

DIN EN 17658



ICS 71.100.35

Einsprüche bis 2021-05-26

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Chemische Textildesinfektion für den häuslichen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche und Englische Fassung prEN 17658:2021**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Chemical textile disinfection for the domestic area –
Test method and requirements (phase 2, step 2);
German and English version prEN 17658:2021

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Désinfection chimique du textile pour le domaine domestique –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2);
Version allemande et anglaise prEN 17658:2021

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-03-26 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 oder Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

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

Gesamtumfang 90 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17658:2021) 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.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

EN 285	siehe	DIN EN 285
EN 1276	siehe	DIN EN 1276
EN 1650	siehe	DIN EN 1650
EN 12353	siehe	DIN EN 12353
EN 14885	siehe	DIN EN 14885

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

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN 285, *Sterilisation — Dampf-Sterilisatoren — Groß-Sterilisatoren*

DIN EN 1276, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

DIN EN 1650, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

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

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

— Leerseite —

<i>Titel de:</i>	Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Chemische Textildesinfektion für den häuslichen Bereich — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)
<i>Titel en:</i>	Chemical disinfectants and antiseptics — Chemical textile disinfection for the domestic area — Test method and requirements (phase 2, step 2)
<i>Titel fr:</i>	Antiseptiques et désinfectants chimiques — Désinfection chimique du textile pour le domaine domestique — Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2)

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	8
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	31
Anhang B (informativ) Geeignete Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten	32
B.1 Allgemeines	32
B.2 Neutralisationsmedien	32
B.3 Dem Agar für die Keimzählung zugesetzte Neutralisationsmedien	33
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung des Prüfverfahrens	34
Anhang D (informativ) Beispiel für die Spezifikation einer Vorrichtung im Labormaßstab	36
Anhang E (informativ) Prüfbericht (Beispiel)	37
Literaturhinweise	43

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 17658:2021) 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

Die Wäschedesinfektion im häuslichen Bereich hat in den letzten Jahren mit den neuen gesellschaftlichen Trends der Energieeinsparung, die auf der Verringerung der Waschttemperatur von Haushaltswäsche auf $\leq 40\text{ °C}$ beruhen, an Bedeutung gewonnen. Diese Tatsache führt, zusammen mit dem gesellschaftlichen Trend zur Schnelligkeit, dazu, dass die Waschvorgänge im häuslichen Bereich zeitlich kürzer werden, was den Gehalt an Mikroorganismen in den Wäschestücken nach dem Waschvorgang beeinträchtigt. Darüber hinaus sorgen die Modetrends bei Textildesign und Fasertechnologie für Kleidungsstücke, die unter besonderen Pflegebedingungen (kaltes Wasser, kurze Zyklen, „sanfte Chemie“) gewaschen werden müssen, um ihre Eigenschaften zu erhalten, ohne jedoch gleichzeitig deren Hygieneniveau zu beeinträchtigen.

Die Chemie spielt eine wichtige Rolle, um unter den beschriebenen Bedingungen gute hygienische Bedingungen für Haushaltswäsche zu bieten.

Dieses Dokument enthält eine Prüfung der Phase 2, Stufe 2, und legt eine Methodik im Labormaßstab fest, um festzustellen, ob ein chemisches Produkt, das in einem der Waschvorgänge im häuslichen Bereich (Hauptwäsche und Spülen) verwendet wird, eine mikrobizide Wirkung (bakterizide und levurozide Wirkung) auf kontaminierte Textilien und das Waschbad aufweist und einen Effekt bei der Vermeidung einer Kreuzkontamination von Mikroorganismen von kontaminierten Textilien auf nicht kontaminierten Textilien.

Diese Methodik im Labormaßstab wird unter Anwendung einer Trommelvorrichtung durchgeführt, die in der Lage ist, eine Einwirkkammer um eine vertikale Kreisbahn von 360° zu drehen (Rotawash, Launderometer, Gyrowash, Linitester und Mathis BFA wurden im Ringversuch validiert). Diese Trommelvorrichtung hält eine optimale Bewegung (konstant 40 min^{-1} ($\pm 2\text{ min}^{-1}$)) und eine genaue Temperatur für gleichbleibend zuverlässige Prüfergebnisse aufrecht.

Mikroorganismen werden auf textile Keimträger abgeimpft, die in eine Einwirkkammer einbracht werden, um praktische Bedingungen zu simulieren, einschließlich Einwirkzeit, Temperatur, Prüforganismus und Belastungssubstanz (Bedingungen, die die Wirkung des Produkts in der Praxis beeinflussen können). Die Anweisungen des Herstellers sollten ausreichend sein, um die vollständige Durchführung (z. B. Dosierung, Temperatur der Waschphase (Hauptwaschgang, Spülen) und Waschzeit) des in diesem Dokument beschriebenen Verfahrens zu ermöglichen.

Diese Prüfung gibt vor, einen gemeinsamen experimentellen Rahmen zu schaffen, in dem Produkte geprüft werden können, um ihre wirksame Dosierung für jede ausgewählte Versuchsbedingung festzulegen. Auf der Grundlage der Ergebnisse dieser Prüfung erstellte Gebrauchsanweisungen liegen in der Verantwortung der Hersteller der Produkte.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die mikrobizide Wirkung eines chemischen Produkts fest, dessen vorgesehene Verwendung die chemische Behandlung von Textilien im häuslichen Bereich ist, um die Hygieneleistung von Wäschepflegeprodukten für den häuslichen Bereich in Haushaltswaschmaschinen bei niedrigen Temperaturen ($\leq 40\text{ °C}$) zu bewerten. Dieses Verfahren gilt nicht für bestimmte Arten von Wäschedesinfektionstechnologien, für die spezielle Geräte erforderlich sind (d. h. Wirkstoffe werden *in situ* durch den Einsatz spezieller Geräte erzeugt). Dieses Verfahren ist nicht auf bestimmte Arten von Textilien, von Produkten oder auf bestimmte Schritte im Waschzyklus beschränkt.

Dieses Dokument kann auch für Produkte angewendet werden, die zur chemischen Desinfektion von Textilien in den Bereichen Lebensmittel, Industrie und öffentliche Einrichtungen (z. B. Lebensmittelverarbeitung, Geschäfte, Sporträume, Büros, Hotels, Arbeitskleidung, Lebensmittelbereiche oder ähnliche Einrichtungen) verwendet werden, jedoch nicht, wenn die Desinfektion medizinisch indiziert ist (medizinischer Bereich).

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

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

2 Normative Verweisungen

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

EN 1276, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

EN 1650, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

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 und die folgenden Begriffe.

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

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

3.1

Flottenverhältnis

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

3.2

Desinfektionsprozess

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

3.3

Behandlung von kontaminierten Textilien

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

3.4

Wäschedesinfektion im häuslichen und nichtmedizinischen Bereich

Behandlung von Textilien (z. B. Kleidung, Küchentücher, Bettlaken, Tischdecke...) mit chemischen Produkten zur Inaktivierung der mikrobiellen Belastung; der Zweck dieser Desinfektionsstufe besteht darin, die Übertragung von wäschebezogener Mikroflora (Tuch, Waschmaschine, Waschwasser) zwischen kontaminierten und nicht kontaminierte Textilien zu verhindern

3.5

ästhetische und Geruchsbehandlung

Reduzieren der Mikroorganismen auf einen Gehalt, der negative Auswirkungen auf die Wäsche verhindert; Beeinträchtigung der Ästhetik (z. B. Fleckenbildung, Verfärbung, Färbung) oder Ansammlung von mikrobieller Kontamination, die einen unangenehmen Geruch verursacht

4 Anforderungen

Das Produkt muss bei Prüfung nach Tabelle 1 mindestens die folgende lg-Reduktion aufweisen und die grundlegenden Grenzwerte in 5.7.3 einhalten.

a) Hauptwaschgang

a. Wäschedesinfektion im häuslichen und nichtmedizinischen Bereich

mindestens eine Reduktion von Bakterien auf kontaminierten Keimträgern von mehr als 4 ulg-Stufen und eine Reduktion von *Candida albicans* von 3 lg-Stufen. Wenn eine zusätzliche fungizide Wirkung ausgewiesen ist, muss eine Reduktion von 3 ulg-Stufen erreicht werden. Darüber hinaus sind in Keimträgern zum Nachweis einer Kreuzkontamination nicht mehr als 1,54 KBE (lg/Keimträger) und im Waschwasser nicht mehr als 1,15 KBE (lg/ml) nachzuweisen.

b. Ästhetische und Geruchsbehandlung

mindestens eine Reduktion von Bakterien auf kontaminierten Keimträgern von mehr als 3 lg-Stufen und eine Reduktion von *Candida albicans* von 3 ulg-Stufen. Wenn eine zusätzliche fungizide Wirkung ausgewiesen ist, muss eine Reduktion von 3 lg-Stufen erreicht werden. Darüber hinaus sind in Keimträgern zum Nachweis einer Kreuzkontamination nicht mehr als 1,70 KBE (lg/Keimträger) und im Waschwasser nicht mehr als 2 KBE (lg/ml) nachzuweisen.

b) Spülgang

a. Wäschedesinfektion im häuslichen und nichtmedizinischen Bereich

mindestens eine Reduktion von Bakterien auf kontaminierten Keimträgern von mehr als 3 lg-Stufen und eine Reduktion von *Candida albicans* von 3 lg-Stufen. Wenn eine zusätzliche fungizide Wirkung ausgewiesen ist, muss eine Reduktion von 3 lg-Stufen erreicht werden. Darüber hinaus sind in Keimträgern zum Nachweis einer Kreuzkontamination nicht mehr als 1,54 KBE (lg/Keimträger) und im Waschwasser nicht mehr als 1,15 KBE (lg/ml) nachzuweisen.

b. Ästhetische und Geruchsbehandlung

mindestens eine Reduktion von Bakterien auf kontaminierten Keimträgern von mehr als 2 lg-Stufen und eine Reduktion von *Candida albicans* von 2 lg-Stufen. Wenn eine zusätzliche fungizide Wirkung ausgewiesen ist, muss eine Reduktion von 3 lg-Stufen erreicht werden. Darüber hinaus sind in Keimträgern zum Nachweis einer Kreuzkontamination nicht mehr als 1,70 KBE (lg/Keimträger) und im Waschwasser nicht mehr als 2 KBE (lg/ml) nachzuweisen.

Tabelle 1 — Mindestprüfbedingungen und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüf- parameter	Wäschedesinfektion im häuslichen und nichtmedizinischen Bereich		Ästhetische und Geruchsbehandlung	
	Hauptwaschgang	Spülgang	Hauptwaschgang	Spülgang
Prüf- organismen	<i>E. coli</i> , <i>E. hirae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>		<i>E. coli</i> , <i>E. hirae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>C. albicans</i>	
Zusätzlich	Zusätzlicher Prüforganismus Dermatophyten <i>T. rubrum</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>M. canis</i> mit unangenehmem Geruch verbundene Organismen		Zusätzlicher Prüforganismus Dermatophyten <i>T. rubrum</i> <i>T. mentagrophytes</i> <i>M. canis</i> mit unangenehmem Geruch verbundene Organismen	
Prüf- temperatur	wie vom Hersteller empfohlen und $\leq 40\text{ °C}^a$	wie vom Hersteller empfohlen und $\leq 20\text{ °C}^a$	wie vom Hersteller empfohlen und $\leq 40\text{ °C}^a$	wie vom Hersteller empfohlen und $\leq 20\text{ °C}^a$
Einwirkzeit	wie vom Hersteller empfohlen ^a	wie vom Hersteller empfohlen ^a	wie vom Hersteller empfohlen ^a	wie vom Hersteller empfohlen ^a
Ver- schmutzung	hohe Belastung: 3,5 g Gewebe SBL2004 (100 g Ballastgewebe)	niedrige Belastung: BSA in Einbettungs- matrix	hohe Belastung: 3,5 g Gewebe SBL2004 (100 g Ballastgewebe)	niedrige Belastung: BSA in Einbettungsmatrix
Flotten- verhältnis	zwischen 1 : 2 und 1 : 10 vom Hersteller festzulegen	zwischen 1 : 2 und 1 : 10 vom Hersteller festzulegen	zwischen 1 : 2 und 1 : 10 vom Hersteller festzulegen	zwischen 1 : 2 und 1 : 10 vom Hersteller festzulegen
^a Die Temperatur und die Einwirkzeit müssen auf der Grundlage der praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts ausgewählt werden und liegen in der Verantwortung des Herstellers.				

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Textile Keimträger aus Baumwollgewebe (5.3.2.18) werden mit einer Prüfsuspension von Mikroorganismen in BSA kontaminiert. Nach dem Trocknen werden die Keimträger in eine Trommelvorrichtung für Laborversuche mit textiler Ballastbeladung gegeben, in der der Desinfektionsprozess im häuslichen Bereich simuliert wird. Hauptwaschgang und/oder Spülgang können simuliert werden. Am Ende des Desinfektionsschritts wird die Produktwirkung gestoppt, indem die Keimträger in Neutralisationsmedium-Lösung (5.2.1.6) überführt und in einem Thermomixer (5.3.2.6) bei $1\,000\text{ min}^{-1}$ geschüttelt werden, um die verbliebenen Mikroorganismen aus den Keimträgern zu extrahieren. Die Menge an rückgewonnenen Mikroorganismen wird bestimmt und die Reduktionsrate wird im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle berechnet. Zusätzlich werden außerdem die Übertragungsrate auf unbeimpfte Keimträger und die Kontamination der Waschflotte bestimmt.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die bakterizide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden als Prüforganismen ausgewählten Stämme¹ bewertet werden:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

Escherichia coli ATCC 10536

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Enterococcus hirae ATCC 10541

Die levurozide Wirkung muss unter Verwendung des folgenden Prüforganismus bewertet werden:

Candida albicans ATCC 10231

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

Die geforderten Bebrütungstemperaturen für diese Prüforganismen betragen $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.3) [*C. albicans* $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$]. Die gleiche Temperatur muss für alle Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrollen und Validierung angewendet werden.

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

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

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

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

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

Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern, wird empfohlen, handelsübliche wasserfreie Materialien zur Herstellung von Kulturmedien zu verwenden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Produkte sollten strengstens befolgt werden.

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

5.2.2.2 Wasser zur Herstellung von Medien

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

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

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

5.2.2.3 Wasser standardisierter Härte

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 Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven (5.3.2.1 a). Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall ist mit Wasser (5.2.2.2) unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bei 2 °C bis 8 °C bis zu einem Monat aufbewahren.
- Herstellung von Lösung B: 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 lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bei 2 °C bis 8 °C bis zu einer Woche aufbewahren.
- 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.1.1) werden in einen 1 000-l-Messkolben (5.3.2.12) gegeben und dazu werden mit Hilfe einer Pipette (5.3.2.9) 6,0 ml Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B gegeben. Nach Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml verdünnt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, $7,0 \pm 0,2$ betragen (5.2.3.4). Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt.

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

5.2.2.4 Trypton-Soja-Agar (TSA)

Trypton, pankreatisch verdautes Casein	15,0 g
Sojapepton, Papain-Auflösung von Sojabohnenmehl	5,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.1.1)	bis zu 1 000,0 ml

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

Im Falle des Auftretens von Problemen mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) ist es möglicherweise erforderlich, dem TSA ein Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält eine Anleitung zu Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen.

5.2.2.5 Malzextrakt-Agar (MEA)

Malzextrakt	30,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis zu 1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, $5,6 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.6 Verdünnungsmittel

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

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

5.2.2.7 Neutralisationsmedium

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

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Bedingungen niedriger Belastung

Prüfsuspensionen mit 0,3 % BSA-Lösung (Rinderserumalbumin, en: bovine serum albumin) werden hergestellt.

5.2.2.8.2 Bedingungen hoher Belastung

Prüfsuspensionen mit 0,3 % BSA-Lösung werden hergestellt.

Für die Bedingungen des Hauptwaschgangs werden 3,5 g SBL2004-Gewebestücke hinzugefügt, die etwa 1,2 g Standardschmutz enthalten (WFK-Artikelnnummer 2814003).

Prozentuale Zusammensetzung von SBL2004

Pflanzenöl (Olio Extra Vergine di Oliva)	18 % bis 20 %
synthetischer Hauttalg (Sebum) (nach Bey)	18 % bis 20 %
Kaolin	8 % bis 10 %
Protein (aus Eiweißpulver)	8 % bis 10 %
Bleiche zehrendes Mittel	8 % bis 10 %
Stärke (Maisstärke)	6 % bis 8 %
Salz (NaCl)	6 % bis 8 %
Mineralöl	6 % bis 8 %
Lanolin	6 % bis 8 %
Emulgator (Uniperol®, Dispergiermittel, BASF)	1 % bis 3 %
Harnstoff (synthetisch)	1 % bis 3 %
Quarz	1 % bis 3 %
Calciumchlorid	1 % bis 3 %
Pigmentruß/Ruß	< 1 %
Eisenoxidschwarz	< 1 %

5.3 Apparate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

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

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

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²

und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation (feuchte und trockene Hitze)

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar zwischen (20 ± 1) °C und (45 ± 1) °C.

2 Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar entweder auf $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ bezüglich der bakteriziden Wirkung und $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ bezüglich der levuroziden Wirkung. Bei den Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrollen und Validierung muss die gleiche Temperatur angewendet werden.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungenauigkeit von nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$.

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

5.3.2.5 Stoppuhr

5.3.2.6 Schüttelgeräte

- a) Elektromechanisches Rührwerk, z. B. Vortex®-Mischer³;
- b) Thermomixer (bei $1\,000\text{ min}^{-1}$).

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem Material, das mit den zu filtrierenden Substanzen verträglich ist, mit einem Filterhalter von mindestens 50 ml Nutzvolumen und geeignet zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von $0,45\text{ }\mu\text{m}$ für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.3).

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

5.3.2.9 Messpipetten mit einem Nennvolumen von 10 ml, 1 ml, 0,1 ml und 0,01ml oder kalibrierte automatische Pipetten.

5.3.2.10 Sterile Spritzen mit einem Nennvolumen von 90 ml und 10 ml

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

5.3.2.12 Messkolben.

5.3.2.13 Zentrifuge ($4\,700\text{ g}_N$).

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

5.3.2.15 Mikro-Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (mit einem Fassungsvermögen von 2 ml) für die Rückgewinnung der Prüforganismen aus den Keimträgern.

5.3.2.16 Sieb aus nichtrostendem Stahl (die Löcher müssen kleiner sein als $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$)

5.3.2.17 Metallkügelchen (etwa 0,9 g, etwa 0,6 cm)

5.3.2.18 Keimträger aus Baumwolle, 1 cm^2 : Die Keimträger werden unter Verwendung von Standardbaumwollgewebe hergestellt, das sorgfältig in 1 cm^2 große Stücke geschnitten, dreimal in doppelt destilliertem Wasser gekocht und im Autoklaven [siehe 5.3.2.1 a)] sterilisiert wurde.

3 Ein Vortex®-Mischer 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.

Flächenbezogene Masse:	(170 ± 10) g/m ² (tatsächlich 160 g/m ²)
Faserstoff (Kette und Schuss):	Baumwolle, doppelt gerippt
Faserlänge (Kette und Schuss):	mindestens 27 mm
Garnfeinheit (Kette und Schuss):	(295 ± 10) dtex
Garndrehung (Kette und Schuss):	Z-Drehung (700 ± 25) t/m
Bindung:	Leinwandbindung 1
Fadendichte:	jeweils 270 Fäden/dm

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

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

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

5.3.2.19 Färbung der Keimträger

Um zu erkennen, mit welchem Mikroorganismus jeder Keimträger beimpft wurde, muss jeder Keimträger mit einer anderen Farbe gefärbt werden.

Es muss validiert werden, dass der verwendete Farbstoff für keinen der zu prüfenden Mikroorganismen toxisch ist.

Zum Beispiel sind Brauns-Heitmann-Farben oder Textilmarker von Mara by Marabu für diesen Zweck validiert.

5.3.2.20 Ballastbeladung

Als Ballastbeladung ist textiles Flächengebilde aus Polycotton (65 % Polyester/35 % Baumwolle) zu verwenden.

5.3.2.20.1 Spülgang

Gesamtmenge der Ballastbeladung: 100 g textiles Flächengebilde aus Polycotton.

100 g Ballastgewebe werden in Quadrate von 10 cm x 10 cm geschnitten. Es wird mit sterilem destilliertem Wasser zweimal gekocht. Das Gewebe wird an der Luft trocknen gelassen, bis es vollständig trocken ist. 100 g Ballast werden in einen Behälter gegeben oder innerhalb des Bechers 15 min bei 121 °C autoklaviert; es ist sicherzustellen, dass das Gewebe vor der Verwendung vollständig trocken ist.

5.3.2.20.2 Hauptwaschgang

Gesamtmenge der Ballastbeladung: 96,5 g textiles Flächengebilde aus Polycotton zusätzlich zu 3,5 g SBL2004.

96,5 g Ballastgewebe werden in Quadrate von 10 cm x 10 cm geschnitten. Es wird mit sterilem destilliertem Wasser zweimal gekocht. Das Gewebe wird an der Luft trocknen gelassen, bis es vollständig trocken ist. 96,5g Ballast werden in einen Behälter gegeben oder innerhalb des Bechers 15 min bei 121 °C autoklaviert; es ist sicherzustellen, dass das Gewebe vor der Verwendung vollständig trocken ist.

Die Ballastbeladung für die Produktprüfung sollte nicht mehr als einmal verwendet werden. Beim Kontrollversuch mit Wasser kann der Ballast vor dem Verwerfen dreimal wiederverwendet werden.

5.3.2.21 Trommelvorrichtung (z. B. Rotawash, Launderometer, Gyrowash, Linitester, Mathis BFA)

Durch die Trommelvorrichtung müssen die folgenden Spezifikationen sichergestellt werden:

- a) Trommelvorrichtung zum Drehen des Bechers um eine vertikale Kreisbahn von 360°.
- b) Durchmesser bei 40 min⁻¹ bis 60 min⁻¹.
- c) Bad-/Lufttemperatur 20 °C bis 40 °C.
- d) Genauigkeit ± 1 °C.

5.3.2.22 Einwirkkammer, Metallbecher (1 000 ml)

5.3.2.23 Behälter, geeignet zur Aufnahme von 100 g Ballast (autoklavierbar)

5.4 Herstellung der Prüforganismus-Suspensionen

5.4.1 Prüforganismus-Suspensionen (Prüfsuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüforganismus muss eine Prüfsuspension zur Durchführung der Prüfung hergestellt werden.

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 und Prüforganismen

5.4.1.3.1 Bakterien

Um die Gebrauchskultur der Bakterien herzustellen, wird eine Subkultur von der Stammkultur durch Ausstrich auf mindestens etwa zwei TSA-Platten (5.2.2.4) angelegt und bei $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ bebrütet (5.3.2.3).

Nach 24 h Bebrütung bei $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ wird aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise eine zweite Subkultur angelegt und bebrütet.

Eine dritte Subkultur darf nicht verwendet werden.

5.4.1.3.2 Hefen

Candida albicans

Um die Gebrauchskultur von *Candida albicans* herzustellen, wird eine Subkultur von der Stammkultur durch Ausstrich auf MEA (5.2.2.5) angelegt und bei $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ bebrütet (5.3.2.3). Nach 42 h bis 48 h wird aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise eine zweite Subkultur angelegt und 42 h bis 48 h bebrütet.

Aus dieser zweiten Subkultur darf auf gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden. Die zweite und dritte Subkultur müssen die Gebrauchskulturen sein. Eine vierte Subkultur darf nicht verwendet werden.

5.4.1.4 Prüfsuspension (M)

5.4.1.4.1 Prüfsuspension von Bakterien

Anteile der zweiten Subkultur werden ösenweise in das Verdünnungsmittel überführt und unter Verwendung eines Spektrophotometers mit einer Wellenlänge von 620 nm wird der Organismenbestand auf mehr als

$1,5 \times 10^9$ KBE/ml für *P. aeruginosa* und *E. coli* und mehr als $1,5 \times 10^8$ KBE/ml für *E. hirae* und *S. aureus* eingestellt.

Die Suspension wird 5 min bei 4 700 *g* zentrifugiert. Der gesamte Überstand wird entfernt und das Pellet wird mit 0,3%iger BSA-Lösung resuspendiert, deren Volumen dem im vorherigen Schritt aufgezeichneten Volumen des Verdünnungsmittels entspricht. Die Anzahl der Zellen in der Suspension muss mehr als $1,5 \times 10^9$ KBE/ml für *P. aeruginosa* und *E. coli* und mehr als $1,5 \times 10^8$ KBE/ml für *E. hirae* und *S. aureus* betragen.

c) Zur Auszählung von *P. aeruginosa* und *E. coli* werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.2) Verdünnungen von 10^{-7} und 10^{-8} hergestellt. Zur Auszählung von *E. hirae* und *S. aureus* werden Verdünnungen von 10^{-6} und 10^{-7} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Von jeder Verdünnung wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1-ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf (45 ± 1) °C abgekühlter TSA (5.2.2.4) zugegeben.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe – in etwa gleichgroße Anteile geteilt – auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) an der Oberfläche getrockneter TSA-Platten (5.2.2.4) ausgestrichen.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.10.

5.4.1.4.2 Prüfsuspension von Hefe (*N*)

5.4.1.4.2.1 *Candida albicans*

Anteile der zweiten Subkultur werden ösenweise in das Verdünnungsmittel überführt und unter Verwendung eines Spektrophotometers mit einer Wellenlänge von 620 nm wird der Organismenbestand auf mehr als $1,5 \times 10^7$ KBE/ml eingestellt.

Die Suspension wird 5 min bei 4 700 *g* zentrifugiert. Der gesamte Überstand wird entfernt und das Pellet wird mit 0,3%iger BSA-Lösung resuspendiert, deren Volumen dem im vorherigen Schritt aufgezeichneten Volumen des Verdünnungsmittels entspricht. Die Anzahl der Zellen in der Suspension muss mehr als $1,5 \times 10^7$ KBE/ml betragen.

a) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.6) Verdünnungen von 10^{-5} und 10^{-6} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)]. Von jeder Verdünnung wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1-ml-Probe in gesonderte Petrischalen überführt und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf (45 ± 1) °C abgekühlter MEA (5.2.2.5) zugegeben.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe – in etwa gleichgroße Anteile geteilt – auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) an der Oberfläche getrockneter MEA-Platten (5.2.2.5) ausgestrichen.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.10.

5.4.1.5 Beimpfung der Keimträger

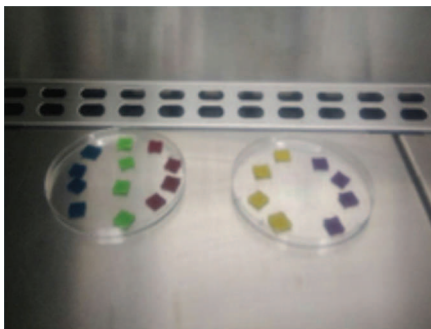


Bild 1 — Prozess der Trocknung der Keimträger

Jeder sterile Keimträger (in einer sterilen Petrischale) wird mit 30 µl hergestelltem Inokulum beimpft. Mindestens drei Keimträger je Mikroorganismus. Ein einzelner Tropfen wird in die Mitte des Keimträgers gegeben.

Die Keimträger werden in einer Sicherheitswerkbank getrocknet, bis sie trocken sind, vorzugsweise nicht länger als 30 min. Die vorbereiteten Keimträger werden unmittelbar nach dem Ende der Trocknungszeit verwendet.

5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der mikrobiziden Wirkung des Produkts

5.5.1 Allgemeines

5.5.1.1 Versuchsbedingungen (obligatorische und zusätzliche)

a) Prozesse bei Temperaturen $\leq 40\text{ °C}$

— Prüforganismen:

— bakterizide Wirkung: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus hirae*

— levurozide Wirkung: *Candida albicans*

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

— Prüftemperatur:

Die Prüfungen werden bei den Prozesstemperaturen durchgeführt.

— Belastungssubstanz:

Die zu prüfende obligatorische Belastungssubstanz ist SBL2004 (siehe 5.2.4.8.2) (3,5 g je Becher bei der Prüfung im Hauptwaschgang).

5.5.1.2 Auswahl des Neutralisationsmediums

Die Validierung der Neutralisation und die Verifizierung des Nichtvorliegens einer Toxizität des Neutralisationsmediums (5.2.2.7) müssen während der entsprechenden Prüfungen der Phase 2, Stufe 1 nach EN 1276, EN 1650 nachgewiesen werden.

Unter besonderen Umständen kann es erforderlich sein, dem Wachstumsmedium (5.2.2.4, 5.2.2.5) ein Neutralisationsmedium zuzusetzen.

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

5.5.1.3 Allgemeine Anweisungen für Validierungs- und Kontrollverfahren

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

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

5.5.1.4 Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit Prüforganismen

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

5.5.2 Verfahren

5.5.2.1 Allgemeines

Die Ballastbeladung ist in 5.3.2.20 festgelegt. Die Art der eingesetzten Vorrichtung muss im Prüfbericht angegeben werden und die in 5.3.2.21 angeführten Anforderungen erfüllen.

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

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

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

Sowohl die Vorrichtung als auch das zu prüfende Produkt müssen auf Prüftemperatur vorgewärmt werden. Die Desinfektionszeit beginnt, wenn die geforderte Waschtemperatur erreicht ist. Während des Desinfektionsprozesses muss auf Temperaturabweichungen geachtet werden. Schwankungen müssen im Prüfbericht angegeben werden.

5.5.2.2 Vorbereitung des Bechers

Ein Becher von 1 l ist erforderlich (5.3.2.22). Der Becher wird vor der Prüfung auf Anzeichen von Beschädigung oder Korrosion geprüft. Die Vorbereitung erfolgt durch Waschen der Innenseite mit Neutralisationsmedium und anschließendes Spülen mit destilliertem Wasser bis das Neutralisationsmedium vollständig entfernt ist. Eine Gummiringdichtung wird in den Becher eingesetzt, der Deckel wird aufgelegt und es wird 15 min bei 121 °C autoklaviert. Es ist sicherzustellen, dass der Becher vor der Verwendung vollständig trocken ist.

5.5.2.3 Vorbereitung des Prüfbeckers

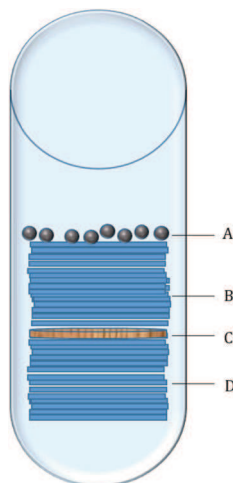
a) Hauptwaschgang

Unter sterilen Bedingungen werden insgesamt 100 g Gewebeballast (96,5 g Ballastgewebe (5.3.2.20) und 3,5 g Belastungssubstanz (5.2.4.8.2)) in der folgenden Reihenfolge in den Becher gegeben:

- I. Die Hälfte des gesamten Ballastgewebes (5.3.2.20) wird nacheinander hinzugefügt, wobei jedes Quadrat in der Mitte gefaltet wird. Bei jedem Hinzufügen wird das halbe Quadrat um 45° gedreht, um eine gleichmäßige Verteilung im Becher sicherzustellen (siehe Bild II).
- II. Die Belastungssubstanz (5.2.4.8.2) wird oben auf die in Schritt I errichtete Säule gegeben.
- III. Das verbliebene Ballastgewebe (5.3.2.20) wird unter Wiederholung von Schritt I hinzugefügt.
- IV. Auf die Oberseite der Becherfüllung werden 8 Metallkügelchen (5.3.2.17) gegeben.



Bild 2 — Verteilung des Gewebeballasts



Legende

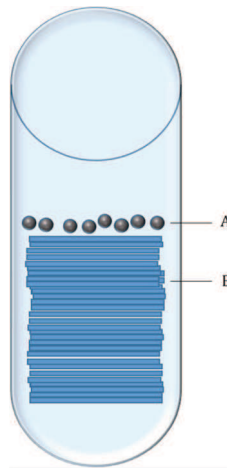
- A 8 Stahlkügelchen
B 48,25 g Ballastbeladung
C 3,5 g SBL2004
D 48,25 g Ballastbeladung

Bild 3 — Verteilung im Becher für den Hauptwaschgang

b) Spülgang

Unter sterilen Bedingungen werden insgesamt 100 g Gewebeballast (100 g Ballastgewebe (5.3.2.20)) in der folgenden Reihenfolge in den Becher gegeben:

- I. Das gesamte Ballastgewebe wird nacheinander hinzugefügt, wobei jedes Quadrat in der Mitte gefaltet wird. Bei jedem Hinzufügen wird das halbe Quadrat um 45° gedreht, um eine gleichmäßige Verteilung im Becher sicherzustellen.
- II. Auf die Oberseite der Becherfüllung werden 8 Metallkügelchen (5.3.2.17) gegeben.



Legende

- A 8 Stahlkügelchen
B 48,25 g Ballastbeladung

Bild 4 — Verteilung im Becher für den Spülgang

5.5.2.4 Herstellung von Prüfproduktverdünnungen

Ein ausreichendes Volumen des auf die Prüfkonzentration verdünnten Produkts wird unter Verwendung von Wasser standardisierter Härte hergestellt, das bei Bedarf auf die gewünschte Temperatur vorgewärmt wird. Die Prüftemperatur wird bis zum Prüfbeginn aufrechterhalten.

5.5.2.5 Prüfverfahren „N_a“ (Bestimmung der mikrobiziden Konzentrationen) und Referenz „N₀“ (Keimzahl auf den Keimträgern)

- a) Mit einer sterilen Pinzette wird ein beimpfter Keimträger für jeden Prüforganismus aseptisch in den Prüfbecher gegeben. Zur Bestimmung der Kreuzkontamination (RI) werden 4 sterile unbehandelte Keimträger hinzugefügt. Das entsprechende Volumen Wasser standardisierter Härte, das das verdünnte Prüfprodukt enthält, wird hinzugefügt und der Zeitgeber wird unverzüglich gestartet. Der Becher wird mit Deckel und Gummidichtung verschlossen. Er wird an der Trommelvorrichtung im Labormaßstab (5.3.2.21) arretiert und gesichert.

Die geeignete Prüftemperatur und Einwirkzeit für entsprechende Prüfparameter werden gewählt.

- b) Nach der Einwirkzeit werden mit einer Spritze 15 ml Washwasser rückgewonnen und mit 15 ml Neutralisationsmedium (doppelt konzentriert) gemischt. Es wird eine Verdünnung (-1) durchgeführt. 2 ml Gemisch werden auf fünf TSA-Platten und fünf MEA-Platten ausplattiert. Der Prozess für die -1-Verdünnung wird wiederholt. Die Bebrütung erfolgt unter festgelegten Bedingungen.
- c) Unmittelbar nach dem Mischen des Washwassers mit dem Neutralisationsmedium wird der verbliebene Inhalt des Prüfbeckers in ein steriles Sieb (5.3.2.16) gekippt. Die Keimträger (5 kontaminierte Keimträger,

4 nicht kontaminierte Keimträger (RI)) werden aus der Ballastbeladung rückgewonnen und jeweils einzeln in ein Röhrchen mit 1 ml Neutralisationsmedium gegeben. Die Rückgewinnung von Keimträgern und Waschwasser sollte nicht länger als 5 min dauern.

- d) Der Inhalt der Röhrchen wird mit einem Thermomixer (5.3.2.6 b) 10 min bei 15 °C bis 18 °C und 1 000 min⁻¹ gemischt, um die verbliebenen Mikroorganismen rückzugewinnen.

Zur Auszählung werden mit dem Verdünnungsmittel Zehnfachverdünnungen bis 10⁻² hergestellt. Es wird durchmischt (5.3.2.6 a). Von jeder Verdünnung wird eine Probe von 0,4 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren abgeimpft.

Zur Bewertung der Kreuzkontamination werden das Eluat von zwei nicht kontaminierten Keimträgern auf TSA und das Eluat von zwei nicht kontaminierten Keimträgern auf MEA ausplattiert.

- I. Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens werden zwei aliquote Anteile von 0,4 ml in gesonderte Petrischalen überführt und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf (45 ± 1) °C abgekühlter TSA (5.2.2.4), oder MEA (5.2.2.5) für *C. albicans*, zugegeben.
- II. Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens werden zwei aliquote Anteile von 0,4 ml in zwei gesonderten Petrischalen auf an der Oberfläche getrockneten TSA-Platten (5.2.2.4), oder MEA-Platten (5.2.2.5) für *C. albicans*, ausgestrichen.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.5.2.9.

- e) Für jede Prüfreihe muss die Keimzahl eines nicht behandelten Keimträgers von jedem Mikroorganismus bestimmt werden.

Der Wert des unbehandelten Keimträgers („N₀“) für jede Prüfreihe dient als Grundlage für die Berechnung der Keimreduktion nach der Einwirkung.

5.5.2.6 Referenzkontrolle „N_w“ (Prüfung ohne Waschmittel oder Desinfektionsmittel)

Um die mechanische Wirkung des Waschprozesses zu ermitteln, wird ein Referenzverfahren durchgeführt. Es wird der gleiche Prozess wie bei „N_a“ ohne Verwendung von Waschmittel oder Desinfektionsmittel durchgeführt.

Zur Bewertung des Waschwassers werden mit einer 10-ml-Spritze 10 ml Waschwasser rückgewonnen und mit 90 ml Neutralisationsmedium gemischt. Aus dem neutralisierten Waschwasser werden Zehnfachverdünnungen bis zu 10⁻⁴ hergestellt. 1 ml jeder Verdünnung wird als Doppelbestimmung auf TSA-Platten und 1 ml jeder Verdünnung als Doppelbestimmung auf MEA-Platten ausplattiert. Die Bebrütung erfolgt unter festgelegten Bedingungen.

- I. Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens werden zwei aliquote Anteile von 1 ml in gesonderte Petrischalen überführt und es werden 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf (45 ± 1) °C abgekühlter TSA (5.2.2.4) oder MEA (5.2.2.5) zugegeben.
- II. Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens werden zwei aliquote Anteile von 1 ml in zwei gesonderten Petrischalen auf an der Oberfläche getrockneten TSA-Platten (5.2.2.4) oder MEA-Platten (5.2.2.5) ausgestrichen.

5.5.2.7 Kontrolle „RI“ (nicht kontaminierter Keimträger aus Baumwolle im Prüfverfahren und im Referenzverfahren)

Zusätzlich zu den kontaminierten Keimträgern in allen Reihen im Prüfverfahren müssen vier nicht kontaminierte Baumwoll-Keimträger dem Verfahren unterzogen werden.

Die in 5.5.2.5 angeführten Anweisungen sind einzuhalten.

Ein Wachstum der Prüforganismen von nicht mehr als 1,54 KBE (lg/Keimträger) muss sowohl in TSA als auch MEA im Prüfverfahren zur Wäschedesinfektion nachgewiesen werden und von nicht mehr als 1,70 KBE (lg/Keimträger) beim Prüfverfahren zur vorbeugenden Desinfektion und Geruchsbehandlung. Wohingegen im Referenzverfahren ein Wachstum > 3 KBE [lg/Keimträger (TSA)] und > 2 KBE [lg/Keimträger (MEA)] nachgewiesen werden muss.

5.5.2.8 Kontrolle „ N_w “ (Keimzahlen im Waschwasser im Prüfverfahren und in der Referenzkontrolle)

Nach Abschluss des Desinfektionsschrittes werden 15 ml Waschwasser entnommen und unverzüglich mit 15 ml doppelt konzentriertem Neutralisationsmedium gemischt. Ein Wachstum der Prüforganismen von nicht mehr als 1,15 KBE (lg/ml) muss sowohl in TSA als auch MEA im Prüfverfahren (5.5.2.5) zur Wäschedesinfektion nachgewiesen werden und von nicht mehr als 2 KBE (lg/ml) beim Prüfverfahren zur vorbeugenden Desinfektion und Geruchsbehandlung. Wohingegen in der Referenzkontrolle ein Wachstum > 4 KBE [lg/ml (TSA)] und > 3 KBE [lg/ml (MEA)] nachgewiesen werden muss.

5.5.2.9 Bebrütung und Auszählung

- Die Platten der Prüforganismen ohne Kontakt mit dem Desinfektionsmittel werden für 20 h bis 24 h (*C. albicans*: 48 h) bebrütet (5.5.2.9), siehe 5.2.1. Die Kultur mit den Prüforganismen nach dem Kontakt mit dem Desinfektionsmittel muss mindestens 7 Tage länger als die reguläre Bebrütungszeit bebrütet werden. Alle Platten, die aus irgendeinem Grund nicht auszählbar sind, werden verworfen. Die Platten werden ausgezählt und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wird bestimmt.
- Für jede Platte wird die genaue Anzahl der Kolonien aufgezeichnet, aber es wird > 330 für alle Koloniezahlen über 330 aufgezeichnet, und die V_c -Werte werden nach 5.7 bestimmt.
- Die Anzahlen der KBE/ml in der Prüfsuspension N werden nach den in 5.6.2.3 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.
- Die Anzahlen der KBE auf den Keimträgern in den Prüfgemischen N_a , N_0 und RI und in der Referenzkontrolle N_w werden nach den in 5.6.2.2 b) und 5.6.2.3 bis 5.6.2.5 angegebenen Verfahren berechnet. Die Verifizierung erfolgt nach 5.7.

5.6 Versuchsdaten und Berechnung

5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen

5.6.1.1 Überblick über die verschiedenen Suspensionen und Prüfgemische

Tabelle 2 — Anzahl der gezählten Zellen je ml

	Anzahl der Zellen in den mikrobiellen Suspensionen KBE/ml	Anzahl der Zellen aus den Referenzkontrollen KBE/Keimträger	Nicht kontaminierter Keimträger	Anzahl der Zellen je unbehandeltem Keimträger (KBE/Keimträger)	Anzahl der überlebenden Zellen je behandeltem Keimträger (KBE/Keimträger)
Prüfung und Referenzkontrollen	N	N_w	RI	N_0	N_a

5.6.1.2 V_C -Werte

Alle Versuchsdaten werden im Bericht als V_C -Werte angegeben. Ein V_C -Wert ist die Anzahl der je 1,0 ml Probe gezählten KBE für N und W_W sowie 0,4 ml für N_0 , N_w , N_a .

ANMERKUNG Die Keimträger werden in 1 ml Neutralisationsmedium überführt. Es werden nur 0,8 ml des Gemischs auf einer Agarplatte analysiert.

5.6.2 Berechnung

5.6.2.1 Allgemeines

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

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

Im Ergebnis wird die Anzahl der KBE/Keimträger als Zahl zwischen 1,00 und 9,95, multipliziert mit der entsprechenden Zehnerpotenz, angegeben.

5.6.2.2 Bestimmung der V_C -Keimzahlen

Die V_C -Keimzahlen werden wie folgt bestimmt.

- a) Die üblichen Grenzwerte für die Auszählung von Bakterien auf Agarplatten liegen zwischen 15 und 300 Kolonien. In diesem Dokument ist eine Abweichung von 10 % zulässig, so dass die Grenzwerte 14 und 330 betragen.

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 eine V_C -Keimzahl von 16. Der obere Grenzwert (330) spiegelt die Ungenauigkeit beim Zählen zusammenfließender Kolonien und die Wachstumshemmung durch Nährstoffauszehrung wider. Sie beziehen sich nur auf die Auszählung auf einer Platte und nicht notwendigerweise auf die Probe.

- b) Für die Auszählung der Prüfsuspension N (5.4.1.4) und W_W (5.5.2.8) werden die V_C -Keimzahlen entsprechend der Anzahl der je 1 ml Probe verwendeten Platten aufgezeichnet (5.6.1.2); für alle anderen Auszählungen der Prüfungen und Referenzkontrolle (N_0 , N_a , N_w , RI) (5.5.2.5) werden die V_C -Keimzahlen entsprechend der Anzahl der je 0,4 ml Probe verwendeten Platten bestimmt und aufgezeichnet (5.6.1.2).

Wenn mehr als eine Platte je 0,4 ml Probe zur Bestimmung der V_C -Keimzahlen verwendet worden ist, sollten die Keimzahlen je Platte aufgezeichnet werden.

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

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

- c) Für die weitere Berechnung werden, außer im Fall von N_a (5.6.2.4), nur V_C -Werte innerhalb der jeweiligen Auszählgrenzen berücksichtigt.

5.6.2.3 Berechnung von N und N_0

N ist die Anzahl der Zellen je ml in der Prüfsuspension (5.4.1.4).

Da zwei Verdünnungen der Prüfsuspension (5.4.1.4) ausgewertet werden, wird die Anzahl der KBE/ml als die gewichtete mittlere Keimzahl nach folgender Gleichung berechnet:

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

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_C -Werte;
- n_1 die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung, d. h. 10^{-6} , berücksichtigten V_C -Werte;
- n_2 die Anzahl der bei der stärkeren Verdünnung, d. h. 10^{-7} , berücksichtigten V_C -Werte;
- d der der geringeren Verdünnung (10^{-6}) entsprechende Verdünnungsfaktor.

N_0 ist die Anzahl der Zellen je Keimträger auf einem unbehandelten Keimträger (5.5.2.5 e).

Da zwei Verdünnungen von N_0 (5.5.2.5 e) ausgewertet werden, wird die Anzahl der KBE je Keimträger als die gewichtete mittlere Keimzahl nach folgender Gleichung berechnet:

$$N_0 = \frac{c}{0,4x(n_1 + 0,1 \times n_2)d}$$

Dabei ist

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

BEISPIEL
$$\frac{168 + 215 + 14 + 25}{0,4x(2 + 0,1 \times 2) 10^{-6}} = \frac{422}{0,4x(2,2 \times 10^{-6})} = 4,7955 \times 10^8 = 4,8 \times 10^8 \text{ (in KBE/ml)}$$

5.6.2.4 Berechnung von N_a

N_a ist die Anzahl der Zellen je Keimträger im Prüfgemisch (5.5.2.5 d) am Ende der Einwirkzeit und vor der Neutralisation.

Da zwei Verdünnungen von N_a (5.5.2.5 d) ausgewertet werden, wird die Anzahl der KBE je Keimträger als die gewichtete mittlere Keimzahl nach folgender Gleichung berechnet:

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

$$N_a^0, N_a^{-1}, N_a^{-2} = \frac{c}{0,4x(n_1 + 0,1 \times n_2)d}$$

Dabei ist

- c die Summe der berücksichtigten V_C -Keimzahlen;
- n_1 die Anzahl der bei der geringeren Verdünnung, z. B. 10^{-1} , berücksichtigten V_C -Keimzahlen;