

DIN EN 13623



ICS 71.100.35

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden
Wirkung gegen *Legionella* von chemischen Desinfektionsmitteln für
wasserführende Systeme –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 13623:2010**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity against *Legionella* of
chemical disinfectants for aqueous systems –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German version EN 13623:2010

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide contre des
légionelles des désinfectants chimiques pour les systèmes aqueux –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);
Version allemande EN 13623:2010

Gesamtumfang 38 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm (EN 13623:2010) wurde von der Arbeitsgruppe 1 „Humanmedizin“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der Arbeitsgruppe 1 des CEN/TC 216 wird über den Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) wahrgenommen.

Deutsche Fassung

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der
bakteriziden Wirkung gegen *Legionella* von chemischen
Desinfektionsmitteln für wasserführende Systeme —
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)

Chemical disinfectants and antiseptics —
Quantitative suspension test for the evaluation of
bactericidal activity against *Legionella* of chemical
disinfectants for aqueous systems —
Test method and requirements (phase 2, step 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de
l'activité bactéricide contre des *légi*onelles des
désinfectants chimiques pour les systèmes aqueux —
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 15. April 2010 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, Kroatien, 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.....	5
3 Begriffe	5
4 Anforderungen	5
5 Prüfverfahren	6
5.1 Kurzbeschreibung	6
5.2 Materialien und Reagenzien	6
5.2.1 Prüfkeim.....	6
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	7
5.3 Apparate und Glasgeräte	11
5.3.1 Allgemeines.....	11
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	11
5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüfkeime und der Prüflösungen	12
5.4.1 Suspensionen der Prüfkeime (Prüf- und Validierungssuspension).....	12
5.4.2 Produktprüflösung.....	13
5.5 Verfahren zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produkts	14
5.5.1 Allgemeines	14
5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	15
5.5.3 Membranfiltrationsverfahren	17
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	19
5.6.1 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen	19
5.6.2 Berechnung	20
5.7 Verifizierung des Verfahrens	24
5.7.1 Allgemeines.....	24
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	24
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte.....	24
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision.....	25
5.8.1 Keimreduktion.....	25
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	25
5.8.3 Bakterizide Konzentration	25
5.8.4 Präzision, Wiederholung.....	25
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	25
5.9.1 Allgemeines.....	25
5.9.2 Bakterizide Wirkung für allgemeine Zwecke.....	26
5.9.3 Bakterizide Wirkung für besondere Zwecke	26
5.10 Prüfbericht.....	26
Anhang A (informativ) Bestimmung der bakteriziden Wirkung gegen <i>Legionella pneumophila</i>	28
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien	30
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung der Prüfverfahren.....	32
C.1 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	32
C.2 Membranfiltrationsverfahren	34
Literaturhinweise	36

Vorwort

Dieses Dokument (EN 13623:2010) 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 März 2011, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis März 2011 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.

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, Kroatien, 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 zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel im Rahmen der im Anwendungsbereich beschriebenen Anwendungsgebiete eine bakterizide Wirkung gegen *Legionella pneumophila* aufweist, fest. Die vorliegende Norm wurde speziell für Produkte zur Wasseraufbereitung erarbeitet, es ist jedoch auch möglich, sie auf andere Produkte anzuwenden.

Die Proliferation von *Legionella* tritt nur unter bestimmten Bedingungen in Gewässern auf und stellt überwiegend als Aerosol ein Risiko dar. Viele wasserführende Systeme erfordern keine Aufbereitung. Eine Entscheidung über die Zugabe chemischer Desinfektionsmittel zu einem beliebigen Wasser sollte auf einer Risikobeurteilung beruhen.

Wenn das Produkt die Anforderungen der vorliegenden Norm erfüllt, kann es als bakterizid gegen *Legionella pneumophila* angesehen werden, aber daraus sollte nicht zwangsläufig abgeleitet werden, dass das Produkt ohne Berücksichtigung anderer relevanter Faktoren, wie z. B. pH-Wert, Wasser, chemische Eigenschaften, Temperatur und biologischer Verschmutzungsgrad am Anwendungsort, für einen spezifischen Anwendungsort annehmbar ist. Die Norm berücksichtigt nicht die durch einen Biofilm auf den Organismen bedingte Schutzwirkung.

Die Untersuchungsbedingungen sollen allgemeinen Ansprüchen genügen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten ermöglichen. Jede in diesem Versuch gefundene Konzentration des chemischen Desinfektionsmittels entspricht festgelegten Untersuchungsbedingungen. Bei einigen Anwendungsarten können jedoch die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt unterschiedlich sein und deshalb müssen zusätzliche Untersuchungsbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die bakterizide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln zur Verwendung bei der Aufbereitung in wasserführenden Systemen gegen *Legionella pneumophila* fest, die bei Verdünnung mit gepuffertem eisenhaltigem Wasser standardisierter Härte oder Wasser standardisierter Härte als homogenes, physikalisch stabiles Präparat vorliegen. Immer wenn *Legionella pneumophila* ein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellt, ist dieses Verfahren für in Kühltürmen genutztes Wasser und Wasser für allgemeine Zwecke, wie z. B. Bäder, Schwimm- und Badebecken, Duschen und andere Zwecke, geeignet. Das Verfahren ist nicht für die elektrochemische Desinfektion geeignet.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die zur Wasseraufbereitung verwendet werden, um *Legionella pneumophila* abzutöten.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren dient zur Bestimmung der Wirksamkeit von handelsüblichen Zubereitungen oder Wirkstoffen unter den Bedingungen, unter denen sie angewendet werden.

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

ANMERKUNG 3 Das vorliegende Verfahren berücksichtigt nicht die Tatsache, dass *Legionella pneumophila* oft in Zellen von Amöben und/oder Biofilmen zu finden ist und das dadurch die Wirksamkeit des Produkts gegen die Bakterien möglicherweise verringert ist.

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

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 14885 und die folgenden Begriffe.

3.1

Kühlwasser

Wasser zur Reduzierung der Hitze in einem Prozess oder in der Umwelt

3.2

Wasser für allgemeine Zwecke

Wasser, das unter anderen Voraussetzungen verwendet wird als Kühlwasser

4 Anforderungen

Für das Produkt, das mit gepuffertem eisenhaltigem Wasser standardisierter Härte (**5.2.2.10**) oder Wasser standardisierter Härte (**5.2.2.7**) verdünnt und nach Abschnitt 5 unter den obligatorischen Untersuchungsbedingungen (ein gewählter Prüfkeim, bei entweder 20 °C oder 30 °C) innerhalb von 60 min bei Produkten mit schneller bakterizider Wirkung oder 15 h bei Produkten mit langsamerer bakterizider Wirkung geprüft wurde, muss mindestens eine dezimal-logarithmische (lg) Reduktion der Lebendkeimzahl um vier Stufen nachgewiesen werden.

Die bakterizide Wirkung ist unter Verwendung des folgenden Prüfkeims zu bewerten: *Legionella pneumophila*.

Wo es angezeigt ist, muss die spezifische bakterizide Wirkung zusätzlich unter Anwendung anderer Einwirkzeiten und Prüfkeime (in Übereinstimmung mit 5.2.1 und 5.5.1.1) bestimmt werden, um besondere vorge-sehene Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

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

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7 oder 5.2.2.10) verdünnte Probe des Produkts wird zu einer Prüfsuspension von Bakterien in einer Lösung von Belastungssubstanzen gegeben. Das Gemisch wird für $60 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ oder $(15 \pm 1) \text{ h}$ bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ oder $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ gehalten (obligatorische Untersuchungsbedingungen). Am Ende der gewählten Einwirkzeit wird ein aliquoter Anteil entnommen und die bakterizide und/oder bakteriostatische Wirkung dieses Anteils wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. 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 unter Verwendung von *Legionella pneumophila* als Prüfkeim (obligatorische Untersuchungsbedingungen) durchgeführt.

5.1.3 Zusätzliche und wahlfreie Einwirkzeiten sind festgelegt. Zusätzliche Prüfkeime dürfen verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfkeim

Die bakterizide Wirkung ist unter Verwendung des folgenden Stammes als Prüfkeim¹⁾ zu ermitteln: *Legionella pneumophila*: Serogruppe 1, Philadelphia (NCTC 11192, ATCC 33152).

Falls für bestimmte Anwendungen erforderlich, dürfen zusätzliche Prüfkeime verwendet werden, z. B. *Legionella pneumophila*, Serogruppe 1, Benidorm (NCTC 12006, ATCC 43108).

Die erforderliche Bebrütungstemperatur für diesen Prüfkeim 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 Bebrütungen muss die gleiche Temperatur (entweder $36 ^\circ\text{C}$ oder $37 ^\circ\text{C}$) angewendet werden.

Wenn zusätzliche Prüfkeime verwendet werden, müssen sie unter den im Prüfbericht angeführten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Zeit, Atmosphäre, Medien) 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 Kultursammlung für fünf Jahre als Referenzprobe zurückgestellt werden.

1) Die NCTC- und ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von der National Type Culture Collection (NCTC) und 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.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Sofern nicht speziell angeführt, beziehen sich alle in dieser Norm angegebenen Massen chemischer Substanzen auf die wasserfreien Salze. Wasserhaltige Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um daraus folgende Differenzen in den relativen Molekülmassen zu berücksichtigen.

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

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

ANMERKUNG 2 Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte ein Endverbrauchsdatum festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliert werden und darf nicht nur entmineralisiertes Wasser sein. Falls destilliertes Wasser geeigneter Qualität nicht zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionslösungen (Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

Sterilisation im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG Hinsichtlich des Verfahrens für die Herstellung von gepuffertem eisenhaltigem Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.10.

5.2.2.3 Gepuffertes Aktivkohle-Hefeextrakt-Agar (en: Buffered Charcoal Yeast Extract B (BCYE-Agar))

BCYE-Agar, der aus Folgendem besteht:

— Hefeextrakt (Reinheit für bakteriologische Untersuchungen)	10,0 g;
— Agar	12,0 g;
— Aktivkohle	2,0 g;
— α -Ketoglutarat, Monokaliumsalz	1,0 g;
— ACES-Pufferlösung (N-2-Acetamido-2-aminoethansulfonsäure)	10,0 g;
— Kaliumhydroxid (KOH) (Plätzchen)	2,8 g;
— L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat	0,4 g;
— Eisen(III)-pyrophosphat [$\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$]	0,25 g;
— Destilliertes Wasser	bis auf 1 000,0 ml.

Herstellung

a) Cystein- bzw. Eisenlösung

Es sind frische Lösungen von *L*-Cysteinhydrochlorid und Eisen(III)-pyrophosphat herzustellen, indem 0,4 g bzw. 0,25 g zu 10-ml-Volumina Wasser (**5.2.2.2**) hinzugefügt werden. Jede Lösung ist durch Membranfiltration (**5.3.2.7**) zu sterilisieren. Die Lösungen sind in sauberen sterilen Behältern bei $(20 \pm 3)^\circ\text{C}$ für höchstens 3 Monate aufzubewahren.

b) ACES-Pufferlösung

Die ACES-Körnchen sind zu 500 ml Wasser (**5.2.2.2**) zu geben und durch Stehen in einem Wasserbad bei 45°C bis 50°C zu lösen. Zu weiteren 480 ml Wasser (**5.2.2.2**) sind die gesamten Kaliumhydroxid-Plättchen zu geben und durch vorsichtiges Schütteln zu lösen. Zur Herstellung der ACES-Pufferlösung sind die beiden Lösungen zu mischen.

ANMERKUNG 1 Die ACES-Pufferlösung kann zu einer Denaturierung des Hefeextrakts führen, wenn die nachfolgende Reihenfolge nicht eingehalten wird.

c) Endmedium

Zu den 980 ml ACES-Pufferlösung sind nacheinander die Aktivkohle, der Hefeextrakt und α -Ketoglutarat hinzuzufügen. Durch Lösen von 5,6 g Kaliumhydroxid (KOH) in 1 l Wasser (**5.2.2.2**) ist eine Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mol/l herzustellen. Durch vorsichtige Zugabe von 5,3 ml Schwefelsäure (H_2SO_4) zu 1 l Wasser (**5.2.2.2**) ist eine Schwefelsäure-Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mol/l herzustellen. Je nach Bedarf ist die Kaliumhydroxid-Lösung oder die Schwefelsäure-Lösung, jeweils mit einer Konzentration von 0,1 mol/l, zum Einstellen des pH-Wertes auf $6,9 \pm 0,2$ zu verwenden. Der Agar ist hinzuzufügen, alles ist zu vermischen und zu autoklavieren [**5.3.2.1 a**]. Nach dem Autoklavieren ist das Gemisch in einem Wasserbad (**5.3.2.2**) auf $(47 \pm 2)^\circ\text{C}$ abkühlen zu lassen.

Die *L*-Cystein- und Eisen(III)-pyrophosphat-Lösungen sind aseptisch hinzuzufügen, wobei zwischen den Zugaben gut zu mischen ist.

20-ml-Volumina sind in Petrischalen mit einem Durchmesser von 90 mm bis 100 mm zu verteilen. Der pH-Wert des Endmediums beträgt bei 25°C $6,9 \pm 0,2$. Überschüssige Feuchtigkeit auf den Platten ist trocknen zu lassen und die Platten sind in luftdichten Behältern im Dunkeln bei $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ für bis zu vier Wochen zu lagern.

Ein längeres Erhitzen während der Sterilisation oder ein Erhitzen auf eine zu hohe Temperatur sind zu vermeiden, weil das den Nährwert des BCYE-Mediums beeinträchtigen kann. Schwankungen zwischen den Chargen der Bestandteile des Mediums (insbesondere α -Ketoglutarat) können ebenfalls dessen Leistungsverhalten beeinflussen. Deshalb ist es unbedingt notwendig, die Qualität jeder neu hergestellten Mediencharge auf deren Fähigkeit zu prüfen, das Wachstum des Prüfkeims innerhalb einer Bebrütungsdauer von drei Tagen zu fördern, wobei die Validierungssuspension N_V (**5.4.1.5**) verwendet wird.

ANMERKUNG 2 Die Eignung der Medien zur Unterstützung des Wachstums von *Legionella* sollte quantitativ abgeschätzt werden entweder durch bekannte Quantitäten des obligatorischen *Legionella*-Stammes oder durch direkten Vergleich mit früheren Chargen. Kommerziell erhältliche Medien dürfen ohne Prüfung verwendet werden, wenn die Leistungsfähigkeit in einem Labor geprüft wurde, dass nach EN ISO/IEC 17025:2005 für diesen Zweck akkreditiert wurde.

5.2.2.4 BCYE-Bouillon

Die Bouillon ist nach dem gleichen Verfahren wie BCYE-Agar (**5.2.2.3**) herzustellen, jedoch ohne Zugabe von Agar.

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 angeführt, 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. 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 angeführt, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte für allgemeine Zwecke (en: hard water for general purpose, HWGP)

Zur Herstellung von 1 l Wasser standardisierter Härte ist wie folgt zu verfahren:

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

Das Wasser standardisierter Härte ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

ANMERKUNG 1 Bei Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produkts in dieses 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).

ANMERKUNG 2 Dieses Wasser standardisierter Härte stellt die typische Beschaffenheit von Wasser dar, das nicht als Kühlwasser verwendet wird.

5.2.2.8 Belastungssubstanz (Hefeextrakt)

- Hefeextrakt 0,5 g;
- Wasser bis auf 1 000,0 ml.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

Die Endkonzentration des Hefeextrakts in der Prüfung beträgt 0,000 5 %.

5.2.2.9 Salzlösung nach Page

Salzlösung, die aus Folgendem besteht:

— Natriumchlorid (NaCl)	0,120 g;
— Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,004 g;
— Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,004 g;
— Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	0,142 g;
— Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	0,136 g;
— Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

ANMERKUNG Zur Unterstützung einer genauen Herstellung wird empfohlen, ein Volumen von 10 l der Salzlösung nach Page herzustellen und auf kleinere Volumina aufzuteilen, wie sie für das Autoklavieren erforderlich sind. Alternativ dürfen die Salzlösungen einzeln in konzentrierter Form hergestellt und bei Bedarf entsprechend verdünnt werden.

5.2.2.10 Gepuffertes eisenhaltiges Wasser standardisierter Härte zur Aufbereitung von Kühlwasser (en: buffered ferrous hard water for treatment of cooling water, BFHW)

Zur Herstellung von 1 l BFHW ist wie folgt zu verfahren:

- Herstellung von Lösung A: Es werden 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Wenn das Autoklavieren angewendet wird, kann es zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall ist das Volumen unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufzufüllen. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einem Monat aufbewahren.
- Herstellung von Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einer Woche aufbewahren.
- In einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) gegeben, dazu gegeben werden 70 ml 0,2 M Borsäure (13,6 g Borsäure werden mit destilliertem Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt), 30 ml 0,05 M Borax (19,07 g Borax werden mit destilliertem Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt) und 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A sowie danach 8,0 ml Lösung B. Abschließend wird 1,0 ml Eisen(III)-sulfat-Lösung ($3,0 \times 10^{-3}$ mol/l) hinzugefügt. Nach Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, $8,0 \pm 0,2$ betragen (5.3.2.4). Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7).

Das Wasser standardisierter Härte ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

ANMERKUNG 1 Bei Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produkts in dieses 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).