ (oder für 5 min bei $121^{+3}_0 ^\circ\text{C}$) erhitzt.

Die Endkonzentration im Prüfverfahren (5.5) beträgt 10 g/l Milchpulver.

5.2.2.7.2 Rinderserumalbuminlösung

0,6 g Rinderserumalbumin (Cohn-Fraktion V für Dubos-Medium) werden in einem 100 ml-Messkolben in 90 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst. Der Kolben wird mit Wasser (5.2.2.2) bis zur Marke aufgefüllt.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7). Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) bei $2 ^\circ\text{C}$ bis $8 ^\circ\text{C}$ aufbewahrt und innerhalb von einem Monat verwendet.

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

5.2.3 Prüfoberfläche – künstliche Haut

5.2.3.1 Künstliche Haut (VITRO-SKIN)²

Die Handhabung der Haut erfolgt mit sterilen Pinzetten/Gerätschaften. Für jede Prüfung werden acht Stücke verwendet: 3 für die Prüfverdünnungen, 1 für den Kontrollversuch mit Wasser, 1 für den Kontrollversuch B, 2 für den Kontrollversuch C (1 beimpft und 1 nicht beimpft) und 1 zur Überprüfung der Sterilität.

Künstliche Haut: mit einem Schreibstift und Lineal werden auf der Außenseite der verschlossenen Hautverpackung acht Quadrate von (2×2) cm (je Prüfung) angezeichnet. Das Schneiden erfolgt mit einer sterilen Schere und die Stücke werden vor der Verwendung für 16 h bis 24 h rehydriert (entsprechend den vom Lieferanten bereitgestellten Anweisungen). Sobald gebrauchsbereit, wird jedes Stück in ein steriles Weithalsgefäß gegeben und dieses mit einem Deckel verschlossen.

² VITRO-SKIN darf bezogen werden von IMS Inc., 110 Marginal Way, PMB 155, Portland ME 04101-2497 USA. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.3 Geräte und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

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

- a) durch feuchte Hitze in einem Autoklaven;
- b) durch trockene Hitze in einem Heißluftschrank.

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung³, und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation (trockene und feuchte 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 Heißluftschrank, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min bei (180^{+3}_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 Wasserbad, einstellbar auf (20 ± 1) °C, (30 ± 1) °C oder (45 ± 1) °C.

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf (30 ± 1) °C, (36 ± 1) °C oder (37 ± 1) °C.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungenauigkeit von nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei (20 ± 1) °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 Schüttelgeräte

- a) elektromechanisches Schüttelgerät, z. B. Vortex®-Mischer⁴;
- b) mechanisches Schüttelgerät.

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem Material, das mit den zu filtrierenden Substanzen verträglich ist, ausgestattet mit einem Filterhalter mit einem Mindestvolumen von 50 ml und geeignet für die Verwendung mit Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von 0,45 µm für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) und Rinderserumalbumin (5.2.2.7.2).

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

5.3.2.9 Graduierte Messpipetten, mit Nennvolumina von 10 ml, 1 ml, 0,1 ml und 0,05 ml oder kalibrierte automatische Pipetten.

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

3 Sterile Einwegmaterialien sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

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

5.3.2.11 Glasperlen (Durchmesser von 3 mm bis 4 mm).

5.3.2.12 Messkolben.

5.3.2.13 Ultraschallbad, einstellbar auf eine Betriebsfrequenz von 30 kHz bis 55 kHz, Höchstleistung 1 000 W.

5.4 Herstellung der Prüforganismussuspension und Produktprüflösungen

5.4.1 Prüforganismussuspension (Prüf- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

ANMERKUNG Die Prüf- und Validierungssuspension sind diesem Dokument gleich.

Für jede Prüfung muss eine Suspension hergestellt werden: diese wird verwendet als „Bakterien-Prüfsuspension“ zur Durchführung der Prüfung und als „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrollversuche und der Verfahrensvalidierung.

5.4.1.2 Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüforganismen

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

5.4.1.3 Gebrauchskulturen der Prüforganismen

Um die Gebrauchskulturen der Prüforganismen herzustellen, wird aus der Stammkultur durch Ausstrich auf TSA-Schrägagar oder Platten eine Subkultur angelegt und 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 angelegt werden. Die zweite und (sofern angelegt) dritte Subkultur ist (sind) die Gebrauchskultur(en).

Sofern es nicht möglich ist, die zweite Subkultur an einem bestimmten Tag anzulegen, darf eine 48 h-Subkultur für das nachfolgende Anlegen von Subkulturen verwendet werden, vorausgesetzt, die Subkultur wurde während der 48 h im Brutschrank (5.3.2.3) aufbewahrt. Unter diesen Umständen wird eine weitere 24 h-Subkultur hergestellt, bevor das Verfahren fortgesetzt wird.

Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

5.4.1.4 Prüfsuspension („N“)

- a) 10 ml des Verdünnungsmittels werden zusammen mit 5 g Glasperlen in einen 100 ml-Kolben gegeben. Von der Gebrauchskultur werden Zellen ösenweise in das Verdünnungsmittel überführt. Das Suspendieren der Zellen im Verdünnungsmittel sollte durch Reiben der Öse an der nassen 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 Röhrchen überführt.

- b) Die Anzahl der Zellen in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel auf $1,5 \times 10^9$ KBE/ml⁵ bis $5,0 \times 10^9$ KBE⁵/ml eingestellt, wobei die Anzahl der KBE/ml mit einem geeigneten Verfahren abgeschätzt wird. Diese Prüfsuspension wird im Wasserbad bei der Prüftemperatur (20 ± 1) °C aufbewahrt und innerhalb von 2 h verwendet. Die Anwendung eines Spektralphotometers zur Einstellung der Zellzahl wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm – Küvette mit 10 mm optischer Weglänge). Um reproduzierbare Ergebnisse dieser Messung zu erreichen, kann es erforderlich sein, die Prüfsuspension zu verdünnen.

ANMERKUNG Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

- c) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel Verdünnungen von 10^{-6} und 10^{-7} hergestellt.

Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

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

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0 ml-Probe in eine gesonderte Petrischale überführt, und es werden 15 ml bis 20 ml geschmolzener TSA (5.2.2.3) zugegeben, der auf (45 ± 1) °C abgekühlt wurde.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0 ml-Probe – in annähernd gleich große Teilmengen aufgeteilt – auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) an der Oberfläche getrockneter Platten ausgestrichen, die TSA enthalten.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.5.

5.4.1.5 Bebrüten und Auszählen der Prüfsuspension

Die Platten werden 20 h bis 24 h bebrütet (5.3.2.3). Alle Platten, die (aus irgendeinem Grund) nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt, um die Gesamtanzahl der KBE zu bestimmen. Die Platten werden erneut für 20 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. Wenn sich die Anzahl erhöht hat, darf nur die höhere Anzahl für die weitere Bestimmung verwendet werden.

Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet; für alle Keimzahlen über 330 wird jedoch „> 330“ aufgezeichnet, und die Vc-Werte werden nach 5.6.2.2 bestimmt.

Die Anzahl der KBE/ml in der Prüfsuspension N wird mit der in 5.6.1 angegebenen Gleichung berechnet.

ANMERKUNG Auf die Oberfläche werden 0,05 ml eines Gemisches gegeben, das zu gleichen Teilen aus der Prüfsuspension und der Belastungssubstanz besteht; folglich werden 0,025 ml Suspension hinzugegeben.

5.4.2 Produktprüflösung

Produktprüflösungen müssen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) in mindestens drei unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt werden, um eine Konzentration im Wirkungsbereich und eine Konzentration im unwirksamen Bereich (5.8.2) zu erfassen. Das Produkt im Lieferzustand darf als eine der Produktprüflösungen verwendet werden. Lösungen von gebrauchsfertigen Produkten, d. h. Produkten, die zur Anwendung nicht verdünnt werden, müssen mit Wasser (5.2.2.2) anstatt Wasser standardisierter Härte hergestellt werden.

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

Bei festen Produkten wird das Produkt im Lieferzustand aufgelöst, indem mindestens $1,0 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ des Produkts in einen Messkolben eingewogen werden und mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) aufgefüllt wird. Die nachfolgenden Verdünnungen (d. h. niedrigere Konzentrationen) müssen in Messkolben (5.3.2.12) im Verhältnis Volumen zu Volumen in Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) hergestellt werden.

Bei flüssigen Produkten müssen die Verdünnungen des Produkts mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) im Verhältnis Volumen zu Volumen in Messkolben (5.3.2.12) hergestellt werden.

Die Produktprüflösungen müssen frisch hergestellt und innerhalb von 2 h in der Prüfung verwendet werden. Sie müssen eine physikalisch homogene Zubereitung ergeben, die während des gesamten Verfahrensablaufs stabil ist.

Die im Prüfbericht angegebene Konzentration des Produkts muss die erwünschte Prüfkonzentration sein. Die Prüfkonzentration wird als Massenanteil in Prozent oder als Volumenanteil in Prozent angegeben, ebenso werden Einzelheiten der Produktprobe im Lieferzustand angegeben.

5.5 Verfahren zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Untersuchungsbedingungen

Neben der festgelegten Temperatur, Einwirkzeit, Belastungssubstanz und Prüforganismen dürfen zusätzliche Untersuchungsbedingungen entsprechend der für das Produkt vorgesehenen praktischen Anwendung (Abschnitt 4) ausgewählt werden:

a) Temperatur (in °C):

Die obligatorische Temperatur ist in Abschnitt 4, Tabelle 1, festgelegt; die zulässige Abweichung für die Temperatur beträgt $\pm 1^\circ\text{C}$. Es ist nicht notwendig, Produkte zur Zitrendesinfektion bei anderen Temperaturen zu prüfen.

b) Einwirkzeit t (in min):

Die zu prüfenden minimale, maximale und zusätzliche Einwirkzeiten sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt; die erlaubte Abweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt $\pm 10 \text{ s}$ bei längeren Einwirkzeiten als 1 min und $\pm 5 \text{ s}$ bei Einwirkzeiten bis einschließlich 1 min.

c) Belastungssubstanz:

Die zu prüfenden Belastungssubstanzen sind in Abschnitt 4, Tabelle 1 festgelegt.

d) Prüforganismen sind: *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* (Abschnitt 4, Tabelle 1 und 5.2.1)
Zusätzliche Prüforganismen dürfen geprüft werden.

5.5.1.2 Neutralisation

Zur Ermittlung eines geeigneten Neutralisationsmediums wird die Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens (5.5.2.4) unter Verwendung eines geeigneten Neutralisationsmediums durchgeführt, das nach der Erfahrung des Laboratoriums und/oder veröffentlichten Daten ausgewählt wird.

Sollte dieses Neutralisationsmedium nicht valide sein, wird die Validierungsprüfung mit einem alternativen Neutralisationsmedium unter Berücksichtigung der Angaben in Anhang B wiederholt.

Bei kürzeren Einwirkzeiten als 10 min muss das für das Neutralisationsmedium nachgewiesen sein, dass es bei Prüfung nach EN 1656 innerhalb von 10 s wirksam ist.

ANMERKUNG Unter besonderen Umständen könnte es aufgrund von Neutralisationsproblemen erforderlich sein, dem TSA (5.2.2.3) Neutralisationsmedium zuzufügen.

5.5.1.3 Allgemeine Anweisungen zu Verfahrensabläufen bei der Validierung und Kontrolle

Die Neutralisation muss für jeden der Prüforganismen und für jede Untersuchungsbedingung (Belastungssubstanz, Einwirkzeit) kontrolliert und validiert werden, und zwar nur bei der höchsten Produktprüfkonzentration.

Diese Verfahren (Kontrollversuch mit Wasser, Kontrolle des Neutralisationsmediums und Verfahrensvalidierung) müssen gleichzeitig mit der Prüfung und mit dem gleichen Neutralisationsmedium wie in der Prüfung durchgeführt werden.

Wenn dem für die Validierungs- und Kontrollverfahren verwendeten TSA ein Neutralisationsmedium zugefügt wurde (5.5.1.2), muss der in der Prüfung verwendete TSA ebenfalls die gleiche Menge dieses Neutralisationsmediums enthalten.

5.5.1.4 Temperaturangleichung

Alle Reagenzien [Produktprüflösungen (5.4.2) und Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6)] werden vor der Prüfung im auf $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ [5.5.1.1 a)] eingestellten Wasserbad (5.3.2.2) und/oder Brutschrank (5.3.2.3) auf die Prüftemperatur von $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestellt. Die Stabilisierung der Temperatur der Reagenzien auf $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ wird überprüft.

Das Neutralisationsmedium (5.2.2.5) und das Verdünnungsmittel (5.2.2.4) müssen an die Temperatur von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ angeglichen werden.

5.5.2 Prüfverfahren

5.5.2.1 Allgemeines

Das Prüf- sowie die Kontroll- und Validierungsverfahren müssen zeitgleich durchgeführt werden.

5.5.2.2 Prüfung „Na“ – Bestimmung der bakteriziden Konzentrationen

5.5.2.2.1 Beimpfung und Konditionierung der Hautoberfläche

Zur Herstellung des Inokulums werden 2,0 ml der Belastungssubstanz (5.2.2.7) in ein Gefäß pipettiert. Nach Zugabe von 2,0 ml Prüfsuspension wird durch Schütteln oder mittels Vortex-Mischer durchmischt und das Gefäß in den Brutschrank bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ gestellt.

Nach 2 min wird ein Tropfen (0,05 ml) des Inokulums auf eine Hautoberfläche (5.2.3.1) gegeben, ohne den Tropfen zu verteilen. Die beimpfte Haut wird im offenen Gefäß für 15 min bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ belassen, bevor das nachfolgende Verfahren durchgeführt wird. Der Inokulum-Tropfen wird nach 15 min nicht getrocknet sein; diese Zeitspanne stellt eine Konditionierungsdauer dar, die dem Inokulum das Festsetzen auf der Haut erlaubt.

Dies wird in Intervallen mit 5 weiteren Hautstücken wiederholt (6 Stücke je Prüfung).

5.5.2.2.2 Prüfverfahren

- a) Bei Einwirkzeiten von 2 min oder länger: 10 ml des Produkts werden auf eine beimpfte und konditionierte Hautoberfläche in eine Weithalsflasche gegeben, worauf die Stoppuhr gestartet und sichergestellt wird, dass die gesamte Oberfläche bedeckt ist; dann wird nach 30 s die Hautoberfläche herausgehoben und überschüssiges Produkt zurück in die Flasche ablaufen gelassen. Die desinfizierte Oberfläche wird in ein steriles Gefäß gelegt und für die verbleibende Einwirkzeit in einen Brutschrank bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ gestellt.

Nach der Einwirkzeit werden 10 ml Neutralisationsmedium in das Gefäß mit der Prüfoberfläche gegeben. Es wird für 15 s durchmischt und das Gefäß anschließend in ein Ultraschallbad mit Eiswasser gestellt, um die Temperatur zwischen 0 °C und 4 °C zu halten. Das Gefäß wird für 5 min $\pm$ 10 s mit Ultraschall behandelt.

- b) Bei kürzeren Einwirkzeiten als 2 min: 10 ml des Produkts werden auf eine beimpfte und konditionierte Hautoberfläche in eine Weithalsflasche gegeben, worauf die Stoppuhr gestartet und sichergestellt wird, dass die gesamte Oberfläche bedeckt ist. Nach der Einwirkzeit wird die Hautoberfläche herausgehoben, überschüssiges Produkt zurück in die Flasche ablaufen gelassen und die Oberfläche in ein Gefäß mit 10 ml Neutralisationsmedium gelegt. Es wird für 15 s durchmischt und das Gefäß anschließend in ein Ultraschallbad mit Eiswasser gestellt, um die Temperatur zwischen 0 °C und 4 °C zu halten. Das Gefäß wird für 5 min $\pm$ 10 s mit Ultraschall behandelt.
- c) Vom neutralisierten Gemisch werden mit dem Verdünnungsmittel Zehnfachverdünnungen bis 10^{-2} hergestellt. Vom Neutralisationsmedium und von jeder Verdünnung wird eine Probe von je 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und in eine gesonderte Petrischale überführt, worauf 15 ml bis 20 ml geschmolzener Trypton-Soja-Agar (TSA) zugegeben werden, der auf (45 ± 1) °C abgekühlt wurde.
- d) Vom gebrauchten Desinfektionsmittel in der Flasche wird 1 ml entnommen, zu 9 ml Neutralisationsmedium gegeben und in ein auf (20 ± 1) °C geregeltes Wasserbad gestellt. Nach einer Neutralisationszeit von 5 min $\pm$ 10 s (bei Einwirkzeiten von 10 min oder kürzer, nach einer Neutralisationszeit von (10 ± 1) s) werden mit dem Verdünnungsmittel Zehnfachverdünnungen bis 10^{-2} hergestellt. Vom Neutralisationsmedium und von jeder Verdünnung wird eine Probe von je 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und in eine gesonderte Petrischale überführt, worauf 15 ml bis 20 ml geschmolzener Trypton-Soja-Agar (TSA) zugegeben werden, der auf (45 ± 1) °C abgekühlt wurde.

Dies wird für die anderen beiden Produktprüflösungen wiederholt.

5.5.2.3 Kontrollversuch mit Wasser „Nw“

Für den Kontrollversuch mit Wasser (Nw) wird die Produktprüfverdünnung in 5.5.2.3 durch steriles Wasser standardisierter Härte (oder Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten) ersetzt. Vom neutralisierten Gemisch wird mit dem Verdünnungsmittel eine Reihe von Zehnfachverdünnungen bis 10^{-4} hergestellt. Von den 10^{-3} - und 10^{-4} -Verdünnungen wird eine Probe von je 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und in eine gesonderte Petrischale überführt, worauf 15 ml bis 20 ml geschmolzener Trypton-Soja-Agar (TSA) zugegeben werden, der auf (45 ± 1) °C abgekühlt wurde.

Vom gebrauchten Wasser in der Flasche wird 1 ml entnommen und zu 9 ml Neutralisationsmedium gegeben, worauf mit dem Verdünnungsmittel Zehnfachverdünnungen bis 10^{-4} hergestellt werden. Von den 10^{-3} - und 10^{-4} -Verdünnungen wird eine Probe von je 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und in eine gesonderte Petrischale überführt, worauf 15 ml bis 20 ml geschmolzener Trypton-Soja-Agar (TSA) zugegeben werden, der auf (45 ± 1) °C abgekühlt wurde.

5.5.2.4 Kontrolle des Neutralisationsmediums „B“ – Verifizierung des Nichtvorliegens einer Toxizität des Neutralisationsmediums

Die Vorgehensweise bei der Verifizierung des Nichtvorliegens einer Toxizität des Neutralisationsmediums ist wie folgt:

- a) In ein Gefäß, das eine beimpfte und konditionierte Prüfoberfläche enthält, werden 10 ml Neutralisationsmedium hinzugefügt. Es wird durchmischt, worauf das Gefäß in ein Ultraschallbad mit Eiswasser gestellt wird, um die Temperatur zwischen 0 °C und 4 °C zu halten, und für 5 min + 10 s mit Ultraschall behandelt wird.

- b) Nach Ablauf dieser Zeit wird von diesem Gemisch „B“ mit 9,0 ml Verdünnungsmittel eine Reihe von Zehnfachverdünnungen bis 10^{-4} hergestellt. Von den 10^{-3} - und 10^{-4} -Verdünnungen wird eine Probe von je 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und in eine gesonderte Petrischale überführt, worauf 15 ml bis 20 ml geschmolzener Trypton-Soja-Agar (TSA) zugegeben werden, der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde.

5.5.2.5 Verfahrensvalidierung „C“

Die Vorgehensweise bei der Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens ist wie folgt:

- a) Bei Einwirkzeiten von 2 min oder länger: eine unbeimpfte Oberfläche wird für 30 s in 10 ml der bei der Prüfung verwendeten Produktlösung mit der höchsten Konzentration getaucht, worauf sie entnommen, überschüssiges Produkt ablaufen gelassen und die desinfizierte Oberfläche in einem sterilen Weithalsgefäß mit aufgesetztem Deckel für die verbleibende Einwirkzeit t in einen temperaturgeregelten Schrank bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ gestellt wird.

Nach der Einwirkzeit werden 10 ml Neutralisationsmedium in das Gefäß gegeben. Es wird durchmischt, worauf das Gefäß in ein Ultraschallbad mit Eiswasser gestellt wird, um die Temperatur zwischen 0°C und 4°C zu halten, und für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ mit Ultraschall behandelt wird.

Bei kürzeren Einwirkzeiten als 2 min: eine unbeimpfte Oberfläche wird für die Einwirkzeit in 10 ml der bei der Prüfung verwendeten Produktlösung mit der höchsten Konzentration getaucht, worauf sie entnommen, überschüssiges Produkt ablaufen gelassen und die desinfizierte Oberfläche in ein Gefäß mit 10 ml Neutralisationsmedium gelegt wird.

Es wird durchmischt, worauf das Gefäß in ein Ultraschallbad (in dem die Temperatur durch Zugabe von Eis auf 0°C bis 4°C gehalten wird) gestellt und für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ mit Ultraschall behandelt wird.

- b) Nach 5 min wird das die Oberfläche enthaltende Neutralisationsmedium in ein anderes Weithalsgefäß, das die beimpfte und konditionierte Prüfoberfläche enthält, gegeben. Es wird durchmischt, worauf das Gefäß in ein Ultraschallbad mit Eis gestellt wird, um die Temperatur zwischen 0°C und 4°C zu halten, und für $5 \text{ min} + 10 \text{ s}$ mit Ultraschall behandelt wird.
- c) Nach Ablauf dieser Zeit wird vom Gemisch mit Verdünnungsmittel eine Reihe von Zehnfachverdünnungen bis 10^{-4} hergestellt. Von den 10^{-3} und 10^{-4} -Verdünnungen wird eine Probe von je 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und in eine gesonderte Petrischale überführt, worauf 15 ml bis 20 ml geschmolzener Trypton-Soja-Agar (TSA) zugegeben werden, der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde.

5.6 Versuchsdaten und Berechnung

5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen

5.6.1.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen und Prüfgemische

N stellt die Prüfsuspension und die Validierungssuspension dar, Na ist das bakterizide Prüfgemisch, Nw das Prüfgemisch beim Kontrollversuch mit Wasser und B (Kontrolle des Neutralisationsmediums) und C (Verfahrensvalidierung) sind die verschiedenen Kontrollprüfgemische.

ANMERKUNG 1 Die Kontrolle der Untersuchungsbedingungen „A“ (Validierung der gewählten Untersuchungsbedingungen oder Verifizierung des Nichtvorliegens keimtötender Wirkungen unter den Prüfbedingungen) unterscheidet sich von den anderen Normen durch die Tatsache, dass sie direkt im Kontrollversuch mit Wasser bestimmt wird.