

DIN EN 17422



ICS 71.100.35

Einsprüche bis 2024-09-26
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 17422:2022-09

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Oberflächenversuch zur Beurteilung von
Zitzendesinfektionsmittel für den Veterinärbereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17422:2024**

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 17422:2024

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de surface pour l'évaluation des désinfectants de trayons utilisés dans le
domaine vétérinaire –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2);
Version allemande et anglaise prEN 17422:2024

Anwendungswarnvermerk

Dieser Entwurf mit Erscheinungsdatum 2024-07-26 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil das beabsichtigte Dokument 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 oder Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin.

Es wird gebeten, mit den Kommentaren zu diesem Entwurf jegliche relevanten Patentrechte, die bekannt sind, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 62 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Das Dokument prEN 17422:2024 wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-08-04 AA "Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich" im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

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

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 17422:2022-09 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Harmonisierung des Grades der Milchverschmutzung;
- b) Überarbeitung der Begriffe und Abkürzungen;
- c) klarere Definition der Berechnungen.

August 2024

prEN 17422

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Oberflächenversuch zur Beurteilung von Zitzendesinfektionsmittel für den Veterinärbereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)

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)

Antiseptiques et désinfectants chimiques – Essai quantitatif de surface pour l'évaluation des désinfectants de trayons utilisés dans le domaine vétérinaire – Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
3.1 Symbole und Abkürzungen	6
4 Anforderungen	7
5 Prüfverfahren	7
5.1 Kurzbeschreibung	7
5.2 Materialien und Reagenzien	8
5.2.1 Prüforganismen	8
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	8
5.2.3 Prüfoberfläche	10
5.3 Geräte und Glasgeräte	11
5.3.1 Allgemeines	11
5.3.2 Übliche mikrobiologische Ausrüstung, insbesondere folgende Geräte	11
5.4 Herstellung der Prüforganismussuspension und Produktprüflösungen	12
5.4.1 Prüforganismussuspension (Prüf- und Validierungssuspension)	12
5.4.2 Produktprüflösung	13
5.5 Verfahren zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produkts	14
5.5.1 Allgemeines	14
5.5.2 Prüfverfahren	15
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	17
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen	17
5.6.2 Berechnung	18
5.7 Verifizierung der Verfahrensweise	21
5.7.1 Allgemeines	21
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren „WM“-Keimzahlen	21
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	21
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	21
5.8.1 Reduktion	21
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der nicht wirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	22
5.8.3 Limitierender Prüforganismus und bakterizide Konzentration	22
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	22
5.9 Interpretation der Ergebnisse – Schlussfolgerung	22
5.9.1 Allgemeines	22
5.9.2 Bakterizide Wirkung für die Zitzendesinfektion	23
5.10 Prüfbericht	23
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	25
Anhang B (informativ) Beispiele von Neutralisationsmedien für die verbleibende antimikrobielle Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika sowie Spülflüssigkeiten	26
Anhang C (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht	28
Literaturhinweise	31

Tabellen

Tabelle 1 — Prüfbedingungen	7
Tabelle 2 — Anzahl der Zellen je ml oder je Oberfläche	18

Tabelle B.1 — Beispiele von Neutralisationsmedien für die verbleibende antimikrobielle
Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln 26

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17422:2024) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument wird EN 17422:2022 ersetzen.

Dieses Dokument wurde überarbeitet, um die Milchverschmutzungsgrade zu harmonisieren, Begriffe und Abkürzungen eindeutiger zu formulieren und klarere Festlegungen für die Berechnungen zu treffen.

Einleitung

Dieses Dokument legt einen Oberflächenversuch fest, mit dem festgestellt werden soll, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum in den im Anwendungsbereich beschriebenen Bereichen eine bakterizide Wirkung aufweist.

Dieser Laborversuch berücksichtigt praktische Anwendungsbedingungen für das Produkt, einschließlich Einwirkzeit, Temperatur, Prüforganismen und Belastungssubstanzen, d. h. Bedingungen, die die Wirkung des Produkts in praktischen Situationen beeinflussen können.

Die Bedingungen sind dafür vorgesehen, die allgemeinen Zwecke abzudecken und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produkten zu ermöglichen. Jede in diesem Versuch festgestellte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht festgelegten Untersuchungsbedingungen. Bei einigen Anwendungsarten weichen jedoch die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt möglicherweise ab und deshalb müssen zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die bakterizide Wirkung von Zit-zendesinfektionsmitteln fest, die bei Verdünnung in Wasser standardisierter Härte — oder im Falle gebrauchsfertiger Produkte — in Wasser eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung bilden.

Dieses Verfahren ist anzuwenden für Zit-zendesinfektionsmittel, die auf der Zitzenhaut ohne mechanische Einwirkung als Desinfektionsmittel vor und/oder nach dem Melken im Veterinärbereich zum Einsatz kommen, z. B. 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 ist dafür vorgesehen, die Wirksamkeit gewerblich hergestellter Zubereitungen oder anderer Wirkstoffe unter Anwendungsbedingungen zu bestimmen.

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

2 Normative Verweisungen

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

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

EN 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 Electromedical: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp/>

3.1 Symbole und Abkürzungen

<i>N</i>	Prüfsuspension
<i>Na</i>	Prüfsuspension + Belastungssubstanz
<i>Nv</i>	Validierungssuspension
<i>Nw</i>	Kontrollversuch mit Wasser
<i>B</i>	Kontrollversuch B
<i>C</i>	Kontrollversuch C
<i>Vc</i>	Lebendkeimzahl

NUw eingesetztes Wasser

NUd eingesetztes Desinfektionsmittel

Nws Oberfläche beim Kontrollversuch mit Wasser

Nts Prüfoberfläche

4 Anforderungen

Das Produkt muss eine dezimal-logarithmische (lg) Reduktion um mindestens 4 Stufen (Desinfektionsmittel für nach dem Melken) oder eine dezimal-logarithmische (lg) Reduktion um mindestens 3 Stufen (Desinfektionsmittel für vor dem Melken) gegenüber einem Kontrollversuch mit Wasser aufweisen, wenn es nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 unter simulierter Verschmutzung (Belastung) (10,0 g/l Magermilch für Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken, 3,0 g/l Rinderserumalbumin für Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken) geprüft wird.

Tabelle 1 — Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Bakterizide Wirkung auf künstlicher Haut ohne mechanische Wirkung	
Mindestspektrum von Prüforganismen	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	
Zusätzlich	Alle relevanten Prüforganismen	
Prüftemperatur	(30 ± 1) °C	
Einwirkzeit Minimale Einwirkzeit	Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken (30 ± 5) s	Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken 1 min ± 5 s
Maximale Einwirkzeit	Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken 3 min ± 10 s	Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken 5 min ± 10 s
Andere Einwirkzeiten dürfen in Abständen von 30 s für Einwirkzeiten bis zu 1 min und in Abständen von 1 min für Einwirkzeiten > 1 min gewählt werden.		
Belastungssubstanz Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken	10,0 g/l Milchpulver 3,0 g/l Rinderserumalbumin	

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Eine Prüfsuspension von Bakterien gemischt mit der Belastungssubstanz (5.2.2.7) wird auf die künstliche Hautprüfoberfläche abgeimpft und für die Dauer der Konditionierung bei 30 °C gehalten.

Nach dieser Konditionierungszeit wird die Prüfoberfläche in das Produkt oder Verdünnungen des Produkts bei 30 °C für eine Verweilzeit von 30 s eingetaucht, entnommen und für die verbleibende bestimmte, in Tabelle 1 festgelegte Zeitdauer bebrütet. Nach Ablauf dieser Einwirkzeit wird die Oberfläche in ein Neutralisationsmedium überführt, so dass die Wirkung des Desinfektionsmittels unmittelbar neutralisiert wird. Gleichzeitig wird ein aliquoter Anteil des eingesetzten Desinfektionsmittels als Probe entnommen und ebenfalls neutralisiert.

Durch Behandlung mit Ultraschall werden die Bakterien von der Oberfläche entfernt. Die Anzahl der überlebenden Bakterien, die von der Oberfläche rückgewonnen werden können, wird quantitativ bestimmt. Die Anzahl der überlebenden Bakterien im eingesetzten Desinfektionsmittel wird quantitativ bestimmt.

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

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

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

— *Escherichia coli*

— *Staphylococcus aureus*

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

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

Für alle während eines Versuchs sowie dessen Kontrolle und Validierung durchgeführten, auf das Wachstum ausgerichteten Bebrütungen muss die gleiche Temperatur (entweder 36°C oder 37°C) angewendet werden.

Wenn zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, müssen sie unter optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Zeit, Atmosphäre, Medien), die im Prüfbericht zu dokumentieren sind, bebrütet werden. Wenn die gewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss ihre Eignung zur Bereitstellung der erforderlichen Inokula verifiziert werden. Wenn diese zusätzlichen Prüforganismen nicht durch ein Referenz-Zentrum klassifiziert wurden, müssen ihre Identifizierungsmerkmale angegeben werden. Außerdem müssen sie von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kultursammlung für fünf Jahre zu Referenzzwecken aufbewahrt 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. 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.

Wenn die zusätzlichen Stämme nicht auf den Kulturmedien (5.2.2.3) wachsen oder nicht mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) verwendet werden können, müssen zusätzliche Medien verwendet und im Prüfbericht angegeben werden, ebenso wie zusätzliche Bebrütungsbedingungen.

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.

Gebrauchsfertige Medien dürfen verwendet werden, wenn sie den erforderlichen Anforderungen entsprechen.

Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte ein begrenzter 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.

5.2.2.3 Trypton-Soja-Agar (TSA)

Trypton-Soja-Agar, bestehend aus:

Trypton, pankreatisch verdautes Casein	15,0 g;
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	5,0 g;
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g;
Agar	15,0 g;
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

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

Falls Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auftreten, kann es notwendig sein, Neutralisationsmedium zum TSA zuzugeben. Anhang B, Tabelle B.1 enthält eine Anleitung zu den Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen. Es wird empfohlen, kein Neutralisationsmedium zu verwenden, das zu einer Trübung im Agar führt.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

Trypton, pankreatisch verdautes Casein	1,0 g;
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g;
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Verdünnungsmittels $7,0 \pm 0,2$ 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 für die Verdünnung der Produkte

Die Vorgehensweise bei der Herstellung von 1 000 ml 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 Wasser (5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem

Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird mit Wasser (5.2.2.2) unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens einen Monat aufbewahrt.

- Herstellung von Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7). Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens eine Woche aufbewahrt.

In einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) gegeben, dazu werden 6,0 ml Lösung A und anschließend 8,0 ml Lösung B gegeben. Es wird durchmischt und mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.4). Falls erforderlich, wird der pH Wert unter Verwendung einer Lösung mit 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.

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

5.2.2.7 Belastungssubstanzen

5.2.2.7.1 Allgemeines

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

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

5.2.2.7.2 Magermilch

Eine Lösung von 20 g Milchpulver, die garantiert frei von Antibiotika und Zusatzstoffen ist, wird 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.

5.2.2.7.3 Rinderserumalbuminlösung

0,6 g Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) 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 $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ aufbewahrt und innerhalb von einem Monat verwendet.

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

5.2.3 Prüfoberfläche

5.2.3.1 Künstliche Haut

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.

Mit einem Schreibstift und Lineal werden auf der Außenseite der verschlossenen Hautpackung 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 mit der Prüfung gestartet werden kann, wird jedes Stück in ein steriles Weithalsgefäß mit aufgesetztem Deckel gegeben.

ANMERKUNG Es wurden zwei Arten künstlicher Haut in einem Ringversuch beurteilt, ohne einen wesentlichen Leistungsunterschied festzustellen. Eine der beiden geprüften Arten, VITRO-SKIN ®¹, ist im Handel erhältlich. Andere Arten künstlicher Haut können verfügbar und angewendet werden, wenn nachgewiesen wird, dass sie zu vergleichbaren Ergebnissen wie die in diesem Dokument angeführte Art führen.

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 [5.3.2.1 a)];
- b) durch trockene Hitze in einem Heißluftschrank [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Ausrüstung², 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_0^{+3}) °C gehalten werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluftsterilisator, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min bei (180_0^{+3}) °C, für eine Mindesthaltezeit von 1 h bei (170_0^{+5}) °C oder für eine Mindesthaltezeit von 2 h bei (160_0^{+5}) °C gehalten werden kann.

5.3.2.2 Wasserbad, einstellbar auf (20 ± 1) °C, (30 ± 1) °C und (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 Kalibrierungsgenauigkeit 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 Rührwerk, z. B. Vortex-Mischer;
- 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

1 VITRO-SKIN ® ist das Warenzeichen von IMS Inc. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Personen, die dieses Dokument anwenden, und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

2 Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

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 (5.2.2.7.3).

5.3.2.8 Kühlschranks, einstellbar auf $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$.

5.3.2.9 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.

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 Validierungssuspensionen sind in 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 Gebrauchskultur der Prüforganismen

Um die Gebrauchskultur der Prüforganismen herzustellen, wird aus der Stammkultur durch Ausstrich auf TSA-Schrägar 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 Subkultur 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/ml³ bis $5,0 \times 10^9$ KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der KBE/ml mit einem geeigneten Verfahren geschätzt wird. Diese Prüfsuspension wird im Wasserbad bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 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^{-7} und 10^{-8} 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 Ausstrichplattenverfahren abgeimpft.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0 ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt, und es werden 15 ml bis 20 ml geschmolzener TSA (5.2.2.3) zugegeben, der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde.
- 2) Bei Anwendung des Ausstrichplattenverfahrens 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, und die Gesamtanzahl der KBE wird bestimmt. Die Platten werden für weitere 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, wird nur die höhere Anzahl für die weitere Auswertung verwendet.

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

Die Anzahl der KBE je 1 ml in der Prüfsuspension N wird berechnet (5.6.2.3).

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 wirksamen und eine im nicht wirksamen 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.

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.

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

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 gewünschte Prüfkonzentration sein. Die Prüfkonzentration wird als Massenkonzentration 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 den festgelegten Prüforganismen dürfen zusätzliche Untersuchungsbedingungen entsprechend der für das Produkt vorgesehenen praktischen Anwendung (Abschnitt 4) ausgewählt werden:

a) Temperatur (in °C):

Die obligatorisch zu prüfende Temperatur ist in Abschnitt 4, Tabelle 1, festgelegt; die zulässige Abweichung für die Temperatur beträgt ± 1 °C. Es ist nicht notwendig, Produkte zur Zitzendesinfektion 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 zulässige Abweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt ± 10 s bei längeren Einwirkzeiten als 1 min und ± 5 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 und 5.5.2.5) unter Verwendung eines geeigneten Neutralisationsmediums durchgeführt, das nach der Erfahrung des Labors 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.

ANMERKUNG Unter besonderen Umständen, wenn es schwierig ist, eine geeignete Neutralisation zu erreichen, kann dem TSA ein Neutralisationsmedium zugefügt werden (5.2.2.3).

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, wie in der Prüfung verwendeten Neutralisationsmedium 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

Vor der Prüfung werden alle Reagenzien [Produktprüflösungen (5.4.2) und Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6)] im auf $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ eingestellten Wasserbad (5.3.2.2) und/oder Brutschrank (5.3.2.3) auf die Prüftemperatur von $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ [5.5.1.1 a)] 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 Prüfoberfläche

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 elektromechanischem Rührwerk 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 Prüfoberfläche (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 weiteren 5 Hautstücken wiederholt (6 Stücke je Prüfung).

5.5.2.2.2 Prüfverfahren

- a) Es werden vorsichtig 10 ml der Produktprüflösung über eine beimpfte und konditionierte Prüfoberfläche in einer Weithalsflasche gegossen, die Stoppuhr wird gestartet und es wird sichergestellt, dass die gesamte Oberfläche bedeckt ist; dann wird nach 30 s die Prüfoberfläche herausgehoben und überschüssiges Produkt zurück in die Flasche ablaufen gelassen. Die desinfizierte Oberfläche wird in ein steriles Gefäß gelegt und für die verbleibende Einwirkzeit t (sofern zutreffend) in einen Brutschrank bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ gestellt.

Nach Ablauf der Einwirkzeit wird die behandelte Prüfoberfläche in 10 ml Neutralisationsmedium angeordnet, wobei darauf zu achten ist, dass die Prüfoberfläche untergetaucht ist. Es wird für 15 s durchmischt und das Gefäß anschließend in ein Ultraschallbad mit Eiswasser gestellt, um die Temperatur bei $(2 \pm 2)^\circ\text{C}$ zu halten. Das Gefäß wird für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ mit Ultraschall behandelt.

- b) Vom neutralisierten Gemisch werden mit dem Verdünnungsmittel Zehnfachverdünnungen bis 10^{-3} (vor dem Melken) oder bis 10^{-2} (nach dem Melken) hergestellt. Von jeder Verdünnung wird eine Probe von je 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Ausstrichplattenverfahren abgeimpft.

Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0 ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt, und es werden 15 ml bis 20 ml geschmolzener TSA (5.2.2.3) zugegeben, der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde.

Bei Anwendung des Ausstrichplattenverfahrens 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.

- c) Nach dem Eintauchschritt in 5.5.2.2.2 a) wird 1,0 ml des eingesetzten Desinfektionsmittels (NUd) in der Flasche entnommen, 9 ml Neutralisationsmedium (für Berechnungszwecke als N_0 bezeichnet) werden zugegeben und alles wird in ein auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ geregeltes Wasserbad gestellt. Nach einer Neutralisationszeit von (10 ± 1) s werden mit dem Verdünnungsmittel Zehnfachverdünnungen bis 10^{-3} (vor dem Melken) oder bis 10^{-2} (nach dem Melken) hergestellt. Von jeder Verdünnung wird eine Probe von je 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Ausstrichplattenverfahren abgeimpft.

Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0 ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt, und es werden 15 ml bis 20 ml geschmolzener TSA (5.2.2.3) zugegeben, der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde.

Bei Anwendung des Ausstrichplattenverfahrens 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.

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 5.5.2.2.2 a) durch steriles Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) (oder Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten) ersetzt. Vom neutralisierten Gemisch wird mit dem Verdünnungsmittel eine Reihe von Zehnfachverdünnungen bis 10^{-5} hergestellt. Von jeder der 10^{-4} und 10^{-5} -Verdünnungen wird eine Probe von je 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Ausstrichplattenverfahren abgeimpft.

Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0 ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt, und es werden 15 ml bis 20 ml geschmolzener TSA (5.2.2.3) zugegeben, der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde.

Bei Anwendung des Ausstrichplattenverfahrens 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.

Vom gebrauchten Wasser (NUw) in der Flasche wird 1,0 ml entnommen und zu 9 ml des Neutralisationsmediums (validiert nach 5.5.1.2) gegeben, worauf mit dem Verdünnungsmittel Zehnfachverdünnungen bis 10^{-5} hergestellt werden. Von jeder der 10^{-4} und 10^{-5} -Verdünnungen wird eine Probe von je 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Ausstrichplattenverfahren abgeimpft.

Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0 ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt, und es werden 15 ml bis 20 ml geschmolzener TSA (5.2.2.3) zugegeben, der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde.

Bei Anwendung des Ausstrichplattenverfahrens 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.

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 und das Gefäß wird in ein Ultraschallbad mit Eiswasser gestellt, um die Temperatur bei $(2 \pm 2)^\circ\text{C}$ zu halten, und es wird für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ mit Ultraschall behandelt.
- b) Nach Ablauf dieser Zeit wird von diesem Gemisch „B“ mit 9,0 ml Verdünnungsmittel eine Reihe von Zehnfachverdünnungen bis 10^{-5} hergestellt. Von jeder der 10^{-4} und 10^{-5} -Verdünnungen wird eine Probe von je 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Ausstrichplattenverfahren abgeimpft.

Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0 ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt, und es werden 15 ml bis 20 ml geschmolzener TSA (5.2.2.3) zugegeben, der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde.

Bei Anwendung des Ausstrichplattenverfahrens 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.

5.5.2.5 Verfahrenvalidierung „C“

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

- a) Eine unbeimpfte Oberfläche wird für 30 s in 10 ml der bei der Prüfung verwendeten Produktlösung mit der höchsten Konzentration getaucht, anschließend wird sie entnommen, überschüssiges Produkt ablaufen gelassen und die desinfizierte Oberfläche wird in einem sterilen Weithalsgefäß mit aufgesetztem Deckel für die verbleibende, sofern zutreffend, Einwirkzeit t in einen temperaturgeregelten Schrank bei $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ gestellt.

Nach Ablauf der Einwirkzeit wird die Prüfoberfläche in 10 ml Neutralisationsmedium angeordnet. Es wird durchmischt und das Gefäß wird in ein Ultraschallbad mit Eiswasser gestellt, um die Temperatur bei $(2 \pm 2)^\circ\text{C}$ zu halten, und es wird für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ mit Ultraschall behandelt.

- 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 und das Gefäß wird in ein Ultraschallbad mit Eis gestellt, um die Temperatur bei $(2 \pm 2)^\circ\text{C}$ zu halten, und es wird für weitere $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ mit Ultraschall behandelt.
- c) Nach Ablauf dieser Zeit wird vom Gemisch mit Verdünnungsmittel eine Reihe von Zehnfachverdünnungen bis 10^{-5} hergestellt. Von jeder der 10^{-4} und 10^{-5} -Verdünnungen wird eine Probe von je 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Ausstrichplattenverfahren abgeimpft.

Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0 ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt, und es werden 15 ml bis 20 ml geschmolzener TSA (5.2.2.3) zugegeben, der auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt wurde.

Bei Anwendung des Ausstrichplattenverfahrens 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.

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 ist das Prüfgemisch beim Kontrollversuch mit Wasser und B (Kontrolle des Neutralisationsmediums) und C (Verfahrensvalidierung) sind die verschiedenen Kontrollprüfgemische.