

DIN EN 16438

ICS 71.100.35

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Oberflächenversuch zur Bestimmung der fungiziden oder
levuroziden 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 16438:2014**

Chemical disinfectants and antiseptics –

Quantitative surface test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal 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 16438:2014

Antiseptiques et désinfectants chimiques –

Essai quantitatif de surface pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide 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 16438:2014

Gesamtumfang 41 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 16438:2014) 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 das nationale Spiegelgremium, der Arbeitsausschuss NA 057-02-03 AA „Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich (DTL)“ im Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) zuständig.

Deutsche Fassung

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika - Quantitativer
Oberflächenversuch zur Bestimmung der fungiziden oder
levuroziden 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 fungicidal or yeasticidal
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 fongicide ou
levuricide 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 30. November 2013 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	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 Prüfkeim	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 Prüfkeimsuspension (Prüf- und Validierungssuspension)	11
5.4.2 Produktprüflösungen	15
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der fungiziden oder levuroziden Wirkung des Produkts	16
5.5.1 Allgemeines	16
5.5.2 Prüfverfahren (Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren)	17
5.5.3 Untersuchung des Agars mit den Prüfflächen	20
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	20
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen	20
5.6.2 Berechnung	21
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
5.7.4 Mikroskopische Untersuchung	25
5.8 Auswertung 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 Fungizide oder levurozide Konzentration	25
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	25
5.9 Interpretation der Ergebnisse – Schlussfolgerung	26
5.9.1 Allgemeines	26
5.9.2 Fungizide oder levurozide Wirkung für allgemeine Zwecke	26
5.9.3 Eignung für bestimmte Anwendungsgebiete	26
5.10 Prüfbericht	26
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Kultursammlungen	28
Anhang B (informativ) Beispiele von Neutralisationsmedien für die antimikrobielle Restwirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika	29
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens	31
Anhang D (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht	35
Literaturhinweise	39

Vorwort

Dieses Dokument (EN 16438:2014) 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 August 2014, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis August 2014 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.

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 den im Anwendungsbereich beschriebenen Gebieten eine fungizide oder levurozide Wirkung aufweist oder nicht 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 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 fungizide oder levurozide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die in Wasser standardisierter Härte oder – im Fall gebrauchsfertiger Produkte – mit Wasser eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung bilden.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte für die Anwendung im Veterinärbereich, 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.

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 (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

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

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

3 Begriffe

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

4 Anforderungen

Bei dem Produkt muss bei Prüfung nach 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 eine dezimal-logarithmische (lg-)Reduktion der Lebendkeimzahl gegenüber einem Kontrollversuch mit Wasser um mindestens 3 Stufen nachgewiesen werden.

Tabelle 1 — Obligatorische und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Fungizide oder levurozide Wirkung auf nicht-porösen Oberflächen ohne mechanische Wirkung im Veterinärbereich
Prüfkeim fungizide Wirkung a) obligatorisch	<i>Aspergillus brasiliensis</i> (Conidiosporen) und <i>Candida albicans</i> (vegetative Zellen)
Prüfkeim levurozide Wirkung a) obligatorisch	<i>Candida albicans</i> (vegetative Zellen)
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	60 min ± 10 s
b) zusätzlich ^a	5 min ± 10 s; 30 min ± 10 s; 120 min ± 10 s
Belastungssubstanz a) obligatorische Verschmutzung niedrigen Grades Verschmutzung hohen Grades	3,0 g/l Rinderserumalbumin 10 g/l Hefeextrakt plus 10 g/l Rinderserumalbumin
b) zusätzlich	jede geeignete Substanz
Die in Tabelle 1 angeführten obligatorischen Einwirkzeiten für Oberflächendesinfektionsmittel wurden gewählt, um einen Vergleich von Standardbedingungen zu ermöglichen.	
^a 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.	

Jede beliebige zusätzliche spezifische fungizide 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 Pilzconidiosporen oder Hefen und Belastungssubstanz wird auf die Prüffläche punktförmig aufgetropft und angetrocknet. Nach der Trocknungszeit wird ein Aliquot des zu prüfenden 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 dieser 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 Pilze oder Hefen auf einer mit Wasser anstelle des Desinfektionsmittels behandelten Fläche wird ebenfalls bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahl berechnet.

Die Prüfung wird unter Verwendung der Conidiosporen von *Aspergillus brasiliensis* (früher *A. niger*) und der vegetativen Zellen von *Candida albicans* (fungizide Wirkung) oder nur der vegetativen Zellen von *Candida albicans* (levurozide Wirkung) 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 Prüfkeim

Zur Ermittlung der fungiziden Wirkung sind die folgenden Stämme als Prüfkeime zu verwenden¹⁾:

Aspergillus brasiliensis (früher *Aspergillus niger*) ATCC 16404

Candida albicans ATCC 10231

Zur Ermittlung der levuroziden Wirkung ist ausschließlich *Candida albicans* zu verwenden.

ANMERKUNG In Anhang A sind entsprechende Stammmummern in einigen anderen Kultursammlungen zu finden.

Die erforderliche Bebrütungstemperatur für diese Keime liegt bei $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.3). Für alle während einer Prüfung sowie deren Kontrolle und Validierung durchgeführten Bebrütungen muss die gleiche Temperatur 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 ihre Identifizierungsmerkmale 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 den Prüfkeim 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 sollten strengstens befolgt werden.

Gebrauchsfertige Medien dürfen verwendet werden, wenn sie den Anforderungen entsprechen.

Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte ein Verfallsdatum festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes und darf nicht 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. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG 2 Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität verfügbar ist, kann Wasser für Injektionen (siehe Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

ANMERKUNG 3 Hinsichtlich des Verfahrens zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.6.

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

5.2.2.3 Malzextrakt-Agar (MEA)

Malzextrakt-Agar, bestehend aus:

Malzextrakt*	30,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	auf 1 000 ml

* Der Malzextrakt sollte lebensmitteltauglich (z. B. Cristomalzpulver von Difal) oder von gleichwertiger Qualität sein. Er sollte nicht stark aufgereinigt sein und nicht nur auf Maltose basieren (z. B. Malzextrakt von OXOID²⁾). Sollte es dennoch Probleme geben, mindestens 75 % stachelige Sporen herzustellen, so siehe 5.4.1.4.2.

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

Im Falle des Auftretens von Problemen mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) ist es möglicherweise erforderlich, dem MEA Neutralisationsmedium zuzusetzen. Im Anhang B finden sich Beispiele für verwendbare Neutralisationsmedien. 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)	auf 1 000 ml

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

ANMERKUNG In Anhang B finden sich Angaben über Neutralisationsmedien, 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 1 000 ml Wasser standardisierter Härte ist wie folgt:

- Herstellung von Lösung A: 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) sind in Wasser (5.2.2.2) zu lösen und auf 1 000 ml aufzufüllen. 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 ist im Kühlschrank (5.3.2.8) nicht länger als einen Monat aufzubewahren.

2) Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Gleichwertige Produkte dürfen verwendet werden, wenn nachgewiesen wird, dass sie zu den gleichen Ergebnissen führen.

- Herstellung von Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) sind in Wasser (5.2.2.2) zu lösen und auf 1 000 ml aufzufüllen. Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7). Die Lösung ist im Kühlschrank (5.3.2.8) nicht länger als eine Woche aufzubewahren.
- In einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) sind 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) zu geben; 6,0 ml Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B sind hinzuzugeben. Nach Durchmischen ist mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufzufüllen. 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, ist 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) einzustellen.
- 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 ist die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas niedriger als 375 mg/l Calciumcarbonat (CaCO_3).

5.2.2.7 Belastungssubstanz

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 die zusätzlichen Belastungssubstanzen müssen die Ionenzusammensetzung (z. B. pH-Wert), die Calcium- und/oder Magnesiumhärte und die chemische Zusammensetzung (z. B. Mineralstoffe, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Detergenzien) bestimmt werden.

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 sind 0,6 g Rinderserumalbumin V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) in 90 ml Wasser (5.2.2.2) zu lösen. Es ist mit Wasser (5.2.2.2) bis zur Marke aufzufüllen.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7); die Lösung ist im Kühlschrank (5.3.2.8) aufzubewahren und innerhalb eines Monats zu verwenden.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins im Prüfverfahren (5.5.2) beträgt 3 g/l.

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

In einem 250-ml-Messkolben (5.3.2.12) sind 10 g Hefeextrakt-Pulver in 150 ml Wasser (5.2.2.2) zu lösen und es ist zu warten, bis der Schaum sich aufgelöst hat. Mit Wasser (5.2.2.2) ist bis zur Marke aufzufüllen. Das Gemisch ist in eine saubere trockene Flasche zu überführen und im Autoklaven [5.3.2.1 a)] zu sterilisieren. Danach ist auf $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ abzukühlen.

25 ml dieser Lösung sind in einen 50-ml-Messkolben zu pipettieren und 10 ml Wasser (5.2.2.2) sind zuzugeben. 1 g Rinderserumalbumin, Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke), ist unter Schütteln in der Lösung zu lösen und es ist zu warten, bis der Schaum sich aufgelöst hat. Mit Wasser (5.2.2.2) ist bis zur Marke aufzufüllen und durch Membranfiltration zu sterilisieren. Das Gemisch ist im Kühlschrank (5.3.2.8) aufzubewahren und innerhalb eines Monats zu verwenden.

Die Endkonzentration im Prüfverfahren (5.5.2) 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 dürfen nur einmal verwendet werden.

Vor der Verwendung sollten die Scheiben für 60 min in ein Becherglas (Mindestfassungsvermögen 50 ml) gelegt werden, das mindestens 20 ml 5%iges Decon^{®3)} enthält. Sie sind danach sofort 10 s unter laufendem frisch destilliertem Wasser zu spülen.

Die Prüfflächen dürfen in keiner Weise trocknen. Sie sind nur mit der Pinzette zu handhaben. Die Prüfflächen sind weitere 10 s unter fließendem Wasser zu spülen, um die vollständige Beseitigung des Detergens sicherzustellen. Um einen ausreichenden Wasserstrom zu liefern, kann ein Flüssigkeit abgebendes Druckgefäß mit geeignetem Schlauch und entsprechenden Anschlüssen oder ein anderes geeignetes Verfahren verwendet werden, das auf eine Zufuhr von etwa 2 000 ml/min eingestellt werden kann. Die sauberen Scheiben sind für 15 min in ein Bad mit 95%igem 2-Propanol zu legen und nach dem Herausnehmen durch Verdunsten zu trocknen.

5.3 Apparate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme steril gelieferter Geräte 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 Laborausrüstung⁴⁾

und besonders folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation (feuchte und trockene Hitze)

- a) zur Sterilisation durch feuchte Hitze ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min bei (121^{+3}_0) °C gehalten werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluft-Sterilisator, 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.

5.3.2.2 Wasserbad, einstellbar auf (10 ± 1) °C, (20 ± 1) °C und (45 ± 1) °C (um MEA im flüssigen Zustand zu halten, falls das Gussplattenverfahren angewendet wird) und auf zusätzliche Untersuchungstemperaturen ± 1 °C (5.5.1).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf (30 ± 1) °C und (37 ± 1) °C (für Trockenflächen).

³⁾ 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 zu einem späteren Zeitpunkt festgelegt.

⁴⁾ Sterile Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibriergenauigkeit von 0,1 pH-Einheiten bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

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 Schüttelgeräte

a) Elektromechanisches Rührwerk, z. B. Vortex^{® 5)}-Mischer;

b) mechanisches Schüttelgerät.

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem Material, das mit den zu filtrierenden Substanzen verträglich ist, mit einem Filterhalter von mindestens 50 ml Nutzvolumen und geeignet zur Verwendung mit Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von 0,45 µm für die Filtration von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.6) und Rinderserumalbumin (5.2.2.7.2, 5.2.2.7.3).

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

5.3.2.9 Messpipetten mit einem Nennvolumen von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml oder kalibrierte automatische Pipetten.

5.3.2.10 Petrischalen (Platten) mit einem Durchmesser von 90 mm bis 100 mm.

5.3.2.11 Glasperlen, Durchmesser: 3 mm bis 4 mm.

5.3.2.12 Messkolben

5.3.2.13 Klimakammer, einstellbar auf eine Temperatur von $(10 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

5.3.2.14 Glasbehälter mit Schraubverschluss, mit einem Bodendurchmesser von 4 cm bis 5 cm.

5.3.2.15 Filter mit Fritte, mit einer Porengröße von 40 µm bis 100 µm nach ISO 4793.

5.3.2.16 Glasflaschen mit belüfteten Kappen.

5.3.2.17 Mikroskop, geeignet für eine 400fache Vergrößerung.

5.3.2.18 Vakuum-Exsikkator, einstellbar auf einen Unterdruck von 20 mm bis 25 mm Quecksilber.

5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüfkeimsuspension (Prüf- und Validierungssuspension)

ANMERKUNG Die Prüf- und Validierungssuspension sind in der vorliegenden Norm gleich.

5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüfkeim muss eine Suspension hergestellt werden: diese wird als „Prüfsuspension“ der Pilze zur Durchführung der Prüfung und als „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrollversuche und der Verfahrensvalidierung verwendet.

5.4.1.2 Konservierung und Stammkulturen der Prüfkeime

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

5) Ein Vortex[®]-Mischer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Dies dient lediglich zur Information der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.