

DIN EN 1276



ICS 71.100.35

Ersatz für
DIN EN 1276:1997-08

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden
Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in den
Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche
Einrichtungen –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 1276:2009**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical
disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German version EN 1276:2009

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide des antiseptiques
et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans
l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);
Version allemande EN 1276:2009

Gesamtumfang 44 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Die Europäische Norm wurde von der Arbeitsgruppe 3 „Lebensmittelhygiene und Anwendung im Haushalt und öffentlichen Einrichtungen“ (Sekretariat: Frankreich, AFNOR) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird, unter Beteiligung deutscher Experten erarbeitet.

Im DIN Deutsches Institut für Normung e. V. ist der Arbeitsausschuss NA 057-02-03 AA „Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich (DTL)“ im Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) zuständig.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 1276:1997-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Anwendungsbereich präzisiert;
- b) Begriff „bakteriostatische Wirkung“ ergänzt; Begriffe „niedrige und hohe Belastung“ gestrichen;
- c) Anforderungen zur Bebrütungstemperatur der Prüfkeime wurden ergänzt;
- d) Anforderungen an Verfahren zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produktes wurden überarbeitet (5.5), z. B. die Validierungssuspension sowie die Anforderungen an deren Bebrütung und Auszählung neu aufgenommen;
- e) Anforderungen an Versuchsdaten und Berechnung (5.6) überarbeitet;
- f) Anforderungen an die Verifizierung der Verfahrensweise (5.7) neu aufgenommen;
- g) Anhang (normativ) zur Validierung des Verdünnungs-, Neutralisations- und des Membranfiltrationsverfahrens gestrichen;
- h) Anhang C (informativ) zu Verdünnungs-, Neutralisations- und Membranfiltrationsverfahren neu;
- i) Anhang zu Prüfbericht (informativ) überarbeitet;
- j) neuer informativer Anhang zur Präzision des Prüfergebnisses aufgenommen;
- k) Anhang F (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation von Europäischen Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika gestrichen;
- l) Norm wurde redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN 1276: 1997-08

Deutsche Fassung

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

Chemical disinfectants and antiseptics —
Quantitative suspension test for the evaluation of
bactericidal activity of chemical disinfectants and
antiseptics used in food, industrial, domestic and
institutional areas —
Test method and requirements (phase 2, step 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de
l'activité bactéricide des antiseptiques et des désinfectants
chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire,
dans l'industrie, dans les domaines
domestiques et en collectivité —
Méthode d'essai et prescriptions (Phase 2, étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 20. September 2009 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 des CEN 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, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Rumänien, 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: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

Seite

Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen.....	6
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	7
5.1 Kurzbeschreibung	7
5.2 Materialien und Reagenzien	7
5.2.1 Prüfkeime.....	7
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	8
5.3 Apparate und Glaswaren	11
5.3.1 Allgemeines.....	11
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	11
5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und Produktprüflösungen	12
5.4.1 Prüfkeimsuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension).....	12
5.4.2 Produktprüflösungen	14
5.5 Verfahren zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produkts	15
5.5.1 Allgemeines.....	15
5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	16
5.5.3 Membranfiltrationsverfahren	19
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	21
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen.....	21
5.6.2 Berechnung	21
5.7 Verifizierung der Verfahrensweise.....	24
5.7.1 Allgemeines.....	24
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	24
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte.....	25
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision.....	25
5.8.1 Reduktion	25
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	25
5.8.3 Limitierender Prüfkeim und bakterizide Konzentration.....	25
5.8.4 Präzision, Wiederholung.....	26
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	26
5.9.1 Allgemeines.....	26
5.9.2 Bakterizide Wirkung für allgemeine Zwecke.....	26
5.9.3 Bakterizide Wirkung für besondere Zwecke	26
5.10 Prüfbericht.....	27
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	28
Anhang B (informativ) Geeignete Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten.....	29
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens und des Membranfiltrationsverfahrens.....	31
Anhang D (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht	35
Anhang E (informativ) Präzision des Prüfergebnisses	39
Literaturhinweise	42

Vorwort

Dieses Dokument (EN 1276:2009) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis April 2010, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis April 2010 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN 1276:1997.

Es wurde mit folgenden Zielen überarbeitet: Aufnahme der Ergebnisse eines Ringversuchs (ANDISTAND), Behebung offensichtlicher Fehler und Zweideutigkeiten, Harmonisierung des Aufbaus und der Formulierungen mit dem/denen weiterer quantitativer Suspensionsversuche des CEN/TC 216 (bestehend oder in Vorbereitung) sowie Verbesserung der Lesbarkeit der Norm und damit ihrer Verständlichkeit.

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

Einleitung

Diese Europäische Norm legt einen Suspensionsversuch fest, mit dem festgestellt werden soll, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum in den im Anwendungsbereich beschriebenen Bereichen eine bakterizide Wirkung aufweist oder nicht.

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

Die Bedingungen sollen allgemeinen Zwecken dienen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produkten ermöglichen. Jede in diesem Versuch festgestellte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht festgelegten experimentellen Bedingungen. Bei einigen Anwendungsarten können jedoch die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt abweichen, deshalb müssen möglicherweise zusätzliche experimentelle Bedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die bakterizide Wirkung von chemischen Desinfektionsprodukten und antiseptischen Produkten fest, die bei Verdünnung in Wasser standardisierter Härte oder — im Falle gebrauchsfertiger Produkte — in Wasser als homogenes und physikalisch stabiles Präparat vorliegen. Die Produkte können nur bei einer Konzentration von höchstens 80 % geprüft werden, da durch die Zugabe der Prüfkeime und der Belastungssubstanz immer eine bestimmte Verdünnung auftritt.

Das vorliegende Dokument gilt für Produkte, die im Lebensmittelbereich, in der Industrie, im Haushalt und in öffentlichen Einrichtungen genutzt werden; ausgenommen sind Bereiche und Situationen, in denen die Desinfektion medizinisch angezeigt ist und Produkte, die auf lebenden Geweben verwendet werden, hier wiederum außer denen, die zur Handhygiene in den vorstehend genannten Bereichen verwendet werden. Es werden mindestens folgende Bereiche abgedeckt:

a) Verarbeitung, Vertrieb und Verkauf von:

1) Lebensmitteln tierischer Herkunft:

- Milch und Milcherzeugnisse;
- Fleisch und Fleischerzeugnisse;
- Fisch, Meerestiere und zugehörige Erzeugnisse;
- Eier und Eierzeugnisse;
- Tiernahrung;
- usw.;

2) Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft:

- Getränke;
- Obst, Gemüse und zugehörige Erzeugnisse (einschließlich Zucker, Destillationsprodukte usw.);
- Mehl, gemahlene und gebackene Erzeugnisse;
- Tiernahrung;
- usw.;

b) öffentliche Einrichtungen und Haushalt:

- Verpflegungsbetriebe;
- öffentliche Bereiche;
- öffentliche Verkehrsmittel;
- Schulen;
- Kindergärten, Kinderkrippen u. Ä.;
- Geschäfte;
- Sportstätten;
- Abfallbehälter (Mülltonnen usw.);
- Hotels;
- Wohngebäude;
- klinisch nicht kritische Bereiche in Krankenhäusern;
- Büroräume;
- usw.;

c) weitere industrielle Bereiche:

- Verpackungsmaterial;
- Biotechnologie (Hefe, Proteine, Enzyme, usw.);
- Pharmazeutika;
- Kosmetika und Toilettenartikel;
- Textilien;
- Luft- und Raumfahrtindustrie, Computerindustrie;
- usw.

EN 14885 legt im Einzelnen den Zusammenhang zwischen den verschiedenen Prüfungen sowie zu den „Anwendungsempfehlungen“ fest.

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

ANMERKUNG 2 Dieses Verfahren entspricht einer Prüfung der Phase 2, Stufe 1.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments 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 — Aufbewahrung von Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden, mykobakteriziden, sporiziden und fungiziden Wirkung*

EN 14885:2006, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 14885:2006.

4 Anforderungen

Das Produkt muss mindestens eine dezimal-logarithmische (lg-)Reduktion der Lebendkeimzahl um 5 Stufen ergeben, wenn es mit Wasser standardisierter Härte (**5.2.2.7**) oder — im Falle gebrauchsfertiger Produkte — mit Wasser (**5.2.2.2**) verdünnt und nach Abschnitt 5 unter simulierten Bedingungen niedriger Belastung (0,3 g/l Rinderalbuminlösung — **5.2.2.8.2**) oder simulierten Bedingungen hoher Belastung (3 g/l Rinderalbuminlösung — **5.2.2.8.3**) entsprechend der praktischen Anwendung und unter den weiteren obligatorischen Untersuchungsbedingungen (vier ausgewählte Prüfkeime, 20 °C, 5 min bzw. 1 min für die Händedesinfektion) geprüft wurde.

Die bakterizide Wirkung muss unter Anwendung der folgenden vier Prüfkeime bestimmt werden:

- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Escherichia coli*;
- *Staphylococcus aureus*;
- *Enterococcus hirae*.

Sofern angezeigt, muss zusätzlich die spezifische bakterizide Wirkung unter Anwendung weiterer Einwirkzeiten, Temperaturen, Belastungssubstanzen und Prüfkeime (nach 5.2.1, 5.2.2.8 und 5.5.1.1) bestimmt werden, um vorgesehene produktspezifische Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

ANMERKUNG Unter diesen zusätzlichen Bedingungen kann die als Ergebnis definierte Konzentration niedriger sein als die unter den obligatorischen Untersuchungsbedingungen erhaltene.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Probe des Produkts — entweder im Lieferzustand und/oder mit Wasser standardisierter Härte (oder für gebrauchsfertige Produkte mit Wasser) verdünnt — wird zu einer Prüfsuspension von Bakterien in einer Lösung mit Belastungssubstanz gegeben. Das Gemisch wird für $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ (obligatorische Untersuchungsbedingungen) bzw. 1 min (obligatorische Untersuchungsbedingungen für die Händedesinfektion) bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gehalten. Nach Ablauf dieser Einwirkzeit wird ein aliquoter Anteil entnommen, und die bakterizide und/oder bakteriostatische Wirkung in dieser Teilmenge wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder inaktiviert. Das Verfahren der Wahl ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Wenn kein geeignetes Neutralisationsmedium gefunden werden kann, wird die Membranfiltration angewendet. Die Anzahl der überlebenden Bakterien in jeder Probe wird bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahl berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus hirae* als Prüfkeime durchgeführt.

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

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfkeime

Die bakterizide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden Stämme als Prüfkeime bestimmt werden:¹⁾

— <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442;
— <i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536;
— <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538;
— <i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541.

Falls für besondere Anwendungen erforderlich, dürfen zusätzliche Prüfkeime gewählt werden, z. B.:

— <i>Salmonella Typhimurium</i>	ATCC 13311;
— <i>Lactobacillus brevis</i>	DSM 6235;
— <i>Enterobacter cloacae</i>	DSM 6234.

ANMERKUNG Zu Verweisungen auf Stämme aus einigen anderen Kulturensammlungen siehe Anhang A.

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

Die erforderliche Inkubationstemperatur für diese Prüfkeime liegt bei $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ (**5.3.2.3**). Für alle während eines Versuchs sowie dessen Kontrolle und Validierung durchgeführten Inkubationen muss die gleiche Temperatur (entweder 36°C oder 37°C) angewendet werden.

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

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

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

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

ANMERKUNG 1 Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, zur Herstellung von Kulturmedien handelsübliche wasserfreie Materialien zu verwenden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Produkte sollten genauestens befolgt werden.

ANMERKUNG 2 Für jedes Kulturmedium und Reagens sollten Einsatzbeschränkungen festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliert werden und darf kein demineralisiertes Wasser sein.

Die Sterilisation erfolgt im Dampf-Sterilisator (Autoklaven) [**5.3.2.1 a**].

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

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

ANMERKUNG 3 Hinsichtlich des Verfahrens für die Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe **5.2.2.7**.

5.2.2.3 Trypton-Soja-Agar (TSA)

Trypton-Soja-Agar bestehend aus:

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

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

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

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchloridlösung, bestehend aus:

Trypton aus Casein, pankreatisch verdaut	1,0 g;
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g;
Wasser (5.2.2.2)	auf 1 000,0 ml.

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

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

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

ANMERKUNG In Anhang B sind Angaben zu Neutralisationsmedien aufgeführt, die sich für einige Kategorien 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. Die Spülflüssigkeit muss steril, mit der Filtermembran kompatibel und unter den in 5.5.3 beschriebenen Untersuchungsbedingungen durch die Filtermembran filtrierbar sein.

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

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte für die Verdünnung der Produkte

Die Vorgehensweise bei der Herstellung von 1 000 ml Wasser standardisierter Härte ist wie folgt:

- Herstellung der Lösung A: 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) werden in Wasser (5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml verdünnt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Dampf-Sterilisator (Autoklaven) [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Wenn das Sterilisieren angewendet wird, kann es zu einem Flüssigkeitsverlust kommen. In diesem Fall wird das Volumen unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens einen Monat aufbewahrt;
- Herstellung der Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml verdünnt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens eine Woche aufbewahrt;
- in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden (600 bis 700) ml Wasser (5.2.2.2) gegeben, dazu werden 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A und anschließend 8,0 ml Lösung B gegeben. Es wird durchgemischt und mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.4). Falls erforderlich, wird der pH-Wert mit Hilfe einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Chlorwasserstoffsäure (HCl) eingestellt.

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

ANMERKUNG Bei der Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produkts zum Wasser standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas unter 300 mg/l bezogen auf Calciumcarbonat (CaCO_3).

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz muss entsprechend den für das Produkt festgelegten Einsatzbedingungen ausgewählt werden.

Die Belastungssubstanz muss steril sein und mit dem 10-Fachen der Endkonzentration im Versuch hergestellt werden.

Die Ionenzusammensetzung (z. B. pH-Wert, Calcium- und/oder Magnesiumhärte) und die chemische Zusammensetzung (z. B. mineralische Substanzen, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Detergenzien) müssen definiert werden.

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

5.2.2.8.2 Niedrige Belastung (Rinderalbuminlösung — geringe Konzentration)

0,3 g der Rinderalbuminfraktion *V* (geeignet für mikrobiologische Zwecke) werden in 100 ml Wasser (5.2.2.2) aufgelöst.

Es wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert, die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verwendet.

Die Endkonzentration des Rinderalbumins im Prüfverfahren (5.5) beträgt 0,3 g/l.

5.2.2.8.3 Hohe Belastung (Rinderalbuminlösung — hohe Konzentration)

3,0 g der Rinderalbuminfraktion *V* (geeignet für mikrobiologische Zwecke) werden in 100 ml Wasser (5.2.2.2) aufgelöst.

Es wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert, die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verwendet.

Die Endkonzentration des Rinderalbumins im Prüfverfahren (5.5) beträgt 3,0 g/l.

5.2.2.8.4 Milch (Molkereien usw.)

Magermilch, garantiert frei von Antibiotika und Zusatzstoffen sowie im Verhältnis von 100 g Pulver je Liter Wasser (5.2.2.2) rekonstituiert, ist wie folgt herzustellen:

— es wird eine Lösung von 100 g Milchpulver in 1 000 ml Wasser (5.2.2.2) hergestellt. Diese wird für 30 min bei $(105 \pm 3)^\circ\text{C}$ [oder für 5 min bei $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$] erhitzt.

Die Endkonzentration der rekonstituierten Milch im Prüfverfahren (5.5) beträgt 10,0 g/l.

5.2.2.8.5 Hefeextrakt (Brauereien usw.)

Entwässerter Hefeextrakt für bakteriologische Zwecke wird wie folgt zubereitet:

- es wird eine Lösung von 100 g/l in Wasser (5.2.2.2) hergestellt, und der pH-Wert wird mit Natriumhydroxid (NaOH) auf $7,0 \pm 0,2$ eingestellt;
- die Sterilisation erfolgt im Dampf-Sterilisator (Autoklaven) [5.3.2.1 a)].

Die Endkonzentration des Hefeextrakts im Prüfverfahren (5.5) beträgt 10,0 g/l.

5.2.2.8.6 Saccharose (Getränke, Erfrischungsgetränke-Industrie)

Es wird eine Lösung von 100 g/l Saccharose in Wasser (5.2.2.2) hergestellt und durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert.

Die Endkonzentration der Saccharose im Prüfverfahren (5.5) beträgt 10,0 g/l.

5.2.2.8.7 Pufferlösungen mit einem pH-Wert von 5,0 bzw. 9,0 (Umlaufreinigung usw.)

Die verwendete Pufferlösung muss im Prüfbericht beschrieben und die pH-Werte müssen aufgezeichnet werden. Der End-pH-Wert in den Reagenzgläsern (mit den Prüfkeimen und dem Produkt) muss kontrolliert werden und $5,0 \pm 0,2$ bzw. $9,0 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.8.8 Natriumlaurylsulfat (kosmetische Industrie usw.)

Es wird eine Lösung von 50 g/l Natriumlaurylsulfat ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) in Wasser (5.2.2.2) hergestellt. Die Sterilisation erfolgt im Dampf-Sterilisator (Autoklaven) [5.3.2.1 a)].

Die Endkonzentration von Natriumlaurylsulfat im Prüfverfahren (5.5) beträgt 5,0 g/l.

5.3 Apparate und Glaswaren

5.3.1 Allgemeines

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

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

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²⁾

und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Sterilisator:

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

2) Sterile Einwegmaterialien sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, auf $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (um den TSA für den Fall des Gussplattenverfahrens im geschmolzenen Zustand zu halten) und auf zusätzliche Prüftemperaturen $\pm 1 ^\circ\text{C}$ (**5.5.1**).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (**5.2.1**).

5.3.2.4 pH-Messgerät, kalibriert auf $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

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

5.3.2.5 Stoppuhr

5.3.2.6 Schüttelgerät

a) **elektromechanisches Schüttelgerät**, 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 mit einem Filterhalter mit einem Mindestvolumen von 50 ml ausgestattet sein. Es muss geeignet sein für die Anwendung mit Filtern eines Durchmessers von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von $0,45 \mu\text{m}$ zur Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (**5.2.2.7**), Rinderalbumin (**5.2.2.8.2** und **5.2.2.8.3**) und Saccharose (**5.2.2.8.6**) und für den Fall der Anwendung des Membranfiltrationsverfahrens (**5.5.3**).

Die verwendete Vakuumquelle muss eine gleichmäßige Filtrationsdurchflussrate gewährleisten. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen über die Membran zu erreichen und einen zu lange andauernden Filtrationsvorgang zu vermeiden, muss das Gerät so eingestellt werden, dass 100 ml der Spülflüssigkeit in (20 bis 40) s filtriert werden.

5.3.2.8 Kühltank, einstellbar auf (2 bis 8) $^\circ\text{C}$.

5.3.2.9 Graduierte Messpipetten mit einem Nennfassungsvermögen von (10, 1 und 0,1) ml oder kalibrierte automatische Pipetten.

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

5.3.2.11 Glaskügelchen, mit einem Durchmesser von (3 bis 4) mm.

5.3.2.12 Messkolben.

5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und Produktprüflösungen

5.4.1 Prüfkeimsuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüfkeim müssen zwei verschiedene Suspensionen hergestellt werden: die „Prüfsuspension“ zur Durchführung der Prüfung und die „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrollversuche und der Verfahrensvalidierung.

3) Vortex[®] ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.