

DIN EN 14349



ICS 71.100.35

Ersatz für
DIN EN 14349:2008-05

**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**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative surface test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants
and antiseptics used in the veterinary area on non-porous surfaces without mechanical
action –
Test method and requirements (phase 2, step 2);
German version EN 14349:2012

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de surface pour l'évaluation de l'activité bactéricide des antiseptiques et
des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire sur des surfaces non
poreuses sans action mécanique –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2);
Version allemande EN 14349:2012

Gesamtumfang 38 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Die Europäische Norm wurde von der Arbeitsgruppe 2 „Anwendung im Veterinärbereich“ (Sekretariat: Vereinigtes Königreich, BSI) 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 14349:2008-05 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Einleitung und Anwendungsbereich präzisiert;
- b) für die Anwendung dieser Norm gelten die Begriffe nach EN 14885;
- c) Präzisierung der Anforderungen (4) hinsichtlich der Prüfbedingungen und der mykobakteriziden Wirkung (Tabelle neu aufgenommen);
- d) Kurzbeschreibung (5.1) sowie Materialien und Reagenzien (5.2) wurden überarbeitet;
- e) Apparate und Geräte (5.3) aktualisiert;
- f) Beschreibung der Herstellung der Mykobakterien-Prüfsuspension und der Produktprüflösungen wurden überarbeitet (5.4.1), z. B. wurden die Validierungssuspension sowie die Anforderungen an deren Bebrütung und Auszählung neu aufgenommen;
- g) Verfahrensablauf zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produktes (5.5) neu gestaltet und überarbeitet;
- h) Anforderungen an Versuchsdaten und Berechnung (5.6) überarbeitet;
- i) Anforderungen an die Verifizierung der Verfahrensweise (5.7) neu aufgenommen;
- j) Interpretation der Ergebnisse – Schlussfolgerung (5.9) aktualisiert;
- k) Anhang A zur Validierung der Verdünnungsneutralisation (normativ) gestrichen;
- l) Anhang zur Graphischen Darstellung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens (informativ) neu;
- m) Anhang zu Prüfbericht (informativ) und Anhang zu Neutralisationsmedien (informativ) überarbeitet;
- n) Anhang E (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation von Europäischen Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika gestrichen;
- o) Norm wurde redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN 14349: 2004-12, 2008-01, 2008-05

Deutsche Fassung

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)

Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative
surface test for the evaluation of bactericidal activity of
chemical disinfectants and antiseptics used in the
veterinary area on non-porous surfaces without mechanical
action - Test method and requirements (phase 2, step 2)

Antiseptiques et désinfectants chimiques - Essai quantitatif
de surface pour l'évaluation de l'activité bactéricide des
antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans
le domaine vétérinaire sur des surfaces non poreuses sans
action mécanique - Méthode d'essai et prescriptions (phase
2, étape 2)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 22. September 2012 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-CENELEC 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, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, 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, der Türkei, 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	7
5.2.1 Prüfkeime.....	7
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	7
5.2.3 Prüffläche	10
5.3 Apparate und Glasgeräte	10
5.3.1 Allgemeines	10
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	10
5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und der Produktprüflösungen.....	11
5.4.1 Prüfkeimsuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension).....	11
5.4.2 Produktprüflösungen	13
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produkts.....	14
5.5.1 Allgemeines	14
5.5.2 Prüfverfahren (Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren)	15
5.5.3 Beurteilung des Agars mit den Prüfflächen.....	18
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	18
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen.....	18
5.6.2 Berechnung	19
5.7 Verifizierung des Verfahrens	22
5.7.1 Allgemeines	22
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	22
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte.....	22
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	23
5.8.1 Keimreduktion.....	23
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	23
5.8.3 Limitierender Prüfkeim und bakterizide Konzentration.....	23
5.8.4 Präzision, Wiederholungen.....	23
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	23
5.9.1 Allgemeines	23
5.9.2 Bakterizide Wirkung für allgemeine Zwecke.....	24
5.9.3 Eignung für bestimmte Anwendungsgebiete	24
5.10 Prüfbericht.....	24
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Kultursammlungen.....	26
Anhang B (informativ) Beispiele von Neutralisationsmedien für die verbleibende antimikrobielle Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika	27
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung des Verfahrens	28
Anhang D (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht	32
Literaturhinweise	36

Vorwort

Dieses Dokument (EN 14349:2012) 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 Mai 2013, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 2013 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 14349:2007.

Durch die Verwendung der früheren Fassung EN 14349 erhaltene Daten dürfen weiter verwendet werden.

Das Dokument wurde überarbeitet, um offensichtliche Fehler und Zweideutigkeiten zu beheben, den Aufbau und die Formulierungen mit dem/denen weiteren Prüfungen des CEN/TC 216 (bestehend oder in Vorbereitung) zu harmonisieren sowie die Lesbarkeit der Norm und damit ihre Verständlichkeit zu verbessern.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, 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, Türkei, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

Diese Europäische Norm legt einen Oberflächenversuch zur Ermittlung fest, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum in dem/den im Anwendungsbereich beschriebenen Bereich und Gebieten eine bakterizide Wirkung aufweist.

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 Ansprüchen genügen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten ermöglichen. Jede in dieser Prüfung festgestellte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht den gewählten Untersuchungsbedingungen. Für einige Anwendungszwecke können jedoch die Gebrauchsanweisungen für ein Produkt abweichen, und deshalb müssen zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die bakterizide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte oder — im Fall gebrauchsfertiger Produkte — mit Wasser eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung bilden.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die im Veterinärbereich auf nicht-porösen Oberflächen ohne mechanische Wirkung angewendet werden, d. h. bei der Aufzucht, Haltung, Produktion und beim Transport von Tieren sowie bei der Tierkörperbeseitigung, außer wenn die Tiere nach der Tötung durch Zuführung in die weiterverarbeitende Industrie in die Nahrungsmittelkette eintreten.

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

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren ist für die Bestimmung der Wirkung von handelsüblichen Zubereitungen oder Wirkstoffen unter den Bedingungen, unter denen sie verwendet werden, bestimmt.

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

Dieses Verfahren kann nicht angewendet werden, um die Wirkung von Produkten gegen Mykobakterien zu bewerten.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, 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, *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.

4 Anforderungen

Bei Prüfung in Übereinstimmung mit Tabelle 1 und Abschnitt 5, unter Simulierung von Verschmutzung niedrigen Grades (3,0 g/l Rinderserumalbumin) oder Verschmutzung hohen Grades (10 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Rinderserumalbumin) auf einer Oberfläche muss für das Produkt eine dezimal-logarithmische (Ig-)Reduktion der Lebendkeimzahl gegenüber einem Kontrollversuch mit Wasser um mindestens 4 Stufen nachgewiesen werden.

Tabelle 1 — Obligatorische und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Bakterizide Wirkung auf nicht-porösen Oberflächen ohne mechanische Wirkung im Veterinärbereich
Prüfkeim	<i>Enterococcus hirae</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>
a) obligatorisch	
b) zusätzlich	jeder geeignete Prüfkeim
Prüftemperatur	
a) obligatorisch	(10 ± 1) °C
b) zusätzlich	(4 ± 1) °C; (20 ± 1) °C; (40 ± 1) °C
Einwirkzeit	
a) obligatorisch	30 min ± 10 s
b) zusätzlich	1 min ± 5 s, 5 min ± 10 s, 60 min ± 10 s
Belastungssubstanz	
a) obligatorische Verschmutzung niedrigen Grades	3,0 g/l Rinderserumalbumin
Verschmutzung hohen Grades	10 g/l Hefeextrakt plus 10 g/l Rinderserumalbumin
b) zusätzlich	jede geeignete Substanz
Die in Tabelle 1 angeführte obligatorische Einwirkzeit für Oberflächendesinfektionsmittel wurde gewählt, um einen Vergleich von Standardbedingungen zu ermöglichen.	
Die empfohlene Einwirkzeit für die Anwendung des Produktes liegt in der Verantwortung des Herstellers.	
ANMERKUNG Bei den zusätzlichen Bedingungen kann die als Ergebnis festgelegte Konzentration niedriger sein als die unter den obligatorischen Prüfbedingungen erhaltene Konzentration.	

Eine beliebige zusätzliche spezifische bakterizide Wirkung muss nach 5.2.1 und 5.5.1.1 bestimmt werden, um besondere bestimmungsgemäße Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Eine Prüfsuspension von Bakterien gemischt mit der Belastungssubstanz wird auf die Prüffläche inokuliert und trocknen gelassen. Nach der Trocknungszeit wird 0,1 ml des Produkts so auf die Oberfläche aufgebracht, dass der getrocknete Film bedeckt wird. Die Fläche wird über eine festgelegte Einwirkdauer bei einer festgelegten Temperatur gehalten, wie in Abschnitt 4 und 5.5.1.1 festgelegt. Nach Ablauf der Einwirkzeit wird die Prüffläche in ein Neutralisationsmedium überführt, so dass die Wirkung des Desinfektionsmittels unmittelbar neutralisiert wird. Die Anzahl überlebender Keime, die von der Prüffläche zurückgewonnen werden können, wird quantitativ bestimmt.

Die Anzahl der Bakterien auf einer mit Wasser anstelle des Desinfektionsmittels behandelten Fläche wird ebenfalls bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahl berechnet.

Die Prüfung wird unter Verwendung von *Enterococcus hirae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* als Prüfkeime durchgeführt (Abschnitt 4, Tabelle 1).

Zusätzliche und optionale Einwirkzeiten und Temperaturen sind festgelegt (Abschnitt 4, Tabelle 1). Zusätzliche Belastungssubstanzen und Prüfkeime dürfen verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfkeime

Zur Ermittlung der bakteriziden Wirkung sind die folgenden Stämme¹⁾ zu verwenden:

<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541;
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13315;
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442;
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538.

ANMERKUNG Zum Verweis auf Stämme in einigen anderen Kultursammlungen siehe Anhang A.

Die erforderliche Bebrütungstemperatur 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 einer Prüfung sowie deren 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 in einem Referenz-Zentrum klassifiziert wurden, müssen Merkmale zu ihrer Identifizierung angegeben werden. Außerdem müssen sie von dem Prüflaboratorium oder der nationalen Kultursammlung für fünf Jahre zu Referenzzwecken aufbewahrt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in dieser Europäischen Norm angegebenen Gewichtsangaben von chemischen Substanzen beziehen sich auf wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Gewichtsangaben müssen angepasst werden, um daraus resultierende Differenzen in den relativen Molekülmassen zu berücksichtigen.

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

Wenn die zusätzlichen Stämme nicht auf den Kulturmedien (5.2.2.3) wachsen oder nicht mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) verwendet werden können, sind zusätzliche Medien zu verwenden und im Prüfbericht anzugeben, ebenso wie zusätzliche Bebrütungsbedingungen.

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

Gebrauchsfertige Medien dürfen verwendet werden, wenn sie mit den notwendigen Anforderungen übereinstimmen.

Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte ein Verfallsdatum festgelegt werden.

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

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes und nicht demineralisiertes Wasser sein. Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, darf Wasser für Injektionszwecke (siehe Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

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

ANMERKUNG Hinsichtlich des Verfahrens zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.6.

5.2.2.3 Trypton-Soja-Agar (TSA)

Trypton-Soja-Agar, bestehend aus:

Trypton, tryptisch verdautes Casein	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)	bis zu 1 000 ml.

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

Wenn Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auftreten, ist es möglicherweise erforderlich, dem TSA Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält eine Anleitung zu den Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen. Es wird empfohlen, kein Neutralisationsmedium zu verwenden, das zu einer Trübung im Agar führt.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

Trypton, tryptisch verdautes Casein	1,0 g;
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g;
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000 ml.

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

5.2.2.5 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 Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.6 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

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

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

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

ANMERKUNG Bei Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produktes zum Wasser standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte, angegeben als Calciumcarbonat (CaCO_3), im Reagenzglas unter 375 mg/l.

5.2.2.7 Belastungssubstanzen

5.2.2.7.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz muss nach den für das Produkt festgelegten Anwendungsbedingungen ausgewählt werden.

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem Doppelten der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

Für alle weiteren Belastungssubstanzen sind die Ionenzusammensetzung (z. B. pH-Wert, Calcium- und/oder Magnesiumhärte) und die chemische Zusammensetzung (z. B. Mineralstoffe, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Detergenzien) festzulegen.

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

5.2.2.7.2 Verschmutzung niedrigen Grades (Rinderserumalbumin-Lösung)

In einem 100-ml-Messkolben werden 0,6 g Rinderserumalbumin V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) in 90 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst. Es wird mit Wasser (5.2.2.2) bis zur Marke aufgefüllt.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7), die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verwendet.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins im Prüfverfahren (5.5) beträgt 3 g/l.

5.2.2.7.3 Verschmutzung hohen Grades (Gemisch aus Rinderserumalbumin-Lösung und Hefeextrakt)

- a) In einem 250-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 10 g Hefeextrakt-Pulver in 150 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst und es wird gewartet, bis der Schaum sich aufgelöst hat. Mit Wasser (5.2.2.2) wird bis zur Marke aufgefüllt. Das Gemisch wird in eine saubere trockene Flasche überführt und im Autoklaven [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Danach wird auf $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ abgekühlt.
- b) 25 ml dieser Lösung werden in einen 50-ml-Messkolben (5.3.2.12) pipettiert und 10 ml Wasser (5.2.2.2) zugegeben. 1 g Rinderserumalbumin wird unter Schütteln in der Lösung im Kolben gelöst und es wird gewartet, bis der Schaum sich aufgelöst hat. Mit Wasser (5.2.2.2) wird bis zur Marke aufgefüllt und durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Das Gemisch wird in 10-ml-Portionen im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verwendet.

Die Endkonzentration im Prüfverfahren (5.5) beträgt 10 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Rinderserumalbumin.

5.2.3 Prüffläche

Scheiben aus nichtrostendem Stahl 304 (von 2 cm Durchmesser), beidseitig auf Grad 2 poliert. Die Oberflächen sollten eben sein.

Die Prüfflächen sollten nur einmal verwendet werden.

Vor der Verwendung sollten die Prüfflächen für 60 min in ein Becherglas (Mindestfassungsvermögen 50 ml) gelegt werden, das mindestens 20 ml 5%iges Decon^{®2)} enthält. Sie werden danach sofort 10 s unter laufendem frisch destilliertem Wasser gespült.

Die Prüfflächen dürfen zwischenzeitlich in keiner Weise trocknen. Sie sind nur mit der Pinzette zu handhaben. Die Prüfflächen werden weitere 10 s unter fließendem Wasser gespült, um die vollständige Beseitigung des Detergens sicherzustellen. Dabei ist zu gewährleisten, dass der Keimträger unter fließendem Wasser gespült wird und der Wasserstrom dabei etwa 2 000 ml/min beträgt. Die sauberen Prüfflächen werden für 15 min in ein Bad mit 95%igem 2-Propanol gelegt. Nach dem Herausnehmen durch Verdunsten trocknen.

5.3 Apparate und Glasgeräte

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, nach einem der folgenden Verfahren zu sterilisieren:

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

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung³⁾

und besonders folgende Geräte:

-
- 2) Decon[®]-Konzentrat ist bei Decon Laboratories Ltd., Conway Street, Hove, East Sussex, BN3 3LY, Großbritannien, erhältlich. Tel. 01273 756598. Es wurde durch Studien nachgewiesen, dass dieses Reinigungsverfahren zufriedenstellend ist. Ein geeignetes „generisches“ Präparat wird auf einer späteren Stufe festgelegt werden.
 - 3) Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.