



ANFORDERUNGEN UND METHODEN zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren

Herausgegeben von
der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH
laufend aktualisierte Ausgabe ab 2022

Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren





Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren

Herausgegeben von der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

Stand: 1. September 2022

Herausgeber:

Desinfektionsmittel-Kommission im Verbund für Angewandte Hygiene e.V. (VAH)

Vorsitzender: Prof. em. Dr. med. Martin Exner
Schriftführer: Dr. rer. nat. Jürgen Gebel
Geschäftsstelle: Dr. Stefanie Gemein, Carsten Zingsheim, Kornelia Zimmer

Adresse der Geschäftsstelle und Korrespondenzadresse:

Desinfektionsmittel-Kommission im VAH
c/o Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit
des Universitätsklinikums Bonn
Venusberg-Campus 1
53127 Bonn
Deutschland
Tel.: (+49) 02 28 - 28 71 40 22, Fax: (+49) 02 28 - 28 71 95 22
E-Mail: info@vah-online.de
Webseite: www.vah-online.de
Geschäftszeiten: Mo–Fr 9.00 – 12.00 Uhr

Die Mitglieder der Desinfektionsmittel-Kommission (Stand 1. September 2022):

Dr. med. B. Christiansen (stellvertretende Vorsitzende)
Dr. M. Decius
Priv.-Doz. Dr. M. Eggers
Prof. em. Dr. med. M. Exner (Vorsitzender)
Dr. J. Gebel (Schriftführer)
Dr. S. Gemein
Priv.-Doz. Dr. med. S. Gleich
Dr. med. B. Hornei
Dr. B. Hunsinger
Prof. Dr. med. A. Kramer
Prof. Dr. H. Martiny
Priv.-Doz. Dr. med. F. Pitten
Priv.-Doz. Dr. med. K. Schröppel
Dr. I. Schwebke
Dr. J. Steinmann
Assoc.-Prof. Priv.-Doz. Dr. M. Suchomel
Dr. med. J. Tatzel
Prof. Dr. L. Vossebein
Prof. Dr. M. H. Wolff

Gäste in der Desinfektionsmittel-Kommission:

P. Ahl, Fachapothekerin für Klinische Pharmazie (Gast für ABDA)
Priv.-Doz. Dr. med. Ch. Brandt (Gast für DGHM)
Dr. med. F. Helm (Gast für Bundeswehr)
Dr. A. Jacobshagen (Gast für BfArM)
I. Klöckner (Gast für VHD)
K. Konrat, M.Sc. (Gast für RKI)
Dr. med. A. Marcic (Gast für MSGJFS, Kiel)
Prof. Dr. U. Rösler (Gast für DVG)
Dr. V. Weinheimer (Gast für BAuA)

Copyright-Vermerk

© VAH e.V., 2022

Dieses Dokument wird laufend aktualisiert. Der Nachdruck (auch auszugsweise) sowie die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Medien ist zu kommerziellen Zwecken nicht gestattet. Für weitere Nutzungshinweise kontaktieren Sie bitte die Geschäftsstelle des VAH (info@vah-online.de).

Zitierhinweis (z.B. für Vorträge und wissenschaftliche Arbeiten):

Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.). Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren. Kapitel XXX., Stand [Internet]. Verfügbar unter: Vollständige URL, Download-Datum

INHALT¹

1 Vorbemerkungen (Änderungshinweis: Aktualisierung 1. November 2021)	1-1
Literatur	1-2
2 Prinzipien der Desinfektionsmittel-Testung (Änderungshinweis: Aktualisierung 1. November 2021)	
2.1 Prüfmethode	2-1
2.2 Übersicht über die Prüfmethode zu den unterschiedlichen Anwendungsbereichen	2-2
2.3 Zertifizierungsfähige Verfahren	2-2
Literatur	2-6
3 Bewertungsverfahren der VAH-Zertifizierung (Änderungshinweis: Aktualisierung 1. November 2021)	
3.1 Antragstellung	3-1
3.2 Anforderungen an Prüfbericht, Gutachten und Gutachter	3-1
3.3 Qualitätssicherung	3-2
3.3.1 Prüflaboratorien	3-3
3.3.2 Nachprüfungen durch die Desinfektionsmittel-Kommission	3-3
Literatur	3-3
4 Wirksamkeitsprüfung gegen spezielle Erreger (Sporen, Viren) (Änderungshinweis: Aktualisierung 1. November 2021)	
4.1 Bakterielle Sporen	4-1
4.2 Viren	4-2
Literatur	4-5
5 Produktprüflösung	
6 Testorganismen	
6.1 Herstellung der Stammkulturen	6-1
6.1.1 Bakterien (außer Mykobakterien)	6-1
6.1.2 Hefen	6-2
6.1.3 Schimmelpilze	6-2
6.1.4 Mykobakterien	6-3
6.1.5 Nachweis der Reinheit der Stämme	6-3
6.2 Herstellung der Gebrauchskulturen und Anreicherungskulturen	6-4
6.2.1 Bakterien (außer Mykobakterien)	6-4
6.2.2 Hefen	6-4

¹Diese Fassung basiert auf der Gesamtausgabe vom Juni 2019 und wurde mit Stand 1.9.2022 aktualisiert und ergänzt

2 Inhalt

6.2.3 Schimmelpilze.....	6-5
6.2.4 Mykobakterien	6-5
6.2.5 Aufbewahrung der Anreicherungskultur (1. Subkultur)	6-5
6.3 Herstellung der Prüfsuspensionen	6-5
6.3.1 Bakterien (außer Mykobakterien) und Hefen.....	6-5
6.3.2 Schimmelpilze.....	6-6
6.3.3 Mykobakterien	6-7
6.4 Bestimmung der Ausgangskoloniezahl der Prüfsuspensionen.....	6-7
Literatur.....	6-7

7 Bestimmung der bakteriostatischen und levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter

Neutralisationsmittel (Methode 7)

7.1 Testorganismen	7-1
7.2 Produktprüflösung.....	7-2
7.3 Methodik	7-2
7.4 Inkubation.....	7-2
7.5 Auswertung	7-2
7A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung.....	7-3

8 Bestimmung der bakteriziden und levuroziden Wirksamkeit im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8)

8.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen.....	8-1
8.2 Produktprüflösung.....	8-1
8.3 Methodik	8-2
8.4 Inkubation.....	8-2
8.5 Auswertung	8-2
8.6 Prüfbedingungen	8-2

9 Bestimmung der bakteriziden, levuroziden, fungiziden, tuberkuloziden bzw. mykobakteriziden

Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9)

9.1 Quantitativer Suspensionsversuch mit Bakterien, Mykobakterien, Hefen und Schimmelpilzen	9-1
9.1.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen in KBE/ml.....	9-1
9.1.2 Produktprüflösung.....	9-1
9.1.3 Methodik	9-2
9.1.3.1 Prinzip.....	9-2
9.1.3.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	9-2
9.1.3.3 Membranfiltrations-Verfahren	9-3
9.1.4 Inkubation.....	9-4

9.1.5 Auswertung	9-4
9.1.6 Validierung	9-4
9.1.6.1 Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens	9-5
9.1.6.1.1 WSH-Kontrolle (Ko1)	9-5
9.1.6.1.2 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)	9-5
9.1.6.1.3 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3)	9-5
9.1.6.2 Validierung des Membranfiltrations-Verfahrens	9-5
9.1.6.2.1 WSH-Kontrolle (Ko1)	9-5
9.1.6.2.2 Kontrolle des Membranfiltrations-Verfahrens (Ko2)	9-6
9.1.6.2.3 Kontrolle der Filtration (Ko3)	9-6
9A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung	9-6
Literatur	9-10

10 Hygienische Händewaschung – praxisnaher Versuch mit Probanden (Methode 10)

10.1 Testorganismus und Ausgangskonzentration	10-1
10.2 Produktprüflösung	10-1
10.3 Methodik	10-1
10.3.1 Prinzip	10-1
10.3.2 Probanden	10-2
10.3.3 Kontaminationsflüssigkeit	10-2
10.3.4 Kontamination der Hände und Bestimmung der Vorwerte (VW)	10-2
10.3.5 Hygienische Händewaschung	10-3
10.3.5.1 Referenz-Händewaschung (RP)	10-3
10.3.5.2 Hygienische Händewaschung mit dem zu prüfenden Produkt (PP)	10-3
10.3.6 Bestimmung der Nachwerte (NW)	10-4
10.4 Inkubation	10-4
10.5 Auswertung	10-4
10.6 Verifizierung des Versuches	10-5
10.7 Signifikanzprüfung	10-5
10A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung	10-6
Literatur	10-7

11 Hygienische Händedesinfektion – praxisnaher Versuch mit Probanden (Methode 11)

11.1 Testorganismus und Ausgangskonzentration	11-1
11.2 Produktprüflösung	11-1
11.3 Methodik	11-1
11.3.1 Prinzip	11-1

4 Inhalt

11.3.2 Probanden	11-2
11.3.3 Kontaminationsflüssigkeit.....	11-2
11.3.4 Kontamination der Hände und Bestimmung der Vorwerte (VW).....	11-2
11.3.5 Hygienische Händedesinfektion	11-3
11.3.5.1 Hygienische Referenz-Händedesinfektion (RP).....	11-3
11.3.5.2 Hygienische Händedesinfektion mit dem zu prüfenden Produkt (PP).....	11-3
11.3.6 Bestimmung der Nachwerte (NW)	11-3
11.4 Inkubation.....	11-4
11.5 Auswertung	11-4
11.6 Verifizierung des Versuches	11-5
11.7 Signifikanzprüfung.....	11-5
11A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung.....	11-5
Literatur.....	11-7
Mitteilungen des VAH aus Hygiene&Medizin	
- Wirksamkeitsprüfung von alkoholischen Schäumen zur hygienischen Händedesinfektion (HM 5/2020)	
- Voraussetzungen zur VAH-Zertifizierung chlorbasierter Händedesinfektionsmittel (HM 10/2020)	
- Zusätzliche Anforderungen an die VAH-Zertifizierung nicht-alkoholbasierter Händedesinfektionsmittel (HM 7/8/2021)	
- Volumenangabe bei der Listung von hygienischen Händedesinfektionsmitteln (HM 11/2021)	
12 Chirurgische Händedesinfektion – praxisnaher Versuch mit Probanden (Methode 12)	
12.1 Produktprüflösung.....	12-1
12.2 Methodik	12-1
12.2.1 Prinzip.....	12-1
12.2.2 Probanden	12-2
12.2.3 Vorbereitung der Hände und Bestimmung der Vorwerte (VW)	12-2
12.2.4 Chirurgische Händedesinfektion.....	12-2
12.2.4.1 Chirurgische Referenz-Händedesinfektion (RP).....	12-2
12.2.4.2 Chirurgische Händedesinfektion mit dem zu prüfenden Produkt (PP)	12-3
12.2.5 Bestimmung der Nachwerte (NW)	12-3
12.3 Inkubation.....	12-4
12.4 Auswertung	12-4
12.5 Verifizierung des Versuches	12-5
12.6 Signifikanzprüfung.....	12-5
12A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung.....	12-6
Literatur.....	12-7
Mitteilungen des VAH aus Hygiene&Medizin	
- Anforderungen an die VAH-Listung von chirurgischen Händedesinfektionsmitteln (HM 10/2021)	

13 Hautantiseptik – praxisnaher Versuch mit Probanden (Methode 13)

13.1 Produktprüflösung..... 13-1

13.2 Methodik 13-1

13.2.1 Prinzip..... 13-1

13.2.2 Probanden 13-1

13.2.3 Antiseptik auf talgdrüsenarmer Haut – (Versuche am Oberarm)..... 13-1

13.2.3.1 Bestimmung der Vorwerte (VW) 13-2

13.2.3.2 Antiseptik mit Referenz- (RP) und Prüfprodukt (PP)..... 13-2

13.2.3.3 Bestimmung der Nachwerte (NW) 13-2

13.2.4 Antiseptik auf talgdrüsenreicher Haut – (Versuche an der Stirn) 13-3

13.2.4.1 Bestimmung der Vorwerte 13-3

13.2.4.2 Antiseptik auf talgdrüsenreicher Haut 13-3

13.2.4.3 Bestimmung der Nachwerte..... 13-4

13.3 Inkubation..... 13-4

13.4 Auswertung 13-4

13.5 Verifizierung des Versuches 13-4

13.6 Signifikanzprüfung residente Flora 13-5

13A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung..... 13-5

Literatur..... 13-7

14 Flächendesinfektion

14.1 Flächendesinfektion ohne Mechanik – praxisnaher Versuch (Methode 14.1)

Prüfung der bakteriziden, levuroziden, fungiziden, tuberkuloziden und mykobakteriziden Wirksamkeit auf nicht-porösen Oberflächen ohne Mechanik 14.1-1

14.1.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen 14.1-1

14.1.2 Produktprüflösung..... 14.1-1

14.1.3 Testzeiten..... 14.1-1

14.1.4 Testflächen..... 14.1-2

14.1.5 Kontamination der Testflächen..... 14.1-2

14.1.6 Methodik 14.1-2

14.1.7 Inkubation 14.1-2

14.1.8 Auswertung 14.1-2

14.1.9 Validierung..... 14.1-3

14.1.9.1 WSH-Kontrolle (Ko1)..... 14.1-3

14.1.9.2 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)..... 14.1-3

14.1.9.3 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3) 14.1-3

14.1 Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Flächendesinfektion ohne Mechanik – praxisnaher Versuch auf nicht-porösen Oberflächen 14.1-4

Literatur 14.1-7

Mitteilungen des VAH aus Hygiene&Medizin

- Chlorbasierte Flächendesinfektionsmittel: Voraussetzungen zur VAH-Zertifizierung erweitert und präzisiert (HM 6/2021)
- Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Ergänzende Informationen zur VAH-Listung von Schäumen/Sprays zur Desinfektion von Flächen und Medizinprodukten (HM 9/2021)

14.2 Flächendesinfektion mit Mechanik – praxisnaher 4-Felder-Test (Methode 14.2)

Prüfung der bakteriziden, levuroziden, fungiziden, tuberkuloziden und mykobakteriziden Wirksamkeit

auf nicht-porösen Oberflächen mit Mechanik 14.2-1

14.2a Prüfung der Wirksamkeit einer Desinfektionslösung im Wischverfahren

mit einem standardisierten Tuchmaterial 14.2-1

14.2b Prüfung der Wirksamkeit der Kombination von einem spezifizierten Wischtuch

und einem Desinfektionsmittel 14.2-1

14.2.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen 14.2-1

14.2.2 Produktprüflösung 14.2-2

14.2.3 Testzeiten 14.2-2

14.2.4 Materialien 14.2-2

14.2.4.1 Testflächen 14.2-2

14.2.4.2 Utensilien für den Wischvorgang 14.2-3

14.2.5 Kontamination des Testfeldes 1 14.2-3

14.2.6a Methodik zur Überprüfung einer Desinfektionsmittellösung im Wischverfahren 14.2-3

14.2.6b Methodik zur Überprüfung der Kombination Desinfektionsmittellösung mit
spezifiziertem Wischtuch 14.2-4

14.2.7 Rückgewinnung der Testorganismen von Testfeld 1–4 14.2-4

14.2.8 Inkubation 14.2-5

14.2.9 Auswertung 14.2-5

14.2.10 Validierung 14.2-6

14.2.10.1 Kontrolle der Rückgewinnung nach Trocknung (T_0 , T_1) 14.2-6

14.2.10.2 WSH-Kontrolle (Ko1) 14.2-6

14.2.10.3 Kontrolle der Neutralisation (Ko2) 14.2-6

14.2.10.4 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3) 14.2-7

14.2A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Flächendesinfektion mit Mechanik – praxisnaher 4-Felder-Test 14.2-7

Literatur 14.2-11

Mitteilungen des VAH aus Hygiene&Medizin

- Chlorbasierte Flächendesinfektionsmittel: Voraussetzungen zur VAH-Zertifizierung erweitert und präzisiert (HM 6/2021)
- Ergänzende Informationen zur Testung des 1-min-Wertes bei gebrauchsfertigen Desinfektionsmittel-Tüchern (HM 7/8/2021)
- Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Ergänzende Informationen zur VAH-Listung von Schäumen/Sprays zur Desinfektion von Flächen und Medizinprodukten (HM 9/2021)

15 Chemische/Chemothermische Instrumentendesinfektion – praxisnaher quantitativer Keimträgerest (Methode 15)

15.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen 15-1

15.2 Produktprüflösung 15-1

15.3 Testzeiten 15-1

15.4 Keimträger 15-2

15.5 Kontamination der Keimträger 15-2

15.6 Methodik 15-2

15.7 Inkubation 15-2

15.8 Auswertung 15-2

15.9 Validierung 15-3

15.9.1 WSH-Kontrolle (Ko1) 15-3

15.9.1 Kontrolle der Neutralisation (Ko2) 15-3

15.9.2 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3) 15-3

15A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung 15-3

Literatur 15-7

16 Chemische Wäschedesinfektion – Einlegeverfahren (praxisnaher Versuch) (Methode 16)

Vorbemerkungen 16-1

16.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen 16-1

16.2 Produktprüflösung 16-1

16.3 Prüfkörper 16-1

16.4 Kontamination der Prüfkörper 16-2

16.5 Methodik 16-2

16.6 Nachweis vermehrungsfähiger Testorganismen auf den Prüfkörpern 16-2

16.7 Inkubation 16-3

16.8 Auswertung 16-3

16.9 Kontrollen 16-3

16.9.1 WSH-Kontrolle (Ko1) 16-3

16.9.2 Kontrolle der Neutralisation (Ko2) 16-3

16.9.3 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3) 16-4

16A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung 16-5

Literatur 16-8

17 Chemothermische Wäschedesinfektion – Einbadverfahren (praxisnaher Versuch) (Methode 17)

Vorbemerkungen	17-1
Maschinenvorbereitung	17-1
Ballastbeladung (Wäsche)	17-1
Wasserhärte	17-2
Desinfektionsmittel mit Aktivsauerstoffkomponenten	17-2

17.1 Prüfung von Wäschedesinfektionsverfahren bei Temperaturen von 30 °C bis < 60 °C (Methode 17.1)

17.1.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen	17.1-1
17.1.2 Produktprüflösungen.....	17.1-1
17.1.2.1 Produktprüflösung für die Prüfung in der Waschmaschine.....	17.1-1
17.1.2.2 Produktprüflösung für Kontrolluntersuchungen (⇒ Kapitel 5 und 17.1.8.4).....	17.1-1
17.1.3 Prüfkörper	17.1-2
17.1.4 Kontamination der Prüfkörper	17.1-2
17.1.5 Methodik	17.1-2
17.1.5.1 Nachweis vermehrungsfähiger Testorganismen (mit Ausnahme von <i>M. terrae</i> und <i>M. avium</i>) in der Flotte	17.1-3
17.1.5.2 Nachweis vermehrungsfähiger Testorganismen auf den Prüfkörpern	17.1-3
17.1.6 Inkubation	17.1-3
17.1.7 Auswertung und Dokumentation	17.1-3
17.1.8 Kontrollen	17.1-4
17.1.8.1 Prüfsuspension und Prüfkörper.....	17.1-4
17.1.8.2 Sterile Prüfkörper im Prüfverfahren	17.1-4
17.1.8.3 Test ohne Wasch- und ohne Desinfektionsmittel mit Prüfkörpern.....	17.1-5
17.1.8.4 Kontrolle der Neutralisation (Ko2).....	17.1-5
17.1.8.5 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3).....	17.1-6
17.1A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung	17.1-7
Literatur.....	17.1-10

17.2 Prüfung von Wäschedesinfektionsverfahren bei Temperaturen von ≥ 60 °C bis 70 °C (Methode 17.2)

17.2.1 Testorganismus und Ausgangskonzentration	17.2-1
17.2.2 Produktprüflösungen.....	17.2-1
17.2.2.1 Produktprüflösung für die Prüfung in der Waschmaschine	17.2-1
17.2.2.2 Produktprüflösung für Kontrolluntersuchungen (⇒ 17.2.8.4, 17.2.8.5 und Kapitel 5).....	17.2-1
17.2.3 Prüfkörper	17.2-1
17.2.4 Kontamination der Prüfkörper	17.2-1
17.2.5 Methodik	17.2-2
17.2.5.1 Nachweis vermehrungsfähiger Testorganismen in der Flotte	17.2-2

17.2.5.2 Nachweis vermehrfähiger Testorganismen auf den Prüfkörpern	17.2-3
17.2.6 Inkubation	17.2-3
17.2.7 Auswertung und Dokumentation	17.2-3
17.2.8 Kontrollen	17.2-3
17.2.8.1 Prüfsuspension und Prüfkörper	17.2-3
17.2.8.2 Sterile Prüfkörper im Prüfverfahren	17.2-4
17.2.8.3 Test ohne Wasch- und ohne Desinfektionsmittel mit Prüfkörpern	17.2-4
17.2.8.4 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)	17.2-4
17.2.8.5 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3)	17.2-5
17.2A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung	17.2-6
Literatur	17.2-7

18 Bestimmung der sporiziden Wirksamkeit gegenüber Clostridium-difficile-Sporen im quantitativen Suspensionsversuch

(Methode 18) (Änderungsnachweise: Oktober 2016, Korrekturen Oktober 2018, März 2019)

18.1 Testorganismus	18-1
18.1.1 Testorganismus und Ausgangskonzentration	18-1
18.1.2 Herstellung der Stammkultur von <i>C. difficile</i>	18-1
18.1.3 Herstellung der Arbeitskulturen und Sporensuspension von <i>C. difficile</i>	18-1
18.1.4 Bestimmung der Germinationsfähigkeit und chemischen Widerstandsfähigkeit der Sporensuspension (Referenzkontrolle)	18-4
18.1.5 Herstellung der Prüfsuspension	18-4
18.1.6 Bestimmung der Sporenzahl der Prüfsuspensionen von <i>C. difficile</i>	18-4
18.2 Produktprüflösung	18-5
18.3 Methodik	18-5
18.3.1 Prinzip	18-5
18.3.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	18-5
18.4 Inkubation	18-7
18.5 Auswertung	18-7
18.6 Validierung	18-7
18.6.1 Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens	18-7
18.6.1.1 WSH-Kontrolle (Ko1)	18-7
18.6.1.2 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)	18-7
18.6.1.3 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3)	18-8
18.6.1.4 Validierung des Membranfiltrationsverfahrens	18-8
18A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung	18-8

19 Flächendesinfektion gegenüber Clostridium-difficile-Sporen (Neu: Oktober 2018)**Flächendesinfektion mit Mechanik – praxisnaher 4-Felder-Text (Methode 19)**

Prüfung der sporiziden Wirksamkeit auf nicht-porösen Oberflächen mit Mechanik

19a Prüfung der Wirksamkeit einer Desinfektionslösung im Wischverfahren mit einem standardisierten Tuchmaterial.....	19-1
19b Prüfung der sporiziden Wirksamkeit der Kombination von einem spezifizierten Wischtuch und einem Desinfektionsmittel.....	19-1
19.1 Testorganismen und Ausgangskonzentration	19-2
19.2 Produktprüflösung.....	19-2
19.3 Testzeiten.....	19-2
19.4 Materialien	19-2
19.4.1 Testflächen.....	19-3
19.5 Kontamination des Testfeldes 1.....	19-4
19.6a Methodik zur Überprüfung einer Desinfektionsmittellösung im Wischverfahren.....	19-4
19.6b Methodik zur Überprüfung der Kombination Desinfektionsmittellösung mit spezifiziertem Wischtuch	19-5
19.7 Rückgewinnung der Testorganismen von Testfeld 1–4.....	19-5
19.8 Inkubation.....	19-6
19.9 Auswertung	19-6
19.10 Validierung.....	19-7
19.10.1 Kontrolle der Rückgewinnung nach Trocknung (T_0 , T_1).....	19-7
19.10.2 WSH-Kontrolle (Ko1).....	19-8
19.10.3 Kontrolle der Neutralisation (Ko2).....	19-8
19.10.4 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3).....	19-9
19A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung	
Flächendesinfektion mit Mechanik – praxisnaher 4-Felder-Text gegenüber Clostridium-difficile-Sporen	19-9
Literatur.....	19-11

ANHANG A (Änderungshinweis: Aktualisierung Oktober 2016 und Oktober 2018)

A 1 Kulturmedien und Reagenzien	A-1
A 1.1 Wasser.....	A-1
A 1.2 WSH (Wasser standardisierter Härte)	A-1
A 1.3 Verdünnungsmittel.....	A-2
A 1.3.1 Trypton-NaCl	A-2
A 1.3.2 M/15 Phosphatpuffer	A-2
A 1.3.3 0,1 M Phosphatpuffer	A-2
A 1.3.4 Phosphatpuffer 0,25 mol/l	A-2

A 1.3.5 Natriumphosphatpuffer 0,1M	A-3
A 1.3.6 Enzympuffer	A-3
A 1.4 Nährmedien.....	A-3
A 1.4.1 7H10 Agar.....	A-3
A 1.4.2 7H9 Bouillon	A-3
A 1.4.3 Casein-Sojamehlpepton Agar (CSA).....	A-4
A 1.4.4 Casein-Sojamehlpepton Agar (CSA) + Desoxycholat	A-4
A 1.4.5 Casein-Sojamehlpepton Bouillon (CSB) (CASO-Bouillon)	A-4
A 1.4.6 Malz-Extrakt-Agar (MEA).....	A-4
A 1.4.7 Malz-Extrakt-Agar für <i>A. brasiliensis</i> (MEA B)	A-5
A 1.4.8 Malz-Extrakt-Bouillon (MEB)	A-5
A 1.4.9 Sabouraud-Glucose-Agar (SGA).....	A-5
A 1.4.10 Sabouraud-Glucose-Bouillon (SGB)	A-5
A 1.4.11 Schutzlösung	A-6
A 1.4.12 Brain-Heart-Infusion-Yeast-Extract mit Taurocholat (BHIYT-L) Agar	A-6
A 1.4.13 Brain-Heart-Infusion (BHI); Hirnherzbouillon (BHI)	A-6
A 1.4.14 Columbia Broth	A-7
A 1.4.15 Sporulationsmedium	A-7
A 1.5 Spülflüssigkeiten.....	A-8
A 1.6 Seifen.....	A-8
A 1.6.1 Sapo kalinus (ohne Konservierungsstoffe gemäß Rezeptur)	A-8
A 1.6.2 Reinigungslösung	A-8
A 1.7 Neutralisationsmittel.....	A-9
A 1.8 Belastungen.....	A-10
A 2 Prüfkörper	A-11
A 2.1 (Kapitel 14.1).....	A-11
A 2.2 (Kapitel 14.2).....	A-11
A 2.3 (Kapitel 14.2).....	A-11
A 2.4 (Kapitel 15).....	A-11
A 2.5 (Kapitel 16 und 17).....	A-11
A 2.6 (Anhang P1).....	A-11
A 3 Mikrobiologische Laborausrüstung	A-12
A 4 Beispiel für eine Titration PES und Wasserstoffperoxid	A-15
 ANHANG B	
Prüfbericht	B-1

ANHANG C (Änderungshinweis: Aktualisierung Oktober 2016)**C 1 Standard-Waschverfahren**..... **C-1****C 2 Standard-Einreibeverfahren**..... **C-1****ANHANG D** (Änderungshinweis: Ergänzung bzw. Korrekturen Oktober 2016 und Oktober 2018)**Schematische Darstellung der Versuchsanordnungen**..... **D-1**

Schema D1 zu Methode 7 D-1

Schema D2 zu Methode 8 D-2

Schema D3.1 zu Methode 9 D-2

Schema D3.2 zu Methode 9 D-3

Schema D4 zu Methode 9 D-3

Schema D5 zu Methode 14.1 D-4

Schema D6 zu Methode 14.2 D-4

Schema D7 zu Methode 15 D-5

Schema D8.1 zu Methode 18 D-5

Schema D8.2 zu Methode 18 D-6

Schema D8.3 zu Methode 18 D-6

Schema D9 zu Methode 19 D-7

ANHANG P**Optionale Prüfmethode für spezielle Erreger****P 1 Testflächenversuch auf unbehandeltem Holz zur Bestimmung der fungiziden Wirksamkeit***P 1.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen*..... P-1*P 1.1.1 Herstellung der Stammkultur von *T. mentagrophytes**..... P-1*P 1.1.2 Herstellung der Gebrauchs- und Anreicherungskulturen von *T. mentagrophytes**..... P-1*P 1.1.3 Herstellung der Prüfsuspensionen von *T. mentagrophytes**..... P-2*P 1.1.4 Bestimmung der Ausgangskoloniezahl der Prüfsuspensionen von *T. mentagrophytes**..... P-2*P 1.2 Produktprüflösung*..... P-2*P 1.3 Testzeiten*..... P-2*P 1.4 Testflächen*..... P-2*P 1.5 Kontamination der Testflächen*..... P-2*P 1.6 Methodik*..... P-3*P 1.7 Inkubation*..... P-3*P 1.8 Auswertung*..... P-3*P 1.9 Validierung*..... P-3**P1A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung****Flächendesinfektion ohne Mechanik: praxisnaher Versuch Pilze auf rohem Holz**..... **P-3**

ANHANG V

(Änderungshinweise: komplette Überarbeitung des Anhangs zur Viruswirksamkeit mit Stand 1.11.2021)

Anforderungen an die Zertifizierung von viruswirksamen Verfahren

V1A Hygienische Händedesinfektion	V-1
<i>Anforderungen</i>	<i>V-1</i>
<i>Testviren gemäß DVV/RKI-Leitlinien bzw. DIN EN 14476.....</i>	<i>V-3</i>
<i>Literatur.....</i>	<i>V-3</i>
V2A Flächendesinfektion	V-4
<i>Anforderungen</i>	<i>V-4</i>
<i>Testviren gemäß DVV/RKI-Leitlinien bzw. DIN EN 14476 oder DIN EN 16777</i>	<i>V-6</i>
<i>Literatur.....</i>	<i>V-6</i>
V3A Instrumentendesinfektion (als Eintauchdesinfektion)	V-8
<i>Anforderungen</i>	<i>V-10</i>
<i>Testviren gemäß DVV/RKI-Leitlinien bzw. DIN EN 14476 oder DIN EN 16777</i>	<i>V-11</i>
<i>Literatur.....</i>	<i>V-11</i>
V4A Chemothermische Wäschedesinfektion	V-12
<i>Anforderungen</i>	<i>V-12</i>
<i>Testviren gemäß DVV/RKI-Leitlinien bzw. DIN EN 14476 oder DIN EN 16777</i>	<i>V-13</i>
<i>Literatur.....</i>	<i>V-13</i>

1

Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren

Die vorliegenden Prüfmethode und Anforderungen wurden von der Desinfektionsmittel-Kommission (DMK) im VAH erarbeitet. Sie ersetzen die Publikationen *Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren*, Stand: 2.4.2015 mit Ergänzungen [1], sowie die seither in Hygiene & Medizin publizierten Mitteilungen zu Methodenänderungen vollständig.

Es wird darauf aufmerksam gemacht, dass die Bezeichnungen „Gutachter“, „Experte“ bzw. „Auftraggeber“ die weibliche Form einschließt.

Vorbemerkungen

Diese Überarbeitung der Anforderungen und Prüfmethode entspricht dem Stand der Wissenschaft. Sie werden zukünftig laufend aktualisiert und mit dem jeweils geltenden Stand veröffentlicht.

In diesen Anforderungen sind alle relevanten aktuellen Normenvorhaben des CEN/TC 216 der Arbeitsgruppe 1 (WG1) integriert [2]. Sofern Vornormen zur Anwendung kommen, ist der Stand angegeben.

Die hier beschriebenen Prüfmethode erlauben keine Aussage über weitere Eigenschaften wie z. B. Reinigungswirksamkeit, Toxizität und Umweltbelastung.

Wie alle Präventivmaßnahmen im Gesundheitsbereich dienen Desinfektionsmaßnahmen dem Schutz der Patienten, des Personals sowie Dritter. Anwendungsgebiete sind Bereiche, Räumlichkeiten und Situationen, in denen eine Desinfektion medizinisch indiziert ist. Solche Indikationen ergeben sich bei der Versorgung von Patienten, beispielsweise in Krankenhäusern, sonstigen medizinischen Einrichtungen inklusive der zahnärztlichen Behandlung sowie bei gehäuftem Auftreten (Ausbrüchen) von bestimmten Infektionskrankheiten in Schulen, Kindergärten, Altenheimen, Pflegeeinrichtungen, Kureinrichtungen oder auch am Arbeitsplatz und im privaten Wohnumfeld. Weiterhin sind Wäschereien und Stationsküchen in Krankenhäusern eingeschlossen, deren Produkte an Patienten geliefert werden. Sie können auch in Dienstleistungseinrichtungen, wie beispielsweise bei Friseuren, in der Maniküre und Pediküre, bei Optikern, Ohrlochstechern, Tätowierern und Akupunkteuren angewendet werden. Für Großküchen mit ihren Vor- und Nachbereitungsräumen gelten aufgrund der dort herrschenden Bedingungen (Temperaturen, Belastungen) besondere hygienische Anforderungen, die dem Lebensmittelrecht unterliegen. Desinfektionsmittel für diesen Bereich werden in der Regel gemäß den Anforderungen der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) geprüft und gelistet [3].

Die hier beschriebenen Prüfmethode sind als Standardmethoden zu verstehen. Sie beinhalten die experimentellen Ansätze für die Wirksamkeitsprüfung von Produkten und Verfahren der Hände-, Flächen-, Eintauch-Instrumenten- und Wäschedesinfektion bzw. Hautantiseptik. Die Verantwortung für die Eignung dieser Standardmethoden für die Prüfung des jeweiligen Verfahrens, aber auch für Modifikationen der Methode, trägt der Gutachter. So kann es einerseits bei bestimmten Produkten erforderlich sein, insbesondere bei neuen Wirksubstanzen oder bekannten Problemen etablierter Wirkstoffe, methodische Änderungen oder Erweiterungen zur Charakterisierung der Wirksamkeit auszuführen. Andererseits sind Modifikationen zugelassen, wenn sie ausreichend standardisiert und validiert sind und dadurch die Aussagekraft verbessert wird. In jedem Fall sind jegliche Abweichungen und Ergänzungen von den Standardmethoden im Prüfbericht anzugeben, zu beschreiben und zu begründen.

Literatur

1. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.). Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren. Stand: 2.4.2015 mit Ergänzungen. Wiesbaden: mhp Verlag.
2. DIN EN 14885:2019-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika, Deutsche Fassung EN 14885:2018.
3. DVG. Voraussetzung für die Desinfektionsmittelprüfung und Aufnahme in die Desinfektionsmittellisten der DVG. Stand 1.2.2015. Abrufbar über <https://www.desinfektion-dvg.de/index.php?id=1809>

2

Prinzipien der Desinfektionsmittel-Testung

2.1 Prüfmethode

Die mikrobizide und viruzide Wirksamkeit wird in quantitativen Tests bestimmt, damit auf diese Weise eine Aussage über die Inaktivierungskinetik getroffen werden kann. Die Bestimmung der desinfizierenden Wirksamkeit der verschiedenen Anwendungsverfahren erfolgt in zwei Schritten:

- In-vitro-Tests (Phase 2, Stufe 1),
- Tests unter praxisnahen Bedingungen (Phase 2, Stufe 2).

Die In-vitro-Tests sollen Auskunft über die mikrobiziden/viruziden Eigenschaften des zu prüfenden Verfahrens bei unterschiedlichen Konzentrationen, Einwirkzeiten und erforderlichenfalls Expositionstemperaturen geben. Zusätzlich wird die Veränderung der Absterbekinetik unter den Belastungen erfasst, die für das Anwendungsverfahren von Belang sind (z. B. Eiweiß bzw. Blut). Die hier beschriebenen In-vitro-Tests entsprechen ihrer Struktur nach den Phase-1- und Phase-2/Stufe-1-Tests der vergleichbaren europäischen Normen bzw. Vornormen. Die Ergebnisse der In-vitro-Tests lassen allein keine Schlussfolgerungen zu, ob durch die Anwendung des Produktes unter den Bedingungen der Praxis eine Wirksamkeit zu erwarten ist. Vielmehr sind die Ergebnisse der In-vitro-Tests bzw. die Erfüllung der Anforderungen, bezogen auf die jeweiligen Anwendungsverfahren, Voraussetzung dafür, mit welchen Konzentrations-Zeit-(Temperatur)-Relationen Tests unter praxisnahen Bedingungen durchgeführt werden sollen.

Die Tests unter praxisnahen Bedingungen gestatten die Schlussfolgerung, ob nach dem Stand des Wissens die Wirksamkeit eines Produktes unter den Bedingungen des Anwendungsverfahrens als geeignet einzustufen ist. Infolge der Vielzahl an Einflussfaktoren in derartigen Testreihen sind größere Streubreiten zu erwarten. Die Sicherheit der Aussage wird daher durch eine erhöhte Anzahl der Einzeltests pro Ansatz oder durch Referenzverfahren oder Reproduktionen erhöht. Die Tests unter praxisnahen Bedingungen entsprechen ihrer Struktur nach den Phase-2/Stufe-2-Tests der vergleichbaren europäischen Normen oder Vornormen. Werden Instrumentendesinfektionsmittel im Eintauchverfahren zur Aufbereitung von Medizinprodukten eingesetzt, ist zu beachten, dass ab der Einstufung „semikritisch“ der Gesamtprozess der Aufbereitung, d. h. alle erforderlichen Einzelschritte, validiert werden muss.

2.2 Übersicht über die Prüfmethode zu den unterschiedlichen Anwendungsbereichen

Im Folgenden werden für die verschiedenen Anwendungsbereiche Einzelheiten der Untersuchungen sowie die Anforderungen an die Resultate benannt. Es werden „orientierende“, „obligate“ sowie „optionale“ Prüfungen aufgeführt.

Orientierende Prüfungen müssen nicht zwingend durchgeführt werden. Sie werden bei der Festlegung der Anwendungsempfehlungen für das Desinfektionsverfahren nicht berücksichtigt. Die Resultate von orientierenden Prüfungen können jedoch wichtige Aussagen/Entscheidungshilfen für das weitere Vorgehen liefern und den Aufwand für die obligaten Prüfungen gegebenenfalls verringern.

Resultate von obligaten Prüfungen sind die Grundlage für die Bewertung des Desinfektionsverfahrens. Als obligate Prüfungen sind die bei dem jeweiligen Anwendungsbereich aufgeführten quantitativen Suspensionsversuche und der praxisnahe Test durchzuführen.

Darüber hinaus können optional zusätzliche Prüfungen mit erweiterten Aussagen hinsichtlich des Wirkungsspektrums des Produktes durchgeführt werden (**s. Tabelle 2.1**). In besonderen fachlich zu begründenden Fällen sind andere Methoden – entsprechend dem aktuellen Stand des Wissens – anzuwenden.

Zertifizierungsfähige Verfahren

1) *Hygienische Händewaschung*

Einwirkzeit 30 Sekunden oder 1 Minute

2) *Händedesinfektion*

a) hygienische Händedesinfektion: Einwirkzeit 30 Sekunden oder 1 Minute

b) chirurgische Händedesinfektion: Einwirkzeit 1 / 1,5 / 2 / 2,5 / 3 oder 5 Minuten

3) *Hautantiseptik / Hautdesinfektion*

Einwirkzeit je nach Hautareal 15 Sekunden, 30 Sekunden oder 1 Minute an talgdrüsenarmer Haut bzw. 1 / 1,5 / 2 / 2,5 / 3 / 3,5 / 4 / 4,5 / 5 und 10 Minuten an talgdrüsenreicher Haut

4) *Flächendesinfektion*

Einwirkzeit 1, 5, 15, 30, 60 bzw. 240* Minuten

Zusätzlich: Desinfektion von Pilzen auf rohem Holz, mögliche Einwirkzeiten wie oben

5) *Instrumentendesinfektion als Eintauchdesinfektion*

Einwirkzeit 5, 15, 30, 60 Minuten

6) *Wäschedesinfektion, chemisch oder chemothermisch*

Einwirkungszeit von 5 bis 20 Minuten. Anwendungsform vom Verfahren abhängig

* Nur für Flächendesinfektion ohne Mechanik

Tabelle 2.1: Übersicht über die Prüfmethoden und deren EN-Äquivalente für verschiedene Auslobungen in der VAH-Liste. Alle Verfahren müssen bakterizid und levurozid geprüft und für wirksam befunden sein (Stand dieser Tabelle ist der **1. November 2021**).

Anwendungsbereich	Phase/ Stufe	Wirkspektrum											
		Bakterizidie	Levurozidie	Fungizidie <i>optional</i>	Tuberkulozidie <i>optional</i>	Mykobakterizidie <i>optional</i>	Viruzidie "begrenzt viruzid" <i>optional</i>	Viruzidie "begrenzt viruzid PLUS" <i>optional</i>	Viruzidie "viruzid" <i>optional</i>	Sporizidie <i>C. difficile</i> <i>optional</i>			
Hygienische Händewaschung		Methode 7 <i>orientierend</i>	Methode 7 <i>orientierend</i>										
		Methode 8 <i>orientierend</i>	Methode 8 <i>orientierend</i>										
	2 / 1	Methode 9 <i>bzw. EN 13727</i>	Methode 9 <i>bzw. EN 13624</i>				DVV, RKI 2015 <i>bzw. EN 14476^a</i>						
	2 / 2	Methode 10 <i>bzw. EN 1499</i>											
Hygienische Hände- desinfektion		Methode 7 <i>orientierend</i>	Methode 7 <i>orientierend</i>										
		Methode 8 <i>orientierend</i>	Methode 8 <i>orientierend</i>										
	2 / 1	Methode 9 <i>bzw. EN 13727</i>	Methode 9 <i>bzw. EN 13624</i>				DVV, RKI 2015 <i>bzw. EN 14476^a</i>	DVV, RKI 2015 <i>bzw. EN 14476</i>	DVV, RKI 2015 <i>bzw. EN 14476^b</i>				
	2 / 2	Methode 11 <i>bzw. EN 1500</i>									p/EN 17430		
Chirurgische Hände- desinfektion		Methode 7 <i>orientierend</i>	Methode 7 <i>orientierend</i>										
		Methode 8 <i>orientierend</i>	Methode 8 <i>orientierend</i>										
	2 / 1	Methode 9 <i>bzw. EN 13727</i>	Methode 9 <i>bzw. EN 13624</i>										
	2 / 2	Methode 12 <i>bzw. EN 12791</i>	Methode 12 <i>bzw. EN 12791</i>										

Tabelle 2.1, Fortsetzung: Übersicht über die Prüfmethode und deren EN-Äquivalente für verschiedene Auslobungen in der VAH-Liste. Alle Verfahren müssen bakterizid und levurozid geprüft und für wirksam befunden sein (Stand dieser Tabelle ist der **1. November 2021**).

Anwendungsbereich	Phase/ Stufe	Wirkspektrum												
		Bakterizidie	Levurozidie	Fungizidie <i>optional</i>	Tuberkulozidie <i>optional</i>	Mykobakterizidie <i>optional</i>	Viruzidie "begrenzt viruzid" <i>optional</i>	Viruzidie "begrenzt viruzid PLUS" <i>optional</i>	Viruzidie "viruzid" <i>optional</i>	Sporizidie <i>C. difficile</i> <i>optional</i>				
Hautantiseptik		Methode 7 <i>orientierend</i>	Methode 7 <i>orientierend</i>											
		Methode 8 <i>orientierend</i>	Methode 8 <i>orientierend</i>											
	2 / 1	Methode 9 bzw. EN 13727	Methode 9 bzw. EN 13624				DVV, RKI 2015 bzw. EN 14476 ^a							
	2 / 2	Methode 13	Methode 13											
Oberflächen- desinfektion		Methode 7 <i>orientierend</i>	Methode 7 <i>orientierend</i>											
		Methode 8 <i>orientierend</i>	Methode 8 <i>orientierend</i>											
	2 / 1	Methode 9 bzw. EN 13727	Methode 9 bzw. EN 13624	Methode 9 bzw. EN 13624	Methode 9 bzw. EN 14348	Methode 9 bzw. EN 14348	DVV, RKI 2015 bzw. EN 14476 ^a	DVV, RKI 2015 bzw. EN 14476	DVV, RKI 2015 bzw. EN 14476	Methode 18 bzw. EN 17126 ^g				
Oberflächen- desinfektion ohne Mechanik	2 / 2	Methode 14.1 bzw. EN 17387 ^h	Methode 14.1 bzw. EN 17387 ⁱ	Methode 14.1 bzw. EN 17387 ^j	Methode 14.1	Methode 14.1	DVV 2012 bzw. EN 16777 ^c	DVV 2012 bzw. EN 16777 ^d	DVV 2012 bzw. EN 16777 ^e					
	2 / 2	Methode 14.2 bzw. EN 16615	Methode 14.2 bzw. EN 16615	Methode 14.2	Methode 14.2	Methode 14.2	Praxisnahe Tests bei CEN in Entwicklung	Praxisnahe Tests bei CEN in Entwicklung	Praxisnahe Tests bei CEN in Entwicklung	Methode 19				
Instrumenten- desinfektion		Methode 7 <i>orientierend</i>	Methode 7 <i>orientierend</i>											
		Methode 8 <i>orientierend</i>	Methode 8 <i>orientierend</i>											
	2 / 1	Methode 9 bzw. EN 13727	Methode 9 bzw. EN 13624	Methode 9 bzw. EN 13624	Methode 9 bzw. EN 14348	Methode 9 bzw. EN 14348	DVV, RKI 2015 bzw. EN 14476 ^a	DVV, RKI 2015 bzw. EN 14476 ^b bis 40 °C oder DVV, RKI 2015 bzw. EN 14476 ^f >40 °C	DVV, RKI 2015 bzw. EN 14476 ^b bis 40 °C oder DVV, RKI 2015 bzw. EN 14476 ^f >40 °C	Methode 18 bzw. EN 17126 ^g				
	2 / 2	Methode 15 bzw. EN 14561	Methode 15 bzw. EN 14562	Methode 15 bzw. EN 14562	Methode 15 bzw. EN 14563	Methode 15 bzw. EN 14563	EN 17111	EN 17111	EN 17111					

Tabelle 2.1: Übersicht über die Prüfmethode und deren EN-Äquivalente für verschiedene Auslobungen in der VAH-Liste. Alle Verfahren müssen bakterizid und levurozid geprüft und für wirksam befunden sein. (Stand dieser Tabelle ist der **1. November 2021**).

Anwendungsbereich	Phase/ Stufe	Wirkspektrum											
		Bakterizidie	Levurozidie	Fungizidie <i>optional</i>	Tuberkulozidie <i>optional</i>	Mykobakterizidie <i>optional</i>	Viruzidie "begrenzt viruzid" <i>optional</i>	Viruzidie "begrenzt viruzid PLUS" <i>optional</i>	Viruzidie "viruzid" <i>optional</i>	Sporizidie <i>C. difficile</i> <i>optional</i>			
Chemische Wäsche- desinfektion (manuelles Einlege- verfahren)		Methode 7 <i>orientierend</i>	Methode 7 <i>orientierend</i>										
		Methode 8 <i>orientierend</i>	Methode 8 <i>orientierend</i>										
	2 / 1	Methode 9 <i>bzw. EN 13727</i>	Methode 9 <i>bzw. EN 13624</i>	Methode 9 <i>bzw. EN 13624</i>	Methode 9 <i>bzw. EN 14348</i>	Methode 9 <i>bzw. EN 14348</i>						Methode 18 <i>bzw. EN 17126 §</i>	
	2 / 2	Methode 16	Methode 16	Methode 16	Methode 16	Methode 16							
Maschinelle chemo- thermische Wäsche- desinfektion		Methode 7 <i>orientierend</i>	Methode 7 <i>orientierend</i>										
		Methode 8 <i>orientierend</i>	Methode 8 <i>orientierend</i>										
	2 / 1	Methode 9 <i>bzw. EN 13727</i>	Methode 9 <i>bzw. EN 13624</i>	Methode 9 <i>bzw. EN 13624</i>	Methode 9 <i>bzw. EN 14348</i>	Methode 9 <i>bzw. EN 14348</i>						Methode 18 <i>bzw. EN 17126 §</i>	
	2 / 2	Methode 17 <i>bzw. EN 16616</i>	Methode 17 <i>bzw. EN 16616</i>	Methode 17 <i>bzw. EN 16616</i>	Methode 17 <i>bzw. EN 16616</i>	Methode 17 <i>bzw. EN 16616</i>							

Erläuterungen:

Sofern europäische Normen berücksichtigt werden, müssen die Versuche im Doppelsatz mit Berechnung eines mittleren Konfidenzintervalls entsprechend DVV, RKI 2015 durchgeführt werden.

- a. EN 14476 nur mit MVA (Modifiziertes Vacciniavirus Ankara),
- b. EN 14476 + SV40,
- c. EN 16777 nur mit MVA (Modifiziertes Vacciniavirus Ankara)
- d. Low level: EN 16777 nur mit Adenovirus + murines Norovirus
- e. High level: EN 16777 nur mit Adenovirus + murines Norovirus + murines Parvovirus
- f. EN 14476 nur mit murinem Parvovirus
- g. EN 17126 nur mit *C. diff.*
- h. *bzw.* EN 13697 oder EN 14349 mod. gemäß EN 14885
- i. *bzw.* EN 13697 oder EN 16438 mod. gemäß EN 14885

Literatur

Alle in Tabelle 2.1 erwähnten Normen, Vornormen und Leitlinien sind in der folgenden Übersicht thematisch sortiert aufgeführt:

Allgemeine Normen zur Desinfektion

DIN EN 14885:2019-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika. Deutsche Fassung EN 14885:2018.

DIN EN 13727:2015-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1). Deutsche Fassung EN 13727:2012+A2:2015.

DIN EN 13624:2013-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1). Deutsche Fassung EN 13624:2013.

DIN EN 14348:2005-04. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der mykobakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich einschließlich der Instrumentendesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1). Deutsche Fassung EN 14348:2005

DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin – Fassung vom 1. Dezember 2014. Bundesgesundheitsbl 2015; 58:493–504.

DIN EN 14476:2019-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1); Deutsche und Englische Fassung EN 14476:2013+A2:2019.

DIN EN 17126:2019-02. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der sporiziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1); Deutsche Fassung EN 17126:2018

Hygienische Händewaschung, Hygienische Händedesinfektion

DIN EN 1499:2017-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Hygienische Händewaschung – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 1499:2013.

DIN EN 1500:2017-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Hygienische Händedesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 1500:2013.

DIN EN 17430:2019-09 Entwurf Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Viruzide hygienische Händedesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche und Englische Fassung prEN 17430:2019.

DIN EN 12791:2018-01. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Chirurgische Händedesinfektionsmittel – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 12791:2016+A1:2017.

Flächendesinfektion

DIN EN 17387:2021-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Versuch zur Bestimmung der bakteriziden und levuroziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich auf nicht porösen Oberflächen ohne mechanische Einwirkung - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2); Deutsche Fassung EN 17387:2021

DIN EN 13697:2019-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Oberflächen-Versuch nicht poröser Oberflächen zur Bestimmung der bakteriziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen – Prüfverfahren und Anforderungen ohne mechanische Behandlung (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 13697:2015+A1:2019.

DIN EN 14349:2013-02. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Oberflächenversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich auf nicht-porösen Oberflächen ohne mechanische Wirkung – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 14349:2012.

DIN EN 16438:2014-07. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Oberflächenversuch zur Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich auf nicht-porösen Oberflächen ohne mechanische Wirkung – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 16438:2014.

DIN EN 16615:2015-06. Chemische Desinfektion und Antiseptika – Quantitatives Prüfverfahren zur Bestimmung der bakteriziden und levuroziden Wirkung auf nicht-porösen Oberflächen mit mechanischer Einwirkung mit Hilfe von Tüchern oder Mops im humanmedizinischen Bereich (4-Felder-Test) – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 16615:2015.

DVV. Quantitative Prüfung der viruziden Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel auf nicht-porösen Oberflächen (Anwendung im Bereich Humanmedizin). HygMed 2012;37(3): 78–85.

DIN EN 16777:2019-03. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Versuch auf nicht porösen Oberflächen ohne mechanische Einwirkung zur Bestimmung der viruziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 16777:2018.

Instrumentendesinfektion im Eintauchverfahren

DIN EN 14561:2006-08. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung für Instrumente im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 14561:2006.

DIN EN 14562:2006-08. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der fungiziden oder levuroziden Wirkung für Instrumente im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 14562:2006.

DIN EN 14563:2009-02. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der mykobakteriziden oder tuberkuloziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel für Instrumente im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 14563:2008.

DVV/GfV, RKI. Mitteilung des Fachausschusses Virusdesinfektion der DVV/GfV und des RKI zur Untersuchungstemperatur bei der Prüfung von chemischen bzw. chemothermischen Instrumentendesinfektionsverfahren entsprechend der DVV/RKI-Leitlinie in der Fassung vom 01.12.2014. Bundesgesundheitsbl 2015;58(8):888.

DIN EN 17111:2018-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der viruziden Wirkung für Instrumente im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 17111:2018.

Wäschedesinfektion

DIN EN 16616:2015-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Chemothermische Wäschedesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 16616:2015.

3

Bewertungsverfahren der VAH-Zertifizierung

3.1 Antragstellung

Zur Zertifizierung eines Produktes müssen folgende Unterlagen per Post eingereicht werden:

1. Antrag auf Zertifikatserteilung/-verlängerung in vierfacher Ausführung.
2. Zwei unabhängige Gutachten mit Prüfberichten in dreifacher Ausführung.
3. Etiketten bzw. Etikettenentwurf, Produktinformationen, Sicherheitsdatenblatt. Bei neuen Produkten ist zumindest eine vollständige Beschreibung der Anwendungsempfehlung einzureichen.

Adressieren an:

Desinfektionsmittel-Kommission im VAH
c/o Institut für Hygiene und Öffentliche Gesundheit
des Universitätsklinikums Bonn
Venusberg-Campus 1, Gebäude 63
D-53127 Bonn

Weitere detaillierte Informationen sowie die **Antragsformulare** können von der Homepage des VAH im [Bereich für Hersteller](#) heruntergeladen werden.

3.2 Anforderungen an Prüfbericht, Gutachten und Gutachter

3.2.1 Prüfbericht

Prüfberichte müssen die Ergebnisse aller Tests in Tabellenform enthalten. Einzelheiten sind bei den jeweiligen Testmethoden aufgeführt. Auf eine Beschreibung der Methode kann verzichtet werden, wenn sie nach diesen Standardmethoden oder einer relevanten europäischen Norm durchgeführt wurde. Jegliche Abweichung von der Methode ist aber zu deklarieren und zu begründen.

Pro Test ist der Bezug zu einer der Standardmethoden oder Normen mit Datum des Erscheinens anzugeben. Wenn nicht anders angegeben, ist das jeweilige Testdatum und die Ausgangskoloniezahl der verwendeten Prüfsuspensionen in KBE pro ml anzugeben. Jede Testserie muss eine Ergebnisbeurteilung enthalten, aus der ersichtlich ist, inwieweit die an sie gestellten Anforderungen an die Wirksamkeit unter Bezug auf die Standardmethoden oder Normen erfüllt werden.

Prüfberichte müssen folgende Angaben enthalten:

- Bezeichnung und Adresse des Prüflaboratoriums,
- Produktname der Originalhandelsabpackung bzw. eine, beim Auftraggeber rückverfolgbare, Bezeichnung des Prüfmusters,
- Auftraggeber,
- Auftragsdatum / Eingang der Proben,
- Prüfzeitraum,
- Chargennummer und/oder Herstellungsdatum, ggf. Verfallsdatum,
- Beschreibung des Produktes, z. B. Flüssigkeit oder Pulver, Farbe, Aussehen, Geruch,
- pH-Werte des Konzentrats sowie einer 1%igen Produktlösung,
- Wirkstoffe nach Art und Menge auf Grund der Herstellerangaben nach den jeweils rechtlich verbindlichen Bestimmungen.

3.2.2 Gutachten

Das Gutachten muss einen persönlichen Briefkopf des Gutachters tragen und von dem zuständigen Gutachter unterschrieben sein. Im Gutachten muss der Name des Produktes, der Verweis auf die Prüfberichte und die Anwendungsempfehlung mit Anwendungsgebiet und wirksamen Konzentrations-Zeit-Relationen auf der Basis der vorliegenden Untersuchungsergebnisse und unter Berücksichtigung wissenschaftlicher Erkenntnisse klar ersichtlich sein.

3.2.3 Gutachter

Der Gutachter muss als Experte Berufserfahrung auf dem Gebiet der Desinfektionsmittel-Testung und der Krankenhaushygiene aufweisen. Als Experte gelten jene Gutachter, die ein abgeschlossenes Hochschulstudium der Medizin oder einer fachverwandten Naturwissenschaft aufweisen und über eine mindestens zweijährige experimentelle Erfahrung auf dem Gebiet der Desinfektionsmittel-Testung verfügen.

Eine Liste der Gutachter, die Gutachten nach den Anforderungen zur Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren durch den VAH erstellen, finden Sie auf der [Homepage](#) des VAH.

3.3 Qualitätssicherung

Jedes Prüflaboratorium muss akkreditiert sein und sich in regelmäßigen Abständen einer von der DMK veranlassten Qualitätskontrolle durch Teilnahme an Ringversuchen stellen. Weiterhin muss gewährleistet sein, dass Beauftragte der DMK Zugang zu dem Prüflaboratorium erhalten mit dem Recht, die Laboreinrichtungen zu besichtigen und die VAH-relevanten Laborprotokolle einzusehen

3.3.1 Prüflaboratorien

Eine Liste der Laboratorien, die Prüfberichte nach den Anforderungen zur Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren durch den VAH erstellen, finden Sie auf der [Homepage](#) des VAH.

3.3.2 Nachprüfungen durch die Desinfektionsmittel-Kommission

Die Geschäftsstelle der DMK wird regelmäßig stichprobenweise eine Überprüfung von aus dem Markt gezogenen Mustern vornehmen oder vornehmen lassen. Der Zeitpunkt der Untersuchungen darf dem Zertifikatsinhaber nicht vorher bekannt gegeben werden. Folgende Parameter sind zu überprüfen: pH-Wert des Konzentrats (ausgenommen Alkohole), pH-Wert der Anwendungskonzentration der Produktlösung in WSH, Brechungsindex, Dichte. Zusätzlich kann der Gehalt an wirksamen Substanzen mit den Methoden des Herstellers (siehe III § 2 [1]) überprüft werden. Bei Abweichungen wird der Antragsteller um eine Stellungnahme gebeten. Die DMK entscheidet dann über eine mikrobiologische Nachtestung, wobei insbesondere Resultate der Tests der eingereichten Prüfberichte, die für die Konzentration / Zeitwerte ausschlaggebend waren, einschließlich der Neutralisation überprüft werden. Das Untersuchungsergebnis wird der DMK zusammen mit einer Bewertung übergeben. Hat die DMK der Bewertung zugestimmt bzw. abgestimmt geändert, informiert die Geschäftsstelle den Zertifikatsinhaber über das Ergebnis.

Literatur

1. Verbund für Angewandte Hygiene (VAH) (2013). Geschäftsordnung der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Stand 1. Juli 2013. Download über: www.vah-online.de

4

Wirksamkeit gegen spezielle Erreger

4.1 Bakterielle Sporen

Der VAH hat in Kooperation mit der 4+4-Arbeitsgruppe einen quantitativen Suspensionsversuch zur Überprüfung der sporiziden Wirksamkeit gegenüber anaeroben Sporenbildnern mit *C.-difficile*-Sporen des Ribotyps R027 als **VAH-Methode 18** veröffentlicht.

Diese Testmethode wurde über das DIN auch in die WG 1 des CEN TC 216 eingebracht und als DIN EN 17126 [1] veröffentlicht.

Entgegen der derzeit oft zur Deklaration herangezogenen Testverfahren wird in diesem Suspensionsversuch unter anderem eine höhere Reduktion der Sporen verlangt. So muss eine Reduktion von 4 lg-Stufen (statt der in den bisher veröffentlichten Prüfverfahren von nur 3 lg-Stufen) dargestellt werden.

Ein praxisnaher 4-Felder-Test – Flächendesinfektion mit Mechanik – zur Überprüfung der Wirksamkeit gegenüber *C.-difficile*-Sporen wurde vom VAH auf Durchführbarkeit und Robustheit überprüft und als **VAH-Methode 19** etabliert. Die Listung sporizid wirksamer Flächendesinfektionsmittel mit Mechanik kann somit gegenüber *C.-difficile*-Sporen erfolgen.

Auf einen entsprechenden Firmenantrag hin werden die Prüfberichte und Gutachten der Produkte von unabhängigen Experten geprüft. Für das Konformitätsbewertungsverfahren sind zwei unabhängige Gutachten einschließlich Prüfberichte inklusive der Daten zur Empfindlichkeitsprüfung der verwendeten Sporensuspension einzureichen, die die Wirksamkeit der beantragten Konzentration-Zeit-Relation bestätigen.

Für die anderen Anwendungsgebiete im medizinischen Bereich, zum Beispiel Instrumentendesinfektion im Eintauchverfahren oder Wäschedesinfektion, fehlen abgestimmte praxisnahe Prüfmethoden. Die Anwender sollten, bis eine Listung sporizider Produkte in diesen Anwendungsgebieten möglich ist, zumindest Untersuchungen im quantitativen Suspensionsversuch entsprechend VAH-Methode 18 bzw. EN 17126 [1] einfordern.

4.2 Wirksamkeitsprüfung gegen Viren

Mit der Listung viruswirksamer Eigenschaften in der VAH-Liste soll dem Anwender die Möglichkeit gegeben werden, auf Desinfektionsmittel zuzugreifen, für die nach dem derzeitigen Stand des Wissens eine begrenzt viruzide, begrenzt viruzid PLUS bzw. viruzide Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch und im Versuch unter praxisnahen Bedingungen (soweit verfügbar) vorliegt.

Auf einen entsprechenden Firmenantrag zur Zertifizierung hin werden die Prüfberichte und Gutachten zur Wirksamkeit der Produkte von unabhängigen Experten geprüft.

Für das Konformitätsbewertungsverfahren sind zwei voneinander unabhängige Gutachten für den jeweiligen Wirkungsbereich einschließlich der Prüfberichte einzureichen, die die Wirksamkeit in der beantragten Konzentration-Zeit-Relation bestätigen.

Die Prüfmethode mit den zugehörigen Testviren, Belastungen und Prüfbedingungen sind bei den jeweiligen Anwendungsbereichen aufgeführt.

Auch bei Prüfungen nach europäischer Norm muss die wirksame Konzentration-Zeit-Relation in einem zweiten unabhängigen Ansatz bestätigt werden. Die Wiederholungsprüfung (zweiter Ansatz) muss zumindest mit der Anwendungskonzentration durchgeführt werden und als Kontrollen die Viruskontrolle, die Prüfung der Zytotoxizität und die Referenzprüfung beinhalten.

Da als Prüfmethode europäische Normen und die entsprechenden DVV-Leitlinien verwendet werden können, muss im Prüfbericht genau angegeben werden, nach welcher Methode die Prüfungen durchgeführt wurden. Für die Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse sind alle Abweichungen von der jeweiligen Methode eindeutig zu beschreiben. Bei Verwendung des Large-Volume-Plating-Verfahrens müssen für alle Prüf- und Kontrollansätze die verwendeten Verdünnungen und Volumina angegeben werden.

Grundvoraussetzung für eine Zertifizierung ist die bakterizide/levurozide Wirksamkeit, die vom VAH im Rahmen eines Konformitätsbewertungsverfahrens bestätigt wurde oder im Rahmen dieses Verfahrens mit bestätigt wird.

Die Einwirkzeit für die Wirksamkeit gegen Viren, die in die VAH-Liste eingetragen wird, kann nicht kürzer sein als die für die bakterizide/levurozide Wirksamkeit. Konzentrationen und Einwirkzeiten sind im Test so zu wählen, dass aus dem Prüfergebnis die Abhängigkeit der Viruswirksamkeit des Desinfektionsmittels von der Konzentration bzw. der Einwirkzeit ersichtlich ist (Kinetik).

Folgende Wirkungsbereiche können eingetragen werden: begrenzt viruzid, begrenzt viruzid PLUS und viruzid [2].

- **Begrenzt viruzid** – wirksam gegen behüllte Viren
- **Begrenzt viruzid PLUS** – wirksam gegen behüllte Viren und Adeno-, Noro- und Rotaviren [2]
- **Viruzid** – wirksam gegen behüllte und unbehüllte Viren.

Wird der Wirkbereich begrenzt viruzid PLUS oder viruzid beantragt, ohne dass eine Listung für den Wirkbereich begrenzt viruzid vorhanden ist, ist die Wirksamkeit gegen behüllte Viren in der Regel zusätzlich nachzuweisen. Das gilt insbesondere, wenn es sich um Produkte handelt, die Wirkstoffe bzw. Wirkprinzipien beinhalten, zu denen wenig Erfahrungen zur Viruswirksamkeit vorliegen[†].

Ein Überblick über die eingesetzten Testviren und die damit abgedeckten Viren wird in **Tabelle 4.1** gegeben.

[†] Auskünfte hierzu erteilt die Geschäftsstelle

Tabelle 4.1: Testviren zur Wirksamkeitsprüfung von Desinfektionsmitteln und ausgewählte Viren, die durch die Testviren abgedeckt sind.

	Testviren	Wirksamkeitsspektrum (beispielhaft) ^{a, b}
Viruzid: Behüllte und unbehüllte Viren	<ul style="list-style-type: none"> - Adenovirus, unbehüllt (Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75) - Murines Norovirus, unbehüllt (MNV, Stamm S99 Berlin) - Poliovirus, unbehüllt (Poliovirus Typ 1, Stamm LSs-2ab) - Polyomavirus SV40, unbehüllt (Simianvirus 40, Stamm 777) 	<p>Papillomaviren</p> <p>Parvoviren^b</p> <ul style="list-style-type: none"> - Parvovirus B19 - Bocaviren <p>Picornaviren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Enteroviren: Coxsackie-, Echo-, Polioviren, Rhinoviren - Hepatovirus: Hepatitis-A-Virus (HAV)^b - Parechoviren: Echovirus 22 und 23 <p>zusätzlich Wirksamkeitsspektrum „begrenzt viruzid“ und „begrenzt viruzid PLUS“</p>
Begrenzt viruzid PLUS: Adeno-, Noro-, Rotavirus	<ul style="list-style-type: none"> - Adenovirus, unbehüllt (Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75) - Murines Norovirus, unbehüllt (MNV, Stamm S99 Berlin) 	<p>Erreger viraler Gastroenteritiden</p> <ul style="list-style-type: none"> - Adenovirus Serotyp 40 und 41 - Norovirus - Rotavirus <p>Erreger respiratorischer Infektionen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Adenovirus Serotyp 7 <p>Erreger der Keratokonjunktivitis</p> <ul style="list-style-type: none"> - Adenovirus Serotyp 8, 19 und 37 <p>zusätzlich Wirksamkeitsspektrum „begrenzt viruzid“</p>
Begrenzt viruzid: Behüllte Viren	<ul style="list-style-type: none"> - BVDV*, behüllt (Bovine Viral Diarrhea Virus) *Surrogatvirus für Hepatitis-C-Virus - Vacciniavirus, behüllt (Stamm Elstree bzw. MVA) 	<p>Erreger blutübertragener Infektionen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hepatitis-B-Virus (HBV) - Hepatitis-C-Virus (HCV) - Humanes-Immundefizienz-Virus (HIV) <p>Erreger respiratorischer Infektionen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Humane Coronaviren (HCoV) 229E und OC43 - Influenzavirus A (z. B. H1N1, H3N2) und B - Metapneumonievirus - Respiratory Syncytial Virus (RSV) <p>Erreger reiseassoziiierter Infektionen</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bunyavirus (Sandfliegen-Fieber) - Denguevirus, Ebolavirus, Gelbfieber-Virus, Hantavirus, Lassavirus, Marburgvirus - Krim-Kongo hämorrhagisches Fieber - FSME-Virus - SARS-CoV-2, MERS-CoV - Tollwutvirus - West-Nil-Virus (West-Nil-Fieber) <p>Herpesviren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cytomegalievirus (CMV) - Herpes-simplex-Viren Typ 1 und 2 (HSV-1, HSV-2) - Epstein-Barr-Virus (EBV) - Varizella-Zoster-Virus (VZV) <p>Paramyxoviren</p> <ul style="list-style-type: none"> - Masernvirus - Mumpsvirus <p>Rötelnvirus (Rubella)</p>
Chemothermische Wäschedesinfektion	<ul style="list-style-type: none"> - Minute Virus of Mice (MVM, Murines Parvovirus), unbehüllt 	<p>Siehe „viruzides“, „begrenzt viruzid PLUS“ und „begrenzt viruzides“ Wirksamkeitsspektrum</p>

Einschränkungen:

a. Diese Klassifizierung kann nur als Orientierung dienen, da eine Wirkstoffabhängigkeit vorliegt und der Effekt nicht immer uneingeschränkt einschätzbar ist.

b. Bei besonders stabilen unbehüllten Viren wie z.B. HAV, Parvoviren oder Genvektoren wie Adenoassoziierte Viren (AAV) sind ggf. zusätzliche Prüfungen mit den entsprechenden Viren erforderlich [2-3]

Im **Anhang V** werden die Anforderungen an die Zertifizierung von viruswirksamen Verfahren detailliert aufgeführt.

Bisher wurden der Anhang V1A „Hygienische Händedesinfektion“, Anhang V2A „Flächendesinfektion“, Anhang V3A „Instrumentendesinfektion“ und Anhang V4A „Wäschedesinfektion“ fertiggestellt.

Literatur

1. DIN EN 17126:2019-02. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der sporiziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1). Deutsche Fassung EN 17126:2018.
2. Eggers M, Rabenau HF, Blümel J, Fickenscher H, Geisel B, Glebe D, Hengel H, Marschang R, Reiche S, Steinmann E, Steinmann J, Schwebke I: Einsatz geeigneter Desinfektionsmittel bei gentechnisch veränderten Viren und viralen Vektoren: Stellungnahme der Kommission für Virusdesinfektion der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e. V. und der Gesellschaft für Virologie (GfV) e. V. *Epid Bull* 2020;35:3–14 | DOI 10.25646/7030
3. Schwebke I, Eggers M, Gebel J, Geisel B, Glebe D, Rapp I, Steinmann J, Rabenau HF Prüfung und Deklaration der Wirksamkeit von Desinfektionsmitteln gegen Viren zur Anwendung im humanmedizinischen Bereich. Stellungnahme des Arbeitskreises Viruzidie beim Robert Koch-Institut (RKI), des Fachausschusses Virusdesinfektion der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und der Gesellschaft für Virologie (GfV) e.V. sowie der Desinfektionsmittelkommission des Verbundes für Angewandte Hygiene (VAH) e.V. *Bundesgesundheitsbl* 2017;60:353–363 DOI 10.1007/s00103-016-2509-2
4. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin (Fassung vom 15. Juni 2005). *Bundesgesundheitsblatt* 2005;48:1420–1426.
5. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin – Fassung vom 1. August 2008. *Bundesgesundheitsblatt* 2008;51:937–945.
6. DVV. Quantitative Prüfung der viruziden Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel auf nicht-porösen Oberflächen (Anwendung im Bereich Humanmedizin). *HygMed* 2012;37(3):78–85.
7. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin – Fassung vom 1. Dezember 2014. *Bundesgesundheitsblatt* 2015;58:493-504.
8. DVV/GfV, RKI. Mitteilung des Fachausschusses Virusdesinfektion der DVV/GfV und des RKI zur Untersuchungstemperatur bei der Prüfung von chemischen bzw. chemothermischen Instrumentendesinfektionsverfahren entsprechend der DVV/RKI-Leitlinie in der Fassung vom 01.12.2014. *Bundesgesundheitsbl* 2015;58(8):888.
9. DIN EN 14476:2019-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1); Deutsche Fassung EN 14476:2013+A2: 2019.
10. DIN EN 16777:2019-03. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Versuch auf nicht porösen Oberflächen ohne mechanische Einwirkung zur Bestimmung der viruziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2); Deutsche Fassung EN 16777:2018.
11. DIN EN 17111:2018. Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der viruziden Wirkung für Instrumente im humanmedizinischen Bereich - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2); Deutsche Fassung EN 17111:2018.

Produktprüflösung

5

Die Produktprüflösungen werden als Verdünnungen der Produktkonzentrate je nach Test unmittelbar vor der Prüfung mit Wasser standardisierter Härte (*WSH* → *Anhang A1.2*) und bei gebrauchsfertigen Produktprüflösungen mit destilliertem/demineralisiertem Wasser (→ *Anhang A1.1*) angesetzt. Jedes Konzentrat ist vor der Verwendung und vor der Herstellung der Prüfkonzentrationen zu schütteln.

Bei flüssigen Desinfektionsmitteln erfolgt die Konzentrationsangabe in Milliliter (ml) des Desinfektionsmittels in 100 ml Gesamtvolumen (Volumenprozent), bei Trockensubstanzen oder Pasten in Anzahl Gramm (g) in 100 ml Gesamtvolumen. Bei Trockensubstanzen oder Pasten werden mind. $1 \text{ g} \pm 10 \text{ mg}$ in einem Messkolben eingewogen und mit Wasser aufgefüllt. Die Prozentangaben beziehen sich auf das konzentrierte Produkt und nicht auf seinen Wirkstoffgehalt. Bei Wasch- oder Desinfektionsmitteln, bei denen die Wirkstoffe im Prozess gebildet werden, sind mindestens Ansätze von 1 l herzustellen.

Für die Überprüfung chemothermischer Waschverfahren verfährt man wie folgt: Von dem Waschmittel wird eine Lösung von 1 l in der zu testenden Konzentration hergestellt. 100 ml der Waschmittellösung werden im Wasserbad auf die Verfahrenstemperatur erhitzt. Dabei ist ein Referenzgefäß zur Temperaturmessung mitzuführen. Nach Erreichen der Verfahrenstemperatur wird das Desinfektionsmittel in der zu prüfenden Konzentration zugefügt. Entsteht das Desinfektionsmittel erst im Waschverfahren aus dem Desinfektionswaschmittel, wird ein Liter Lösung in der zu testenden Konzentration hergestellt. Diese Lösung wird der Verfahrenstemperatur in einem Wasserbad ausgesetzt, bis die Verfahrenstemperatur erreicht ist, um so die desinfizierende Komponente herzustellen. Diese Lösung wird danach sofort auf 20 °C abgekühlt.

Der Hersteller hat Vorschriften zur Herstellung der Prüfkonzentrationen detailliert anzugeben. Dies gilt besonders für die Möglichkeit, Produktprüflösungen aus Stammlösungen herzustellen (z. B. bei pulverförmigen Produkten). Dabei sind insbesondere Temperatur und Aufbewahrungszeit zu beachten.

Für die Festlegung der Wirksamkeitsgrenzen sind folgende Prüfkonzentrationen (%) aus Gründen der Vergleichbarkeit zu beachten; weitere Prüfkonzentrationen sind ggf. zur Abklärung bzw. Definition der Wirksamkeit bestimmter Produkte oder Verfahren erforderlich (**Tabelle 5.1**):

Tabelle 5.1: Prüfkonzentrationen (%) zur Abklärung bzw. Definition der Wirksamkeit.

100 % ¹	7,5 %	1,00 %	0,0125 %
75 %	5,0 %	0,75 %	0,00625 %
50 %	4,0 %	0,50 %	0,003125 %
25 %	3,0 %	0,10 %	(usw. in geometrischer Reihe)
15 %	2,0 %	0,05 %	
10 %	1,5 %	0,025 %	

¹Für gebrauchsfertige („ready-to-use“) Produkte ist die maximale Prüfkonzentration im quantitativen Suspensionstest (Phase 2/Stufe 2) 97 %.

Anmerkung: Die 100 % beziehen sich auf das konzentrierte Produkt. Alle anderen Konzentrationen beziehen sich auf die Prüfkonzentration im Test. Das bedeutet, dass vor der Verdünnung in Abhängigkeit von den Testbedingungen gegebenenfalls ein Faktor einkalkuliert werden muss.

Diese Auflistung bedeutet jedoch nicht, dass prinzipiell aufeinanderfolgende Konzentrationen zu testen sind. Vielmehr sind je nach Produkt die zu prüfenden Konzentrationen so auszuwählen, dass der Grenzbereich der Wirksamkeit mit nachweisbaren KBE erfasst wird. Dabei sollten in den Suspensionsversuchen beim resistantesten Mikroorganismus mindestens 3 Konzentrationen getestet werden, wovon eine im unwirksamen und mindestens eine im wirksamen Bereich liegt. Die beantragte Konzentration sollte in der Mitte liegen. Sofern die beantragte Konzentration unter 10 % liegt, dürfen die beiden anderen Konzentrationen nicht um mehr als den Faktor 3 darüber bzw. darunter liegen. Bei Konzentrationen ab 10 % darf der Faktor 2 nicht überschritten werden.

Bei bestimmten Substanzklassen (z. B. Jodophor, hohe Alkoholkonzentration) oder neuen Substanzklassen kann es in quantitativen Suspensionsversuchen trotz Wirksamkeit in geringen Konzentrationen erforderlich sein, auch das Konzentrat zu prüfen. Bei bestimmten Verfahren wird als Minimalforderung eine definierte Verminderung der KBE durch ausgewählte Konzentrationen des Produktes gefordert, weshalb diese Konzentrationen in die Tests einzubeziehen sind.

Im Prüfbericht werden die Prüfkonzentrationen als Volumen- oder als Massenkonzentrationen und ggf. Besonderheiten der Herstellung angegeben.

Testorganismen

6

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	(DSM 799)
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 6057	(DSM 2146)
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541	(DSM 3320)
<i>Escherichia coli</i> K12	NCTC 10538	(DSM 11250)
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 14153	(DSM 788)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	(DSM 939)
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	(DSM 1386)
<i>Mycobacterium terrae</i>	ATCC 15755	(DSM 43227)
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 15769	(DSM 44157)
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (früher <i>A. niger</i>)	ATCC 16404	(DSM 1988)

Von den für die Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika verwendeten Testorganismen werden Stammkulturen angelegt, aus denen die jeweiligen Gebrauchskulturen und daraus die Prüfsuspensionen herzustellen sind.

Die bei den jeweiligen Tests auszuwählenden Testorganismen sind dort genannt.

6.1 Herstellung der Stammkulturen

Die Herstellung der Stammkulturen der Testorganismen entspricht DIN EN 12353 „Haltung von Bakterien- und Pilzstämmen, die zur Prüfung der bakteriziden, levuroziden und fungiziden Wirksamkeit eingesetzt werden“ [1]. Stammkultur ist im Folgenden die bei -70 °C tiefgefrorene Kultur. In der DIN EN 12353 wird allerdings mit Stammkultur, die hier später als Anreicherungskultur beschriebene im Kühlschrank aufbewahrte Kultur bezeichnet.

6.1.1 Bakterien (außer Mykobakterien)

Die gefriergetrocknete Probe des Bakterienstammes wird nach den mit der Probe gelieferten Empfehlungen von der Stammsammlung in CSB (Boullionkultur) suspendiert. Aus der Suspension wird direkt ein Ausstrich auf CSA durchgeführt mit dem Ziel, Einzelkolonien darzustellen.

Die Oberflächenkulturen werden 18 h bis 24 h bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubiert. Nach der Inkubation wird die Oberflächenkultur verwendet, um die Reinheit des Stammes zu überprüfen (→ Kapitel 6.1.5). Parallel werden die Stammkulturen angelegt:

Die Oberfläche einer CSA-Platte wird mit 0,1 ml der Bouillonkultur gleichmäßig beimpft. Die Oberflächenkultur wird 18 h bis 24 h bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubiert.

Auf die Oberfläche der CSA-Kultur werden 10 ml (ggf. 2 x 5 ml) der Schutzlösung für das Einfrieren (→ Anhang A1.4.11) gegeben und die Zellen mit einem Spatel in der Schutzlösung suspendiert. Die Zellsuspension wird von der Agaroberfläche abgesaugt.

Je 1 ml der Zellsuspension wird in ein Glas- oder Keramikperlen enthaltendes Kryoröhrchen pipettiert. Das Röhrchen wird geschüttelt, um die Zellsuspension auf den Perlen zu verteilen. Diesen Ansatz lässt man 30 min bei $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ruhen. Die überstehende Schutzlösung wird mit einer Pipette abgesaugt.

Die Kryoröhrchen werden bei einer Temperatur von -70 °C oder kälter nicht länger als 14 Monate aufbewahrt.

Andere Möglichkeiten der Aliquotierung sind zulässig.

6.1.2 Hefen

Die Verfahrensweise zur Herstellung einer Hefe-Stammkultur entspricht der für Bakterien (→ Kapitel 6.1.1). Jedoch wird anstelle von CSA und CSB als Nährmedium MEA und MEB verwendet. Die Kulturen werden 42 h bis 48 h bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubiert.

Andere Möglichkeiten der Aliquotierung sind zulässig.

6.1.3 Schimmelpilze

Die gefriergetrocknete Probe des Pilzstammes wird nach den mit der Probe gelieferten Empfehlungen in MEB suspendiert. Zwei Proben der Suspension werden für *A. brasiliensis* (→ Anhang A1.4.7) auf MEA B überimpft. Die Kulturen werden 7 bis 9 Tage bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubiert. Nach der Inkubation wird eine der Oberflächenkulturen verwendet, um die Reinheit des Stammes nachzuweisen (→ Kapitel 6.1.6). Parallel werden die Stammkulturen angelegt.

Auf die Oberfläche der anderen MEA-Kultur werden 10 ml Wasser (→ Anhang A1.1) gegeben, die Konidien mit einem Spatel abgelöst und in die Lösung verbracht. Die Suspension wird in einen Erlenmeyerkolben überführt und 1 min vorsichtig mit Glas- oder Keramikperlen (\varnothing 3–4 mm) geschüttelt (ca. 10 Perlen je 10 ml Suspension). Die Suspension wird durch Glaswolle filtriert und danach in Zentrifugenröhrchen aus Glas überführt. Die filtrierte Suspension wird 20 min bei 2000 g_N zentrifugiert. Die Konidien werden danach in der Schutzlösung eingefroren (→ Anhang A1.4.11).

Je 1 ml der Konidien suspension wird in ein Glas- oder Keramikperlen enthaltendes Kryoröhrchen pipettiert. Das Röhrchen wird geschüttelt, um die Zellsuspension auf

den Perlen zu verteilen. Diesen Ansatz lässt man 30 min bei $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ruhen. Die überstehende Schutzlösung wird mit einer Pipette abgesaugt. Die Kryoröhrchen werden bei einer Temperatur von $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ oder kälter nicht länger als 14 Monate aufbewahrt.

Andere Möglichkeiten der Aliquotierung sind zulässig.

6.1.4 Mykobakterien

Die gefriergetrocknete Probe der Mykobakterien wird nach den mit der Probe gelieferten Empfehlungen in 10 ml Schutzlösung (\Rightarrow *Anhang A1.4.11*) suspendiert. Zwei Proben der Suspension werden auf 7H10-Agar ausgestrichen, mit dem Ziel, Einzelkolonien darzustellen.

Nach der Inkubationszeit von 21 Tagen bei $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ wird eine dieser Oberflächenkulturen verwendet, um die Reinheit des Stammes zu überprüfen (\Rightarrow *Kapitel 6.1.5*). Zum Schutz vor Austrocknung ist die Petrischale abzukleben bzw. in einen Polyethylen-Beutel zu verpacken. Parallel wird mit der zweiten Oberflächenkultur die Stammkultur hergestellt.

Auf die Oberfläche der 7H10-Kultur werden 10 ml (ggf. $2 \times 5 \text{ ml}$) der Schutzlösung für das Einfrieren (\Rightarrow *Anhang A1.4.11*) gegeben und die Zellen mit einem Spatel in der Schutzlösung suspendiert. Die Zellsuspension wird von der Agaroberfläche abgesaugt.

Je 1 ml der Suspension wird in ein Glas- oder Keramikperlen enthaltendes Kryoröhrchen pipettiert. Das Röhrchen wird geschüttelt, um die Zellsuspension auf den Perlen zu verteilen. Diesen Ansatz lässt man 30 min bei $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ruhen. Die überstehende Schutzlösung wird mit einer Pipette abgesaugt. Die Kryoröhrchen werden bei einer Temperatur von $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ oder kälter nicht länger als 14 Monate aufbewahrt.

Andere Möglichkeiten der Aliquotierung sind zulässig.

6.1.5 Nachweis der Reinheit der Stämme

Der Nachweis der Reinheit des Stammes erfolgt bei der Herstellung der Stammkultur, nach einer Woche Gefrierzeit sowie in regelmäßigen Abständen während der Aufbewahrung des Stammes. Die Reinheit ist durch Isolierung auf einer oder mehreren Petrischalen mit einem geeigneten Nährmedium und ggf. durch mikroskopische Untersuchung nach Gram-Färbung oder einer anderen Färbung nachzuweisen.

Bei Zweifel ist die Identität des Stammes nach aktuell anerkannten Identifizierungsverfahren nachzuweisen.

Für jeden Bakterien- und/oder Pilzstamm sind die folgenden Angaben im Laborjournal festzuhalten:

- Herkunft
- Herstellungsdatum des Lyophilisats, sofern verfügbar
- Datum und Methode der Rekonstitution des Lyophilisats
- Datum und Temperatur der Stammeinlagerung.

6.2 Herstellung der Gebrauchskulturen und Anreicherungskulturen

Im Folgenden wird die Herstellung der Gebrauchskultur für den Ansatz mit Perlen beschrieben. Alternativ kann auch entsprechend der DIN EN 12353 [1] ein Verfahren in Suspension gewählt werden. Der Begriff Anreicherungskultur entspricht dem Begriff „stock culture“ bzw. „Stammkultur“ in der DIN EN 12353 [1].

6.2.1 Bakterien (außer Mykobakterien)

Um die Gebrauchskultur der Bakterien herzustellen, werden aus der Stammkultur in Kryoröhrchen einzelne Perlen mit einem Draht oder einer Pinzette entnommen und durch Ausstreichen auf CSA zwei Kulturen angelegt (1. Subkultur): Eine dient der Anreicherung, mit der anderen soll durch die Darstellung von Einzelkolonien die Reinheit des Stammes nachgewiesen werden. Beide Subkulturen werden bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubiert.

Nach 18 h bis 24 h Inkubation wird von der Anreicherungskultur eine zweite Subkultur angelegt. Falls dies an diesem Tag nicht möglich ist, darf eine 48-h-Subkultur für die weitere Überimpfung verwendet werden, vorausgesetzt, dass diese Subkultur während der 48 Stunden im Brutschrank verblieb. Unter diesen Umständen ist eine weitere 24-h-Subkultur herzustellen, bevor das Verfahren fortgesetzt wird.

Die zweite und/oder dritte Subkultur ist die Gebrauchskultur. Eine vierte Subkultur ist nur für die praxisnahen Versuche mit *E. coli* bei der hygienischen Händewaschung und Händedesinfektion gestattet.

6.2.2 Hefen

Um die Gebrauchskultur der Hefen herzustellen, werden aus der Stammkultur in Kryogefäßen einzelne Perlen mit einem Draht oder einer Pinzette entnommen und durch Ausstreichen auf MEA zwei Subkulturen angelegt (1. Subkultur): Eine dient der Anreicherung, mit der anderen soll durch die Darstellung von Einzelkolonien die Reinheit des Stammes nachgewiesen werden. Beide Subkulturen werden bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubiert.

Nach 42 h bis 48 h Inkubation wird von der Anreicherungskultur eine zweite Subkultur angelegt. Falls dies an diesem Tag nicht möglich ist, darf eine 72-h-Subkultur für die weitere Überimpfung verwendet werden, vorausgesetzt, dass diese Subkultur während der 72 h im Brutschrank verblieb. Unter diesen Umständen ist eine weitere 48-h-Subkultur herzustellen, bevor das Verfahren fortgesetzt wird.

Die zweite und/oder dritte Subkultur ist die Gebrauchskultur. Eine vierte Subkultur ist nicht gestattet.

6.2.3 Schimmelpilze

Um die Gebrauchskultur der Schimmelpilze herzustellen, werden aus der Stammkultur in Kryogefäßen einzelne Perlen mit einem Draht oder einer Pinzette entnommen und in 1 ml MEB suspendiert. Aus dieser Suspension werden durch Beimpfen auf MEA B in Petrischalen oder belüfteten Zellkulturflaschen zwei Subkulturen angelegt (1. Subkultur): Eine dient der Anreicherung, mit der anderen soll durch die Darstellung von Einzelkolonien die Reinheit des Stammes nachgewiesen werden. Beide Subkulturen werden bei $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Nach 7 bis 9 Tagen Inkubation wird von der Anreicherungskultur eine zweite Subkultur angelegt. Die erste und/oder zweite Subkultur ist die Gebrauchskultur. Eine dritte Subkultur ist nicht gestattet.

6.2.4 Mykobakterien

Um die Gebrauchskultur der Mykobakterien herzustellen, werden aus der Stammkultur in Kryogefäßen einzelne Perlen mit einem Draht oder einer Pinzette entnommen und in 1 ml Wasser (\Rightarrow Anhang A1.1) suspendiert. Aus dieser Suspension werden durch Ausstreichen auf 7H10 zwei Subkulturen angelegt (1. Subkultur): Eine dient der Anreicherung, mit der anderen soll durch die Darstellung von Einzelkolonien die Reinheit des Stammes nachgewiesen werden. Beide Subkulturen werden bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Zum Schutz vor Austrocknung sind die Petrischalen abzukleben bzw. in Polyethylen-Beuteln zu verpacken.

Nach 21 Tagen wird von der Anreicherungskultur eine zweite Subkultur angelegt. Die erste und/oder zweite Subkultur ist die Gebrauchskultur. Eine dritte Subkultur ist nicht gestattet.

6.2.5 Aufbewahrung der Anreicherungskultur (1. Subkultur)

Die Anreicherungskultur für die Gebrauchskultur ist nicht länger als 9 Wochen (*P. aeruginosa* 6 Wochen) bei $2-8^{\circ}\text{C}$ aufzubewahren.

6.3 Herstellung der Prüfsuspensionen

6.3.1 Bakterien (außer Mykobakterien) und Hefen

Der Bakterien- oder Heferasen der Gebrauchskultur wird mit je 10 ml Verdünnungsmittel (\Rightarrow Anhang A1.3.1) pro Petrischale abgeschwemmt und unter Verwendung von 5–10 g Glasperlen (\varnothing 3–4 mm) im Verdünnungsmittel 3 min mechanisch suspendiert. Größere Partikel werden mittels Sedimentation oder Filtration durch Glaswolle entfernt.

Die Anzahl der KBE in der Prüfsuspension wird bei den qualitativen und quanti-

tativen Suspensionsversuchen und bei den quantitativen praxisnahen Versuchen zur Flächen- und Instrumentendesinfektion mit dem Verdünnungsmittel unter Verwendung einer geeigneten Methode auf $1,5\text{--}5,0 \times 10^8$ pro ml ($1,5\text{--}5,0 \times 10^9$ pro ml bei Konzentraten bzw. bei den Prüfmethoden 14.1, 14.2, 15, 16 und 17) und bei *C. albicans* auf $1,5\text{--}5,0 \times 10^7$ pro ml ($1,5\text{--}5,0 \times 10^8$ pro ml bei Konzentraten bzw. bei den Prüfmethoden 14.2 und 15) eingestellt, wenn nicht für besondere Fragestellungen Anderes gefordert ist.

Diese Suspension ist bei $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden.

6.3.2 Schimmelpilze

Die von der Nähragaroberfläche mit Hilfe eines Spatels gelösten Konidien werden in 10 ml Verdünnungsmittel (► *Anhang A1.3.1*) suspendiert. Diese Suspension wird unter Verwendung von 5–10 g Glasperlen (\varnothing 3–4 mm) in einem 100 ml Glaskolben 1 min leicht geschüttelt und anschließend durch eine Glasfilterfritte filtriert.

Mittels mikroskopischem Nachweis bei 400facher Vergrößerung sollte unmittelbar nach Herstellung der Prüfsuspension bzw. sofern eine Suspension länger als 4 h verwendet wird kurz vor dem Test, das Vorhandensein einer hohen Anzahl charakteristischer reifer Sporen (= spiny spores; „stachelige“ Sporen versus glatte Sporen) sowie das Nichtvorhandensein von Myzelfragmenten und einer Sporenauskeimung sichergestellt werden. In keinem von mindestens zehn Zählfeldern dürfen diese Formen zu sehen sein.

Eine Suspension mit einer hohen Konzentration an unreifen, glatten Sporen bzw. ausgekeimten Sporen darf nicht verwendet werden.

Falls Myzelien gefunden werden, wird die filtrierte Suspension bei ca. 2000 g_N für 20 min zentrifugiert, dekantiert und resuspendiert, um die Myzelien mit dem Verdünnungsmittel herauszuwaschen. Dieser Vorgang wird so lange wiederholt, bis keine Myzelien mehr vorhanden sind, jedoch mindestens zweimal.

Die Anzahl der Sporen in der Prüfsuspension wird bei den qualitativen und quantitativen Suspensionsversuchen unter Verwendung einer geeigneten Methode auf $1,5\text{--}5,0 \times 10^7$ pro ml ($1,5\text{--}5,0 \times 10^8$ pro ml bei Konzentraten bzw. bei den Prüfmethoden **14.2** und **15**) eingestellt. Die Prüfsuspension kann (bei 2 °C bis 8 °C gelagert) 2 Tage lang verwendet werden.

Vor dem Gebrauch sollte die Prüfsuspension geschüttelt werden, um die Sporen wieder in eine homogene Suspension zu bringen.

6.3.3 Mykobakterien

Der Bakterienrasen der Gebrauchskultur wird mit 2×10 ml Wasser (→ *Anhang A1.1*) abgeschwemmt und durch dreimaliges Zentrifugieren für 15 min bei ca. $2000 g_N$ und Wiederaufnehmen des Pellets in Wasser (→ *Anhang A1.1*) gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wird das Sediment in max. 5 ml Wasser (→ *Anhang A1.1*) aufgenommen und in einem Glashomogenisator unter Eiskühlung während 15 min bei 1500 U/min homogenisiert (eine vergleichbare, ergebnisbezogen validierte Methode der Homogenisierung ist gestattet). Die Anzahl der KBE im Homogenisat wird bei den qualitativen und quantitativen Suspensionsversuchen mit einer geeigneten Methode auf $1,5-5,0 \times 10^8$ pro ml (bei Konzentraten bzw. bei den Prüfmethode **14.2** und **15** auf $1,5-5,0 \times 10^9$ pro ml) eingestellt.

Diese Suspension kann z. B. in 2 ml-Portionen aufgeteilt und (bei 2°C bis 8°C gelagert) bis zu 5 Tage verwendet werden. Vor dem Gebrauch sollte die Prüfsuspension geschüttelt werden, um die Mykobakterien wieder in eine homogene Lösung zu bringen.

6.4 Bestimmung der Ausgangskoloniezahl der Prüfsuspensionen

Die eingestellten Prüfsuspensionen (qualitative und quantitative Suspensionsversuche ohne organische Belastung – praxisnahe Versuche ggf. mit organischer Belastung) werden mit dem Verdünnungsmittel so verdünnt, dass Suspensionen von 10^2 bis 10^3 KBE pro ml resultieren. Die Suspension wird mit dem Schüttelgerät homogenisiert. Je 0,1 ml der verdünnten Suspension wird entnommen und nach dem Oberflächenverfahren ausgespatelt.

Die beimpften Nährmedien werden bei $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (*C. albicans*, *A. brasiliensis*: $30^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) für 42 h bis 48 h (*A. brasiliensis*: 7 bis 9 Tage; *M. terrae*: 21 Tage) inkubiert. Zum Schutz vor Austrocknung sind die 7H10-Nährböden abzukleben bzw. in Polyethylen-Beuteln zu verpacken.

Die Anzahl der KBE auf jedem Nährboden wird ausgezählt und protokolliert. Es sind Zählwerte zu bevorzugen, die Werte zwischen 14 und 330 KBE/Platte aufweisen.

Literatur

1. DIN EN 12353:2013-04. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Aufbewahrung von Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, spoziziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung.



Bestimmung der bakteriostatischen und levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel

(Methode 7)

Die Suche nach einem geeigneten Neutralisationsmittel ist Voraussetzung für alle weiteren Versuche. Orientierend ist hier eine Methode zum Screening geeigneter Neutralisationsmittel aufgeführt.

Ausschlaggebend für die Beurteilung sind jedoch die jeweiligen Neutralisations- und Toxizitäts-Kontrollen der betreffenden quantitativen Suspensionsversuche und praxisnahen Tests. Findet sich in diesen Kontrollen kein geeignetes Neutralisationsmittel, sind andere Verfahren wie z. B. die Membranfiltration zu verwenden. In diesem Fall ist jedoch das Verfahren so zu validieren, dass eine falsch negative Befundung (Wachstumshemmung aufgrund unzureichender Neutralisation) ausgeschlossen werden kann. Es wird darauf hingewiesen, dass eine Membranfiltration mit Wasser als alleiniger Spülflüssigkeit nicht ausreichend neutralisiert.

7.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	(DSM 799)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Enterococcus faecium</i> *	ATCC 6057	(DSM 2146)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541	(DSM 3320)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Escherichia coli</i> K12	NCTC 10538	(DSM 11250)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 14153	(DSM 788)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	(DSM 939)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	(DSM 1386)	1,5–5 x 10 ⁷ KBE/ml

* nur bei chemothermischen Verfahren

Die Eignung der Neutralisationsmittel für folgende Testorganismen kann nur im jeweiligen quantitativen Test validiert werden:

<i>Mycobacterium terrae</i>	ATCC 15755	(DSM 43227)	1,5–5 x 10 ⁷ KBE/ml
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 15769	(DSM 44157)	1,5–5 x 10 ⁷ KBE/ml
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (früher <i>A. niger</i>)	ATCC 16404	(DSM 1988)	1,5–5 x 10 ⁷ KBE/ml

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sowie der Prüfsuspensionen sind in **➔ Kapitel 6** beschrieben.

7.2 Produktprüflösung

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in **➔ Kapitel 5** beschrieben.

➔ siehe Schema **D1**, Anhang D

7.3 Methodik

In Reagenzröhrchen werden je 5 ml der doppelt konzentrierten Produktprüflösung mit 5 ml doppelt konzentrierter CSB (*C. albicans*: MEB) bzw. CSB + Neutralisationsmittel (*C. albicans* MEB + Neutralisationsmittel) (**➔ Anhang A1.7**) vermischt. (Im Prüfbericht sind die entsprechenden Endkonzentrationen des Prüfproduktes anzugeben.)

Zur Bestimmung der bakterio- und levurostatischen Wirksamkeit werden die Röhrchen durch Zugabe von 0,1 ml einer 1:10 mit CSB verdünnten Prüfsuspension der Testorganismen beimpft. Zur Prüfung der levurostatischen Wirksamkeit werden je 0,1 ml einer unverdünnten Prüfsuspension von *C. albicans* verwendet.

7.4 Inkubation

Die Auswertung erfolgt nach 48 h Inkubation bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (*C. albicans*: 72 h bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$).

7.5 Auswertung

Der Vergleich der Hemmtiter in den Testreihen ohne und mit Zusatz von Neutralisationsmittel gibt Auskunft über deren Wirksamkeit.

Als Maß der vermehrungshemmenden Wirksamkeit (Hemmkonzentration) gilt die höchste Verdünnung der Produktprüflösung in CSB (*C. albicans* MEB) bzw. CSB + Neutralisationsmittel (*C. albicans* MEB + Neutralisationsmittel), die das Wachstum der Testorganismen nach 48 h (*C. albicans* 72 h) Inkubation so unterdrückt, dass es nicht zur Trübung der Suspension führt (+ bedeutet Wachstum der Mikroorganismen; – bedeutet kein Wachstum der Mikroorganismen).

Als Maß für die beste Neutralisation gilt die niedrigste Verdünnung der Produktprüflösung (höchste Produktkonzentration) in CSB (*C. albicans* MEB) + Neutralisationsmittel, die das Wachstum der Testorganismen nach 48 h (*C. albicans* 72 h) Inkubation so unterstützt/ermöglicht, dass es zur Trübung der Suspension führt (+ bedeutet Wachstum der Mikroorganismen; – bedeutet kein Wachstum der Mikroorganismen).

Die Resultate der Bestimmung der bakterio- bzw. levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel sind im Prüfbericht vollständig tabellarisch inkl.

der Inkubationstemperatur, des KBE-Gehaltes pro ml der Prüfsuspensionen usw. anzugeben.

7A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Dieser Versuch dient der Auswahl geeigneter Neutralisationsmittel für die weiterführenden Untersuchungen. Die Ergebnisse müssen eine Differenzierung zwischen Wachstum (+) und Hemmung (-) in den zur Auswahl des Neutralisationsmittels gewählten Ansätzen ermöglichen.

Das Neutralisationsmittel, das bei der geringsten Verdünnung der Produktprüflösung noch ein Wachstum (Trübung) zeigt, sollte bevorzugt in allen folgenden Tests (In-vitro-Tests und Tests unter praxisnahen Bedingungen) verwendet werden und ist in deren Neutralisations- und Toxizitätskontrollen jeweils zu bestätigen.

8

Bestimmung der bakteriziden und levuroziden Wirksamkeit im qualitativen Suspensionsversuch

(Methode 8)

Diese Untersuchungen sind geeignet, eine mögliche größere Toleranz von *P. mirabilis* und *E. coli* im Vergleich zu dem im quantitativen Suspensionsversuch geforderten Gram-negativen Testorganismus *P. aeruginosa* darzustellen. Darüber hinaus haben sie jedoch keine Bedeutung bei der Bewertung der Wirksamkeit des geprüften Desinfektionsverfahrens. Diese Methode kann außerdem der Arbeitserleichterung bei der Ermittlung des wirksamen Konzentrationsbereiches dienen. Auf die Validierung der Neutralisation kann wegen der eingeschränkten Aussagekraft des qualitativen Suspensionsversuches verzichtet werden. Werden *P. mirabilis* und *E. coli* im quantitativen Suspensionstest geprüft, kann der qualitative Suspensionstest entfallen.

8.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen

Obligat:

<i>Escherichia coli</i> K12	NCTC 10538	(DSM 11250)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 14153	(DSM 788)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	(DSM 939)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml

Optional:

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	(DSM 799)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 6057	(DSM 2146)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541	(DSM 3320)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	(DSM 1386)	1,5–5 x 10 ⁷ KBE/ml

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sowie der Prüfsuspensionen sind in ➔ Kapitel 6 beschrieben.

8.2 Produktprüflösung

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in ➔ Kapitel 5 beschrieben.

➔ siehe Schema D2, Anhang D

➔ zur Bestimmung des Neutralisationsmittels, siehe Kapitel 7

8.3 Methodik

0,1 ml der Prüfsuspension werden mit 10 ml der jeweiligen Verdünnung der Produktprüflösung gut gemischt. Parallel wird ein Test mit WSH anstelle der Produktprüflösung mitgeführt. Nach den erforderlichen Einwirkzeiten wird das Prüfprodukt-Prüfsuspensionsgemisch erneut gründlich gemischt, jeweils 0,1 ml werden entnommen und in 10 ml CSB (*C. albicans*: MEB) (mit dem in ➔ Kapitel 7 bestimmten Neutralisationsmittel) überführt.

8.4 Inkubation

Die Subkulturen werden 48 h bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (*C. albicans*: 72 h bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) inkubiert.

8.5 Auswertung

Anhand der Trübung der Bouillon-Kulturen kann vorhandenes Wachstum festgestellt werden (+ bedeutet Wachstum der Mikroorganismen; – bedeutet kein Wachstum der Mikroorganismen).

Die Erfassung der wirksamen bzw. unwirksamen Konzentrations-Einwirkzeit-Relationen ist für alle Testorganismen erforderlich. Die Resultate des qualitativen Suspensionsversuchs sind im Prüfbericht vollständig tabellarisch inkl. der Prüftemperatur und des KBE-Gehaltes pro ml der Prüfsuspensionen etc. anzugeben.

8.6 Prüfbedingungen

Die Prüfbedingungen sind in **Tabelle 8.1** und **8.2** zusammengefasst. Stellt sich in diesem Test *E. coli* oder *P. mirabilis* resistenter als *P. aeruginosa* dar, ist im quantitativen Suspensionsversuch dieser Testorganismus neben *P. aeruginosa* mit zu prüfen.

Tabelle 8.1: Prüfbedingungen im qualitativen Suspensionsversuch.

Anwendungsverfahren	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten ⁴
Hygienische Händewaschung	50% ²	20 ± 1	15 s, 30 s, 1 min
Hygienische Händedesinfektion (Einreibeverfahren)	Konzentrat	20 ± 1	15 s, 30 s, 1 min
Chirurgische Händedesinfektion (Einreibeverfahren)	Konzentrat	20 ± 1	30 s, 1 min, 1,5 min, 3 min, 5 min
Hautantiseptik	Konzentrat	20 ± 1	15 s, 30 s, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min
Flächendesinfektion	Gebrauchsverdünnungen ³	20 ± 1	1 min ⁵ , 5 min, 15 min, 30 min, 60 min
Chemische Instrumentendesinfektion (manuelles Eintauchverfahren)	Gebrauchsverdünnungen ³	20 ± 1	1 min ⁵ , 5 min, 15 min, 30 min, 60 min
Maschinelle chemothermische Instrumentendesinfektion	Gebrauchsverdünnungen ³	≥ 20 bis ≤ 60 ± 1	1 min ⁵ , 5 min, 15 min, 30 min, 60 min
Chemische Wäschedesinfektion (manuelles Einlegeverfahren)	Gebrauchsverdünnungen ³	13 ± 2	4 h, 6 h, 12 h
Maschinelle chemothermische Wäschedesinfektion	Mischungen des Wasch- und Desinfektionsmittelzusatzes in den Gebrauchsrelationen	30 bis 70 ± 1 entsprechend den Temperaturen im Waschverfahren	5 min, 10 min, 15 min, 20 min

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (siehe **Kapitel 5**). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Bei Produkten mit Wasserzugabe während des Verfahrens.

³ Konzentrat bei unverdünnt anzuwendenden Produkten.

⁴ Es müssen mindestens 3 Einwirkzeiten getestet werden, wobei die empfohlene Einwirkzeit die mittlere Zeit sein sollte.

⁵ Falls 5 min als beantragte Einwirkzeit vorgesehen ist, muss 1 min ebenfalls getestet werden.

Tabelle 8.2: Wirkungsspektrum im qualitativen Suspensionsversuch.

Anwendungsverfahren	Bakterizide Wirksamkeit	Levurozide Wirksamkeit
Hygienische Händewaschung	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 <i>P. mirabilis</i> <i>S. aureus</i> * <i>E. hirae</i> *	<i>C. albicans</i> *
Hygienische Händedesinfektion	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 <i>P. mirabilis</i> <i>S. aureus</i> * <i>E. hirae</i> *	<i>C. albicans</i> *
Chirurgische Händedesinfektion	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 <i>P. mirabilis</i> <i>S. aureus</i> * <i>E. hirae</i> *	<i>C. albicans</i> *
Hautantiseptik	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 <i>P. mirabilis</i> <i>S. aureus</i> * <i>E. hirae</i> *	<i>C. albicans</i> *
Flächendesinfektion	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 <i>P. mirabilis</i> <i>S. aureus</i> * <i>E. hirae</i> *	<i>C. albicans</i> *
Chemische Instrumentendesinfektion (manuelles Eintauchverfahren)	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 <i>P. mirabilis</i> <i>S. aureus</i> * <i>E. hirae</i> * <i>E. faecium</i> *	<i>C. albicans</i> *
Maschinelle chemothermische Instrumentendesinfektion	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 <i>P. mirabilis</i> <i>S. aureus</i> * <i>E. hirae</i> * <i>E. faecium</i> *	<i>C. albicans</i> *
Chemische Wäschedesinfektion (manuelles Einlegeverfahren)	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 <i>P. mirabilis</i> <i>S. aureus</i> * <i>E. hirae</i> *	<i>C. albicans</i> *

Anwendungsverfahren	Bakterizide Wirksamkeit	Levurozide Wirksamkeit
Maschinelle chemothermische Wäschedesinfektion (< 60 °C)	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 <i>P. mirabilis</i> <i>S. aureus</i> * <i>E. hirae</i> *	<i>C. albicans</i> *
Maschinelle chemothermische Wäschedesinfektion (≥ 60 bis 70 °C)	<i>E. faecium</i> *	

*optional

Bestimmung der bakteriziden, levuroziden, fungiziden, tuberkuloziden bzw. mykobakteriziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch¹

(Methode 9)



9.1 Quantitativer Suspensionsversuch mit Bakterien, Mykobakterien, Hefen und Schimmelpilzen

Die erforderlichen Prüfkonzentrationen ergeben sich ggf. aus den Resultaten der qualitativen Suspensionsversuche (→ Kapitel 8).

9.1.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen in KBE/ml

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 (DSM 799)	1,5–5 x 10 ⁸ bzw. 1,5–5 x 10 ⁹ bei Konzentraten
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 6057 (DSM 2146)	1,5–5 x 10 ⁸ bzw. 1,5–5 x 10 ⁹ bei Konzentraten
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541 (DSM 3320)	1,5–5 x 10 ⁸ bzw. 1,5–5 x 10 ⁹ bei Konzentraten
<i>Escherichia coli</i> K12	NCTC 10538 (DSM 11250)	1,5–5 x 10 ⁸ bzw. 1,5–5 x 10 ⁹ bei Konzentraten
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 14153 (DSM 788)	1,5–5 x 10 ⁸ bzw. 1,5–5 x 10 ⁹ bei Konzentraten
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442 (DSM 939)	1,5–5 x 10 ⁸ bzw. 1,5–5 x 10 ⁹ bei Konzentraten
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 (DSM 1386)	1,5–5 x 10 ⁷ bzw. 1,5–5 x 10 ⁸ bei Konzentraten
<i>Mycobacterium terrae</i>	ATCC 15755 (DSM 43227)	1,5–5 x 10 ⁸ bzw. 1,5–5 x 10 ⁹ bei Konzentraten
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 15769 (DSM 44157)	1,5–5 x 10 ⁸ bzw. 1,5–5 x 10 ⁹ bei Konzentraten
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (früher <i>A. niger</i>)	ATCC 16404 (DSM 1988)	1,5–5 x 10 ⁷ bzw. 1,5–5 x 10 ⁸ bei Konzentraten

Bei der Auswahl der Testorganismen sind die entsprechenden Vorgaben aus **Tabelle 9.2** und **Tabelle 9.3** zu berücksichtigen.

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sowie der Prüfsuspensionen sind in → Kapitel 6 beschrieben.

9.1.2 Produktprüflösung

Für alle Produkte, die bis zu 80 % verdünnt angewendet werden, muss die Konzentration der Produktprüflösung aufgrund der angewendeten Methodik das 1,25-fache der zu testenden Prüfkonzentration betragen. Für alle Produkte, die mit höheren Konzen-

¹ Entsprechend können Testverfahren nach den Europäischen Richtlinien für die Überprüfung der bakteriziden Eigenschaften (z. B. DIN EN 13727 [1]), der levuroziden und fungiziden Eigenschaften (z. B. DIN EN 13624 [2]) oder der mykobakteriziden Eigenschaften (z. B. DIN EN 14348 [3]) herangezogen werden, sofern sie die in 9A aufgeführten Anforderungen erfüllen).

trationen eingesetzt werden, wird die unverdünnte Lösung als höchste Konzentration entsprechend der „97%-Prüfung“ (gebrauchsfertige Lösung (rtu = ready to use)) getestet.

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in **►Kapitel 5** beschrieben.

► siehe Schema **D3.1**, Anhang D

9.1.3 Methodik

9.1.3.1 Prinzip

Eine Probe des zu prüfenden Produktes wird mit einer Bakterien- oder Pilzsuspension versehen und dieses Gemisch bei der Prüftemperatur gehalten. Nach ausgewählten und festgelegten Einwirkzeiten wird eine aliquote Menge des Gemisches mit validierten Verfahren sofort neutralisiert, um die vorhandene Bakterizidie, Levurozidie, Fungizidie, Tuberkulozidie und/oder Mykobakterizidie zu überprüfen. In jeder Probe werden die Koloniezahlen bestimmt und deren Verminderung gegenüber der Ausgangskoloniezahl berechnet.

Das Verfahren der Wahl ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Nur wenn kein geeignetes Neutralisationsmittel gefunden wurde, darf das Membranfiltrations-Verfahren angewendet werden.

Die Prüfungen mit geringer bzw. hoher organischer Belastung richten sich nach den Einsatzbedingungen des zu prüfenden Präparates.

9.1.3.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren

► Prüfbedingungen siehe **9A**

Bei der Auswahl der Prüfbedingungen hinsichtlich der hinzuzufügenden organischen Belastung sind die entsprechenden Vorgaben zu berücksichtigen.

Um bei Konzentraten eine möglichst geringe methodenbedingte Verdünnung der Wirkstoffkonzentration zu verursachen, werden hierfür andere Verdünnungsverhältnisse (9,7 ml Produkt + 0,2 ml einer 5-fach höher konzentrierten Belastung + 0,1 ml Prüfsuspension (für Konzentrate)) ermöglicht.

a) ohne Belastung

8 ml der Produktprüflösung werden mit 1 ml WSH und 1 ml der Prüfsuspension gut vermischt (Konzentrat: 9,9 ml der Produktprüflösung werden mit 0,1 ml der Prüfsuspension für Konzentrate vermischt). Nach den erforderlichen Einwirkzeiten wird das Prüfprodukt-Prüfsuspensionsgemisch erneut gut gemischt, jeweils 0,5 ml entnommen und in 4,5 ml Neutralisationsmittel (**► Anhang A1.7**) überführt (= Prüfneutralisationsgemisch) und gemischt. Unmittelbar danach werden 10^{-1} - und 10^{-2} -Verdünnungen in Neutralisationsmittel angelegt. Nach 5 min \pm 10 s Neutralisationszeit werden direkt aus dem Prüfneutralisationsgemisch 1 ml und 0,1 ml sowie aus den Verdünnungen je 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

► zur Inkubation siehe **9.1.4**

► zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe **9.1.5**

b) mit 0,03 % Albumin (geringe organische Belastung)

Der quantitative Suspensionsversuch wird mit Produktprüflösungen durchgeführt, die 0,03 % Albumin (⇒ *Anhang A1.8*) enthalten, das erst unmittelbar vor Versuchsbeginn zugesetzt werden darf.

Hierzu werden 8 ml der Produktprüflösung mit 1 ml einer 0,3%igen Albuminlösung und anschließend mit 1 ml der Prüfsuspension gut vermischt (Konzentrat: 9,7 ml der Produktprüflösung werden mit 0,2 ml einer 1,5%igen Albuminlösung und 0,1 ml der Prüfsuspension für Konzentrate vermischt).

Zum Vergleich der Versuchsdurchführungen ohne und mit organischer Belastung müssen diese Untersuchungen ggf. in parallelen Ansätzen erfolgen.

c) mit 0,3 % Albumin und 0,3 % Schaferythrozyten (hohe organische Belastung)

Zur Simulation hoher organischer Belastungen wird der quantitative Suspensionsversuch mit Produktprüflösungen durchgeführt, die 0,3 % Albumin und 0,3 % Schaferythrozyten (⇒ *Anhang A1.8*) enthalten, die erst unmittelbar vor Versuchsbeginn zugesetzt werden dürfen.

Hierzu werden 8 ml der Produktprüflösung mit 1 ml einer Lösung, welche 3 % Albumin sowie 3 % Schaferythrozyten enthält, und anschließend mit 1 ml der Prüfsuspension gut vermischt (Konzentrat: 9,7 ml der Produktprüflösung werden mit 0,2 ml einer 15 %-Albumin sowie 15 %-Schaferythrozyten-Lösung und 0,1 ml der Prüfsuspension für Konzentrate vermischt).

Für die Beurteilung der zusätzlichen Belastung müssen auch diese Untersuchungen ggf. parallel zu a) bzw. b) erfolgen.

9.1.3.3 Membranfiltrations-Verfahren

Bei der Auswahl der Prüfbedingungen hinsichtlich der hinzuzufügenden organischen Belastung sind die entsprechenden Vorgaben zu berücksichtigen.

➔ Prüfbedingungen siehe **9A**

a) ohne Belastung

8 ml der Produktprüflösung werden mit 1 ml WSH und 1 ml der Prüfsuspension gut vermischt (Konzentrat: 9,9 ml der Produktprüflösung werden mit 0,1 ml der Prüfsuspension für Konzentrate vermischt). Nach den erforderlichen Einwirkzeiten wird das Prüfprodukt-Prüfsuspensionsgemisch erneut gut gemischt und hieraus Verdünnungen 10^{-1} bis 10^{-3} in Spülflüssigkeit angelegt. Von dem Prüfprodukt-Prüfsuspensionsgemisch und den Verdünnungen werden 1,0 ml auf den Membranfilter einer Filtrationsanlage, die vorher mit 50 ml Spülflüssigkeit (⇒ *Anhang A1.5*) versehen wurde, überführt und sofort filtriert. Die Zeitspanne von 1 min für das Filtrieren sollte dabei nicht überschritten werden (eine Überschreitung der Zeit muss im Prüfbericht vermerkt werden). Mit min-

destens 150 ml, aber höchstens 500 ml Spülflüssigkeit spülen. Die Membran wird dann (ohne Lufteinschlüsse zwischen Membran und Nähragaroberfläche) auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA, *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) überführt, wobei sich die Bakterien bzw. Hefen oder Pilze auf der oberen Seite der Membran befinden sollen.

b) mit 0,03 % Albumin (geringe organische Belastung)

➔ zur Inkubation siehe 9.1.4

➔ zur Berechnung und

Darstellung der Ergebnisse

siehe 9.1.5

Die Prüfung wird mit Produktprüflösungen durchgeführt, denen unmittelbar vor Versuchsbeginn 0,03 % Albumin (➔ *Anhang A1.8a*) zugesetzt wurde (➔ 9.1.3.2.b) (Konzentrat: 9,7 ml der Produktprüflösung werden mit 0,2 ml einer 1,5%igen Albuminlösung und 0,1 ml der Prüfsuspension für Konzentrate vermischt).

c) mit 0,3 % Albumin und 0,3 % Schaferythrozyten (hohe organische Belastung)

Die Prüfung wird mit Produktprüflösungen durchgeführt, denen unmittelbar vor Versuchsbeginn 0,3 % Albumin und 0,3 % Schaferythrozyten (➔ *Anhang A1.8b*) zugesetzt wurden (➔ 9.1.3.2.c) (Konzentrat: 9,7 ml der Produktprüflösung werden mit 0,2 ml einer 15 %-Albumin sowie 15 %-Schaferythrozyten-Lösung und 0,1 ml der Prüfsuspension für Konzentrate vermischt).

9.1.4 Inkubation

Nach 42 h bis 48 h Inkubationszeit bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (*C. albicans*: 72 h und $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und *A. brasiliensis*: 7 bis 9 Tage bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) werden die Kolonien ausgezählt.

9.1.5 Auswertung

Es werden vorrangig Nährböden ausgewertet, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 14 und 330 (14–165 für *A. brasiliensis*) liegt.

Die Reduktion (früher Reduktionsfaktor) R wird nach folgender Formel berechnet:

$$\lg R = \lg (\text{KBE Ko1}) - \lg (\text{KBE D})$$

KBE Ko1: Anzahl der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes (WSH-Kontrolle)

KBE D: Anzahl der KBE pro ml nach Einwirkung des Produktes

Im Prüfbericht sind die KBE-Werte pro Verdünnungsstufe, die $\lg (\text{KBE D})$ sowie die R-Werte tabellarisch aufzulisten.

Die KBE-Werte pro Verdünnungsstufe der Kontrollen 2 und 3 (➔ 9.1.6) sind den KBE-Werten der Verdünnungsstufen der Prüfsuspension gegenüberzustellen.

9.1.6 Validierung

Alle Validierungen werden bei der Prüftemperatur durchgeführt, mit Ausnahme der Kontrolle 3, die bei 20 °C validiert wird.

9.1.6.1 Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens

➔ siehe Schema D3.1, Anhang D

9.1.6.1.1 WSH-Kontrolle (Ko1)

Zur Bestimmung der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes (Ko1) wird die jeweilige Prüfsuspension mit der jeweiligen organischen Belastung mit WSH anstelle der Produktprüflösung bei der Prüftemperatur vermischt. Nach den erforderlichen Einwirkzeiten sind von diesem Ansatz in gleicher Weise wie oben beschrieben (➔ 9.1.3.2) Subkulturen (Verdünnungen von 10^{-3} ggf. bis 10^{-4}) anzulegen.

➔ zur Inkubation siehe 9.1.4

➔ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 9.1.5

9.1.6.1.2 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)

➔ siehe Schema D3.2, Anhang D

Zur Kontrolle der Neutralisation (Ko2) wird 1 ml der höchsten im Test eingesetzten Konzentration des Prüfproduktes bei der Prüftemperatur mit 9 ml Neutralisationsmittel vermischt und nach $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit* mit 0,1 ml einer 10^{-3} -Verdünnung (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: 10^{-2} -Verdünnung) (bei Konzentrationen 10^{-4} bzw. 10^{-3} bei *C. albicans* und *A. brasiliensis*) der Prüfsuspension versetzt. Nach der längsten Einwirkzeit wird hiervon sowohl aus dem Direktansatz als auch aus einer 10^{-1} -Verdünnung in Neutralisationsmittel (➔ Anhang A1.7) je 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

*bei Präparaten mit Einwirkzeiten von $\leq 10 \text{ min}$ nach $10 \text{ s} \pm 1 \text{ s}$ Neutralisationszeit

Anmerkung: Zeigt sich im Test eine unzureichende Neutralisation (weniger als 10^3 KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden.

➔ zur Inkubation siehe 9.1.4

➔ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 9.1.5

9.1.6.1.3 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3)

➔ siehe Schema D3.2, Anhang D

Die Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3) wird parallel zur Kontrolle 2 durchgeführt, enthält jedoch anstelle der Produktprüflösung WSH bzw. bei Konzentrationen Wasser und wird bei 20 °C durchgeführt. (➔ Anhang A1.1).

Anmerkung: Zeigt sich im Test ein toxischer Effekt (weniger als 10^3 KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden.

9.1.6.2 Validierung des Membranfiltrations-Verfahrens

Dieses Verfahren kann nicht mit *M. terrae* und *M. avium* durchgeführt werden.

9.1.6.2.1 WSH-Kontrolle (Ko1)

Zur Bestimmung der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes (Ko1) wird die jeweilige Prüfsuspension mit der jeweiligen organischen Belastung mit WSH anstelle der Produktprüflösung bei der Prüftemperatur vermischt. Nach den erforderlichen Einwirkzeiten wird mit diesem Ansatz nach entsprechender Vorverdünnung der Probe mit Spülflüssigkeit die Filtration wie oben beschrieben (➔ 9.1.3.3) durchgeführt.

➔ Zur Inkubation siehe 9.1.4

➔ Zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 9.1.5

➔ Zur Inkubation siehe 9.1.4

➔ Zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 9.1.5

9.1.6.2.2 Kontrolle des Membranfiltrations-Verfahrens (Ko2)

Zur Kontrolle des Verfahrens (Ko2) werden 8 ml der höchsten im Test eingesetzten Konzentration des Prüfproduktes mit 2 ml WSH gemischt und bei der Prüftemperatur inkubiert (Konzentrat: 9,9 ml der höchsten im Test eingesetzten Konzentration des Prüfproduktes werden mit 0,1 ml Wasser (➔ Anhang A1.1) gemischt). Nach der längsten Einwirkzeit werden 1,0 ml dieses Gemisches auf den Membranfilter einer Filtrationsanlage, die vorher mit 50 ml Spülflüssigkeit versehen wurde, überführt und sofort filtriert. Mit mindestens 150 ml, aber höchstens 500 ml Spülflüssigkeit spülen. Anschließend wird die Membran wiederum mit 50 ml Spülflüssigkeit versehen, 0,05 ml einer 10^{-5} -Verdünnung (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: 10^{-4} -Verdünnung) der Prüfsuspension überführt und filtriert. Abschließend wird nochmals mit 50 ml Spülflüssigkeit (➔ Anhang A1.5) gespült. Die Zeitspanne für das Überführen der Proben und das Filtrieren sollte 1 min jeweils nicht überschreiten. Die Membran wird abschließend wie oben beschrieben (➔ 9.1.3.3) auf den Nährboden überführt.

Anmerkung: Zeigt sich im Test eine unzureichende Neutralisation (weniger als 10^1 KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsverfahren ausgewählt werden.

9.1.6.2.3 Kontrolle der Filtration (Ko3)

➔ zur Inkubation siehe 9.1.4

➔ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 9.1.5

Zur Kontrolle der Filtration (Ko3) werden 0,05 ml einer 10^{-5} -Verdünnung (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: 10^{-4} -Verdünnung) der Prüfsuspension bei 20 °C auf den Membranfilter einer Filtrationsanlage, die vorher mit 50 ml Spülflüssigkeit befüllt worden ist, pipettiert und sofort filtriert. Die Zeitspanne von 1 min für das Filtrieren sollte dabei nicht überschritten werden (eine Überschreitung der Zeit muss im Prüfbericht vermerkt werden). Es wird nochmals mit 50 ml Spülflüssigkeit gespült und die Membran dann wie oben beschrieben (➔ 9.1.3.3) auf den Nährboden überführt.

Anmerkung: Zeigt sich im Test ein toxischer Effekt (weniger als 10^1 KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsverfahren ausgewählt werden.

9A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Prüfbedingungen siehe Tabelle 9.1, 9.2 und 9.3

Der quantitative Suspensionsversuch ist obligatorisch für alle vom VAH zu beurteilenden Anwendungsverfahren. Die Prüfbedingungen (Prüfkonzentration, Prüftemperatur, Einwirkzeiten) sind in **Tabelle 9.1** aufgeführt.

Die optional und obligat zu prüfenden Testorganismen und die erforderlichen Testbedingungen (geringe bzw. hohe organische Belastung, Temperatur, Konzentration, Einwirkzeit) sowie die geforderten Reduktionen sind in den **Tabellen 9.2** und **9.3** enthalten.

Aus den Ergebnissen der Prüfungen muss die Abgrenzung des wirksamen vom

unwirksamen Bereich für den resistetesten Testorganismus aus dem Bereich Bakteri- die und Levurozidie (*C. albicans*) sowie für gegebenenfalls zusätzlich geprüfte Testorga- nismen hervorgehen.

Sofern die Prüfungen gemäß DIN EN Normen durchgeführt werden, sind darüber hinaus folgende zusätzliche Anforderungen zu erfüllen:

- Verdünnungen des Prüfneutralisationsgemisches bis mindestens 10^{-1} (10^{-2} bei Myko- bakterien) sind unbedingt erforderlich, um mögliche Neutralisationsprobleme zu erkennen.
- Die Auswahl der Testorganismen richtet sich nach den jeweils zu prüfenden Wirkspek- tren (→ **Tabelle 9.2** und **9.3**). Erfolgt keine Vorauswahl durch den qualitativen Suspen- sionsversuch, sind neben den Gram-positiven alle Gram-negativen Testorganismen zu prüfen.

Tabelle 9.1: Prüfbedingungen im qualitativen und quantitativen Suspensionsversuch.

Anwendungsverfahren	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten ⁴
Hygienische Händewaschung	50% ²	20 ± 1	15 s, 30 s, 1 min
Hygienische Händedesinfektion (Einreibeverfahren)	Konzentrat (80 bzw. 97 %)	20 ± 1	15 s, 30 s, 1 min
Chirurgische Händedesinfektion (Einreibeverfahren)	Konzentrat	20 ± 1	30 s, 1 min, 1,5 min, 3 min, 5 min
Hautantiseptik	Konzentrat	20 ± 1	15 s, 30 s, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min
Flächendesinfektion	Gebrauchsverdünnungen ³	20 ± 1	1 min ⁵ , 5 min, 15 min, 30 min, 60 min
Chemische Instrumenten- desinfektion (manuelles Eintauchverfahren)	Gebrauchsverdünnungen ³	20 ± 1	1 min ⁵ , 5 min, 15 min, 30 min, 60 min
Maschinelle chemothermische Instrumentendesinfektion	Gebrauchsverdünnungen ³	≥20 bis ≤60 ± 1	1 min ⁵ , 5 min, 15 min, 30 min, 60 min
Chemische Wäsche- desinfektion (manuelles Einlegeverfahren)	Gebrauchsverdünnungen ³	13 ± 2	4 h, 6 h, 12 h
Maschinelle chemothermische Wäschedesinfektion	Mischungen des Wasch- und Desinfektionsmittelzusatzes in den Gebrauchsrelationen	30 bis 70 ± 1 entsprechend den Temperaturen im Waschverfahren	5 min, 10 min, 15 min, 20 min

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit. Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Bei Produkten aufgrund der Wasserzugabe während des Verfahrens.

³ Konzentrat bei unverdünnt anzuwendenden Produkten.

⁴ Es müssen mindestens 3 Einwirkzeiten getestet werden, wobei die empfohlene Einwirkzeit die mittlere Zeit sein sollte.

⁵ Falls 5 min als beantragte Einwirkzeit vorgesehen sind, muss 1 min ebenfalls getestet werden.

Tabelle 9.2: Wirkungsspektrum im quantitativen Suspensionsversuch (Hände, Haut).

Anwendungs- verfahren	Bakterizide Wirksamkeit (5 lg-Stufen Reduktion)		Levurozide Wirksamkeit (4 lg-Stufen Reduktion)	
	geringe Belastung	hohe Belastung	geringe Belastung	hohe Belastung
Hygienische Händewaschung ¹		<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12* <i>P. mirabilis</i> *		<i>C. albicans</i>
Hygienische Hände- desinfektion ² (Einreibe- verfahren)		<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12* <i>P. mirabilis</i> *		<i>C. albicans</i>
Chirurgische Hände- desinfektion (Einreibe- verfahren)	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12* <i>P. mirabilis</i> *		<i>C. albicans</i>	
Hautantiseptik		<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12* <i>P. mirabilis</i> *		<i>C. albicans</i>

* Prüfung ist erforderlich, wenn diese Testorganismen im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *Pseudomonas aeruginosa* sind bzw. kein qualitativer Suspensionsversuch durchgeführt wird.

¹ Bakterizide Wirkung (3 lg-Stufen Reduktion).

² Wenn in DIN EN 13727 die Prüfung für hygienische Händedesinfektion unter geringer Belastung durchgeführt worden ist, muss mit dem resistentesten Testorganismus eine Prüfung unter hoher organischer Belastung nachgereicht werden.

Tabelle 9.3: Wirkungsspektrum im quantitativen Suspensionsversuch (Fläche, Instrumente, Wäsche).

Anwendungs- verfahren	Bakterizide Wirksamkeit (5 lg-Stufen Reduktion)		Levurozide (fungizide) Wirksamkeit (4 lg-Stufen Reduktion)		Tuberkulozide (mykobakterizide) Wirksamkeit (4 lg-Stufen Reduktion)	
	gering Belastung ¹	hohe ² Belastung	geringe Belastung ¹	hohe ² Belastung	geringe Belastung ¹	hohe ² Belastung
Flächendesinfektion	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³	<i>C. albicans</i> (und <i>A. brasiliensis</i>)	<i>C. albicans</i> (und <i>A. brasiliensis</i>)	<i>M. terrae</i> (und <i>M. avium</i>)	<i>M. terrae</i> (und <i>M. avium</i>)
Chemische Instrumenten- desinfektion (manuelles Eintauchverfahren)	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³	<i>C. albicans</i> (und <i>A. brasiliensis</i>)	<i>C. albicans</i> (und <i>A. brasiliensis</i>)	<i>M. terrae</i> (und <i>M. avium</i>)	<i>M. terrae</i> (und <i>M. avium</i>)
Maschinelle chemothermische Instrumenten- desinfektion (20 °C bis ≤ 70 °C)	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³ <i>E. faecium</i> ⁴	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³ <i>E. faecium</i> ⁴	<i>C. albicans</i> (und <i>A. brasiliensis</i>)	<i>C. albicans</i> (und <i>A. brasiliensis</i>)	<i>M. terrae</i> (und <i>M. avium</i>)	<i>M. terrae</i> (und <i>M. avium</i>)
Chemische Wäschedesinfektion (manuelles Einlegeverfahren) (13 ± 2 °C)	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³	<i>C. albicans</i> (und <i>A. brasiliensis</i>)	<i>C. albicans</i> (und <i>A. brasiliensis</i>)	<i>M. terrae</i> (und <i>M. avium</i>)	<i>M. terrae</i> (und <i>M. avium</i>)
Maschinelle chemothermische Wäschedesinfektion (30 °C bis < 60 °C)	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³	<i>C. albicans</i> (und <i>A. brasiliensis</i>)	<i>C. albicans</i> (und <i>A. brasiliensis</i>)	<i>M. terrae</i> (und <i>M. avium</i>)	<i>M. terrae</i> (und <i>M. avium</i>)
Maschinelle chemothermische Wäschedesinfektion (≥ 60 °C bis 70 °C)	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>				

¹ Bei der chemothermischen Wäschedesinfektion (<60 °C) nur bei Verfahren mit Vorwäsche.

² Bei der chemothermischen Wäschedesinfektion (<60 °C) nur bei Verfahren ohne Vorwäsche.

³ Prüfung ist erforderlich, wenn diese Testorganismen im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *Pseudomonas aeruginosa* sind bzw. kein qualitativer Suspensionsversuch durchgeführt wird.

⁴ Bei Verfahren ≥ 40 °C zusätzlich *E. faecium*.

() Optional zusätzlicher Wirkungsbereich.

Literatur

1. DIN EN 13727:2014-03. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
2. DIN EN 13624:2013-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
3. DIN EN 14348:2005-04. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der mykobakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich einschließlich der Instrumentendesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).

Hygienische Händewaschung – praxisnaher Versuch mit Probanden*

(Methode 10)

10

10.1 Testorganismus und Ausgangskonzentration

<i>Escherichia coli</i> K12	NCTC 10538	(DSM 11250)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
-----------------------------	------------	-------------	--------------------------------

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sind in → Kapitel 6 beschrieben. Zur Herstellung der Prüfsuspension (= Kontaminationsflüssigkeit) → 10.3.3.

10.2 Produktprüflösung

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in → Kapitel 5 beschrieben.

10.3 Methodik

10.3.1 Prinzip

Zur Beurteilung der Wirksamkeit eines Produktes für die hygienische Händewaschung im praxisnahen Versuch wird das Verhältnis zweier Werte herangezogen. Der erste Wert (= Vorwert) beinhaltet die Anzahl der Testorganismen, die von künstlich kontaminierten Fingerkuppen zurückgewonnen werden können. Den zweiten Wert (= Nachwert) erhält man durch die Anzahl von Testorganismen, die nach der hygienischen Händewaschung zurückgewonnen werden können.

Es werden je Proband am selben Tag mit derselben Kontaminationsflüssigkeit und unter definierten Bedingungen Referenz-Händewaschungen mit nichtantibakteriell wirkender Seife durchgeführt, um die hierdurch erreichte Reduktion zu bestimmen, diese mit der durch das Prüfprodukt erreichten zu vergleichen und somit die äußeren Einflüsse zu kompensieren.

Für die Untersuchung müssen 15 Probanden getestet werden. Davon müssen mindestens 12 verwertbare Datensätze in die Bewertung einzubeziehen sein, um die erforderliche Präzision zu erreichen. Die Ergebnisse aller 15 Probanden sind im Prüfbericht aufzuführen.

Die Probanden werden nach Zufallskriterien in zwei etwa gleich große Gruppen aufgeteilt. Eine dieser Gruppen führt die Referenz-Händewaschung (RP) durch, während die andere Gruppe das zu prüfende Produkt (PP) benutzt. Danach werden in einem zweiten Durchlauf der Prüfung Referenz-Händewaschung und die Benutzung des zu prüfenden Produktes durchgeführt.

*Entsprechend kann auch der Phase-2-Stufe-2-Test nach DIN EN 1499 durchgeführt werden [1].

den Produktes in umgekehrter Zuordnung durchgeführt. Die genaue Durchführung der künstlichen Kontamination und die Ermittlung des Vorwertes sind besonders zu beachten.

Wenn mehrere Produkte gleichzeitig geprüft werden, muss nach der Lateinischen-Quadrat-Anordnung [3] verfahren werden: Es müssen genauso viele Versuchsdurchläufe und Probandengruppen vorhanden sein wie Produkte einschließlich der Referenzseife. Alle Waschverfahren werden in den einzelnen Durchläufen parallel durchgeführt. Jeder Proband muss jedes Handwaschprodukt einmal verwendet haben.

10.3.2 Probanden

Die Probanden sollten alle gesund sein, müssen über saubere, kurze Fingernägel verfügen, dürfen an den Händen keine Verletzungen haben und keinen Schmuck an den Unterarmen und Händen tragen. Die Probanden müssen mindestens 18 Jahre alt sein.

Eine Woche vor Versuchsbeginn müssen die Probanden auf Substanzen mit antimikrobieller Wirkung (z. B. Seifen und Handcremes mit mikrobiziden Zusätzen) verzichten.

10.3.3 Kontaminationsflüssigkeit

Es werden zwei je 5 ml CSB enthaltende Röhrchen mit dem Testorganismus beimpft und bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ während 18 h bis 24 h inkubiert. Mit je einer dieser Kulturen wird eine 1000 ml CSB enthaltende Flasche beimpft, die wiederum bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ 18 h bis 24 h unter Schütteln inkubiert wird. Die danach in einem sterilen Gefäß vereinigten Prüfsuspensionen werden auf eine Koloniezahl zwischen $1,5 \times 10^8$ und $5,0 \times 10^8$ KBE pro ml eingestellt. Diese Kontaminationsflüssigkeit sollte maximal 1 h vor Testbeginn hergestellt werden und danach nicht länger als 4 h zur Kontamination der Hände der Probanden verwendet werden. Eine Sedimentation der Testorganismen ist zu vermeiden.

10.3.4 Kontamination der Hände und Bestimmung der Vorwerte (VW)

Die Probanden müssen ihre Hände 1 min lang mit 5 ml Kaliseife (→ *Anhang A1.6.1*) waschen und dann gründlich mit mikrobiologisch einwandfreien Papierhandtüchern abtrocknen. Dies dient der Reduzierung der normalen transienten Flora. Dann werden die Hände bis zur Mitte der Mittelhand 5 s in das Gefäß mit der Kontaminationsflüssigkeit getaucht. Es sollte darauf geachtet werden, dass die angrenzenden Arbeitsflächen nicht kontaminiert werden.

Mit gespreizten Fingern werden die Hände unter langsamem Drehen in waagerechter Haltung 3 min an der Luft getrocknet. Hierdurch soll auch eine Tropfenbildung verhindert werden.

Um den Vorwert zu ermitteln, werden die Kuppen der Finger und des Daumens beider Hände in je eine Schale mit 10 ml CSB (mit Neutralisationsmittel) getaucht und während 1 min ausgeknetet. Aus diesen Sammelflüssigkeiten werden Verdünnungen (10^{-3} und 10^{-4}) in CSB (mit Neutralisationsmittel) hergestellt. Davon werden 0,1 ml auf CSA ggf. mit Des-

→ zur Inkubation siehe 10.4

→ zur Auswertung der Vorwerte siehe 10.5

oxycholat (⇒ *Anhang A1.4.3 und A1.4.4*) ausgespatelt. Dies muss spätestens 30 min ± 3 min nach der Probenahme geschehen sein.

10.3.5 Hygienische Händewaschung

Je nach zugeteilter Gruppe müssen sich die Probanden direkt nach der Ermittlung der Vorwerte ohne weitere Kontamination der Hände der Referenz-Händewaschung (RP) oder der hygienischen Händewaschung mit dem zu prüfenden Produkt (PP) unterziehen.

10.3.5.1 Referenz-Händewaschung (RP)

Die Hände werden mit Leitungswasser angefeuchtet und mit 5 ml Kaliseife (⇒ *Anhang A1.6*), die in die hohlen Hände gegossen wird, nach dem Standard-Handwaschverfahren (⇒ *Anhang C1*) bis zu den Handgelenken gewaschen, um die Benetzung der gesamten Handoberfläche sicherzustellen.

Die Dauer des Standard-Handwaschverfahrens sollte insgesamt 60s betragen (+ 15s Abspülen) und wird wie folgt durchgeführt:

Je 5-mal mit genügend lauwarmem Leitungswasser zum ausreichenden Aufschäumen

- Handfläche auf Handfläche hin und her,
- mit und ohne gespreizte Finger,
- rechte Handfläche über linken Handrücken und umgekehrt,
- mit verschränkten Fingern in der gegenüberliegenden Handfläche die Außenseite der Finger einreiben und umgekehrt,
- mit dem rechten Daumen kreisende Bewegungen in der linken geschlossenen Handfläche und umgekehrt,
- kreisende Bewegungen der geschlossenen Fingerkuppen in der gegenüberliegenden Handfläche und umgekehrt.

Nach 1 min werden die Hände mit nach oben gerichteten Fingerkuppen 15s lang unter fließendem Leitungswasser mit Trinkwasserqualität von den Kuppen bis zum Handgelenk abgespült. Diese Stellung der nach oben gerichteten Fingerkuppen wird beibehalten, um eine Rekontamination durch Tropfen zu verhindern, bis die Nachwerte erhoben werden. Helfer trocknen dazu Handgelenke und Unterarme mit Papierhandtüchern ab.

10.3.5.2 Hygienische Händewaschung mit dem zu prüfenden Produkt (PP)

Hierbei werden die Anweisungen des Herstellers bezüglich

- der zu verwendenden Menge des Produktes (muss benannt werden),
- der Häufigkeit der Anwendungen,
- der Notwendigkeit der Vorbenetzung,
- ggf. Aufschäumzeit und
- Art und Weise des Einsatzes von Wasser

strikt eingehalten und im Prüfbericht dokumentiert. Eine hygienische Händewaschung sieht immer den Einsatz von Wasser im Verfahren vor.

Die Anwendungsdauer beträgt 30 s oder 60 s (ohne die Dauer des letzten Abspülens). Ein abschließendes Abspülen von mind. 10s ist notwendig, auch wenn vom Hersteller eine kürzere Zeitdauer oder gar kein Abspülen empfohlen wird. Auch hier sollte eine Rekontamination durch Tropfen (➔ 10.3.5.1) vermieden werden.

10.3.6 Bestimmung der Nachwerte (NW)

Nach Ende des jeweiligen Verfahrens (RP oder PP) werden die Hände mit nach oben gerichteten Fingerkuppen gehalten, um eine Rekontamination durch Tropfen zu verhindern. Helfer trocknen zur Verhinderung einer Rekontamination dazu Handgelenke und Unterarme (aber nicht die Hände) mit Papierhandtüchern ab.

Sofort nach dem Abtrocknen der Handgelenke und Unterarme werden die Fingerkuppen (einschließlich Daumenkuppen) jeder Hand 1 min lang in je eine Petrischale mit 10 ml CSB + Neutralisationsmittel* getaucht und ausgeknetet (für jede Hand gesondert). Aus der unverdünnten Sammelflüssigkeit werden 1 ml und 0,1 ml sowie 0,1 ml aus einer Verdünnung 10^{-1} und ggf. 10^{-2} in CSB + Neutralisationsmittel* auf CSA ggf. mit Desoxycholat (➔ Anhang A1.4.3, A1.4.4) ausgespatelt. Dies sollte innerhalb von 30 min geschehen.

*validiert im quantitativen
Suspensionsversuch,
Methode 9

10.4 Inkubation

Nach 42 h bis 48 h Inkubation bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ werden alle Platten ausgezählt. Gegebenenfalls ist eine Vorabzählung nach 24 h hilfreich.

10.5 Auswertung

Es werden vorrangig Nährböden ausgezählt, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 14 und 330 liegt. Nachwerte mit weniger als 14 Kolonien oder gar keinem Wachstum, auch wenn 1 ml unverdünnter Sammelflüssigkeit ausgespatelt worden ist, können berücksichtigt werden, da dies ein Hinweis auf ein sehr wirksames Produkt sein kann. Liegen die Koloniezahlen aus aufeinanderfolgenden Verdünnungen im o. a. Zählbereich, wird hieraus das gewichtete Mittel nach folgender Formel berechnet:

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

Dabei ist

c die Summe der gezählten Kolonien auf allen ausgewerteten Nährböden

n₁ die Anzahl der ausgewerteten Nährböden mit der ersten Verdünnung

n₂ die Anzahl der ausgewerteten Nährböden mit der zweiten Verdünnung

d der Verdünnungsfaktor der ersten ausgewerteten Verdünnung

Sind die Koloniezahlen bei den unterschiedlichen Verdünnungsschritten stark disproportional, könnte dies ein Hinweis auf eine unzureichende Neutralisation sein!

Die Koloniezahlen je ml Sammelflüssigkeit werden dekadisch logarithmiert, wobei aus rechnerischen Gründen die „0“-Werte ($\lg 0 = \infty$) gleich „1“ ($\lg 1 = 0$) gesetzt werden. Dabei sollte beachtet werden, dass „0“-Werte nur bei Nachwerten und besonders wirksamen Produkten auftreten dürften, so dass diese Regel zu einer tendenziellen Unterbewertung der antimikrobiellen Wirksamkeit eines Produktes führen kann.

Die logarithmierten Werte (Vor- und Nachwerte) der linken und der rechten Hand jedes Probanden werden gemittelt, wodurch sich durch diese doppelte Gewichtung die Präzision erhöht. Pro Proband wird dann aus der Differenz zwischen dem kombinierten Vorwert und dem Nachwert die individuelle Reduktion ermittelt ($\lg R = \lg VW - \lg NW$). Aus den arithmetischen Mittelwerten aller individuellen Reduktionen ergeben sich die mittleren Reduktions-Werte für das Referenz- und das Prüfverfahren. Es muss aufgezeigt werden, ob der Proband zu Gruppe 1 (RP \Rightarrow PP) oder Gruppe 2 (PP \Rightarrow RP) gehört.

10.6 Verifizierung des Versuches

Für den Vergleich der Ergebnisse der Verfahren RP und PP und zur Bewertung des Prüfverfahrens PP müssen die in \Rightarrow 10A genannten Anforderungen erfüllt sein.

10.7 Signifikanzprüfung

Ist der Mittelwert der Reduktionen des zu prüfenden Produktes – wie gefordert – größer als der durch die Referenzseife erreichte, muss die Differenz auf statistische Signifikanz untersucht werden.

Für die Prüfung des Leistungsverhaltens von PP im Vergleich zu RP ist ein Test auf Überlegenheit, der parameterfreie Vorzeichen-Rangtest für gepaarte Stichproben nach Wilcoxon [2], anzuwenden.

Die Prüfung der Daten aus einem Lateinischen-Quadrat-Experiment wird mit dem Rangtest nach Wilcoxon-Wilcox [3] vorgenommen. Dabei werden die Mittelwerte von mehr als einem Prüfverfahren mit denen des Referenzverfahrens paarweise verglichen.

Aufgrund der vorwiegend bestätigenden Natur des Tests bei dieser Anwendung wird das Signifikanzniveau mit $p = 0,01$ festgesetzt. Es ist eine einseitige Prüfung durchzuführen.

Ein Produkt, das diese Anforderung erfüllt, wird als geeignet für die hygienische Händedesinfektion angesehen.

Zukünftige Änderungen der DIN EN 1499 [1] werden bei der Beurteilung durch den VAH berücksichtigt.

10A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Orientierend

- Bestimmung der bakteriostatischen und levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel (Methode 7)
- Bestimmung der bakteriziden Wirkung im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8) – orientierend –. Nicht notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch alle Gram-negativen Testorganismen getestet werden (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*); Prüfbedingungen s. Tabelle 10.1

Tabelle 10.1: Prüfbedingungen im qualitativen Suspensionsversuch.

Erforderliche Reduktion: Kein Wachstum in den Kulturröhrchen nach 48 h.

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten ²
Hygienische Händewaschung	<i>E. coli</i> K12 <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabilis</i>	ohne	50 % im Ansatz	20 ± 1	15 s 30 s 1 min

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit. Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens die 3 angegebenen Einwirkzeiten getestet werden.

Obligat

- Bestimmung der bakteriziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9.1 bzw. DIN EN 13727 [4] und DIN EN 13624 [5]); Prüfbedingungen s. Tabelle 10.2

Das zu prüfende Produkt muss die Kolonienzahl der in **Tabelle 10.2** und **Tabelle 10.3** genannten Testorganismen unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit (30 s bzw. 1 min) bei 20 °C mindestens um 3 lg-Stufen sowie von *Candida albicans* mindestens um 2 lg-Stufen vermindern.

Tabelle 10.2: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten ²
Hygienische Händewaschung	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³ <i>C. albicans</i>	hoch	50% im Ansatz	20 ± 1	15 s 30 s 1 min

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit. Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens die 3 angegebenen Einwirkzeiten getestet werden.

³ Wenn im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa*.

Tabelle 10.3: Anforderungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Wirkungsbereich	Bakterizide Wirksamkeit	Levurozide Wirksamkeit
Reduktion	3 lg-Stufen	2 lg-Stufen
Belastung	hohe Belastung	hohe Belastung
Testorganismen	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ¹ <i>P. mirabilis</i> ¹	<i>C. albicans</i>

¹ Prüfung ist erforderlich, wenn diese Testorganismen im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *Pseudomonas aeruginosa* sind bzw. kein qualitativer Suspensionsversuch durchgeführt worden ist.

– Hygienische Händewaschung – praxisnaher Versuch mit Probanden (Methode 10 bzw. DIN EN 1499 Phase 2/Stufe 2 [1])

Für den Vergleich der Ergebnisse des Prüf- und des Referenzverfahrens und zur Bewertung des Prüfverfahrens müssen die folgenden Anforderungen erfüllt sein:

- Von 15 Probanden müssen Ergebnisse vorliegen.
 - Von mindestens 12 Probanden müssen auswertbare Datensätze vorliegen.
 - Der Gesamtmittelwert der Vorwerte für RP und PP muss mindestens 5 lg-Stufen betragen.
 - Die absolute Differenz der mittleren Differenzen zwischen den lg-Reduktionen von RP und PP von Gruppe RP → PP und Gruppe PP → RP muss weniger als 2 betragen.
 - Alle Quotienten gewichteter mittlerer Keimzahlen müssen zwischen 5 und 15 liegen.
- Ist der Mittelwert der lg-Reduktion des zu prüfenden Verfahrens entsprechend ▶ Kapitel 10.7 signifikant größer (Signifikanzniveau 0,01) als das Referenzverfahren mit Seife, so erfüllt das Prüfprodukt unter praxisnahen Bedingungen die Anforderungen.

Literatur

1. DIN EN 1499:2013-07. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Hygienische Händewaschung. Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).
2. Siegel S (1956). Non-parametric statistics for the behavioral sciences. New York, McGraw-Hill.
3. Wilcoxon F and Wilcoxon RA (1964). Some rapid approximate statistical procedures. Pearl River, New York, Lederle Laboratories. (z.B. in Lothar Sachs (1992): Angewandte Statistik. 7. Auflage, Springer-Verlag).
4. DIN EN 13727:2014-3. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
5. DIN EN 13624:2013-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).

Hygienische Händedesinfektion – praxisnaher Versuch mit Probanden*

(Methode 11)

11.1 Testorganismus und Ausgangskonzentration

<i>Escherichia coli</i> K12	NCTC 10538	(DSM 11250)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
-----------------------------	------------	-------------	--------------------------------

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sind in → Kapitel 6 beschrieben. Zur Herstellung der Prüfsuspension (= Kontaminationsflüssigkeit) → 11.3.3.

11.2 Produktprüflösung

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in → Kapitel 5 beschrieben.

11.3 Methodik

11.3.1 Prinzip

Zur Beurteilung der Wirksamkeit eines Produktes für die hygienische Händedesinfektion im praxisnahen Versuch wird das Verhältnis zweier Werte herangezogen. Der erste Wert (Vorwert) beinhaltet die Anzahl der Testorganismen von künstlich kontaminierten Fingerringen. Den zweiten Wert (Nachwert) erhält man durch die Messung der Anzahl von Testorganismen, die nach der hygienischen Händedesinfektion verblieben sind.

Analog werden je Proband am selben Tag, mit derselben Kontaminationsflüssigkeit und unter definierten Bedingungen Referenz-Händedesinfektionen mit dem Referenzalkohol 60 Vol.-%iges Propan-2-ol durchgeführt, um die hierdurch erreichte Reduktion zu bestimmen, diese mit der durch das Prüfprodukt erreichten zu vergleichen und somit die äußeren Einflüsse zu kompensieren.

Für die Untersuchung müssen 18–20 Probanden getestet werden. Davon müssen mindestens 18 verwertbare Datensätze in die Bewertung einzubeziehen sein, um die erforderliche Präzision zu erreichen. Die Ergebnisse **aller** Probanden (auch die nicht verwertbaren) sind im Prüfbericht aufzuführen.

Die Probanden werden nach Zufallskriterien in zwei etwa gleich große Gruppen aufgeteilt. Eine dieser Gruppen führt die Referenz-Händedesinfektion (RP) durch, während die andere Gruppe das zu prüfende Produkt (PP) benutzt. Danach werden in einem zweiten Durchlauf der Prüfung Referenz-Händedesinfektion und die Benutzung des zu prüfenden Produktes in umgekehrter Zuordnung durchgeführt. Bei der Testung sind die genaue Durchführung der künstlichen Kontamination und die Ermittlung der Vorwerte zu beachten.

*Entsprechend kann auch der Phase-2-Stufe-2-Test nach DIN EN 1500 durchgeführt werden [1].

Wenn mehrere Produkte gleichzeitig geprüft werden, muss nach der Lateinischen-Quadrat-Anordnung [2] verfahren werden: Es müssen genauso viele Versuchsdurchläufe und Probandengruppen vorhanden sein wie Produkte einschließlich des Referenzalkohols. Alle hygienischen Händedesinfektionsverfahren werden in den einzelnen Durchläufen parallel durchgeführt. Jeder Proband muss jedes Händedesinfektionsprodukt einmal verwendet haben.

11.3.2 Probanden

Die Probanden sollten alle gesund sein, müssen über saubere, kurze Fingernägel verfügen, dürfen an den Händen keine Verletzungen haben und keinen Schmuck an den Unterarmen und Händen tragen. Die Probanden müssen mindestens 18 Jahre alt sein.

Eine Woche vor Versuchsbeginn müssen die Probanden auf Substanzen mit antimikrobieller Wirkung (z. B. Seifen und Handcremes mit mikrobiziden Zusätzen) verzichten.

11.3.3 Kontaminationsflüssigkeit

Es werden zwei je 5 ml CSB enthaltende Röhrchen mit dem Testorganismus beimpft und bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ 18 h bis 24 h inkubiert. Mit je einer dieser Kulturen wird eine 1000 ml CSB enthaltende Flasche beimpft, die wiederum bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ während 18 h bis 24 h inkubiert wird. Die danach in einem sterilen Gefäß vereinigten Prüfsuspensionen werden auf eine Koloniezahl zwischen $1,5 \times 10^8$ und $5,0 \times 10^8$ KBE pro ml eingestellt. Diese Kontaminationsflüssigkeit sollte maximal 1 h vor Testbeginn hergestellt werden und danach nicht länger als 4 h zur Kontamination der Hände der Probanden verwendet werden. Eine Sedimentation der Testorganismen ist zu vermeiden.

11.3.4 Kontamination der Hände und Bestimmung der Vorwerte (VW)

➔ zur Inkubation siehe 11.4
➔ zur Auswertung der Vorwerte siehe 11.5

Die Probanden müssen ihre Hände 1 min lang mit 5 ml Kaliseife (➔ *Anhang A1.6.1*) waschen, unter fließendem Leitungswasser abspülen und dann gründlich mit Papierhandtüchern abtrocknen.

Dann werden die Hände bis zur Mitte der Mittelhand 5 s in das Gefäß mit der Kontaminationsflüssigkeit getaucht. Es sollte darauf geachtet werden, dass die angrenzenden Arbeitsflächen nicht kontaminiert werden.

Mit gespreizten Fingern werden die Hände unter langsamem Drehen in waagerechter Haltung 3 min an der Luft getrocknet. Hierdurch soll auch eine Tropfenbildung verhindert werden.

Um den Vorwert zu ermitteln, werden die Kuppen der Finger und des Daumens beider Hände in je eine Schale mit 10 ml CSB (mit Neutralisationsmittel) getaucht und während 1 min ausgeknetet. Aus diesen Sammelflüssigkeiten werden Verdünnungen (10^{-3} und 10^{-4}) in CSB (mit Neutralisationsmittel) hergestellt.

Davon werden 0,1 ml auf CSA + Desoxycholat (⇒ *Anhang A1.4.4*) ausgespatelt. Dies muss spätestens 30 min nach der Probenahme geschehen sein.

11.3.5 Hygienische Händedesinfektion

Je nach Zuteilung müssen sich die Probanden direkt nach der Ermittlung der Vorwerte der Referenz-Händedesinfektion (RP) oder der hygienischen Händedesinfektion mit dem zu prüfenden Produkt (PP) unterziehen.

11.3.5.1 Hygienische Referenz-Händedesinfektion (RP)

3 ml 60 Vol.-%iges Propan-2-ol werden in die hohlen, trockenen Hände gegossen und nach dem Standard-Einreibeverfahren (⇒ *Anhang C2*) während 30 s kräftig verrieben. Um eine vollständige Benetzung der Hände bis zu den Handgelenken sicherzustellen, verfährt man wie folgt:

Je 5-mal

- Handfläche auf Handfläche hin und her,
- mit und ohne gespreizte Finger,
- rechte Handfläche über linken Handrücken und umgekehrt,
- mit verschränkten Fingern in der gegenüberliegenden Handfläche die Außenseite der Finger einreiben und umgekehrt,
- mit dem rechten Daumen kreisende Bewegungen in der linken geschlossenen Handfläche und umgekehrt,
- kreisende Bewegungen der geschlossenen Fingerkuppen in der gegenüberliegenden Handfläche und umgekehrt.

Um eine Gesamt-Einreibzeit von 60 s ohne eine Austrocknung der Hände zu erlangen, muss dieser Vorgang nach 30 s mit einer weiteren 3 ml-Portion 60 Vol.-%iges Propan-2-ol wiederholt werden.

11.3.5.2 Hygienische Händedesinfektion mit dem zu prüfenden Produkt (PP)

Hierbei werden die Anweisungen des Herstellers bezüglich

- der zu verwendenden Menge des Produktes und
 - der Häufigkeit der Anwendungen
- strikt eingehalten und im Prüfbericht dokumentiert.

Die Anwendungsdauer beträgt 30 s oder 60 s.

11.3.6 Bestimmung der Nachwerte (NW)

Sofort nach Ende des jeweiligen Verfahrens (RP oder PP) werden die Fingerkuppen (einschließlich Daumenkuppe) jeder Hand 1 min lang in eine Petrischale mit 10 ml CSB + Neutralisationsmittel getaucht und ausgeknetet (für jede Hand gesondert). Aus der

unverdünnten Sammelflüssigkeit werden 1 ml und 0,1 ml sowie 0,1 ml aus einer Verdünnung 10^{-1} in CSB + Neutralisationsmittel auf CSA + Desoxycholat (→ *Anhang A1.4.4*) ausgespatelt. Dies muss innerhalb von 30 min geschehen. Bei zu hohen Bakterienkonzentrationen wird in einer Wiederholung des Versuches 0,1 ml aus einer Verdünnung 10^{-2} ausgespatelt.

11.4 Inkubation

→ zur Inkubation siehe 11.4

→ zur Auswertung der

Nachwerte siehe 11.5.

Nach 18 h bis 24 h Inkubation bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ werden alle Nährböden ausgezählt und nach weiteren 24 h Inkubation erneut ausgezählt, um auch langsam wachsende Kolonien nachzuweisen. Der höhere Zählwert wird bei der Auswertung herangezogen.

11.5 Auswertung

Es werden vorrangig Nährböden ausgezählt, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 14 und 330 liegt. Nachwerte mit weniger als 14 Kolonien oder keinem Wachstum, auch wenn 1 ml unverdünnter Sammelflüssigkeit ausgespatelt worden ist, können berücksichtigt werden, da dies ein Hinweis auf ein sehr wirksames Produkt sein kann. Liegen die Koloniezahlen aus aufeinanderfolgenden Verdünnungen im o. a. Zählbereich, wird hieraus das gewichtete Mittel nach folgender Formel berechnet:

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

Dabei ist

c die Summe der gezählten Kolonien auf allen ausgewerteten Nährböden

n₁ die Anzahl der ausgewerteten Nährböden mit der ersten Verdünnung

n₂ die Anzahl der ausgewerteten Nährböden mit der zweiten Verdünnung

d der Verdünnungsfaktor der ersten ausgewerteten Verdünnung

Wird jeweils nur ein Nährboden pro Verdünnung eingesetzt, ergibt sich die Summe in der Klammer des Divisors von 1,1.

Sind die Koloniezahlen bei den unterschiedlichen Verdünnungsschritten stark disproportional, könnte dies ein Hinweis auf eine unzureichende Neutralisation sein.

Die Koloniezahlen je ml Sammelflüssigkeit werden dekadisch logarithmiert, wobei aus rechnerischen Gründen die „0“-Werte ($\lg 0 = \infty$) gleich „1“ ($\lg 1 = 0$) gesetzt werden. Dabei muss beachtet werden, dass „0“-Werte nur bei Nachwerten und besonders wirksamen Produkten auftreten dürften, so dass diese Regel zu einer tendenziellen Unterbewertung der antimikrobiellen Wirksamkeit eines Produktes führen kann.

Die logarithmierten Werte (Vor- und Nachwerte) der linken und der rechten Hand jedes Probanden werden gemittelt, wodurch sich durch diese doppelte Wichtung die Prä-

zision erhöht. Pro Proband wird dann aus der Differenz zwischen den jeweils gemittelten Vorwerten und Nachwerten die individuelle Reduktion ermittelt ($\lg R = \lg VW - \lg NW$). Aus den arithmetischen Mittelwerten aller individuellen Reduktionen ergeben sich die mittleren Reduktionen für das Referenz- und das Prüfverfahren. Es muss dokumentiert werden, ob der Proband zu Gruppe 1 (RP \rightarrow PP) oder Gruppe 2 (PP \rightarrow RP) gehört.

11.6 Verifizierung des Versuches

Für den Vergleich der Ergebnisse der Verfahren RP und PP und zur Bewertung des Prüfverfahrens PP müssen die in \rightarrow 11A genannten Anforderungen erfüllt sein.

11.7 Signifikanzprüfung

Die Differenz der Mittelwerte der Reduktion muss auf statistische Signifikanz geprüft werden. Es ist zu belegen, dass das Prüfprodukt dem Referenzprodukt nicht unterlegen ist. Die Prüfung erfolgt gemäß den Verfahren nach Hodges&Lehmann.

Die Prüfung der Daten aus einem Lateinischen-Quadrat-Experiment wird ebenfalls mit einem Test auf Nicht-Unterlegenheit vorgenommen. Dabei werden die Mittelwerte von mehr als einem Prüfverfahren mit denen des Referenzverfahrens paarweise verglichen.

Auf Grund der vorwiegend bestätigenden Natur der Prüfung bei dieser Anwendung wird das Signifikanzniveau mit $p = 0,025$ festgesetzt. Es ist eine einseitige Prüfung durchzuführen.

Die Grenze für Unterlegenheit beträgt 0,6 lg-Einheiten.

Zukünftige Änderungen der EN 1500 werden bei der Beurteilung durch den VAH berücksichtigt.

11A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Bakterien (außer Mykobakterien) und Hefen

Orientierend

- *Bestimmung der bakterio- und levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel (Methode 7)*
- *Bestimmung der bakteriziden Wirkung im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8) – orientierend –. Nicht notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch alle Gram-negativen Testorganismen getestet werden (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*); Prüfbedingungen s. Tabelle 11.1*

Tabelle 11.1: Prüfbedingungen im qualitativen Suspensionsversuch.

Erforderliche Reduktion: Kein Wachstum in den Kulturröhrchen nach 48 h.

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten ²
Hygienische Händedesinfektion (Einreibeverfahren)	<i>E. coli</i> K12	ohne	Konzentrat	20 ± 1	15 s
	<i>P. aeruginosa</i>				30 s
	<i>P. mirabilis</i>				1 min

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (⇒ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens die 3 angegebenen Einwirkzeiten getestet werden.

Obligat

– Bestimmung der bakteriziden bzw. levuroziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9.1 bzw. EN 13727 [3] und EN 13624 [4]); Prüfbedingungen s. Tabelle 11.2

Das zu prüfende Produkt muss die Koloniezahl der in ⇒ Tabelle 11.2 und Tabelle 11.3 genannten Testorganismen unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit (30 s bzw. 1 min) bei 20 °C mindestens um 5 lg-Stufen sowie von *Candida albicans* mindestens um 4 lg-Stufen vermindern.

Tabelle 11.2: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten ²
Hygienische Händedesinfektion (Einreibeverfahren)	<i>S. aureus</i>	hohe	Konzentrat (80 bzw. 97 %)	20 ± 1	15 s
	<i>E. hirae</i>				30 s
	<i>P. aeruginosa</i>				1 min
	<i>E. coli</i> K12 ³				
	<i>P. mirabilis</i> ³				
	<i>C. albicans</i>				

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (⇒ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens die 3 angegebenen Einwirkzeiten getestet werden.

³ Wenn im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa*.

Tabelle 11.3: Anforderungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Wirkungsbereich	Bakterizide Wirksamkeit	Levurozide Wirksamkeit
Reduktion	5 lg-Stufen	4 lg-Stufen
Belastung	hohe Belastung	hohe Belastung
Testorganismen	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ¹ <i>P. mirabilis</i> ¹	<i>C. albicans</i>

¹ Prüfung ist erforderlich, wenn diese Testorganismen im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *Pseudomonas aeruginosa* sind bzw. kein qualitativer Suspensionsversuch durchgeführt worden ist.

– Hygienische Händedesinfektion – praxisnaher Versuch mit Probanden (Methode 11 bzw. DIN EN 1500 Phase 2/Stufe 2 [1])

Für den Vergleich der Ergebnisse des Prüf- und des Referenzverfahrens und zur Bewertung des Prüfverfahrens müssen die folgenden Anforderungen erfüllt sein:

- Von mindestens 18 Probanden müssen verwertbare Ergebnisse vorliegen.
- Der Gesamtmittelwert der Vorwerte für RP und PP muss mindestens 5 lg betragen.
- Bei RP dürfen nicht mehr als drei einzelne lg-Reduktionen <3 auftreten und die absolute Differenz der mittleren Differenzen zwischen den lg-Reduktionen von Gruppe RP → PP und Gruppe PP → RP muss weniger als 2 betragen.
- Alle Quotienten gewichteter mittlerer Koloniezahlen müssen zwischen 5 und 15 liegen.

Literatur

1. DIN EN 1500:2013-07. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Hygienische Händedesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).
2. Wilcoxon F and Wilcoxon RA (1964). Some rapid approximate statistical procedures. Pearl River, New York, Lederle Laboratories. (z.B. in Lothar Sachs (1992): Angewandte Statistik. 7. Auflage, Springer-Verlag).
3. DIN EN 13727:2014-3. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
4. DIN EN 13624:2013-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).

Wirksamkeitsprüfung von alkoholischen Schäumen zur hygienischen Händedesinfektion

Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

■ Schaumarten und Wirkstoffgehalt

In der Literatur werden verschiedene kommerziell erhältliche Schäume auf Alkoholbasis zur hygienischen Händedesinfektion beschrieben, die alle nur Ethanol als Wirkstoff und eine oder mehrere schaumbildende Substanzen wie beispielsweise PEG-12 Dimethicone enthalten [1]. Diese Schäume können als Sprayschaum mit Treibgas oder als Pumpschaum ohne Treibgas vorliegen. Viele der Schäume enthalten vergleichsweise niedrige Wirkstoffkonzentrationen. Nachfolgend werden diese wegen der besseren Vergleichbarkeit mit konventionellen Händedesinfektionsmittel-Lösungen durchgängig in Gewichtsprozent angegeben und wurden somit umgerechnet, wenn sie ursprünglich in Volumenprozent angegeben waren. Es gibt Schäume mit 52,1% Ethanol (umgerechnet von 60% v/v) [2], 54,1% Ethanol (umgerechnet von 62% v/v) [3, 4, 5, 6], 62,4% Ethanol (umgerechnet von 70% v/v) [2, 4, 7–10] sowie 80% Ethanol [1]. In Deutschland finden sich bei Lösungen zur Händedesinfektion typischerweise Konzentrationen von 80% bis 85% Ethanol. Die im Vergleich dazu eher niedrige Ethanolkonzentration vieler Schäume könnte ein Grund dafür sein, dass die tendenziell schwächere Wirksamkeit weniger mit dem Schaum selbst als mit der Konzentration des Wirkstoffs erklärt werden kann [11].

■ Veröffentlichte Daten zur Wirksamkeit von Schäumen nach EN 1500

In zwei Studien wurde die bakterizide Wirksamkeit alkoholischer Schäume nach EN 1500 untersucht [1, 9]. In der Studie von Macinga et al. war ein Schaum auf Basis von 62,4% Ethanol (umgerechnet von 70% v/v) in 30 s nur dann ausreichend wirksam, wenn 3 ml verwendet wurden. Wenn das Produkt jedoch in einer Dosis angewendet wurde, die beide Hände über 30 s feucht hält (1,6 ml), dann wurde die Wirksam-

keitsanforderung der EN 1500 nicht erfüllt. Leider wird nicht gesagt, ob das Produkt mit oder ohne Aufschäumen angewendet wurde. Die gleiche Diskrepanz wurde auch für die Wirksamkeitsprüfung einer Lösung auf Basis von 73,5% Ethanol (umgerechnet von 80% v/v; 3 ml versus 2 ml) und eines Gels auf Basis von 85% Ethanol (3 ml versus 2,1 ml) beschrieben [9]. Daraus lässt sich ableiten, dass 3 ml eines Schaumprodukts auf Basis von Ethanol die Wirksamkeitsanforderungen der EN 1500, wie auch eine Lösung oder ein Gel, sehr wohl erfüllen kann. Weiterhin lässt sich ableiten, dass das angewendete Volumen und damit die Kontaktzeit zur transienten Flora der Hände bis zum Abtrocknen des Ethanols einen beachtlichen Einfluss auf die Wirksamkeit nach EN 1500 haben.

In der zweiten Studie wurden drei Formulierungen von jeweils 53,7% *iso*-Propanol (umgerechnet von 60% v/v) und von 73,5% Ethanol (umgerechnet von 80% v/v) auf ihre Wirksamkeit nach EN 1500 untersucht: eine Lösung, ein zu Studienzwecken im Labor hergestelltes einfaches Gel und ein mit dem gleichen Ziel hergestellter einfacher Schaum. 3 ml der jeweiligen Formulierungen auf Basis von 53,7% *iso*-Propanol waren als Lösung (Reduktion um 4,2 log-Stufen), als Gel (Reduktion um 4,3 log-Stufen) und als Schaum (Reduktion um 4,2 log-Stufen), vergleichbar bakterizid wirksam, jedoch alle dem Referenzverfahren unterlegen. Das gleiche Bild zeigte sich für 73,5% Ethanol. Auch hier waren 3 ml der jeweiligen Formulierungen als Lösung (Reduktion um 4,0 log Stufen), als Gel (Reduktion um 4,5 log Stufen) und als Schaum (Reduktion um 4,3 log Stufen) vergleichbar bakterizid wirksam und ebenfalls dem Referenzverfahren unterlegen [1]. Daraus lässt sich ableiten, dass die Art der Formulierung (Lösung, Gel oder Schaum) keinen Ein-

**Verbund für Angewandte Hygiene e.V.
Desinfektionsmittel-Kommission**

Verantwortlich:
Prof. Dr. med. Martin Exner
(Vorsitzender)
Dr. rer. nat. Jürgen Gebel
(Schriftführer)

c/o Institut für Hygiene und
Öffentliche Gesundheit der
Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
53127 Bonn
Tel: 0228 287-14022
Fax: 0228 287-19522
E-Mail: info@vah-online.de
Internet: www.vah-online.de

fluss auf die bakterizide Wirkung nach EN 1500 aufweist. In derselben Studie wurden die Trocknungszeiten der Formulierungen untersucht. Hier fanden sich keine relevanten Unterschiede zwischen Lösungen und Schäumen auf Basis von 53,7% *iso*-Propanol bzw. 73,5% Ethanol, lediglich bei den Gelen war die Trocknungsdauer signifikant länger [1].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei der Verwendung alkoholischer Schäume zur hygienischen Händedesinfektion von der gleichen Wirksamkeit ausgegangen werden kann wie bei flüssigen Produkten, solange die Wirksamkeitsanforderungen der EN 1500 unter praxisrelevanten Anwendungsbedingungen (als Schaum geprüft) nachweislich erfüllt werden.

■ Wird durch die EN 1500 die Anwendung von Schäumen abgedeckt?

Gemäß der EN 1500 werden Produkte „zur hygienischen Händedesinfektion“ geprüft [12]. Darunter versteht man die Anwendung und das Verreiben eines Produkts auf den Händen ohne den Zusatz von Wasser zur Reduktion der transienten Flora [13]. Üblicherweise sind diese Produkte auf Basis von Ethanol oder *n*- oder *iso*-Propanol. In der Norm finden sich keine Einschränkungen hinsichtlich der Darreichungsform bzw. Art der Formulierung eines Produkts zur hygienischen Händedesinfektion. Nach Erfüllung der Anforderungen der Norm kann das Produkt somit eine Lösung, ein Gel mit erhöhter Viskosität oder auch ein Schaum sein, solange es als Indikation die hygienische Händedesinfektion ausweist und ohne den Zusatz von Wasser angewendet wird. In der Folge hat das Produkt innerhalb von 30 bis 60 s die Wirksamkeitsanforderungen zu erfüllen, wenn es nach Herstellerangaben angewendet wird. Vom Hersteller sind das zu verwendende Volumen des Produkts (z.B. 3 ml), die Häufigkeit der Anwendung (z.B. 1 × 3 ml) und die Einwirkzeit anzugeben (z.B. 1 × 3 ml in 30 s) [12].

■ Prüfung alkoholischer Schäume zur hygienischen Händedesinfektion (VAH-Zertifizierung)

Schäume zur hygienischen Händedesinfektion sind neue Zubereitungsformen. Obwohl sie zur hygienischen Händedesinfektion somit durch die EN 1500 bzw. VAH-Methode 11 formal ab-

gedeckt sind, sind für deren Wirksamkeitsprüfung produktspezifische Aspekte zu berücksichtigen [14].

- 1) Das Produkt muss nach EN 1500 bzw. VAH-Methode 11 als Schaum geprüft werden, da es nur als Schaum vom Anwender verwendet wird. Die Prüfung des Produktes nach EN 1500 bzw. VAH-Methode 11 als Lösung ohne Aufschäumen ist aus diesem Grund nicht normkonform.
- 2) Herstellern von Schäumen zur hygienischen Händedesinfektion wird empfohlen, auf dem Produkt für den Anwender eindeutig zu kennzeichnen, ob das Produkt als Schaum geprüft wurde (z.B. „als Schaum wirksam nach EN 1500“) oder nicht. Alle nach dem 01.12.2019 vom VAH zertifizierten Händedesinfektionsverfahren, die als Schaum appliziert werden, wurden nach EN 1500 bzw. VAH-Methode 11 als Schaum getestet.
- 3) Die Angabe des zu verwendenden Produktvolumens ist bei Lösungen und Gelen einfach, bei Schäumen hingegen nicht. Die geprüfte Produktmenge soll deshalb idealerweise in Anzahl der Hübe (z.B. beim Pumpschaum) und zusätzlich in Gramm als Gesamtmenge angegeben werden. Die Anzahl der Hübe wird von der Art der Pumpe abhängen. Diese muss für jeden zu prüfenden Pumpschaum als Dosier- und Aufschäumhilfe vom Hersteller zur Wirksamkeitsprüfung mit angegeben werden, einschließlich der erwarteten Mengenangabe eines Hubs für den zu prüfenden Schaum in Gramm. Bei der Prüfung von Sprayschäumen ist die Mengenangabe Schaum pro Anwendung in g ausreichend.

■ Relevante Aspekte für die Anwendung

Für die Praxis gilt es zu berücksichtigen, dass die Anwendung von Schäumen nur dann erfolgen sollte, wenn der Hersteller die Wirksamkeit des Produktes als Schaum geprüft hat – dies ist bei VAH-zertifizierten Produkten mit Zertifikatsdatum nach dem 01.12.2019 gegeben. Im Zweifelsfall wird empfohlen, dass der Anwender den Hersteller dazu befragt und sich diese Auskunft schriftlich bestätigen lässt oder auf flüssige Händedesinfektionsmittel ausweicht.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass bei der Anwendung von Schäumen

zur hygienischen Händedesinfektion in Abhängigkeit vom Wirkstoff, seiner Konzentration und der erforderlichen Produktmenge pro Anwendung eine tatsächliche Dauer des Feuchthaltes der Hände resultiert, die möglicherweise weit über die 30 s hinausgeht, insbesondere bei Produkten mit eher niedrigem Alkoholgehalt. Dabei können sich die Hände nach der Anwendung von 3 ml Schaum klebriger und weniger sauber anfühlen im Vergleich zur Anwendung von 3 ml eines flüssigen Händedesinfektionsmittels [15]. Bisher ungeklärt ist, ob sich der Schaumbildner ungünstig auf die Hautverträglichkeit auswirkt. Die Anwendung von PEG-12 gilt nur auf intakter Haut als unbedenklich, nicht jedoch auf geschädigter bzw. irritierter Haut [16]. Für PEG 400 gibt es in ca. 4% der Fälle bei Patienten mit geschädigter Haut positive Reaktion als Kontaktallergen [17]; insofern erscheint eine Risikoabklärung für PEG-12 in Kombination mit Alkoholen auf Grund der Anwendungsdauer während des gesamten Berufslebens notwendig. Da PEG die dermale Resorption fördern können, sollte untersucht werden, ob die Alkoholresorption verstärkt wird, was vor allem für Propanole toxikologisch relevant sein könnte.

■ Danksagung

Wir danken Herrn Prof. Dr. med. Günter Kampf (Hamburg) für seine aktive Mitarbeit.

■ Literatur

1. Wilkinson MAC, Ormandy K, Bradley CR, Hines J. A comparison of the efficacy and drying times of liquid, gel and foam formats of alcohol based hand rubs. *J Hosp Infect.* 2017;98:359–364.
2. Edmonds SL, Macinga DR, Mays-Suko P, Duley C, Rutter J, Jarvis WR et al. Comparative efficacy of commercially available alcohol-based hand rubs and World Health Organization-recommended hand rubs: formulation matters. *Am J Infect Control.* 2012;40:521–525.
3. Edmonds SL, Macinga DR, Mays-Suko P, Duley C, Rutter J, Jarvis WR et al. Comparative efficacy of commercially available alcohol-based hand rubs and World Health Organization-recommended hand rubs: formulation matters. *Am J Infect Control.* 2012;40:521–525.
4. Edmonds SL, Mann J, McCormack RR, Macinga DR, Fricker CM, Arbogast

- JW et al. SaniTwice: a novel approach to hand hygiene for reducing bacterial contamination on hands when soap and water are unavailable. *J Food Prot.* 2010;73:2296–2300.
5. Kampf G, Marschall S, Eggerstedt S, Ostermeyer C. Efficacy of ethanol-based hand foams using clinically relevant amounts: a cross-over controlled study among healthy volunteers. *BMC Infect Dis.* 2010;10:78.
 6. Larson EL, Cohen B, Baxter KA. Analysis of alcohol-based hand sanitizer delivery systems: efficacy of foam, gel, and wipes against influenza A (H1N1) virus on hands. *Am J Infect Control.* 2012;40:806–809.
 7. Edmonds-Wilson S, Campbell E, Fox K, Macinga D. Comparison of 3 in vivo methods for assessment of alcohol-based hand rubs. *Am J Infect Control.* 2015;43:506–509.
 8. Macinga DR, Edmonds SL, Campbell E, Shumaker DJ, Arbogast JW. Efficacy of novel alcohol-based hand rub products at typical in-use volumes. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013;34:299–301.
 9. Macinga DR, Shumaker DJ, Werner HP, Edmonds SL, Leslie RA, Parker AE et al. The relative influences of product volume, delivery format and alcohol concentration on dry-time and efficacy of alcohol-based hand rubs. *BMC Infect Dis.* 2014;14:511.
 10. Marra AR, Camargo TZ, Cardoso VJ, Moura DF, Jr., Casemiro de Andrade E, Wentzovitch J et al. Hand hygiene compliance in the critical care setting: a comparative study of 2 different alcohol handrub formulations. *Am J Infect Control.* 2013;41:136–139.
 11. Kampf G. Ethanol. In: Kampf G, editor. *Kompodium Händehygiene.* Wiesbaden: mhp-Verlag; 2017. p. 325–351.
 12. EN 1500:2013. Chemical disinfectants and antiseptics. Hygienic hand disinfection. Test method and requirement (phase 2, step 2). Brussels: CEN - Comité Européen de Normalisation; 2013.
 13. EN 14885:2015. Chemical disinfectants and antiseptics. Application of European standards for chemical disinfectants and antiseptics. Brussels: CEN - Comité Européen de Normalisation; 2015.
 14. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.). *Methoden und Anforderungen zur VAH-Zertifizierung von chemischen Desinfektionsverfahren.* Inkl. 4. Ergänzungslieferung mit Stand 15.6.2019. mhp Verlag: Wiesbaden, 2019.
 15. Greenaway RE, Ormandy K, Fellows C, Hollowood T. Impact of hand sanitizer format (gel/foam/liquid) and dose amount on its sensory properties and acceptability for improving hand hygiene compliance. *J Hosp Infect.* 2018;100:195-201.
 16. Anonym. Amended Safety Assessment of PEG Propylene Glycol Derivatives as Used in Cosmetics. Cosmetic Ingredient Review. 2017: <https://www.cir-safety.org/sites/default/files/pegp-ge122016rep.pdf>.
 17. Kramer A, Reichwagen S, Below H, Heldt P, Weber U, Widulle H et al. *Alkohole.* In: Kramer A et al., editors. *Wallhäußers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2008. p. 643–669.

Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

Voraussetzungen zur VAH-Zertifizierung chlorbasierter Händedesinfektionsmittel

Fachinformation für Antragsteller und Laboratorien

■ Ergänzende Anforderungen zur Zertifizierung chlorbasierter Händedesinfektionsmittel

Unter Bezugnahme auf die bereits veröffentlichte Mitteilung „Chlorbasierte Desinfektionsmittel: Anforderungen an die Zertifizierung durch den VAH“ [1] möchte die Desinfektionsmittel-Kommission im VAH folgende Ergänzung hinzufügen:

In jüngster Zeit werden vermehrt Händedesinfektionsmittel auf der Basis elektrolytisch hergestellter wässriger Chlorlösungen mit den Wirkstoffangaben Natrium-Hypochlorit und/oder hypochlorige Säure angeboten.

Erfahrungen bei dauerhaftem Einsatz in Bezug auf die Hautverträglichkeit liegen derzeit noch nicht vor.

Die Desinfektionsmittel-Kommission im VAH hat am 03.07.2020 beschlossen, Produkte auf der Basis elektrolytisch hergestellter wässriger Chlorlösungen für den Bereich Händedesinfektion nicht zur VAH-Zertifizierung zu akzeptieren, solange die Pro-

dukte nicht entsprechend Biozid-Meldeverordnung zugelassen sind oder eine Arzneimittelzulassung vorweisen können [vgl. 1, 2].

Eine Registrierung zum Genehmigungsverfahren des Wirkstoffs ist nicht ausreichend. Eine Registriernummer (N-XXXXXX) der BAuA darf nicht mit einer Zulassung (gekennzeichnet durch eine Zulassungsnummer des Formats EU-XXXXXXXX-XXXX oder DEXXXXXXXXX-XX-XXXX-XX) verwechselt werden.

■ Literatur

1. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.) Chlorbasierte Desinfektionsmittel: Anforderungen an die Zertifizierung durch den VAH. HygMed 2020;45(6):107–108.
2. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.) Qualitätskennzeichen für den Einkauf von Händedesinfektionsmitteln. HygMed 2020;45(5):73–75.

Verbund für Angewandte Hygiene e.V. Desinfektionsmittel-Kommission

Verantwortlich:
Prof. Dr. med. Martin Exner
(Vorsitzender)
Dr. rer. nat. Jürgen Gebel
(Schriftführer)

c/o Institut für Hygiene und
Öffentliche Gesundheit der
Universität Bonn
Venusberg-Campus 1
53127 Bonn
Tel: 0228 287-14022
Fax: 0228 287-19522
E-Mail: info@vah-online.de
Internet: www.vah-online.de

Die VAH-Mitteilungen dieser Ausgabe wurden erarbeitet von der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH:

Dr. Bärbel Christiansen (stellvertretende Vorsitzende), Dr. M. Decius, Priv.-Doz. Dr. M. Eggers, Prof. Dr. Martin Exner (Vorsitzender), Dr. J. Gebel (Schriftführer), Dr. S. Gemein, Priv.-Doz. Dr. S. Gleich, Dr. B. Hunsinger, Prof. Dr. A. Kramer, Prof. Dr. H. Martiny, Priv.-Doz. Dr. F. Pitten, Dr. J. Steinmann, Assoc. Prof. Priv.-Doz. Dr. M. Suchomel, Prof. Dr. L. Vossebein, Prof. Dr. C. Wendt, Prof. Dr. M. H. Wolff

Unter fachlicher Beratung von:

Priv.-Doz. Dr. Ch. Brandt (Gast für DGHM), F. Helm (Gast für Bundeswehr), Dr. K. Günnewig (Gast für BAuA), Dr. B. Hornei, Dipl.-Biol. A. Jacobshagen (Gast für BfArM), M.Sc. K. Konrat (Gast für RKI), Prof. Dr. U. Rösler (Gast für DVG), Priv.-Doz. Dr. K. Schröppel (Gast für DGHM), Dr. I. Schwebke (Gast für RKI), Dr. J. Tatzel, Dr. U. Teichert (Gast für BVÖGD)

16. Suneja T, Belsito DV. Occupational dermatoses in health care workers evaluated for suspected allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 2008; 58(5):285–290. Abrufbar unter https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0536.2007.01315.x?casa_token=2eMiVok8QFwAAAAA%3Am6OS-mHRofArpB9uWDIPiVbjyvcA_3Je7vK_ljOhQ0Lh4mGFoqbq6FD3XzxxE_lqN1H-z8Dc15Y3JO8A
17. Anderson SE, Shane H, Long C, Lukomska E, Meade BJ, Marshall NB. Evaluation of the irritancy and hypersensitivity potential following topical application of didecylidimethylammonium chloride. *J of Immunotoxicology* 2016; 13(4):557–566. DOI: 10.3109/1547691X.2016.1140854
18. Shane HL, Lukomska E, Stefaniak AB, Anderson SE. Divergent hypersensitivity responses following topical application of the quaternary ammonium compound, didecylidimethylammonium bromide. *J of Immunotoxicology* 2017;14(1):204–214. DOI: 10.1080/1547691X.2017.139726

Ergänzung der Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission aus *Hygiene & Medizin* 10/2020*

Fachinformationen für Antragsteller und Prüflaboratorien:

Ergänzende Informationen zur Testung des 1-min-Wertes bei gebrauchsfertigen Desinfektionsmittel-Tüchern

Stand: 6. Juli 2021

Die Desinfektionsmittel-Kommission zertifiziert seit Mitte 2020 auch Einwirkzeiten von 1 min für die Flächen-desinfektion mit und ohne Mechanik.

Für die VAH-Zertifizierung soll der Grenzbereich der Wirksamkeit durch Prüfung unterschiedlicher Konzentrationen und/oder Einwirkzeiten dargestellt werden [1]. Für den Bereich der Flächendesinfektion wird im praxisnahen Test bei einem Leistungswert von 5 min deshalb zusätzlich die Prüfung bei 1 min gefordert. Die Desinfektionsmittel-Kommission weist darauf hin, dass **Einwirkzeiten < 1 min bei der Testung mit Mechanik nicht akzeptiert werden**, da diese versuchstechnisch nicht eingehalten werden können.

Zur Darstellung des Grenzbereichs werden für die Einwirkzeit von 1 min **Testungen unterschiedlicher Konzentrationen** gefordert. Für die Testung von ready-to-use Tuchsyste-men sind

dem Prüflabor zusätzlich zum Produkt **trockene Tücher und das Desinfektionsmittelkonzentrat** zur Herstellung der entsprechenden Konzentrationsabstufungen bereitzustellen.

Ist die Bereitstellung von Desinfektionsmitteltüchern und separatem spezi-fischen, trockenen Tuch für das zu prü-fende ready-to-use Tuchsyste-m nicht möglich, ist die Prüfung im 1. Durchgang mit zwei Einwirkzeiten durchzu-führen. Für die Einwirkzeit von 1 min muss in diesem Fall die 5-min-Einwirk-zeit im 1. Durchgang mitgeprüft wer-den, da sich in einigen Prüfberichten die Wirksamkeit bei 5 min (Wirkstoff ggf. evaporiert) ungünstiger dargestellt hat als bei 1 min.

Im 2. Durchgang muss die Wirk-samkeit des 1-min-Wertes mit jeweils 2 Testflächen für die beiden resistentesten Testorganismen (Bakterizidie/Le-vurozidie) aus dem ersten Durchgang

bestätigt werden. Bei Auslobung ande-rer Wirksamkeitsspektren muss dies für die jeweiligen Testorganismen zusätz-lich beigebracht werden.

■ Literatur

1. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.). Methoden und Anforderungen zur VAH-Zertifizierung von chemischen Desinfektionsverfahren. mhp Verlag: Wiesbaden, 2015. Mit Ergänzungslieferungen (Stand: Juni 2019). [Hinweis: Download über die VAH-Webseite]

* Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Fachinformationen zur Flächendesinfektion für Antragsteller und Laboratorien. Anforderungen zur Zertifizierung einer Einwirkzeit von 1 min für die Flächendesinfektion. *HygMed* 2020;45(10):171. Download über: https://vah-online.de/files/download/vah-mitteilungen/VAH_Sch%C3%A4ume%20Fl%C3%A4che%20EWZ_HM_10_20.pdf

Die Mitteilungen dieser Ausgabe wurden erarbeitet von der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

Die Mitglieder der Desinfektionsmittel-Kommission:

Dr. B. Christiansen (stellvertretende Vorsitzende), Dr. M. Decius, Priv.-Doz. Dr. M. Eggers, Prof. em. Dr. M. Exner (Vorsitzender), Dr. J. Gebel (Schriftführer), Dr. S. Gemein, Priv.-Doz. Dr. S. Gleich, Dr. Britt Hornei, Dr. B. Hunsinger, Prof. Dr. A. Kramer, Prof. Dr. H. Martiny, Priv.-Doz. Dr. F. Pitten, Priv.-Doz. Dr. K. Schröppel, Dr. I. Schwabke, Dr. J. Steinmann, Assoc. Prof. Priv.-Doz. Dr. M. Suchomel, Dr. J. Tatzel, Prof. Dr. L. Vossebein, Prof. Dr. C. Wendt, Prof. Dr. M. H. Wolff

Unter fachlicher Beratung von:

P. Ahl, Fachapothekerin für Klinische Pharmazie (Gast für ABDA), Priv.-Doz. Dr. Ch. Brandt (Gast für DGHM), F. Helm (Gast für Bundeswehr), Dr. A. Jacobshagen (Gast für BfArM), I. Klöckner (Gast für VHD), M.Sc. K. Konrat (Gast für RKI), Prof. Dr. U. Rösler (Gast für DVG), Dr. U. Teichert (Gast für BVÖGD), Dr. V. Weinheimer (Gast für BAuA)

Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

Volumenangabe bei der Listung von hygienischen Händedesinfektionsmitteln

Stand: 1. November 2021

■ Anwendung von hygienischen Händedesinfektionsmitteln

Für eine sichere Anwendung der hygienischen Händedesinfektion sind die Wirksamkeit des Produktes, das Einhalten der Einwirkzeit und eine vollständige Benetzung der Hände über den Zeitraum der Einwirkzeit von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der unterschiedlichen Handgrößen und Hautspezifika der Anwenderinnen und Anwender kann das erforderliche Volumen für eine vollständige Benetzung über die Einwirkzeit variieren. Deswegen wurde auf eine Volumenangabe in der Desinfektionsmittel-Liste bisher verzichtet und eine vollständige Benetzung über die komplette Einwirkzeit (30 s bzw. 60 s) vorausgesetzt.

■ Praxisnaher Versuch mit Proband*innen

Für die praxisnahe Prüfung der Wirksamkeit der hygienischen Händedesinfektion wird in der VAH-Methode 11 [1] und in der DIN EN 1500 [2] vorgegeben, dass das zu prüfende Verfahren dem Referenzverfahren nicht unterlegen sein darf.

Für das Referenzverfahren wird 60Vol.%iges Propan-2-ol mit einer Ein-

wirkzeit von 60 s vorgegeben. Als Volumen werden 2×3 ml appliziert, wovon 3 ml zu Beginn und eine weitere 3 ml-Portion nach 30 s aufgebracht werden. So wird eine vollständige Benetzung der Hände ohne Austrocknung über die vorgeschriebene Anwendungsdauer von insgesamt 60 s gewährleistet.

Das zu prüfende Verfahren wird nach Anweisungen des Herstellers eingesetzt. Die zu verwendende Menge (Volumen) des Produktes und die Dauer der Anwendung werden vom Hersteller vorgegeben und müssen strikt eingehalten werden. Dabei sind im Grunde ausschließlich 30 s und 60 s als praktikable Einwirkzeiten vorgegeben.

In der Vergangenheit haben sich 3 ml-Portionen bewährt, weil die Erfahrungen aus den Referenzverfahren die vollständige Benetzung der Probandenhände über die Einwirkzeit von 30 s bestätigt haben.

Dieser Umstand hat auch auf die Ausgestaltung von manuellen und automatischen Spendersystemen Einfluss genommen und zu Dosiermengen von 1,5 ml bei manuellen (zweimalige Betätigung des Spenders) bzw. 3 ml bei automatischen Spendersystemen geführt.

Verbund für Angewandte Hygiene e.V. Desinfektionsmittel-Kommission

Verantwortlich:
Prof. Dr. med. Martin Exner
(Vorsitzender)
Dr. rer. nat. Jürgen Gebel
(Schriftführer)

c/o Institut für Hygiene und
Öffentliche Gesundheit der
Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
53127 Bonn
Tel: 0228 287-14022
Fax: 0228 287-19522
E-Mail: info@vah-online.de
Internet: www.vah-online.de

Die VAH-Mitteilungen der aktuellen Ausgabe wurden erarbeitet von der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

Die Mitglieder der Desinfektionsmittel-Kommission:

Dr. B. Christiansen (stellvertretende Vorsitzende), Dr. M. Decius, Priv.-Doz. Dr. M. Eggers, Prof. em. Dr. M. Exner (Vorsitzender), Dr. J. Gebel (Schriftführer), Dr. S. Gemein, Priv.-Doz. Dr. S. Gleich, Dr. Britt Hornei, Dr. B. Hunsinger, Prof. Dr. A. Kramer, Prof. Dr. H. Martiny, Priv.-Doz. Dr. F. Pitten, Priv.-Doz. Dr. K. Schröppel, Dr. I. Schwebke, Dr. J. Steinmann, Assoc. Prof. Priv.-Doz. Dr. M. Suchomel, Dr. J. Tatzel, Prof. Dr. L. Vossebein, Prof. Dr. C. Wendt, Prof. Dr. M. H. Wolff

Unter fachlicher Beratung von:

P. Ahl, Fachapothekerin für Klinische Pharmazie (Gast für ABDA), Priv.-Doz. Dr. Ch. Brandt (Gast für DGHM), F. Helm (Gast für Bundeswehr), Dr. A. Jacobshagen (Gast für BfArM), I. Klöckner (Gast für VHD), M.Sc. K. Konrat (Gast für RKI), Dr. A. Marcic (Gast für MSGJFS), Prof. Dr. U. Rösler (Gast für DVG), Dr. U. Teichert (Gast für BVÖGD), Dr. V. Weinheimer (Gast für BAuA)

Seit kurzem finden sich in den Prüfberichten für Händedesinfektionsmittel zunehmend Volumenangaben, die von den 3 ml-Portionen abweichen und 4- bis 6 ml-Portionen für die Probanden im Test der zu prüfenden Produkte vorgeben. Das bedeutet, dass bei diesen Produkten die Wirksamkeit im Test nur bestätigt wurde, wenn die im Bericht genannte Menge an Desinfektionsmittel auf die Hände der Probanden gegeben wurde.

Diesem Umstand möchte der VAH Rechnung tragen, weil dies auch Einfluss auf die Wirksamkeit der Produkte in der Praxis nehmen kann. Aus diesem Grund werden künftig alle hygienischen Händedesinfektionsmittel mit

der erforderlichen Mengenangabe (Volumen) in der VAH-Liste kenntlich gemacht.

Sofern Angaben abweichend von 3 ml gemacht werden, sollte geprüft werden, ob mit den vorhandenen Dosiersystemen über die gesamte Einwirkzeit eine ausreichende Benetzung der Hände gewährleistet wird. Anderenfalls sind die Dosiersysteme so zu kalibrieren, dass mit den abgegebenen Desinfektionsmittel-Portionen eine ausreichende Benetzung der Hände gewährleistet werden kann. Dies betrifft auch alle Verfahren, bei denen derzeit noch keine Volumenangaben gemacht wurden. Die Volumenangaben werden ab sofort bei Neuanträgen bzw. Rezer-

tifizierungen von Händedesinfektionsmitteln auf dem Zertifikat und in der VAH-Liste mit aufgeführt.

■ Literatur

1. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.). Methoden und Anforderungen zur VAH-Zertifizierung von chemischen Desinfektionsverfahren. mhp Verlag Wiesbaden, 2015. Mit Ergänzungslieferungen (Stand: Juni 2019). [Hinweis: Download über die VAH-Webseite]
2. DIN EN 1500:2017-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Hygienische Händedesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/ Stufe 2); Deutsche Fassung EN 1500:2017.

Chirurgische Händedesinfektion – praxisnaher Versuch mit Probanden*

(Methode 12)

12

12.1 Produktprüflösung

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in ► Kapitel 5 beschrieben.

12.2 Methodik

12.2.1 Prinzip

Vor Versuchsbeginn werden zunächst durch eine Händewaschung die transiente Flora und Fremdmaterial reduziert, um eine Beeinflussung der Koloniezahlen vor der Probenahme einzuschränken.

Bei diesem Verfahren werden Koloniezahlbestimmungen der Bakterien auf den Händen vorgenommen:

- direkt nach der vorbereitenden Händewaschung
- unmittelbar nach der folgenden desinfizierenden Behandlung (Sofortwirkung)
- 3 h nach der desinfizierenden Behandlung (Langzeitwirkung)

Das Verhältnis zweier Werte (= Reduktionen) charakterisiert die desinfizierende Wirksamkeit des zu prüfenden Produkts. Durch die Ermittlung zweier Nachwerte (für die Sofortwirkung an der einen, für die Langzeitwirkung an der anderen Hand) werden zwei Reduktionen errechnet. Analog werden je Proband am selben Tag, mit derselben Kontaminationsflüssigkeit und unter definierten Bedingungen eine chirurgische Referenz-Händedesinfektion mit dem Referenzalkohol 60 Vol.-%iges Propan-1-ol durchgeführt, um die hierdurch erreichte Reduktion zu bestimmen, diese mit der durch das Prüfprodukt erreichten zu vergleichen und somit die äußeren Einflüsse zu kompensieren.

Für die Untersuchung müssen 20 Probanden getestet werden. Davon müssen mindestens 18 verwertbare Datensätze in die Bewertung einzubeziehen sein, um die erforderliche Präzision zu erreichen. Die Ergebnisse **aller** 20 Probanden sind im Prüfbericht aufzuführen.

Die Probanden werden nach Zufallskriterien in zwei etwa gleich große Gruppen aufgeteilt. Eine dieser Gruppen führt die Referenz-Händedesinfektion durch, während die andere Gruppe das zu prüfende Produkt benutzt. Nach mindestens einer Woche, wenn sich die Hautflora normalisiert hat, werden in einem zweiten Durchlauf der Prüfung

*Entsprechend kann auch der Phase-2-Stufe-2-Test nach DIN EN 12791 durchgeführt werden [1]. Die DIN EN 12701 wird zur Zeit revidiert. Es wird empfohlen, zumindest die Probandenzahl auf die in der prEN 12701 genannte Zahl zu erhöhen.

Referenz-Händedesinfektion und die Desinfektion mit dem zu prüfenden Produkt in umgekehrter Zuordnung durchgeführt.

Nach der Lateinischen-Quadrat-Anordnung [2] muss verfahren werden, wenn mehrere Produkte gleichzeitig geprüft werden: Es müssen genauso viele Versuchsdurchläufe und Probandengruppen vorhanden sein wie Produkte einschließlich des Referenzalkohols. Alle chirurgischen Händedesinfektionsverfahren werden in den Durchläufen parallel durchgeführt. Zwischen diesen Durchläufen muss mindestens eine Woche Abstand sein, damit sich die normale Hautflora wieder regenerieren kann. Jeder Proband muss jedes Händedesinfektionsprodukt einmal verwendet haben.

12.2.2 Probanden

Die Probanden sollten alle gesund sein, müssen über saubere, kurze Fingernägel verfügen, dürfen an den Händen keine Verletzungen haben und keinen Schmuck an den Unterarmen und Händen tragen. Die Probanden müssen mindestens 18 Jahre alt sein.

Eine Woche vor Versuchsbeginn müssen die Probanden auf Substanzen mit antimikrobieller Wirkung (z. B. Seifen und Handcremes mit mikrobiziden Zusätzen) verzichten.

12.2.3 Vorbereitung der Hände und Bestimmung der Vorwerte (VW)

Die Probanden müssen ihre Hände 1 min lang mit 5 ml Kaliseife (→ *Anhang A1.6.1*) waschen, unter fließendem Leitungswasser abspülen und dann gründlich mit Papierhandtüchern abtrocknen.

→ zur Inkubation siehe **12.3**
→ zur Auswertung der Vorwerte siehe **12.4**

Um den Vorwert zu ermitteln, werden die Kuppen der Finger und des Daumens beider Hände in je eine Petrischale mit 10 ml CSB (mit Neutralisationsmittel) getaucht und während 1 min ausgeknetet. Aus diesen Sammelflüssigkeiten werden Verdünnungen (10^{-1} und 10^{-2}) in CSB hergestellt und jeweils 0,1 ml auf CSA ausgespatelt. Dies muss spätestens 30 min nach der Probenahme geschehen.

12.2.4 Chirurgische Händedesinfektion

Je nach Zuteilung müssen sich die Probanden direkt nach der Ermittlung der Vorwerte der Referenz-Händedesinfektion (RP) oder der chirurgischen Händedesinfektion mit dem zu prüfenden Produkt (PP) unterziehen.

12.2.4.1 Chirurgische Referenz-Händedesinfektion (RP)

→ zu Standard-Einreibeverfahren siehe **Anhang C2**

Eine ausreichende Menge (mindestens 3 ml) 60 Vol.-%iges Propan-1-ol wird in die hohlen, trockenen Hände gegossen und nach dem Standard-Einreibeverfahren kräftig verrieben. Um eine vollständige Benetzung der Hände bis zu den Handgelenken sicherzustellen, verfährt man wie folgt:

je 5-mal

- Handfläche auf Handfläche hin und her,
- mit und ohne gespreizte Finger,
- rechte Handfläche über linken Handrücken und umgekehrt,
- mit verschränkten Fingern in der gegenüberliegenden Handfläche die Außenseite der Finger einreiben und umgekehrt,
- mit dem rechten Daumen kreisende Bewegungen in der linken geschlossenen Handfläche und umgekehrt,
- kreisende Bewegungen der geschlossenen Fingerkuppen in der gegenüberliegenden Handfläche und umgekehrt.

Bevor die Hände trocken werden, wird eine weitere Portion (3 ml) Propan-1-ol aufgetragen. Die Hände müssen 3 min (Gesamtanwendungszeit von RP) lang feucht gehalten werden. *Hinweis:* In der Regel werden 3 bis 4 Portionen über die Einwirkzeit von 3 min verteilt appliziert.

Die aufgebrauchte Menge des Referenzproduktes ist im Prüfbericht zu vermerken.

12.2.4.2 Chirurgische Händedesinfektion mit dem zu prüfenden Produkt (PP)

Zur Vorbereitung werden die Hände vorab nach dem Standard-Waschverfahren (➔ *Anhang C1*) gewaschen.

Bei Einreibpräparaten werden die Anweisungen des Herstellers bezüglich

- der zu verwendenden Menge des Produktes,
 - der Einwirkzeit,
 - der Häufigkeit der Anwendungen sowie
 - der Zeit, in der die Hände feucht gehalten werden müssen,
- strikt eingehalten und im Prüfbericht dokumentiert.

Bei der chirurgischen Händedesinfektion beträgt die längste akzeptierte Einwirkzeit 5 min.

Die aufgebrauchte Menge des Prüfproduktes ist im Prüfbericht zu vermerken.

12.2.5 Bestimmung der Nachwerte (NW)

a) Sofortwirkung

Für den Sofortwert werden unmittelbar nach Ende der Einwirkzeit die Fingerkuppen (einschließlich Daumenkuppe) einer zufällig ausgewählten Hand 1 min lang in eine Petrischale mit 10 ml CSB (mit Neutralisationsmittel, bestimmt nach Methode 7) getaucht und ausgeknetet.

Aus der unverdünnten Sammelflüssigkeit werden 1 ml und 0,1 ml sowie 0,1 ml aus einer Verdünnung 10^{-1} in CSB (mit Neutralisationsmittel, bestimmt nach Methode 7) ausgespatelt. Dies muss innerhalb von 30 min geschehen.

➔ zur Inkubation siehe **12.3**

➔ zur Berechnung des

Nachwerts siehe **12.4**

Die andere Hand wird inzwischen an der Luft getrocknet (bei Prüfprodukten auf Alkoholbasis). Eine Kontamination der Hand sollte sorgfältig vermieden werden.

b) 3-Stundenwert

Sofort nach Beendigung des Desinfektionsverfahrens und Lufttrocknung der anderen Hand wird diese durch das Tragen eines chirurgischen Handschuhes vor Kontamination von außen geschützt. Nach 3 h wird der Handschuh ausgezogen und die Probenahme analog dem Nachwert für die Sofortwirkung durchgeführt.

12.3 Inkubation

Nach 18 h bis 24 h Inkubation bei 36 °C ±1 °C werden alle Nährböden ausgezählt und nach weiteren 24 h Inkubation erneut ausgezählt, um auch langsam wachsende Kolonien nachzuweisen. Der höhere Zählwert wird bei der Auswertung verwendet.

12.4 Auswertung

Es werden vorrangig Nährböden ausgezählt, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 14 und 330 liegt. Nachwerte mit weniger als 14 Kolonien oder keinem Wachstum, auch wenn 1 ml unverdünnter Sammelflüssigkeit ausgespatelt worden ist, können berücksichtigt werden, da dies ein Hinweis auf ein sehr wirksames Produkt sein kann. Liegen die Koloniezahlen aus aufeinanderfolgenden Verdünnungen im o. a. Zählbereich, wird hieraus das gewichtete Mittel nach folgender Formel berechnet:

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

Dabei ist

c die Summe der gezählten Kolonien auf allen ausgewerteten Nährböden

n₁ die Anzahl der ausgewerteten Nährböden mit der ersten Verdünnung

n₂ die Anzahl der ausgewerteten Nährböden mit der zweiten Verdünnung

d der Verdünnungsfaktor der ersten ausgewerteten Verdünnung

Folgen die Koloniezahlen bei den unterschiedlichen Verdünnungsschritten nicht den Verdünnungsschritten, könnte dies ein Hinweis auf eine unzureichende Neutralisation sein!

Die Koloniezahlen je ml Sammelflüssigkeit werden dekadisch logarithmiert, wobei aus rechnerischen Gründen die „0“-Werte (lg 0 = ∞) gleich „1“ (lg 1 = 0) gesetzt werden. Dabei muss beachtet werden, dass „0“-Werte nur bei Nachwerten und besonders wirksamen Produkten auftreten dürften, so dass diese Regel zu einer tendenziellen Unterbewertung der antimikrobiellen Wirksamkeit eines Produktes führen kann.

Aus der Differenz der logarithmierten Werte (Vor- und Nachwerte der Sofort- bzw. der 3 h-Wirkung) von derselben Hand wird für jeden Probanden eine Reduktion (der Sofort- bzw. der Langzeitwirkung) ermittelt. Aus den individuellen Reduktionen werden getrennt für die Sofortwirkung und für die Langzeitwirkung arithmetische Mittelwerte für das Referenzverfahren (RP) und das Prüfverfahren (PP) berechnet.

12.5 Verifizierung des Versuches

Für den Vergleich der Ergebnisse der Verfahren RP und PP und zur Bewertung des Prüfverfahrens PP müssen die in ➔ **12A** genannten Anforderungen erfüllt sein.

12.6 Signifikanzprüfung

Ist der Mittelwert des RP des zu prüfenden Produktes kleiner als der durch das Referenzverfahren Propan-1-ol erreichte, muss die Differenz auf statistische Signifikanz geprüft werden. Ist der Mittelwert für das Produkt nicht signifikant kleiner als für das Referenzprodukt, so ist die Desinfektionsleistung als gleichwertig einzustufen.

Die Prüfung des Mittelwertes von Reduktionen von PP gegen den von RP wird mit dem parameterfreien Vorzeichen-Rangtest für Paardifferenzen nach Wilcoxon [2] durchgeführt.

Die Prüfung der Daten aus einem Lateinischen-Quadrat-Experiment wird mit dem Rangtest nach Wilcoxon-Wilcox [2] vorgenommen. Dabei werden die Mittelwerte von mehr als einem Prüfverfahren mit denen des Referenzverfahrens paarweise verglichen.

Auf Grund der vorwiegend explorativen Natur der Prüfung der Sofortwirkung und des 3-Stundenwertes bei dieser Anwendung wird das Signifikanzniveau mit $p = 0,1$ festgesetzt. Es ist eine einseitige Prüfung durchzuführen.

Die Trennschärfe des beschriebenen Prüfverfahrens wurde auf den Nachweis einer Differenz zwischen den beiden Mittelwerten der Reduktionen von etwa 0,6 lg bei einem Vertrauensintervall von 95 % eingestellt.

Wenn das Prüfprodukt im Dreistundenwert schlechter als das Referenzprodukt ist, muss eine Signifikanzprüfung durchgeführt werden.

Sowohl der Sofort- als auch der 3-Stundenwert dürfen auf dem jeweiligen Signifikanzniveau nicht signifikant schlechter als die jeweiligen des Referenzproduktes sein. Soll ein Langzeitwert explizit ausgelobt werden, muss das Prüfverfahren signifikant besser sein als das Referenzverfahren. Auf Grund der vorwiegend bestätigenden Natur der Prüfung der Langzeitwirkung wird bei dieser Anwendung das Signifikanzniveau mit $p = 0,01$ festgesetzt. Die Prüfung erfolgt einseitig.

Zukünftige Änderungen der DIN EN 12791 [1] werden bei der Beurteilung durch den VAH berücksichtigt.

12A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Bakterien (außer Mykobakterien) und Hefen

Orientierend

- Bestimmung der bakteriostatischen und levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel (Methode 7)
- Bestimmung der bakteriziden Wirkung im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8) – orientierend –. Nicht notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch alle Gram-negativen Testorganismen getestet werden (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*); Prüfbedingungen s. Tabelle 12.1

Tabelle 12.1: Prüfbedingungen im qualitativen Suspensionsversuch.

Erforderliche Reduktion: kein Wachstum in den Kulturröhrchen nach 48 h.

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten ²
Chir. Händedesinfektion (Einreibeverfahren)	<i>E. coli</i> K12 <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabilis</i>	ohne	Konzentrat	20 ± 1	30 s, 1 min, 1,5 min, 3 min, 5 min

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (→ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden.

Obligat

- Bestimmung der bakteriziden bzw. levuroziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9.1 bzw. EN 13727 [3] und EN 13624 [4]); Prüfbedingungen s. Tabelle 12.2
- Das zu prüfende Produkt muss die Koloniezahl der in → **Tabelle 12.2** und **Tabelle 12.3** genannten Testorganismen unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit (1 min bis 5 min) bei 20 °C mindestens um 5 lg-Stufen sowie von *Candida albicans* mindestens um 4 lg-Stufen vermindern.

Tabelle 12.2: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten ²
Chir. Händedesinfektion (Einreibeverfahren)	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> ³ <i>P. mirabilis</i> ³ <i>C. albicans</i>	geringe Belastung	Konzentrat	20 ± 1	30 s, 1 min, 1,5 min, 3 min, 5 min

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit. Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden. Kann die Wirksamkeit in kürzeren Einwirkzeiten belegt werden, müssen längere Einwirkzeiten nicht notwendigerweise geprüft werden.

³ Wenn im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa*.

Tabelle 12.3: Anforderungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Wirkungsbereich	Bakterizide Wirksamkeit	Levurozide Wirksamkeit
Reduktion	5 lg-Stufen	4 lg-Stufen
Belastung	geringe Belastung	geringe Belastung
Testorganismen	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ¹ <i>P. mirabilis</i> ¹	<i>C. albicans</i>

¹ Prüfung ist erforderlich, wenn diese Testorganismen im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *Pseudomonas aeruginosa* sind bzw. kein qualitativer Suspensionsversuch durchgeführt worden ist.

– Chirurgische Händedesinfektion – praxisnaher Versuch mit Probanden (Methode 12 bzw. DIN EN 12791 Phase 2/Stufe 2 [1]).

Für den Vergleich der Ergebnisse des Prüf- und des Referenzverfahrens und zur Bewertung des Prüfverfahrens müssen die folgenden Anforderungen erfüllt sein:

- Von mindestens 18 der 20 Probanden müssen verwertbare Ergebnisse vorliegen.
- Der Gesamtmittelwert der Vorwerte für das Referenz- und das Prüfverfahren muss mindestens 3,5 lg-Stufen betragen.

Ist der Mittelwert der lg-Reduktion des zu prüfenden Verfahrens in der Sofortwirkung und der der 3-h-Wirkung bei einseitiger Prüfung nicht signifikant (Signifikanzniveau 0,1) geringer als der entsprechende Mittelwert des Referenzverfahrens mit Propan-1-ol, so erfüllt das Prüfprodukt unter praxisnahen Bedingungen die Anforderungen.

Ist der Mittelwert der lg-Reduktion des zu prüfenden Verfahrens darüber hinaus in der 3-h-Wirkung bei einseitiger Prüfung signifikant größer (Signifikanzniveau 0,01) als der des Referenzverfahrens mit Propan-1-ol, so erfüllt das Prüfprodukt unter praxisnahen Bedingungen die Anforderungen für ein Verfahren „mit Langzeitwirkung“.

Literatur

1. DIN EN 12791:2013-07. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Chirurgische Händedesinfektionsmittel – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).
2. Wilcoxon, F. and R. A. Wilcox (1964). Some rapid approximate statistical procedures Pearl River, New York, Lederle Laboratories. (z.B. in Lothar Sachs (1992): Angewandte Statistik. 7. Auflage, Springer-Verlag).
3. DIN EN 13727:2014-3. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
4. DIN EN 13624:2013-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).

Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

Anforderungen an die VAH-Listung von chirurgischen Händedesinfektionsmitteln

Fachinformationen für Antragsteller und Laboratorien

Stand: 10. September 2021

■ Wirksamkeitstestung von chirurgischen Händedesinfektionsmitteln: Praxisnaher Versuch mit Probanden

Im Bereich der chirurgischen Händedesinfektion wurde 2016 die EN 12791:2013-07 revidiert und im europäischen Konsens die Probandenanzahl und die statistische Auswertung angepasst. In den Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung mit Stand 2015 wurde dieser Hinweis bereits bei Methode 12 gegeben mit der Empfehlung, die Probandenanzahl auf die in der prEN 12791 genannte Zahl zu erhöhen [1].

Die Umsetzung der Revision erfolgte 2016 und wird aktuell von der EN 12791:2018-01 ersetzt [2].

Folgende wesentliche Änderungen ergeben sich für die praxisnahe Prüfung mit Probanden:

- Die Probandenanzahl wurde auf 23 bis 28 Probanden angehoben, wovon mindestens für 23 Probanden verwertbare Ergebnisse vorliegen müssen.
- Die Prüfung der Leistungsfähigkeit der Sofortwirkung und der 3-Stunden-Wirkung erfolgt gemäß Hodges

& Lehmann. Das Prüfprodukt (PP) darf dem Referenzprodukt (RP) nicht unterlegen sein. Es wird ein einseitiges Signifikanzniveau von $= 0,025$ angelegt.

- Die Unterlegenheitsmarge liegt bei 0,75 lg für Sofortwirkung bzw. 0,85 lg für 3-Stunden Wirkung.
- Soll eine Langzeitwirkung ausgebaut werden, müssen auch die Ergebnisse des Vorzeichenrangtests für gepaarte Stichproben nach Wilcoxon mit einer einseitigen Signifikanzprüfung von $p = 0,01$ angegeben werden.

Die Desinfektionsmittel-Kommission hat aus diesem Grund beschlossen, dass ab **01.01.2022** für den Bereich der chirurgischen Händedesinfektion nur noch Prüfberichte, die der aktuell gültigen EN 12791:2018-01 bzw. den derzeit in Überarbeitung befindlichen Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren mit Stand 2022 entsprechen, akzeptiert werden.

Sofern Ergebnisse vorliegen, die auf Basis der früheren Fassung der EN 12791

Diese Mitteilung wurde erarbeitet von der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

Die Mitglieder der Desinfektionsmittel-Kommission:

Dr. B. Christiansen (stellvertretende Vorsitzende), Dr. M. Decius, Priv.-Doz. Dr. M. Eggers, Prof. em. Dr. M. Exner (Vorsitzender), Dr. J. Gebel (Schriftführer), Dr. S. Gemein, Priv.-Doz. Dr. S. Gleich, Dr. Britt Hornei, Dr. B. Hunsinger, Prof. Dr. A. Kramer, Prof. Dr. H. Martiny, Priv.-Doz. Dr. F. Pitten, Priv.-Doz. Dr. K. Schröppel, Dr. I. Schwebke, Dr. J. Steinmann, Assoc. Prof. Priv.-Doz. Dr. M. Suchomel, Dr. J. Tatzel, Prof. Dr. L. Vossebein, Prof. Dr. C. Wendt, Prof. Dr. M. H. Wolff

Unter fachlicher Beratung von:

P. Ahl, Fachapothekerin für Klinische Pharmazie (Gast für ABDA), Priv.-Doz. Dr. Ch. Brandt (Gast für DGHM), F. Helm (Gast für Bundeswehr), Dr. A. Jacobshagen (Gast für BfArM), I. Klöckner (Gast für VHD), M.Sc. K. Konrat (Gast für RKI), Dr. A. Marcic (Gast für MSGJFS), Prof. Dr. U. Rösler (Gast für DVG), Dr. U. Teichert (Gast für BVÖGD), Dr. V. Weinheimer (Gast für BAuA)

Verbund für Angewandte Hygiene e.V. Desinfektionsmittel-Kommission

Verantwortlich:

Prof. Dr. med. Martin Exner
(Vorsitzender)

Dr. rer. nat. Jürgen Gebel
(Schriftführer)

c/o Institut für Hygiene und
Öffentliche Gesundheit der
Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25

53127 Bonn

Tel: 0228 287-14022

Fax: 0228 287-19522

E-Mail: info@vah-online.de

Internet: www.vah-online.de

oder gemäß VAH-Methodenbuch Stand 2015 ermittelt wurden, können diese durch zusätzliche Probanden (bevorzugt im selben Labor) ergänzt werden. Die statistische Auswertung der alten und neuen Daten erfolgt dann nach neuer Methode entsprechend Hodges & Lehmann.

Bei entsprechenden **Rezertifizierungen** bzw. **Neuaufnahmen** sollte

dies im Vorfeld **bei der Antragstellung** beachtet werden.

■ Literatur

1. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.). Methoden und Anforderungen zur VAH-Zertifizierung von chemischen Desinfektionsverfahren. Gesamtausgabe mit Stand 15.3.2019. mhp Verlag: Wiesbaden,

2019 (eBook). Abrufbar über https://vah-online.de/files/download/ebooks/eBook_VAH_Methoden_Anforderungen.pdf

2. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Chirurgische Händedesinfektionsmittel - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2); Deutsche Fassung EN 12791:2016+A1:2017

In eigener Sache:

Neues Gastmitglied in der Desinfektionsmittel-Kommission: Dr. med. Anne Marcic vom Ministerium für Soziales, Gesundheit, Jugend, Familie und Senioren Schleswig-Holstein

Die Desinfektionsmittel-Kommission im VAH konnte die Fachärztin für Hygiene und Umweltmedizin Dr. med. Anne Marcic aus dem Ministerium für Soziales, Gesundheit, Jugend, Familie und Senioren Schleswig-Holstein als neues Gastmitglied gewinnen. Frau Dr. Marcic ist Referentin für Infektionsschutz und beschäftigt sich unter anderem mit den grundsätzlichen Anforderungen an Desinfektionsmaßnahmen in verschiedenen Bereichen und deren Überwachung durch den ÖGD.

Die Kommission kann durch die vielen Erfahrungen und die Einblicke von Frau Dr. Marcic in die Verordnungslandschaft und die Praxis des Infektionsschutzes in verschiedenen Settings sowie die Überwachung von Infektionsschutzmaßnahmen noch gezielter auf die Erfordernisse bei der Prüfung und Anwendung von Desinfektionsmaßnahmen eingehen.

Hautantiseptik – praxisnaher Versuch mit Probanden

(Methode 13)

13

13.1 Produktprüflösung

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in ➔ Kapitel 5 beschrieben.

13.2 Methodik

13.2.1 Prinzip

Die Prüfung der Wirksamkeit gegen die residente Hautflora wird sowohl an talgdrüsenarmer (Oberarm) als auch an talgdrüsenreicher Haut (Stirn) nach der folgenden Methodik durchgeführt.

Die Wirksamkeit eines Prüfproduktes (PP) wird mit der eines Referenzprodukts (RP) verglichen, das an denselben Probanden und unter gleichen Umgebungsbedingungen angewandt wird. Als Maßstab für die Wirksamkeit dient die Verringerung der Abgabe von Mikroorganismen der residenten Flora von der Haut des Oberarms und der Stirn. Die Größe dieser Reduktion ergibt sich aus dem Verhältnis der Mikroorganismenkonzentration, die vor und nach Antiseptik unter standardisierten Bedingungen mittels der quantitativen Tupferabstrichmethode von der Haut ermittelt wird.

13.2.2 Probanden

Für die Untersuchung müssen 20 Probanden getestet werden. Davon müssen mindestens 18 auswertbare Datensätze in die Bewertung einzubeziehen sein, um die erforderliche Präzision zu erreichen. **Alle** Ergebnisse der 20 Probanden sind aufzuführen.

Die Probanden sollten alle gesund sein und dürfen an den zu untersuchenden Hautarealen keine Verletzungen, Ekzeme oder andere entzündliche Hauterscheinungen haben. Die Probanden müssen mindestens 18 Jahre alt sein. Es ist auf eine paritätische Verteilung von weiblichen und männlichen Probanden zu achten.

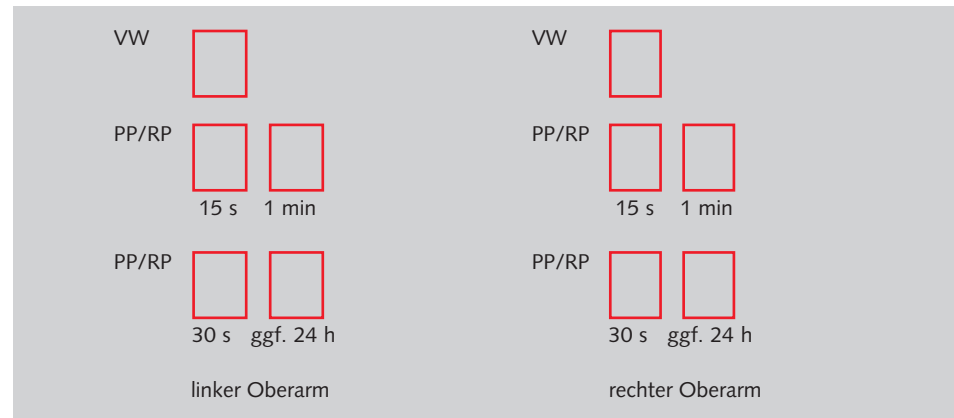
Die Haut darf mindestens drei Tage vor den Versuchen nicht mit Desinfektionsmitteln oder antiseptischen Lösungen behandelt worden sein. Außerdem müssen Probanden ausgeschlossen sein, deren Hautflora möglicherweise durch eine Antibiotikumtherapie verändert ist.

13.2.3 Antiseptik auf talgdrüsenarmer Haut – (Versuche am Oberarm)

Die Versuche werden am rechten und linken Oberarm durchgeführt, wobei an dem einen Arm das Referenz-, am anderen das Prüfprodukt verwendet wird.

13.2.3.1 Bestimmung der Vorwerte (VW)

Rechter und linker Oberarm werden jeweils zufällig dem entsprechenden Referenz- oder Prüfprodukt zugeordnet. Auf jedem Oberarm werden mit einer Schablone (Stempel, Zylinder) 5 cm² (1,25 x 4 cm) große Flächen sparsam markiert.



VW: Vorwert, RP: Referenzprodukt, PP: Prüfprodukt. (Zuordnung der Felder in Abb. beispielhaft dargestellt).

An jedem Arm wird im ersten Testfeld der Vorwert bestimmt: Mit dem in CSB mit Neutralisationsmittel angefeuchteten Wattetupfer wird das markierte Testfeld gründlich abgestrichen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass nicht über die Ränder hinaus gestrichen wird. Danach wird der Tupfer in 5 ml CSB mit Neutralisationsmittel überführt und 30 s mit hoher Frequenz auf einem Reagenzglasschüttler geschüttelt. Aus diesen Sammelflüssigkeiten und aus einer 10⁻²-Verdünnung in CSB mit Neutralisationsmittel werden in Doppelbestimmungen je 1 ml Probe auf CSA ausgespatelt.

- ➔ zur Inkubation siehe 13.3
- ➔ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 13.4

13.2.3.2 Antiseptik mit Referenz- (RP) und Prüfprodukt (PP)

Als Referenzprodukt dient Propan-2-ol (70 Vol.-%). Die Einwirkzeiten für Referenz- und Prüfverfahren betragen 15 s (Mindestzeit), 30 s und 1 min und ggf. 24 h sowie ggf. andere vom Hersteller gewünschte Einwirkzeiten.

Ein Arm wird mit dem Referenzprodukt, der andere mit dem Prüfprodukt behandelt. Dabei ist das Referenzprodukt mit einem Wattetupfer einmal satt aufzustreichen und das Prüfprodukt entsprechend den Herstellerempfehlungen anzuwenden (aufstreichen oder sprühen). Nach der antiseptischen Behandlung muss das Prüffeld für den 24-Stundenwert nach der Abtrocknung steril abgedeckt werden.

13.2.3.3 Bestimmung der Nachwerte (NW)

Nach den vorgesehenen Einwirkzeiten wird das jeweilige Testfeld mit einem in CSB mit Neutralisationsmittel angefeuchteten Tupfer gründlich abgestrichen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass nicht über die Ränder hinaus gestrichen wird. Danach wird der Tupfer in 5 ml CSB mit Neutralisationsmittel überführt und 30 s mit hoher Frequenz auf

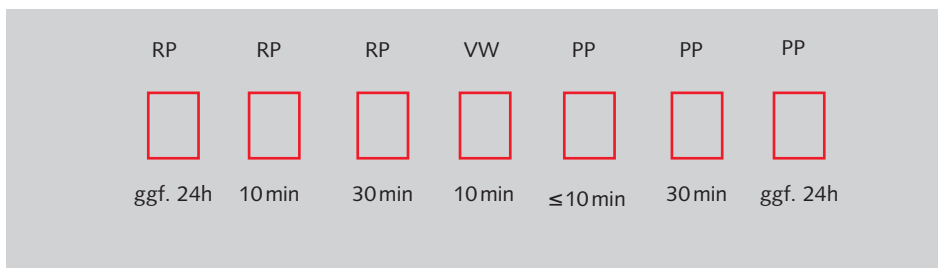
einem Reagenzglasschüttler geschüttelt. Aus diesen Sammelflüssigkeiten und aus einer 10^{-2} -Verdünnung in CSB mit Neutralisationsmittel werden in Doppelbestimmungen je 1 ml Probe auf CSA ausgespatelt.

13.2.4 Antiseptik auf talgdrüsenreicher Haut – (Versuche an der Stirn)

Die Haare werden während der Untersuchung von der Stirn ferngehalten (Klammer, Band o.ä.).

13.2.4.1 Bestimmung der Vorwerte

Auf der Stirn werden in einer Reihe nebeneinander mindestens fünf (sieben bei Langzeiteffekt) Felder à 5 cm^2 ($1,25 \times 4 \text{ cm}$) markiert. Für das PV können als Testzeiten $\leq 10 \text{ min}$ z. B. die Testzeiten 1 min, 1,5 min, 2 min, 2,5 min, 3 min, 5 min oder 10 min verwendet werden.



VW: Vorwert, RP: Referenzprodukt, PP: Prüfprodukte. (Zuordnung der Felder in Abb. beispielhaft dargestellt).

Nach den vorgesehenen Einwirkzeiten wird das jeweilige Testfeld mit einem in CSB mit Neutralisationsmittel angefeuchteten Tupfer gründlich abgestrichen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass nicht über die Ränder hinaus gestrichen wird. Danach wird der Tupfer in 5 ml CSB mit Neutralisationsmittel überführt und 30 s mit hoher Frequenz auf einem Reagenzglasschüttler geschüttelt. Aus dieser Sammelflüssigkeit werden mindestens zwei Verdünnungen in CSB mit Neutralisationsmittel hergestellt (z. B. 10^{-1} bis 10^{-4}) und daraus in Doppelbestimmungen je 1 ml Probe auf CSA ausgespatelt.

➔ zur Inkubation siehe 13.3

➔ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 13.4

13.2.4.2 Antiseptik auf talgdrüsenreicher Haut

Das Referenzprodukt Propan-2-ol (70 Vol.-%) wird nach einer Einwirkzeit von 10 min geprüft, wobei die Haut über diese 10 min ständig mit dem Referenzprodukt feucht gehalten werden muss (mindestens fünfmaliges Auftragen). Außerdem wird ein weiteres Testfeld 30 min nach Beginn der Applikationszeit beprobt, welches ebenfalls die ersten 10 min lang ständig mit dem Referenzprodukt feucht gehalten wurde. Wenn eine Langzeitwirkung bestätigt werden soll, ist auch das Referenzprodukt nach 24 h zu prüfen.

Für das Prüfprodukt müssen die vom Hersteller vorgegebenen Anwendungsbedingungen eingehalten werden. Auf jeden Fall ist eine Probenahme 30 min nach Applikation durchzuführen, sofern keine Langzeitwirkung über 24 h geprüft wird.

13.2.4.3 Bestimmung der Nachwerte

Nach den vorgesehenen Einwirkzeiten wird das jeweilige Testfeld mit einem in CSB mit Neutralisationsmittel angefeuchteten Tupfer gründlich abgestrichen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass nicht über die Ränder hinaus gestrichen wird. Danach wird der Tupfer in 5 ml CSB mit Neutralisationsmittel überführt und 30 s mit hoher Frequenz auf einem Reagenzglasschüttler geschüttelt.

➔ zur Inkubation siehe 13.3

➔ zur Berechnung des

Nachwerts siehe 13.4

Aus dieser Sammelflüssigkeit werden direkt und mindestens aus einer Verdünnung in CSB mit Neutralisationsmittel (z. B. 10^{-2}) in Doppelbestimmungen je 1 ml Probe auf CSA ausgespatelt.

13.3 Inkubation

Alle Nährböden werden bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für 48 h inkubiert.

13.4 Auswertung

Für die Untersuchung müssen 20 Probanden getestet werden. Davon müssen mindestens 18 auswertbare Datensätze in die Bewertung einzubeziehen sein, um die erforderliche Präzision zu erreichen. **Alle** Ergebnisse der 20 Probanden sind aufzuführen.

Es werden Nährböden ausgezählt, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 14 und 330 liegt. Nachwerte mit weniger als 14 Kolonien oder gar keinem Wachstum, auch wenn 1 ml unverdünnter Schüttelflüssigkeit ausgespatelt worden ist, können berücksichtigt werden, da dies ein Hinweis auf ein sehr wirksames Produkt sein kann.

Liegen die Koloniezahlen im o. a. Zählbereich, wird die Reduktionswirkung (R) nach folgender Formel berechnet:

$$\lg R = \lg (VW) - \lg (NW)$$

VW: Anzahl der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes

NW: Anzahl der KBE pro ml nach Einwirkung des Produktes

Die Werte aller Probanden werden dekadisch logarithmiert und in Tabellen, nach Einwirkzeit geordnet, aufgeführt.

Ist ein NW = 0, so muss er = 1 gesetzt werden (ergibt logarithmiert: 0).

Ist an der Stirn keine 10^0 -Verdünnung (unverdünnt) ausplattiert worden und ein NW in der 10^{-1} -Verdünnung = 0, wird er = 9 gesetzt (ergibt logarithmiert: 0,95).

13.5 Verifizierung des Versuches

Für den Vergleich der Ergebnisse der Referenzprodukte und Prüfprodukte und zur Bewertung des Prüfprodukts PP müssen die in ➔ 13A genannten Anforderungen erfüllt sein.

13.6 Signifikanzprüfung residente Flora

Sind/ist die/der Mittelwert/e der Reduktionen kleiner als die mit dem Referenzprodukts erreichte/n, muss die Differenz auf statistische Signifikanz geprüft werden.

Die Prüfung des Mittelwertes der Reduktion des Prüfprodukts gegen den Mittelwert der Reduktion des Referenzprodukts wird mit dem parameterfreien Vorzeichen-Rangtest für Paardifferenzen nach Wilcoxon [3] durchgeführt.

Die Prüfung der Daten aus einem Lateinischen-Quadrat-Experiment wird mit dem Rangtest nach Wilcoxon-Wilcox [3] vorgenommen. Dabei werden die Mittelwerte von mehr als einem Prüfprodukt mit denen des Referenzprodukts paarweise verglichen.

Auf Grund der vorwiegend explorativen Natur der Prüfung dieser Anwendung wird das Signifikanzniveau mit $p = 0,1$ festgesetzt. Es ist eine einseitige Prüfung durchzuführen. Dies gilt sowohl an talgdrüsenarmer als auch talgdrüsenreicher Haut. Die Wirksamkeit muss auf beiden Hautarealen gegeben sein.

13A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Bakterien (außer Mykobakterien) und Hefen

Die Prüfbedingungen richten sich nach der gewünschten Anwendungsempfehlung (z. B. Einwirkzeit, Applikationsart, Langzeiteffekt) des zu prüfenden Hautantiseptikums. Alle Prüfprodukte müssen die Anforderungen auf talgdrüsenarmer und talgdrüsenreicher Haut erfüllen.

Für die Beurteilung eines Hautantiseptikums werden für das Prüfprodukt orientierende, obligate und optionale Prüfungen zugrunde gelegt.

Orientierend:

- *Bestimmung der bakteriostatischen und levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel (Methode 7)*
- *Bestimmung der bakteriziden Wirkung im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8)*
 - *orientierend – Nicht notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) alle Gram-negativen Testorganismen (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*) getestet werden; Prüfbedingungen siehe Tabelle 13.1*

Tabelle 13.1: Prüfbedingungen im qualitativen Suspensionsversuch.

Erforderliche Reduktion: kein Wachstum nach 48 h.

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten ²
Hautantiseptik	<i>E. coli</i> K12 <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabilis</i>	ohne	Konzentrat	20 ± 1	15 s, 30 s, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (⇒ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen.

Obligat:

– Bestimmung der bakteriziden und levuroziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9.1 bzw. EN 13727 [1] und EN 13624 [2]); Prüfbedingungen s. Tabelle 13.2 und 13.3

Das zu prüfende Produkt muss die Koloniezahl der in ⇒ **Tabelle 13.3** genannten Testorganismen unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit bei 20 °C mindestens um 5 lg-Stufen sowie von *Candida albicans* mindestens um 4 lg-Stufen vermindern.

Tabelle 13.2: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (s oder min) ²
Hautantiseptik	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> ³ K12 <i>P. mirabilis</i> ³ <i>C. albicans</i>	hoch	Konzentrat	20 ± 1	15 s, 30 s, 1 min, 3 min, 5 min, 10 min

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (⇒ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen. Bei der Prüfung ist auch die Einwirkzeit zu berücksichtigen, die direkt unter der kürzesten beantragten Einwirkzeit liegt. Das gilt auch, wenn methodisch nach EN geprüft wird.

³ Wenn im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa*.

Tabelle 13.3: Anforderungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Wirkungsbereich	Bakterizide Wirksamkeit	Levurozide Wirksamkeit
Reduktion	5 lg-Stufen	4 lg-Stufen
Belastung	hohe Belastung	hohe Belastung
Testorganismen	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ¹ <i>P. mirabilis</i> ¹	<i>C. albicans</i>

¹ Prüfung ist erforderlich, wenn diese Testorganismen im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *Pseudomonas aeruginosa* sind bzw. kein qualitativer Suspensionsversuch durchgeführt worden ist.

– Wirksamkeit gegenüber residenter Flora, Hautantiseptik (Methode 13)

Für den Vergleich der Ergebnisse des Prüf- und des Referenzprodukts und zur Bewertung des Prüfprodukts müssen die folgenden Anforderungen erfüllt sein:

- Von mindestens 20 Probanden müssen sämtliche Ergebnisse aufgeführt sein.
- Von mindestens 18 Probanden müssen auswertbare Ergebnisse vorliegen.
- Die Vorwerte müssen im Mittel >2 lg-Stufen betragen.

Sind die/der Mittelwert/e der Reduktion des Prüfprodukts kleiner als die mit dem Referenzprodukts erreichten und ist der Unterschied mindestens eines Mittelwertes statistisch gesichert (Signifikanzniveau 0,1), wird das Prüfprodukts als ungeeignet abgelehnt. Dies gilt für alle Prüfzeiten sowohl an talgdrüsenarmer als auch talgdrüsenreicher Haut.

Soll ein Langzeitwert (24-Stundenwert) explizit ausgelobt werden, muss das Prüfverfahren sowohl an talgdrüsenarmer als auch an talgdrüsenreicher Haut signifikant besser sein als das Referenzverfahren, da dieses keinen Langzeiteffekt hat. Auf Grund der vorwiegend bestätigenden Natur der Prüfung der Langzeitwirkung wird bei dieser Anwendung das Signifikanzniveau mit $p = 0,01$ festgesetzt. Die Prüfung erfolgt einseitig.

Literatur

1. DIN EN 13727:2014-3. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
2. DIN EN 13624:2013-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
3. Wilcoxon F, Wilcox RA (1964). Some rapid approximate statistical procedures Pearl River, New York, Lederle Laboratories. (z.B. in Lothar Sachs (1992): Angewandte Statistik. 7. Auflage, Springer-Verlag).

Flächendesinfektion

14.1 Flächendesinfektion ohne Mechanik – praxisnaher Versuch*

(Methode 14.1)

14

Prüfung der bakteriziden, levuroziden, fungiziden, tuberkuloziden und mykobakteriziden Wirksamkeit auf nicht-porösen Oberflächen ohne Mechanik

14.1.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	(DSM 799)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541	(DSM 3320)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Escherichia coli</i> K12	NCTC 10538	(DSM 11250)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	(DSM 939)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	(DSM 1386)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Mycobacterium terrae</i>	ATCC 15755	(DSM 43227)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 15769	(DSM 44157)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (früher <i>A. niger</i>)	ATCC 16404	(DSM 1988)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sowie der Prüfsuspensionen sind in ➔ Kapitel 6 beschrieben.

Zur Simulation praxisnaher Bedingungen wird den Prüfsuspensionen maximal 2 h vor der Prüfung Albumin (0,03 % Endkonzentration, ➔ *Anhang A1.8a – geringe organische Belastung*) bzw. Albumin und Schaferythrozyten (je 0,3 % Endkonzentration, ➔ *Anhang A1.8b – hohe organische Belastung*) zugesetzt.

14.1.2 Produktprüflösung

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in ➔ Kapitel 5 beschrieben.

14.1.3 Testzeiten

Als Testzeiten sind 1, 5, 15, 30, 60 und/oder 240 min auszuwählen. Mögliche Einwirkzeiten sind 5, 15, 30, 60 und 240 min.

*Entsprechend kann auch der Phase-2-Stufe-2-Test nach DIN EN 13697, DIN EN 14349 oder DIN EN 16438 mit angepassten Bedingungen (s. Tabellen 14.1.3 und 14.1.4) durchgeführt werden [1].

14.1.4 Testflächen

Alle Testflächen werden während des gesamten Versuches waagrecht gehalten. Die im Versuchsraum gemessenen Werte der rel. Feuchte und die Raumlufttemperatur (20 °C bis 25 °C) am Anfang und Ende der Prüfung sind im Bericht anzugeben.

Als Modellflächen dienen Metallplättchen, Ø 20 mm (➔ *Anhang A2*).

Zur Vorbereitung werden die Testflächen 60 min in Seifenlösung (➔ *Anhang A1.6.2*) gegeben (entspricht u. a. DIN EN 13697), 3 mal mit Wasser (➔ *Anhang A1.1*) gewaschen und anschließend in Isopropanol (70 Vol.%) oder Ethanol (70 Vol.%) mindestens 15 min eingelegt. Unter Laminar Airflow trocknen. Die getrockneten Testflächen werden abschließend mit Heißluft (➔ *Anhang A3*) sterilisiert und in einem geschlossenen Gefäß staubarm gelagert.

14.1.5 Kontamination der Testflächen

Auf je eine Testfläche pro Prüfzeit werden 0,05 ml der Prüfsuspension (inkl. 0,03 % Albumin für geringe Belastung bzw. 0,3 % Albumin und 0,3 % Schaferythrozyten für hohe organische Belastung) mit einer Pipette mittig aufgesetzt punktuell aufgebracht. Die Flächen werden bis zur optischen Trockenheit (max. 60 min) unter Laminar Air Flow aufbewahrt.

➔ siehe Schema **D5**, Anhang D

14.1.6 Methodik

Nach Antrocknung der Prüfsuspension werden die Testflächen mit 0,1 ml Produktprüflösung überschichtet, wobei die getrocknete Prüfsuspension vollständig bedeckt sein muss.

Für den Nachweis rückgewinnbarer KBE werden die Testflächen mit der Oberseite nach unten in einen Behälter mit max. 5 cm Durchmesser eingelegt, der 10 ml Neutralisationsmittel und Gasperlen (Ø 3–4 mm) enthält (= Prüfneutralisationsgemisch). Das Abschwemmen erfolgt auf einem Horizontalschüttler (ca. 125 U/min) während 2 min. Unmittelbar danach werden 10⁻¹- und 10⁻²-Verdünnungen in Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) angelegt. Von dem Prüfneutralisationsgemisch (Direktansatz) werden 1 ml und 0,1 ml und aus den 10⁻¹- und 10⁻²-Verdünnungen jeweils 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

➔ zur Inkubation siehe **14.1.7**

➔ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe **14.1.8**

14.1.7 Inkubation

Die Nährböden werden 48 h (*M. terrae* und *M. avium*: 21 Tage, *C. albicans*: 72 h, *A. brasiliensis*: 7 bis 9 Tage) bei 36 °C ± 1 °C (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: 30 °C ± 1 °C) inkubiert.

14.1.8 Auswertung

Es werden Nährböden ausgezählt, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 14 und 330 liegt. Die Reduktion (R) wird nach folgender Formel berechnet:

$$\lg R = \lg (\text{KBE Ko1}) - \lg (\text{KBE D})$$

KBE Ko1: Anzahl der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes (WSH-Kontrolle)

KBE D: Anzahl der KBE pro ml nach Einwirkung des Produktes

Im Prüfbericht sind die KBE-Werte pro Verdünnungsstufe, die \lg (KBE D) sowie die Reduktionswerte tabellarisch aufzulisten.

14.1.9 Validierung

14.1.9.1 WSH-Kontrolle (Ko1)

Zur Bestimmung der Anzahl der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes (Ko1) werden in Parallelansätzen kontaminierte Flächen anstelle mit der Produktprüflösung mit WSH behandelt. Aus dem Prüfneutralisationsgemisch werden 10^{-3} - und 10^{-4} -Verdünnungen hergestellt und hieraus je 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

➔ zur Inkubation siehe 14.1.7
➔ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 14.1.8

14.1.9.2 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)

Es wird eine zweite Kontrolle (Ko2) durchgeführt, die den Nachweis der erfolgreichen Neutralisation belegen soll, indem 0,1 ml der Produktprüflösung in einen Behälter mit max. 5 cm Durchmesser, der 10 ml Neutralisationsmittel (➔ Anhang A1.7) enthält, überführt werden. Nach $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit werden 0,1 ml einer 10^{-3} -Verdünnung (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: 10^{-2} -Verdünnung) der Prüfsuspension zugesetzt. Nach der längsten Einwirkzeit wird sowohl hiervon und aus einer 10^{-1} -Verdünnung je 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

➔ zur Inkubation siehe 14.1.7
➔ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 14.1.8

Anmerkung: Zeigt sich im Test eine unzureichende Neutralisation (weniger als 10^3 KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden. Gegebenenfalls muss die Neutralisationszeit verlängert werden, die dann der Einwirkzeit hinzugerechnet werden muss und damit Auswirkungen auf die Auslobung hat.

14.1.9.3 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3)

Die dritte Kontrolle (Ko3) wird für den Nachweis der fehlenden Toxizität des Neutralisationsmittels durchgeführt, indem 0,05 ml einer 10^{-2} -Verdünnung (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: 10^{-1} -Verdünnung) der Prüfsuspension in einen Behälter mit max. 5 cm Durchmesser, der 10 ml Neutralisationsmittel (➔ Anhang A1.7) enthält, überführt werden. Nach 30 min wird sowohl hiervon und aus einer 10^{-1} -Verdünnung je 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

➔ zur Inkubation siehe 14.1.7
➔ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 14.1.8

Anmerkung: Zeigt sich im Test ein toxischer Effekt (weniger als 10^3 KBE/ml), muss ein anders Neutralisationsmittel verwendet werden.

14.1 Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Flächendesinfektion ohne Mechanik – praxisnaher Versuch auf nicht-porösen Oberflächen

Die Prüfbedingungen richten sich nach der gewünschten Anwendungsempfehlung des Flächendesinfektionsverfahrens. Es können Produkte bzw. Verfahren ohne Mechanik unter geringer und/oder hoher Belastung geprüft werden.

Für die Beurteilung eines Flächendesinfektionsmittels werden orientierende, obligate und optionale Prüfungen zugrunde gelegt.

Orientierend

- Bestimmung der bakteriostatischen und levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel (Methode 7)
- Bestimmung der bakteriziden Wirkung im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8)
- orientierend –. Nicht notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) alle Gram-negativen Testorganismen (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*) getestet werden; Prüfbedingungen s. Tabelle 14.1.1

Tabelle 14.1.1: Prüfbedingungen im qualitativen Suspensionsversuch.

Erforderliche Reduktion: kein Wachstum in den Kulturröhrchen nach 48 h.

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (min) ²
Flächendesinfektion	<i>E. coli</i> K12 <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabilis</i>	ohne	Anwendungskonzentration	20 ± 1	1, 5, 15, 30, 60, 240

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (⇒ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen.

Obligat

- Bestimmung der bakteriziden Wirkung im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8).
Notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) nicht alle Gram-negativen Testorganismen (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*) getestet werden;
Prüfbedingungen s. Tabelle 14.1.1
- Bestimmung der bakteriziden und levuroziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9.1 bzw. DIN EN 13727 [2] und DIN EN 13624 [3]); Prüfbedingungen s. Tabelle 14.1.2 und 14.1.3

Das zu prüfende Produkt muss die Anforderungen aus ⇒ **Tabelle 14.1.4** für die obligaten Testorganismen unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit bei 20 °C ± 1 °C erfüllen.

– Prüfung der bakteriziden und levuroziden Wirkung unter praxisnahen Bedingungen;

Prüfbedingungen s. Tabelle 14.1.2 und 14.1.3:

Ohne mechanische Einwirkung: Methode 14.1 bzw. DIN EN 13697 [1], DIN EN 14349 [5] oder DIN EN 16438 [6] mit Belastung gemäß DIN EN 13727 [2]

Das zu prüfende Produkt muss die Anforderungen aus ► **Tabelle 14.1.4** für die obligaten Testorganismen unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit bei 20 °C ± 1 °C erfüllen.

Tabelle 14.1.2: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch und unter praxisnahen Bedingungen.

Anwendungsverfahren	Testorganismen ⁴	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (min) ²
Flächendesinfektion	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³ <i>C. albicans</i> <i>M. terrae</i> ⁴ <i>M. avium</i> ⁴ <i>A. brasiliensis</i> ⁴	gering und/oder hoch	Anwendungs- konzentration	20 ± 1	1, 5, 15, 30, 60, 240

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (► Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen. Bei der Prüfung ist auch die Einwirkzeit zu berücksichtigen, die direkt unter der kürzesten beantragten Einwirkzeit liegt. Das gilt auch, wenn methodisch nach EN geprüft wird.

³ Wenn im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa*.

⁴ Optional, wenn eine tuberkulozide, mykobakterizide oder fungizide Wirksamkeit beantragt wird.

Tabelle 14.1.3: In den einzelnen Durchgängen zu wählende Einwirkzeiten für die praxisnahen Prüfungen von Flächendesinfektionsmitteln.

Beantragte Einwirkzeit	1. Durchgang	2. Durchgang
Flächendesinfektion ohne Mechanik		
5 min	1 min, 5 min	5 min
15 min	5 min, 15 min	15 min
30 min	15 min, 30 min	30 min
60 min	30 min, 60 min	60 min
240 min	60 min, 240 min	240 min

Tabelle 14.1.4: Anforderungen im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) und unter praxisnahen Bedingungen (Methode 14.1) – Flächendesinfektion ohne Mechanik.

Wirkungsbereich	Bakterizide Wirksamkeit	Levurozide Wirksamkeit	Fungizide Wirksamkeit	Tuberkulozide Wirksamkeit	Mykobakterizide Wirksamkeit
Reduktion	5 lg-Stufen ¹	4 lg-Stufen ³	4 lg-Stufen ³	4 lg-Stufen	4 lg-Stufen
Belastung	gering und/oder hoch	gering und/oder hoch	gering und/oder hoch	gering und/oder hoch	gering und/oder hoch
Testorganismen	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ² <i>P. mirabilis</i> ²	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> <i>A. brasiliensis</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. terrae</i> <i>M. avium</i>

¹ 4 lg bei *P. aeruginosa* 240 min, wenn die WSH-Kontrolle keine Darstellung einer lg 5-Reduktion erlaubt.

² Prüfung im quantitativen Suspensionsversuch ist erforderlich, wenn diese Testorganismen im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa* sind bzw. kein qualitativer Suspensionsversuch durchgeführt worden ist.

³ 3 lg bei *C. albicans* 240 min, wenn die WSH-Kontrolle keine Darstellung einer lg 4-Reduktion erlaubt.

Optional

Soll eine tuberkulozide oder mykobakterizide oder fungizide Wirksamkeit dargestellt werden, müssen neben den oben genannten obligaten Prüfungen folgende Prüfungen jeweils als Suspensionsversuch und praxisnaher Test durchgeführt werden.

– Bestimmung der tuberkuloziden, mykobakteriziden bzw. fungiziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9.1 bzw. DIN EN 14348 [4], DIN EN 13624 [3]; Prüfbedingungen s. Tabelle 14.1.2 und 14.1.3

– Überprüfung der tuberkuloziden, mykobakteriziden bzw. fungiziden Wirkung unter praxisnahen Bedingungen; Prüfbedingungen s. Tabelle 14.1.2 und 14.1.3:

– ohne mechanische Einwirkung: Methode 14.1 oder DIN EN 13697 [1], DIN EN 14349 [5] oder DIN EN 16438 [6] mit Belastung gemäß DIN EN 13727 [2]

Das zu prüfende Produkt muss die Anforderungen aus ► **Tabelle 14.1.4** für die optionalen Testorganismen unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit bei 20 °C ± 1 °C erfüllen.

Die Prüfung zur Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch sowie unter praxisnahen Bedingungen gegenüber *Candida albicans* ist bei allen Flächendesinfektionsverfahren erforderlich. Die Testung gegenüber *Aspergillus brasiliensis* ist nur im Falle der zusätzlichen Aussage über diese Wirksamkeit erforderlich.

Im Falle des optional zusätzlichen Nachweises einer tuberkuloziden Wirksamkeit ist im quantitativen Suspensionstest und im Versuch unter praxisnahen Bedingungen gegenüber *Mycobacterium terrae* zu prüfen. Soll ein mykobakterizider Effekt bestätigt werden, ist zusätzlich auch mit *Mycobacterium avium* zu untersuchen.

Die praxisnahen Prüfungen haben jeweils in 2 Durchgängen zu erfolgen:

1. *Durchgang*: 1 Testfläche pro Konzentration-Zeit-Relation und pro WSH-Kontrolle (Ko1) + Durchführung der Kontrollen (Ko2, Ko3).

2. *Durchgang*: Je 2 Testflächen pro beantragter Konzentration-Zeit-Relation und eine Konzentration darunter und 1 Testfläche pro WSH-Kontrolle (Ko1).

Im zweiten Durchgang ist für den Bereich Bakterizidie/Levurozidie nur die Prüfung der beiden resistentesten Testorganismen aus dem 1. Durchgang notwendig.

Literatur

1. DIN EN 13697:2015-06. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Oberflächen-Versuch nicht-poröser Oberflächen zur Bestimmung der bakteriziden und/oder fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche Einrichtungen – Prüfverfahren ohne mechanische Behandlung und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).
2. DIN EN 13727:2014-01. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
3. DIN EN 13624:2013-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
4. DIN EN 14348:2005-04. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der mykobakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich einschließlich der Instrumentendesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
5. DIN EN 14349:2013-02. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Oberflächenversuch zur Bestimmung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich auf nicht-porösen Oberflächen ohne mechanische Wirkung – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).
6. DIN EN 16438:2014-07. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Oberflächenversuch zur Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den Veterinärbereich auf nicht-porösen Oberflächen ohne mechanische Wirkung – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).

Chlorbasierte Flächendesinfektionsmittel: Voraussetzungen zur VAH-Zertifizierung erweitert und präzisiert

Aktualisierung und Ergänzung zur VAH-Mitteilung aus Hyg Med 6/2020*

Stand: 26. Mai 2021

Derzeit werden beim VAH vermehrt Anträge zur Zertifizierung von Produkten gestellt, deren Hauptwirkstoffe chlorabspaltende Verbindungen sind. Der VAH weist ausdrücklich auf **Besonderheiten bei der Herstellung dieser Verbindungen über Elektrodiaphragmalyse** hin. So kann es z.B. in Abhängigkeit des Diaphragmalyseverfahrens zu deutlichen pH-Wert-Unterschieden der generierten Wirkstofflösungen kommen, die dann einen erheblichen Einfluss auf die Wirksamkeit, aber auch auf die Korrosivität haben. Außerdem sind die generierten Wirkstoffe unterschiedlichen Zerfallsprozessen unterworfen, die auch auf die Verwendbarkeit der Wirkstofflösungen Einfluss nehmen.

In Anlehnung an die Regularien der ECHA hat die Desinfektionsmittel-Kommission beschlossen, ausschließlich Verfahren zu zertifizieren, die Aktivchlor (ex situ) bereits enthalten [1, 2]. Verfahren, die Aktivchlor vor Ort erzeugen (in situ) werden zur Zeit nicht zertifiziert. In der VAH-Liste findet der Anwender daher nur ex-situ Aktivchlor-Lösungen. Hierbei wird in Abhängigkeit des pH-Wertes zwischen der Wirkstoffbezeichnung „Aktivchlor hergestellt aus Natriumhypochlorit“ für Lösungen $\text{pH} > 7,5$ und „Aktivchlor, freigesetzt aus hypochloriger Säure“ für Lösungen $\text{pH} < 7,5$ unterschieden. Im VAH-Zertifikat wird neben dieser Wirkstoffbezeichnung der Gehalt an Aktivchlor in mg/L und der pH-Wert des Produktes angegeben.

Die Desinfektionsmittel-Kommission im VAH hatte in ihrer Mitteilung

aus Hygiene & Medizin 06/2020 beschlossen [3], dass für Zertifizierungen von Produkten auf Basis chlorabspaltender Verbindungen, **zusätzlich** zu den bisher geltenden Anforderungen an Prüfbericht und Gutachten (gemäß Methodenbuch Kap. 3.2 [4]), mindestens am ersten und letzten Testtag der Verwendung des jeweiligen Prüfmusters der **Gehalt des gesamten und des freien Chlors** (Aktivchlor) sowie die **Redox-Spannung** des geprüften Produktes dokumentiert und im Prüfbericht angegeben werden müssen. Als Verfahren zur Bestimmung von freiem Chlor und Gesamtchlor kann z.B. das **kolorimetrische Verfahren mit N,N-Diethyl-1,4-Phenylendiamin nach DIN EN ISO 7393-2** eingesetzt werden (ggfs. nach Vorverdünnung mit A. dest). Als Verfahren für die Bestimmung der Redox-Spannung kann z.B. die **DIN 38404-C 6** eingesetzt werden.

Diese Daten sowie der pH-Wert des geprüften Produkts mit der oben beschriebenen Wirkstoffbezeichnung müssen auch für bereits zertifizierte Produkte **inklusive einer mikrobiologischen Eckwertprüfung bis zum 31.12.2021 nachgereicht** werden. In der Eckwertprüfung soll im praxisnahen Test die Listungskonzentration mit dem resistentesten Testorganismus entsprechend der VAH-Methode 14.1 („Flächendesinfektion ohne Mechanik“) bzw. 14.2 („4-Felder-Test“) überprüft werden (1. Durchgang: 1 Testfläche + WSH / 2. Durchgang: 2 Testflächen + WSH) [4].

Verband für Angewandte Hygiene e.V. Desinfektionsmittel-Kommission

Verantwortlich:
Prof. Dr. med. Martin Exner
(Vorsitzender)
Dr. rer. nat. Jürgen Gebel
(Schriftführer)

c/o Institut für Hygiene und
Öffentliche Gesundheit der
Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
53127 Bonn
Tel: 0228 287-14022
Fax: 0228 287-19522
E-Mail: info@vah-online.de
Internet: www.vah-online.de

*Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Chlorbasierte Desinfektionsmittel: Anforderungen an die Zertifizierung durch den VAH. HygMed 2020;45(6):107-108. Verfügbar online unter https://vah-online.de/files/download/vah-mitteilungen/Chlorbasierte_Desinfektionsmittel_107_108_VAH_HM_6_20.pdf

Weiterhin muss der Hersteller mit Daten belegen, über welchen Zeitraum das Konzentrat bei täglicher Entnahme den zertifizierten Gehalt an freiem Chlor (Aktivchlor) behält.

Der **Mindestwirkstoffgehalt an freiem Chlor (Aktivchlor, Angabe in Cl mg/L)** im Produkt sowie der Verwendungszeitraum, über den dieser Mindestwirkstoffgehalt garantiert ist, werden **im Zertifikat des VAH** aufgeführt.

Hinweis:

Chlorbasierte Händedesinfektionsmittel werden derzeit vom VAH nur dann zertifiziert, wenn eine Biozid- oder eine Arzneimittelzulassung für das Produkt vorliegt [5, 6].

■ **Literatur**

1. Hölzl-Armstrong L. Genehmigung von Aktivchlorwirkstoffen. Veröffentlicht am 23. März 2021 über <https://www.umco.de/de/blog/artikel/Genehmigung-aktivchlorwirkstoffe.html>
2. Helpdesk, reach-clp-biozid. Welche Wirkstoffbezeichnung für „Aktivchlor“ ist die Richtige für mein Biozidprodukt? Helpdesk-Nummer: 0598. Online verfügbar unter https://www.reach-clp-biozid-helpdesk.de/DE/Biozide/FAQ/Wirkstoffe/Wirkstoffe_node.html
3. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Chlorbasierte Desinfektionsmittel: Anforderungen an die Zertifizierung durch den VAH. HygMed 2020;45(6):107–108. Online verfügbar unter https://vah-online.de/files/download/vah-mitteilungen/Chlorbasier-te_Desinfektionsmittel_107_108_VAH_HM_6_20.pdf
4. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.). Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren. Wiesbaden: mhp Verlag. Grundwerk mit Ergänzungen, Stand 15.06.2020.
5. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Voraussetzungen zur VAH-Zertifizierung chlorbasierter Händedesinfektionsmittel. HygMed 2020;45(10):170. Online verfügbar unter https://vah-online.de/files/download/vah-mitteilungen/VAH_Chlorbasierte%20HDM_HM_10_20.pdf
6. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Zur VAH-Zertifizierung von nicht-alkoholbasierten Händedesinfektionsmitteln. Stand 25. Mai 2021. im Druck. Online verfügbar auf www.vah-online.de

Diese Mitteilung wurde erarbeitet von der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

Die Mitglieder der Desinfektionsmittel-Kommission

Dr. B. Christiansen (stellvertretende Vorsitzende), Dr. M. Decius, Priv.-Doz. Dr. M. Eggers, Prof. Dr. M. Exner (Vorsitzender), Dr. J. Gebel (Schriftführer), Dr. S. Gemein, Priv.-Doz. Dr. S. Gleich, Dr. Britt Hornei, Dr. B. Hunsinger, Prof. Dr. A. Kramer, Prof. Dr. H. Martiny, Priv.-Doz. Dr. F. Pitten, Priv.-Doz. Dr. K. Schröppel, Dr. I. Schwebke, Dr. J. Steinmann, Assoc. Prof. Priv.-Doz. Dr. M. Suchomel, Dr. J. Tatzel, Prof. Dr. L. Vossebein, Prof. Dr. C. Wendt, Prof. Dr. M. H. Wolff

Unter fachlicher Beratung von:

P. Ahl, Fachapothekerin für Klinische Pharmazie (Gast für ABDA), Priv.-Doz. Dr. Ch. Brandt (Gast für DGHM), F. Helm (Gast für Bundeswehr), Dr. A. Jacobshagen (Gast für BfArM), I. Klöckner (Gast für VHD), M.Sc. K. Konrat (Gast für RKI), Prof. Dr. U. Rösler (Gast für DVG), Dr. U. Teichert (Gast für BVÖGD), Dr. V. Weinheimer (Gast für BAuA)

Ergänzende Informationen zur VAH-Listung von Schäumen/Sprays zur Desinfektion von Flächen und Medizinprodukten

Aktualisierung und Ergänzung der Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission aus Hyg Med 10/2020*

Stand: 23. August 2021

■ Grundsätzliches zur Wirksamkeitsprüfung von Flächendesinfektionsmitteln

Die Formulierungen und Anwendungsarten von Flächendesinfektionsmitteln verändern sich kontinuierlich. Zu den Tuchsystemen kamen in den letzten Jahren die Schäume hinzu. In der Folge müssen auch standardisierte Testmethoden für diese Desinfektionsverfahren angepasst bzw. neu entwickelt werden, um die Anwendungsbedingungen der Praxis abzubilden und die Wirksamkeit zu bestätigen.

Prinzipiell wird bei chemischen Verfahren zur Flächendesinfektion zwischen den Anwendungsarten „mit Mechanik“ (Wischen) und „ohne Mechanik“ (Sprühen ohne nachfolgendes Wischen) unterschieden (Abbildung 1). Für die VAH-Zertifizierung und -Listung leitet sich aus der Anwendungsart ab, welche praxisnahen Prüfungen erforderlich sind.

■ Flächendesinfektion „mit Mechanik“

In der Regel werden Flächendesinfektionsmittel im Wischverfahren eingesetzt (Synonyme: Scheuer-Wisch-Desinfektion, mit Mechanik, mit Wischen) [1, 2]. Bei diesem Verfahren wird das Desinfektionsmittel mit einem Tuch unter leichtem Druck verteilt, die Komponente der Mechanik ist hier also Teil des Desinfektionsprozesses. Die benö-

tigte Desinfektionsmittel-Menge ist bei der Wischdesinfektion geringer als bei der Sprühdessinfektion. Dies wird in der Prüfmethodik mit abgebildet [3]. **Es ist immer auf eine ausreichende Benetzung der Fläche zu achten.**

Anwendungsart

- Alle (752 Produkte)
- Mit mechanischer Einwirkung (wischen)
 - Ohne spezifizierte Tücher (432 Produkte)
 - Tuchtränkesystem mit spezifiziertem Tuch (2 Produkte)
 - ready-to-use Tuchsystem (218 Produkte)
- Ohne mechanische Einwirkung
 - Ohne Wischen (z. B. Sprühen) (125 Produkte)

Abbildung 1: Anwendungsarten von Flächendesinfektionsmitteln: Abbildung aus der VAH-Liste online, Detailsuche Flächendesinfektion, Stand 09.08.2021.

Verband für Angewandte Hygiene e.V. Desinfektionsmittel-Kommission

Verantwortlich:
Prof. Dr. med. Martin Exner
(Vorsitzender)
Dr. rer. nat. Jürgen Gebel
(Schriftführer)

c/o Institut für Hygiene und
Öffentliche Gesundheit der
Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
53127 Bonn
Tel: 0228 287-14022
Fax: 0228 287-19522
E-Mail: info@vah-online.de
Internet: www.vah-online.de

* Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Wirksamkeitsprüfung von Schäumen zur Desinfektion von Flächen und Medizinprodukten. Fachinformationen für Antragsteller und Laboratorien. HygMed 2020;45(10):171. https://vah-online.de/files/download/vah-mitteilungen/VAH_Sch%C3%A4ume%20F%C3%A4che%20_EWZ_HM_10_20.pdf

Tabelle 1: Anwendungsarten der Flächendesinfektion - tabellarische Übersicht einschließlich Prüfmethode.

Flächendesinfektion mit mechanischer Einwirkung (wischen) (https://vah-liste.mhp-verlag.de/)	Flächeneinsatztyp	Anwendungsart	Prüfmethodik für die VAH-Listung
Ohne spezifizierte Tücher	Das Desinfektionsmittel wird als gebrauchsfertiges Konzentrat verwendet oder vor Ort verdünnt (gemäß Dosierangabe in Prozent) und dann mit einem vom Anwender ausgewählten, beliebigen Wischtuch oder Wischmopp aufgetragen, das/der mit dem Desinfektionsmittel getränkt ist.		VAH-Methode 14.2 oder EN 16615 plus Anforderungen wie beschrieben in [2]
Tuchtränkesystem mit spezifiziertem Tuch	Die spezifizierten Tücher werden mit dem Desinfektionsmittel vorgetränkt, entweder mit dem gebrauchsfertigen Konzentrat oder in der angegebenen Verdünnung gemäß Dosierangabe.		VAH-Methode 14.2 oder EN 16615 plus Anforderungen wie beschrieben in [2] Hinweis: Es werden Tuchgröße, Tuchmaterial, Tuchgewicht in g pro cm ² sowie das Tuchtränkevolumen in der VAH-Liste angegeben
Ready-to-use Tuchsystem (gebrauchsfertige Tücher)	Die vorgetränkten Desinfektionsmittel-Tücher werden vom Hersteller gebrauchsfertig zur Verfügung gestellt.		VAH-Methode 14.2 oder EN 16615 plus Anforderungen wie beschrieben in [3]

Tabelle 1 erläutert die Anwendungsarten der Wischdesinfektion und welche Prüfmethoden für die VAH-Zertifizierung und -Listung entsprechend der Anwendungsart erforderlich sind.

■ Sonderfall: Schäume bzw. Sprays für die Wischdesinfektion

Anwendungsart

Seit einiger Zeit werden **Schäume/Sprays für die Wischdesinfektion** von Flächen, einschließlich der manuellen Wischdesinfektion von Medizinprodukteflächen, angeboten. Die Anwendungsempfehlungen und die Appli-

kation der Schäume/Sprays erfolgen dabei **in unterschiedlicher Weise, je nach Herstellerangabe**. Auch die **Sprühköpfe** und die **Menge** an Desinfektionsmittel, die mit einem Hub aufgebracht werden, unterscheiden sich. Überwiegend werden Schäume/Sprays in den beiden folgenden Anwendungsarten eingesetzt:

1. Der Schaum/das Spray wird direkt auf die Fläche aufgebracht und unmittelbar anschließend mit einem trockenen Tuch verteilt.
2. Der Schaum/das Spray wird zuerst auf ein trockenes Tuch aufgebracht

und mit diesem unmittelbar anschließend auf der Fläche verteilt.

Dies bedeutet, dass die Anwendung der Schäume/Sprays in diesen beiden Fällen immer **mit einer mechanischen Einwirkung** verbunden ist. Es ist für den Erfolg des Desinfektionsprozesses unbedingt erforderlich, dass das Tuch ausreichend Desinfektionsmittel abgibt und die **Flächen satt benetzt** sind. Bei der Anwendung ist darauf ganz besonders zu achten, auch da i.d.R. der Schaum/das Spray auf trockene Tücher aufgebracht wird.

Prüfmethodik: Informationen für Hersteller und Laboratorien

Die derzeitigen Prüfmethoden für chemische Flächendesinfektionsverfahren mit mechanischer Einwirkung, die VAH-Methode 14.2 oder die europäische Norm EN 16615 (4-Felder-Test für die Wischdesinfektion), sind auf die Prüfung von Flüssigkeiten mit spezifischen Tüchern (in der Regel mit einem Volumen von < 5 ml/m²) oder mit unspezifischen Tüchern (in der Regel mit einem Volumen von ca. 10 ml/m²) abgestimmt ([4], siehe auch Tabelle 1). Die Desinfektion mit Schäumen oder Sprays in der Anwendungsform „sprühen und wischen“ wird dabei nicht abgebildet. Bei der Testung dieser Schäume oder Sprays wird zwar entsprechend VAH-Methode 14.2 oder EN 16615 immer ein mit der Desinfektionsmittel-Flüssigkeit getränktes (unspezifisches) Tuch verwendet, jedoch nicht in Kombination mit dem Spray bzw. Schaum, der aus der Flüssigkeit generiert wird, und dem Tuch.

Der VAH hat daher bereits 2020 eine Mitteilung veröffentlicht, in der die Anforderungen für die Zertifizierung der beiden oben genannten Anwendungsarten von Schäumen erläutert werden [5]: Da es für Schäume noch keine etablierten spezifischen Testverfahren gibt, fordert die DMK für die Zertifizierung von Schäumen und Sprays mit mechanischer Einwirkung grundsätzlich die Testung nach VAH-Methode 14.2 oder EN 16615 als Flüssigkeit in Kombination mit Tüchern. **Zusätzlich** zu dieser Prüfung ist für den Schaum/das Spray eine **Eckwertprüfung** mit *S. aureus* durchzuführen (siehe Tabelle 2), bei der das Produkt entsprechend der vorgesehenen Anwendungsart bzw. Applikationsform geprüft wird.

Tabelle 2: VAH-Anforderungen an die Prüfung und Zertifizierung von Schäumen oder Sprays mit mechanischer Einwirkung.

Flächendesinfektion mit mechanischer Einwirkung (wischen) (https://vah-liste.mhp-verlag.de/)	Flächeneinsatztyp	Anwendungsart	Prüfmethodik für die VAH-Listung
Sonderfall Schäume/ Sprays Sprühen/schäumen und wischen	Das Desinfektionsmittel wird entweder 1) unmittelbar auf die Fläche aufgesprüht und anschließend mit einem trockenen Tuch auf der Fläche verteilt. oder 2) erst auf ein trockenes Tuch aufgesprüht und anschließend auf der Fläche verteilt.	  	VAH-Methode 14.2 oder EN 16615 plus Eckwertprüfung mit <i>S. aureus</i> gemäß VAH-Methode 14.2 bzw. EN 16615

Eine allgemeingültige, **standardisierte Prüfung von Schäumen und Sprays** ist aufgrund unterschiedlicher Sprühköpfe und dem damit verbundenen unterschiedlich abgegebenen Volumen und Verschäumungszahlen (d.h. Volumen Schaum pro ml Flüssigkeit) der auf dem Markt verfügbaren Produkte **nicht möglich**. Daher müssen die Hersteller produktbezogen **zusätzlich Eckwertprüfungen** ein- bzw. nachreichen, wenn sie einen Schaum oder ein Spray zur Anwendung „sprühen und wischen“ zertifizieren lassen möchten. Mit dieser Eckwertprüfung werden die Anwendungsempfehlungen der Hersteller für Schäume/Sprays gestützt.

Bei der Eckwertprüfung sollen **2 Testflächen pro beantragter Konzentration-Zeit-Relation** und **1 Testfläche pro WSH-Kontrolle** in einem Durchgang mit dem Standard-Tuch zusätzlich überprüft werden.

Bei der **Anwendungsart 1** wird die vom Hersteller empfohlene Anzahl HÜBE auf die Testfläche aufgesprüht. Dabei wird die Hälfte der HÜBE unmittelbar vor das Testfeld 1 aufgesprüht, um das Einheitsgewicht (Granitblock gemäß VAH-Methodenbuch) für die Prüfung mit dem Tuch dort aufzusetzen. Die anderen HÜBE werden direkt auf das Testfeld 1 aufgesprüht und unmittelbar danach gewischt. Der Wischvorgang und die Rückgewinnung des Testorganismus erfolgt entsprechend VAH-Methode 14.2 bzw. EN 16615. Die Einwirkzeit beginnt mit Vollendung des Wischvorgangs. Im Prüfbericht ist die Anzahl der HÜBE (inkl. Volumen in ml bzw. g) pro Testfläche anzugeben.

Bei der **Anwendungsart 2** wird die vom Hersteller empfohlene Anzahl HÜBE pro Tuch auf das auf den Granitblock aufgespannte Tuch aufgesprüht und unmittelbar danach entsprechend VAH-Methode 14.2 bzw. EN 16615 gewischt. Die Einwirkzeit beginnt mit Vollendung des Wischvorgangs. Im Prüfbericht ist die Anzahl der HÜBE (inkl. Volumen in ml bzw. g) pro Tuch und Testfläche anzugeben. Hierfür ist die Differenz des Gewichts des feuchten Tuchs vor dem Wischen (trockenes Tuch plus Hubvolumen) und des Tuchgewichts nach dem Wischprozess zu ermitteln.

In den **Anwendungsempfehlungen des Gutachters** muss die **Anzahl der HÜBE** für eine ausreichende Benetzung der Testfläche bzw. des Tuchs angegeben sein.

Diese Anforderungen **gelten ab dem 2.9.2021**. Für bereits vor diesem Stichtag zertifizierte Schäume bzw. Sprays zur Anwendung mit Mechanik, für die die entsprechenden Eckwertprüfungen noch nicht vorliegen, müssen diese **bis zum 30.06.2022 nachgereicht** werden.

Kennzeichnung der Zusatzprüfungen für Schäume und Sprays zur Anwendung mit Mechanik in der Desinfektionsmittel-Liste des VAH für Anwender

Schäume oder Sprays mit den oben genannten Anwendungsempfehlungen finden Anwender in der VAH-Liste online in der Detailsuche unter „**Flächendesinfektion mit mechanischer Einwirkung**“, „ohne spezifizierte Tücher“. Zukünftig werden im Feld „Zusätzliche Bemerkungen“ die Informationen eingetragen, welche Anwendungsart gemäß der Eckwertprüfung geprüft wurde: Schaum/Spray im Tuch oder/und Schaum/Spray auf Fläche. In der Print-Ausgabe der VAH-Liste sind diese Produkte im Kapitel 3.1 aufgeführt.

Hinweis:

Zur Wirksamkeitsprüfung von Schäumen zur hygienische Händedesinfek-

tion, siehe VAH-Mitteilung vom Mai 2020 [6].

■ **Flächendesinfektion „ohne Mechanik“**

Flächendesinfektionsmittel „ohne Mechanik“ werden **ohne Wischen** mittels **Sprühen oder Schäumen** auf trockene Flächen aufgetragen. Dieses Sprüh- oder Schaumverfahren kommt zum Einsatz, wenn keine Wischdesinfektion möglich ist, beispielsweise für schwer zugängliche Nischenflächen oder offene porige Oberflächen. Produkte, die „ohne Mechanik“ gelistet sind, **dürfen während der Einwirkzeit nicht mit Tüchern verteilt** werden, es sei denn, sie sind **zusätzlich** auch als Verfahren für die Wischdesinfektion getestet worden und für diese Anwendungsart VAH-zertifiziert und -gelistet.

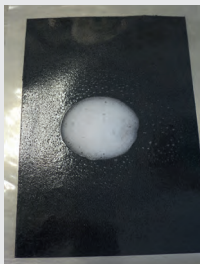
Auch bei Sprays und Schäumen ist darauf zu achten, dass **die zu desinfi-**

zierende Fläche komplett und satt benetzt ist (Tabelle 3). Erst nach der Einwirkzeit darf überflüssiges Desinfektionsmittel verteilt oder abgenommen werden.

Desinfektionsmittel, die ohne Wischen verwendet werden, müssen in der Print-Ausgabe der Desinfektionsmittel-Liste des VAH aus der Rubrik 3.1 in der Spalte „ohne Mechanik“ bzw. durch Anklicken der Option „ohne mechanische Einwirkung“/„ohne Wischen“ in der Detailsuche der Online-Ausgabe der VAH-Liste ausgewählt werden (vgl. Abbildung 1).

Aus **Arbeitsschutzgründen** ist die **Sprühdesinfektion nur in Ausnahmefällen** zulässig [7, 8]. Inwieweit bei einer Schaumdesinfektion die Arbeitssicherheit weniger kritisch ist im Vergleich zu einer Sprühdesinfektion, ist noch nicht abschließend bewertet.

Tabelle 3: Anforderungen an die Prüfung von Schäumen oder Sprays ohne mechanische Einwirkung.

Flächendesinfektion ohne mechanische Einwirkung (sprühen) (https://vah-liste.mhp-verlag.de/)	Flächeneinsatztyp	Anwendungsart	Prüfmethodik für die VAH-Listung
Ohne Wischen (z.B. sprühen)	Das Desinfektionsmittel wird als gebrauchsfertiges Konzentrat (oder wie angegeben vorverdünnt) aufgesprüht und während der Einwirkzeit nicht mit einem Tuch verteilt .		VAH-Methode 14.1 oder EN 17387; (bzw. EN 13697; EN 14349; EN 16438 mit angepassten Bedingungen) [4]

Für die sachgerechte Durchführung der jeweiligen Desinfektionsverfahren unter Berücksichtigung der Anwendungsart und der Eigenschaften der Produktformulierung, d.h. Lösung, vorge-tränktes Tuch, gebrauchsfertiges Tuch, Schaum oder Spray, ist eine **gezielte Schulung** notwendig.

■ Literatur

1. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH unter Mitwirkung der 4+4 Arbeitsgruppe. Listung von Flächendesinfektionsmitteln. HygMed 2016;41(6):169–170.
2. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH unter Mitwirkung der 4+4 Arbeitsgruppe. Listung von Flächendesinfektionsmitteln – Spezifizierung der notwendigen Prüfungen. HygMed 2017; 42(10):199–200.
3. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Testverfahren zur Prüfung von Flächendesinfektionsmitteln für Verfahren ohne Mechanik. HygMed 2015; 40(11):467.
4. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.). Methoden und Anforderungen zur VAH-Zertifizierung von chemischen Desinfektionsverfahren. mhp Verlag: Wiesbaden, 2015. Mit Ergänzungslieferungen (Stand: Juni 2019).
5. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Wirksamkeitsprüfung von Schäumen zur Desinfektion von Flächen und Medizinprodukten. Fachinformationen für Antragsteller und Laboratorien. Hyg-Med 2020;45(10):171.
6. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.) Wirksamkeitsprüfung von alkoholischen Schäumen zur hygienischen Händedesinfektion. HygMed 2020;45(5):76–78.
7. Hengesbach B, Eikmann Th. Vor- und Nachteile der Sprühdesinfektion. Hyg-Med 2007;32(6):258–260.
8. DGUV Information 207-206. Prävention chemischer Risiken beim Umgang mit Desinfektionsmitteln im Gesundheitswesen. DGUV: Berlin, Dezember 2016.

Diese Mitteilung wurde erarbeitet von der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

Die Mitglieder der Desinfektionsmittel-Kommission

Dr. B. Christiansen (stellvertretende Vorsitzende), Dr. M. Decius, Priv.-Doz. Dr. M. Eggers, Prof. Dr. M. Exner (Vorsitzender), Dr. J. Gebel (Schriftführer), Dr. S. Gemein, Priv.-Doz. Dr. S. Gleich, Dr. Britt Hornei, Dr. B. Hunsinger, Prof. Dr. A. Kramer, Prof. Dr. H. Martiny, Priv.-Doz. Dr. F. Pitten, Priv.-Doz. Dr. K. Schröppel, Dr. I. Schwebke, Dr. J. Steinmann, Assoc. Prof. Priv.-Doz. Dr. M. Sucomel, Dr. J. Tatzel, Prof. Dr. L. Vossebein, Prof. Dr. C. Wendt, Prof. Dr. M. H. Wolff

Unter fachlicher Beratung von:

P. Ahl, Fachapothekerin für Klinische Pharmazie (Gast für ABDA), Priv.-Doz. Dr. Ch. Brandt (Gast für DGHM), F. Helm (Gast für Bundeswehr), Dr. A. Jacobshagen (Gast für BfArM), I. Klöckner (Gast für VHD), M.Sc. K. Konrat (Gast für RKI), Prof. Dr. U. Rösler (Gast für DVG), Dr. U. Teichert (Gast für BVÖGD), Dr. V. Weinheimer (Gast für BAuA)

Flächendesinfektion

14.2 Flächendesinfektion mit Mechanik – praxisnaher 4-Felder-Test*

(Methode 14.2)

14

Prüfung der bakteriziden, levuroziden, fungiziden, tuberkuloziden und mykobakteriziden Wirksamkeit auf nicht-porösen Oberflächen mit Mechanik

14.2a Prüfung der Wirksamkeit einer Desinfektionslösung im Wischverfahren mit einem standardisierten Tuchmaterial

In dieser Prüfung liegt der Schwerpunkt auf der Evaluation der **Wirksamkeit des Desinfektionsmittels** bezüglich des Erfolges einer Wischdesinfektion von Oberflächen einschl. Fußböden mit einem **standardisierten Tuchmaterial**.

14.2b Prüfung der Wirksamkeit der Kombination von einem spezifizierten Wischtuch und einem Desinfektionsmittel

In dieser Prüfung liegt der Schwerpunkt auf der Evaluation der **Wirksamkeit einer Kombination des Desinfektionsmittels mit einem spezifizierten Tuchmaterial**, das z. B. im Vortranksystem für die Oberflächendesinfektion eingesetzt werden soll. Hierbei wird auch die vorgesehene Verwendungsdauer nach Anbruch geprüft.

14.2.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	(DSM 799)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541	(DSM 3320)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	(DSM 939)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	(DSM 1386)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Mycobacterium terrae</i>	ATCC 15755	(DSM 43227)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 15769	(DSM 44157)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (früher <i>A. niger</i>)	ATCC 16404	(DSM 1988)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sowie der Prüfsuspensionen sind in ➔ Kapitel 6 beschrieben. Um ein Absterben während der Trocknungszeit zu verhindern, wird die Prüfsuspension mit *Pseudomonas aeruginosa* mit 0,2 % Glycerin versetzt.

*Entsprechend kann auch der Phase-2-Stufe-2-Test nach prEN 16615 mit angepassten Bedingungen durchgeführt werden [1].

Die Anzahl der KBE in der Prüfsuspension wird mit dem Verdünnungsmittel unter Verwendung einer geeigneten Methode auf $1,5 - 5,0 \times 10^9$ pro ml (*C. albicans* und *A. brasiliensis* $1,5 - 5,0 \times 10^8$ pro ml) eingestellt.

Zur Simulation praxisnaher Bedingungen wird den Prüfsuspensionen maximal 2 h vor der Prüfung 0,03 % Albumin (→ *Anhang A1.8* – geringe organische Belastung) bzw. 0,3 % Albumin und 0,3 % Schaferythrozyten (→ *Anhang A1.8* – hohe organische Belastung) zugesetzt.

14.2.2 Produktprüflösung

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in → Kapitel 5 beschrieben.

14.2.3 Testzeiten

Als Testzeiten sind 1, 5, 15, 30 und/oder 60 min auszuwählen.

14.2.4 Materialien

14.2.4.1 Testflächen

Als Testfläche dient PVC-Bodenbelag mit der Abmessung 20x50 cm (PVC mit PUR Coating, Dicke 2 mm (z. B. PLASTO Bodenbeläge, Handelsgesellschaft mbH & Co.KG, Pfaffenweg 25, 53227 Bonn-Beuel)). Vorreinigung mit 80 %igem vergällten Ethanol ohne weitere Zusätze.

Auf der Testfläche werden vier Testfelder als Quadrate à 5x5 cm in einer Reihe im Abstand von 5 cm auf der Fläche mit der Bezeichnung 1–4 mit einem Bleistift oder Permanent-Marker markiert. Die Reihe soll in der Mitte der Testfläche verlaufen und das erste Feld einen Abstand von 10 cm zum Rand der Testfläche aufweisen (→ *Abb. 14.2.1*).



Abbildung 14.2.1: Das Einheitsgewicht wird mit Parafilm auf der Unterseite bespannt. Auf die mit Parafilm geschützte Fläche wird das einmal gefaltete Tuch gelegt und mit den Fingern der Hand fixiert, die das Gewicht über die Testfläche bewegt.

Alle Testflächen werden während des gesamten Versuches waagrecht gehalten. Die im Versuchsraum gemessenen Werte der rel. Feuchte und die Raumlufttemperatur ($20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) sind im Bericht anzugeben. Für die Trocknungskontrollen T_0 und T_t (→ *14.3.10.1*)

werden auf schmälere Testflächen (Minimum 7 cm x 13 cm) zwei Testfelder als Quadrate à 5 x 5 cm markiert.

14.2.4.2 Utensilien für den Wischvorgang

Wischtuch mit der Abmessung 17,5 cm x 28 cm (55 % Zellstoff, 45 % Polyethylenterephthalat (PET) (z. B. Tork Premium Spezial Tücher, Art. Nr. 90491, Fa. SCA Tork)).

Container mit einem Fassungsvermögen von 1 l für die Tränkung der Wischtücher.

Einheitsgewicht: Granitblock (2,3 – 2,5 kg) mit den Abmessungen 12,1 cm x 8,6 cm x 8,6 cm (Länge x Breite x Höhe). Die Höhe kann in Abhängigkeit der Materialdichte variieren. Die Verwendung des Einheitsgewichtes standardisiert den Wischvorgang und simuliert einen mittleren Anpressdruck des Wischens in der Praxis.

Parafilm (für die Einmalverwendung): Zum Schutz der unteren horizontalen und vertikalen Flächen des Einheitsgewichtes vor jeglichen Kontaminationen während des Wischvorgangs wird Parafilm verwendet. Dieser Parafilm muss nach jedem Wischvorgang erneuert werden (z. B. Parafilm® M (100 mm) Art.Nr. 7016 05, BRAND GMBH + CO KG, Postfach 11 55, D-97861 Wertheim).

Spatel aus Metall, Glas oder Kunststoff mit einer Kantenlänge von 3 cm zum Verteilen der Prüfsuspension bei der Kontamination der Testflächen.

Tupfer mit einem tränkbaaren Teil aus reiner Baumwolle und frei von Substanzen, die eine Hemmung oder Förderung des Prüfproduktes bedingen oder die Testorganismen inaktivieren können.

14.2.5 Kontamination des Testfeldes 1

Für jede zu prüfende Produktprüflösung wird eine Testfläche (➔ 14.2.4.1) vorbereitet. Auf das Testfeld 1 werden 0,05 ml Prüfsuspension mit einer Pipette aufgebracht und mit einem Spatel auf dem gesamten Testfeld von 5 x 5 cm gleichmäßig verteilt. Die Testfläche wird bis zur optischen Trockenheit (max. 60 min) bei Raumtemperatur aufbewahrt (➔ 14.2.4). Der zur Verteilung der Prüfsuspension benutzte Spatel ist zuerst auf einer Blindprobe zu verwenden, um zu vermeiden, dass das Testfeld 1 mit einer zu geringen Prüfsuspensionsmenge kontaminiert wird.

14.2.6a Methodik zur Überprüfung einer Desinfektionsmittellösung im Wischverfahren

Nach Antrocknung der Prüfsuspension erfolgt der Wischvorgang mit dem Wischtuch (➔ 14.2.4.2), welches 30 min ± 5 min zuvor mit jeweils 16 ml des Prüfproduktes benetzt wird. Der Wischvorgang mit einem Wischtuch erfolgt mit einem Einheitsgewicht (➔ Abb. 14.2.1). Das benetzte Wischtuch wird vor und nach dem Wischvorgang gewogen, um die abgegebene Prüfproduktmenge bestimmen zu können. Der Wischvorgang erfolgt von Testfeld 1 zu Testfeld 4 und wieder zurück zu Testfeld 1 (➔ Abb. 14.2.2).

Dabei gilt zu beachten, dass der Block die Wischstrecke 1 – 2 – 3 – 4 innerhalb einer Sekunde überfährt, wendet und innerhalb der nächsten Sekunde zum Ausgangspunkt zurückkehrt, sodass möglichst die gesamte Testfläche befeuchtet wird, aber trotzdem die Testfelder 1–4 zweimal komplett überfahren werden. Unmittelbar nach dem Wischvorgang wird die Stoppuhr gestartet und die Fläche über die entsprechende Einwirkzeit (t) bei Raumtemperatur gelagert.

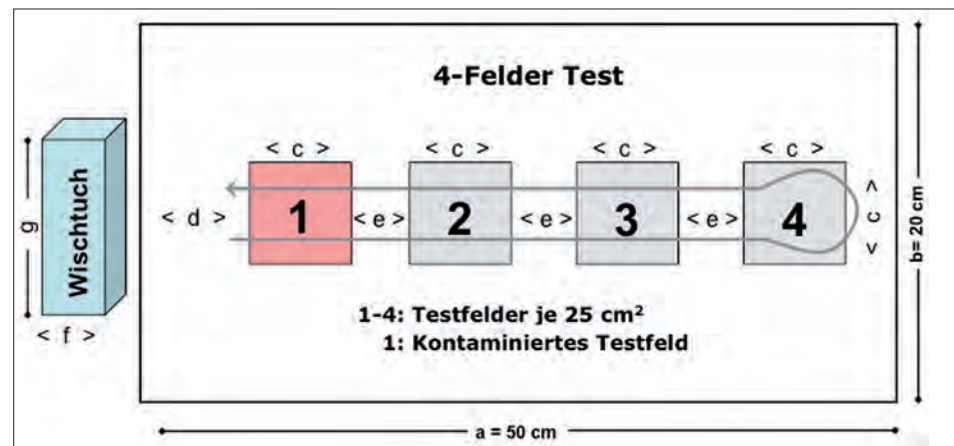


Abbildung 14.2.2: Schematische Darstellung des 4-Felder-Tests. Testfläche (15 x 50 cm) mit 4 Testfeldern (5 x 5 cm) und vorgegebener Wischstrecke des Wischtuches. $a = 50$ cm, $b = 20$ cm, $c = 5$ cm, $d = 10$ cm, $e = 5$ cm, Abmessung des Einheitsgewichtes $f \times g$ mind. 8,6 cm x 12,1 cm.

14.2.6b Methodik zur Überprüfung der Kombination Desinfektionsmittellösung mit spezifiziertem Wischtuch

Nach Antrocknung der Prüfsuspension erfolgt der Wischvorgang mit dem Wischtuch des Herstellers, welches 30 ± 5 min zuvor mit der vom Hersteller vorgegebenen Menge des Prüfproduktes benetzt worden ist. Der Wischvorgang erfolgt analog der Methode \rightarrow 14.2.6a.

14.2.7 Rückgewinnung der Testorganismen von Testfeld 1–4

Der Nachweis rückgewinnbarer KBE von jedem der Testfelder 1–4 erfolgt mittels Wattetupferabstrich-Verfahren. Mit einem in Neutralisationsmittel (\rightarrow Anhang A1.7) befeuchteten Wattetupfer wird das gesamte Testfeld 1 in horizontaler, vertikaler und diagonaler Richtung gewischt. Dieser Rückgewinnungsprozess wird mit demselben Tupfer nach Auswaschen in einem Reagenzröhrchen mit 5 ml Neutralisationsmittel wiederholt. Die untere Hälfte des Tupfers wird anschließend durch Abbrechen am Rand des Neutralisationsmittlröhrchen in das Neutralisationsmittel überführt. Mit einem zweiten, trockenen Wattetupfer wird der Rückgewinnungsprozess auf demselben Testfeld einmalig wiederholt. Der Rückgewinnungsprozess pro Testfeld benötigt etwa 1 min. Pro Testfeld werden die 2 eingesetzten Wattetupfer in 5 ml Neutralisationsmittel zusammengeführt. Die Rückgewinnung auf Testfeld 2–4 erfolgt in gleicher Weise.

- \rightarrow zur Inkubation siehe 14.2.8
- \rightarrow zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 14.2.9

Nach $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit werden zweimal 0,5 ml aus dem jeweiligen Prüfneutralisationsgemisch (Direktansatz) auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA, *M. terrae* und *M. avium* 7H10) ausgespatelt.

14.2.8 Inkubation

Die Nährböden werden 48 h bei $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ (*C. albicans*: 72 h bei $30 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ und *A. brasiliensis*: 7 bis 9 Tage (es empfiehlt sich eine erste Zählung nach 72 h) bei $30 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$; *M. terrae* und *M. avium* 21 Tage bei $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$) inkubiert.

14.2.9 Auswertung

Für Testfeld 1 werden Nährböden ausgezählt, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 14 und 330 liegt.

Für die Testfelder 2 bis 4 werden Nährböden ausgezählt, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 1 und 330 liegt.

KBE_1 : Anzahl der KBE von 2 Platten á 0,5 ml auf Testfeld 1

KBE_2 : Anzahl der KBE von 2 Platten á 0,5 ml auf Testfeld 2

KBE_3 : Anzahl der KBE von 2 Platten á 0,5 ml auf Testfeld 3

KBE_4 : Anzahl der KBE von 2 Platten á 0,5 ml auf Testfeld 4

KBE_{T1} : Anzahl der KBE pro 25 cm^2 (Testfeld 1) (entspricht $KBE_1 \times 5$)

KBE_{T2} : Anzahl der KBE pro 25 cm^2 (Testfeld 2) (entspricht $KBE_2 \times 5$)

KBE_{T3} : Anzahl der KBE pro 25 cm^2 (Testfeld 3) (entspricht $KBE_3 \times 5$)

KBE_{T4} : Anzahl der KBE pro 25 cm^2 (Testfeld 4) (entspricht $KBE_4 \times 5$)

KBE_{T0} : Anzahl der KBE pro ml auf Kontrollfeld $T_0 \times 5$ (\Rightarrow 14.2.10.1)

KBE_{Tt} : Anzahl der KBE pro ml auf Kontrollfeld $T_t \times 5$ (\Rightarrow 14.2.10.1)

R: Reduktion auf Testfeld 1

RC: Restkontamination auf Testfeld 1

AF: Akkumulation Testfeld 2–4

Die Reduktion (R) wird nach folgender Formel berechnet:

$$\lg R = \lg (KBE_{Tt}) - \lg (KBE_{T1})$$

$$\lg RC = \lg (KBE_{T1})$$

$$AF_{2-4} = [(KBE_{T2} + KBE_{T3} + KBE_{T4}) / 3]$$

14.2.10 Validierung

14.2.10.1 Kontrolle der Rückgewinnung nach Trocknung (T_0 , T_1)

Zur Quantifizierung der Rückgewinnbarkeit ohne jeglichen chemischen oder mechanischen Einfluss (Trocknungskontrolle) werden parallel zur Kontamination des Testfelds 1 auf einer separaten Testfläche (mind. 7x13 cm) zwei Kontrolltestflächen á 5 x 5 cm (T_0 und T_1) analog zu Testfeld 1 (⇒ 14.2.5) kontaminiert.

Die Rückgewinnung von Testfeld T_0 erfolgt unmittelbar nach Antrocknung und vor dem Wischvorgang der kontaminierten Testflächen.

Die Rückgewinnung der Testorganismen von Testfeld T_1 erfolgt nach der Einwirkzeit (T_1), um quantifizieren zu können, ob Testorganismen über die Einwirkzeit ohne Behandlung inaktiviert werden.

Die Rückgewinnung der Testorganismen von den Testfeldern (T_0 und T_1) erfolgt mittels Wattetupferabstrich-Verfahren (⇒ 14.2.7). Mit einem in Neutralisationsmittel befeuchteten Wattetupfer wird das gesamte Testfeld T_0 bzw. T_1 in horizontaler, vertikaler und diagonaler Richtung gewischt. Dieser Rückgewinnungsprozess wird mit demselben Tupfer nach Auswaschen in einem Reagenzröhrchen mit 5 ml Neutralisationsmittel wiederholt. Die untere Hälfte des Tupfers wird anschließend durch Abbrechen am Rand des Neutralisationsmittlröhrchen in das Neutralisationsmittel überführt. Mit einem zweiten, trockenen Wattetupfer wird der Rückgewinnungsprozess auf demselben Testfeld einmalig wiederholt. Der Rückgewinnungsprozess pro Testfeld benötigt etwa 1 min. Pro Testfeld werden 2 eingesetzte Wattetupfer in 5 ml Neutralisationsmittel zusammengeführt.

➔ zur Inkubation siehe 14.2.8

➔ zur Berechnung und

Darstellung der Ergebnisse

siehe 14.2.9

Nach der Neutralisationszeit von 5 min ± 10 s werden eine 10^{-4} - und 10^{-5} -Verdünnung (*P. aeruginosa* 10^{-3} und 10^{-4} , *C. albicans* und *A. brasiliensis* 10^{-2} - und 10^{-3}) angelegt und aus diesen zweimal 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

Ermittelt werden die koloniebildenden Einheiten pro Testfeld (KBE/25 cm²).

14.2.10.2 WSH-Kontrolle (Ko1)

➔ zur Inkubation siehe 14.2.8

➔ zur Berechnung und

Darstellung der Ergebnisse

siehe 14.2.9

Zur Bestimmung der Anzahl der KBE pro 25 cm² ohne Einwirkung des Produktes (Ko1) werden pro Testzeit parallel kontaminierte Flächen anstelle der Produktprüflösung mit WSH + 0,1% Polysorbat 80 behandelt. Aus dem „Prüfneutralisationsgemisch“ werden zweimal 0,5 ml direkt und eine 10^{-1} -Verdünnung auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

14.2.10.3 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)

Diese Kontrolle kann entfallen, wenn aus den quantitativen Suspensionsversuchen (⇒ Methode 9) hierzu schon aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. Sofern solche Resultate

nicht vorliegen, sollte diese Kontrolle einmal vor den eigentlichen Versuchen durchgeführt werden.

Es wird eine Kontrolle durchgeführt, die den Nachweis der erfolgreichen Neutralisation belegen soll, indem 0,1 ml der Produktprüflösung in 5 ml Neutralisationsmittel (→ *Anhang A1.7*) überführt werden. Nach 5 min ± 10 s Neutralisationszeit werden 0,1 ml einer 10⁻⁴-Verdünnung der Prüfsuspension zugesetzt. Nach der längsten Einwirkzeit werden sowohl hiervon als auch aus einer 10⁻¹-Verdünnung je 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

Anmerkung: Zeigt sich im Test eine unzureichende Neutralisation ($Ko_2 < 10^3$ KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden.

→ zur Inkubation siehe 14.2.8

→ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 14.2.9

14.2.10.4 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko_3)

Diese Kontrolle kann entfallen, wenn aus den quantitativen Suspensionsversuchen (→ Methode 9) hierzu schon aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. Sofern solche Resultate nicht vorliegen, sollte diese Kontrolle einmal vor den eigentlichen Versuchen durchgeführt werden.

Diese Kontrolle wird durchgeführt, indem 0,1 ml einer 10⁻⁴-Verdünnung der Prüfsuspension in 5 ml Neutralisationsmittel (→ *Anhang A1.7*) überführt werden. Nach 30 min werden sowohl hiervon und ggf. auch aus einer 10⁻¹-Verdünnung je 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

Anmerkung: Zeigt sich im Test ein toxischer Effekt ($Ko_3 < 10^3$ KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel verwendet werden.

→ zur Inkubation siehe 14.2.8

→ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 14.2.9

14.2A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Flächendesinfektion mit Mechanik – praxisnaher 4-Felder-Test

Für die Beurteilung eines Flächendesinfektionsmittels werden orientierende, obligate und optionale Prüfungen zugrunde gelegt.

Orientierend

- Bestimmung der bakteriostatischen und levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel (Methode 7)
- Bestimmung der bakteriziden Wirkung im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8)
 - orientierend – Nicht notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) alle Gram-negativen Testorganismen (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*) getestet werden; Prüfbedingungen s. Tabelle 14.2.1

Obligat

– Bestimmung der bakteriziden Wirkung im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8).
Notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) nicht alle Gram-negativen Testorganismen (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*) getestet werden;
Prüfbedingungen s. Tabelle 14.2.1

– Bestimmung der bakteriziden und levuroziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9.1 bzw. DIN EN 13727 [2] und DIN EN 13624 [3]); Prüfbedingungen s. Tabelle 14.2.2 und 14.2.3

Das zu prüfende Produkt muss die Anforderungen aus ► **Tabelle 14.2.4** für die obligaten Testorganismen unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit bei 20 °C ± 1 °C erfüllen.

– Prüfung der bakteriziden und levuroziden Wirkung unter praxisnahen Bedingungen;
Prüfbedingungen s. Tabelle 14.2.2 und 14.2.3:

– mit mechanischer Einwirkung: Methode 14.2 bzw prEN 16615 [1]

Das zu prüfende Produkt muss die Anforderungen aus ► **Tabelle 14.2.4** für die obligaten Testorganismen unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit bei 20 °C ± 1 °C erfüllen.

Optional

Soll eine tuberkulozide oder mykobakterizide oder fungizide Wirksamkeit dargestellt werden, müssen neben den oben genannten obligaten Prüfungen folgende Prüfungen jeweils als Suspensionsversuch und praxisnaher Test durchgeführt werden.

– Bestimmung der tuberkuloziden, mykobakteriziden bzw. fungiziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9.1 bzw. DIN EN 14348 [4], DIN EN 13624; Prüfbedingungen s. Tab. 14.2.2 und 14.2.4)

– Überprüfung der tuberkuloziden, mykobakteriziden bzw. fungiziden Wirkung unter praxisnahen Bedingungen (Prüfbedingungen s. Tab. 14.2.2 bis 14.2.4):

– mit mechanischer Einwirkung: Methode 14.2 bzw prEN 16615 [1]

Das zu prüfende Produkt muss die Anforderungen aus ► **Tabelle 14.2.4** für die optionalen Testorganismen unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit bei 20 °C ± 1 °C erfüllen.

Die Prüfung zur Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch sowie unter praxisnahen Bedingungen gegenüber *Candida albicans* ist bei allen Flächendesinfektionsverfahren erforderlich. Die Testung gegenüber *Aspergillus brasiliensis* ist nur im Falle der zusätzlichen Aussage über die fungizide Wirksamkeit erforderlich.

Tabelle 14.2.1: Prüfbedingungen im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8). Erforderliche Reduktion: kein Wachstum (dargestellt als visuelle Trübung) in den Kulturröhrchen nach 48 h.

Anwendungs- verfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (min) ²
Flächen- desinfektion	<i>E. coli</i> K12 <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabilis</i>	ohne	Anwendungs- konzentration	20 ± 1	1, 5, 15, 30, 60

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (➔ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen.

Tabelle 14.2.2: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) und unter praxisnahen Bedingungen (Methode 14.2).

Anwendungs- verfahren	Testorganismen ⁴	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (min) ²
Flächen- desinfektion	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³ <i>C. albicans</i> <i>M. terrae</i> ⁴ <i>M. avium</i> ⁴ <i>A. brasiliensis</i> ⁴	gering und/oder hoch	Anwendungs- konzentration	20 ± 1	1, 5, 15, 30, 60

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (➔ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen. Bei der Prüfung ist auch die Einwirkzeit zu berücksichtigen, die direkt unter der kürzesten beantragten Einwirkzeit liegt. Das gilt auch, wenn methodisch nach EN geprüft wird.

³ Wenn im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa*.

⁴ Optional, wenn eine tuberkulozide, mykobakterizide oder fungizide Wirksamkeit beantragt wird.

Tabelle 14.2.3: In den einzelnen Durchgängen zu wählende Einwirkzeiten für die praxisnahen Prüfungen von Flächendesinfektionsmitteln.

Beantragte Einwirkzeit	1. Durchgang	2. Durchgang
Flächendesinfektion mit Mechanik (Methode 14.2)		
5 min	1 min, 5 min	5 min
15 min	5 min, 15 min	15 min
30 min	15 min, 30 min	30 min
60 min	30 min, 60 min	60 min

Tabelle 14.2.4: Anforderungen im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) und unter praxisnahen Bedingungen (Methode 14.2) – Flächendesinfektion mit Mechanik auf Feld 1.

Wirkungsbereich	Bakterizide Wirksamkeit	Levurozide Wirksamkeit	Fungizide Wirksamkeit	Tuberkulozide Wirksamkeit	Mykobakterizide Wirksamkeit
Reduktion	5 lg-Stufen ²	4 lg-Stufen ³	4 lg-Stufen ³	4 lg-Stufen	4 lg-Stufen
Belastung	gering und/oder hoch	gering und/oder hoch	gering und/oder hoch	gering und/oder hoch	gering und/oder hoch
Testorganismen	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ¹ <i>P. mirabilis</i> ¹	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> <i>A. brasiliensis</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. terrae</i> <i>M. avium</i>

¹ Prüfung im quantitativen Suspensionsversuch ist erforderlich, wenn diese Testorganismen im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa* sind bzw. kein qualitativer Suspensionsversuch durchgeführt worden ist.

² 4 lg bei *P. aeruginosa*, wenn die T₁-Kontrolle im Praxisversuch keine Darstellung einer lg 5-Reduktion erlaubt

³ 3 lg bei *C. albicans*, wenn die T₁-Kontrolle im Praxisversuch keine Darstellung einer lg 4-Reduktion erlaubt

Ergänzende Anforderungen im Praxisversuch mit Mechanik (14.2) für die Felder 2–4:

Auf den Feldern 2–4 dürfen beim Prüfprodukt im Mittel ≤ 50 KBE gezählt werden. Bei der Wasser-Kontrolle müssen hingegen auf den Testfeldern 2–4 im Mittel ≥ 10 KBE nachgewiesen werden.

Im Falle des optional zusätzlichen Nachweises einer tuberkuloziden Wirksamkeit ist im quantitativen Suspensionstest und im Versuch unter praxisnahen Bedingungen gegenüber *Mycobacterium terrae* zu prüfen. Soll ein mykobakterizider Effekt bestätigt werden, ist zusätzlich auch mit *Mycobacterium avium* zu untersuchen.

Die praxisnahen Prüfungen haben jeweils in 3 Durchgängen zu erfolgen:

1. *Durchgang:* Durchführung der Kontrollen (Ko2, Ko3)
2. *Durchgang:* 1 Testfläche pro Konzentration-Zeit-Relation und pro WSH-Kontrolle (Ko1)
3. *Durchgang:* je 2 Testflächen pro beantragter Konzentration-Zeit-Relation und 1 Testfläche pro WSH-Kontrolle (Ko1)

Im zweiten Durchgang ist für den Bereich Bakterizidie/Levurozidie nur die Prüfung der beiden resistantesten Testorganismen aus dem 1. Durchgang notwendig.

Literatur

1. EN 16615:2015-06. Chemische Desinfektion und Antiseptika – Quantitatives Prüfverfahren zur Bestimmung der bakteriziden und levuroziden Wirkung auf nicht-porösen Oberflächen mit mechanischer Einwirkung mit Hilfe von Tüchern oder Mops im humanmedizinischen Bereich (4-Felder-Test) – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).
2. DIN EN 13727:2014-01. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
3. DIN EN 13624:2013-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
4. DIN EN 14561:2006-08. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung für Instrumente im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).

Chlorbasierte Flächendesinfektionsmittel: Voraussetzungen zur VAH-Zertifizierung erweitert und präzisiert

Aktualisierung und Ergänzung zur VAH-Mitteilung aus Hyg Med 6/2020*

Stand: 26. Mai 2021

Derzeit werden beim VAH vermehrt Anträge zur Zertifizierung von Produkten gestellt, deren Hauptwirkstoffe chlorabspaltende Verbindungen sind. Der VAH weist ausdrücklich auf **Besonderheiten bei der Herstellung dieser Verbindungen über Elektrodiaphragmalyse** hin. So kann es z.B. in Abhängigkeit des Diaphragmalyseverfahrens zu deutlichen pH-Wert-Unterschieden der generierten Wirkstofflösungen kommen, die dann einen erheblichen Einfluss auf die Wirksamkeit, aber auch auf die Korrosivität haben. Außerdem sind die generierten Wirkstoffe unterschiedlichen Zerfallsprozessen unterworfen, die auch auf die Verwendbarkeit der Wirkstofflösungen Einfluss nehmen.

In Anlehnung an die Regularien der ECHA hat die Desinfektionsmittel-Kommission beschlossen, ausschließlich Verfahren zu zertifizieren, die Aktivchlor (ex situ) bereits enthalten [1, 2]. Verfahren, die Aktivchlor vor Ort erzeugen (in situ) werden zur Zeit nicht zertifiziert. In der VAH-Liste findet der Anwender daher nur ex-situ Aktivchlor-Lösungen. Hierbei wird in Abhängigkeit des pH-Wertes zwischen der Wirkstoffbezeichnung „Aktivchlor hergestellt aus Natriumhypochlorit“ für Lösungen $\text{pH} > 7,5$ und „Aktivchlor, freigesetzt aus hypochloriger Säure“ für Lösungen $\text{pH} < 7,5$ unterschieden. Im VAH-Zertifikat wird neben dieser Wirkstoffbezeichnung der Gehalt an Aktivchlor in mg/L und der pH-Wert des Produktes angegeben.

Die Desinfektionsmittel-Kommission im VAH hatte in ihrer Mitteilung

aus Hygiene & Medizin 06/2020 beschlossen [3], dass für Zertifizierungen von Produkten auf Basis chlorabspaltender Verbindungen, **zusätzlich** zu den bisher geltenden Anforderungen an Prüfbericht und Gutachten (gemäß Methodenbuch Kap. 3.2 [4]), mindestens am ersten und letzten Testtag der Verwendung des jeweiligen Prüfmusters der **Gehalt des gesamten und des freien Chlors** (Aktivchlor) sowie die **Redox-Spannung** des geprüften Produktes dokumentiert und im Prüfbericht angegeben werden müssen. Als Verfahren zur Bestimmung von freiem Chlor und Gesamtchlor kann z.B. das **kolorimetrische Verfahren mit N,N-Diethyl-1,4-Phenylendiamin nach DIN EN ISO 7393-2** eingesetzt werden (ggfs. nach Vorverdünnung mit A. dest). Als Verfahren für die Bestimmung der Redox-Spannung kann z.B. die **DIN 38404-C 6** eingesetzt werden.

Diese Daten sowie der pH-Wert des geprüften Produkts mit der oben beschriebenen Wirkstoffbezeichnung müssen auch für bereits zertifizierte Produkte **inklusive einer mikrobiologischen Eckwertprüfung bis zum 31.12.2021 nachgereicht** werden. In der Eckwertprüfung soll im praxisnahen Test die Listungskonzentration mit dem resistentesten Testorganismus entsprechend der VAH-Methode 14.1 („Flächendesinfektion ohne Mechanik“) bzw. 14.2 („4-Felder-Test“) überprüft werden (1. Durchgang: 1 Testfläche + WSH / 2. Durchgang: 2 Testflächen + WSH) [4].

Verband für Angewandte Hygiene e.V. Desinfektionsmittel-Kommission

Verantwortlich:
Prof. Dr. med. Martin Exner
(Vorsitzender)
Dr. rer. nat. Jürgen Gebel
(Schriftführer)

c/o Institut für Hygiene und
Öffentliche Gesundheit der
Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
53127 Bonn
Tel: 0228 287-14022
Fax: 0228 287-19522
E-Mail: info@vah-online.de
Internet: www.vah-online.de

*Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Chlorbasierte Desinfektionsmittel: Anforderungen an die Zertifizierung durch den VAH. HygMed 2020;45(6):107-108. Verfügbar online unter https://vah-online.de/files/download/vah-mitteilungen/Chlorbasierte_Desinfektionsmittel_107_108_VAH_HM_6_20.pdf

Weiterhin muss der Hersteller mit Daten belegen, über welchen Zeitraum das Konzentrat bei täglicher Entnahme den zertifizierten Gehalt an freiem Chlor (Aktivchlor) behält.

Der **Mindestwirkstoffgehalt an freiem Chlor (Aktivchlor, Angabe in Cl mg/L)** im Produkt sowie der Verwendungszeitraum, über den dieser Mindestwirkstoffgehalt garantiert ist, werden **im Zertifikat des VAH** aufgeführt.

Hinweis:

Chlorbasierte Händedesinfektionsmittel werden derzeit vom VAH nur dann zertifiziert, wenn eine Biozid- oder eine Arzneimittelzulassung für das Produkt vorliegt [5, 6].

■ **Literatur**

1. Hölzl-Armstrong L. Genehmigung von Aktivchlorwirkstoffen. Veröffentlicht am 23. März 2021 über <https://www.umco.de/de/blog/artikel/Genehmigung-aktivchlorwirkstoffe.html>
2. Helpdesk, reach-clp-biozid. Welche Wirkstoffbezeichnung für „Aktivchlor“ ist die Richtige für mein Biozidprodukt? Helpdesk-Nummer: 0598. Online verfügbar unter https://www.reach-clp-biozid-helpdesk.de/DE/Biozide/FAQ/Wirkstoffe/Wirkstoffe_node.html
3. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Chlorbasierte Desinfektionsmittel: Anforderungen an die Zertifizierung durch den VAH. HygMed 2020;45(6):107–108. Online verfügbar unter https://vah-online.de/files/download/vah-mitteilungen/Chlorbasier-te_Desinfektionsmittel_107_108_VAH_HM_6_20.pdf
4. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.). Anforderungen und Methoden zur VAH-Zertifizierung chemischer Desinfektionsverfahren. Wiesbaden: mhp Verlag. Grundwerk mit Ergänzungen, Stand 15.06.2020.
5. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Voraussetzungen zur VAH-Zertifizierung chlorbasierter Händedesinfektionsmittel. HygMed 2020;45(10):170. Online verfügbar unter https://vah-online.de/files/download/vah-mitteilungen/VAH_Chlorbasierte%20HDM_HM_10_20.pdf
6. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Zur VAH-Zertifizierung von nicht-alkoholbasierten Händedesinfektionsmitteln. Stand 25. Mai 2021. im Druck. Online verfügbar auf www.vah-online.de

Diese Mitteilung wurde erarbeitet von der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

Die Mitglieder der Desinfektionsmittel-Kommission

Dr. B. Christiansen (stellvertretende Vorsitzende), Dr. M. Decius, Priv.-Doz. Dr. M. Eggers, Prof. Dr. M. Exner (Vorsitzender), Dr. J. Gebel (Schriftführer), Dr. S. Gemein, Priv.-Doz. Dr. S. Gleich, Dr. Britt Hornei, Dr. B. Hunsinger, Prof. Dr. A. Kramer, Prof. Dr. H. Martiny, Priv.-Doz. Dr. F. Pitten, Priv.-Doz. Dr. K. Schröppel, Dr. I. Schwebke, Dr. J. Steinmann, Assoc. Prof. Priv.-Doz. Dr. M. Suchomel, Dr. J. Tatzel, Prof. Dr. L. Vossebein, Prof. Dr. C. Wendt, Prof. Dr. M. H. Wolff

Unter fachlicher Beratung von:

P. Ahl, Fachapothekerin für Klinische Pharmazie (Gast für ABDA), Priv.-Doz. Dr. Ch. Brandt (Gast für DGHM), F. Helm (Gast für Bundeswehr), Dr. A. Jacobshagen (Gast für BfArM), I. Klöckner (Gast für VHD), M.Sc. K. Konrat (Gast für RKI), Prof. Dr. U. Rösler (Gast für DVG), Dr. U. Teichert (Gast für BVÖGD), Dr. V. Weinheimer (Gast für BAuA)

16. Suneja T, Belsito DV. Occupational dermatoses in health care workers evaluated for suspected allergic contact dermatitis. *Contact Dermatitis*, 2008; 58(5):285–290. Abrufbar unter [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0536.2007.01315.x?casa_token=2eMiVOk8QFwAAAAA%3Am6OS-](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0536.2007.01315.x?casa_token=2eMiVOk8QFwAAAAA%3Am6OS-mHRofArpB9uWDIPiVbjyvcA_3Je7vK_ljOhQ0Lh4mGFoqbq6FD3XzxxE_lqN1H-z8Dc15Y3JO8A)
17. Anderson SE, Shane H, Long C, Lukomska E, Meade BJ, Marshall NB. Evaluation of the irritancy and hypersensitivity potential following topical application of didecylidimethylammonium chloride. *J of Immunotoxicology* 2016; 13(4):557–566. DOI: 10.3109/1547691X.2016.1140854
18. Shane HL, Lukomska E, Stefaniak AB, Anderson SE. Divergent hypersensitivity responses following topical application of the quaternary ammonium compound, didecylidimethylammonium bromide. *J of Immunotoxicology* 2017;14(1):204–214. DOI: 10.1080/1547691X.2017.139726

Ergänzung der Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission aus *Hygiene & Medizin* 10/2020*

Fachinformationen für Antragsteller und Prüflaboratorien:

Ergänzende Informationen zur Testung des 1-min-Wertes bei gebrauchsfertigen Desinfektionsmittel-Tüchern

Stand: 6. Juli 2021

Die Desinfektionsmittel-Kommission zertifiziert seit Mitte 2020 auch Einwirkzeiten von 1 min für die Flächen-desinfektion mit und ohne Mechanik.

Für die VAH-Zertifizierung soll der Grenzbereich der Wirksamkeit durch Prüfung unterschiedlicher Konzentrationen und/oder Einwirkzeiten dargestellt werden [1]. Für den Bereich der Flächendesinfektion wird im praxisnahen Test bei einem Leistungswert von 5 min deshalb zusätzlich die Prüfung bei 1 min gefordert. Die Desinfektionsmittel-Kommission weist darauf hin, dass **Einwirkzeiten < 1 min bei der Testung mit Mechanik nicht akzeptiert werden**, da diese versuchstechnisch nicht eingehalten werden können.

Zur Darstellung des Grenzbereichs werden für die Einwirkzeit von 1 min **Testungen unterschiedlicher Konzentrationen** gefordert. Für die Testung von ready-to-use Tuchsyste-men sind

dem Prüflabor zusätzlich zum Produkt **trockene Tücher und das Desinfektionsmittelkonzentrat** zur Herstellung der entsprechenden Konzentrationsabstufungen bereitzustellen.

Ist die Bereitstellung von Desinfektionsmitteltüchern und separatem spezi-fischen, trockenen Tuch für das zu prü-fende ready-to-use Tuchsyste-m nicht möglich, ist die Prüfung im 1. Durchgang mit zwei Einwirkzeiten durchzu-führen. Für die Einwirkzeit von 1 min muss in diesem Fall die 5-min-Einwirkzeit im 1. Durchgang mitgeprüft werden, da sich in einigen Prüfberichten die Wirksamkeit bei 5 min (Wirkstoff ggf. evaporiert) ungünstiger dargestellt hat als bei 1 min.

Im 2. Durchgang muss die Wirk-samkeit des 1-min-Wertes mit jeweils 2 Testflächen für die beiden resistentesten Testorganismen (Bakterizidie/Le-vurozidie) aus dem ersten Durchgang

bestätigt werden. Bei Auslobung ande-rer Wirksamkeitsspektren muss dies für die jeweiligen Testorganismen zusätz-lich beigebracht werden.

■ Literatur

1. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.). Methoden und Anforderungen zur VAH-Zertifizierung von chemischen Desinfektionsverfahren. mhp Verlag: Wiesbaden, 2015. Mit Ergänzungslieferungen (Stand: Juni 2019). [Hinweis: Download über die VAH-Webseite]

* Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Fachinformationen zur Flächendesinfektion für Antragsteller und Laboratorien. Anforderungen zur Zertifizierung einer Einwirkzeit von 1 min für die Flächendesinfektion. *HygMed* 2020;45(10):171. Download über: https://vah-online.de/files/download/vah-mitteilungen/VAH_Sch%C3%A4ume%20Fl%C3%A4che%20EWZ_HM_10_20.pdf

Die Mitteilungen dieser Ausgabe wurden erarbeitet von der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

Die Mitglieder der Desinfektionsmittel-Kommission:

Dr. B. Christiansen (stellvertretende Vorsitzende), Dr. M. Decius, Priv.-Doz. Dr. M. Eggers, Prof. em. Dr. M. Exner (Vorsitzender), Dr. J. Gebel (Schriftführer), Dr. S. Gemein, Priv.-Doz. Dr. S. Gleich, Dr. Britt Hornei, Dr. B. Hunsinger, Prof. Dr. A. Kramer, Prof. Dr. H. Martiny, Priv.-Doz. Dr. F. Pitten, Priv.-Doz. Dr. K. Schröppel, Dr. I. Schwabke, Dr. J. Steinmann, Assoc. Prof. Priv.-Doz. Dr. M. Suchomel, Dr. J. Tatzel, Prof. Dr. L. Vossebein, Prof. Dr. C. Wendt, Prof. Dr. M. H. Wolff

Unter fachlicher Beratung von:

P. Ahl, Fachapothekerin für Klinische Pharmazie (Gast für ABDA), Priv.-Doz. Dr. Ch. Brandt (Gast für DGHM), F. Helm (Gast für Bundeswehr), Dr. A. Jacobshagen (Gast für BfArM), I. Klöckner (Gast für VHD), M.Sc. K. Konrat (Gast für RKI), Prof. Dr. U. Rösler (Gast für DVG), Dr. U. Teichert (Gast für BVÖGD), Dr. V. Weinheimer (Gast für BAuA)

Ergänzende Informationen zur VAH-Listung von Schäumen/Sprays zur Desinfektion von Flächen und Medizinprodukten

Aktualisierung und Ergänzung der Mitteilung der Desinfektionsmittel-Kommission aus Hyg Med 10/2020*

Stand: 23. August 2021

■ Grundsätzliches zur Wirksamkeitsprüfung von Flächendesinfektionsmitteln

Die Formulierungen und Anwendungsarten von Flächendesinfektionsmitteln verändern sich kontinuierlich. Zu den Tuchsystemen kamen in den letzten Jahren die Schäume hinzu. In der Folge müssen auch standardisierte Testmethoden für diese Desinfektionsverfahren angepasst bzw. neu entwickelt werden, um die Anwendungsbedingungen der Praxis abzubilden und die Wirksamkeit zu bestätigen.

Prinzipiell wird bei chemischen Verfahren zur Flächendesinfektion zwischen den **Anwendungsarten „mit Mechanik“ (Wischen) und „ohne Mechanik“ (Sprühen ohne nachfolgendes Wischen)** unterschieden (Abbildung 1). **Für die VAH-Zertifizierung und -Listung leitet sich aus der Anwendungsart ab, welche praxisnahen Prüfungen erforderlich sind.**

■ Flächendesinfektion „mit Mechanik“

In der Regel werden Flächendesinfektionsmittel im Wischverfahren eingesetzt (Synonyme: Scheuer-Wisch-Desinfektion, mit Mechanik, mit Wischen) [1, 2]. Bei diesem Verfahren wird das Desinfektionsmittel mit einem Tuch unter leichtem Druck verteilt, die Komponente der Mechanik ist hier also Teil des Desinfektionsprozesses. Die benö-

tigte Desinfektionsmittel-Menge ist bei der Wischdesinfektion geringer als bei der Sprühdessinfektion. Dies wird in der Prüfmethodik mit abgebildet [3]. **Es ist immer auf eine ausreichende Benetzung der Fläche zu achten.**

Anwendungsart

- Alle (752 Produkte)
- **Mit mechanischer Einwirkung (wischen)**
 - Ohne spezifizierte Tücher (432 Produkte)
 - Tuchtränkesystem mit spezifiziertem Tuch (2 Produkte)
 - ready-to-use Tuchsystem (218 Produkte)
- **Ohne mechanische Einwirkung**
 - Ohne Wischen (z. B. Sprühen) (125 Produkte)

Abbildung 1: Anwendungsarten von Flächendesinfektionsmitteln: Abbildung aus der VAH-Liste online, Detailsuche Flächendesinfektion, Stand 09.08.2021.

Verband für Angewandte Hygiene e.V. Desinfektionsmittel-Kommission

Verantwortlich:
Prof. Dr. med. Martin Exner
(Vorsitzender)
Dr. rer. nat. Jürgen Gebel
(Schriftführer)

c/o Institut für Hygiene und
Öffentliche Gesundheit der
Universität Bonn
Sigmund-Freud-Str. 25
53127 Bonn
Tel: 0228 287-14022
Fax: 0228 287-19522
E-Mail: info@vah-online.de
Internet: www.vah-online.de

* Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Wirksamkeitsprüfung von Schäumen zur Desinfektion von Flächen und Medizinprodukten. Fachinformationen für Antragsteller und Laboratorien. HygMed 2020;45(10):171. https://vah-online.de/files/download/vah-mitteilungen/VAH_Sch%C3%A4ume%20F%C3%A4che%20_EWZ_HM_10_20.pdf

Tabelle 1: Anwendungsarten der Flächendesinfektion - tabellarische Übersicht einschließlich Prüfmethode.

Flächendesinfektion mit mechanischer Einwirkung (wischen) (https://vah-liste.mhp-verlag.de/)	Flächeneinsatztyp	Anwendungsart	Prüfmethode für die VAH-Listung
Ohne spezifizierte Tücher	Das Desinfektionsmittel wird als gebrauchsfertiges Konzentrat verwendet oder vor Ort verdünnt (gemäß Dosierangabe in Prozent) und dann mit einem vom Anwender ausgewählten, beliebigen Wischtuch oder Wischmopp aufgetragen, das/der mit dem Desinfektionsmittel getränkt ist.		VAH-Methode 14.2 oder EN 16615 plus Anforderungen wie beschrieben in [2]
Tuchtränkesystem mit spezifiziertem Tuch	Die spezifizierten Tücher werden mit dem Desinfektionsmittel vorgetränkt, entweder mit dem gebrauchsfertigen Konzentrat oder in der angegebenen Verdünnung gemäß Dosierangabe.		VAH-Methode 14.2 oder EN 16615 plus Anforderungen wie beschrieben in [2] Hinweis: Es werden Tuchgröße, Tuchmaterial, Tuchgewicht in g pro cm ² sowie das Tuchtränkevolumen in der VAH-Liste angegeben
Ready-to-use Tuchsystem (gebrauchsfertige Tücher)	Die vorgetränkten Desinfektionsmittel-Tücher werden vom Hersteller gebrauchsfertig zur Verfügung gestellt.		VAH-Methode 14.2 oder EN 16615 plus Anforderungen wie beschrieben in [3]

Tabelle 1 erläutert die Anwendungsarten der Wischdesinfektion und welche Prüfmethode für die VAH-Zertifizierung und -Listung entsprechend der Anwendungsart erforderlich sind.

■ Sonderfall: Schäume bzw. Sprays für die Wischdesinfektion

Anwendungsart

Seit einiger Zeit werden **Schäume/Sprays für die Wischdesinfektion** von Flächen, einschließlich der manuellen Wischdesinfektion von Medizinprodukteflächen, angeboten. Die Anwendungsempfehlungen und die Appli-

kation der Schäume/Sprays erfolgen dabei **in unterschiedlicher Weise, je nach Herstellerangabe**. Auch die **Sprühköpfe** und die **Menge** an Desinfektionsmittel, die mit einem Hub aufgebracht werden, unterscheiden sich. Überwiegend werden Schäume/Sprays in den beiden folgenden Anwendungsarten eingesetzt:

1. Der Schaum/das Spray wird direkt auf die Fläche aufgebracht und unmittelbar anschließend mit einem trockenen Tuch verteilt.
2. Der Schaum/das Spray wird zuerst auf ein trockenes Tuch aufgebracht

und mit diesem unmittelbar anschließend auf der Fläche verteilt.

Dies bedeutet, dass die Anwendung der Schäume/Sprays in diesen beiden Fällen immer **mit einer mechanischen Einwirkung** verbunden ist. Es ist für den Erfolg des Desinfektionsprozesses unbedingt erforderlich, dass das Tuch ausreichend Desinfektionsmittel abgibt und die **Flächen satt benetzt** sind. Bei der Anwendung ist darauf ganz besonders zu achten, auch da i.d.R. der Schaum/das Spray auf trockene Tücher aufgebracht wird.

Prüfmethodik: Informationen für Hersteller und Laboratorien

Die derzeitigen Prüfmethoden für chemische Flächendesinfektionsverfahren mit mechanischer Einwirkung, die VAH-Methode 14.2 oder die europäische Norm EN 16615 (4-Felder-Test für die Wischdesinfektion), sind auf die Prüfung von Flüssigkeiten mit spezifischen Tüchern (in der Regel mit einem Volumen von < 5 ml/m²) oder mit unspezifischen Tüchern (in der Regel mit einem Volumen von ca. 10 ml/m²) abgestimmt ([4], siehe auch Tabelle 1). Die Desinfektion mit Schäumen oder Sprays in der Anwendungsform „sprühen und wischen“ wird dabei nicht abgebildet. Bei der Testung dieser Schäume oder Sprays wird zwar entsprechend VAH-Methode 14.2 oder EN 16615 immer ein mit der Desinfektionsmittel-Flüssigkeit getränktes (unspezifisches) Tuch verwendet, jedoch nicht in Kombination mit dem Spray bzw. Schaum, der aus der Flüssigkeit generiert wird, und dem Tuch.

Der VAH hat daher bereits 2020 eine Mitteilung veröffentlicht, in der die Anforderungen für die Zertifizierung der beiden oben genannten Anwendungsarten von Schäumen erläutert werden [5]: Da es für Schäume noch keine etablierten spezifischen Testverfahren gibt, fordert die DMK für die Zertifizierung von Schäumen und Sprays mit mechanischer Einwirkung grundsätzlich die Testung nach VAH-Methode 14.2 oder EN 16615 als Flüssigkeit in Kombination mit Tüchern.

Zusätzlich zu dieser Prüfung ist für den Schaum/das Spray eine **Eckwertprüfung** mit *S. aureus* durchzuführen (siehe Tabelle 2), bei der das Produkt entsprechend der vorgesehenen Anwendungsart bzw. Applikationsform geprüft wird.

Tabelle 2: VAH-Anforderungen an die Prüfung und Zertifizierung von Schäumen oder Sprays mit mechanischer Einwirkung.

Flächendesinfektion mit mechanischer Einwirkung (wischen) (https://vah-liste.mhp-verlag.de/)	Flächeneinsatztyp	Anwendungsart	Prüfmethodik für die VAH-Listung
Sonderfall Schäume/ Sprays Sprühen/schäumen und wischen	Das Desinfektionsmittel wird entweder 1) unmittelbar auf die Fläche aufgesprüht und anschließend mit einem trockenen Tuch auf der Fläche verteilt. oder 2) erst auf ein trockenes Tuch aufgesprüht und anschließend auf der Fläche verteilt.	  	VAH-Methode 14.2 oder EN 16615 plus Eckwertprüfung mit <i>S. aureus</i> gemäß VAH-Methode 14.2 bzw. EN 16615

Eine allgemeingültige, **standardisierte Prüfung von Schäumen und Sprays** ist aufgrund unterschiedlicher Sprühköpfe und dem damit verbundenen unterschiedlich abgegebenen Volumen und Verschäumungszahlen (d.h. Volumen Schaum pro ml Flüssigkeit) der auf dem Markt verfügbaren Produkte **nicht möglich**. Daher müssen die Hersteller produktbezogen **zusätzlich Eckwertprüfungen** ein- bzw. nachreichen, wenn sie einen Schaum oder ein Spray zur Anwendung „sprühen und wischen“ zertifizieren lassen möchten. Mit dieser Eckwertprüfung werden die Anwendungsempfehlungen der Hersteller für Schäume/Sprays gestützt.

Bei der Eckwertprüfung sollen **2 Testflächen pro beantragter Konzentration-Zeit-Relation** und **1 Testfläche pro WSH-Kontrolle** in einem Durchgang mit dem Standard-Tuch zusätzlich überprüft werden.

Bei der **Anwendungsart 1** wird die vom Hersteller empfohlene Anzahl HÜBE auf die Testfläche aufgesprüht. Dabei wird die Hälfte der HÜBE unmittelbar vor das Testfeld 1 aufgesprüht, um das Einheitsgewicht (Granitblock gemäß VAH-Methodenbuch) für die Prüfung mit dem Tuch dort aufzusetzen. Die anderen HÜBE werden direkt auf das Testfeld 1 aufgesprüht und unmittelbar danach gewischt. Der Wischvorgang und die Rückgewinnung des Testorganismus erfolgt entsprechend VAH-Methode 14.2 bzw. EN 16615. Die Einwirkzeit beginnt mit Vollendung des Wischvorgangs. Im Prüfbericht ist die Anzahl der HÜBE (inkl. Volumen in ml bzw. g) pro Testfläche anzugeben.

Bei der **Anwendungsart 2** wird die vom Hersteller empfohlene Anzahl HÜBE pro Tuch auf das auf den Granitblock aufgespannte Tuch aufgesprüht und unmittelbar danach entsprechend VAH-Methode 14.2 bzw. EN 16615 gewischt. Die Einwirkzeit beginnt mit Vollendung des Wischvorgangs. Im Prüfbericht ist die Anzahl der HÜBE (inkl. Volumen in ml bzw. g) pro Tuch und Testfläche anzugeben. Hierfür ist die Differenz des Gewichts des feuchten Tuchs vor dem Wischen (trockenes Tuch plus Hubvolumen) und des Tuchgewichts nach dem Wischprozess zu ermitteln.

In den **Anwendungsempfehlungen des Gutachters** muss die **Anzahl der HÜBE** für eine ausreichende Benetzung der Testfläche bzw. des Tuchs angegeben sein.

Diese Anforderungen **gelten ab dem 2.9.2021**. Für bereits vor diesem Stichtag zertifizierte Schäume bzw. Sprays zur Anwendung mit Mechanik, für die die entsprechenden Eckwertprüfungen noch nicht vorliegen, müssen diese **bis zum 30.06.2022 nachgereicht** werden.

Kennzeichnung der Zusatzprüfungen für Schäume und Sprays zur Anwendung mit Mechanik in der Desinfektionsmittel-Liste des VAH für Anwender

Schäume oder Sprays mit den oben genannten Anwendungsempfehlungen finden Anwender in der VAH-Liste online in der Detailsuche unter „**Flächendesinfektion mit mechanischer Einwirkung**“, „ohne spezifizierte Tücher“. Zukünftig werden im Feld „Zusätzliche Bemerkungen“ die Informationen eingetragen, welche Anwendungsart gemäß der Eckwertprüfung geprüft wurde: Schaum/Spray im Tuch oder/und Schaum/Spray auf Fläche. In der Print-Ausgabe der VAH-Liste sind diese Produkte im Kapitel 3.1 aufgeführt.

Hinweis:

Zur Wirksamkeitsprüfung von Schäumen zur hygienische Händedesinfek-

tion, siehe VAH-Mitteilung vom Mai 2020 [6].

■ **Flächendesinfektion „ohne Mechanik“**

Flächendesinfektionsmittel „ohne Mechanik“ werden **ohne Wischen** mittels **Sprühen oder Schäumen** auf trockene Flächen aufgetragen. Dieses Sprüh- oder Schaumverfahren kommt zum Einsatz, wenn keine Wischdesinfektion möglich ist, beispielsweise für schwer zugängliche Nischenflächen oder offene porige Oberflächen. Produkte, die „ohne Mechanik“ gelistet sind, **dürfen während der Einwirkzeit nicht mit Tüchern verteilt** werden, es sei denn, sie sind **zusätzlich** auch als Verfahren für die Wischdesinfektion getestet worden und für diese Anwendungsart VAH-zertifiziert und -gelistet.

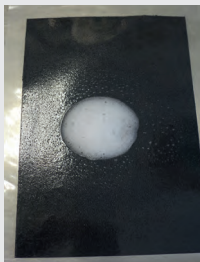
Auch bei Sprays und Schäumen ist darauf zu achten, dass **die zu desinfi-**

zierende Fläche komplett und satt benetzt ist (Tabelle 3). Erst nach der Einwirkzeit darf überflüssiges Desinfektionsmittel verteilt oder abgenommen werden.

Desinfektionsmittel, die ohne Wischen verwendet werden, müssen in der Print-Ausgabe der Desinfektionsmittel-Liste des VAH aus der Rubrik 3.1 in der Spalte „ohne Mechanik“ bzw. durch Anklicken der Option „ohne mechanische Einwirkung“/„ohne Wischen“ in der Detailsuche der Online-Ausgabe der VAH-Liste ausgewählt werden (vgl. Abbildung 1).

Aus **Arbeitsschutzgründen** ist die **Sprühdesinfektion nur in Ausnahmefällen** zulässig [7, 8]. Inwieweit bei einer Schaumdesinfektion die Arbeitssicherheit weniger kritisch ist im Vergleich zu einer Sprühdesinfektion, ist noch nicht abschließend bewertet.

Tabelle 3: Anforderungen an die Prüfung von Schäumen oder Sprays ohne mechanische Einwirkung.

Flächendesinfektion ohne mechanische Einwirkung (sprühen) (https://vah-liste.mhp-verlag.de/)	Flächeneinsatztyp	Anwendungsart	Prüfmethodik für die VAH-Listung
Ohne Wischen (z.B. sprühen)	Das Desinfektionsmittel wird als gebrauchsfertiges Konzentrat (oder wie angegeben vorverdünnt) aufgesprüht und während der Einwirkzeit nicht mit einem Tuch verteilt .		VAH-Methode 14.1 oder EN 17387; (bzw. EN 13697; EN 14349; EN 16438 mit angepassten Bedingungen) [4]

Für die sachgerechte Durchführung der jeweiligen Desinfektionsverfahren unter Berücksichtigung der Anwendungsart und der Eigenschaften der Produktformulierung, d.h. Lösung, vorge-tränktes Tuch, gebrauchsfertiges Tuch, Schaum oder Spray, ist eine **gezielte Schulung** notwendig.

■ Literatur

1. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH unter Mitwirkung der 4+4 Arbeitsgruppe. Listung von Flächendesinfektionsmitteln. HygMed 2016;41(6):169–170.
2. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH unter Mitwirkung der 4+4 Arbeitsgruppe. Listung von Flächendesinfektionsmitteln – Spezifizierung der notwendigen Prüfungen. HygMed 2017; 42(10):199–200.
3. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Testverfahren zur Prüfung von Flächendesinfektionsmitteln für Verfahren ohne Mechanik. HygMed 2015; 40(11):467.
4. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.). Methoden und Anforderungen zur VAH-Zertifizierung von chemischen Desinfektionsverfahren. mhp Verlag: Wiesbaden, 2015. Mit Ergänzungslieferungen (Stand: Juni 2019).
5. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH. Wirksamkeitsprüfung von Schäumen zur Desinfektion von Flächen und Medizinprodukten. Fachinformationen für Antragsteller und Laboratorien. Hyg-Med 2020;45(10):171.
6. Desinfektionsmittel-Kommission im VAH (Hrsg.) Wirksamkeitsprüfung von alkoholischen Schäumen zur hygienischen Händedesinfektion. HygMed 2020;45(5):76–78.
7. Hengesbach B, Eikmann Th. Vor- und Nachteile der Sprühdesinfektion. Hyg-Med 2007;32(6):258–260.
8. DGUV Information 207-206. Prävention chemischer Risiken beim Umgang mit Desinfektionsmitteln im Gesundheitswesen. DGUV: Berlin, Dezember 2016.

Diese Mitteilung wurde erarbeitet von der Desinfektionsmittel-Kommission im VAH

Die Mitglieder der Desinfektionsmittel-Kommission

Dr. B. Christiansen (stellvertretende Vorsitzende), Dr. M. Decius, Priv.-Doz. Dr. M. Eggers, Prof. Dr. M. Exner (Vorsitzender), Dr. J. Gebel (Schriftführer), Dr. S. Gemein, Priv.-Doz. Dr. S. Gleich, Dr. Britt Hornei, Dr. B. Hunsinger, Prof. Dr. A. Kramer, Prof. Dr. H. Martiny, Priv.-Doz. Dr. F. Pitten, Priv.-Doz. Dr. K. Schröppel, Dr. I. Schwebke, Dr. J. Steinmann, Assoc. Prof. Priv.-Doz. Dr. M. Suhomel, Dr. J. Tatzel, Prof. Dr. L. Vossebein, Prof. Dr. C. Wendt, Prof. Dr. M. H. Wolff

Unter fachlicher Beratung von:

P. Ahl, Fachapothekerin für Klinische Pharmazie (Gast für ABDA), Priv.-Doz. Dr. Ch. Brandt (Gast für DGHM), F. Helm (Gast für Bundeswehr), Dr. A. Jacobshagen (Gast für BfArM), I. Klöckner (Gast für VHD), M.Sc. K. Konrat (Gast für RKI), Prof. Dr. U. Rösler (Gast für DVG), Dr. U. Teichert (Gast für BVÖGD), Dr. V. Weinheimer (Gast für BAuA)

Chemische/Chemothermische Instrumentendesinfektion – praxisnaher quantitativer Keimträger*test*

(Methode 15)

15

Unter diesem Verfahren ist die Desinfektion von Instrumenten durch Einlegen in eine Desinfektionsmittel-Lösung zu verstehen. Voraussetzung für den Desinfektionserfolg ist die vollständige Benetzung aller Flächen des Desinfektionsgutes während der gesamten Einwirkzeit.

15.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 (DSM 799)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541 (DSM 3320)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 6057 (DSM 2146)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442 (DSM 939)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Mycobacterium terrae</i>	ATCC 15755 (DSM 43227)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 15769 (DSM 44157)	1,5–5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 (DSM 1386)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (früher <i>A. niger</i>)	ATCC 16404 (DSM 1988)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sowie der Prüfsuspensionen sind in ➔ Kapitel 6 beschrieben.

Zur Simulation praxisnaher Bedingungen wird den Prüfsuspensionen maximal 2 h vor der Prüfung 0,03 % Albumin (➔ *Anhang A1.8a* – geringe organische Belastung) bzw. 0,3 % Albumin und 0,3 % Schaferthrombozyten (➔ *Anhang A1.8b* – hohe organische Belastung) zugesetzt.

15.2 Produktprüflösung

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in ➔ Kapitel 5 beschrieben.

15.3 Testzeiten

Als Testzeiten sind 1, 5, 15, 30 und/oder 60 min auszuwählen.

*Entsprechend kann auch der Phase-2-Stufe-2-Test nach EN 14561 (Bakterizidie), 14562 (Levurozidie, Fungizidie) und 14563 (Tuberkulozidie, Mykobakterizidie) unter Berücksichtigung der Tabelle 15.4 durchgeführt werden [1–3].

15.4 Keimträger

Als Keimträger werden Mattglasstreifen (→ *Anhang A2*) verwendet. Zur Vorbereitung werden die Glasstreifen 10 min in Seifenlösung (→ *Anhang A1.6.2*) gekocht, dreimal mit Wasser (→ *Anhang A1.1*) gewaschen und anschließend mit Isopropanol (70 Vol.-%) oder Ethanol (70 Vol.-%) gespült. Auf den getrockneten Mattglasstreifen werden die Testfelder (1 cm²) im unteren Drittel mit einem Bleistift markiert. Abschließend werden die Keimträger mit Heißluft (→ *Anhang 3*) sterilisiert.

15.5 Kontamination der Keimträger

Je 0,05 ml der Prüfsuspension werden auf die Testfelder mittels Einwegpipettenspitzen pipettiert und mithilfe der Pipettenspitze verteilt. Die kontaminierten Keimträger werden unter bis zur optischen Trockenheit bzw. längstens 60 min unter Laminar Air Flow aufbewahrt.

15.6 Methodik

Die kontaminierten Keimträger werden aufrecht in ein 10 ml Produktprüflösung enthaltendes Schraubdeckelröhrchen gestellt. Nach der Einwirkzeit wird der Keimträger mit einer Pinzette in ein weiteres Schraubdeckelröhrchen überführt, welches 10 ml Neutralisationsmittel (→ *Anhang A1.7*) sowie Glasperlen (Ø 0,25–0,5 mm; ca. 1 ml) enthält. Dieses Röhrchen wird mit zugeschraubtem Deckel 2 min auf einem Vortex geschüttelt. Unmittelbar danach werden 10⁻¹- und 10⁻²-Verdünnungen in Neutralisationsmittel (→ *Anhang A1.7*) hergestellt. Nach 5 min ± 10 s Neutralisationszeit werden je 1 ml und 0,1 ml aus dem Schraubdeckelröhrchen sowie je 0,1 ml aus den Verdünnungen auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA, *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

→ zur Inkubation siehe 15.7
 → zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 15.8

15.7 Inkubation

Die Nährböden werden 48 h bei 36 °C ± 1 °C (*C. albicans*: 72 h bei 30 °C ± 1 °C und *A. brasiliensis*: 7 bis 9 Tage (es empfiehlt sich eine erste Zählung nach 72 h) bei 30 °C ± 1 °C; *M. terrae* und *M. avium* 21 Tage bei 36 °C ± 1 °C) inkubiert.

15.8 Auswertung

Es werden vorrangig Nährböden ausgezählt, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 14 und 330 liegt. Die Reduktionswirkung (R) wird nach folgender Formel berechnet:

$$\lg R = \lg (\text{KBE Ko1}) - \lg (\text{KBE D})$$

KBE Ko1: Anzahl der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes (WSH-Kontrolle)

KBE D: Anzahl der KBE pro ml nach Einwirkung des Produktes

Im Prüfbericht sind die KBE-Werte pro Verdünnungsstufe, die lg-(KBE D) sowie die R-Werte tabellarisch aufzulisten.

15.9 Validierung

15.9.1 WSH-Kontrolle (Ko1)

Zur Bestimmung der Anzahl der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes (Ko1) werden die Keimträger zu jeder Einwirkzeit in WSH statt Produktprüflösung getaucht. Aus dem Schraubdeckelröhrchen werden Verdünnungen 10^{-3} und 10^{-4} (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: 10^{-2} und 10^{-3}) in Neutralisationsmittel (⇒ Anhang A1.7) hergestellt und hieraus je 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA, *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

➔ zur Inkubation siehe 15.7
➔ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 15.8

15.9.1 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)

Zur Kontrolle der Neutralisation wird 1 ml der höchsten im Test eingesetzten Konzentration des Prüfproduktes mit 9 ml Neutralisationsmittel (⇒ Anhang A1.7) vermischt und nach $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit mit 0,1 ml einer 10^{-3} -Verdünnung (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: 10^{-2} -Verdünnung) der Prüfsuspension versetzt. Nach der längsten Einwirkzeit werden hiervon als auch aus einer 10^{-1} -Verdünnung in Neutralisationsmittel (⇒ Anhang A1.7) je 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA, *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

Anmerkung: Zeigt sich im Test eine unzureichende Neutralisation ($< 10^3$ KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel oder Verfahren (Reduzierung des Prüfproduktvolumens ⇒ 14.1.9.2b) verwendet werden. Gegebenenfalls muss die Neutralisationszeit verlängert werden, die dann der Einwirkzeit hinzugerechnet werden muss und damit Auswirkungen auf die Auslobung hat.

15.9.2 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3)

Die Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels wird parallel zur Ko2 durchgeführt und enthält anstelle der Produktprüflösung WSH.

Anmerkung: Zeigt sich im Test ein toxischer Effekt (weniger als 10^3 KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel oder Verfahren verwendet werden.

15A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Die Prüfbedingungen richten sich nach der gewünschten Anwendungsempfehlung des Instrumentendesinfektionsverfahrens. Es können Verfahren mit geringer und hoher Belastung festgelegt werden.

Für die Beurteilung eines Instrumentendesinfektionsmittels werden orientierende, obligate und optionale Prüfungen zugrunde gelegt.

Orientierend:

– *Bestimmung der bakteriostatischen und levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel (Methode 7)*

Der Vergleich der Hemmtiter in den Prüfreihe ohne und mit Zusatz von Neutralisationsmittel gibt Auskunft über dessen Wirksamkeit.

Als Maß der vermehrungshemmenden Wirksamkeit (Hemmkonzentration) gilt die höchste Verdünnung des Produktes in CSB bzw. MEB (jeweils ggf. + Neutralisationsmittel), die das Wachstum der Testorganismen nach 48 h Inkubation so unterdrückt, dass es nicht zur Trübung der Suspension führt (+ = Wachstum der Mikroorganismen; – = kein Wachstum der Mikroorganismen).

Sofern Resultate der Bestimmung der bakterio- bzw. levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel vorhanden sind, sind diese im Prüfbericht vollständig tabellarisch inkl. des KBE-Gehaltes pro ml der Prüfsuspensionen anzugeben.

– *Bestimmung der bakteriziden Wirkung im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8)*
 – *orientierend –. Nicht notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) alle Gram-negativen Testorganismen (E. coli, P. aeruginosa und P. mirabilis) getestet werden (Prüfbedingungen siehe Tab. 15.1)*

Obligat:

– *Bestimmung der bakteriziden und levuroziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9.1 bzw. EN 13727 [4] und EN 13624 [5]); (Prüfbedingungen s. Tab. 15.2 und 15.4)*

Das zu prüfende Produkt muss die Koloniezahl der in ► **Tabelle 15.4** genannten Testorganismen unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit bei 20 °C ± 1 °C mindestens um 5 lg-Stufen sowie von *Candida albicans* mindestens um 4 lg-Stufen vermindern.

– *Prüfung der bakteriziden und levuroziden Wirkung unter praxisnahen Bedingungen (Methode 15 bzw. EN 14561, EN 14562 [1, 2]); (Prüfbedingungen s. Tab. 15.2 bis 15.4)*

Optional:

Soll eine tuberkulozide oder mykobakterizide oder fungizide Wirksamkeit dargestellt werden, müssen neben den oben genannten obligaten Prüfungen folgende Prüfungen jeweils als Suspensionsversuch und praxisnaher Test durchgeführt werden.

– *Bestimmung der tuberkuloziden, mykobakteriziden bzw. fungiziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9.1 bzw. EN 14348, EN 13624 [5, 6]); (Prüfbedingungen s. Tab. 15.2 und 15.4)*

- Prüfung der fungiziden Wirkung unter praxisnahen Bedingungen (Methode 15 bzw. EN 14561 [1], EN 14562 [2])
- Prüfung der tuberkuloziden, mykobakteriziden Wirkung unter praxisnahen Bedingungen (Methode 15 bzw. EN 14563 [3]); (Prüfbedingungen s. Tab. 15.2 bis 15.4)

Prüfbedingungen und Anforderungen

Die Anforderungen für die Prüfung von chemischen Instrumentendesinfektionsmitteln sind in den **Tabellen 15.1 bis 15.4** angegeben.

Tabelle 15.1: Prüfbedingungen im qualitativen Suspensionsversuch
Erforderliche Reduktion: kein Wachstum in den Kulturröhrchen nach 48 h.

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (min) ²
Chemische Instrumentendesinfektion	<i>E. coli</i> K12 <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabilis</i>	ohne	Anwendungskonzentration	20 ± 1	1, 5, 15, 30, 60

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (→ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen.

Tabelle 15.2: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch und unter praxisnahen Bedingungen.

Anwendungsverfahren	Testorganismen ⁵	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (min) ²
Chemische Instrumentendesinfektion	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³ <i>C. albicans</i> <i>M. terrae</i> ⁵ <i>M. avium</i> ⁵ <i>A. brasiliensis</i> ⁵	gering und/oder hoch	Anwendungskonzentration	20 ± 1	1, 5, 15, 30, 60
Maschinelle chemothermische Instrumentendesinfektion 20 bis < 60 ± 1	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³ <i>E. faecium</i> ⁴ <i>C. albicans</i> <i>M. terrae</i> ⁵ <i>M. avium</i> ⁵ <i>A. brasiliensis</i> ⁵	gering und/oder hoch	Anwendungskonzentration	20 bis < 60 ± 1	1, 5, 15, 30, 60

Tabelle 15.2 (Fortsetzung von S. 15.5): Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch und unter praxisnahen Bedingungen.

Anwendungsverfahren	Testorganismen ⁵	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (min) ²
Maschinelle chemo-thermische Instrumentendesinfektion ≥ 60 bis ≤ 70 ± 1	<i>E. faecium</i>	gering und/oder hoch	Anwendungskonzentration	≥ 60 bis ≤ 70 ± 1	1, 5, 15, 30, 60

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (→ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen im quantitativen Suspensionsversuch mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen. Bei dieser Prüfung ist auch die Einwirkzeit zu berücksichtigen, die direkt unter der kürzesten beantragten Einwirkzeit liegt. Das gilt auch, wenn methodisch nach EN geprüft wird.

³ Wenn im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa*.

⁴ Bei Verfahren ≥ 40 °C zusätzlich *E. faecium*.

⁵ Optional, wenn eine tuberkulozide, mykobakterizide oder fungizide Wirksamkeit beantragt wird.

Tabelle 15.3: In den einzelnen Durchgängen zu wählende Einwirkzeiten für die praxisnahen Prüfungen von Instrumentendesinfektionsmitteln.

Beantragte Einwirkzeit	1. Durchgang	2. Durchgang
5 min	1 min, 5 min	5 min
15 min	5 min, 15 min	15 min
30 min	15 min, 30 min	30 min
60 min	30 min, 60 min	60 min

Tabelle 15.4: Anforderungen im quantitativen Suspensionsversuch (9) und unter praxisnahen Bedingungen (15) – Instrumentendesinfektion.

Wirkungsbereich	Bakterizide Wirkung	Levurozide Wirkung	Fungizide Wirkung	Tuberkulozide Wirkung	Mykobakterizide Wirkung
Reduktion	5 lg-Stufen	4 lg-Stufen	4 lg-Stufen	4 lg-Stufen	4 lg-Stufen
Belastung	gering und/oder hoch	gering und/oder hoch	gering und/oder hoch	gering und/oder hoch	gering und/oder hoch
Testorganismen	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ¹ <i>P. mirabilis</i> ¹ <i>E. faecium</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> <i>A. brasiliensis</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. terrae</i> <i>M. avium</i>

¹ Prüfung ist im quantitativen Test erforderlich, wenn diese Testorganismen im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa* sind bzw. kein qualitativer Suspensionsversuch durchgeführt worden ist.

Die Prüfung zur Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch sowie unter praxisnahen Bedingungen gegenüber den obligaten Bakterien und *Candida albicans* ist bei allen Instrumentendesinfektionsverfahren erforderlich. Die Testung gegenüber *Aspergillus brasiliensis* ist nur im Falle der zusätzlichen Aussage über die fungizide Wirksamkeit erforderlich.

Im Falle des optional zusätzlichen Nachweises einer tuberkuloziden Wirksamkeit ist im quantitativen Suspensionstest und im Versuch unter praxisnahen Bedingungen gegenüber *Mycobacterium terrae* zu prüfen. Soll ein mykobakterizider Effekt bestätigt werden, ist zusätzlich auch mit *Mycobacterium avium* zu untersuchen.

Die praxisnahen Prüfungen haben jeweils in zwei Durchgängen zu erfolgen:

1. *Durchgang*: 1 Testfläche pro Konzentration-Zeit-Relation und pro WSH-Kontrolle (Ko1) + Durchführung der Kontrollen (Ko2, Ko3)
2. *Durchgang*: je 2 Testflächen pro beantragter Konzentration-Zeit-Relation und 1 Testfläche pro WSH-Kontrolle (Ko1)

Im zweiten Durchgang ist für den Bereich Bakterizidie/Levurozidie nur die Prüfung der beiden resistentesten Testorganismen aus dem 1. Durchgang notwendig.

Literatur

1. DIN EN 14561:2006-08. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung für Instrumente im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).
2. DIN EN 14562:2006-08. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der fungiziden oder levuroziden Wirkung für Instrumente im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).
3. DIN EN 14563:2009-02. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der mykobakteriziden oder tuberkuloziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel für Instrumente im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).
4. DIN EN 13727:2014-03. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
5. DIN EN 13624:2013-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
6. DIN EN 14348:2005-04. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der mykobakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich einschließlich der Instrumentendesinfektion. Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).

Chemische Wäschedesinfektion – Einlegeverfahren (praxisnaher Versuch)

(Methode 16)

16

Vorbemerkungen

Diese Methode wurde mit dem Robert Koch-Institut (RKI) gemeinsam erarbeitet. Die Anforderungen an die Wirksamkeit des Einbadverfahrens entsprechen somit auch denen für die Aufnahme in die Desinfektionsmittel-Liste des RKI.

16.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 (DSM 799)	> 1,5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541 (DSM 3320)	> 1,5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Escherichia coli</i> K12	NCTC 10538 (DSM 11250)	> 1,5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442 (DSM 939)	> 1,5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Mycobacterium terrae</i>	ATCC 15755 (DSM 43227)	> 1,5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 15769 (DSM 44157)	> 1,5 x 10 ⁹ KBE/ml
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 (DSM 1386)	> 1,5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (früher <i>A. niger</i>)	ATCC 16404 (DSM 1988)	> 1,5 x 10 ⁸ KBE/ml

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sowie der Prüfsuspensionen sind in ➔ Kapitel 6 beschrieben.

Nach Abschwemmen der Gebrauchskulturen in Verdünnungsmittel (➔ *Anhang A1.3*), Zentrifugation und Entfernen des Überstandes werden die Testorganismen als Pellet in defibriniertem Schafblut (➔ *Anhang A1.8c*) aufgenommen und homogenisiert. Die dadurch entstehende Prüfsuspension soll eine Konzentration von den oben genannten KBE/ml aufweisen.

16.2 Produktprüflösung

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in ➔ Kapitel 5 beschrieben.

Die Produktprüflösung wird mit Albumin (0,3 % Endkonzentration) versetzt.

16.3 Prüfkörper

Zur Fertigung der Prüfkörper wird Standardbaumwollgewebe (➔ *Anhang A2*), welches in Wasser (➔ *Anhang A1.1*) gründlich gespült wurde, verwendet. Das Gewebe wird in

Prüfkörper von 1 cm² (1 cm x 1 cm) geschnitten, dreimal in jeweils frischem Wasser (⇒ *Anhang A1.1*) aufgekocht, gespült und getrocknet, anschließend dampfsterilisiert und rekontaminationssicher gelagert.

16.4 Kontamination der Prüfkörper

Die Prüfkörper werden in die Prüfsuspension eingetaucht und zur vollständigen Benetzung und Entfernung der Luftbläschen mittels Pinzette während 15 min mehrfach gewendet. Anschließend werden die Prüfkörper bei Raumtemperatur in offenen Petrischalen (z.B. 1–3 h unter der Laminar Air Flow bei eingeschaltetem Gebläse) getrocknet. Sie können am gleichen Tag verwendet werden. Bei längerer Verwendungszeit der Prüfkörper ist deren Eignung am Anfang und Ende der Verwendungszeit in Bezug auf die Koloniezahl zu bestätigen (⇒ 16.6).

Hinweis: Prüfkörper mit M. terrae können, wenn die folgenden Bedingungen der Herstellung eingehalten werden, für einen Zeitraum von 12 Wochen verwendet werden.

Die Prüfkörper werden nach dem Eintauchen und Wenden in der Prüfsuspension auf 3 Lagen Filterpapier (⇒ *Anhang A3*) in Petrischalen gelegt. Anschließend werden die Prüfkörper in Petrischalen ohne Filterpapier für 24 h offen in einer Klimakammer bei Raumtemperatur und einer rel. Feuchte von 20 % getrocknet. Danach erfolgt die Lagerung bei 45 % rel. Feuchte und Raumtemperatur (20 % rel. Feuchte kann durch CaCl₂-Kristalle in einem dicht verschlossenen Gefäß (z.B. Exsikkator) erreicht werden. 45 % rel. Feuchte kann unter gleichen Bedingungen mit einer gesättigten K₂CO₃-Lösung erzielt werden). Nach 48 h können die Prüfkörper verwendet werden.

16.5 Methodik

Für jede zu prüfende Konzentration des Prüfprodukts werden für 3 Einwirkzeiten 6 Prüfkörper in ein Gefäß gelegt, mit 15 ml der auf 12 bis 14 °C temperierten Produktprüflösung übergossen und zur Entfernung von Luftblasen mehrfach gewendet. Nach (ggf. 1), 4, 6 und 12 h Einwirkzeit bei 12 bis 14 °C werden je 2 Prüfkörper entnommen und die darauf verbliebene Kontamination festgestellt (⇒ 16.6).

16.6 Nachweis vermehrungsfähiger Testorganismen auf den Prüfkörpern

Pro Testdurchgang ist die KBE/ml der Testorganismen von 3 unbehandelten Prüfkörpern zu bestimmen. Die Koloniezahl pro Prüfkörper soll mindestens 7,5 x 10⁷ KBE, *P. aeruginosa*, *C. albicans* und *A. brasiliensis* 7,5 x 10⁶ betragen.

Nach den vorgesehenen Einwirkzeiten werden je 2 kontaminierte Prüfkörper entnommen und sofort einzeln in Röhrchen mit je 5 ml CSB (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEB; *M. terrae* und *M. avium*: 0,1M Phosphatpuffer) jeweils mit Neutralisationsmittel (⇒ *Anhang A1.7*) und Glasperlen (Ø 3–4 mm) eingebracht.

Nach Ausschütteln (10 min mit einer Schüttelmaschine bei 400 U/min) wird der Nachweis noch vorhandener Testorganismen mittels Oberflächenverfahren (gleichbedeutend mit Spatelverfahren) von 1 ml Neutralisationslösung und 1 ml je einer Verdünnung 10^{-1} bis 10^{-3} in Neutralisationsmittel auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) geführt.

16.7 Inkubation

Die Nährböden werden 48 h bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (*C. albicans*: 72 h bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, *A. brasiliensis*: 7 bis 9 Tage (es empfiehlt sich eine erste Zählung nach 72 h) bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$; *M. terrae* und *M. avium*: 21 Tage, bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) inkubiert.

16.8 Auswertung

Pro Prüfkörper ist die Reduktion der Testorganismen zu errechnen. Es werden vorrangig Nährböden ausgezählt, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 14 und 330 liegt. Die Reduktion (R) wird nach folgender Formel berechnet:

$$\lg R = \lg (\text{KBE Ko1}) - \lg (\text{KBE D})$$

KBE Ko1: Anzahl der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes (WSH-Kontrolle)

KBE D: Anzahl der KBE pro ml nach Einwirkung des Produktes

Im Prüfbericht sind die KBE-Werte pro Verdünnungsstufe, die $\lg (\text{KBE D})$ - sowie die R-Werte tabellarisch aufzulisten.

16.9 Kontrollen

16.9.1 WSH-Kontrolle (Ko1)

Zur Bestimmung der Anzahl der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes sind in gleicher Weise hergestellte Prüfkörper, die anstelle des Desinfektionsmittels mit WSH übergossen wurden, nach der längsten Einwirkungszeit entsprechend zu behandeln (➔ 16.6.–16.7).

16.9.2 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)

Diese Kontrolle kann entfallen, wenn aus den quantitativen Suspensionsversuchen (➔ Methode 9) hierzu schon aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. Sofern solche Resultate nicht vorliegen, sollte diese Kontrolle einmal vor den eigentlichen Versuchen durchgeführt werden. In den Tests sind CSB (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEB; *M. terrae* und *M. avium*: 0,1M Phosphatpuffer) jeweils mit Neutralisationsmitteln (➔ Anhang A1.7) einzusetzen, die sich im quantitativen Suspensionsversuch als geeignet erwiesen haben. Für die Ko2 ist die Produktprüflösung (➔ Kapitel 5) zu verwenden. Diese Kontrolle kann entfallen, wenn aus den quantitativen Suspensionsversuchen (➔ Methode 9) hierzu schon

aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. Sofern solche Resultate nicht vorliegen, sollte diese Kontrolle einmal vor den eigentlichen Versuchen durchgeführt werden. In den Tests sind CSB + Neutralisationsmittel einzusetzen.

Zur Herstellung der Prüforganismensuspension für die Neutralisationsprüfung wird je Testorganismus 1 kontaminierter Prüfkörper (➔ 16.4) in 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer mit Glasperlen in Röhrchen auf einer Schüttelmaschine (10 min bei 400 U/min) geschüttelt. Anschließend wird 30 s mit einem Wirbelmischer (z.B. Vortex) gemischt. Der Inhalt des Röhrchens wird in 10-er Schritten so verdünnt, dass eine Suspension von 10^3 KBE/ml erhalten wird. Diese Verdünnung wird als Neutralisation-Prüforganismensuspension eingesetzt.

Zur Kontrolle der Neutralisation (Ko2) wird 1 ml der höchsten im Test eingesetzten Konzentration des Prüfproduktes mit 8 ml Neutralisationsmittel vermischt und nach 5 min \pm 10 s Neutralisationszeit mit 1 ml der Neutralisation-Prüforganismensuspension versetzt. Nach der längsten Einwirkzeit wird hiervon sowohl aus dem Direktansatz 1 ml (z.B. 2x0,5 ml) als auch 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA, *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) ausgespatelt.

Anmerkung: Zeigt sich im Test eine unzureichende Neutralisation (weniger als 10^2 KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden.

16.9.3 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3)

Diese Kontrolle kann entfallen, wenn aus den quantitativen Suspensionsversuchen (➔ Methode 9) hierzu schon aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. Sofern solche Resultate nicht vorliegen, sollte diese Kontrolle einmal vor den eigentlichen Versuchen durchgeführt werden. In den Tests sind CSB (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEB; *M. terrae* und *M. avium*: 0,1 M Phosphatpuffer) mit Neutralisationsmittel (➔ Anhang A1.7) einzusetzen.

Zur Herstellung der Prüforganismensuspension für die Toxizitätsprüfung des Neutralisationsmittels wird je Testorganismus 1 kontaminierter Prüfkörper (➔ 16.4) in 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer mit Glasperlen in Röhrchen auf einer Schüttelmaschine (10 min bei 400 U/min) geschüttelt. Anschließend wird 30 sec mit einem Wirbelmischer (z.B. Vortex) gemischt. Der Inhalt des Röhrchens wird in 10-er Schritten so verdünnt, dass eine Suspension von 10^3 KBE/ml erhalten wird. Diese Verdünnung wird als Prüforganismensuspension eingesetzt.

Die Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3) wird parallel zur Kontrolle 2 durchgeführt, enthält jedoch anstelle der Produktprüflösung WSH bzw. bei Konzentraten Wasser und wird bei 20 °C durchgeführt. (➔ Anhang A1.1).

Anmerkung: Zeigt sich im Test ein toxischer Effekt (weniger als 10^2 KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden.

16A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Die Prüfbedingungen richten sich nach der gewünschten Anwendungsempfehlung des Wäschedesinfektionsverfahrens. Es können nur Verfahren mit hoher Belastung festgelegt werden.

Für die Beurteilung eines chemischen Wäschedesinfektionsmittels werden orientierende, obligate und optionale Prüfungen zugrunde gelegt.

Orientierend (nicht obligat):

– *Bestimmung der bakterio- und levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel (Methode 7)*

Der Vergleich der Hemmtiter in den Prüfreihe ohne und mit Zusatz von Neutralisationsmittel gibt Auskunft über dessen Wirksamkeit.

Als Maß der vermehrungshemmenden Wirksamkeit (Hemmkonzentration) gilt die höchste Verdünnung des Produktes in CSB bzw. MEB (jeweils ggf. + Neutralisationsmittel), die das Wachstum der Testorganismen nach 48 h Inkubation so unterdrückt, dass es nicht zur Trübung der Suspension führt (+ = Wachstum der Mikroorganismen; – = kein Wachstum der Mikroorganismen).

Sofern Resultate der Bestimmung der bakterio- bzw. levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel vorhanden sind, sind diese im Prüfbericht vollständig tabellarisch inkl. des KBE-Gehaltes pro ml der Prüfsuspensionen anzugeben.

– *Bestimmung der bakteriziden Wirksamkeit im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8) – orientierend –. Nicht notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) alle Gram-negativen Testorganismen (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*) getestet werden. (Prüfbedingungen siehe Tab. 16.1)*

Obligat:

– *Bestimmung der bakteriziden Wirksamkeit im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8); notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) nicht alle Gram-negativen Testorganismen (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*) getestet werden. (Prüfbedingungen siehe Tab. 16.1)*

– *Bestimmung der bakteriziden, und levuroziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9.1 bzw. EN 13727 und EN 13624 [1, 2]) (Prüfbedingungen s. Tab. 16.2 und 16.4)*

Das zu prüfende Produkt muss die Koloniezahl der in **► Tabelle 16.4** genannten Testorganismen unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit bei 20 °C mindestens um 5 lg-Stufen sowie von *Candida albicans* mindestens um 4 lg-Stufen vermindern.

– Prüfung der bakteriziden und levuroziden Wirksamkeit unter praxisnahen Bedingungen (Methode 16) (Prüfbedingungen s. Tab. 16.2 bis 16.4)

Ein Mittel gilt bei der chemischen Wäschedesinfektion als wirksam, wenn es in der Gebrauchsverdünnung bei 12 °C–14 °C die Testorganismen auf den Keimträgern innerhalb der Einwirkzeit soweit reduziert, dass keine KBE mehr nachweisbar sind.

Optional:

Soll eine fungizide oder tuberkulozide oder mykobakterizide Wirksamkeit dargestellt werden, müssen neben den oben genannten obligaten Prüfungen folgende Prüfungen jeweils als Suspensionsversuch und praxisnaher Test durchgeführt werden.

- Bestimmung der tuberkuloziden, mykobakteriziden bzw. fungiziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9.1 bzw. EN 14348, EN 13624 [3, 2]; Prüfbedingungen s. Tab. 16.2 und 16.4)
- Prüfung der tuberkuloziden, mykobakteriziden oder fungiziden Wirksamkeit unter praxisnahen Bedingungen (Methode 16)

Prüfbedingungen und Anforderungen

Die Anforderungen für die Prüfung von chemischen Wäschedesinfektionsverfahren sind in den ➔ Tabellen 16.1 bis 16.4 angegeben.

Tabelle 16.1: Prüfbedingungen im qualitativen Suspensionsversuch.
Erforderliche Reduktion: Kein Wachstum in den Kulturröhrchen nach 48 h.

Anwendungs- verfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (h) ²
Chemische Wäsche- desinfektion	<i>E. coli</i> K12 <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabilis</i>	ohne	Anwendungs- konzentration	13 ± 2	4, 6, 12

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (➔ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen.

Tabelle 16.2: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Anwendungs- verfahren	Testorganismen ⁴	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (h) ²
Chemische Wäsche- desinfektion	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabilis</i> ³ <i>E. coli</i> K12 ³ <i>C. albicans</i> <i>M. terrae</i> ⁴ <i>M. avium</i> ⁴ <i>A. brasiliensis</i> ⁴	hoch	Anwendungs- konzentration	13 ± 2	4, 6, 12

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (→ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen. Bei der Prüfung ist auch die Einwirkzeit zu berücksichtigen, die direkt unter der kürzesten beantragten Einwirkzeit liegt. Das gilt auch, wenn methodisch nach EN geprüft wird.

³ Wenn im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa*.

⁴ Optional, wenn eine fungizide oder tuberkulozide oder mykobakterizide Wirksamkeit beantragt wird.

Tabelle 16.3: In den einzelnen Durchgängen zu wählende Einwirkzeiten für die praxisnahen Prüfungen von Wäschedesinfektionsmitteln.

Beantragte Einwirkzeit	1. Durchgang	2. Durchgang
Chemische Wäschedesinfektion		
4 h	1 h, 4 h	4 h
6 h	4 h, 6 h	6 h
12 h	6 h, 12 h	12 h

Tabelle 16.4: Anforderungen im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) bzw. unter praxisnahen Bedingungen – Chemische Wäschedesinfektion.

Wirkungsbereich	bakterizide Wirksamkeit	levurozide Wirksamkeit	fungizide Wirksamkeit	tuberkulozide Wirksamkeit	mykobakterizide Wirksamkeit
Reduktion	5 bzw. 7 lg-Stufen	4 bzw. 6 lg-Stufen	4 bzw. 6 lg-Stufen	4 bzw. 6 lg-Stufen	4 bzw. 6 lg-Stufen
Belastung	hoch	hoch	hoch	hoch	hoch
Testorganismen	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> ²⁾ <i>P. mirabilis</i> ¹ <i>E. coli</i> K12 ¹	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> <i>A. brasiliensis</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. terrae</i> <i>M. avium</i>

¹ Prüfung im quantitativen Suspensionsversuch ist erforderlich, wenn diese Testorganismen im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa* sind bzw. kein qualitativer Suspensionsversuch durchgeführt worden ist.

² 5 bzw. 6 lg-Stufen.

Die praxisnahen Prüfungen haben jeweils in zwei Durchgängen zu erfolgen:

1. *Durchgang*: 2 Prüfkörper pro Konzentration-Zeit-Relation und pro WSH-Kontrolle (Ko1) + Durchführung der Kontrollen (Ko2, Ko3).
2. *Durchgang*: je 2 Prüfkörper pro beantragter Konzentration-Zeit-Relation und pro WSH-Kontrolle (Ko1).

Im zweiten Durchgang ist im Falle der obligaten Prüfung der Bakterizidie und Levurozidie nur die Prüfung der beiden resistantesten Testorganismen aus dem 1. Durchgang notwendig.

Literatur

1. DIN EN 13727:2014-3. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
2. DIN EN 13624:2013-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
3. DIN EN 14348:2005-04. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der mykobakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich einschließlich der Instrumentendesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).

Chemothermische Wäschedesinfektion – Einbadverfahren (praxisnaher Versuch)*

(Methode 17)

17

Vorbemerkungen

Diese Methode wurde mit dem Robert Koch-Institut (RKI) gemeinsam erarbeitet. Die Anforderungen an die Wirksamkeit des Einbadverfahrens entsprechen somit auch denen für die Aufnahme in die Desinfektionsmittel-Liste des RKI.

Derartige Prüfungen können nur in Waschmaschinen durchgeführt werden, die eine exakte Steuerung der Verfahrenskennwerte wie Dosierung des Prüfproduktes und der Wassermenge (und damit das Flottenverhältnis), Wassertemperatur und Einwirkzeit zulassen und eine Probenahme für die Prüfkörper und Flotte unmittelbar nach der Desinfektionsphase erlauben.

Die im folgenden beschriebenen Versuche werden bei der Verfahrenstemperatur durchgeführt.

Anforderung an die Waschmaschine werden im ➔ Anhang **A3** aufgeführt.

Maschinenvorbereitung

Vor jeder Prüfung muss die Maschine ohne Ballastbeladung (➔ 17.1.5) einer Behandlung von mindestens 30 min bei 80 °C bis 90 °C ohne Wasch- und Desinfektionsmittel unterzogen werden. Die Waschmaschine muss vor Verwendung auf Raumtemperatur (20 °C bis 25 °C) abgekühlt sein.

Ballastbeladung (Wäsche)

Als Ballastbeladung dient vorgewaschenes Baumwollmischgewebe. Es ist darauf zu achten, dass der Baumwollanteil mindestens 35 % beträgt. Die Menge der Ballastbeladung muss mindestens 80 % der maximalen Füllmenge betragen.

Anmerkung: Diese Gewebezusammensetzung entspricht der üblichen Zusammensetzung von Krankenhauswäsche. Ist das Verfahren zur Aufbereitung von Textilien aus 100 % Baumwolle vorgesehen, muss die Prüfung mit Ballastwäsche aus 100 % Baumwolle durchgeführt werden.

Zur Vorbereitung vor der ersten Benutzung wird die Ballastbeladung 30 min bei 80 °C bis 90 °C ohne Zusätze gewaschen, gefolgt von mindestens 5 Spülgängen. Danach wird die Wäsche getrocknet und einer Sterilisation im Dampfsterilisator unterzogen.

*Entsprechend kann auch der Phase-2-Stufe-2-Test nach prEN 16616 durchgeführt werden [1].

Die Ballastbeladung sollte in nicht mehr als 100 Waschzyklen (einschließlich Vorbehandlungs- und Desinfektionszyklen) verwendet werden.

Nach der Prüfung zur Desinfektion sollte die Ballastbeladung 30 min bei 80 °C bis 90 °C gewaschen werden, gefolgt von mindestens 5 Spülängen (jeweils mindestens 5 min) und einer Sterilisation im Dampfsterilisator vor dem Gebrauch.

Anmerkung: Wenn im letzten Spülgang Schaum vorliegt, ist zusätzliches Spülen notwendig.

Wasserhärte

Das Wasch- und Desinfektionsverfahren muss mit einer Wasserhärte von mindestens 4 mmol/l Erdalkaliionen (Mg^{2+} , Ca^{2+}) geprüft werden.

Optional: Es können auch Verfahren unter Verwendung von Weichwasser gelistet werden. Dafür muss in beiden Prüflaboratorien die entsprechende Wasserhärte ($< 8 \text{ °dH}$) verwendet werden.

Die Wasserhärte muss im Prüfbericht angegeben sein.

Desinfektionsmittel mit Aktivsauerstoffkomponenten

Bei Verwendung von Desinfektionsmitteln mit Aktivsauerstoffkomponenten muss der Gehalt des Wirkstoffes durch Titration nach anerkannten Methoden (➔ *Anhang A4*) bestimmt werden, um zu gewährleisten, dass im Test die vom Hersteller für das Verfahren vorgesehene Konzentration eingesetzt wird*. Ist die so bestimmte Konzentration des Wirkstoffes um mehr als 5 % gegenüber der vom Hersteller deklarierten Konzentration erhöht, muss die Menge des Desinfektionsmittels im Test so korrigiert werden, dass in der Waschflotte die für das jeweilige Verfahren festgelegte Wirkstoffmenge vorliegt.

Beispiel: Ist die Konzentration bei einer 5%igen PES-Lösung um den Faktor 1,12 (also 12 % mehr = 5,6 %) höher, ist die eingesetzte Menge entsprechend zu verringern, nämlich um den Faktor $1/1,12$, also auf 4,46 % (5:1,12).

*Aufgrund der relativ geringen Stabilität von Peressigsäure werden diese Lösungen häufig mit einem höheren Wirkstoffgehalt vertrieben, um die deklarierte Konzentration auch am Ende der Haltbarkeit noch zu gewährleisten.

17.1 Prüfung von Wäschedesinfektionsverfahren bei Temperaturen von 30 °C bis < 60 °C

(Methode 17.1)



17.1.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538 (DSM 799)	$\geq 1,5 \times 10^9$ KBE/ml
<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541 (DSM 3320)	$\geq 1,5 \times 10^9$ KBE/ml
<i>Escherichia coli</i> K12	NCTC 10538 (DSM 11250)	$\geq 1,5 \times 10^9$ KBE/ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442 (DSM 939)	$\geq 1,5 \times 10^9$ KBE/ml
<i>Mycobacterium terrae</i>	ATCC 15755 (DSM 43227)	$\geq 1,5 \times 10^9$ KBE/ml
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC 15769 (DSM 44157)	$\geq 1,5 \times 10^9$ KBE/ml
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 (DSM 1386)	$\geq 1,5 \times 10^8$ KBE/ml
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (früher <i>A. niger</i>)	ATCC 16404 (DSM 1988)	$\geq 1,5 \times 10^8$ KBE/ml

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sowie der Prüfsuspensionen sind in [Kapitel 6](#) beschrieben. Nach Abschwemmen der Gebrauchskulturen in Verdünnungsmittel ([Anhang A1.3](#)), Zentrifugation und Entfernen des Überstandes werden die Testorganismen als Pellet in defibriertem Schafblut ([Anhang A.1.8c](#)) aufgenommen und homogenisiert. Die dadurch entstehende Prüfsuspension soll eine Konzentration von den oben genannten KBE/ml aufweisen.

17.1.2 Produktprüflösungen

17.1.2.1 Produktprüflösung für die Prüfung in der Waschmaschine

Für die im Verfahren eingesetzten Wasch- und Desinfektionsmittel wird entsprechend dem im Versuch vorgesehenen Flottenvolumen (abhängig von Produktdosierung und Flottenverhältnis) die für den Test erforderliche Menge abgemessen, um sie anschließend im Waschverfahren gemäß dem vom Hersteller vorgegebenen Verfahrensablauf einzusetzen. Soll das Wasch- und/oder Desinfektionsmittel in unterschiedlichen Konzentrationen angewendet werden, sind sowohl die niedrigste als auch die höchste angegebene Konzentration zu testen.

17.1.2.2 Produktprüflösung für Kontrolluntersuchungen ([Kapitel 5](#) und [17.1.8.4](#))

17.1.3 Prüfkörper

Zur Fertigung der Prüfkörper wird Standardbaumwollgewebe (➔ *Anhang A2*), welches in Wasser (➔ *Anhang A1.1*) gründlich gespült wurde, verwendet. Das Gewebe wird in Prüfkörper von 1 cm² (1 cm x 1 cm) geschnitten, dreimal in jeweils frischem Wasser (➔ *Anhang A1.1*) aufgekocht, gespült und getrocknet, anschließend dampfsterilisiert und rekontaminationssicher gelagert.

17.1.4 Kontamination der Prüfkörper

Die Prüfkörper werden in die Prüfsuspension eingetaucht und zur vollständigen Benetzung und Entfernung der Luftbläschen mittels Pinzette während 15 min mehrfach gewendet. Anschließend werden die Prüfkörper bei Raumtemperatur in offenen Petrischalen (z. B. 1–3 h unter der Laminair Air Flow bei eingeschaltetem Gebläse) getrocknet und können am gleichen Tag verwendet werden. Bei längerer Verwendungszeit der Prüfkörper ist deren Eignung am Anfang und Ende der Verwendungszeit in Bezug auf die Koloniezahl und die Resistenz zu bestätigen (➔ 17.1.8.1 und 17.1.8.3).

Hinweis: Prüfkörper mit *M. terrae* können, wenn die folgenden Bedingungen der Herstellung eingehalten werden, für einen Zeitraum von 12 Wochen verwendet werden. Die Prüfkörper werden nach dem Eintauchen und Wenden in der Prüfsuspension auf 3 Lagen Filterpapier (➔ *Anhang A3*) in Petrischalen gelegt. Anschließend werden die Prüfkörper in Petrischalen ohne Filterpapier für 24 h offen in einer Klimakammer bei Raumtemperatur und einer rel. Feuchte von 20 % getrocknet. Danach erfolgt die Lagerung bei 45 % rel. Feuchte und Raumtemperatur (20 % rel. Feuchte kann durch CaCl₂-Kristalle z. B. in einem dicht verschlossenen Gefäß (z. B. Exsikkator) erreicht werden, 45 % rel. Feuchte kann unter gleichen Bedingungen mit einer gesättigten K₂CO₃-Lösung erzielt werden). Nach 48 h können die Prüfkörper verwendet werden.

17.1.5 Methodik

Die Dosierung des Wasch- und Desinfektionsmittels sowie die Einstellung des Flottenverhältnisses erfolgen nach den Angaben des Herstellers.

Jeder Prüfkörper wird mittels Pinzette in je ein/e Säckchen/Tasche z. B. aus Baumwollgewebe überführt.

Hinweis: Eine einfache Wiederfindung ergibt sich, wenn man entsprechend viele Säckchen/Taschen aus Baumwollgewebe auf ein gut erkennbares Tuch aufnäht.

Beim Beschicken der Waschmaschine mit der Wäsche (Ballastbeladung) und den Prüfkörpern (10 Prüfkörper pro Testorganismus in den 10 Säckchen/Taschen) werden pro kg Wäsche 12,5 ml defibriniertes Schafblut (➔ *Anhang A1.8 c*) vor dem Wassereinlauf auf die Wäsche gegeben.

Die Aufheizzeiten bis zum Erreichen der vorgeschriebenen Temperatur und die Haltezeiten sind im Protokoll zu verzeichnen.

Die Desinfektionszeit beginnt mit dem Zeitpunkt des Erreichens der vorgeschriebenen Waschtemperatur und endet mit Ablauf der Haltezeit.

17.1.5.1 Nachweis vermehrungsfähiger Testorganismen (mit Ausnahme von *M. terrae* und *M. avium*) in der Flotte

Nach Beendigung der Desinfektionsphase werden 100 ml Flotte entnommen und sofort mit 100 ml doppelt konzentrierter CSB (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEB) + Neutralisationsmittel vermischt.

Der Nachweis der vorhandenen Testorganismen erfolgt qualitativ durch Inkubation für 7 Tage (*A. brasiliensis*: 9 Tage) bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$).

Bei vorhandener Trübung ist durch Ausstrich auf geeigneten Nährböden (CSA bzw. *C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA) und anschließender Differenzierung die Abwesenheit der Testorganismen darzustellen.

17.1.5.2 Nachweis vermehrungsfähiger Testorganismen auf den Prüfkörpern

Unmittelbar nach Beendigung der Desinfektionsphase, also vor einer Klarspülung, werden die Prüfkörper entnommen und sofort einzeln in Röhrchen (mindestens 10 ml Füllvolumen) mit je 5 ml CSB, MEB (*C. albicans* und *A. brasiliensis*) oder 0,1 M Phosphatpuffer (für *M. terrae* und *M. avium*) jeweils mit Neutralisationsmittel (→ Anhang A1.7) und Glasperlen (\emptyset 3–4 mm, ca. 1 ml) eingebracht.

Die Zeit bis zum Überführen aller Prüfkörper in das Neutralisationsmittel darf 5 min nicht überschreiten und muss dokumentiert werden.

Nach Ausschütteln der Prüfkörper (10 min mit einer Schüttelmaschine bei 400 U/min) wird der Nachweis noch vorhandener Testorganismen mittels Oberflächenverfahren (gleichbedeutend mit Spatelverfahren) von 1 ml Neutralisationslösung und 1 ml je einer Verdünnung 10^{-1} bis 10^{-3} in Neutralisationsmittel auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) geführt.

→ zur Inkubation siehe 17.1.6 a

17.1.6 Inkubation

a) Die Nährböden werden 48 h bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (*C. albicans*: 72 h bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und *A. brasiliensis*: 7 bis 9 Tage (es empfiehlt sich eine erste Zählung nach 72 h) bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$; *M. terrae* und *M. avium* 21 Tage bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$) inkubiert.

- b) Die Röhrrchen mit den Prüfkörpern werden 7 Tage bei 36 °C ± 1 °C (*C. albicans* 30 °C ± 1 °C, *A. brasiliensis*: 9 Tage bei 30 °C ± 1 °C) inkubiert. Bei einer sich entwickelnden Trübung ist der Nachweis der Abwesenheit der Testorganismen zu erbringen.

17.1.7 Auswertung und Dokumentation

Pro Prüfkörper ist die Reduktion der Testorganismen zu errechnen. Es werden vorrangig Nährböden ausgezählt, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 14 und 330 liegt. Die Reduktion (R) wird nach folgender Formel berechnet:

$$\lg R = \lg (\text{KBE Ko1}) - \lg (\text{KBE D})$$

KBE Ko1: Anzahl der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes

KBE D: Anzahl der KBE pro ml nach Einwirkung des Produktes

Im Prüfbericht sind die KBE-Werte pro Verdünnungsstufe, die lg(KBE D)- sowie die R-Werte tabellarisch aufzulisten. Alle Ergebnisse der Produktprüfungen und der Kontrollen sowie der Verfahrensablauf (Beladung der Waschmaschine, Dosierung, minutengenaue Temperaturverlauf (z.B. mittels Loggern), Aufheizzeit bis zum Erreichen der Desinfektionstemperatur, Haltezeit und Flottenverhältnis) der einzelnen Testdurchgänge sind zu protokollieren.

Art und Typ der Waschmaschine sind im Protokoll anzugeben.

17.1.8 Kontrollen

17.1.8.1 Prüfsuspension und Prüfkörper

Pro Testdurchgang ist die KBE/ml der Testorganismen in der Prüfsuspension inkl. Schafblut sowie von 3 Prüfkörpern zu bestimmen. Der lg-Mittelwert der 3 Prüfkörper wird als Basis für die Berechnung der Reduktionen auf den Prüfkörpern nach Exposition angesetzt. Die Koloniezahl pro Prüfkörper soll mindestens $7,5 \times 10^7$ KBE, *P. aeruginosa*, *C. albicans* und *A. brasiliensis* $7,5 \times 10^6$ KBE, betragen¹. Die Rückgewinnung der Testorganismen ist gemäß ➔ 17.1.5.2 durchzuführen.

17.1.8.2 Sterile Prüfkörper im Prüfverfahren

In mindestens einer Testreihe des Prüfverfahrens sind zusätzlich zu den kontaminierten Prüfkörpern 6 sterile Prüfkörper in dem Verfahren einzusetzen.

Jeder Prüfkörper wird mittels Pinzette in je ein Säckchen/Tasche z. B. aus Baumwollgewebe überführt.

Unmittelbar nach Beendigung der Desinfektionsphase, also vor einer Klarspülung, werden die Prüfkörper entnommen und innerhalb von 5 min einzeln in Röhrrchen mit je

¹Sofern diese Koloniezahl bei *P. aeruginosa*, *C. albicans* oder *A. brasiliensis* nicht erreicht wird, können alternativ 3 Prüfkörper je Tasche verwendet werden.

5 ml CSB (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEB; *M. terrae* und *M. avium*: 7H9) mit Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) eingebracht und entsprechend ➔ 17.1.6 inkubiert.

17.1.8.3 Test ohne Wasch- und ohne Desinfektionsmittel mit Prüfkörpern

Diese Prüfung dient der Beurteilung der Qualität der Prüfkörper. Dazu wird der Test ohne Wasch- und Desinfektionsmittel mit 10 kontaminierten Prüfkörpern pro Testorganismus (derselben Herstellungscharge des Tests nach ➔ 17.1.5) und 6 sterilen Prüfkörpern ohne Schafblut durchgeführt, um den mechanischen Spüleffekt der Waschmaschine zu ermitteln. Abweichend von den Anwendungsbedingungen wird dieser Test bei Standardbedingungen durchgeführt: Desinfektionstemperatur 40 °C, Einwirkzeit 20 min. Bei Testung von Gram-negativen Erregern hat diese Prüfung im Anschluss an die Tests entsprechend ➔ 17.1.5.1 zu erfolgen.

Unmittelbar nach Beendigung der Phase, die dem Desinfektionsschritt entsprechen würde, also vor einer Klarspülung, werden die Prüfkörper entnommen und sofort einzeln in Röhrchen mit je 5 ml CSB (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEB; *M. terrae* und *M. avium*: 0,1 M Phosphatpuffer) + Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) und Glasperlen (Ø 3–4 mm, ca. 1 ml) eingebracht.

Die Zeit bis zum Überführen aller Prüfkörper in das Neutralisationsmittel darf 5 min nicht überschreiten und muss dokumentiert werden.

Nach Ausschütteln der Prüfkörper (10 min mit einer Schüttelmaschine 400 U/min) wird der Nachweis noch vorhandener Testorganismen mittels Oberflächenverfahren von 1 ml direkt und bei den kontaminierten Prüfkörpern zusätzlich jeweils 1 ml einer geeigneten Verdünnung (10^{-2} bis 10^{-4} in Neutralisationsmittel) auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA; *M. terrae* und *M. avium*: 7H10) geführt. Die Inkubation erfolgt entsprechend ➔ 17.1.6.

Die Reduktion der Testorganismen auf den kontaminierten Prüfkörpern muss ≤ 3 lg-Stufen sein. Auf jedem der vorher sterilen Prüfkörpern muss das Wachstum mindestens eines Testorganismus nachweisbar sein.

17.1.8.4 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)

Diese Kontrolle kann entfallen, wenn aus den quantitativen Suspensionsversuchen (➔ *Methode 9*) hierzu schon aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. Sofern solche Resultate nicht vorliegen, sollte diese Kontrolle einmal vor den eigentlichen Versuchen durchgeführt werden. In den Tests sind CSB (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEB; *M. terrae* und *M. avium*: 0,1 M Phosphatpuffer) + Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) einzusetzen. Für die Ko2 ist die Produktprüflösung (➔ *Kapitel 5*) zu verwenden.

Zur Herstellung der Prüforganismensuspension für die Neutralisationsprüfung wird je Testorganismus 1 kontaminierter Prüfkörper (➔ 17.1.4) in 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer mit

Glasperlen in Röhrchen auf einer Schüttelmaschine (10 min bei 400 U/min) geschüttelt. Anschließend wird 30 s mit einem Wirbelmischer (z. B. Vortex) gemischt. Der Inhalt des Röhrchens wird in 10-er Schritten so verdünnt, dass eine Suspension von 10^3 KBE/ml erhalten wird. Diese Verdünnung wird als Neutralisation-Prüforganismensuspension eingesetzt.

Zur Kontrolle der Neutralisation (Ko2) wird 1 ml der höchsten im Test eingesetzten Konzentration des Prüfproduktes mit 8 ml Neutralisationsmittel vermischt und nach 5 min \pm 10 s Neutralisationszeit mit 1 ml der Neutralisation-Prüforganismensuspension versetzt. Nach der längsten Einwirkzeit wird hiervon sowohl aus dem Direktansatz 1 ml (z. B. 2x0,5 ml) als auch 0,1 ml auf CSA (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEA, *M. terrae* und *M. avium* 7H10) ausgespatelt.

Anmerkung: Zeigt sich im Test eine unzureichende Neutralisation (weniger als 10^2 KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden.

17.1.8.5 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3)

Diese Kontrolle kann entfallen, wenn aus den quantitativen Suspensionsversuchen (\Rightarrow Methode 9) hierzu schon aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. In den Tests sind CSB (*C. albicans* und *A. brasiliensis*: MEB ; *M. terrae* und *M. avium*: 0,1 M Phosphatpuffer) + Neutralisationsmittel (\Rightarrow Anhang A1.7) einzusetzen.

Zur Herstellung der Prüforganismensuspension für die Toxizitätsprüfung des Neutralisationsmittels wird je Testorganismus 1 kontaminierter Prüfkörper (\Rightarrow 17.1.4) in 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer mit Glasperlen in Röhrchen auf einer Schüttelmaschine (10 min bei 400 U/min) geschüttelt. Anschließend wird 30 s mit einem Wirbelmischer (z. B. Vortex) gemischt. Der Inhalt des Röhrchens wird in 10-er Schritten so verdünnt, dass eine Suspension von 10^3 KBE/ml erhalten wird. Diese Verdünnung wird als Prüforganismensuspension eingesetzt.

Die Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3) wird parallel zur Kontrolle 2 durchgeführt, enthält jedoch anstelle der Produktprüflösung WSH und wird bei 20 °C durchgeführt. (\Rightarrow Anhang A1.1).

Anmerkung: Zeigt sich im Test ein toxischer Effekt (weniger als 10^2 KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden.

17.1A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Verfahren von 30 °C bis < 60 °C

Die Prüfbedingungen richten sich nach der gewünschten Anwendungsempfehlung des chemothermischen Wäschedesinfektionsverfahrens. Es können Verfahren von 30 °C bis <60 °C ausgelobt werden.

Für die Beurteilung eines chemothermischen Wäschedesinfektionsverfahrens in spezifizierten Trommelwaschmaschinen (➔ *Anhang A3*) werden orientierende, obligate und optionale Prüfungen zugrunde gelegt.

Orientierend:

– *Bestimmung der bakteriostatischen und levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel (Methode 7)*

Der Vergleich der Hemmtiter in den Prüfreihe ohne und mit Zusatz von Neutralisationsmittel gibt Auskunft über dessen Wirksamkeit.

Als Maß der vermehrungshemmenden Wirksamkeit (Hemmkonzentration) gilt die höchste Verdünnung des Produktes in CSB bzw. MEB (jeweils ggf. + Neutralisationsmittel), die das Wachstum der Testorganismen nach 48 h Inkubation so unterdrückt, dass es nicht zur Trübung der Suspension führt (+ = Wachstum der Mikroorganismen; – = kein Wachstum der Mikroorganismen).

Sofern Resultate der Bestimmung der bakterio- bzw. levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel vorhanden sind, sind diese im Prüfbericht vollständig tabellarisch inkl. des KBE-Gehaltes pro ml der Prüfsuspensionen anzugeben.

– *Bestimmung der bakteriziden Wirkung im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8)*

– *orientierend. Nicht notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) alle Gram-negativen Testorganismen (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*) getestet werden; Prüfbedingungen siehe Tabelle 17.1.1*

Tabelle 17.1.1: Prüfbedingungen im qualitativen Suspensionsversuch – erforderliche Reduktion:

Kein Wachstum in den Kulturröhrchen nach 48 h.

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (min) ²
Chemothermische Wäschedesinfektion 30 °C bis < 60 °C	<i>E. coli</i> K 12 <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabilis</i>	ohne	Anwendungskonzentration	Temperatur im Waschverfahren	5, 10, 15, 20

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (➔ *Kapitel 5*). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen.

Obligat:

- Bestimmung der bakteriziden Wirksamkeit im qualitativen Suspensionsversuch (Methode 8). Notwendig, wenn im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9) nicht alle Gram-negativen Testorganismen (*E. coli*, *P. aeruginosa* und *P. mirabilis*) getestet werden; Prüfbedingungen siehe Tabelle 17.1.1
- Bestimmung der bakteriziden und levuroziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch bei der beantragten Verfahrenstemperatur (Methode 9.1 bzw. EN 13727 und EN 13624 [2, 3]); Prüfbedingungen s. Tabelle 17.1.2 und 17.1.3
- Prüfung der bakteriziden und levuroziden Wirksamkeit unter praxisnahen Bedingungen; Prüfbedingungen s. Tabelle 17.1.4

Die praxisnahen Prüfungen sind jeweils in 3 Durchgängen für die beantragten Verfahrensparameter durchzuführen. Sämtliche Kontrollen unter ➔ 17.2.8 müssen die dort aufgeführten Akzeptanzkriterien erfüllen.

Ein chemothermisches Wäschedesinfektionsverfahren (Einbadverfahren) gilt als wirksam, wenn es bei der empfohlenen Dosierung und Temperatur sowie dem vorgeschriebenen Flottenverhältnis eine Reduktion der in der **Tabelle 17.1.4** genannten Testorganismen an den Prüfkörpern von mehr als 7 lg-Stufen (*P. aeruginosa*, *Candida albicans*: 6 lg-Stufen) im Mittelwert innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit verursacht, d. h. bei 8 von 10 Prüfkörpern muss die Reduktion je Prüfkörper 7 (bzw. 6) lg-Stufen betragen. Außerdem dürfen in 100 ml Flotte keine Testorganismen nachweisbar sein, ebenso wenig wie an den vorher sterilen Lämpchen.

Tabelle 17.1.2: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (min) ²
Chemothermische Wäschedesinfektion 30 °C bis < 60 °C	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> K12 ³ <i>P. mirabilis</i> ³ <i>C. albicans</i> <i>M. terrae</i> ⁴ <i>M. avium</i> ⁴ <i>A. brasiliensis</i> ⁴	gering (bei Verfahren mit Vorwäsche) oder hoch	Anwendungskonzentration	Verfahrenstemperatur ⁵	5, 10, 15, 20

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (➔ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen. Bei der Prüfung ist auch die Einwirkzeit zu berücksichtigen, die direkt unter der kürzesten beantragten Einwirkzeit liegt. Das gilt auch, wenn methodisch nach EN geprüft wird.

³ Wenn im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa*.

⁴ Optional, wenn eine tuberkulozide, mykobakterizide oder fungizide Wirksamkeit beantragt wird.

⁵ Die WSH-Kontrollen (Ko1, 9.1.6.1) sind jeweils bei 20°C ± 1 °C und der Verfahrenstemperatur durchzuführen.

Tabelle 17.1.3: Anforderungen im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9).

Wirkungsbereich	Bakterizide Wirksamkeit	Levurozide Wirksamkeit	Fungizide Wirksamkeit	Tuberkulozide Wirksamkeit	Mykobakterizide Wirksamkeit
Reduktion	5 lg-Stufen	4 lg-Stufen	4 lg-Stufen	4 lg-Stufen	4 lg-Stufen
Belastung	gering (bei Verfahren mit Vorwäsche) oder hoch	gering (bei Verfahren mit Vorwäsche) oder hoch	gering (bei Verfahren mit Vorwäsche) oder hoch	gering (bei Verfahren mit Vorwäsche) oder hoch	gering (bei Verfahren mit Vorwäsche) oder hoch
Testorganismen	<i>S. aureus</i> <i>E. hirae</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. mirabilis</i> ¹ <i>E. coli</i> K12 ¹	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> <i>A. brasiliensis</i>	<i>M. terrae</i>	<i>M. terrae</i> <i>M. avium</i>

¹ Prüfung ist erforderlich, wenn diese Testorganismen im qualitativen Suspensionsversuch resistenter als *P. aeruginosa* sind bzw. kein qualitativer Suspensionsversuch durchgeführt worden ist.

Tabelle 17.1.4: Prüfbedingungen und erforderliche Reduktionen für chemothermische Wäschedesinfektionsverfahren im Versuch unter praxisnahen Bedingungen.

Anwendungs- verfahren	Belastung	Einwirkzeiten	erforderliche Reduktion
Chemothermische Wäschedesinfektion 30 °C bis < 60°C	12,5 ml defibriniertes Schafblut/kg Wäsche	gemäß beantragter Einwirkzeit	7 lg-Stufen bei Bakterien 6 lg-Stufen bei <i>P. aeruginosa</i> und <i>C. albicans</i> optional: 6 lg-Stufen bei <i>A. brasiliensis</i> 7 lg-Stufen bei <i>M. terrae</i> und <i>M. avium</i>

Optional:

Fungizidie

– Quantitativer Suspensionsversuch mit *Aspergillus brasiliensis* (Methode 9.2 bzw. EN 13624 [3])

Das zu prüfende Produkt muss die Koloniezahl von *Aspergillus brasiliensis* unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit bei der Verfahrenstemperatur mindestens um 4 lg-Stufen vermindern.

– Prüfung unter praxisnahen Bedingungen:

Ein chemothermisches Wäschedesinfektionsverfahren (Einbadverfahren) gilt als wirksam, wenn es bei der empfohlenen Dosierung und Temperatur sowie dem vorgeschriebenen Flottenverhältnis eine Reduktion von *Aspergillus brasiliensis* auf den Prüfkörpern

von mehr als 6 lg-Stufen im Mittelwert innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit verursacht, d.h. bei 8 von 10 Prüfkörpern muss die Reduktion je Prüfkörper 6 lg-Stufen betragen. Außerdem dürfen in 100 ml Flotte keine Testorganismen nachweisbar sein, ebenso wenig wie an den vorher sterilen Lämpchen.

Tuberkulozidie bzw. Mykobakterizidie

– *Quantitativer Suspensionsversuch mit Mycobacterium terrae bzw. Mycobacterium avium (Methode 9.2)*

Das zu prüfende Produkt muss die Koloniezahl von *Mycobacterium terrae* bzw. *Mycobacterium avium* unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit bei der Verfahrenstemperatur mindestens um 4 lg-Stufen vermindern.

Im Falle des optional zusätzlichen Nachweises einer tuberkuloziden Wirksamkeit ist im quantitativen Suspensionstest und im Versuch unter praxisnahen Bedingungen gegenüber *Mycobacterium terrae* zu prüfen. Soll ein mykobakterizider Effekt bestätigt werden, ist zusätzlich auch mit *Mycobacterium avium* zu prüfen.

– *Prüfung unter praxisnahen Bedingungen:*

Ein chemothermisches Wäschedesinfektionsverfahren (Einbadverfahren) gilt als wirksam, wenn es bei der empfohlenen Dosierung und Temperatur sowie dem vorgeschriebenen Flottenverhältnis eine Reduktion von *Mycobacterium terrae* bzw. *Mycobacterium avium* auf den Prüfkörpern von mehr als 7 lg-Stufen im Mittelwert innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit verursacht, d.h. bei 8 von 10 Prüfkörpern muss die Reduktion je Prüfkörper 7 lg-Stufen betragen. Außerdem dürfen an den vorher sterilen Lämpchen keine Testorganismen nachweisbar sein.

Literatur

1. prEN 16616:2013. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika. Chemothermische Wäschedesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).
2. DIN EN 13727:2014-3. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel – im humanmedizinischen Bereich Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
3. DIN EN 13624:2013-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel – im humanmedizinischen Bereich Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
4. DIN EN 14348:2005-04. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der mykobakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich einschließlich der Instrumentendesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).

17.2 Prüfung von Wäschedesinfektionsverfahren bei Temperaturen von ≥ 60 °C bis 70 °C

(Methode 17.2)



17.2.1 Testorganismus und Ausgangskonzentration

<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 6057	(DSM 2146)	≥ 1,5 x 10 ⁹ KBE/ml
-----------------------------	-----------	------------	--------------------------------

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sowie der Prüfsuspensionen sind in ➔ Kapitel 6 beschrieben. Nach Abschwemmen der Gebrauchskulturen in Verdünnungsmittel (➔ *Anhang A1.3*), Zentrifugation und Entfernen des Überstandes werden die Testorganismen als Pellet in defibriertem Schafblut (➔ *Anhang A.1.8c*) aufgenommen und homogenisiert. Die dadurch entstehende Prüfsuspension soll eine Konzentration von den oben genannten KBE/ml aufweisen.

17.2.2 Produktprüflösungen

17.2.2.1 Produktprüflösung für die Prüfung in der Waschmaschine

Für die im Verfahren eingesetzten Wasch- und Desinfektionsmittel wird entsprechend dem im Versuch vorgesehenen Flottenvolumens (abhängig von Produktdosierung und Flottenverhältnis) die für den Test erforderliche Menge abgemessen, um sie anschließend im Waschverfahren gemäß dem vom Hersteller vorgegebenen Verfahrensablauf einzusetzen. Soll das Wasch- und/oder Desinfektionsmittel in unterschiedlichen Konzentrationen angewendet werden, sind sowohl die niedrigste als auch die höchste angegebene Konzentration zu testen.

17.2.2.2 Produktprüflösung für Kontrolluntersuchungen (➔ 17.2.8.4, 17.2.8.5 und Kapitel 5)

17.2.3 Prüfkörper

Zur Fertigung der Prüfkörper wird Standardbaumwollgewebe (➔ *Anhang A2*), welches in Wasser (➔ *Anhang A1.1*) gründlich gespült wurde, verwendet. Das Gewebe wird in Prüfkörper von 1 cm² (1 cm x 1 cm) geschnitten, dreimal in jeweils frischem Wasser (➔ *Anhang A1.1*) aufgekocht, gespült und getrocknet, anschließend dampfsterilisiert und rekontaminationssicher gelagert.

17.2.4 Kontamination der Prüfkörper

Die Prüfkörper werden in die Prüfsuspension eingetaucht und zur vollständigen Benetzung und Entfernung der Luftbläschen mittels Pinzette während 15 min mehrfach gewendet. Anschließend werden die Prüfkörper bei Raumtemperatur in offenen Petri-

schalen (z. B. 1–3 h unter der Laminar Air Flow bei eingeschaltetem Gebläse) getrocknet und können am gleichen Tag verwendet werden. Bei längerer Verwendungszeit der Prüfkörper ist deren Eignung am Anfang und Ende der Verwendungszeit in Bezug auf die Koloniezahl und die Resistenz zu bestätigen (\Rightarrow 17.2.8.1 und 17.2.8.3).

Hinweis: Prüfkörper mit E. faecium können, wenn die folgenden Bedingungen der Herstellung eingehalten werden, für einen Zeitraum von 12 Wochen verwendet werden. Die Prüfkörper werden nach dem Eintauchen und Wenden in der Prüfsuspension auf 3 Lagen Filterpapier (\Rightarrow Anhang A3) in Petrischalen gelegt. Anschließend werden die Prüfkörper in Petrischalen ohne Filterpapier für 24 h offen in einer Klimakammer mit Raumtemperatur und einer rel. Feuchte von 20 % getrocknet. Danach erfolgt die Lagerung bei 45 % rel. Feuchte und Raumtemperatur (20 % rel. Feuchte kann durch CaCl_2 -Kristalle in einem dicht verschlossenen Gefäß (z. B. Exsikkator) erreicht werden, 45 % rel. Feuchte kann unter gleichen Bedingungen mit einer gesättigten K_2CO_3 -Lösung erzielt werden). Nach 48 h können die Prüfkörper verwendet werden.

17.2.5 Methodik

Die Dosierung des Wasch- und Desinfektionsmittels sowie das Flottenverhältnis erfolgen nach den Angaben des Herstellers.

Jeder Prüfkörper wird mittels Pinzette in je ein Säckchen/Tasche z. B. aus Baumwollgewebe überführt.

Hinweis: Eine einfache Wiederfindung ergibt sich, wenn man entsprechend viele Säckchen/Taschen aus Baumwollgewebe auf ein gut erkennbares Tuch aufnäht.

Beim Beschicken der Waschmaschine mit der Wäsche und den Prüfkörpern (10 Prüfkörper pro Testorganismus in den 10 Säckchen/Taschen) werden pro kg Wäsche 12,5 ml defibriniertes Schafblut (\Rightarrow Anhang A1.8c) vor dem Wassereinlauf auf die Wäsche gegeben.

Die Aufheizzeiten bis zum Erreichen der vorgeschriebenen Temperatur und die Haltezeiten sind im Protokoll zu verzeichnen.

Die Desinfektionszeit beginnt mit dem Zeitpunkt des Erreichens der vorgeschriebenen Waschtemperatur und endet mit Ablauf der Einwirkzeit.

17.2.5.1 Nachweis vermehrungsfähiger Testorganismen in der Flotte

Nach Beendigung der Desinfektionsphase werden 100 ml Flotte entnommen und sofort mit 100 ml doppelt konzentrierter CSB + Neutralisationsmittel vermischt.

Der Nachweis der vorhandenen Testorganismen erfolgt qualitativ durch Inkubation für 48 h.

Bei vorhandener Trübung ist durch Ausstrich auf geeignete Nährböden (CSA) und anschließender Differenzierung die Abwesenheit der Testorganismen darzustellen.

17.2.5.2 Nachweis vermehrungsfähiger Testorganismen auf den Prüfkörpern

Unmittelbar nach Beendigung der Desinfektionsphase, also vor einer Klarspülung, werden die Prüfkörper entnommen und sofort einzeln in Röhrchen (mindestens 10 ml Füllvolumen) mit je 5 ml CSB jeweils mit Neutralisationsmittel (► *Anhang A1.7*) und Glasperlen (\varnothing 3–4 mm, ca. 1 ml) eingebracht.

Die Zeit bis zum Überführen aller Prüfkörper in das Neutralisationsmittel darf 5 min nicht überschreiten und muss dokumentiert werden.

Nach Ausschütteln der Prüfkörper (10 min mit einer Schüttelmaschine bei 400 U/min) wird der Nachweis noch vorhandener Testorganismen mittels Oberflächenverfahren (gleichbedeutend mit Spatelverfahren) von 1 ml Neutralisationslösung und 1 ml je einer Verdünnung 10^{-1} bis 10^{-3} in Neutralisationsmittel auf CSA geführt.

17.2.6 Inkubation

- Die Nährböden werden 7 Tage bei 36 °C \pm 1 °C inkubiert.
- Die Röhrchen mit den Prüfkörpern werden 7 Tage bei 36 °C \pm 1 °C inkubiert. Bei einer sich entwickelnden Trübung ist der Nachweis der Abwesenheit der Testorganismen zu erbringen.

17.2.7 Auswertung und Dokumentation

$$\lg R = \lg (\text{KBE Ko1}) - \lg (\text{KBE D})$$

KBE Ko1: Anzahl der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes

KBE D: Anzahl der KBE pro ml nach Einwirkung des Produktes

Im Prüfbericht sind die KBE-Werte pro Verdünnungsstufe, die $\lg(\text{KBE D})$ - sowie die R-Werte tabellarisch aufzulisten. Alle Ergebnisse der Produktprüfungen und der Kontrollen sowie der Verfahrensablauf (Beladung der Waschmaschine, Dosierung, minutengenauer Temperaturverlauf (z.B. mittels Loggern), Aufheizzeit bis zum Erreichen der Desinfektionstemperatur, Haltezeit und Flottenverhältnis) der einzelnen Testdurchgänge sind zu protokollieren.

Art und Typ der Waschmaschine sind im Protokoll anzugeben.

17.2.8 Kontrollen

17.2.8.1 Prüfsuspension und Prüfkörper

Pro Testdurchgang ist die KBE/ml der Testorganismen in der Prüfsuspension inkl. Schafblut sowie von 3 Prüfkörpern zu bestimmen. Der \lg -Mittelwert der 3 Prüfkörper wird als Basis für die Berechnung der Reduktionen auf den Prüfkörpern nach Exposition angesetzt. Die Koloniezahl pro Prüfkörper soll mindestens $7,5 \times 10^7$ KBE betragen. Die Rückgewinnung der Testorganismen ist gemäß ► 17.2.5.2 durchzuführen.

17.2.8.2 Sterile Prüfkörper im Prüfverfahren

In mindestens einer Testreihe des Prüfverfahrens sind zusätzlich zu den kontaminierten Prüfkörpern 6 sterile Prüfkörper in dem Verfahren einzusetzen.

Jeder Prüfkörper wird mittels Pinzette in je ein Säckchen/Tasche z. B. aus Baumwollgewebe überführt.

Unmittelbar nach Beendigung der Desinfektionsphase, also vor einer Klarspülung, werden die Prüfkörper entnommen und innerhalb von 5 min einzeln in Röhrchen mit je 5 ml CSB mit Neutralisationsmittel (\Rightarrow *Anhang A1.7*) eingebracht und entsprechend \Rightarrow 17.2.6 inkubiert.

17.2.8.3 Test ohne Wasch- und ohne Desinfektionsmittel mit Prüfkörpern

Diese Prüfung dient der Beurteilung der Qualität der Prüfkörper. Dazu wird der Test ohne Wasch- und Desinfektionsmittel mit 10 kontaminierten Prüfkörpern pro Testorganismus (derselben Herstellungsladung des Tests nach \Rightarrow 17.2.5) und 6 sterilen Prüfkörpern ohne Schafblut durchgeführt, um den mechanischen Spüleffekt der Waschmaschine zu ermitteln. Abweichend von den Anwendungsbedingungen wird dieser Test bei Standardbedingungen durchgeführt: Desinfektionstemperatur 60 °C, Einwirkzeit 15 min.

Unmittelbar nach Beendigung der Phase, die dem Desinfektionsschritt entsprechen würde, also vor einer Klarspülung, werden die Prüfkörper entnommen und sofort einzeln in Röhrchen mit je 5 ml CSB + Neutralisationsmittel (\Rightarrow *Anhang A1.7*) und Glasperlen (\varnothing 3–4 mm, ca. 1 ml) eingebracht.

Die Zeit bis zum Überführen aller Prüfkörper in das Neutralisationsmittel darf 5 min nicht überschreiten und muss dokumentiert werden.

Nach Ausschütteln der Prüfkörper (10 min mit einer Schüttelmaschine 400 U/min) wird der Nachweis noch vorhandener Testorganismen mittels Oberflächenverfahren von 1 ml direkt und bei den kontaminierten Prüfkörpern zusätzlich jeweils 1 ml einer geeigneten Verdünnung (10^{-2} bis 10^{-4} in Neutralisationsmittel) auf CSA geführt. Die Inkubation erfolgt entsprechend \Rightarrow 17.2.6.

Die Reduktion der Testorganismen auf den kontaminierten Prüfkörpern muss ≤ 3 lg-Stufen sein. Auf jedem der vorher sterilen Prüfkörpern muss das Wachstum mindestens eines Testorganismus nachweisbar sein.

17.2.8.4 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)

Diese Kontrolle kann entfallen, wenn aus den quantitativen Suspensionsversuchen (\Rightarrow *Methode 9*) hierzu schon aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. Sofern solche Resultate nicht vorliegen, sollte diese Kontrolle einmal vor den eigentlichen Versuchen durchgeführt werden. In den Tests sind CSB + Neutralisationsmittel einzusetzen. Für die Ko2 ist die Produktprüflösung (\Rightarrow *Kapitel 5*) zu verwenden.

Zur Herstellung der Prüforganismensuspension für die Neutralisationsprüfung wird 1 kontaminierter Prüfkörper (➔ 17.2.4) in 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer mit Glasperlen in Röhrchen auf einer Schüttelmaschine (10 min bei 400 U/min) geschüttelt. Anschließend wird 30 s mit einem Wirbelmischer (z.B. Vortex) gemischt. Der Inhalt des Röhrchens wird in 10-er Schritten so verdünnt, dass eine Suspension von 10^3 KBE/ml erhalten wird. Diese Verdünnung wird als Neutralisation-Prüforganismensuspension eingesetzt.

Zur Kontrolle der Neutralisation (Ko2) wird 1 ml der höchsten im Test eingesetzten Konzentration des Prüfproduktes mit 8 ml Neutralisationsmittel vermischt und nach $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit mit 1 ml der Neutralisation-Prüforganismensuspension versetzt. Nach der längsten Einwirkzeit wird hiervon sowohl aus dem Direktansatz 1 ml (z.B. $2 \times 0,5 \text{ ml}$) als auch 0,1 ml auf CSA ausgespatelt.

Anmerkung: Zeigt sich im Test eine unzureichende Neutralisation (weniger als 10^2 KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden.

17.2.8.5 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3)

Diese Kontrolle kann entfallen, wenn aus den quantitativen Suspensionsversuchen (➔ Methode 9) hierzu schon aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. Sofern solche Resultate nicht vorliegen, sollte diese Kontrolle einmal vor den eigentlichen Versuchen durchgeführt werden. In den Tests sind CSB + Neutralisationsmittel einzusetzen.

Zur Herstellung der Prüforganismensuspension für die Toxizitätsprüfung des Neutralisationsmittels wird je Testorganismus 1 kontaminierter Prüfkörper (➔ 17.2.4) in 5 ml 0,1 M Phosphatpuffer mit Glasperlen in Röhrchen auf einer Schüttelmaschine (10 min bei 400 U/min) geschüttelt. Anschließend wird 30 s mit einem Wirbelmischer (z.B. Vortex) gemischt. Der Inhalt des Röhrchens wird in 10-er Schritten so verdünnt, dass eine Suspension von 10^3 KBE/ml erhalten wird. Diese Verdünnung wird als Prüforganismensuspension eingesetzt.

Die Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3) wird parallel zur Kontrolle 2 durchgeführt, enthält jedoch anstelle der Produktprüflösung WSH und wird bei 20 °C durchgeführt. (➔ Anhang A1.1).

Anmerkung: Zeigt sich im Test ein toxischer Effekt (weniger als 10^2 KBE/ml), muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden.

17.2A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Die Prüfbedingungen richten sich nach der gewünschten Anwendungsempfehlung des chemothermischen Wäschedesinfektionsverfahrens. Es können Verfahren von ≥ 60 °C bis 70 °C ausgelobt werden.

Für die Beurteilung eines chemothermischen Wäschedesinfektionsverfahrens in spezifizierten Trommelwaschmaschinen (\Rightarrow *Anhang A3*) werden orientierende, obligate und optionale Prüfungen zugrunde gelegt.

Orientierend:

– *Bestimmung der bakteriostatischen und levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel (Methode 7)*

Der Vergleich der Hemmtiter in den Prüfreihen ohne und mit Zusatz von Neutralisationsmittel gibt Auskunft über dessen Wirksamkeit.

Als Maß der vermehrungshemmenden Wirksamkeit (Hemmkonzentration) gilt die höchste Verdünnung des Produktes in CSB (jeweils ggf. + Neutralisationsmittel), die das Wachstum der Testorganismen nach 48 h Inkubation so unterdrückt, dass es nicht zur Trübung der Suspension führt (+ = Wachstum der Mikroorganismen; – = kein Wachstum der Mikroorganismen).

Sofern Resultate der Bestimmung der bakterio- bzw. levurostatischen Wirksamkeit sowie geeigneter Neutralisationsmittel vorhanden sind, sind diese im Prüfbericht vollständig tabellarisch inkl. des KBE-Gehaltes pro ml der Prüfsuspensionen anzugeben.

Obligat:

– *Bestimmung der bakteriziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch bei der beantragten Verfahrenstemperatur (Methode 9.1 bzw. EN 13727 [2]); Prüfbedingungen s. Tabelle 17.2.1*

– *Prüfung der bakteriziden Wirksamkeit unter praxisnahen Bedingungen; Prüfbedingungen s. Tabelle 17.2.2*

Die praxisnahen Prüfungen sind jeweils in 3 Durchgängen für die beantragten Verfahrensparameter durchzuführen. Sämtliche Kontrollen unter (\Rightarrow 17.2.8) müssen die dort aufgeführten Akzeptanzkriterien erfüllen.

– *Prüfung von Wäschedesinfektionsverfahren bei Temperaturen ≥ 60 °C bis 70 °C (Methode 17.2)*

Ein chemothermisches Wäschedesinfektionsverfahren (Einbadverfahren) gilt als wirksam, wenn es bei der empfohlenen Dosierung und Temperatur sowie dem vorgeschriebenen Flottenverhältnis eine Reduktion von *Enterococcus faecium* auf den Prüfkörpern von mehr als 7 lg-Stufen im Mittelwert innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit verursacht, d. h. bei 8 von 10 Prüfkörpern muss die Reduktion je Prüfkörper 7 lg-Stufen

betragen. Außerdem dürfen in 100 ml Waschflotte keine Testorganismen nachweisbar sein, ebenso wenig wie an den vorher sterilen Lappchen.

Tabelle 17.2.1: Prüfbedingungen und Anforderungen im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 9). Erforderliche Reduktion: 5 lg-Stufen.

Anwendungs- verfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (min) ²
Chemothermische Wäschedesinfektion ≥ 60 °C bis 70 °C	<i>E. faecium</i>	gering (bei Verfahren mit Vorwäsche) oder hoch	Anwendungs- konzentration	Verfahrens- temperatur ³	5, 10, 15, 20

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (siehe Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Es müssen mindestens 3 der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen. Bei der Prüfung ist auch die Einwirkzeit zu berücksichtigen, die direkt unter der kürzesten beantragten Einwirkzeit liegt. Das gilt auch, wenn methodisch nach EN geprüft wird.

³ Die WSH-Kontrollen (Ko1, 9.1.6.1) sind jeweils bei 20°C ± 1°C und der Verfahrenstemperatur durchzuführen.

Im quantitativen Suspensionsversuch sind Kombinationsverfahren immer als Kombination von Waschmittel und Desinfektionsmittel zu prüfen und daraus die Prüfkonzentration herzustellen.

Tabelle 17.2.2: Prüfbedingungen und erforderliche Reduktionen für chemothermische Wäschedesinfektionsverfahren im Versuch unter praxisnahen Bedingungen.

Anwendungs- verfahren	Belastung	Einwirkzeiten	erforderliche Reduktion
Chemothermische Wäschedesinfektion ≥ 60 °C bis 70 °C	12,5 ml defibriniertes Schafblut/kg Wäsche	gemäß beantragter Einwirkzeit	7 lg-Stufen bei <i>E. faecium</i>

Literatur

1. prEN 16616:2013-06. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika. Chemothermische Wäschedesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2).
2. DIN EN 13727:2014-3. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der bakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
3. DIN EN 13624:2013-12. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).
4. DIN EN 14348:2005-04. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der mykobakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im humanmedizinischen Bereich einschließlich der Instrumentendesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 1).

Bestimmung der sporiziden Wirksamkeit gegenüber *Clostridium-difficile*-Sporen im quantitativen Suspensionsversuch*

(Methode 18)

18

18.1 Testorganismus

18.1.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen

<i>Clostridium difficile</i> R027	NCTC 13366 (DSM 27147)	1,5 bis 5×10^7 KBE/ml
-----------------------------------	------------------------	--------------------------------

18.1.2 Herstellung der Stammkultur von *C. difficile*

Die Verfahrensweise zur Herstellung der *C. difficile*-Stammkultur entspricht im Wesentlichen der für Bakterien (→ Kapitel 6.1.1). Jedoch werden anstelle von CSA und CSL als Nährmedien BHIYT-L Agar ohne Taurocholat und Lysozym (→ Anhang A1.4.12) bzw. BHI (→ Anhang A1.4.13) verwendet. Die Stammkulturen werden bei $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ unter anaeroben Bedingungen für 72 h inkubiert und entsprechend → Kapitel 6.1.1 eingefroren und aufbewahrt.

18.1.3 Herstellung der Arbeitskulturen und Sporensuspension von *C. difficile*

Tag 1: Zur Herstellung der Arbeitskulturen werden aus der Stammkultur in Kryogefäßen einzelne Perlen mit einem Draht oder einer Pinzette entnommen und durch Ausstreichen auf BHIYT-L Agar (→ Anhang A1.4.12) zwei Kulturen angelegt (1. Subkultur). Eine dient der Anreicherung, mit der anderen soll durch die Darstellung von Einzelkolonien die Reinheit des Stammes nachgewiesen werden. Beide Subkulturen werden bei $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ anaerob für 48 h in einem Anaerobiertopf inkubiert, bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 4 mm aufweisen. Diese erste Subkultur dient als Arbeitskulturen. Die Verwendung einer zweiten oder veralteten, eingelagerten Subkultur ist nicht zulässig.

→ siehe Schema D8.1, Anhang D

Tag 2: Die Herstellung der Columbia Broth (→ Anhang A1.4.14) erfolgt entsprechend den Herstellerangaben. Zur Vorreduzierung des Sauerstoffs und weiteren Verarbeitung werden 5 ml Columbia Broth (→ Anhang A1.4.14) in ein 15 ml Plastikgefäß mit offenem Schraubdeckel überführt und in einem Anaerobiertopf über Nacht (mindestens 12 h) aufbewahrt.

Tag 3: Eine isolierte Kolonie der Arbeitskulturen (mindestens 4 mm) vom BHIYT-L Agar (→ Anhang A1.4.12) wird in 5 ml vorreduzierter Columbia Broth (→ Anhang A1.4.14) sus-

Alternativ können Testverfahren nach den Europäischen Normen für die Prüfung der sporiziden Eigenschaften herangezogen werden, sofern sie die in den Anforderungen aufgeführten Bedingungen an das Testdesign einschließlich der Sporenanzucht erfüllen.

*Aktualisierungshinweis vom 15.3.2019:

Inzwischen ist der Phase-2/Stufe-1-Test als Norm EN 17126 erschienen.

pendiert und bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ anaerob für 24 h inkubiert. Für den Folgetag werden 20 ml Columbia Broth in 50 ml Plastikgefäßen mit offenem Schraubdeckel über Nacht (mindestens 12 h) vorreduziert.

Tag 4: Die vorreduzierte Columbia Broth (➔ *Anhang A1.4.14*) wird mit 50 µl der 24 h Kultur inokuliert und bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ anaerob für 20 h inkubiert.

Bei der Herstellung des Sporulationsmediums (➔ *Anhang A1.4.15*) müssen die Inhaltsstoffe in angegebener Reihenfolge zugefügt werden. 500 ml des Sporulationsmediums werden in 1 l Gefäße abgefüllt und dampfsterilisiert. Nach dem Abkühlen erfolgt die Vorreduzierung des Sporulationsmediums (➔ *Anhang A1.4.15*) in einem Anaerobiertopf für 24 h bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Der pH-Wert soll während dieser Zeit auf $8,2 \pm 0,3$ steigen. (*Hinweis: aus den o.g. 500 ml Sporulationsmedium resultieren final am 17. Tag insgesamt 2 ml Sporensuspension*).

Tag 5: Das gesamte Inokulum der 20 ml Columbia Broth (➔ *Anhang A1.4.14*) wird in 500 ml des vorreduzierten Sporulationsmediums (➔ *Anhang A1.4.15*) überführt und diese Sporenkultur bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ unter anaeroben Bedingungen für 10 Tage inkubiert.

Tag 15: Die Sporenkultur wird auf zwei 250 ml Zentrifugegefäße aufgeteilt und bei 4000 gN für 10 min zentrifugiert. [Die Beschleunigung der Zentrifugation (z. B. 10.000 gN) und die Zentrifugationsvolumina (≤ 250 ml) können angepasst werden, sofern eine gute qualitative Aufreinigung der Sporen gesichert ist. Der Überstand wird als biologischer Abfall verworfen.] Das Pellet jedes 250 ml Gefäßes wird in 50 ml Wasser (➔ *Anhang A1.1*) resuspendiert und schließlich in einem Gefäß zusammengeführt. Das Volumen wird auf 250 ml mit Wasser (➔ *Anhang A1.1*) aufgefüllt und bei 4000 gN für 10 min zentrifugiert. Im Folgenden müssen zwei weitere Waschschrte jeweils mit 250 ml Wasser (➔ *Anhang A1.1*) durchgeführt werden. Nach der dritten Zentrifugation wird das Pellet in 15 ml Wasser (➔ *Anhang A1.1*) resuspendiert und in ein vorgewogenes 50 ml Zentrifugegefäß überführt. Das ursprüngliche Zentrifugegefäß wird zweimal mit 10 ml Wasser (➔ *Anhang A1.1*) gespült und die Spülflüssigkeiten in dem neuen vorgewogenen Gefäß vereint (Endvolumen: 35 ml). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 4000 gN für 10 min wird das Gewicht des Pellets bestimmt und bei 2°C bis 8°C über Nacht gelagert.

Tag 16: Für den Enzymverdau verbliebener vegetativer Zellen und Zellbestandteile wird das Pellet in 10 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (➔ *Anhang A1.3.5*) resuspendiert. Sofern das Nassgewicht höher als 700 mg ist, muss die Suspension auf zwei Gefäße aufgeteilt werden (je 5 ml) und das Volumen jeweils auf 10 ml mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (➔ *Anhang A1.3.5*) aufgefüllt und durchmischt werden.

Das resuspendierte Pellet wird mit 25 ml des Enzympuffers (➔ *Anhang A1.3.6*) versetzt und vorsichtig vermischt; dabei keinen Wirbelmischer verwenden.

Die Suspension wird für 5 min im Ultraschallbad behandelt und für 6 h bei $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert. Zur Temperaturkontrolle muss ein Thermometer in ein

identisches Gefäß mit gleichem Volumen gestellt werden, um feststellen zu können, wann die benötigte Temperatur im Gefäß erreicht wird. Um Verklumpungen zu vermeiden, muss der Ultraschallschritt alle $2 \text{ h} \pm 0,2 \text{ h}$ wiederholt werden. Nach der Inkubationszeit und abschließenden Ultraschallbehandlung wird die Suspension über Nacht bei 2 °C bis 8 °C gelagert.

Tag 17: Zur Aufreinigung und weiteren Lagerung der *C.-difficile*-Sporensuspension wird die Suspension vom Vortag bei 4000 gN für 10 min zentrifugiert und das Pellet dreimal in 10 ml Wasser (➔ *Anhang A1.1*) gewaschen. [Die Beschleunigung der Zentrifugation (z. B. 10.000 gN) und die Zentrifugationsvolumina ($\leq 250 \text{ ml}$) können angepasst werden, sofern eine gute qualitative Aufreinigung der Sporen gesichert ist.] Nach den Waschsritten wird das Pellet in 30 ml Wasser (➔ *Anhang A1.1*) aufgenommen und die Sporensuspension für 10 min bei $70 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ im Wasserbad hitzeinaktiviert. Zur Temperaturkontrolle muss ein Thermometer in ein identisches Gefäß mit gleichem Volumen gestellt werden, um feststellen zu können, wann die benötigte Temperatur im Gefäß erreicht wird und ab wann die Hitzeinaktivierung ($10 \text{ min} \pm 1 \text{ C}^\circ$) starten kann. Unmittelbar nach der Hitzeinaktivierung wird das Gefäß mit der Sporensuspension für 5 min in ein Eisbad gestellt. Die Sporensuspension wird erneut bei 4000 gN für 10 min zentrifugiert und das Pellet einer jeden 500 ml Ursprungskultur in 2 ml Wasser (➔ *Anhang A1.1*) aufgenommen.

Die Anzahl der keimungsfähigen Sporen in der Sporensuspension wird durch ausreichende dekadische Verdünnungen in Wasser (➔ *Anhang A1.1*) und anschließender Inkubation (➔ 18.4) in BHIYT-L Agar oder im Oberflächenverfahren auf BHIYT-L Agar (➔ *Anhang A1.4.12*) bestimmt. Die Anzahl der Kolonien ist zu dokumentieren. Die Validierung der Methode 18 erfolgte mit dem Plattengußverfahren. Das Oberflächenverfahren ist ebenfalls ein anerkanntes Verfahren bei *Clostridium difficile*. Sofern das Oberflächenverfahren zur Anwendung kommt, müssen die BHIYT-L Agarplatten über Nacht für mindestens 12 h bei 36 °C im Anaerobiertopf vorreduziert werden.

Zur Reinheitskontrolle sollen von der Sporensuspension Phasenkontrastaufnahmen oder Sporenfärbungen angefertigt werden. Die Menge der verbliebenen vegetativen Zellen darf 20% pro Gesichtsfeld nicht überschreiten, anderenfalls muss die Sporensuspension erneut gewaschen oder verworfen werden.

Die Lagerung der Sporensuspension erfolgt bei 2 °C bis 8 °C in einem verschließbaren sterilen Gefäß (z. B. Falkon-Tube, Glasgefäß) mit sterilen Glasperlen. Die Sporen dürfen erst nach einer Lagerungszeit von mindestens 8 Wochen verwendet werden. Die Reinheit und chemische Widerstandsfähigkeit der Sporen muss vor der ersten Verwendung gemäß ➔ 18.1.4 mit beiden Validierungslösungen in allen angegebenen Konzentrationen geprüft werden. Nach Lagerung von 12 Monaten ist eine erneute Überprüfung der chemischen Widerstandsfähigkeit gemäß ➔ 18.1.4 mit beiden Validierungslösungen in allen angegebenen Konzentrationen erforderlich. Danach ist diese Prüfung halbjährlich zu wiederholen.

18.1.4 Bestimmung der Keimungsfähigkeit und chemischen Widerstandsfähigkeit der Sporensuspension (Referenzkontrolle)

Die Keimungsfähigkeit und chemische Widerstandsfähigkeit der Sporen jeder Sporencharge soll nach einer Mindestlagerung von 8 Wochen bei 2 °C bis 8 °C überprüft werden. Die Untersuchungen erfolgen im Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren ohne Belastung (⇒ 18.3.2a) gegen festgelegte, exakt bestimmte Konzentrationen von Glutaraldehyd¹ (GA) und Peressigsäure² (PES). Die Peressigsäure sollte zur Bestimmung des tatsächlichen Wirkstoffgehalts am Vortag der Prüfung der Sporensuspension titriert werden (⇒ Anhang A4).

Die Anzahl der Sporen in der Prüfsuspension zur Validierung der Sporensuspension wird mit einer geeigneten Methode auf $1,5 - 5,0 \times 10^6$ KBE pro ml eingestellt.

Folgende Reduktionen müssen bei den entsprechenden Konzentrations-Zeit-Relationen bei $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ mit *Clostridium-difficile*-Sporen NCTC 13366 erzielt werden:

- 1,0 % (v/v) – 15 min: GA-Lösung soll eine lg Reduktion von $< 1,5$ lg erzielen,
- 6,0 % (v/v) – 15 min: GA-Lösung soll eine lg Reduktion von $\geq 1,5$ lg erzielen,
- 0,01 % (v/v) – 15 min: PES-Lösung soll eine lg Reduktion von $< 1,5$ lg erzielen,
- 0,04 % (v/v) – 15 min: PES-Lösung soll eine lg Reduktion von $\geq 1,5$ lg erzielen.

Bei jeder Produktprüfung ist zur internen Qualitätskontrolle ein Test mit der dem Produkt am besten entsprechenden Validierungslösung (GA oder PES) in der geringeren aufgeführten Konzentration parallel durchzuführen. Bei einem chlorabspaltenden Produkt empfiehlt sich beispielsweise das Mitführen der PES-Validierungslösung.

18.1.5 Herstellung der Prüfsuspension

Die mit Glasperlen gelagerte Sporensuspension wird 3 min mechanisch suspendiert. Die Anzahl der keimungsfähigen Sporen in der Prüfsuspension wird unter Verwendung einer geeigneten Methode auf $1,5 - 5,0 \times 10^7$ KBE pro ml [auf $1,5 - 5,0 \times 10^8$ KBE pro ml bei gebrauchsfertigen Produktlösungen (Ready-to-use-Produkten), die als 97%ige Lösung geprüft werden sollen] eingestellt.

Diese Prüfsuspension ist bei $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ aufzubewahren und die Prüfung innerhalb von 2 h zu starten.

18.1.6 Bestimmung der Sporenzahl der Prüfsuspensionen von *C. difficile*

Die eingestellten Prüfsuspensionen werden mit dem Verdünnungsmittel so verdünnt, dass Prüfsuspensionen von 10^1 (10^{-6} -Verdünnung) bis 10^2 (10^{-5} -Verdünnung) KBE pro

¹ Glutaraldehyd z. B. der Firma Dow Chemical Company Ltd, Produktname: BIOBAN™ GA 50 Antimicrobial

² Peressigsäure z. B. der Firma Stockmeier Group, Produktname: Lerasept® spezial

ml resultieren. Die Prüfsuspension wird mit dem Wirbelmischer homogenisiert. Je 1 ml der verdünnten Prüfsuspension wird entnommen und im Plattengussverfahren eingegossen oder im Oberflächenverfahren auf vorreduzierte Platten ausgespatelt.

Die ausgehärteten Nährmedien werden bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ anaerob für 5 d inkubiert.

Die Anzahl der KBE auf jedem Nährboden wird ausgezählt und protokolliert. Es sind Zählwerte zu bevorzugen, die Werte zwischen 14 und 330 KBE/Platte aufweisen.

Vor Verwendung der Prüfsuspension ist die Reinheit mikroskopisch mittels Phasenkontrast zu bestätigen und zu dokumentieren.

18.2 Produktprüflösung

Für alle Produkte, die verdünnt angewendet werden, muss die Konzentration der Produktprüflösung aufgrund der angewendeten Methodik das 1,25-fache der zu testenden Prüfkonzentration betragen. Für alle Produkte, die unverdünnt angewendet werden, kann als höchste Konzentration die 97%ige Lösung (gebrauchsfertige Lösung = Ready-to-use) getestet werden.

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in \rightarrow Kapitel 5 beschrieben.

Als **Ready-to-use-Produkte** (gebrauchsfertige Produktlösungen) werden im Folgenden Produkte bezeichnet, die **unverdünnt** zur Anwendung kommen.

18.3 Methodik

18.3.1 Prinzip

Eine Probe des zu prüfenden Produktes wird mit einer Prüfsuspension versehen und dieses Gemisch wird bei der Prüftemperatur gehalten. Nach ausgewählten und festgelegten Einwirkzeiten wird eine aliquote Menge des Gemisches mit validierten Verfahren sofort neutralisiert. In jeder Probe werden die Koloniezahlen bestimmt und deren Verminderung gegenüber der Ausgangskoloniezahl berechnet.

\rightarrow siehe Schema D8.2, Anhang D

Das Verfahren der Wahl ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Membranfiltrationsverfahren stehen aufgrund fehlender Daten derzeit nicht zur Verfügung.

Die Prüfungen können mit geringer bzw. hoher organischer Belastung durchgeführt werden und richten sich nach den Einsatzbedingungen des zu prüfenden Produktes.

18.3.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren

Bei der Auswahl der Prüfbedingungen sind die entsprechenden Anforderungen zu berücksichtigen.

a) ohne Belastung (nur für die Validierung \rightarrow 18.1.4)

8 ml der Produktprüflösung werden mit 1 ml WSH und 1 ml der Prüfsuspension gut vermischt (Option für Ready-to-use-Produkte: 9,9 ml der Produktprüflösung werden mit 0,1 ml der Prüfsuspension, die eine 10-fach höhere Sporenzahl enthält, vermischt). Nach

➔ zur Inkubation siehe **18.4**
 ➔ zur Berechnung und
 Darstellung der Ergebnisse
 siehe **18.5**

den erforderlichen Einwirkzeiten wird das Prüfprodukt-Prüfsuspensionsgemisch erneut gut gemischt, jeweils 1 ml entnommen und in 9 ml Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) überführt (= Prüfneutralisationsgemisch) und gemischt. Unmittelbar danach werden 10^{-1} - und 10^{-2} -Verdünnungen in Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) angelegt. Nach $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit werden aus dem Prüfneutralisationsgemisch 1 ml sowie aus den Verdünnungen je 1 ml im Doppelansatz in BHIYT-L Agar eingegossen oder im Oberflächenverfahren auf vorreduzierte Platten ausgespatelt.

b) mit 0,03 % Albumin (geringe organische Belastung)

Zur Simulation geringer organischer Belastung wird der quantitative Suspensionsversuch mit Produktprüflösungen durchgeführt, die 0,03 % Albumin (➔ *Anhang A1.8*) enthalten, das erst unmittelbar vor Versuchsbeginn zugesetzt werden darf.

Hierzu werden 8 ml der Produktprüflösung mit 1 ml einer 0,3%igen sterilfiltrierten Albuminlösung und anschließend mit 1 ml der Prüfsuspension gut vermischt (Option für Ready-to-use-Produkte: 9,7 ml der Produktprüflösung werden mit 0,2 ml einer 1,5%igen Albuminlösung und 0,1 ml der Prüfsuspension, die eine 10-fach höhere Sporenzahl enthält, vermischt).

➔ zur Inkubation siehe **18.4**
 ➔ zur Berechnung und
 Darstellung der Ergebnisse
 siehe **18.5**

Nach den erforderlichen Einwirkzeiten wird das Prüfprodukt-Prüfsuspensionsgemisch erneut gut gemischt, jeweils 1 ml entnommen und in 9 ml Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) überführt (= Prüfneutralisationsgemisch) und gemischt. Unmittelbar danach werden 10^{-1} - und 10^{-2} -Verdünnungen in Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) angelegt. Nach $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit werden aus dem Prüfneutralisationsgemisch 1 ml sowie aus den Verdünnungen je 1 ml im Doppelansatz in BHIYT-L Agar eingegossen oder im Oberflächenverfahren auf vorreduzierte Platten ausgespatelt.

c) mit 0,3 % Albumin und 0,3 % Schaferythrozyten (hohe organische Belastung)

Zur Simulation hoher organischer Belastungen wird der quantitative Suspensionsversuch mit Produktprüflösungen durchgeführt, die 0,3 % Albumin und 0,3 % Schaferythrozyten (➔ *Anhang A1.8*) enthalten, die erst unmittelbar vor Versuchsbeginn zugesetzt werden dürfen.

Hierzu werden 8 ml der Produktprüflösung mit 1 ml einer Lösung, welche 3 % sterilfiltriertes Albumin sowie 3 % Schaferythrozyten enthält, gemischt und anschließend mit 1 ml der Prüfsuspension gut vermischt (Option für Ready-to-use-Produkte: 9,7 ml der Produktprüflösung werden mit 0,2 ml einer Lösung, die 15 %ig Albumin- sowie 15 %ig Schaferythrozyten-Lösung enthält, und 0,1 ml der Prüfsuspension, die eine 10-fach höhere Sporenzahl enthält, vermischt).

Nach den erforderlichen Einwirkzeiten wird das Prüfprodukt-Prüfsuspensionsgemisch erneut gut gemischt, jeweils 1 ml entnommen und in 9 ml Neutralisationsmittel

(⇒ *Anhang A1.7*) überführt (= Prüfneutralisationsgemisch) und gemischt. Unmittelbar danach werden 10^{-1} - und 10^{-2} -Verdünnungen in Neutralisationsmittel (⇒ *Anhang A1.7*) angelegt. Nach $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit werden aus dem Prüfneutralisationsgemisch 1 ml sowie aus den Verdünnungen je 1 ml im Doppelansatz in BHIYT-L Agar eingegossen oder im Oberflächenverfahren auf vorreduzierte Platten ausgespatelt.

➔ zur Inkubation siehe **18.4**
 ➔ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe **18.5**

18.4 Inkubation

Nach 5 d Inkubationszeit unter anaeroben Bedingungen bei $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ werden die Kolonien der keimungsfähigen Sporen ausgezählt.

18.5 Auswertung

Es werden vorrangig Nährböden ausgewertet, bei denen die Anzahl der KBE/Platte zwischen 14 und 330 liegt.

Die Reduktion R wird nach folgender Formel berechnet:

$$\lg R = \lg (\text{KBE Ko1}) - \lg (\text{KBE D})$$

KBE Ko1: Anzahl der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes (WSH-Kontrolle)

KBE D: Anzahl der KBE pro ml nach Einwirkung des Produktes

Im Prüfbericht sind die KBE-Werte pro Verdünnungsstufe, die dazugehörigen lg-Werte, sowie die daraus resultierenden R-Werte tabellarisch aufzulisten.

Die KBE-Werte pro Verdünnungsstufe der Kontrollen 2 und 3 (⇒ *18.6.1.2 und 3*) sind den KBE-Werten der Verdünnungsstufen der Prüfsuspension gegenüberzustellen und auf Plausibilität zu prüfen.

18.6 Validierung

18.6.1 Validierung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens

18.6.1.1 WSH-Kontrolle (Ko1)

Zur Bestimmung der KBE pro ml ohne Einwirkung des Produktes (Ko1) wird die jeweilige Prüfsuspension, ggf. mit organischer Belastung anstelle der Produktprüflösung, mit WSH vermischt. Nach den erforderlichen Einwirkzeiten sind von diesem Ansatz in gleicher Weise wie oben beschrieben (⇒ *18.3.2*), Verdünnungen (Verdünnungen von 10^{-3} ggf. bis 10^{-4}) anzulegen.

➔ siehe Schema **D8.2**, Anhang D
 ➔ zur Inkubation siehe **18.4**
 ➔ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe **18.5**

Anmerkung: Die WSH-Kontrolle (Ko1) soll zwischen $1,0 \times 10^6$ und $5,0 \times 10^6$ KBE/ml liegen.

18.6.1.2 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)

Zur Kontrolle der Neutralisation (Ko2) wird 1 ml der höchsten im Test eingesetzten Konzentration des Prüfproduktes mit 9 ml Neutralisationsmittel vermischt und nach $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit* mit 0,1 ml der 10^{-2} -Verdünnung der KBE-Bestimmungsreihe

➔ siehe Schema **D8.3**, Anhang D
 *Bei Produkten mit Einwirkzeiten von $\leq 10 \text{ min}$ nach $10 \text{ s} \pm 1 \text{ s}$ Neutralisationszeit

➔ zur Inkubation siehe **18.4**
 ➔ zur Berechnung und
 Darstellung der Ergebnisse
 siehe **18.5**

(Validierungssuspension) [Option für Ready-to-use-Produkte: 0,1 ml einer 10^{-3} -Verdünnung] versetzt. Nach der längsten Einwirkzeit wird hiervon sowohl aus einer 10^{-1} -Verdünnung als auch aus einer 10^{-2} -Verdünnung in Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) je 1 ml im Doppelansatz in BHIYT-L Agar eingegossen oder im Oberflächenverfahren auf vorreduzierte Platten ausgespatelt.

Anmerkung: Zeigt sich im Test eine unzureichende Neutralisation [weniger als $7,5 \times 10^2$ KBE/ml (= 50 % der Validierungssuspension in der Ko2)], muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden.

18.6.1.3 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3)

➔ siehe Schema **D8.3**, Anhang D

Die Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3) wird parallel zur Kontrolle 2 durchgeführt, enthält jedoch anstelle der Produktprüflösung WSH bzw. bei Ready-to-use-Produkten Wasser (➔ *Anhang A1.1*).

Anmerkung: Zeigt sich im Test ein toxischer Effekt [weniger als $7,5 \times 10^2$ KBE/ml (= 50% der Validierungssuspension in der Ko3)], muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden.

18.6.1.4 Validierung des Membranfiltrations-Verfahrens

Ein Membranfiltrations-Verfahren kann derzeit aufgrund fehlender Daten nicht mit *Clostridium-difficile*-Sporen durchgeführt werden.

18A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Prüfbedingungen siehe Tabelle 18.1 und 18.2

Der quantitative Suspensionsversuch ist obligat für alle vom VAH zu beurteilenden Anwendungsverfahren. Die Prüfbedingungen (Prüfkonzentration, Prüftemperatur, Einwirkzeiten) sind in ➔ **Tabelle 18.1** aufgeführt.

Angaben zur Auswahl der Belastung (geringe bzw. hohe organische Belastung) sowie die geforderten Reduktionen sind in der Tabelle ➔ **Tabelle 18.2** enthalten.

Aus den Ergebnissen der Prüfungen muss die Abgrenzung des wirksamen vom unwirksamen Bereich hervorgehen.

Sofern die Prüfungen gemäß DIN EN-Normen durchgeführt werden, sind folgende zusätzliche Anforderungen zu erfüllen:

– Verdünnungen des Prüfneutralisationsgemisches bis mindestens 10^{-2} sind unbedingt erforderlich, um mögliche Neutralisationsprobleme zu erkennen.

Die Prüfungen mit Sporen von *Clostridium difficile* zur Auslobung der sporiziden Wirksamkeit sind obligat und bedürfen neben der Prüfung im quantitativen Suspensionsversuch auch der Prüfung in den jeweiligen praxisnahen Versuchen, die sich in Entwicklung befinden.

Tabelle 18.1: Prüfbedingungen im qualitativen und quantitativen Suspensionsversuch.

Anwendungsverfahren	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten ³
Flächendesinfektion	Gebrauchsverdünnungen ²	20 ± 1	1 min ⁴ , 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 240 min
Chemische Instrumentendesinfektion (manuelles Eintauchverfahren)	Gebrauchsverdünnungen ²	20 ± 1	1 min ⁴ , 5 min, 15 min, 30 min, 60 min
Maschinelle chemothermische Instrumentendesinfektion	Gebrauchsverdünnungen ²	≥20 bis ≤70 ± 1	1 min ⁴ , 5 min, 15 min, 30 min, 60 min
Chemische Wäschedesinfektion (manuelles Einlegeverfahren)	Gebrauchsverdünnungen ²	13 ± 2	4 h, 6 h, 12 h
Maschinelle chemothermische Wäschedesinfektion	Mischungen des Wasch- und Desinfektionsmittelzusatzes in den Gebrauchsrelationen	30 bis 70 ± 1 entsprechend den Temperaturen im Waschverfahren	5 min, 10 min, 15 min, 20 min

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit. Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollten in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten.

² Ready-to-use-Produkte bei unverdünnt anzuwendenden Produkten.

³ Es müssen mindestens 3 Einwirkzeiten getestet werden, wobei die empfohlene Einwirkzeit die mittlere Zeit sein sollte.

⁴ Falls 5 min als beantragte Einwirkzeit vorgesehen sind, muss 1 min ebenfalls getestet werden.

Tabelle 18.2: Geforderte Reduktion zur sporiziden Wirksamkeit im quantitativen Suspensionsversuch.

Anwendungsverfahren	Sporizide Wirksamkeit: <i>Clostridium difficile</i> geringe ¹ und/oder hohe Belastung ² geforderte Reduktion in lg-Stufen
Flächendesinfektion	4 lg
Chemische Instrumentendesinfektion (manuelles Eintauchverfahren)	4 lg
Maschinelle chemothermische Instrumentendesinfektion 20 °C bis ≤ 70 °C *	4 lg
Chemische Wäschedesinfektion (manuelles Einlegeverfahren) 13 °C ± 2	4 lg
Maschinelle chemothermische Wäschedesinfektion 30 °C bis < 60 °C	4 lg
Maschinelle chemothermische Wäschedesinfektion 60 °C bis 70 °C	4 lg

¹ Bei der chemothermischen Wäschedesinfektion nur bei Verfahren mit Vorwäsche.

² Bei der chemothermischen Wäschedesinfektion nur bei Verfahren ohne Vorwäsche.

*Berichtigung vom 15.3.2019: 70 °C

Flächendesinfektion gegenüber *Clostridium-difficile*-Sporen

19 Flächendesinfektion mit Mechanik – praxisnaher 4-Felder-Test (Methode 19)

19

Prüfung der sporiziden Wirksamkeit auf nicht-porösen Oberflächen mit Mechanik

19a Prüfung der Wirksamkeit einer Desinfektionslösung im Wischverfahren mit einem standardisierten Tuchmaterial

In dieser Prüfung liegt der Schwerpunkt auf der Evaluation der **Wirksamkeit des Desinfektionsmittels** bezüglich des Erfolges einer Wischdesinfektion von Oberflächen einschl. Fußböden mit einem **standardisierten Tuchmaterial**.

Produkte, die mit einem beliebigen nicht spezifiziertem Tuchmaterial vom Anwender ausgebracht werden – entweder verdünnt (aus einem zu verdünnenden Konzentrat) oder als gebrauchsfertige Lösung (ready-to-use (RTU)) – müssen entsprechend 19a geprüft werden.

19b Prüfung der Wirksamkeit der Kombination von einem spezifizierten Wischtuch und einem Desinfektionsmittel

In dieser Prüfung liegt der Schwerpunkt auf der Evaluation der **Wirksamkeit einer Kombination des Desinfektionsmittels mit einem spezifizierten Tuchmaterial** bezüglich des Erfolges einer Wischdesinfektion von Oberflächen einschließlich Fußböden.

Produkte, die als Tuchtränkesystem eingesetzt werden – indem ein vom Hersteller des Produktes spezifiziertes trockenes Tuchmaterial vom Anwender mit der Produktlösung getränkt wird – müssen entsprechend 19b geprüft werden.

Produkte, die vom Hersteller des Produkts als ready-to-use Tuchsysteme fertig konfektioniert an den Anwender abgegeben werden, müssen ebenfalls entsprechend 19b geprüft werden. Bei diesen nach 19b geprüften Verfahren wird der zweite Prüfdurchgang am Ende der vorgesehenen Verwendungsdauer geprüft.

Bei Prüfung entsprechend 19b werden die folgenden zusätzlichen Angaben im Prüfbericht benötigt:

- A1 Zusammensetzung des Tuches (ggf. Beschichtung)
- A2 Größe des Tuches
- A3 Flächengewicht in g/cm³
- B Tränkevolumen pro Tuch
- C Verwendungsdauer, sofern diese über einen Arbeitstag hinaus deklariert werden soll.

19.1 Testorganismus und Ausgangskonzentrationen

<i>Clostridium difficile</i> R027	NCTC 13366 (DSM 27147)	1,5 – 5 × 10 ⁷ KBE/ml
-----------------------------------	------------------------	----------------------------------

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sowie der Prüfsuspensionen sind in ➔ Kapitel **18** beschrieben. Vor Verwendung der Prüfsuspension ist die Reinheit der Prüfsuspension mikroskopisch mittels Phasenkontrast zu kontrollieren und zu dokumentieren.

Die Anzahl der keimfähigen Sporen in der Prüfsuspension wird unter Verwendung einer geeigneten Methode auf 1,5 – 5,0 × 10⁷ pro ml eingestellt (➔ *Methode 18.1.5*).

Zur Simulation praxisnaher Bedingungen wird den Prüfsuspensionen maximal 2 h vor der Prüfung 0,03 % Albumin (➔ *Anhang A1.8* – geringe organische Belastung) bzw. 0,3 % Albumin und 0,3 % Schaferthozyten (➔ *Anhang A1.8* – hohe organische Belastung) zugesetzt.

19.2 Produktprüflösung

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in ➔ Kapitel **5** beschrieben.

19.3 Testzeiten

Als Testzeiten sind 1, 5, 15, 30, 60 und/oder 240 min auszuwählen.

19.4 Materialien

19.4.1 Testflächen

Als Testfläche dient PVC-Bodenbelag mit der Abmessung 20 × 50 cm, Dicke 2 mm (z. B. FOREX classic, weiss matt einseitig mit Folie, MatNr.: SFSFOXC020RWH1F, thyssenkrupp Plastics GmbH, Widdersdorfer Str. 158, 50825 Köln). Vorreinigung der folienfreien Fläche mit 70%igem n-Propanol ohne weitere Zusätze.

Auf der Testfläche werden vier Testfelder als Quadrate à 5 × 5 cm in einer Reihe im Abstand von 5 cm auf der Fläche mit der Bezeichnung 1–4 mit einem Bleistift oder Permanent-Marker markiert. Die Reihe soll in der Mitte der Testfläche verlaufen und das erste Feld einen Abstand von 10 cm zum Rand der Testfläche aufweisen (➔ *Abb. 19.1*).

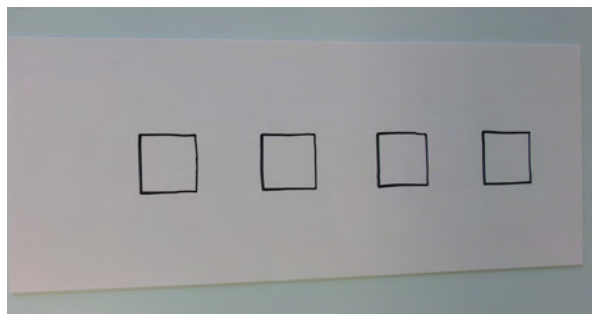


Abbildung 19.1: PVC-Freischäumplatte (FOREX classic).

Um eine einheitliche Vorreinigung zu gewährleisten, wird ein Standard-Wischtuch mit 16 ml 70%igem n-Propanol (v/v) getränkt und mit Hilfe des Einheitsgewichts einmal hin und zurück über die Testfläche gewischt.

Nach dem Trocknen werden vier Testfelder als Quadrate à 5 x 5 cm in einer Reihe im Abstand von 5 cm auf der Fläche mit einem Bleistift oder Permanent-Marker markiert (T₁ – T₄). Die Reihe soll in der Mitte der Testfläche verlaufen und das erste Feld einen Abstand von 10 cm zum Rand aufweisen (⇒ *Abb. 19.3*).

Alle Testflächen werden während des gesamten Versuches waagrecht gehalten. Die im Versuchsraum gemessenen Werte der rel. Feuchte und die Raumlufttemperatur (20 °C ± 1 °C) sind im Bericht anzugeben. Für die Trocknungskontrollen T₀ und T₁ werden auf schmälere Testflächen (Minimum 7 cm x 13 cm) zwei Testfelder als Quadrate à 5 x 5 cm markiert.

19.4.2 Materialien für den Wischvorgang

Standard-Wischtuch: Bei Prüfungen entsprechend 19a und für die WSH-Kontrolle (⇒ 19.10.2) wird ein Standard-Wischtuch mit den Abmessungen 16,5 cm x 30 cm und einer Zusammensetzung von 55% Zellstoff, 45% Polyethylenterephthalat (PET) verwendet (z.B. Tork Fusselarme Reinigungstücher, Art. Nr. 190491, Firma SCA Tork). Die Wischtücher werden nur einmal verwendet.

Spezifiziertes Wischtuch: Bei Tuchtränkesystemen oder ready-to-use Tuchsystemen (⇒ 19b) wird das spezifizierte Wischtuch in Kombination mit dem Desinfektionsmittel verwendet. Der Hersteller ist dafür verantwortlich, genau zu beschreiben, wie die Tücher verwendet werden sollen (z. B. Anzahl der Schichten). Die Wischtücher werden nur einmal verwendet.

Petrischalen: Die Vorbenetzung der Standard-Wischtücher mit 16 ml Produktprüflösung bzw. WSH erfolgt in einer Petrischale.

Einheitsgewicht: Granitblock (2,3 – 2,5 kg) mit den Abmessungen 12,1 cm x 8,6 cm x 8,6 cm (Länge x Breite x Höhe). Die Höhe kann in Abhängigkeit der Materialdichte variieren. Die Verwendung des Einheitsgewichtes standardisiert den Wischvorgang und simuliert einen mittleren Anpressdruck des Wischens in der Praxis.

Gummiband: Zum Fixieren des Wischtuchs am Einheitsblock (z.B. Gummiband Alco).

Parafilm (für die Einmalverwendung): Zum Schutz der unteren horizontalen und vertikalen Flächen des Einheitsgewichtes vor jeglichen Kontaminationen während des Wischvorgangs wird Parafilm verwendet. Dieser Parafilm muss nach jedem Wischvorgang erneuert werden (z. B. Parafilm® M (100 mm) Art.Nr. 7016 05, BRAND GMBH + CO KG, Postfach 11 55, D-97861 Wertheim).

Spatel aus Metall, Glas oder Kunststoff mit einer Kantenlänge von 3 cm zum Verteilen der Prüfsuspension bei der Kontamination der Testflächen.

Wattetupfer (steril zum Einmalgebrauch): Tupfer mit einem tränkbareren Teil aus reiner Baumwolle und frei von Substanzen, die eine Hemmung oder Förderung des Prüfproduktes bedingen oder die Testorganismen inaktivieren können.

19.5 Kontamination des Testfeldes 1

Für jede zu prüfende Produktprüflösung, Einwirkzeit und Belastungssubstanz wird eine Testfläche (➔ 19.4.1) vorbereitet.

0,1 ml Belastungssubstanz werden mit 0,9 ml Prüfsuspension vermischt. Auf das Testfeld 1 werden 0,05 ml dieses Gemisches (Inokulum) mit einer Pipette aufgebracht und mit einem Spatel auf dem gesamten Testfeld von 5×5 cm gleichmäßig verteilt. Die Testfläche wird bis zur optischen Trockenheit (max. 60 min) bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der zur Verteilung der Inokulums benutzte Spatel ist zuerst auf einer Blindprobe zu verwenden, um zu vermeiden, dass das Testfeld 1 mit einer zu geringen Inokulummenge kontaminiert wird.

19.6a Methodik zur Überprüfung einer Desinfektionsmittellösung im Wischverfahren

Nach Antrocknung des Inokulums erfolgt der Wischvorgang mit dem Standard-Wischtuch (➔ 19.4.2), welches 30 min ± 5 min zuvor mit 16 ml des Prüfproduktes benetzt wird. Der Wischvorgang mit dem einmal gefalteten Wischtuch erfolgt mit einem Einheitsgewicht (➔ Abb. 19.2). Das benetzte Wischtuch wird vor und nach dem Wischvorgang ausgewogen, um die abgegebene Prüfproduktmenge bestimmen zu können. Der Wischvorgang erfolgt von Testfeld 1 zu Testfeld 4 und wieder zurück zu Testfeld 1 (➔ Abb. 19.3).

Dabei gilt es zu beachten, dass das Einheitsgewicht die Wischstrecke 1 – 2 – 3 – 4 innerhalb einer Sekunde überfährt, wendet und innerhalb der nächsten Sekunde zum Ausgangspunkt zurückkehrt, sodass die gesamte Testfläche befeuchtet wird, aber trotzdem die Testfelder 1–4 zweimal komplett überfahren werden. Unmittelbar nach dem Ende des Wischvorganges wird die Stoppuhr gestartet und die Fläche über die entsprechende Einwirkzeit (t) bei Raumtemperatur gelagert.

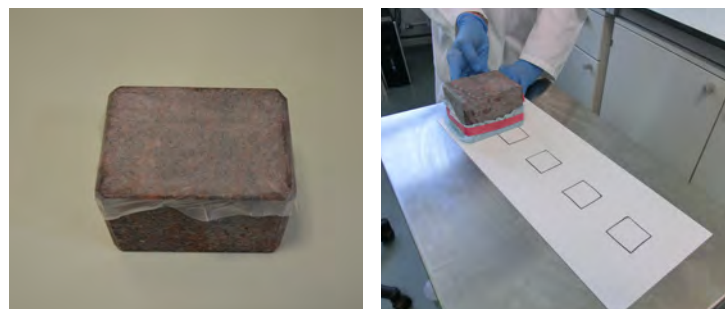


Abbildung 19.2: Das Einheitsgewicht wird mit Parafilm auf der Unterseite bespannt. Auf die mit Parafilm geschützte Fläche wird das einmal gefaltete Standard-Wischtuch gelegt und mit einem Gummiband fixiert. Die Hand schiebt das Gewicht – ohne zusätzlichen Druck auszuüben – über die Testfläche.

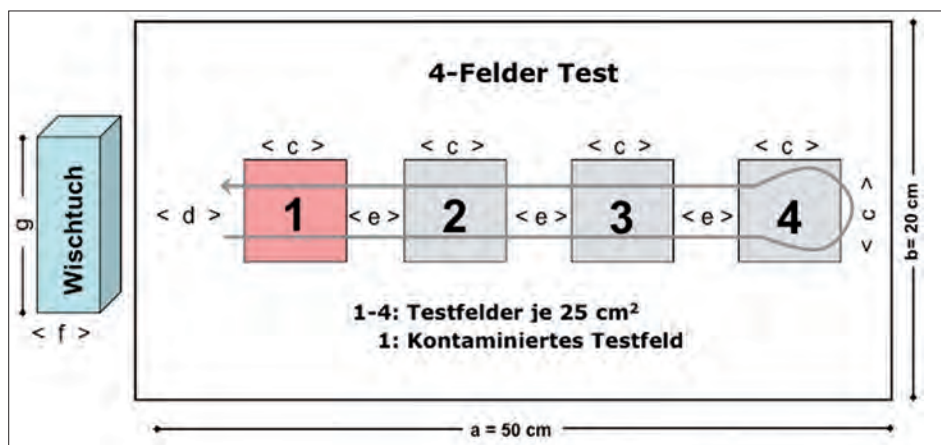


Abbildung 19.3: Schematische Darstellung des 4-Felder-Tests. Testfläche (20 x 50 cm) mit 4 Testfeldern (5 x 5 cm) und vorgegebener Wischstrecke des Wischtuches. $a = 50$ cm, $b = 20$ cm, $c = 5$ cm, $d = 10$ cm, $e = 5$ cm, Abmessung des Einheitsgewichtes $f \times g$ mind. 8,6 cm x 12,1 cm.

19.6b Methodik zur Überprüfung der Kombination Desinfektionsmittellösung mit spezifiziertem Wischtuch

Nach Antrocknung des Inokulums erfolgt der Wischvorgang mit dem Wischtuch des Herstellers. Bei Tuchtränkesystemen wird das spezifizierte Tuchmaterial 30 ± 5 min vor dem Wischvorgang mit der vom Hersteller vorgegebenen Menge des Prüfproduktes benetzt. Bei ready-to-use Tuchsystemen werden die fertig konfektionierten Tücher entsprechend Herstellerangaben direkt nach Anbruch der Verpackung verwendet. Der Hersteller muss angeben, wie die Tücher verwendet werden sollen (z.B. Anzahl der Schichten). Diese Angabe muss auch im Prüfbericht vermerkt werden. Der Wischvorgang erfolgt analog der \rightarrow Methode 19.6a.

Um die vorgesehene Verwendungsdauer nach Ansatz/ Anbruch für Tuchtränkesysteme/ ready-to-use Tuchsysteme zu prüfen, erfolgt der 2. Durchgang der Prüfung mit den Tüchern am Ende der ausgelobten Verwendungsdauer (\rightarrow 19A Anforderungen). Die WSH-Kontrolle 19.10.2 wird bei Prüfungen entsprechend 19.1.6b mit dem Standard-Wischtuch (\rightarrow 19.4.2) durchgeführt.

Die zu prüfenden Tücher müssen eine Mindestgröße von 9,5 cm x 13 cm aufweisen.

19.7 Rückgewinnung der Testorganismen von Testfeld 1–4

Der Nachweis rückgewinnbarer KBE von jedem der Testfelder 1–4 erfolgt mittels Wattetupferabstrich-Verfahren. Mit einem in Neutralisationsmittel (\rightarrow Anhang A1.7, validiert im Suspensionsversuch Methode 18) befeuchteten Wattetupfer wird das gesamte Testfeld 1 in horizontaler, vertikaler und diagonaler Richtung gewischt. Dieser Rückgewinnungsprozess wird mit demselben Wattetupfer nach Auswaschen in Neutralisationsmittel wiederholt. Die untere Hälfte des Wattetupfers wird anschließend durch Abbrechen am Rand

des Reagenzröhrchens in das Neutralisationsmittelröhrchen mit 5 ml Neutralisationsmittel überführt. Mit einem zweiten, trockenen Wattetupfer wird der Rückgewinnungsprozess auf demselben Testfeld einmalig wiederholt bis das Testfeld sichtbar trocken ist. Die untere Hälfte des Tupfers wird ebenfalls in das selbe Röhrchen mit Neutralisationsmittel überführt und durchmischt. Der Rückgewinnungsprozess pro Testfeld benötigt etwa 1 min. Pro Testfeld werden 2 eingesetzte Wattetupfer in 5 ml Neutralisationsmittel zusammengeführt. Die Rückgewinnung auf Testfeld 2 bis 4 erfolgt in gleicher Weise (→ *Schema D6*). Die Teile des Tupfers, die später in das Neutralisationsmittel überführt werden, dürfen nicht berührt werden.

Vor der weiteren Verarbeitung der Neutralisationsröhrchen mit Tupfern ist ein erneutes gründliches Durchmischen für ca. 1 min erforderlich, um eine optimale Resuspension verbliebener Testorganismen aus den Tupfern zu gewährleisten.

Nach $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ Neutralisationszeit werden zweimal 1 ml aus dem jeweiligen Prüfneutralisationsgemisch (Direktansatz) in BHIYT-L Agar eingegossen oder im Oberflächenverfahren auf vorreduzierte Platten ausgespatelt. Bei Testfeld 1 werden zusätzlich noch zweimal 1 ml aus der 10^{-1} Verdünnung in Neutralisationsmittel eingegossen oder im Oberflächenverfahren auf entsprechend viele vorreduzierte Platten ausgespatelt.

Die Validierung der Methode 19 erfolgte im Plattengussverfahren. Das Oberflächenverfahren ist ebenfalls ein anerkanntes Verfahren bei *Clostridium difficile*. Sofern das Oberflächenverfahren zur Anwendung kommt, müssen BHIYT-L Agarplatten über Nacht für mindestens 12 h bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ im Anaerobiertopf vorreduziert werden.

→ siehe Anhang **A1.7**

→ siehe Schema **D9**, Anhang D

→ zur Inkubation siehe **19.8**

→ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe **19.9**

19.8 Inkubation

Nach 5 d Inkubationszeit unter anaeroben Bedingungen bei $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ werden die Kolonien der keimfähigen Sporen ausgezählt.

19.9 Auswertung

Für Testfeld 1 werden vorrangig Nährböden (Platten) ausgezählt, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 14 und 330 liegt.

Für die Testfelder 2 bis 4 werden Nährböden ausgezählt, bei denen die Anzahl der KBE zwischen 1 und 330 liegt.

KBE_1 : Anzahl der KBE von 2 Platten á 1 ml auf Testfeld 1

KBE_2 : Anzahl der KBE von 2 Platten á 1 ml auf Testfeld 2

KBE_3 : Anzahl der KBE von 2 Platten á 1 ml auf Testfeld 3

KBE_4 : Anzahl der KBE von 2 Platten á 1 ml auf Testfeld 4

KBE_{T_1} : Anzahl der KBE pro 25 cm^2 (Testfeld 1) (entspricht $\text{KBE}_1 \times 5$)

KBE_{T_2} : Anzahl der KBE pro 25 cm^2 (Testfeld 2) (entspricht $\text{KBE}_2 \times 5$)

KBE_{T_3} : Anzahl der KBE pro 25 cm² (Testfeld 3) (entspricht $KBE_3 \times 5$)

KBE_{T_4} : Anzahl der KBE pro 25 cm² (Testfeld 4) (entspricht $KBE_4 \times 5$)

KBE_{T_0} : Anzahl der KBE pro ml auf Kontrollfeld $T_0 \times 5$ (⇒ 19.10.1)

KBE_{T_t} : Anzahl der KBE pro ml auf Kontrollfeld $T_t \times 5$ (⇒ 19.10.1)

R: Reduktion auf Testfeld 1

RC: Restkontamination auf Testfeld 1

AF: Akkumulation Testfeld 2–4

Die Reduktion (R) wird nach folgender Formel berechnet:

$$\lg R = \lg (KBE_{T_t}) - \lg (KBE_{T_1})$$

$$\lg RC = \lg (KBE_{T_1})$$

$$AF_{2-4} = [(KBE_{T_2} + KBE_{T_3} + KBE_{T_4}) / 3]$$

19.10 Validierung

19.10.1 Kontrolle der Rückgewinnung nach Trocknung (T_0 , T_t)

Zur Quantifizierung der Rückgewinnbarkeit ohne jeglichen chemischen oder mechanischen Einfluss (Trocknungskontrolle) werden parallel zur Kontamination des Testfelds 1 auf einer separaten Testfläche (mind. 7 × 13 cm) zwei Kontrolltestflächen á 5 × 5 cm (T_0 und T_t) analog zu Testfeld 1 (⇒ 19.5) kontaminiert.

Die Rückgewinnung von Testfeld T_0 erfolgt unmittelbar nach Antrocknung und vor dem Wischvorgang der kontaminierten Testflächen.

Die Rückgewinnung der Testorganismen von Testfeld T_t erfolgt nach der Einwirkzeit (T_t), um quantifizieren zu können, ob Testorganismen über die Einwirkzeit ohne Behandlung inaktiviert werden.

Die Rückgewinnung der Testorganismen von den Testfeldern (T_0 und T_t) erfolgt mittels Wattetupferabstrich-Verfahren (⇒ 19.7). Mit einem in Neutralisationsmittel befeuchteten Wattetupfer wird das gesamte Testfeld T_0 bzw. T_t in horizontaler, vertikaler und diagonaler Richtung gewischt. Dieser Rückgewinnungsprozess wird mit demselben Wattetupfer nach Auswaschen in Neutralisationsmittel wiederholt. Die untere, unberührte Hälfte des Wattetupfers wird anschließend in das Neutralisationsmittelröhrchen überführt. Mit einem zweiten, trockenen Wattetupfer wird der Rückgewinnungsprozess auf demselben Testfeld einmalig wiederholt. Der Rückgewinnungsprozess pro Testfeld benötigt etwa 1 min. Pro Testfeld werden 2 eingesetzte Wattetupfer in 5 ml Neutralisationsmittel zusammengeführt (⇒ *Schema D9*). Nach der Neutralisationszeit von 5 min ± 10 s

➔ zur Inkubation siehe 19.8

➔ zur Berechnung und

Darstellung der Ergebnisse

siehe 19.9

wird eine 10^{-3} - und 10^{-4} -Verdünnung in Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) angelegt und aus diesen zweimal 1 ml in BHIYT-L Agar eingegossen oder entsprechend im Oberflächenverfahren auf vorreduzierten Platten ausgespatelt.

Ermittelt werden die koloniebildenden Einheiten pro Testfeld (KBE/25 cm²).

19.10.2 WSH-Kontrolle (Ko1)

Zur Bestimmung der Anzahl der KBE pro 25 cm² ohne Einwirkung des Produktes (Ko1) werden pro Testzeit parallel kontaminierte Flächen anstelle der Produktprüflösung mit WSH + 0,1% Polysorbat 80 behandelt. Die Benetzung des Standard-Wischtuchs (➔ 19.4.2), das Wischverfahren und die Rückgewinnung der Testorganismen erfolgt analog zu 19.6a und 19.7.

Aus dem „Prüfneutralisationsgemisch“ werden zweimal 1 ml in BHIYT-L Agar direkt und eine 10^{-1} Verdünnung in Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) eingegossen oder im Oberflächenverfahren auf vorreduzierte Platten ausgespatelt.

➔ siehe Schema D9, Anhang D

➔ zur Inkubation siehe 19.8

➔ zur Berechnung und

Darstellung der Ergebnisse

siehe 19.9

Anmerkung: Bei der WSH-Kontrolle (Ko1) müssen auf den Testfeldern 2–4 im Mittel ≥ 10 KBE/25 cm² nachgewiesen werden.

19.10.3 Kontrolle der Neutralisation (Ko2)

Diese Kontrolle kann entfallen, wenn aus den quantitativen Suspensionsversuchen (➔ *Methode 18*) hierzu schon aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. Sofern solche Resultate nicht vorliegen, sollte diese Kontrolle einmal vor den eigentlichen Versuchen durchgeführt werden.

Es wird eine Kontrolle durchgeführt, die den Nachweis der erfolgreichen Neutralisation belegen soll, indem 0,1 ml der Produktprüflösung in 5 ml Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) überführt werden. Nach 5 min \pm 10 s Neutralisationszeit (Präparate mit Einwirkzeiten von ≤ 10 min nach 10 s \pm 1 s) wird 0,05 ml der 10^{-2} -Verdünnung der KBE-Bestimmungsreihe (Validierungssuspension) zugesetzt. Nach der längsten Einwirkzeit wird aus einer 10^{-1} -Verdünnung und 10^{-2} Verdünnung in Neutralisationsmittel (➔ *Anhang A1.7*) je 1 ml in BHIYT-L Agar eingegossen oder entsprechend im Oberflächenverfahren auf vorreduzierten Platten ausgespatelt.

➔ zur Inkubation siehe 19.8

➔ zur Berechnung und

Darstellung der Ergebnisse

siehe 19.9

Anmerkung: Zeigt sich im Test eine unzureichende Neutralisation (weniger als $1,5 \times 10^3$ KBE/ml [= 50% der Validierungssuspension in der Ko3]), muss ein anderes Neutralisationsmittel ausgewählt werden.

19.10.4 Kontrolle der Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels (Ko3)

Diese Kontrolle kann entfallen, wenn aus den quantitativen Suspensionsversuchen (➔ *Methode 18*) hierzu schon aussagekräftige Ergebnisse vorliegen. Sofern solche Resultate nicht vorliegen, sollte diese Kontrolle einmal vor den eigentlichen Versuchen durchgeführt werden.

Diese Kontrolle wird durchgeführt, indem 0,05 ml einer 10⁻²-Verdünnung der KBE-Bestimmungsreihe (Validierungssuspension) in 5 ml Neutralisationsmittel (→ *Anhang I.7*) überführt wird. Nach 30 min wird aus einer 10⁻¹-Verdünnung und 10⁻² Verdünnung in Neutralisationsmittel (→ *Anhang A1.7*) je 1 ml in BHIYT-L Agar eingegossen oder entsprechend im Oberflächenverfahren auf vorreduzierten Platten ausgespatelt.

Anmerkung: Zeigt sich im Test ein toxischer Effekt (weniger als 1,5 x 10³ KBE/ml [= 50% der Validierungssuspension in der Ko3]), muss ein anderes Neutralisationsmittel verwendet werden.

→ zur Inkubation siehe 19.8
→ zur Berechnung und Darstellung der Ergebnisse siehe 19.9

19A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Flächendesinfektion mit Mechanik – praxisnaher 4-Felder-Test gegenüber *Clostridium-difficile*-Sporen

Für die Beurteilung eines Flächendesinfektionsmittels werden folgende obligate Prüfungen zugrunde gelegt:

Obligat

- Bestimmung der sporiziden Wirksamkeit gegenüber *Clostridium difficile* im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 18 bzw. prEN 17126); Prüfbedingungen → Tabelle 19.1
- Prüfung der sporiziden Wirksamkeit gegenüber *Clostridium difficile* im praxisnahen 4-Felder-Test mit mechanischer Einwirkung (Methode 19.1); Prüfbedingungen → Tabelle 19.1 und 19.2

Das zu prüfende Produkt muss die Anforderungen aus → **Tabelle 19.3** für Sporen von *Clostridium difficile* R027 unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit bei 20°C ± 1°C erfüllen.

Tabelle 19.1: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 18) und unter praxisnahen Bedingungen (Methode 19).

Anwendungsverfahren	Testorganismen	Belastung	Prüfkonzentrationen ¹	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten (min) ²
Flächendesinfektion	<i>C.-difficile</i> -Sporen (NCTC 13366)	gering und/oder hoch	Anwendungskonzentration	20 ± 1	1 ³ , 5, 15, 30, 60, 240

¹ Neben den erforderlichen Verdünnungen zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit (→ Kapitel 5). Die im Test eingesetzten Konzentrationen sollen in Abstufungen eingesetzt werden, die den Faktor 10 nicht überschreiten. Im praxisnahen Versuch muss nur die Anwendungskonzentration getestet werden.

² Es müssen mindestens 3 Einwirkzeiten im quantitativen Suspensionsversuch und mindestens 2 Einwirkzeiten im praxisnahen Versuch getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen. Bei der Prüfung ist auch die Einwirkzeit zu berücksichtigen, die direkt unter der kürzesten beantragten Einwirkzeit liegt. Das gilt auch, wenn methodisch nach EN geprüft wird.

³ Falls 5 min als beantragte Einwirkzeit vorgesehen ist, muss 1 min ebenfalls getestet werden.

Tabelle 19.2: In den einzelnen Durchgängen zu wählende Einwirkzeiten für die praxisnahen Prüfungen von Flächendesinfektionsmitteln (Methode 19).

Beantragte Einwirkzeit	1. Durchgang	2. Durchgang
Flächendesinfektion mit Mechanik (Methode 19)		
5 min	1 min, 5 min	5 min
15 min	5 min, 15 min	15 min
30 min	15 min, 30 min	30 min
60 min	30 min, 60 min	60 min
240 min	60 min, 240 min	240 min

Tabelle 19.3: Anforderungen im quantitativen Suspensionsversuch (Methode 18) und unter praxisnahen Bedingungen (Methode 19).

Wirkungsbereich	Sporizide Wirksamkeit gegenüber <i>Clostridium difficile</i>	
Anforderungen	Quantitativer Suspensionsversuch (Methode 18/ prEN 17126)	Flächendesinfektion mit Mechanik (Methode 19)
Reduktion	4 lg-Stufen	Testfeld 1: 4 lg-Stufen
Restkontamination		Testfeld 2–4: im Mittel ≤ 50 KBE/25 cm ² Testfeld 2–4 (WSH-Kontrolle): im Mittel ≥ 10 KBE/25 cm ²
Belastung	gering und/oder hoch	
Testorganismen	<i>Clostridium-difficile</i> -Sporen (NCTC 13366)	

Die praxisnahen Prüfungen haben jeweils in 3 Durchgängen zu erfolgen:

Prüfungen entsprechend 19a (mit standardisiertem Tuchmaterial)

A Durchführung der Kontrollen (Ko2, Ko3)

B 1. *Durchgang*: 1 Testfläche pro Konzentration-Zeit-Relation und pro WSH-Kontrolle (Ko1);

C 2. *Durchgang*: je 2 Testflächen pro beantragter Konzentration-Zeit-Relation und 1 Testfläche pro WSH-Kontrolle (Ko1).

Prüfungen entsprechend 19b (mit spezifiziertem Wischtuch)

A Durchführung der Kontrollen (Ko2, Ko3)

B 1. *Durchgang* – unmittelbar nach Ansatz/Anbruch: 1 Testfläche pro Konzentration-Zeit-Relation und pro WSH-Kontrolle (Ko1);

C 2. *Durchgang* – unmittelbar nach Ansatz / Anbruch bzw. nach ausgelobter Verwendungsdauer: je 2 Testflächen pro beantragter Konzentration-Zeit-Relation und 1 Testfläche pro WSH-Kontrolle (Ko1).

Literatur

1. prEN 17126 (Entwurf). Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der sporiziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1). Beuth-Verlag 2017.

ANHANG A



A 1 Kulturmedien und Reagenzien

Vor Versuchsbeginn sind alle Reaktionslösungen (z.B. Wasser, Produktprüflösung, Prüfsuspensionen, Neutralisationsmittel etc.) auf die Prüftemperatur (chemothermische Wäshedeseinfektion: Verfahrenstemperatur) einzustellen und stichprobenartig auf die Stabilität der Prüftemperatur zu prüfen.

Für die Durchführung dieses Prüfverfahrens sollten alle Reagenzien analysenrein und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Zudem wird empfohlen, kommerziell erhältliche und wasserfreie standardisierte Trockenmaterialien zu verwenden und sich strengstens an die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung zu halten.

A 1.1 Wasser

Das Wasser sollte frisch destilliert/demineralisiert und frei von Substanzen sein, die hemmend oder toxisch auf die Testorganismen wirken könnten. Es wird bei 121 °C während 15 min dampfsterilisiert (Dies ist nicht notwendig, wenn das Wasser durch die Sterilisation der zubereiteten Reagenzien mit sterilisiert wird!). Sollte Wasser solcher Qualität nicht zur Verfügung stehen, darf Wasser für Injektionszwecke (s. Europäische Pharmakopöe) verwendet werden.

A 1.2 WSH (Wasser standardisierter Härte)

Lösung A

- 19,84 g MgCl_2 (wasserfrei)
- 46,24 g CaCl_2 (wasserfrei)
- In Wasser (*Anhang A1.1*) lösen und auf 1000 ml auffüllen
- 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren

Lösung A ist, in kleinen Portionen und bei 2 bis 8 °C gelagert, 1 Monat haltbar.

Lösung B

- 35,02 g NaHCO_3
- In Wasser (*Anhang A1.1*) lösen und auf 1000 ml auffüllen
- sterilfiltrieren (Porengröße 0,22 μm).

Lösung B ist, bei 2 bis 8 °C gelagert, nicht länger als 7 Tage haltbar.

In einen sterilen 1000-ml-Kolben mindestens 600 ml steriles gereinigtes Wasser zu 6 ml der Lösung A geben, 8 ml der Lösung B zugeben, mit sterilem gereinigtem Wasser auf 1000 ml auffüllen.

Die Endhärte muss 375 ppm, berechnet auf CaCO_3 , betragen; der pH-Wert $7,0 \pm 0,2$ bei 20 °C. Evtl. mit 1 N NaOH oder 1 N HCl nachjustieren.

WSH ist frisch herzustellen und, bei 2 bis 8 °C gelagert, nicht länger als 12 h zu verwenden.

A 1.3 Verdünnungsmittel

A 1.3.1 Trypton-NaCl

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	1 g
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = $7,0 \pm 0,2$ bei 20 °C

A 1.3.2 M/15 Phosphatpuffer

Kaliumdihydrogenphosphat (9,07 g/l)	390 ml
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (11,87 g/l)	610 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = $7,0 \pm 0,2$ bei 20 °C

A 1.3.3 0,1 M Phosphatpuffer

Kaliumdihydrogenphosphat (13,61 g/l)	390 ml
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (17,79 g/l)	610 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = $7,0 \pm 0,2$ bei 20 °C

A 1.3.4 Phosphatpuffer 0,25 mol/l

Kaliumdihydrogenphosphat	34 g
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = $7,2 \pm 0,2$ bei 20 °C

A 1.3.5 Natriumphosphatpuffer 0,1 M

Dinatriumhydrogenphosphat	8,19 g
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	5,84 g
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = 7,0 ± 0,2 bei 20 °C

A 1.3.6 Enzympuffer

- 800 Einheiten Lysozym und 250 Einheiten Trypsin je mg Nassgewicht in 25 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (A1.3.5) lösen (pH 7,0 ± 0,2) und sterilfiltrieren.

A 1.4 Nährmedien

A 1.4.1 7H10 Agar

Middlebrook 7H10 Agar	19 g + 10% OADC-Anreicherung
Glycerol	5 ml
Wasser (Anhang A1.1)	ad 900 ml

- Lösen, 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren und auf 50 °C bis 55 °C abkühlen lassen. 100 ml OADC-Anreicherung vortemperieren und unter sterilen Bedingungen hinzufügen und mischen.
- pH = 6,6 ± 0,2 bei 20 °C

A 1.4.2 7H9 Bouillon

Middlebrook 7H9	4,7 g + 10% OADC-Anreicherung
Glycerol	2 ml
Wasser (Anhang A1.1)	ad 900 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = 6,6 ± 0,2 bei 20 °C

A 1.4.3 Casein-Sojamehlpepton Agar (CSA)

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	15 g
Sojapepton, Papain-Auflösung aus Sojabohnenmehl	5 g
Natriumchlorid (NaCl)	5 g
Agar	15 g
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = 7,2 ± 0,2 bei 20 °C

A 1.4.4 Casein-Sojamehlpepton Agar (CSA) + Desoxycholat

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	15 g/30 g für Methode 7 und 8
Sojapepton, Papain-Auflösung aus Sojabohnenmehl	5 g/10 g für Methode 7 und 8
Natriumchlorid (NaCl)	5 g/10 g für Methode 7 und 8
Desoxycholat	0,5 g
Agar	15 g
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = 7,2 ± 0,2 bei 20 °C

A 1.4.5 Casein-Sojamehlpepton Bouillon (CSB) (CASO-Bouillon)

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	15 g /30 g für Methode 7 und 8
Sojapepton, Papain-Auflösung aus Sojabohnenmehl	5 g /10 g für Methode 7 und 8
Natriumchlorid (NaCl)	5 g /10 g für Methode 7 und 8
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = 7,2 ± 0,2 bei 20 °C

A 1.4.6 Malz-Extrakt Agar (MEA)

Malzextrakt	30 g
Sojapepton	3 g
Agar	15 g
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = 5,6 ± 0,2 bei 25 °C

A 1.4.7 Malz-Extrakt Agar für *A. brasiliensis* (MEA B)

Malzextrakt	30 g
Agar	15 g
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- Nach dem Autoklavieren sollte der pH-Wert 5,6 ± 0,2 betragen.

Malzextrakt sollte Lebensmittelqualität oder eine vergleichbare Qualität aufweisen (Cristomalt Puder von Difal oder Malzextrakt von Oxoid wird empfohlen). Das Malzextrakt sollte nicht hoch aufgereinigt sein und nicht nur auf Maltose basieren.

A 1.4.8 Malz-Extrakt Bouillon (MEB)

Malzextrakt (technische Reinheit)	20 g/40 g für Methode 7 und 8
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = 5,6 ± 0,2 bei 20 °C

A 1.4.9 Sabouraud-Glucose Agar (SGA)

Mykologisches Pepton	10 g
Glucose	40 g
Agar	15 g
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = 5,6 ± 0,2 bei 20 °C

A 1.4.10 Sabouraud-Glucose Bouillon (SGB)

Mykologisches Pepton	10 g
Glucose	40 g
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH = 5,6 ± 0,2 bei 20 °C

A 1.4.11 Schutzlösung

Die für die jeweiligen Testorganismen verwendeten Anreicherungsmedien als Nährlösung herstellen und vor dem Dampfsterilisieren 150 g Glycerol je Liter zugeben.

Fleischextrakt	3 g
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut	5 g
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	150 g
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- Lösen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- Nach dem Autoklavieren soll der pH-Wert $6,9 \pm 0,2$ betragen.

A 1.4.12 Brain-Heart-Infusion-Yeast-Extract mit Taurocholat (BHIYT-L) Agar

Hirn-Herz-Boullion	37 g
Hefeextrakt	5 g
L-Cystein	1 g
Taurocholsäure Natriumsalz Hydrat	1 g
Agar	15 g
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

- 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH nach Dampfsterilisation = $7,0 \pm 2$.
- Medium auf $48 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ abkühlen lassen.
- 200.000 Einheiten Lysozym in 10 ml Wasser lösen und die Enzymlösung über einen Sterilfilter direkt in das Medium geben.

A 1.4.13 Brain-Heart-Infusion (BHI); Hirnherzbouillon (BHI)

Kalb-Hirnextrakt	12,5 g
Rind-Hirnextrakt	5 g
Protease-Pepton	10 g
Glucose	2 g
Natriumchlorid (NaCl)	5 g
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	2,5 g
Wasser (Anhang 1.1)	ad 1000 ml

- 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH nach Dampfsterilisation = $7,4 \pm 0,2$.

A 1.4.14 Columbia Broth

Casein, pankreatisch verdaut	10 g
Hefeextrakt	5 g
Proteose Pepton Nr. 3	5 g
Rinderherz, tryptisch verdaut	3 g
L-Cystein HCL	0,1 g
Dextrose	2,5 g
Natriumchlorid	5 g
Magnesiumsulfat (wasserfrei)	0,1 g
Eisensulfat	0,02 g
Natriumcarbonat	0,6 g
3-(Hydroxymethyl)Aminomethan	0,83 g
3-(Hydroxymethyl)Aminomethan HCL	2,86 g
Wasser (A 1.1)	ad 1000 ml

- 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.
- pH nach Dampfsterilisation = 7,5 ± 0,2

A 1.4.15 Sporulationsmedium

Das Sporulationsmedium (1 l) wird in einem 2 l Erlenmeyerkolben angesetzt. Die Inhaltsstoffe müssen in angegebener Reihenfolge zugeführt werden.

Wasser (Anhang A1.1)	700 ml
Special Peptone*	10 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	2,6 g
Ammoniumsulfid (NH ₄) ₂ SO ₄	0,6 g
Calciumchlorid (Monohydrat) (CaCl ₂ x H ₂ O)	0,08 g
Hefeextrakt	10 g
Kaliumcarbonat (K ₂ CO ₃)	3,48 g
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	0,12 g
Wasser (Anhang A1.1)	ad 1000 ml

*Special Peptone: Special Peptone enthält eine spezielle Mischung von Peptonen (Total Nitrogen 11,7 g, Amino Nitrogen 3,8 g und Natriumchlorid 3,5 g) und ist kommerziell (z. B. Firma Oxoid) erhältlich.

- pH vor der Dampfsterilisation = $7,9 \pm 0,2$
- Falls notwendig, den pH-Wert mit KOH anpassen.
- 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren.

A 1.5 Spülflüssigkeiten

Als Spülflüssigkeiten können alle Flüssigkeiten genommen werden, die steril, mit den Filtermembranen verträglich und filtrierbar sind, z. B.

- WSH (*Anhang A1.2*)
- Wasser (*Anhang A1.1*)
- Verdünnungsmittel (*Anhang A 1.3*)
- Polysorbat 80 (0,1 Vol.-% in wässriger Lösung)
- Polysorbat 80 (0,5 Vol.-% in wässriger Lösung)
- Polysorbat 80 (0,5 Vol.-% in wässriger Lösung) + 0,7 g/l Lecithin
- Neutralisationsmittel (*Anhang A1.7*)
- Pufferlösungen (*Anhang A 1.3.2 und A 1.3.3*)

A 1.6 Seifen

A 1.6.1 *Sapo kalinus (ohne Konservierungsstoffe gemäß Rezeptur)*

Kaliseife (200 g/l) – (kann bei falscher Herstellung zu aggressivem Produkt führen)

Leinöl	50 Teile (Gewichtsanteile)
Kaliumhydroxid	8,5 Teile
Ethanol	7 Teile
Wasser (<i>Anhang A 1.1</i>)	nach Bedarf

In 15 Teilen Wasser (*Anhang A1.1*) unter Rühren das Leinöl und die Kaliumhydroxidlösung hinzugeben und auf ca. 70 °C erwärmen.

Ethanol unter Rühren und Erwärmen hinzugeben, bis die Verseifung beendet ist und sich eine Probe in Wasser klar und in Alkohol fast klar löst. Durch Zugabe von heißem Wasser (*Anhang A1.1*) wird das Gewicht der Kaliseife auf 100 Teile gebracht.

200 g Kaliseife werden dann in 1000 ml Wasser (*Anhang A1.1*) dampfsterilisiert.

A 1.6.2 *Reinigungslösung*

(z. B. „Decon® 90 Konzentrat“, Zinsser Analytik, 5%ig verwenden)

A 1.7 Neutralisationsmittel

Für jedes Produkt sollte das geeignete Neutralisationsmittel, welches steril sein muss, ausgewählt werden. Im Folgenden sind einige Kombinationen beispielhaft angegeben:

- 1) Polysorbat 80 30 g/l, Lecithin 3 g/l, L-Cystein 1 g/l, Verdünnungsmittel (*Anhang A 1.3.1*) ad 1000 ml
- 2) Polysorbat 80 30 g/l, Saponin 30 g/l, L-Histidin 1 g/l, Cystein, 1 g/l, Verdünnungsmittel (*Anhang A 1.3.1*) ad 1000 ml
- 3) Polysorbat 80 30 g/l, Lecithin 3 g/l, L-Histidin 1 g/l, Natriumthiosulfat 5 g/l, Verdünnungsmittel (*Anhang A 1.3.1*) ad 1000 ml
- 4) Polysorbat 80 30 g/l, Lecithin 0,3 g/l, L-Histidin 0,1 g/l, Verdünnungsmittel (*Anhang A 1.3.1*) ad 1000 ml
- 5) Polysorbat 80 30 g/l, Lecithin 3 g/l, L-Cystein 1 g/l, Natriumthiosulfat 5 g/l, CSL 30 g/l, Verdünnungsmittel (*Anhang A 1.3.1*) ad 1000 ml
- 6) β -Cyclodextrin 11,35 g/l (10 mM), Verdünnungsmittel (*Anhang A 1.3.1*) ad 1000 ml
- 7) Polysorbat 80 10 g/l, Saponin 30 g/l, Lecithin 3 g/l, M/15 Phosphatpuffer (*Anhang A 1.3.2*) ad 1000 ml (für *M. terrae* – phenolische Desinfektionsmittel)
- 8) Polysorbat 80 10 g/l, Saponin 30 g/l, Natriumthiosulfat 5 g/l, L-Histidin 1 g/l, M/15 Phosphatpuffer (*Anhang A 1.3.2*) ad 1000 ml (für *M. terrae* – nichtphenolische Desinfektionsmittel)
- 9) Phosphatpuffer 0,25 mol/l: (KH_2PO_4) 34 g, Wasser (*Anhang A 1.1*) ad 1000 ml
Herstellung des Phosphatpuffers siehe \rightarrow *Anhang A 1.3.4*
- 10) Natriumsulfatlösung (für Wäscheverfahren): 0,1 M Phosphatpuffer (*Anhang A 1.3.3*) mit 10 mM β -Cyclodextrin (11,35 g/l) versetzen und 15 min bei 121 °C dampfsterilisieren. Am Versuchstag 5 g/l Na_2SO_3 zufügen, 30 s aufkochen und nach dem Abkühlen innerhalb 1 h für den Versuch verwenden (neutralisierende Wirkung lässt nach).

Die Kombinationen 1–3 sollten auf jeden Fall getestet werden. Sofern die Neutralisation in Nährbouillon erfolgen soll, sind vor der Zugabe von Wasser (*Anhang A 1.1*) (anstelle von Verdünnungsmittel) 30 g/l CSB zuzugeben. Für Mykobakterien ist grundsätzlich auch die Verwendung der Neutralisationsmittel 1–6 möglich – dann muss aber anstelle des Verdünnungsmittels (*Anhang A 1.3.1*) M/15 Phosphatpuffer (*Anhang A 1.3.2*) verwendet werden.

Für die sporizide Prüfung müssen die Neutralisationsmittel 1–8 in 0,25 M Phosphatpuffer (*Anhang A 1.3.4*) – anstatt in Verdünnungsmittel oder M/15 Phosphatpuffer – angesetzt und verwendet werden.

Alle Neutralisationsmittel werden bei 20 °C auf pH $7 \pm 0,2$ eingestellt und 15 min bei 121 °C dampfsterilisiert.

A 1.8 Belastungen

a) geringe organische Belastung

0,3 g Rinderserum-Albumin (Fraktion V) in 100 ml Verdünnungsmittel (*Anhang A1.3*) lösen und sterilfiltrieren (Konzentration 0,3 % Albumin).

b) hohe organische Belastung

3,0 g Rinderserum-Albumin (Fraktion V) in 97 ml Verdünnungsmittel (*Anhang A1.3*) lösen und sterilfiltrieren (Konzentration: 3 % Albumin).

Anmerkung: Aufgrund des Verlustes durch die Sterilfiltration kann es sinnvoll sein, mehr als 100 ml herzustellen. Davon werden dann 97 ml für die Mischung mit der Schaferythrozytenlösung (s.u.) verwendet.

Anschließend 3 ml einer Schaferythrozytenlösung (Bereitstellung s.u.) zugeben (Konzentration: 3 % Schaferythrozyten).

Bereitstellung der Schaferythrozyten: 8 ml frisches defibriertes Schafblut (z.B. Oxoid SR 0051 C) bei 800 g für 10 min zentrifugieren. Überstand dekantieren und Pellet in gleichem Volumen Verdünnungsmittel (*Anhang A1.3*) aufnehmen. Den Vorgang dreimal wiederholen bis der Überstand farblos erscheint. Die so gewaschenen Schaferythrozyten für die Herstellung der Belastungsansätze verwenden.

Es können auch kommerziell erhältliche Schaferythrozytenlösungen (z.B. ELOCIN-LAB, Best.-Nr. 301500-50) verwendet werden

c) Defibriertes Schafblut (z. B. Oxoid SR 0051 C)

A 2 Prüfkörper

A 2.1 (Kapitel 14.1)

- Metallplättchen: rund, Ø 20 mm, aus nichtrostendem Stahl 1.4301 (nach EN 10088-1), Oberflächengüte auf beiden Seiten Qualität 2 B nach EN 10088-2. Oberfläche plan mit Dicke von 1,2 – 1,5 mm. Benutzung nur einmalig (z. B. GK Formblech GmbH, Berlin, Sanitärstr. 133, 12277 Berlin, Tel. 030 7200 320; Art.Nr. 10000-3021, Scheibe D=20 aus Blech 1.4301-1,2 mm, gleitgeschliffen).

A 2.2 (Kapitel 14.2)

- Testflächen:
PVC-Bodenbelag mit PUR (Polyurethan) Coating, Abmessung 20 × 50 cm, Dicke 2 mm (z.B. Mipolam Troplan PUR Evercare™, Artikel-Nr. 85931006, Gerflor Mipolam GmbH, Mülheimer Straße 27, 53840 Troisdorf)
oder:
• PVC-Freischaumplatte mit der Abmessung 20 × 50 cm, Dicke 2 mm (z.B. FOREX classic, weiß matt einseitig mit Folie, MatNr.: SFSFOXC020RWH1F, thyssenkrupp Plastics GmbH, Widdersdorfer Str. 158, 50825 Köln).
- Beide Testflächen sind ab sofort auch über die VAH-Geschäftsstelle zu beziehen.

A 2.3 (Kapitel 14.2)

- Wischtuch: mit der Abmessung 16,5 cm x 30 cm.
Zusammensetzung: 55 % Zellstoff, 45 % Polyethylenterephthalat (PET); Benutzung nur einmalig (Beispiel für Hersteller: Tork Reinigungstuch fusselarm (Art. Nr. 190491), Fa. SCA Tork).

A 2.4 (Kapitel 15)

- Mattglasstreifen: 15 × 60 × 1 mm, eine Seite matt (fein gesandstrahlt), (z. B. ZELL Quarzglas und Technische Keramik Technologie GmbH, Art. Nr. 100000088), Spezifikation: Mattscheiben aus AF 45, Format 60 × 15 × 0,2 mm, Dicke 1,1 – 0,15 mm, S1+2 plan, Keil ± 0,05 mm parallel, Schnittkante, Prüfbereich mittig 85 % der Fläche, S1: poliert blank, S2 geschliffen matt (III)).

A 2.5 (Kapitel 16 und 17)

- Standardbaumwollgewebe: entsprechend DIN 53919; Benutzung nur einmalig.

A 2.6 (Anhang P1)

- Flache Holzstäbchen (aus Buchenholzfurnier (5 × 20 × 2 mm) (z. B. Holz Jung GmbH & Co.KG); Benutzung nur einmalig.

A 3 Mikrobiologische Laborausrüstung

Alle Geräte, Geräteteile und Glasgeräte, die mit Reagenzien, Kulturmedien oder Proben in Berührung kommen, müssen entweder:

- mindestens 15 min bei $121\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ dampfsterilisiert

oder

- bei 180 °C für mindestens 30 min bzw. bei 170 °C für mindestens 1 h bzw. bei 160 °C für mindestens 2 h im Heißluft-Sterilisator sterilisiert werden können.

Die vorhandenen Geräte sollten auf diese Parameter einstellbar sein.

- Dampfsterilisator, einstellbar auf $121\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ (s. o.)
- Heißluft-Sterilisator, einstellbar auf 160 °C bis 180 °C (s. o.)
- Brutschrank, einstellbar auf $20 \pm 1\text{ °C}$ bzw. $30 \pm 1\text{ °C}$ bzw. $36 \pm 1\text{ °C}$
- Wasserbad, einstellbar auf $20 \pm 1\text{ °C}$ bzw. Anwendungstemperatur $\pm 1\text{ °C}$
- pH-Meter, bei 25 °C kalibriert auf $\pm 0,1$ pH-Einheiten
- Stoppuhr (kalibriert)
- Kalibrierte Messpipetten in den Nennvolumina 10 ml, 1 ml und 0,1 ml oder kalibrierte, automatische Pipetten
- Petrischalen, Durchmesser: 90–100 mm
- Gefäße, Reagenzgläser oder Kolben mit geeignetem Volumen
- Flaschen, Volumen 1000 ml
- Messkolben, kalibriert bei 20 °C
- Glasperlen, Durchmesser: 0,25–0,5 mm und 3–4 mm
- Schraubdeckelröhrchen, Volumen 15 ml
- Kühlschrank, Betriebstemperatur: zwischen 2 °C und 8 °C
- Gefriergeräte
 - Tiefkühlgeräte, Betriebstemperatur: $\leq -70\text{ °C}$
 - Kryostaten (Dewar-Flasche) mit flüssigem Stickstoff
- elektronisches Schüttelgerät, z. B. Vortex®-Mischer oder Orbitalschüttelgerät (400 Umdrehungen/min)
- Membranfiltrationsanlage, Durchmesser der Filter 47 und 50 mm, Porengröße $0,22\text{ }\mu\text{m}$, Mindest-Nutzvolumen 50 ml
- Rührstäbe aus Glas
- Spatel (Glas oder Metall)
- Glaswolle
- Glasfilterfritte
- Pinzetten
- Draht (Impföse)
- Kryoröhrchen

- Wischtuch: 55 % Zellstoff , 45 % Polyethylenterephthalat (PET), z.B. Tork Reinigungstuch fussealarm (Art. 190491), Hersteller: SCA Tork
- Einheitsgewicht: Granitblock 2,5 kg (erhältlich beim VAH)
- Filterpapier: 58 x 58 cm, glatt, z.B. Bogen-Filterpapier (Art. E-1422), NeoLab
- Zentrifuge, die auf eine Temperatur zwischen 2° – 8°C eingestellt werden kann und mindestens 4.000 gN ermöglicht.
- Ultraschallbad, ~ 40Khz wird zum Aufbrechen von Sporen-Cluster empfohlen
- Anaerobierbehälter mit entsprechendem anaeroben Generierungskit

Anforderungen an die Waschmaschine

Beispielhafte Spezifikationen zur Bestellung einer Maschine:

- Frontlader-Maschine mit horizontaler Achse
- Inneres Trommelvolumen: > 61 l
- Durchmesser der inneren Trommel: > 52 cm
- Tiefe der inneren Trommel: > 31 cm
- Perforierung: 2,5 bis 5 mm, perforierte Trommeloberfläche mind. 600 cm²
- Verhältnis des Trommeldurchmessers zur Tiefe der Trommel: 1,6 + 15 %
- Mitnehmer: 3 mit einer Höhe von 10% bis 12% des Trommeldurchmessers; Breite an der Basis ~ 65 mm, Abstand in der Trommel: 120°
- Elektrische Heizung (Empfehlung: ~ KW 5,4)
- Definierbares Flottenverhältnis (ggf. über separaten Wasserzähler)
- Reversierungsrhythmus: Normal ON Normal OFF, programmierbar 0 bis 250 s, Schrittgröße 1 s (z.B. 12 s Rotation in die eine Richtung, Stopp für 3 s, dann Reversierung)
- Rotationszeitanteil im Hauptwaschgang von der Gesamtwaschzeit: 75 ± 5 %
- Kaltwasserzulauf mit einem Druck von 240 kPa 20 ± 2 l/min
- Füllstandskontrolle ≤ 3 mm, ± 1 l
- Abflusssystem: Abflussventil > 30 l/min

Anforderungen an das ergänzende Equipment und den Waschprozess:

- a) Aufheizzeit um 60 °C zu erreichen < 10 min (60°C Programm)
- b) Thermostat-gesteuerte Temperatur in 1 °C-Schritten von 30 °C bis 90 °C,
- c) Anschalttemperatur ≤ 4 °C unter der Ausschalttemperatur,
Genauigkeit beim Ausschalten ± 1 °C
- d) Timer in Minutenschritten frei programmierbar
- e) Definierbares Flottenverhältnis (ggf. über separaten Wasserzähler)

f) Waschmitteldosierung:

Die Möglichkeit der separaten Zugabe von Wasch- und Desinfektionsmittel muss gegeben sein sowie die Möglichkeit zur Dosierung von Pulver- und Flüssigwaschmitteln. Das Programm muss jederzeit unterbrochen werden können, um bspw. Proben entnehmen zu können.

g) Temperatur:

Das Temperaturprofil des Verfahrens sollte z. B. mit einem Temperaturlogger aufgezeichnet werden, so dass exakte Aussagen zur Höhe der Temperatur und der Haltezeit möglich sind.

h) Wasserversorgung:

Der Wasserzulauf soll mit einer Genauigkeit von 0,5 l oder 0,5 kg kontrolliert werden können (z. B. unter Verwendung einer Wasseruhr oder durch Wägung). Die Temperatur des einlaufenden Wassers muss zwischen 12 und 20 °C liegen.

A 4 Beispiel für eine Titration PES und Wasserstoffperoxid

Peressigsäuren sind Gleichgewichtssysteme aus den Komponenten Peressigsäure, Wasserstoffperoxid, Essigsäure und Wasser.

Peressigsäure wird bei 4°C gelagert, wenn vom Hersteller nicht anders angegeben. Aus dem ca. 40 %igen Peressigsäurekonzentrat wird eine Stammlösung hergestellt. Haltbarkeit der gekühlten Stammlösung ist maximal 1 Tag.

Die Gehaltsbestimmung erfolgt durch Titration jeweils einen Tag vor dem Versuch.

Material:

- Peressigsäure (Peraclean, Evonik)
- Phosphorsäure 85% p. A., z. B. Merck Art.: 1.00573
- Kaliumjodid p. A., z. B. Merck Art.: 1.05043
- 1%ige Stärkelösung – Stärke p. A., z. B. Merck Art.: 1.01252
- Ammoniumheptamolybdat – Tetrahydrat p. A., z. B. Merck Art.: 1.01182
- 0,1 N Natriumthiosulfatlösung, z. B. Merck Art.: 1.09950 Titrisol
- Wasser, Eis (*Anhang A1.1*)
- Erlenmeyerkolben, Messzylinder, kalibrierte Pipetten, Pipettenspitzen
- Magnetrührstäbchen
- Titrationsgerät: z. B. Multi-Dosimat E 415 (Methrom)

Hinweis: Zu beachten ist, dass bei der Titration mit mindestens 100 ml Eiswasser verdünnt wird. Bei zu geringer Verdünnung reagiert Wasserstoffperoxid auch schon in der Kälte etwas mit dem Jodid.

Durchführung:

1. Zu 100 ml Eiswasser werden 10 ml 5%ige Phosphorsäure und ca. 0,5 g Kaliumjodid gegeben und jeweils gut gemischt, 3–4 Tropfen gesättigte Stärkelösung zufügen.

Nach Zugabe der Probenlösung* wird sofort und schnell mit Natriumthiosulfatlösung auf das Verschwinden der Blaufärbung titriert. Entscheidend ist das erste Verschwinden der Färbung; nach kurzem Stehen tritt die Blaufärbung wieder auf, da H₂O₂ langsam mit dem Jodid reagiert.

* z. B. bei einer 1%igen Peressigsäurelösung 1 ml, bei einer 0,1%igen Peressigsäurelösung 10 ml

Verbrauch $\hat{=}$ Gehalt an Peressigsäure

1 ml 0,1 N Natriumthiosulfatlösung $\hat{=}$ 3,803 mg Peressigsäure

Berechnung:

$$\frac{\text{ml } 0,1 \text{ N Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 3,803}{10 \times \text{ml Probe}} = \% \text{ Peressigsäure}$$

2. Eine Spatelspitze Ammoniumheptamolybdat zugeben.

Lösung auf Raumtemperatur erwärmen und erneut mit Natriumthiosulfatlösung auf Entfärbung titrieren.

Verbrauch \triangleq Gehalt an H_2O_2

1 ml 0,1 N Natriumthiosulfatlösung \triangleq 1,701 mg H_2O_2

Berechnung:

$$\frac{\text{ml } 0,1 \text{ N Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 1,701}{10 \times \text{ml Probe}} = \% \text{ H}_2\text{O}_2$$

ANHANG B

B

Prüfbericht

In einem Prüfbericht müssen folgende Punkte entsprechend dem Prüfverfahren beinhaltet sein:

- a) Prüflaboratorium mit genauer Adresse
- b) genaue Beschreibung des zu prüfenden Produktes und des Prüfverfahrens
 - Produktname der Originalverpackung
 - Auftraggeber
 - Chargennummer und/oder Herstellungsdatum, ggf. Verfallsdatum
 - Wirkstoff(e) und dessen/deren Konzentration(en)
 - Produktbeschreibung (z. B. Farbe, Flüssigkeit, Pulver, Aussehen, Geruch)
 - pH-Wert des Konzentrates sowie aller empfohlenen Gebrauchskonzentrationen (Ausnahme: alkoholische Produkte) (mindestens die 1%ige) in WSH
 - Zeitraum der Prüfung
 - Prüfverfahren (ggf. mit Bezug auf Europäische Norm)
 - Neutralisationsmittel
 - Prüf- bzw. Gebrauchskonzentrationen
 - Einwirkzeiten
 - Menge
 - ggf. Anwendungshäufigkeit
 - Prüftemperatur
 - Inkubationstemperatur
- c) genaue Aufstellung aller KBE der Nähragarplatten und deren Verdünnungen
- d) Alle relevanten lg-Werte bzw. ermittelten Reduktionen für die jeweiligen Verfahren sind bis zur zweiten Stelle hinter dem Komma anzugeben.
- e) Schlussfolgerung
- f) Ort, Datum, Unterschrift mit Namenszug in Druckschrift

ANHANG C



C 1 Standard-Waschverfahren

Die vorgesehene Menge des Handwaschproduktes, R (Referenz) oder P (Prüfprodukt), wird in die angefeuchteten, hohlen Hände gegossen, die entsprechend dem unten aufgeführten Handwaschverfahren gewaschen werden, um eine vollständige Benetzung der Hände sicherzustellen. Die Bewegungen jeden Schrittes werden 5-mal durchgeführt, bevor zum nächsten Schritt übergegangen werden darf. Nach Beendigung des 6. Schrittes werden die einzelnen Schritte nach Bedarf wiederholt, um die angegebene Washdauer einzuhalten. Danach werden die Hände mit Wasser abgespült und gründlich getrocknet.

C 2 Standard-Einreibeverfahren

Die vorgesehene Menge des Händedesinfektionsproduktes, R (Referenz) oder P (Prüfprodukt), muss in die hohlen, trockenen Hände gegossen und 30 s durch kräftiges Verreiben nach dem unten aufgeführten Standard-Einreibeverfahren bis zu den Handgelenken auf der Haut verteilt werden, um eine vollständige Benetzung der Hände sicherzustellen. Die Bewegungen jeden Schrittes werden 5-mal durchgeführt, bevor zum nächsten Schritt übergegangen werden darf. Nach Beendigung des 6. Schrittes werden die einzelnen Schritte nach Bedarf wiederholt, um die angegebene Einreibedauer einzuhalten.

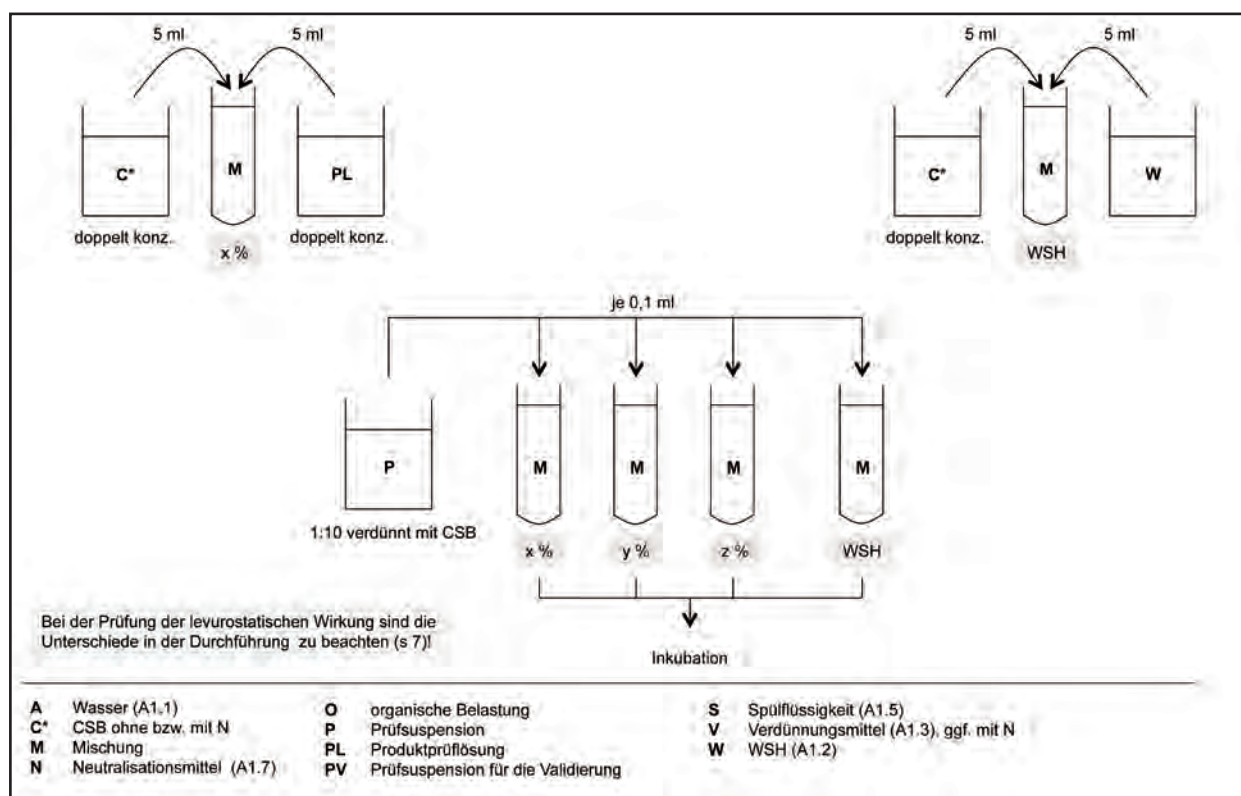
ANHANG D

D

Schematische Darstellung der Versuchsanordnungen

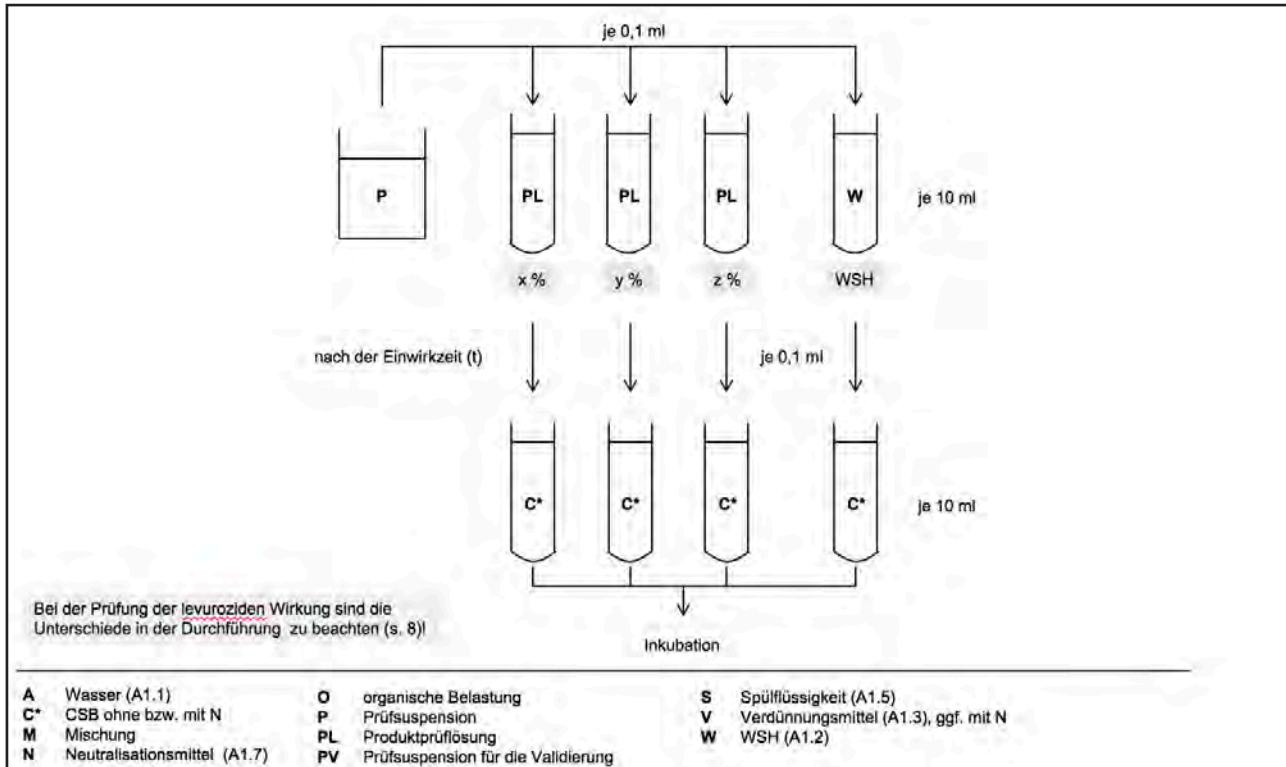
Schema D1 zu Methode 7

Bestimmung der bakteriostatischen bzw. levurostatischen Wirkung sowie geeigneter Neutralisationsmittel



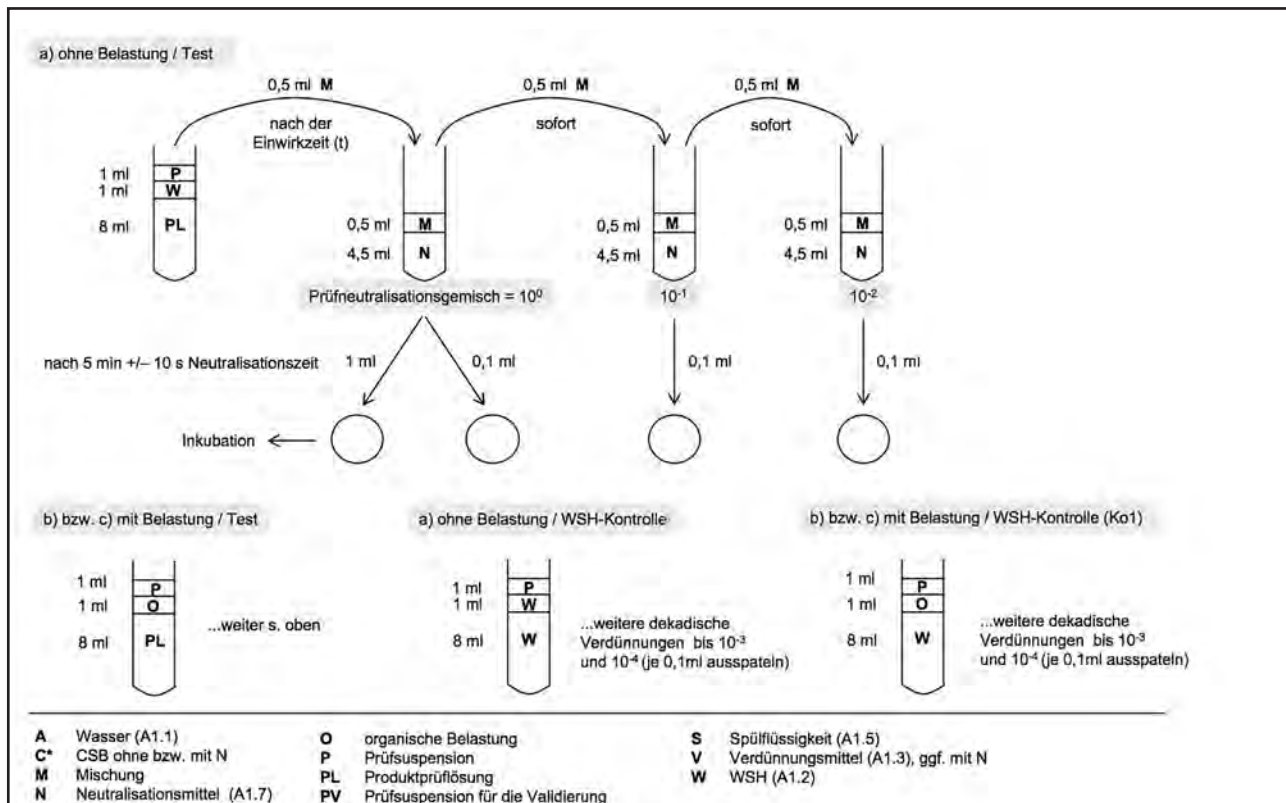
Schema D2 zu Methode 8

Bestimmung der bakteriziden und levuroziden Wirkung im qualitativen Suspensionsversuch



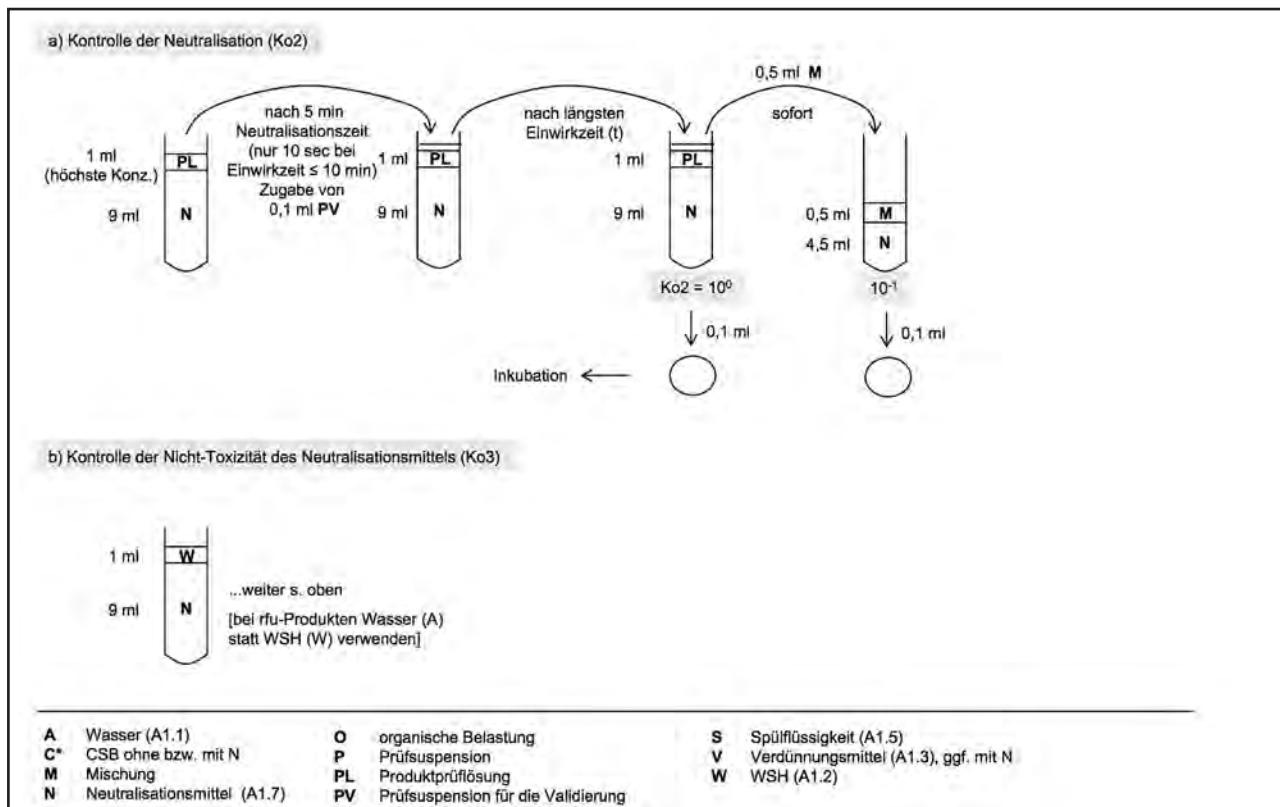
Schema D3.1 zu Methode 9

Quantitativer Suspensionsversuch – Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren inkl. WSH-Kontrolle (Ko1)



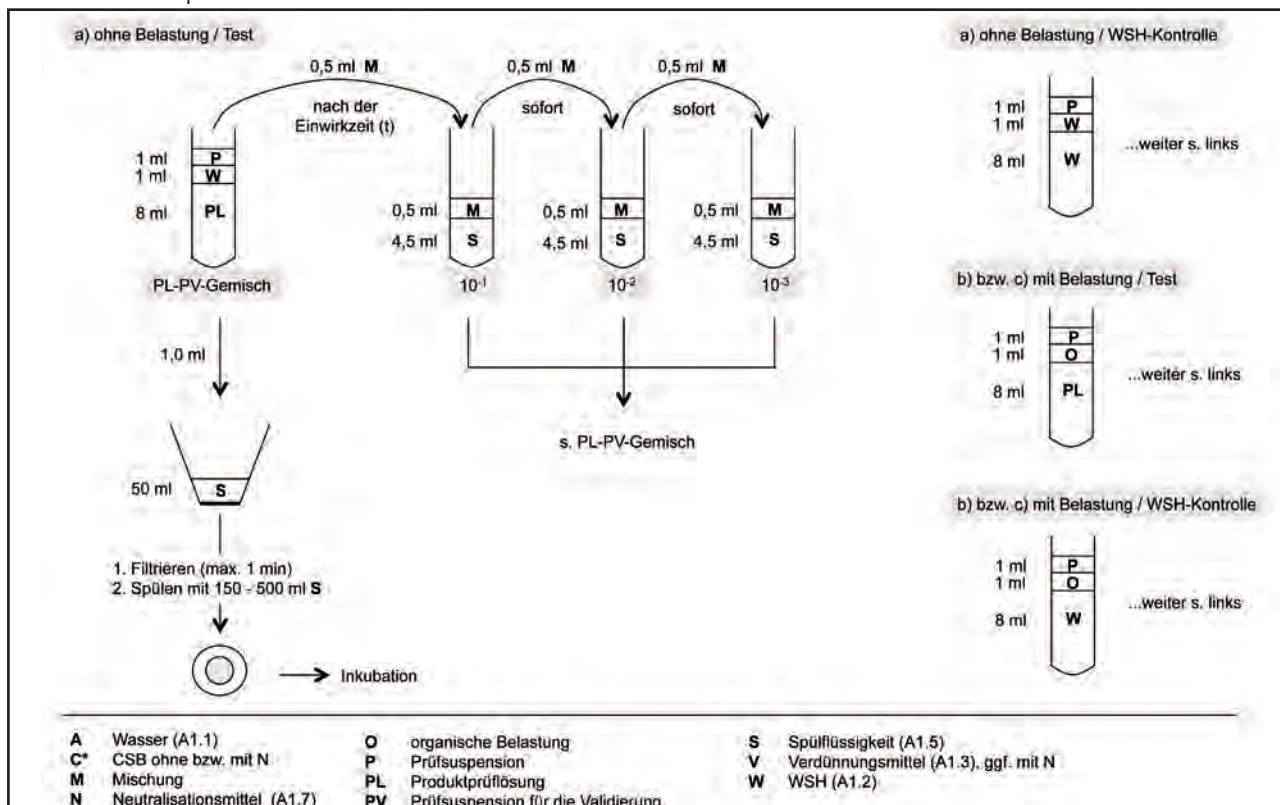
Schema D3.2 zu Methode 9

Quantitativer Suspensionsversuch – Kontrolle der Neutralisation und Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels



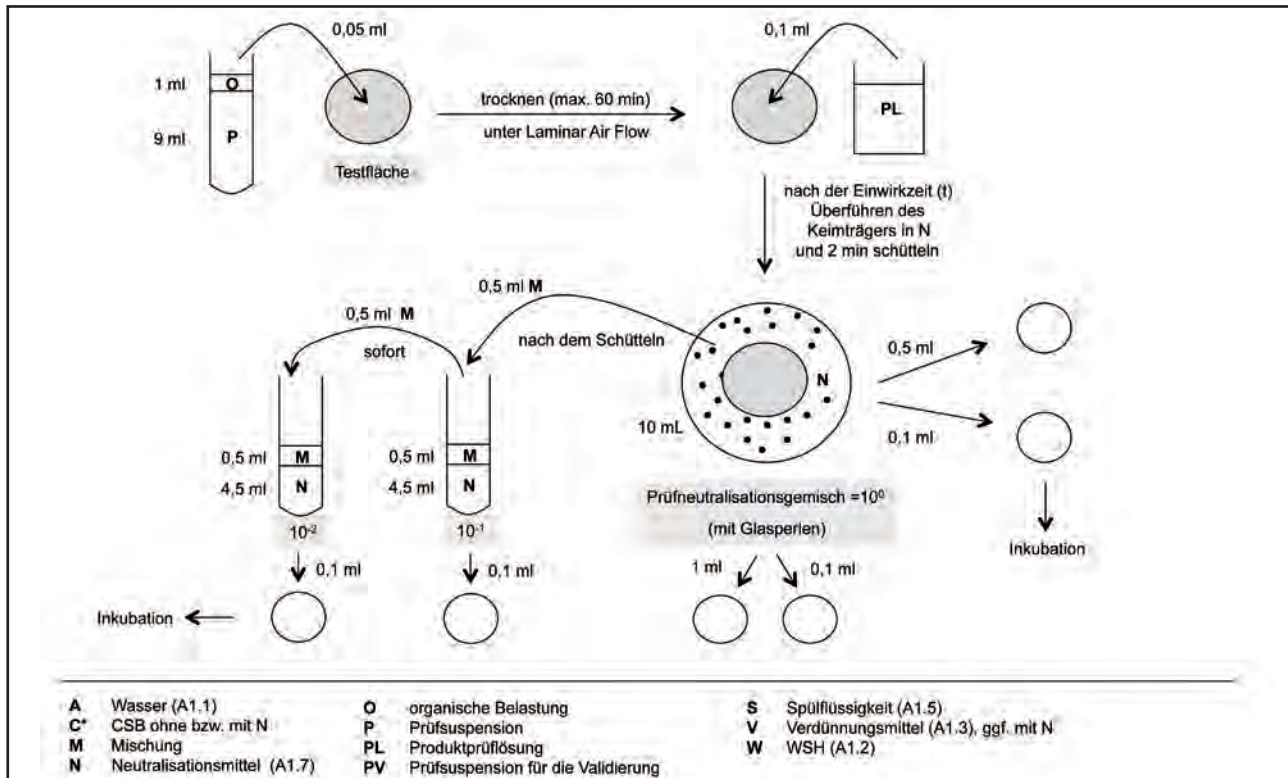
Schema D4 zu Methode 9

Quantitativer Suspensionsversuch – Membranfiltrations-Verfahren



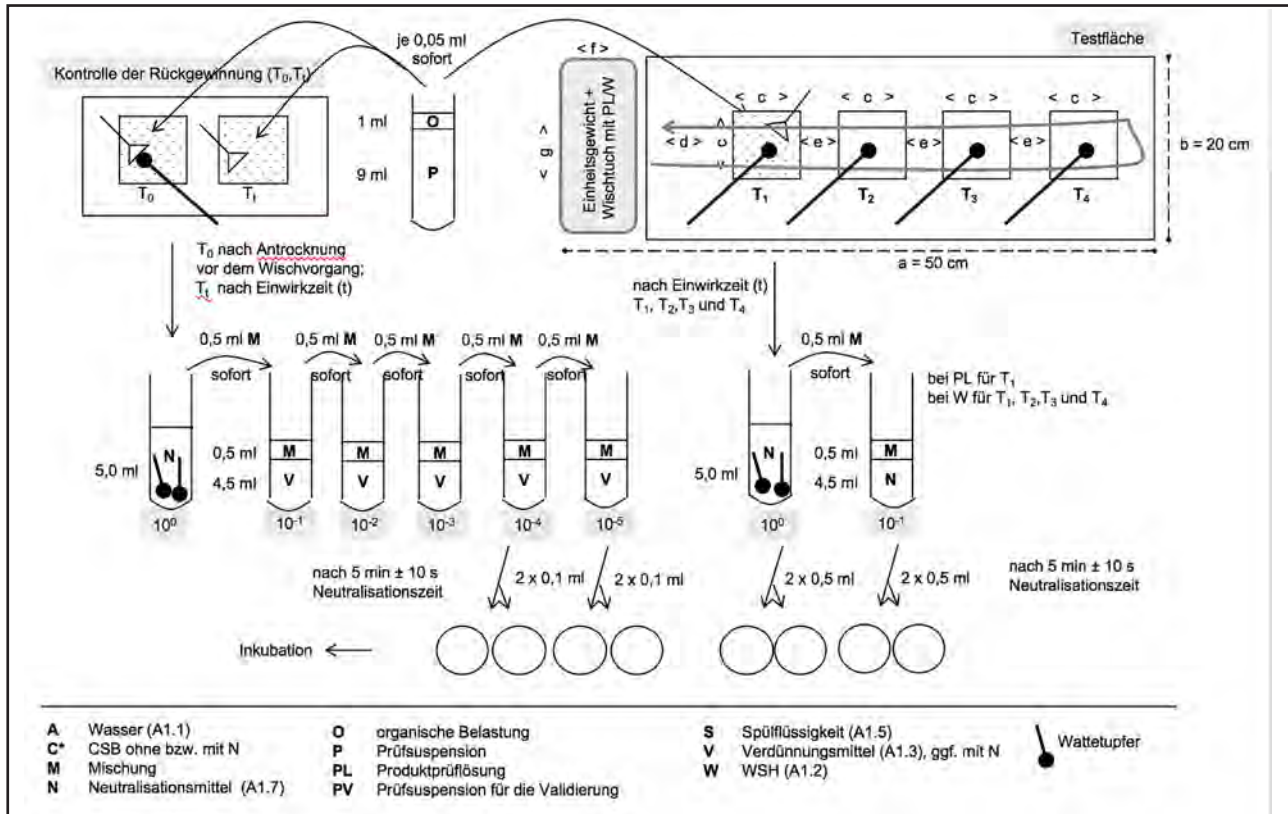
Schema D5 zu Methode 14.1

Flächendesinfektion ohne Mechanik – praxisnaher Versuch



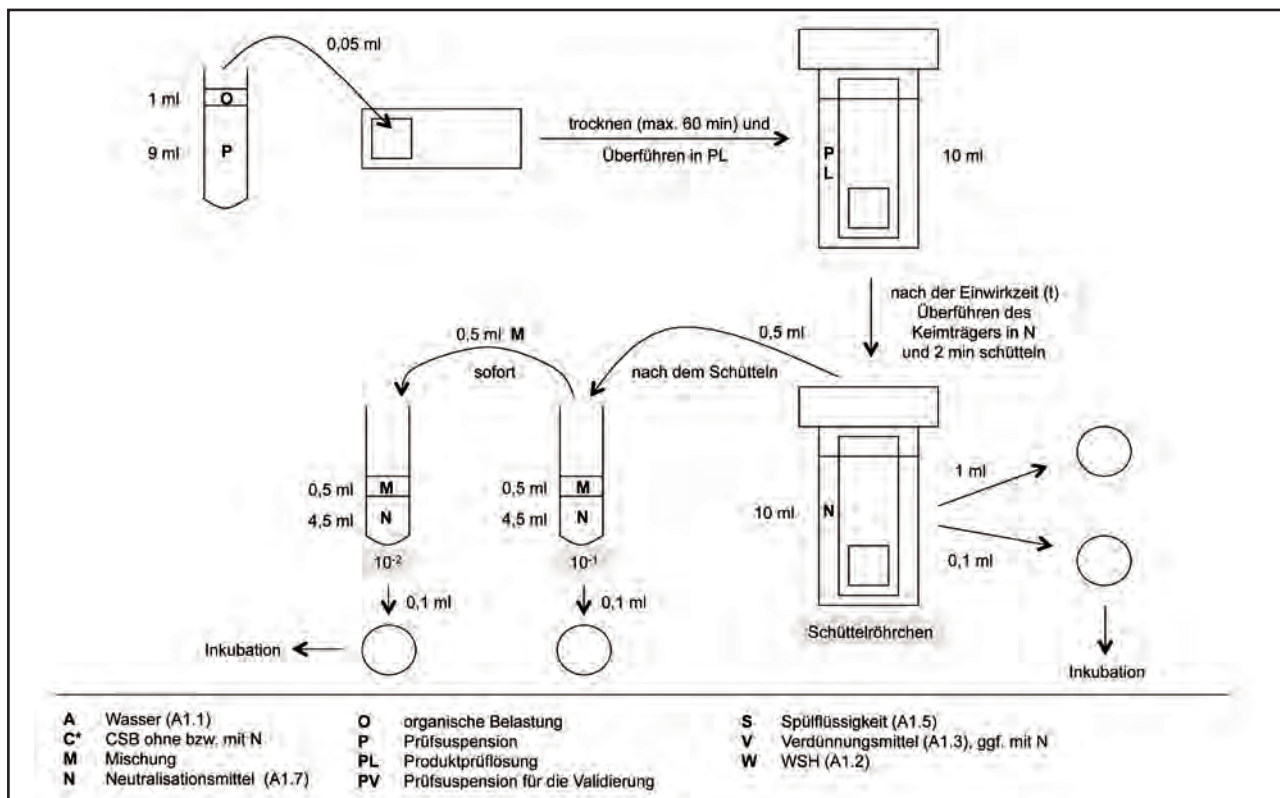
Schema D6 zu Methode 14.2

Flächendesinfektion mit Mechanik – praxisnaher Versuch



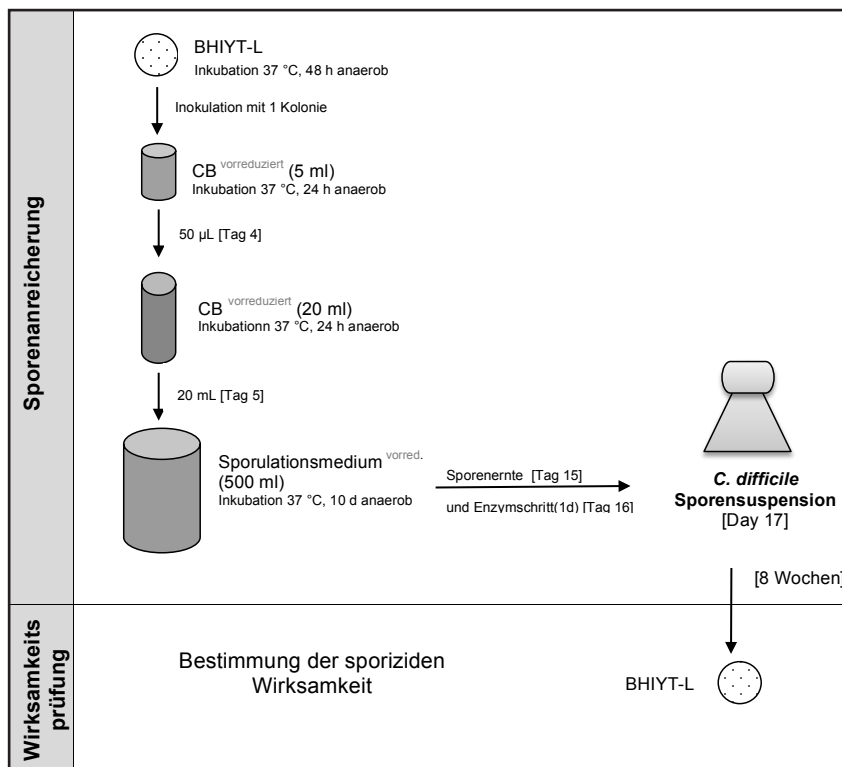
Schema D7 zu Methode 15

Chemische/Chemothermische Instrumentendesinfektion – praxisnaher quantitativer Keimträgertest



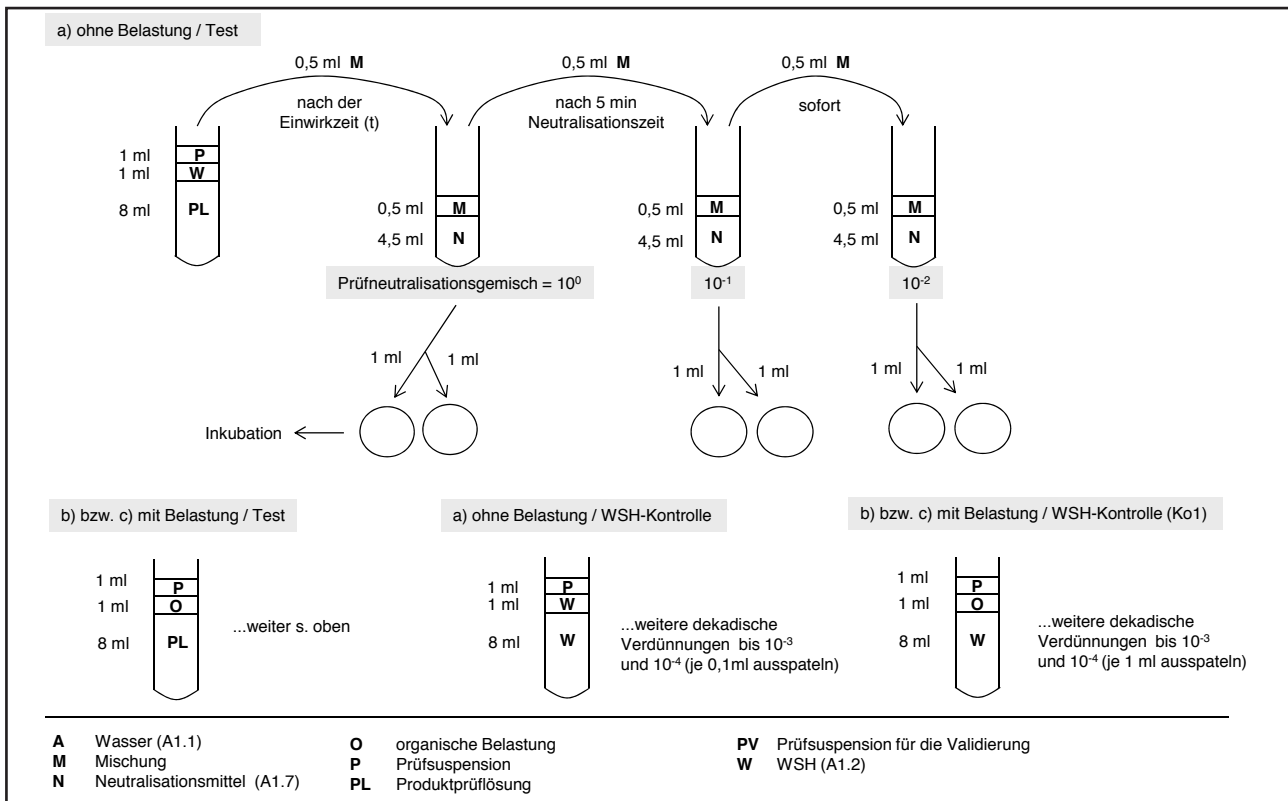
Schema D8.1 zu Methode 18

Quantitativer Suspensionsversuch – Sporenanreicherung von *Clostridium difficile*



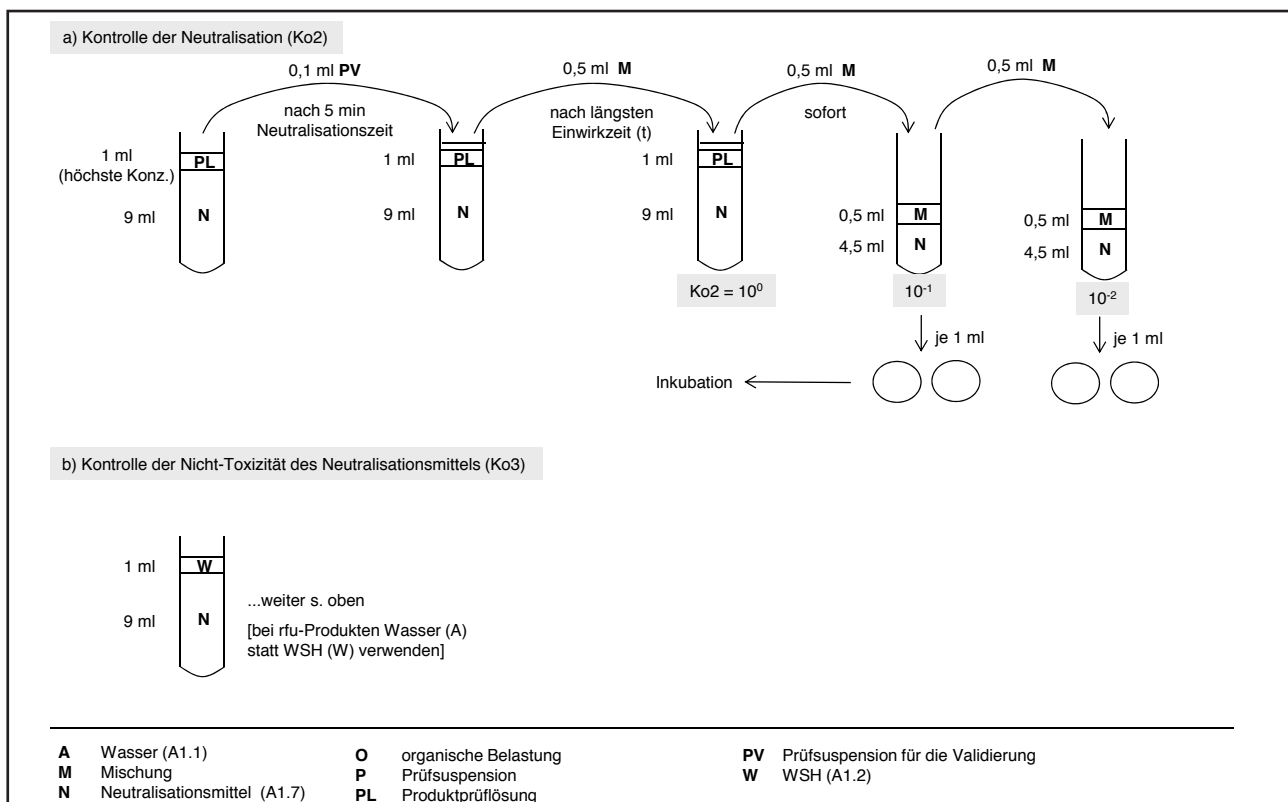
Schema D8.2 zu Methode 18

Quantitativer Suspensionsversuch – Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren



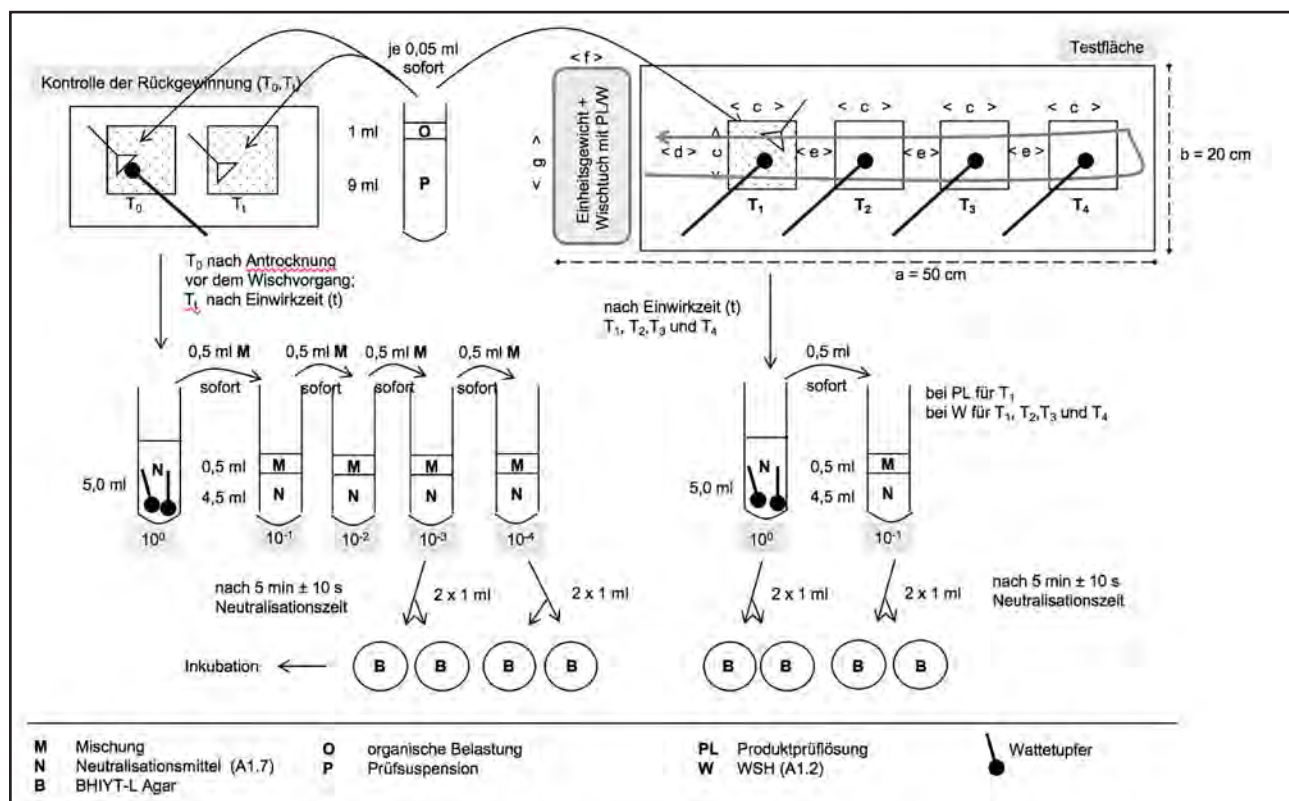
Schema D8.3 zu Methode 18

Quantitativer Suspensionsversuch – Kontrolle der Neutralisation und Nicht-Toxizität des Neutralisationsmittels



Schema D9 zu Methode 19

Flächendesinfektion mit Mechanik (*C. difficile*) – praxisnaher Versuch 4-Felder-Test



ANHANG P

Optionale Prüfmethode für spezielle Erreger

P

P 1 Testflächenversuch auf unbehandeltem Holz zur Bestimmung der fungiziden Wirksamkeit

Anmerkung: Eine Listung von Flächendesinfektionsmitteln mit einer Wirksamkeit gegen Pilze auf unbehandeltem Holz kann nur **zusätzlich (optional)** zu **14.1 oder 14.2** erfolgen.

P 1.1 Testorganismen und Ausgangskonzentrationen

<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 (DSM 1386)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	ATCC 9533 (DSM 4870)	1,5–5 x 10 ⁸ KBE/ml

Einzelheiten zur Herstellung von Stamm-, Gebrauchs- und Anreicherungskulturen sowie der Prüfsuspensionen für *Candida albicans* sind in **➔ Kapitel 6** beschrieben.

Zur Simulation praxisnaher Bedingungen wird den Prüfsuspensionen unmittelbar vor Prüfung 0,03 % Albumin (**➔ Anhang A1.8a** – geringe organische Belastung) bzw. 0,3 % Albumin und 0,3 % Schaferthrombozyten (**➔ Anhang A1.8a** – hohe organische Belastung) zugesetzt.

P 1.1.1 Herstellung der Stammkultur von *T. mentagrophytes*

Die Verfahrensweise zur Herstellung der Trichophyton-Stammkultur entspricht der für Bakterien (**➔ Kapitel 6.1.1**). Jedoch wird anstelle von CSA und CSL als Nährmedium SGA (Sabouraud-Glukose-Agar) bzw. SGB (SG-Bouillon) verwendet (**➔ Anhang A1.4.9, 10**). Die Kulturen werden bei 23,5 °C ± 1,5 °C während 14 Tagen inkubiert.

P 1.1.2 Herstellung der Gebrauchs- und Anreicherungskulturen von *T. mentagrophytes*

Um die Arbeitskulturen von *T. mentagrophytes* herzustellen, werden aus der Stammkultur in Kryogefäßen einzelne Perlen mit einem Draht oder einer Pinzette entnommen und in 1 ml Wasser (**➔ Anhang A1.1**) suspendiert. Aus dieser Suspension werden durch Beimpfen auf SGA zwei Subkulturen angelegt: Eine dient der Anreicherung; mit der anderen soll durch die Darstellung von Einzelkolonien die Reinheit des Stammes nachgewiesen werden. Beide Subkulturen werden bei 23,5 °C ± 1,5 °C inkubiert.

Nach 14 Tagen Inkubation wird von der Anreicherungskultur eine zweite Subkultur angelegt.

Die erste und/oder zweite Subkultur ist die Arbeitskulturer. Eine dritte Subkultur ist nicht gestattet.

P 1.1.3 Herstellung der Prüfsuspensionen von *T. mentagrophytes*

Die Arbeitskulturer wird mit 10 ml Verdünnungsmittel (➔ *Anhang A1.3.1*) überschichtet, die Kolonien vorsichtig mit einer Öse abgeschabt und in weitere 10 ml Verdünnungsmittel (➔ *Anhang A1.3.1*) überführt. Diese Suspension wird unter Verwendung von 5–10 g Glasperlen (Ø 3–4 mm) leicht geschüttelt und zur Entfernung größerer Partikel durch Glaswolle filtriert.

Die Anzahl der KBE in der Prüfsuspension wird unter Verwendung einer geeigneten Methode auf $1,5 - 5,0 \times 10^8$ pro ml eingestellt und kann (bei 2 °C bis 8 °C gelagert) 2 Tage lang verwendet werden.

P 1.1.4 Bestimmung der Ausgangskeimzahl der Prüfsuspensionen von *T. mentagrophytes*

Die eingestellten Prüfsuspensionen werden mit dem Verdünnungsmittel so verdünnt, dass Suspensionen von 10^2 bis 10^3 KBE pro ml resultieren. Die Suspension wird mit dem Schüttelgerät homogenisiert. Je 0,1 ml der verdünnten Suspension wird entnommen und im Oberflächenverfahren verimpft.

Die beimpften Nährmedien werden bei $23,5 \pm 1,5$ °C für 14 Tage inkubiert. Die Anzahl der KBE auf jedem Nährboden wird ausgezählt und protokolliert.

P1.2 Produktprüflösung

Einzelheiten zur Herstellung der Produktprüflösung sind in ➔ Kapitel 5 beschrieben.

P1.3 Testzeiten

Als Testzeiten sind 1, 5, 15, 30, 60 und/oder 240 min auszuwählen. Mögliche Einwirkzeiten sind 5, 15, 30, 60 und 240 min.

P1.4 Testflächen

Zur Vorbereitung werden flache Holzstäbchen (aus Buchenholzfurnier (5 x 20 x 2 mm) z.B. Holz Jung GmbH & Co.KG) 24 h in Wasser (➔ *Anhang A1.1, A2.3*) gewässert und anschließend dampfsterilisiert.

P 1.5 Kontamination der Testflächen

Die Kontamination der Testflächen erfolgt nach Einlegen in eine Glasschale durch Übergießen mit der Prüfsuspension. Nach 10 min Lagerung in der Prüfsuspension werden die Testflächen in einer mit Filterpapier ausgelegten Glasschale verteilt und bei $36 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ während 1 h getrocknet.

P 1.6 Methodik

Die kontaminierten und getrockneten Testflächen werden in Glasschalen eingelegt, mit je 15 ml der Produktprüflösung übergossen (je Konzentration und Einwirkzeit zwei Testflächen), darin hin und her bewegt und nach 2 min den Schälchen entnommen. Die Stäbchen werden anschließend in kleinen Glasgefäßen an den Wänden senkrecht aufgestellt und verbleiben darin bis zum Ablauf der erforderlichen Einwirkzeiten. Nach der vorgesehenen Einwirkzeit werden die Stäbchen zweimal in MEB (ggf. mit Neutralisationsmittel, bestimmt nach \Rightarrow Kapitel 7) gespült. Je zwei Stäbchen werden mit einer Pinzette auf einen MEA-Schrägagar gebracht und auf dem Nährboden hin und her bewegt. Nach der Beimpfung der Nährbodenoberfläche soll einer der Testflächen direkt oberhalb des Kondenswasserspiegels, der andere auf der Mitte der Nährbodenoberfläche liegen bleiben.

P 1.7 Inkubation

Die mit *C. albicans* beimpften Nährböden werden nach 48 h bei $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und die mit *T. mentagrophytes* beimpften Nährböden werden nach 21 Tagen bei $23,5\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$ auf Pilzwachstum kontrolliert.

P 1.8 Auswertung

Die Befunde sind wie folgt zu protokollieren:

– = kein Wachstum,

+ = Wachstum einzelner Kolonien, ++ = starkes Wachstum (mehr als 10 Kolonien).

P 1.9 Validierung

Als Wachstumskontrolle sind anstelle mit Produktprüflösung mit WSH (\Rightarrow Anhang A1.2) behandelte kontaminierte Testflächen nach der längsten Einwirkzeit zu verwenden und weiterzubehandeln.

P1A Anforderungen an die Wirksamkeitsprüfung für die VAH-Zertifizierung

Flächendesinfektion ohne Mechanik: praxisnaher Versuch Pilze auf rohem Holz

Die Prüfbedingungen richten sich nach der gewünschten Anwendungsempfehlung des Flächendesinfektionsverfahrens. Es können Produkte bzw. Verfahren ohne Mechanik unter geringer und/oder hoher Belastung geprüft werden.

Eine Listung von Flächendesinfektionsmitteln gegen Pilze auf unbehandeltem Holz kann nur zusätzlich zu **14.1** bzw. **14.2** (einschließlich der dort zu erfüllenden Anforderungen an obligate Suspensionsversuche) erfolgen.

– *Keimträgerversuch auf unbehandeltem Holz zur Bestimmung der fungiziden Wirksamkeit (Methode P1)*

– *In der Prüfung darf bei der zu empfehlenden Konzentration-Zeit-Relation kein Pilzwachstum zu beobachten sein.*



ANHANG V

V1A Hygienische Händedesinfektion

Anforderungen

Für das Konformitätsbewertungsverfahren sind zwei voneinander unabhängige Gutachten einschließlich Prüfberichten einzureichen, die die Wirksamkeit in der beantragten Konzentration-Zeit-Relation bestätigen.

Hierzu können Gutachten eingereicht werden, die nach der DVV/RKI-Leitlinie 2008 [1] bzw. 2015 [2] erstellt wurden. Gutachten nach der DVV/RKI-Leitlinie 2005 [3] müssen ggfs. mit zusätzlichen Tests ergänzt werden, um den Anforderungen der DVV/RKI-Leitlinie 2015 bzw. 2008 [1, 2] zu entsprechen. Alternativ können auch Gutachten eingereicht werden, die nach DIN EN 14476 [4] erstellt wurden.

Auch bei Prüfungen nach europäischer Norm muss die Anwendungskonzentration im jeweiligen Prüfbericht in einem zweiten unabhängigen Ansatz bestätigt werden und als Kontrollen die Viruskontrolle, die Prüfung der Zytotoxizität und die Referenzprüfung beinhalten. Das mittlere Konfidenzintervall aus zwei unabhängigen Versuchen muss jeweils $\leq 0,5$ lg betragen.

Grundvoraussetzung für eine Zertifizierung ist die bakterizide/levurozide Wirksamkeit, die vom VAH im Rahmen eines Konformitätsbewertungsverfahrens bestätigt wurde oder im Rahmen dieses Verfahrens mit bestätigt wird. Das beinhaltet auch die Wirksamkeit innerhalb der beantragten Konzentration und Einwirkzeit im Praxisversuch mit *E. coli* entsprechend Methode 11 bzw. DIN EN 1500 [5].

Die Konzentration-Zeit-Relation für die Wirksamkeit gegen Viren, die in die VAH-Liste eingetragen wird, darf die für die bakterizide/levurozide VAH-gelistete Wirksamkeit nicht unterschreiten.

Konzentrationen und Einwirkzeiten sind im Test so zu wählen, dass aus dem Prüfergebnis die Abhängigkeit der Viruswirksamkeit des Desinfektionsmittels von der Konzentration bzw. der Einwirkzeit ersichtlich ist (Kinetik).

Obligat:

- *Bestimmung der Viruswirksamkeit (Wirkbereich begrenzt viruzid) im quantitativen Suspensionsversuch (Methode DVV/RKI 2008 oder 2015 [1, 2] bzw. DIN EN 14476 [4])*

Das zu prüfende Produkt muss den Virustiter der in **Tabelle V1.1** genannten Testviren unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit(en) bei 20 °C mindestens um 4 lg-Stufen vermindern.

Optional:

- *Bestimmung der Viruswirksamkeit (Wirkbereich begrenzt viruzid PLUS und/oder viruzid) im quantitativen Suspensionsversuch (Methode DVV/RKI 2008 oder 2015 [1, 2] bzw. DIN EN 14476 [4])*

Das zu prüfende Produkt muss den Virustiter der in **Tabelle V1.1** genannten Testviren unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit(en) bei 20 °C mindestens um 4 lg-Stufen vermindern.

Tabelle V1.1: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Wirkbereich	Testorganismen	Prüfmethode	Belastung ¹ / Prüfkonzentrationen ²	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten ³
begrenzt viruzid	<i>Vacciniavirus</i> <i>BVDV</i> ⁴	DVV/RKI [1 bzw. 2] oder DIN EN 14476 [4] ⁵	DVV/RKI-Belastungen oder gering (EN) / unverdünnt	20 ± 1	15 s, 30 s, 1 min
begrenzt viruzid PLUS	<i>Adenovirus</i> <i>Norovirus</i>	DVV/RKI [1, 2 bzw.3] oder DIN EN 14476 [4] ⁵	DVV/RKI-Belastungen, gering (EN) / unverdünnt	20 ± 1	15 s, 30 s, 1 min, 1,5 min, 2 min
viruzid	<i>Poliovirus</i> <i>Adenovirus</i> <i>Norovirus</i> <i>SV40</i>	DVV/RKI [1, 2 bzw.3] oder DIN EN 14476 [4] ⁵	DVV/RKI-Belastungen, gering (EN) / unverdünnt	20 ± 1	15 s, 30 s, 1 min, 1,5 min, 2 min

¹ Die Belastungen nach DVV/RKI sind 10% FKS (fötales Kälberserum) und A. dest oder nach DIN EN 14476 der Ansatz unter geringer Belastung mit 0,3% BSA (Rinderserumalbumin).

² Zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit sind mindestens zwei Konzentrationen (Anwendungskonzentration und eine unwirksame) zu prüfen.

³ Es müssen mindestens drei der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen. Die Einwirkzeiten sollten zwischen 15 s und 2 min liegen. Es ist eine Einwirkzeit von maximal 60 s anzustreben.

⁴ Zusätzlich bei oxidativ wirksamen Produkten.

⁵ Prüfberichte auf der Grundlage von EN 14476:2013 behalten weiterhin ihre Gültigkeit.

- Falls vorhanden, können auch gerne Prüfberichte nach prDIN EN 17430 (Praxisversuch mit dem Murinen Norovirus) für die Viruswirksamkeit (*Wirkbereich begrenzt viruzid PLUS und/oder viruzid*) eingereicht werden [6]. Die Prüfberichte müssen hierbei folgende Anforderungen erfüllen: Für den Vergleich der Ergebnisse des Prüf- und des Referenzverfahrens und zur Bewertung des Prüfverfahrens müssen die folgenden Anforderungen erfüllt sein:
 - o Von mindestens 18 Probanden müssen verwertbare Ergebnisse vorliegen.
 - o Der Gesamtmittelwert der Vorwerte für RP und PP muss mindestens 4 lg betragen.
 - o Bei RP dürfen nicht mehr als drei einzelne lg-Reduktionen < 2 auftreten und die absolute Differenz der mittleren Differenzen zwischen den lg-Reduktionen von Gruppe RP → PP und Gruppe PP → RP muss weniger als 2 betragen.

- Das Prüfprodukt darf dem Referenzprodukt nicht unterlegen sein (Hodges-Lehmann)
 $p = 0,025$.
- Die Grenze für Unterlegenheit = 0,35 Ig-Einheiten.

Testviren gemäß DVV/RKI-Leitlinien bzw. DIN EN 14476

Adenovirus	= Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75
BVDV	= Bovine Viral Diarrhea Virus, Stamm NADL
Norovirus	= Murines Norovirus, Stamm S99 Berlin (MNV)
Poliovirus	= Poliovirus-Impfstamm Typ 1, Stamm LSc-2ab
SV40	= Polyomavirus (SV 40), Stamm 777
Vacciniavirus	= Modified Vacciniavirus Ankara (MVA) oder Vacciniavirus, Stamm Elstree

Literatur

1. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin – Fassung vom 1. August 2008. Bundesgesundheitsbl 2008;51:937–945.
2. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin – Fassung vom 1. Dezember 2014. Bundesgesundheitsbl 2015;58:493–504.
3. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin (Fassung vom 15. Juni 2005). Bundesgesundheitsbl 2005;48:1420–1426.
4. DIN EN 14476:2019-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1); Deutsche Fassung EN 14476:2013+A2:2019. DIN Deutsches Institut für Normung e.V.: 1–42.
5. DIN EN 1500:2017-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Hygienische Händedesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche Fassung EN 1500:2013.
6. DIN EN 17430:2019-09 Entwurf. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Viruzide hygienische Händedesinfektion – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2/Stufe 2); Deutsche und Englische Fassung prEN 17430:2019.

Anmerkung: VAH-Zertifikate auf Grundlage der prEN-Fassung behalten weiterhin Gültigkeit.

V2A Flächendesinfektion

Anforderungen

Für das Konformitätsbewertungsverfahren sind zwei voneinander unabhängige Gutachten einschließlich Prüfberichten einzureichen, die die Wirksamkeit in der beantragten Konzentration-Zeit-Relation in quantitativen Suspensionsversuchen und praxisnahen Tests bestätigen.

Hierzu können Gutachten eingereicht werden, die nach der DVV/RKI-Leitlinie 2008 [1] bzw. 2015 [2] erstellt wurden. Gutachten nach der Leitlinie DVV/RKI 2005 [3] müssen ggfs. mit zusätzlichen Tests ergänzt werden, um den Anforderungen der Leitlinie DVV/RKI 2015 bzw. 2008 [1, 2] zu entsprechen. Alternativ können auch Gutachten eingereicht werden, die nach DIN EN 14476 [4] erstellt wurden.

Die praxisnahen Flächentests sind entsprechend der DVV-Leitlinie 2012 [5] bzw. EN 16777 [6] durchzuführen.

Auch bei Prüfungen nach europäischen Normen muss die Anwendungskonzentration im jeweiligen Prüfbericht in einem zweiten unabhängigen Ansatz bestätigt werden und als Kontrollen die Viruskontrolle, die Prüfung der Zytotoxizität und die Referenzprüfung beinhalten. Das mittlere Konfidenzintervall aus zwei unabhängigen Versuchen muss jeweils $\leq 0,5$ lg betragen.

Grundvoraussetzung für eine Zertifizierung ist die bakterizide/levurozide Wirksamkeit, die vom VAH im Rahmen eines Konformitätsbewertungsverfahrens bestätigt wurde oder im Rahmen dieses Bewertungsverfahrens ebenfalls bestätigt wird.

Die Konzentration-Zeit-Relation für die Wirksamkeit gegen Viren, die in die VAH-Liste eingetragen wird, darf die für die bakterizide/levurozide VAH-gelistete Wirksamkeit nicht unterschreiten.

Konzentrationen und Einwirkzeiten sind im Test so zu wählen, dass aus dem Prüfergebnis die Abhängigkeit der Viruswirksamkeit des Desinfektionsmittels von der Konzentration bzw. der Einwirkzeit ersichtlich ist (Kinetik).

Obligat:

- *Bestimmung der Viruswirksamkeit (Wirkbereich begrenzt viruzid, begrenzt viruzid PLUS und/oder viruzid) im quantitativen Suspensionsversuch (Methode DVV/RKI 2008 oder 2015 [1, 2] bzw. DIN EN 14476 [4]).*
- *Bestimmung der Viruswirksamkeit (Wirkbereich begrenzt viruzid, begrenzt viruzid PLUS und/oder viruzid) im praxisnahen Flächentest (DVV-Leitlinie 2012 [5] bzw. EN 16777 [6]), wobei begrenzt viruzid PLUS dem Wirkbereich viruzid (low level) und viruzid dem Wirkbereich viruzid (high level) der DVV-Leitlinie entspricht, sofern die Testviren s. Tabelle V 2.2 verwendet werden.*

Das zu prüfende Produkt muss den Virustiter der in **Tabelle V2.1** genannten Testviren unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit(en) und Prüftemperatur mindestens um 4 lg-Stufen vermindern.

Tabelle V2.1: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Wirkbereich	Test-organismen	Prüfmethode	Belastung ¹ / Prüfkonzentrationen ²	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten [min] ³
begrenzt viruzid	<i>Vacciniavirus</i> <i>BVDV</i> ⁴	DVV/RKI [1, 2] oder DIN EN 14476 [4] ⁵	DVV/RKI oder gering oder hoch/ Anwendungskonzentration ²	20 ± 1	1, 5, 15, 30, 60
begrenzt viruzid PLUS	<i>Adenovirus</i> <i>Norovirus</i>	DVV/RKI [1, 2] oder DIN EN 14476 [4] ⁵	DVV/RKI oder gering oder hoch/ Anwendungskonzentration ²	20 ± 1	
viruzid	<i>Poliovirus</i> <i>Adenovirus</i> <i>Norovirus</i> <i>SV40</i>	DVV/RKI [1, 2] oder DIN EN 14476 [4] ⁵	DVV/RKI oder gering oder hoch/ Anwendungskonzentration ²	20 ± 1	

¹ Die Belastungen nach DVV/RKI sind 10% FKS (fötales Kälberserum) und A. dest. Nach DIN EN 14476 wird der Ansatz mit 0,3% BSA (Rinderserumalbumin) als geringe Belastung und mit 3% BSA und 3% Schaferythrozyten als hohe Belastung angesehen.

² Zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit sind mindestens zwei Konzentrationen (Anwendungskonzentration und eine unwirksame) zu prüfen (Abstufung siehe Kapitel 5).

³ Es müssen mindestens drei der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen. Bei der Prüfung ist auch die Einwirkzeit zu berücksichtigen, die direkt unter der beantragten Einwirkzeit liegt.

⁴ Zusätzlich bei oxidativ wirksamen Produkten.

⁵ Prüfberichte auf der Grundlage von EN 14476:2013 behalten weiterhin ihre Gültigkeit.

Tabelle V2.2: Prüfbedingungen im praxisnahen Test.

Wirkbereich	Test-organismen	Prüfmethode	Belastung ¹ / Prüfkonzentrationen ²	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten [min] ³
begrenzt viruzid	<i>Vacciniavirus</i>	DVV-Leitlinie 2012 [5] oder EN 16777 [6] ⁴	gering oder hoch/ Anwendungskonzentration ²	22 ± 3	1, 5, 15, 30, 60
begrenzt viruzid PLUS (entspricht viruzid (low level) [5])	<i>Adenovirus</i> <i>Norovirus</i>	DVV-Leitlinie 2012 [5] oder EN 16777 [6] ⁴	gering oder hoch/ Anwendungskonzentration ²	22 ± 3	
viruzid (entspricht viruzid (high level) [5])	<i>Adenovirus</i> * <i>Norovirus</i> * <i>Parvovirus</i>	DVV-Leitlinie 2012 [5] oder EN 16777 [6] ⁴	gering oder hoch/ Anwendungskonzentration ²	22 ± 3	

¹ Der Ansatz mit 0,3% BSA (Rinderserumalbumin) wird als geringe Belastung, der Ansatz mit 3% BSA und 3% Schaf erythrozyten als hohe Belastung angesehen.

² Zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit sind mindestens zwei Konzentrationen (Anwendungskonzentration und eine unwirksame) zu prüfen (Abstufung siehe Kapitel 5).

³ Die zu prüfenden Einwirkzeiten ergeben sich aus Tabelle V2.3. Bei der Prüfung ist auch die Einwirkzeit zu berücksichtigen, die direkt unter der beantragten Einwirkzeit liegt.

⁴ Prüfberichte auf Grundlage der prEN-Fassung behalten weiterhin Gültigkeit.

* wenn die Wirksamkeit für den Wirkbereich begrenzt viruzid PLUS nicht bereits nachgewiesen wurden.

Tabelle V2.3: In den einzelnen Durchgängen zu wählende Einwirkzeiten für die praxisnahen Prüfungen von Flächendesinfektionsmitteln.

Beantragte Einwirkzeit	1. Durchgang	2. Durchgang
Flächendesinfektion ohne Mechanik		
1 min	0,5 min, 1 min © VAH, 2022. Alle Rechte vorbehalten. Nur zur privaten Nutzung.	1 min
5 min	1 min, 5 min	5 min
15 min	5 min, 15 min	15 min
30 min	15 min, 30 min	30 min
60 min	30 min, 60 min	60 min

Die praxisnahen Prüfungen haben jeweils in zwei Durchgängen zu erfolgen:

1. Durchgang: jeweils mindestens 2 Testflächen pro Konzentration-Zeit-Relation (siehe **Tabelle V2.2** und **V2.3**), Viruskontrolle (vor und nach Antrocknung), Nachwirkungskontrolle, Interferenzkontrolle, Zytotoxizitätskontrolle und Referenzprüfung
2. Durchgang: jeweils mindestens 2 Testflächen pro beantragter Konzentration-Zeit-Relation, Viruskontrolle (vor und nach Antrocknung), Zytotoxizitätskontrolle und Referenzprüfung

Testviren gemäß DVV/RKI-Leitlinien bzw. DIN EN 14476 oder DIN EN 16777

- Adenovirus = Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75
- BVDV = Bovine Viral Diarrhea Virus, Stamm NADL
- Norovirus = Murines Norovirus, Stamm S99 Berlin (MNV)
- Parvovirus = Murines Parvovirus (Minute Virus of Mice, rodent protoparvovirus 1) (MVM)
- Poliovirus = Poliovirus-Impfstamm Typ 1, Stamm LSc-2ab
- SV40 = Polyomavirus (SV 40), Stamm 777
- Vacciniavirus = Modified Vacciniavirus Ankara (MVA) oder Vacciniavirus, Stamm Elstree

Literatur

1. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin – Fassung vom 1. August 2008. Bundesgesundheitsbl 2008;51:937–945.
2. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin – Fassung vom 1. Dezember 2014. Bundesgesundheitsblatt 2015;58:493–504.
3. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin (Fassung vom 15. Juni 2005). Bundesgesundheitsblatt 2005;48:1420–1426.
4. DIN EN 14476:2019-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1); Deutsche Fassung EN 14476:2013+A2: 2019.

5. DVV. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e. V. Quantitative Prüfung der viruziden Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel auf nicht-porösen Oberflächen (Anwendung im Bereich Humanmedizin). HygMed 2012;37(3):78–85.
6. DIN EN 16777:2019-03. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Versuch auf nicht porösen Oberflächen ohne mechanische Einwirkung zur Bestimmung der viruziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2); Deutsche Fassung EN 16777:2018.

V3A Instrumentendesinfektion (als Eintauchdesinfektion)

Anforderungen

Für das Konformitätsbewertungsverfahren sind zwei voneinander unabhängige Gutachten einschließlich Prüfberichten einzureichen, die die Wirksamkeit in der beantragten Konzentration-Zeit-Relation in quantitativen Suspensionsversuchen und praxisnahen Tests bestätigen.

Hierzu können Gutachten für die quantitativen Suspensionsversuche eingereicht werden, die nach DVV/RKI-Leitlinie 2008 [1] bzw. 2015 [2] erstellt wurden. Gutachten nach der Leitlinie DVV/RKI 2005 [3] müssen ggfs. mit zusätzlichen Tests ergänzt werden, um den Anforderungen der Leitlinie DVV/RKI 2015 bzw. 2008 [1, 2] zu entsprechen. Alternativ können auch Gutachten eingereicht werden, die nach DIN EN 14476 [4] erstellt wurden.

Die praxisnahen Prüfungen sind entsprechend EN 17111 [5] durchzuführen.

Auch bei Prüfungen nach EN muss die Anwendungskonzentration im jeweiligen Prüfbericht in einem zweiten unabhängigen Ansatz bestätigt werden und als Kontrollen die Viruskontrolle, die Prüfung der Zytotoxizität und die Referenzprüfung beinhalten. Das mittlere Konfidenzintervall aus zwei unabhängigen Versuchen muss jeweils $\leq 0,5$ lg betragen.

Grundvoraussetzung für die Zertifizierung ist eine bakterizide/levurozide Wirksamkeit, die vom VAH im Rahmen eines Konformitätsbewertungsverfahrens bestätigt wurde oder im Rahmen dieses Bewertungsverfahrens ebenfalls bestätigt wird.

Die Konzentration-Zeit-Relation für die Wirksamkeit gegen Viren, die in die VAH-Liste eingetragen wird, darf die für die bakterizide/levurozide VAH-gelistete Wirksamkeit nicht unterschreiten.

Konzentrationen und Einwirkzeiten sind im Test so zu wählen, dass aus dem Prüfergebnis die Abhängigkeit der Viruswirksamkeit des Desinfektionsmittels von der Konzentration bzw. der Einwirkzeit ersichtlich ist (Kinetik).

Obligat:

- *Bestimmung der Viruswirksamkeit (Wirkbereich begrenzt viruzid und/oder viruzid im quantitativen Suspensionsversuch (Methode DVV/RKI 2008 oder 2015 [1, 2] bzw. DIN EN 14476 [4]).*
- *Bestimmung der Viruswirksamkeit (Wirkbereich begrenzt viruzid und/oder viruzid) im praxisnahen Test nach DIN EN 17111 [5]).*

Das zu prüfende Produkt muss den Titer der in den Tabellen **V3.1** und **V3.2** genannten Testviren unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit(en) und Prüftemperatur(en) mindestens um 4 lg-Stufen vermindern.

Tabelle V3.1: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Wirkbereich	Testorganismen	Prüfmethode	Belastung ¹ / Prüfkonzentrationen ²	Prüf- temperatur[°C]	Einwirkzeiten [min] ³
begrenzt viruzid*	<i>Vacciniavirus</i> <i>BVDV</i> ⁴	DVV/RKI [1, 2] oder in Anlehnung anDIN EN 14476 [4] ⁵	DVV/RKI oder gering oder hoch / Anwendungskonzentration	20 ± 1	1, 5, 15, 30, 60
viruzide Instrumenten- desinfektion bei < 40 °C	<i>Poliovirus</i> <i>Adenovirus</i> <i>Norovirus</i> <i>SV40</i>	DVV/RKI [1, 2] oder DIN EN 14476 [4] ⁵	DVV/RKI oder gering oder hoch / Anwendungskonzentration	20 ± 1 bis < 40 ± 1	
viruzide Instrumenten- desinfektion bei ≥ 40 °C	<i>Parvovirus</i>	DVV/RKI [1, 2] oder DIN EN 14476 [4] ⁵	DVV/RKI oder gering oder hoch / Anwendungskonzentration	≥ 40 ± 1 bis ≤ 70 ± 1	

*Bei Produkten zur Vorreinigung mit einem kombinierten Reiniger/Desinfektionsmittel muss mit geeigneten Verfahren (z.B. Amidoschwarzfärbung) dargestellt werden, dass keine proteinfixierenden Eigenschaften vorliegen.

¹ Belastungen nach DVV/RKI sind 10% FKS (fötales Kälberserum) und A. dest. Nach DIN EN 14476 wird 0,3% BSA (Rinderserumalbumin) als geringe Belastung und 3% BSA und 3% Schaferythrozyten wird als hohe Belastung angesehen.

² Zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit sind mindestens zwei Konzentrationen (Anwendungskonzentration und eine unwirksame) zu prüfen (Abstufung siehe Kapitel 5).

³ Es müssen mindestens drei der angegebenen Einwirkzeiten getestet werden, wobei die beantragten Einwirkzeiten enthalten sein müssen.

⁴ Zusätzlich bei oxidativ wirksamen Produkten.

⁵ Prüfberichte auf der Grundlage von EN 14476:2013 behalten weiterhin ihre Gültigkeit.

Tabelle V3.2: Prüfbedingungen im praxisnahen Test.

Wirkbereich	Testorganismen	Prüfmethode	Belastung ¹ / Prüfkonzentrationen ²	Prüf- temperatur [°C]	Einwirkzeiten [min] ³
begrenzt viruzid*	<i>Vacciniavirus</i>	EN 17111 [5] ⁴	gering oder hoch / Anwendungskonzentration	20 ± 1	1, 5, 15, 30, 60
viruzide Instrumenten- desinfektion bei < 40 °C	<i>Adenovirus</i> <i>Norovirus</i> <i>SV40</i>	EN 17111 [5] ⁴	gering oder hoch / Anwendungskonzentration	20 ± 1 bis < 40 ± 1	
viruzide Instrumenten- desinfektion bei ≥ 40 °C	<i>Parvovirus</i>	EN 17111 [5] ⁴	gering oder hoch / siehe Fußnote ²	≥ 40 ± 1 bis ≤ 70 ± 1	

* Bei Produkten zur Vorreinigung mit einem kombinierten Reiniger/Desinfektionsmittel muss mit geeigneten Verfahren (z.B. Amidoschwarzfärbung) dargestellt werden, dass keine proteinfixierenden Eigenschaften vorliegen.

¹ Die Belastung nach EN 17111 mit 0,3% BSA (Rinderserumalbumin) wird als geringe Belastung und mit 3% BSA und 3% Schaferythrozyten als hohe Belastung angesehen.

² Zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit sind mindestens zwei Konzentrationen (Anwendungskonzentration und eine unwirksame) zu prüfen (Abstufung siehe Kapitel 5).

³ Die zu prüfenden Einwirkzeiten ergeben sich aus Tabelle V3.3.

⁴ Prüfberichte auf Grundlage der prEN-Fassung behalten weiterhin Gültigkeit.

Tabelle V3.3: In den einzelnen Durchgängen zu wählende Einwirkzeiten für die praxisnahen Prüfungen von Instrumentendesinfektionsmitteln.

Beantragte Einwirkzeit	1. Durchgang	2. Durchgang
5 min	1 min, 5 min	5 min
15 min	5 min, 15 min	15 min
30 min	15 min, 30 min	30 min
60 min	30 min, 60 min	60 min

Die praxisnahen Prüfungen haben jeweils in zwei Durchgängen zu erfolgen:

1. Durchgang: jeweils mindestens 2 Testflächen pro Konzentration-Zeit-Relation (siehe **Tabelle V3.2** und **V3.3**), Viruskontrolle (vor und nach Antrocknung), Nachwirkungskontrolle, Interferenzkontrolle, Zytotoxizitätskontrolle und Referenzprüfung
2. Durchgang: jeweils mindestens 2 Testflächen pro beantragter Konzentration-Zeit-Relation, Viruskontrolle (vor und nach Antrocknung), Zytotoxizitätskontrolle und Referenzprüfung

Im zweiten Durchgang bei Verfahren < 40 °C ist nur die Prüfung des resistentesten Testvirus aus dem 1. Durchgang notwendig.

Testviren gemäß DVV/RKI-Leitlinien bzw. DIN EN 14476

- Adenovirus = Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75
 BVDV = Bovine Viral Diarrhea Virus, Stamm NADL
 Norovirus = Murines Norovirus, Stamm S99 Berlin (MNV)
 Parvovirus = Murines Parvovirus (Minute Virus of Mice, rodent protoparvovirus 1) (MVM)
 Poliovirus = Poliovirus-Impfstamm Typ 1, Stamm LSc-2ab
 SV40 = Polyomavirus SV 40, Stamm 777
 Vacciniavirus = Modified Vacciniavirus Ankara (MVA) oder Vacciniavirus, Stamm Elstree

Literatur

1. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin – Fassung vom 1. August 2008. Bundesgesundheitsbl 2008;51:937–945.
2. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin – Fassung vom 1. Dezember 2014. Bundesgesundheitsbl 2015;58:493–504.
3. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e.V. und des Robert Koch-Instituts zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin (Fassung vom 15. Juni 2005). Bundesgesundheitsbl 2005;48:1420–1426.
4. DIN EN 14476:2019-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1); Deutsche Fassung EN 14476:2013+A2: 2019.

5. DIN EN 17111. Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der viruziden Wirkung für Instrumente im humanmedizinischen Bereich - Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2); Deutsche Fassung EN 17111:2018.

V4A Chemothermische Wäschedesinfektion

Anforderungen

Für das Konformitätsbewertungsverfahren sind zwei voneinander unabhängige Gutachten einschließlich Prüfberichten gemäß DIN EN 14476 [1] einzureichen, die die Wirksamkeit in der beantragten Konzentration-Zeit-Relation in quantitativen Suspensionsversuchen bestätigen.

Zusätzlich sind Kontrollen zum Nachweis der Qualität der Testviren und der Validität der Prüfung vorzulegen. Da diese Kontrollen vorläufig in der DIN EN 14476 nicht ausreichend beschrieben sind oder zum Teil fehlen, sind dafür die Kontrollen nach DVV/RKI-Leitlinie 2015 [2] Ziffer 5.1 und 7.6 oder DVV/RKI-Leitlinie 2008 [3] Ziffer 5.1 und 7.7 durchzuführen.

Die Anwendungskonzentration muss im jeweiligen Prüfbericht in einem zweiten unabhängigen Ansatz bestätigt werden und als Kontrollen die Viruskontrolle, die Prüfung der Zytotoxizität und die Referenzprüfung beinhalten. Das mittlere Konfidenzintervall aus zwei unabhängigen Versuchen muss $\leq 0,5$ lg betragen.

Grundvoraussetzung für eine Zertifizierung ist die bakterizide/levurozide Wirksamkeit, die vom VAH im Rahmen eines Konformitätsbewertungsverfahrens bestätigt wurde oder im Rahmen dieses Bewertungsverfahrens ebenfalls bestätigt wird. Der Ablauf des Verfahrens (z.B. Zeitpunkt der Zugabe des Desinfektionsmittels) sollte in den Virusprüfungen soweit möglich berücksichtigt werden.

Die Konzentration-Zeit-Relation für die Wirksamkeit gegen Viren, die in die VAH-Liste eingetragen wird, darf die für die bakterizide/levurozide VAH-gelistete Wirksamkeit nicht unterschreiten.

Konzentrationen und Einwirkzeiten sind im Test so zu wählen, dass aus dem Prüfergebnis die Abhängigkeit der Viruswirksamkeit des Desinfektionsmittels von der Konzentration bzw. der Einwirkzeit ersichtlich ist (Kinetik).

Obligat:

- *Bestimmung der Viruswirksamkeit (Wirkbereich viruzid im quantitativen Suspensionsversuch nach DIN EN 14476 [1]).*

Das Verfahren ist dazu mit dem vollständigen Verfahren (d.h. allen Verfahrenskomponenten* in einem Prüfansatz) bei $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und der vorgegebenen Verfahrenstemperatur zu prüfen. Die Virustiter sind ebenfalls bei $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und der Verfahrenstemperatur zu bestimmen.

* Eine Prüfung der einzelnen Komponenten (sofern bei dem Verfahren mehrere Komponenten – Waschmittel, Waschverstärker, Desinfektionsmittel - eingesetzt werden) ist nicht erforderlich.

Das zu prüfende Produkt muss den Titer der in **Tabelle V4.1** genannten Testviren unter den festgelegten Bedingungen innerhalb der vorgesehenen Einwirkzeit(en) und Prüftemperatur mindestens um 4 Ig-Stufen vermindern.

Tabelle V4.1: Prüfbedingungen im quantitativen Suspensionsversuch.

Wirkbereich	Testorganismen	Prüfmethode	Belastung ¹ / Prüfkonzentrationen ²	Prüftemperatur [°C]	Einwirkzeiten [min]
Viruzid Temperatur ≥ 30 °C – ≤ 70 °C	<i>Murines Parvovirus³ (MVM)</i>	DIN EN 14476, Kontrollen nach DVV/RKI [2, 3]	Gering oder hoch/ siehe Fußnote ²	≥ 30 ± 1 bis ≤ 70 ± 1	5, 10, 15, 20

¹ nach DIN EN 14476 wird der Ansatz mit 3% BSA und 3% Schaferythrozyten als hohe Belastung angesehen.

Mit geringer Belastung - 0,3% BSA (Rinderserumalbumin)- darf nur geprüft werden, wenn eine Vorwäsche im Verfahren vorgesehen ist.

² Zur Erfassung des Grenzbereiches der Wirksamkeit sind mindestens zwei Konzentrations-Zeit-Relationen (Anwendungsbedingungen und eine unwirksame) zu prüfen.

³ Prüfberichte mit dem bovinen Parvovirus sind weiterhin gültig, wenn sie die hier genannten Anforderungen erfüllen.

Tabelle V4.2: Prüfbedingungen (Prüfansatz und Kontrollen).

Virustiter	Temperatur		
	20 °C ± 1 °C	Verfahrenstemperatur	60 °C ± 1 °C
Viruskontrolle mit geringer Belastung ¹	X	X	
Viruskontrolle mit hoher Belastung	X	X	
Versuchsansatz mit allen Komponenten	X	X	
Referenzsubstanz* (Peressigsäure 0,005%/10 min)			X

¹ Nur erforderlich, wenn eine Vorwäsche im Verfahren vorgesehen ist.

* Alternativ können zum Nachweis der Qualität der Testviren auch Untersuchungen nach DVV/RKI-Leitlinie 2008 [3], Ziffer 5.1 und 7.7 anerkannt werden (Kontrolle mit pH-Wert des Waschverfahrens bei 20 °C und der Verfahrenstemperatur).

Testviren gemäß DVV/RKI-Leitlinien bzw. DIN EN 14476

Parvovirus = Murines Parvovirus (Minute Virus of Mice, rodent protoparvovirus 1) (MVM)

Literatur

1. DIN EN 14476:2019-10. Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika – Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich – Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1); Deutsche und Englische Fassung EN 14476: 2013+A2: 2019. DIN Deutsches Institut für Normung e.V.:1–42.
2. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin – Fassung vom 1. Dezember 2014. Bundesgesundheitsbl 2015;58:493–504.

3. DVV/RKI. Leitlinie der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten (DVV) e.V. und des Robert Koch-Instituts (RKI) zur Prüfung von chemischen Desinfektionsmitteln auf Wirksamkeit gegen Viren in der Humanmedizin – Fassung vom 1. August 2008. Bundesgesundheitsbl 2008;51:937-945.