

DIN EN 14675

ICS 71.100.35

Ersatz für
DIN EN 14675:2006-04

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden
Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den
Veterinärbereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 14675:2015**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity of chemical
disinfectants and antiseptics used in the veterinary area –
Test method and requirements (Phase 2, step 1);
German version EN 14675:2015

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité virucide des antiseptiques et
des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);
Version allemande EN 14675:2015

Gesamtumfang 36 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm (EN 14675:2015) 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.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-02-03 AA „Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich (DTL)“ des DIN-Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Änderungen

Gegenüber DIN EN 14675:2006-04 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Aufnahme von normativen Verweisungen;
- b) Begriffe (3) wurden überarbeitet;
- c) Anforderungen (4) wurden überarbeitet (Tabelle 1 „Obligatorische und zusätzliche Prüfbedingungen“ neu aufgenommen);
- d) neuer Unterabschnitt 5.6.3 „Virustitration auf einschichtigen Zelllagen auf Mikrotiterplatten“ aufgenommen;
- e) Unterabschnitt (5.8 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Desinfektionsmittels) aufgenommen;
- f) Anhang B wurde überarbeitet und die „Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebfiltration“ (B.4) aufgenommen;
- g) Anhang E (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation von Europäischen Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika gestrichen;
- h) ein neuer Anhang E (informativ) Darstellung der Prüfergebnisse einer wirksamen Konzentration wurde aufgenommen;
- i) Norm wurde redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN 14675: 2006-04

Deutsche Fassung

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden
Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den
Veterinärbereich —
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)

Chemical disinfectants and antiseptics —
Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal
activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the
veterinary area —
Test method and requirements (Phase 2, step 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité
virucide des antiseptiques et des désinfectants chimiques
utilisés dans le domaine vétérinaire —
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 14. Februar 2015 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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Avenue Marnix 17, B-1000 Brüssel

Inhalt

Seite

Vorwort	4
Einleitung.....	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	7
5 Prüfverfahren	8
5.1 Kurzbeschreibung	8
5.2 Materialien und Reagenzien	8
5.2.1 Prüfvirus	8
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	9
5.3 Apparate und Glasgeräte	15
5.3.1 Allgemeines	15
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere die folgenden Geräte:	15
5.4 Produktprüflösungen	16
5.5 Verfahren zur Bewertung der viruziden Wirkung des Produktes	16
5.5.1 Versuchsbedingungen (obligatorische und zusätzliche)	16
5.5.2 Herstellung der Virus-Prüfsuspension	17
5.5.3 Herstellung der Zelllinie	17
5.6 Infektiositäts-Versuch	17
5.6.1 Vorverdünnen der Virussuspension	17
5.6.2 Virustitration von in Mikrotiterplatten suspendierten Zellen	17
5.6.3 Virustitration auf einschichtigen Zelllagen auf Mikrotiterplatten	18
5.6.4 Plaque-Untersuchung	18
5.7 Viruzidieprüfung – Vorbereitung	18
5.7.1 Allgemeines	18
5.7.2 Prüfverfahren	18
5.8 Überprüfung der Wirksamkeit der Unterdrückung der Wirkung eines Desinfektionsmittels	19
5.8.1 Verdünnung in eiskaltem Medium	19
5.8.2 Filtrationstechnik	19
6 Berechnung und Angabe der Ergebnisse	19
6.1 Versuchsprotokoll zum CPE-Ergebnis	19
6.2 Berechnung des Infektiositätstiters (TCID ₅₀)	19
6.3 Berechnung der PFU	19
6.4 Verifizierung der Methodik	20
6.5 Berechnung der viruziden Wirkung von Produkten	20
6.6 Angabe der Ergebnisse	20
7 Schlussfolgerung	20
7.1 Allgemeines	20
7.2 Prüfbericht	21
Anhang A (informativ) Referenzstämme nationaler Sammlungen	22
Anhang B (normativ) Zytotoxizität, Inaktivierungs-Bezugsprüfung, Titration des Prüfvirus und Entgiftung von Prüfgemischen	23
B.1 Zytotoxische Wirkung der Produktlösungen	23

B.2	Inaktivierungs-Bezugsprüfung	24
B.3	Titration der Virus-Prüfsuspension	24
B.4	Entgiftung von Prüfgemischen durch Molekularsiebfiltration	24
B.4.1	Molekularsiebfiltration mit Sephadex™ LH 20	24
B.4.2	Molekulares Sieben mit MicroSpin-Säule	25
Anhang C (informativ)	Berechnung des viralen Infektiositätstiters	28
C.1	Quantalversuche — Beispiel einer TCID ₅₀ -Bestimmung nach dem Spearman-Kärber-Verfahren	28
C.2	Plaque-Untersuchung	29
Anhang D (informativ)	Beispiel für einen typischen Prüfbericht	30
Anhang E (informativ)	Darstellung der Prüfergebnisse einer wirksamen Konzentration	32
Literaturhinweise		34

Vorwort

Dieses Dokument (EN 14675:2015) 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 Oktober 2015, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Oktober 2015 zurückgezogen werden.

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

Dieses Dokument ersetzt EN 14675:2006.

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 Suspensionsversuch zur Ermittlung fest, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum in den im Anwendungsbereich beschriebenen Gebieten eine viruzide Wirkung aufweist oder nicht.

Dieser Laborversuch berücksichtigt die praktischen Anwendungsbedingungen für das Produkt, einschließlich der Einwirkzeit, der Temperatur, der Prüforganismen und der Belastungssubstanzen, d. h. Bedingungen, die seine Wirkung in der Anwendungspraxis 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 definierten Versuchsbedingungen. Für einige Anwendungszwecke können jedoch die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt abweichen, und deshalb müssen zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die viruzide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte oder – bei der Verwendung von gebrauchsfertigen Produkten – mit Wasser eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung bilden. Die Produkte können nur bei einer Konzentration von 80 % oder darunter geprüft werden, da durch die Zugabe der Prüforganismen und der Belastungssubstanz immer eine Verdünnung hervorgerufen wird.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die im Veterinärbereich eingesetzt werden, d. h. bei der Aufzucht, Haltung, Produktion, beim Transport und bei der Tierkörperbeseitigung aller Tierarten mit Ausnahme der Bereiche, in denen Tiere direkt nach der Tötung als Nahrungsmittel verwendet oder der weiterverarbeitenden Industrie zugeführt werden.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren ist zur Bestimmung der viruziden Wirkung von im Handel erhältlichen Zubereitungen oder aktiven Substanzen unter Anwendungsbedingungen vorgesehen.

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

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokumentes 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

Zytotoxizität

durch das Produkt hervorgerufene morphologische Veränderung und/oder Zerstörung von Zellen oder Reduktion ihrer Empfindlichkeit gegenüber einer Virusmultiplikation

3.2

Plaque bildende Einheiten

PFU

(en: plaque forming units)

Anzahl infektiöser Viruspartikel je Volumeneinheit (ml)

3.3

Virusinaktivierungs-Bezugsversuch

Prüfung, zur internen Versuchskontrolle, mit einem festgelegten Reagens (z. B. Formalin) anstatt eines Produktes

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Ergebnisse des Virusinaktivierungs-Bezugsversuches sollten innerhalb der Grenzen für die Validierung des Verfahrens liegen.

3.4

Virus-Bezugssuspension

Virussuspension eines festgelegten Virusstammes, der zur Weiterzüchtung nicht öfter als zehnmal überimpft wurde, die in nationalen Kultursammlungen gehalten und in kleinen Volumina (weniger als 1 ml) bei –70 °C oder vorzugsweise bei etwa –196 °C auf flüssigem Stickstoff aufbewahrt wird

Anmerkung 1 zum Begriff: Virus-Stammsuspensionen werden aus Virus-Bezugssuspensionen hergestellt.

3.5

Virus-Stammsuspension

Virussuspension eines festgelegten Virusstammes, der zum Erhalt einer Virussuspension mit den gleichen Eigenschaften wie die Virus-Bezugssuspension in geeigneten Zelllinien, die zu einem hohen Virus-Titer führen, vermehrt wird, und in kleinen Volumina bei einer Temperatur von unter -70 °C oder vorzugsweise bei etwa -196 °C auf flüssigem Stickstoff aufbewahrt wird

3.6

Virus-Prüfsuspension

Virussuspension, die zum Prüfen des Desinfektionsmittels auf viruzide Wirkung verwendet wird

3.7

Gewebekultur-Infektionsdosis

TCID₅₀

virale Dosis, die bei 50 % der beimpften Zellkultur eine zytopathische Wirkung (CPE) (3.8) auslöst

3.8

virale zytopathische Wirkung

CPE

(en: viral cytopathic effect)

morphologische Veränderung von Zellen und/oder ihre Zerstörung als Folge einer Virusvermehrung

3.9

Virusplaque

Bereich der in einer Einschicht-Zellkultur unter einem halbfesten Medium aufgetretenen Zellauflösung (Lysis) durch die Infektion mit einem einzigen infektiösen Viruspartikel und dessen Vermehrung

3.10

Virus-Titer

Menge der in einem Zellkulturlysat oder in einer Lösung je Volumeneinheit vorhandenen infektiösen Viren

4 Anforderungen

Das Produkt muss, wenn es mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.3) oder — im Fall von gebrauchsfertigen Produkten — mit Wasser (5.2.2.2) verdünnt sowie nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 geprüft wurde, mindestens eine dezimal-logarithmische (lg-)Reduktion des Virus-Titers um 4 zur Folge haben. Es ist auch möglich, das Produkt im Lieferzustand zu prüfen (die höchste Prüfkonzentration beträgt 80 %).

Tabelle 1 — Obligatorische und zusätzliche Prüfbedingungen

	Obligatorische Bedingungen	Zusätzliche Bedingungen
Prüforganismus	<i>Bovines Enterovirus</i> vom Typ 1 (ECBO)	
Prüftemperatur ^a	10 °C	4 °C, 20 °C oder 40 °C
Einwirkzeit ^b	30 min	1 min, 5 min und 60 min
Belastungssubstanz – niedrige Belastung ^c	3,0 g/l Rinderalbumin	
Belastungssubstanz – hohe Belastung ^c	10 g/l Rinderalbumin zuzüglich 10 g/l Hefeextrakt	
^a Zulässige Abweichung $\pm 1\text{ °C}$. ^b Die zulässige Abweichung für jede gewählte Einwirkzeit beträgt $\pm 10\text{ s}$, ausgenommen für $\leq 1\text{ min}$, wo diese $\pm 5\text{ s}$ beträgt. ^c In Abhängigkeit vom praktischen Anwendungsfall zu wählen.		

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Probe des Produktes im Lieferzustand und/oder verdünnt mit Wasser standardisierter Härte (oder mit Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten) wird zu einer Prüfsuspension des Virus in einer Lösung einer Belastungssubstanz gegeben. Das Prüfgemisch wird bei $(10 \pm 1)^\circ\text{C}$ für $30 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ (obligatorische Prüfbedingungen) gehalten.

Am Ende der Einwirkzeit werden 0,5 ml Virus-Desinfektionsmittel-Gemisch entnommen. Die viruzide Wirkung wird sofort durch Verdünnen in eiskaltem Verdünnungsmittel unterdrückt. Anschließend wird in einem für 10 min im Eisbad belassenen eiskalten Medium eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 10 hergestellt. Die Pipetten sind nach jedem Verdünnungsschritt zu wechseln, um ein Übertragen von Viren zu vermeiden.

Die Verdünnungen werden in die Zellkultureinheiten (Vertiefungen der Mikrotiterplatten) mit den suspendierten Zellen überführt. Mit jeder Verdünnung müssen acht Serieneinheiten beimpft werden. Nach der Inkubation wird der Infektiositätstiter berechnet. Die Titrationsergebnisse der Quantalversuche müssen die Verdünnungsschritte mit dem Prozentsatz positiver Ergebnisse (Auftreten von CPE oder Plaque) zwischen 100 % und 0 % wiedergeben. Die Werte werden nach Spearman und Kärber berechnet (siehe Anhang C).

Die Werte der Virusinaktivierung werden aus den Differenzen der Virus-Titer vor und nach der Behandlung mit dem Produkt berechnet.

5.1.2 Es sind zusätzliche und optionale Einwirkzeiten und Temperaturen festgelegt.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfvirus

Die viruzide Wirkung muss unter Verwendung des folgenden Stammes bewertet werden:

— *Bovines Enterovirus* vom Typ 1 (en: Enteric Cytopathogenic Bovine Orphan Virus – ECBO) ATCC VR-248¹⁾.

ANMERKUNG 1 *Bovines Enterovirus* Typ 1, ECBO-Stamm, wurde als Modellvirus für die große Familie der *Picornaviridae* ausgewählt. Zur Familie der *Picornaviridae* gehören viele klinisch bedeutende Virusarten, zum Beispiel Coxsackieviren A und B und humane ECHO-Viren (en: enteric cytopathogenic human orphan virus). Einige dieser Viren sind von vorrangiger Bedeutung und stellen daher ein beständiges Risiko für Tiere im Veterinärbereich dar. Darüber hinaus weisen sie eine hohe Resistenz gegenüber Chemikalien auf, sind säurebeständig (ausgenommen unter anderem der Rhinovirus und Aphthovirus) und werden von Lipid-Lösemitteln wie Ether, und den meisten Reinigungsmitteln oder quartären Ammoniumprodukten nicht angegriffen.

ANMERKUNG 2 Es ist das Modellvirus für alle Anwendungen, und zwar für die Desinfektion von Instrumenten und Oberflächen sowie die Nachkontaminationsbehandlung von Obduktionsräumen, Zwingern und bei Tierunterbringungen.

ANMERKUNG 3 Aufgrund großer Resistenzunterschiede gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen zwischen und innerhalb von verschiedenen Virusgruppen ist das Prüfen aller Viren gegenüber jedem einzelnen chemischen Desinfektionsmittel oder Antiseptikum finanziell nicht möglich. Deshalb wird in dieser Europäischen Norm das Prüfen auf nur ein so genanntes „Modellvirus“ beschränkt, das auf der Grundlage des derzeitigen Wissensstandes als repräsentatives Beispiel für die Viruswiderstandsfähigkeit und die hohe klinische Relevanz im Veterinärbereich ausgewählt wurde. Wenn ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum eine den Anforderungen dieser Europäischen Norm entsprechende viruzide Wirkung zeigt, kann es für eine Prüfung der Phase 2, Stufe 2 in Erwägung gezogen werden.

Wenn hinsichtlich der Reduktion von Virenvermehrung, Virusinfektiosität oder Zytotoxizität durch Produkte Verbesserungen in der Methodik ausgearbeitet wurden, dürfen diese, zur Darstellung der Verbesserung, parallel zur hier beschriebenen Methodik durchgeführt werden.

¹⁾ ATCC VR-248 ist ein Stamm, der von der Kultursammlung American Type Culture Collections ausgegeben wird. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und stellt keine Anerkennung des genannten Produktes durch das CEN dar. Ein entsprechender Stamm, der von anderen Kultursammlungen geliefert wird, darf verwendet werden, wenn er nachweisbar zu gleichen Ergebnissen führt.

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 virologische Zwecke geeignet sein. Sie müssen frei von Substanzen sein, die toxisch oder hemmend auf den Prüforganismus wirken.

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

Für jedes Kulturmedium und Reagens muss eine zeitliche Begrenzung für die Verwendung festgelegt werden.

Gebrauchsfertige, im Handel erhältliche Produkte und Kulturmedien können erworben werden, wenn diese den vorgeschriebenen Anforderungen entsprechen.

5.2.2.2 Wasser

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

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

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

ANMERKUNG 2 Zum Verfahren zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.3.

Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität verfügbar ist, kann Wasser für Injektionen (siehe Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

5.2.2.3 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

1 l Wasser standardisierter Härte wird wie folgt hergestellt:

- Herstellung der 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. Es wird durch Membranfiltration [5.3.2.1 c)] oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Die Sterilisation im Autoklaven kann, sofern angewendet, zu einem Gewichtsverlust führen. In diesem Fall wird unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml mit Wasser (5.2.2.2) aufgefüllt. Die Lösung ist im Kühlschrank (5.3.2.16) nicht länger als einen Monat aufzubewahren;
- Herstellung der Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Es wird durch Membranfiltration [5.3.2.1 c)] sterilisiert. Die Lösung ist im Kühlschrank (5.3.2.16) nicht länger als eine Woche aufzubewahren;
- 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) werden in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.13) 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 $7,0 \pm 0,2$ bei einer Temperatur von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.4) betragen. Erforderlichenfalls 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 Bei Herstellung der Produktprüflösungen (5.4) führt die Zugabe des Produktes zum Wasser standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall ist die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas niedriger als 375 mg/l Calciumcarbonat (CaCO_3).