

DIN EN 1275

ICS 11.080.20; 71.100.35

Ersatz für
DIN EN 1275:1997-05

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder
levuroziden Wirkung (Basistest) chemischer Desinfektionsmittel und
Antiseptika –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1);
Deutsche Fassung EN 1275:2005**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of basic fungicidal or basic yeasticidal
activity of chemical disinfectants and antiseptics –
Test method and requirements (phase 1);
German version EN 1275:2005

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide de
base des antiseptiques et des désinfectants chimiques –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 1);
Version allemande EN 1275:2005

Gesamtumfang 46 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN
Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument wurde von der Horizontalen Arbeitsgruppe (HWG) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der HWG des CEN/TC 216 wird über den Arbeitsausschuss D 7 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin und Gemeinschaftsaufgaben“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) wahrgenommen.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 1275:1997-05 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Norm ist vom technischen und inhaltlichen Aufbau überarbeitet worden;
- b) eine Harmonisierung von Struktur und Wortlaut mit anderen quantitativen Suspensionsversuchen des CEN/TC 216 wurde vorgenommen;
- c) ein Anhang zur Präzision und eine graphische Darstellung der Prüfverfahren wurde aufgenommen.

Frühere Ausgaben

DIN EN 1275: 1997-05

Deutsche Fassung

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der
fungiziden oder levuroziden Wirkung (Basistest) chemischer
Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1)**

Chemical disinfectants and antiseptics —
Quantitative suspension test for the evaluation of basic
fungicidal or basic yeasticidal activity of chemical
disinfectants and antiseptics —
Test method and requirements (phase 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité
fongicide ou levuricide de base des antiseptiques et des
désinfectants chimiques —
Méthode d'essai et prescriptions (phase 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 28. Juli 2005 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	7
5 Prüfverfahren	7
5.1 Prinzip	7
5.2 Materialien und Reagenzien	8
5.2.1 Prüfkeime.....	8
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	8
5.3 Geräte einschließlich Geräte aus Glas	9
5.3.1 Allgemeines	9
5.3.2 Die übliche mikrobiologische Laborausrüstung	10
5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüfkeime und der Produktprüflösungen	11
5.4.1 Suspensionen der Prüfkeime (für Prüfung und Validierung).....	11
5.4.2 Produktprüflösungen	14
5.5 Verfahren zur Beurteilung der fungiziden oder levuroziden Wirksamkeit des Produkts.....	14
5.5.1 Allgemeines	14
5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	15
5.5.3 Membranfiltrationsverfahren	18
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	20
5.6.1 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen	20
5.6.2 Berechnung	20
5.7 Verifizierung des Verfahrens	23
5.7.1 Allgemeines	23
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	23
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	24
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	24
5.8.1 Keimreduktion	24
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	24
5.8.3 Grenzwert-Prüfkeim und fungizide/levurozide Konzentration	24
5.8.4 Präzision, Wiederholungsuntersuchungen	25
5.9 Interpretation der Ergebnisse – Schlussfolgerung	25
5.9.1 Allgemeines	25
5.9.2 Fungizide Wirkung	25
5.9.3 Levurozide Wirkung.....	26
5.10 Prüfbericht	26
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	28
Anhang B (informativ) Geeignete Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten	29
B.1 Allgemeines	29
B.2 Neutralisationsmedien	29
B.3 Spülflüssigkeiten	30
B.4 Dem Agar zum Auszählen zuzusetzende Neutralisationsmedien	30
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung von Prüfverfahren	31
C.1 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	31
C.2 Membranfiltrationsverfahren	33
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts	35
Anhang E (informativ) Präzision des Prüfergebnisses	39

Anhang F (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation Europäischer Normen	
über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika.....	42
F.1 Anwendung und Interpretation von Prüfverfahren	42
F.2 Richtlinie zur Interpretation von Prüfungen für chemische Desinfektionsmittel und	
Antiseptika	43
Literaturhinweise	44

Vorwort

Dieses Dokument (EN 1275:2005) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Juni 2006, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 2006 zurückgezogen werden.

Dieses Dokument ersetzt EN 1275:1997.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

Diese Europäische Norm beschreibt ein Suspensionsprüfverfahren, mit dem festgestellt werden soll, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum auf den im Anwendungsbereich beschriebenen Gebieten eine fungizide oder levurozide *Bas*swirkung aufweist oder nicht. Die Verwendbarkeit eines Produkts für einen bestimmten festgelegten Zweck kann durch dieses Prüfverfahren nicht bestimmt werden. Deshalb werden Produkte weiteren relevanten Prüfverfahren nach entsprechenden Europäischen Normen unterzogen, um deren Wirksamkeit unter Bedingungen, die der vorgesehenen Anwendung entsprechen, zu bewerten. Diese Europäischen Normen sind durch das CEN/TC 216 erarbeitet worden oder werden durch es erarbeitet werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen für die fungizide oder levurozide Basiswirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und antiseptischen Produkten fest, die in Wasser als homogene und physikalisch stabile Zubereitung vorliegen. Produkte können nur bei einer Konzentration von 80 % oder weniger geprüft werden, da eine bestimmte Verdünnung durch Zugabe der Prüfkeime und von Wasser immer auftritt.

Diese Europäische Norm gilt für Wirksubstanzen (gegen Pilze wirkende Biozide) und für in Entwicklung stehende Zubereitungen, deren Verwendung im Lebensmittelbereich, im industriellen und häuslichen Bereich und in öffentlichen Einrichtungen sowie in der Medizin und Veterinärmedizin geplant ist. Es gilt auch für die Bestimmung der fungiziden oder levuroziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika, wenn einschlägige Normen nicht zur Verfügung stehen.

ANMERKUNG 1 Durch diese Europäische Norm wird nicht die Wirksamkeit eines Produkts für eine vorgesehene Verwendung bewertet.

ANMERKUNG 2 Dieses Prüfverfahren entspricht einem Phase-1-Versuch (Anhang F).

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieser Europäischen Norm erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

EN 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Haltung von Bakterien- und Pilzstämmen, die zur Prüfung der bakteriziden und fungiziden Wirkung eingesetzt werden.*

ISO 4793, *Laboratory sintered (fritted) filters — Porosity grading, classification and designation.*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Europäischen Norm gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Produkt

chemischer Wirkstoff oder Zubereitung, der (die) als chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum verwendet wird

3.2

Fungizid

Produkt, das Pilze (Schimmelpilze und Hefen) und deren Sporen unter festgelegten Bedingungen abtötet

ANMERKUNG Das von „Fungizid“ abgeleitete Adjektiv ist „fungizid“.

3.3

fungizide Wirkung

Fähigkeit eines Produkts, die Anzahl der lebensfähigen vegetativen Hefezellen und Schimmelpilzsporen einschlägiger Prüfkeime unter festgelegten Bedingungen zu verringern

3.4

fungistatische Wirkung

Fähigkeit eines Produkts, das Wachstum von Pilzen (Schimmelpilzen und/oder Hefen) unter festgelegten Bedingungen zu hemmen

3.5

Levurozid

Produkt, das Hefen unter festgelegten Bedingungen abtötet

ANMERKUNG Das von „Levurozid“ abgeleitete Adjektiv ist „levurozid“.

3.6

levurozide Wirkung

Fähigkeit eines Produkts, die Anzahl der lebensfähigen Hefezellen einschlägiger Prüfkeime unter festgelegten Bedingungen zu verringern

4 Anforderungen

Bei Prüfung nach **Abschnitt 5** muss das Produkt eine Verringerung der Keimzahl um mindestens 4 dezimal-logarithmische (lg) Stufen nachweisen.

Die fungizide Wirkung muss unter Verwendung mindestens der folgenden obligatorischen Prüfbedingungen bestimmt werden: zwei Prüfkeime (vegetative Zellen von *Candida albicans* und Sporen von *Aspergillus niger*), 20 °C, 15 min.

Die levurozide Wirkung muss unter Verwendung mindestens der folgenden obligatorischen Prüfbedingungen bestimmt werden: ein Prüfkeim (vegetative Zellen von *Candida albicans*), 20 °C, 15 min.

Wo es angezeigt ist, könnte die fungizide oder levurozide Wirkung unter Anwendung zusätzlicher Einwirkzeiten, Temperaturen und Prüfkeime nach **5.2.1** und **5.5.1.1** bestimmt werden.

ANMERKUNG 1 Bei diesen zusätzlichen Bedingungen kann die als Ergebnis festgestellte Konzentration niedriger sein als die unter den obligatorischen Prüfbedingungen.

ANMERKUNG 2 Bei der als Ergebnis festgestellten Konzentration ist es nicht erforderlich, eine Verringerung der Keimzahl um 4 logarithmische Stufen bei den obligatorischen Prüfbedingungen nachzuweisen.

5 Prüfverfahren

5.1 Prinzip

5.1.1 Eine Probe des Produkts im Lieferzustand (höchste Prüfkonzentration = 80 %) und/oder des mit Wasser verdünnten Produkts wird zu einer Pilzprüfsuspension (Hefezellen oder Schimmelpilzsporen) gegeben. Das Gemisch wird für $15 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ bei $(20 \pm 1) \text{ °C}$ gehalten (obligatorische Prüfbedingungen). Am Ende dieser Einwirkzeit wird eine aliquote Menge entnommen, und die fungizide und/oder fungistatische Wirksamkeit in diesem Anteil wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. Das Verfahren der Wahl ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Falls ein geeignetes Neutralisiermedium nicht zu ermitteln ist, wird die Membranfiltration durchgeführt. Die Anzahl der überlebenden Pilze in jeder Probe wird bestimmt und die Verringerung der Lebendkeimzahl berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird unter Verwendung der vegetativen Zellen von *Candida albicans* und den Sporen von *Aspergillus niger* (fungizide Wirkung) oder nur der vegetativen Zellen von *Candida albicans* (levurozide Wirkung) als Prüfkeime durchgeführt (obligatorische Prüfbedingungen).

5.1.3 Zusätzliche und freigestellte Einwirkzeiten und Temperaturen sind festgelegt. Zusätzliche Prüfkeime können verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfkeime

Die fungizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden Stämme als Prüfkeime zu bewerten¹⁾ :

— *Candida albicans* ATCC 10231;

— *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Die levurozide Wirkung ist nur unter Verwendung von *Candida albicans* zu bewerten.

ANMERKUNG Zu Verweisen auf Stämme in einigen anderen Kulturensammlungen siehe Anhang A.

Die erforderliche Bebrütungstemperatur für diese Prüfkeime ist $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.3).

Wenn zusätzliche Prüfkeime verwendet werden, müssen sie unter den im Prüfbericht anzugebenden optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Kulturmedien) bebrütet werden. Falls die gewählten zusätzlichen Prüfkeime nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss ihre Eignung zur Lieferung der erforderlichen Impfansätze verifiziert werden. Falls diese zusätzlichen Prüfkeime nicht in einem Referenzzentrum klassifiziert sind, müssen ihre Identifizierungsmerkmale angegeben werden. Zusätzlich müssen sie durch das Prüflaboratorium oder die nationale Kulturensammlung für fünf Jahre als Referenzmaterial aufbewahrt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

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

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

ANMERKUNG 1 Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien im Handel erhältliche wasserfreie Materialien verwendet werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten strengstens befolgt werden.

ANMERKUNG 2 Für jedes Kulturmedium und Reagenz sollte eine Gebrauchsbegrenzung festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliert und darf nicht entmineralisiert sein.

Sterilisation im Dampf-Sterilisator [5.3.2.1 a)].

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

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

1) Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von der American Type Culture Collection (ATCC) vertrieben werden. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.2.2.3 Malzextraktagar (MEA)

Malzextraktagar, bestehend aus:

Malzextrakt	30,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss aus Sojabohnenmehl	3,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

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

ANMERKUNG Falls sich Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) ergeben, kann es erforderlich sein, dem MEA Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B gibt eine Anleitung über Neutralisationsmedien, die verwendet werden können.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

Trypton, pankreatischer Aufschluss aus Casein	1,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

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

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

Das Neutralisationsmedium muss für das zu prüfende Produkt nach 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.2 validiert und steril sein.

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

5.2.2.6 Spülflüssigkeit (für die Membranfiltration)

Die Spülflüssigkeit muss für das zu prüfende Produkt nach 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.3 validiert sein. Sie muss steril, mit der Filtermembran verträglich und durch diese unter den in 5.5.3 beschriebenen Prüfbedingungen filtrierbar sein.

ANMERKUNG In Anhang B sind Spülflüssigkeiten angegeben, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.3 Geräte einschließlich Geräte aus Glas

5.3.1 Allgemeines

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

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

5.3.2 Die übliche mikrobiologische Laborausrüstung²⁾

und besonders folgende Geräte

5.3.2.1 Sterilisatoren

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf eine Betriebstemperatur von (20 ± 1) °C, (45 ± 1) °C (zur Aufbewahrung von verflüssigtem MEA beim Gussplattenverfahren) und zusätzliche Prüftemperaturen ± 1 °C (**5.5.1**).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf eine Betriebstemperatur von (30 ± 1) °C.

5.3.2.4 pH-Messgerät, kalibriert auf $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei (20 ± 1) °C.

ANMERKUNG Für die Messung des pH-Werts der Agarmedien (**5.2.2.3**) sollte eine Punktelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

5.3.2.5 Stoppuhr

5.3.2.6 Schüttelgerät

- a) Elektromechanisches Schnellschüttelgerät, z. B. Vortex[®]-Mischer³⁾.
- b) Mechanisches Schüttelgerät

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem mit den zu filtrierenden Substanzen kompatiblen Material.

Das Gerät muss einen Filterhalter mit einem Mindest-Nutzvolumen von 50 ml besitzen. Es muss zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm mit einer Porengröße von 0,45 µm für das Membranfiltrationsverfahren (**5.5.3**) geeignet sein.

Die verwendete Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen auf der Membran zu ermöglichen und um einen zu lange dauernden Filtrationsvorgang zu verhindern, ist die Apparatur so einzustellen, dass 100 ml der Spülflüssigkeit in 20 s bis 40 s filtriert werden.

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

5.3.2.9 Messpipetten mit einem Nennvolumen von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml, oder kalibrierte automatische Pipetten. Diese Art von Pipetten ist zu verwenden, wenn immer es geeignet ist, selbst wenn nicht auf sie verwiesen wird.

5.3.2.10 Petrischalen (Platten) in den Größen 90 mm bis 100 mm. Diese Art von Petrischalen (Platten) ist zu verwenden, selbst wenn nicht auf sie verwiesen wird.

2) Sterile Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.
3) Vortex[®] ist ein Beispiel eines geeigneten Produkts, das als Handelsware geliefert wird. Diese Information wird zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments gegeben und stellt keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN dar.

5.3.2.11 Glasperlen, 3 mm bis 4 mm Durchmesser.

5.3.2.12 Messkolben

5.3.2.13 Glasfilterfritte mit einer Porengröße zwischen 40 µm und 100 µm nach ISO 4793

5.3.2.14 Zentrifuge (2 000 g_N)

5.3.2.15 Roux-Flaschen oder ähnliche Kolben

5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüfkeime und der Produktprüflösungen

5.4.1 Suspensionen der Prüfkeime (für Prüfung und Validierung)

5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüfkeim sind zwei unterschiedliche Suspensionen herzustellen: die „Prüfsuspension“ zur Durchführung der Prüfung und die „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrollversuche und der Verfahrensvalidierung.

5.4.1.2 Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüfkeimen

Die Prüfkeime und ihre Stammkulturen sind nach EN 12353 herzustellen und aufzubewahren.

5.4.1.3 Gebrauchskulturen von Prüfkeimen

5.4.1.3.1 *Candida albicans* (Hefe)

Um die Gebrauchskultur von *Candida albicans* (5.2.1) herzustellen, wird aus der Stammkultur (5.4.1.2) durch Ausstrich auf MEA (5.2.2.3) Schrägagarröhrchen oder -platten (5.3.2.10) und Bebrüten (5.3.2.3) eine Subkultur angelegt. Nach 42 h bis 48 h wird aus der ersten Subkultur eine zweite Subkultur auf gleiche Weise angelegt und 42 h bis 48 h bebrütet. Von dieser zweiten Subkultur aus darf eine dritte Subkultur auf gleiche Weise angelegt werden. Die zweite und (falls hergestellt) die dritte Subkultur ist (sind) die Gebrauchskultur(en).

Falls die Anlegung der zweiten Subkultur an einem bestimmten Tag nicht möglich ist, darf eine 72-h-Subkultur für die weitere Subkultivierung verwendet werden, vorausgesetzt, dass die Subkultur während der 72 h im Brutschrank (5.3.2.3) verblieb.

Eine vierte Subkultur darf nie hergestellt und verwendet werden.

5.4.1.3.2 *Aspergillus niger* (Schimmelpilz)

Bei *Aspergillus niger* (5.3.1) wird nur die erste auf MEA (5.2.2.3) in Roux-Flaschen (5.3.2.15) gewachsene Subkultur verwendet und 9 d bis 11 d bebrütet. Es ist keine weitere Subkultivierung erforderlich.

5.4.1.3.3 Weitere Prüfkeime (Hefen oder Schimmelpilze)

Bei zusätzlichen Prüfkeimen muss jedes Abweichen von diesem Kulturverfahren für die Hefen oder Schimmelpilze oder von der Herstellung der Suspensionen aufgezeichnet werden, wobei die Gründe im Prüfbericht anzugeben sind.

5.4.1.4 Prüfsuspension („N“)

5.4.1.4.1 *Candida albicans*

Das Verfahren zur Herstellung der Prüfsuspension von *Candida albicans* ist wie folgt:

- a) Es werden 10 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) mit 10 g Glasperlen (5.3.2.11) in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Zellen der Gebrauchskulturen (5.4.1.3.1) werden ösenweise in das Verdünnungsmittel (5.2.2.4) gegeben. Die Suspension der Zellen sollte erfolgen, indem man die Öse an der feuchten Wand des Kolbens reibt, um die Zellen voneinander zu trennen, dies erfolgt vor dem Eintauchen in das Verdünnungsmittel. Mit einem mechanischen Schüttelgerät [5.3.2.6 b)] wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in ein anderes Röhrchen überführt.
- b) Die Zellzahl in der Suspension wird mit Verdünnungsmittel (5.2.2.4) auf $1,5 \times 10^7$ bis 5×10^7 KBE/ml⁴⁾ eingestellt; die Anzahl der KBE wird mit einem geeigneten Mittel abgeschätzt. Diese Prüfsuspension ist im Wasserbad bei der Prüftemperatur θ [5.5.1.1 a)] aufzubewahren und innerhalb 2 h zu verwenden.

ANMERKUNG Die Verwendung eines Spektrofotometers zur Einstellung der Zellzahl wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, Küvette mit 10 mm optischer Wegstrecke). Jedes Laboratorium sollte deshalb Kalibrierdaten für jeden Prüfkeim erarbeiten, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte üblicherweise zwischen 0,200 und 0,350 zu finden sind. Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

- c) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit Verdünnungsmittel (5.2.2.4) Verdünnungen von 10^{-5} und 10^{-6} hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

Eine Probe von je 1,0 ml von jeder Verdünnung wird als Doppelbestimmung entnommen und es wird unter Anwendung des Gussplattenverfahrens oder des Oberflächenverfahrens beimpft.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe auf getrennte Petrischalen überführt und es wird mit 15 ml bis 20 ml durch Erwärmen verflüssigtem und auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühltem MEA (5.2.2.3) überschichtet.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe (geteilt in Anteile etwa gleicher Größe) auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) an der Oberfläche getrockneter MEA-Platten (5.2.2.3) ausgestrichen.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.4.2 *Aspergillus niger*

Das Verfahren zur Herstellung der Prüfsuspension von *Aspergillus niger* ist wie folgt:

- a) Aus der Gebrauchskultur (5.4.1.3.2) werden die Sporen in 10 ml steriler 0,05 %iger (W/V) Polysorbat 80-Lösung in Wasser (5.2.2.2) suspendiert. Die Konidiosporen werden mit einem Stab oder Spatel aus Glas von der Oberfläche der Kultur abgelöst. Die Suspension wird in einen Kolben überführt und mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) eine Minute lang leicht mit der Hand geschüttelt. Die Suspension wird durch eine Glasfilterfritte (5.3.2.13) filtriert.
- b) Die mikroskopische Untersuchung bei 400facher Vergrößerung muss unmittelbar nach der Herstellung und dann kurz vor der Prüfung erfolgen, um das Nichtvorhandensein von Myzelfragmenten und Sporenauskeimung nachzuweisen (es sind dafür mindestens zehn Gesichtsfelder zu überprüfen). Bei Vorhandensein ausgekeimter Sporen ist die Suspension zu verwerfen.

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