

DIN EN 1650



ICS 71.100.35

Ersatz für
DIN EN 1650:2013-08

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder
levuroziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika in
den Bereichen Lebensmittel, Industrie, Haushalt und öffentliche
Einrichtungen –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 1650:2019**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity of chemical
disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German version EN 1650:2019

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide des
antiseptiques et des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire,
dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);
Version allemande EN 1650:2019

Gesamtumfang 52 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 1650:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige nationale Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-08-04 AA „Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Änderungen

Gegenüber DIN EN 1650:2013-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Prüfbedingungen und Prüfanforderungen für die Händedesinfektion und Händewaschung wurden mit EN 13624 harmonisiert. Tabelle 1 (Untersuchungsbedingungen für allgemeine Desinfektionszwecke) und Tabelle 2 (Untersuchungsbedingungen für Händehygiene) wurden im Abschnitt 4 (Anforderungen) aufgenommen;
- b) Unterabschnitte 5.2.2.8.5 bis 5.2.2.8.8 (Belastungssubstanzen für Brauereien, Erfrischungsgetränke, Kosmetika und Umlaufreinigung) wurden gestrichen. Es wurde ein Satz aufgenommen, um für spezielle Anwendungen zusätzliche Belastungssubstanzen zuzulassen;
- c) im Unterabschnitt 5.5.1.1 (Untersuchungsbedingungen) wurden die obligatorischen Bedingungen (Temperatur und Einwirkzeit) gestrichen. Der Text wurde, unter Einhaltung bestimmter Zeitintervalle und Temperaturschritte, mit EN 13624 harmonisiert;
- d) Unterabschnitt 5.9.3 (Levurozide Wirkung für allgemeine Zwecke) wurde gestrichen;
- e) Norm wurde redaktionell überarbeitet und den derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Frühere Ausgaben

DIN EN 1650: 1998-02, 2008-08, 2008-11, 2013-08

Deutsche Fassung

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

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

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

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 10. Juni 2019 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 CEN-CENELEC-Management-Zentrum 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, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, 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: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Anforderungen	8
5 Prüfverfahren	9
5.1 Kurzbeschreibung	9
5.2 Materialien und Reagenzien	10
5.2.1 Prüforganismen	10
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	10
5.3 Geräte und Glasgeräte	13
5.3.1 Allgemeines	13
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und besonders folgende Geräte:	14
5.4 Herstellung der Prüforganismussuspensionen und Produktprüflösungen	15
5.4.1 Prüforganismussuspensionen (Prüfungs- und Validierungssuspension)	15
5.4.2 Produktprüflösungen	20
5.5 Verfahren zur Beurteilung der fungiziden oder levuroziden Wirkung des Produkts	20
5.5.1 Allgemeines	20
5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	22
5.5.3 Membranfiltrationsverfahren	24
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	27
5.6.1 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen	27
5.6.2 Berechnung	27
5.7 Verifizierung des Verfahrens	30
5.7.1 Allgemeines	30
5.7.2 Kontrolle der gewichteten Mittelwerte der Auszählungen	31
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	31
5.7.4 Mikroskopische Beobachtung	31
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	31
5.8.1 Reduktion	31
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	32
5.8.3 Limitierender Prüforganismus und fungizide/levurozide Konzentration	32
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	32
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	32
5.9.1 Allgemeines	32
5.9.2 Fungizide Wirkung für allgemeine Zwecke	33
5.9.3 Levurozide Wirkung für allgemeine Zwecke	33
5.9.4 Levurozide Wirkung für Handhygiene	33
5.10 Prüfbericht	33
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	35
Anhang B (informativ) Beispiele von Neutralisationsmedien für die verbleibende antimikrobielle Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika sowie Spülflüssigkeiten	36

Anhang C (informativ) Graphische Darstellungen des Verdünnungs-Neutralisations-Verfahrens und des Membranfiltrationsverfahrens	38
C.1 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	38
C.2 Membranfiltrationsverfahren	40
Anhang D (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht	42
Anhang E (informativ) Präzision des Prüfergebnisses.....	47
Literaturhinweise.....	50

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 1650:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Diese Europäische Norm muss den Status einer nationalen Norm erhalten, entweder durch Veröffentlichung eines identischen Textes oder durch Anerkennung bis Februar 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Februar 2020 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

Dieses Dokument ersetzt EN 1650:2008+A1:2013.

Daten, die unter Anwendung der Vorgängerversion der EN 1650:2008+A1:2013 sind weiterhin gültig.

Die wesentlichen Änderungen im Hinblick auf EN 1650:2008+A1:2013 sind:

- Einbeziehung der Handhygiene;
- Die Prüfbedingungen und Prüfanforderungen für Händedesinfektionsmittel und Handwaschmittel wurden mit EN 13624 harmonisiert.
- Belastungssubstanzen für Brauereien, Softdrinks, kosmetische Mittel und Umlaufreinigung wurden gestrichen. Ein Satz zur Genehmigung zusätzlicher Belastungssubstanzen für spezifische Anwendungen wurde hinzugefügt.
- Die obligatorischen Bedingungen (Temperatur und Einwirkzeit) wurden gestrichen. Der Text wurde unter Beibehaltung der spezifischen Zeitintervalle und Temperaturschritte mit EN 13624 harmonisiert.

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

Einleitung

Diese Europäische Norm beschreibt ein Verfahren für einen Suspensionsversuch zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum in den im Anwendungsbereich beschriebenen Gebieten eine fungizide oder levurozide Wirkung aufweist oder nicht.

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

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

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die fungizide oder levurozide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die bei Verdünnung in Wasser standardisierter Härte oder — im Falle gebrauchsfertiger Produkte — in Wasser eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung bilden. Die Produkte können nur bei einer Konzentration von höchstens 80 % oder weniger geprüft werden, da durch die Zugabe der Prüforganismen und der Belastungssubstanz immer eine bestimmte Verdünnung auftritt.

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

a) Verarbeitung, Vertrieb und Verkauf von:

1) Lebensmitteln tierischer Herkunft:

- Milch und Milcherzeugnisse;
- Fleisch und Fleischprodukte;
- Fisch, Meerestiere und zugehörige Erzeugnisse;
- Eier und Eiprodukte;
- Tiernahrung;
- usw.

2) Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft:

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

b) öffentliche Einrichtungen und Haushaltsbereiche:

- Verpflegungseinrichtungen;
- öffentliche Bereiche;
- öffentliche Verkehrsmittel;
- Schulen;
- Kindergärten;
- Geschäfte;
- Sportstätten;
- Abfallbehälter (Mülltonnen usw.);
- Hotels;
- Wohngebäude;
- klinisch nicht relevante Bereiche in Krankenhäusern;
- Büroräume;
- usw.

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

EN 14885 legt im Einzelnen den Zusammenhang zwischen den verschiedenen Prüfungen und die „Anwendungsempfehlungen“ fest.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente werden im Text in solcher Weise in Bezug genommen, dass einige Teile davon oder ihr gesamter Inhalt Anforderungen des vorliegenden Dokuments darstellen. 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.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <http://www.iso.org/obp>

4 Anforderungen

Das Produkt muss mindestens eine dezimal-logarithmische (lg-)Reduktion der Lebendkeimzahl um 4 Stufen ergeben, wenn es mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) oder — im Falle gebrauchsfertiger Produkte — mit Wasser (5.2.2.2) verdünnt und nach Abschnitt 5 unter simulierten Bedingungen niedriger Belastung (0,3 g/l Rinderserumalbuminlösung — 5.2.2.8.2) oder simulierten Bedingungen hoher Belastung (3 g/l Rinderserumalbuminlösung — 5.2.2.8.3) entsprechend der praktischen Anwendung und unter den angewandten Prüfbedingungen geprüft wurde, wie in 5.5.1.1 sowie in den nachstehenden Tabelle 1 und Tabelle 2 beschrieben.

Tabelle 1 — Prüfbedingungen für Desinfektion bei allgemeiner Verwendung

Prüfbedingungen	levurozide Wirkung	fungizide Wirkung
Prüforganismus (siehe 5.2.1) obligatorisch	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus brasiliensis</i>
Beispiel zusätzlicher Prüfmikroorganismen	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	jeder zutreffende Prüforganismus
Prüftemperatur	im Bereich von 4 °C bis 40 °C	im Bereich von 4 °C bis 40 °C
Einwirkzeit	im Bereich von 1 min bis 60 min (von 1 min bis 5 min in 1-min-Schritten und von 5 min bis 60 min in 5-min-Schritten)	im Bereich von 1 min bis 60 min (von 1 min bis 5 min in 1-min-Schritten und von 5 min bis 60 min in 5-min-Schritten)
Bedingungen niedriger Belastung	0,3 g/l Rinderserumalbumin für <i>C. albicans</i>	0,3 g/l Rinderserumalbumin für <i>C. albicans</i> und <i>A. brasiliensis</i>
Bedingungen hoher Belastung	3,0 g/l Rinderserumalbumin für <i>C. albicans</i>	3,0 g/l Rinderserumalbumin für <i>C. albicans</i> und <i>A. brasiliensis</i>
zusätzlich	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz
lg-Reduktion (dezimal-loga- rithmisch)	≥ 4 lg	≥ 4 lg
Die empfohlene Einwirkzeit für die Anwendung des Produkts liegt in der Verantwortung des Herstellers.		

Tabelle 2 — Prüfbedingungen für Handhygiene

Prüfbedingungen	levurozide Wirkung
Prüforganismus (siehe 5.2.1) obligatorisch	<i>Candida albicans</i>
Prüftemperatur	20 °C
Einwirkzeit	30 s oder 60 s
Bedingungen niedriger Belastung (für hygienische Händedesinfektionsmittel)	0,3 g/l Rinderserumalbumin
Bedingungen hoher Belastung (für hygienische Handwaschmittel)	3,0 g/l Rinderserumalbumin
Ig-Reduktion (dezimal-logarithmisch)	≥ 4 lg für Händedesinfektionsmittel ≥ 2 lg für Handwaschmittel

Sofern angezeigt, muss zusätzlich die spezifische fungizide oder levurozide Wirkung unter Anwendung weiterer Belastungssubstanzen und Prüforganismen (nach 5.2.1, 5.2.2.8 und 5.5.1.1) bestimmt werden, um vorgesehene spezifische Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Probe des Produkts, entweder im Lieferzustand und/oder mit Wasser standardisierter Härte (oder für gebrauchsfertige Produkte mit Wasser) verdünnt, wird zu einer Prüfsuspension aus Pilzen (Hefezellen oder Schimmelpilzsporen) in einer Lösung mit Belastungssubstanz gegeben. Das Gemisch wird für die angewandte Einwirkzeit bei der gewählten Prüftemperatur gehalten. Nach Ablauf dieser Einwirkzeit wird ein aliquoter Anteil entnommen, und die fungizide und/oder fungistatische Wirkung in dieser Teilmenge wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder inaktiviert. Das Verfahren der Wahl ist dabei das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Wenn kein geeignetes Neutralisationsmedium gefunden werden kann, wird die Membranfiltration angewendet. Die Anzahl der überlebenden Pilze in jeder Probe wird bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahlen berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird mit vegetativen Zellen von *Candida albicans* und Sporen von *Aspergillus brasiliensis* (fungizide Wirkung) oder nur den vegetativen Zellen von *Candida albicans* (levurozide Wirkung) als Prüforganismen durchgeführt.

5.1.3 Zusätzliche Prüforganismen können verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die fungizide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden Stämme als Prüforganismen bestimmt werden:

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Die levurozide Wirkung darf nur mit *Candida albicans* bewertet werden.

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

Die erforderliche Bebrütungstemperatur dieser Prüforganismen beträgt $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.3).

Falls für spezifische Anwendungen erforderlich, dürfen zusätzliche Stämme gewählt werden, wie z. B. für Brauereien:

- *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763
- *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* DSM 70487

Wenn zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, müssen sie unter optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Zeit, Atmosphäre, Medien), die im Prüfbericht zu dokumentieren sind, bebrütet werden. Wenn die gewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss ihre Eignung zur Bereitstellung der erforderlichen Inokula verifiziert werden. Wenn diese zusätzlichen Prüforganismen 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 aufbewahrt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

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

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

ANMERKUNG Es wird empfohlen, für jedes Kulturmedium und Reagenz einen maximalen Anwendungszeitraum festzulegen.

5.2.2.2 Wasser

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

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

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

Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionszwecke verwendet werden.

ANMERKUNG 2 Hinsichtlich des Verfahrens für die Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.7.

5.2.2.3 Malzextraktagar (MEA)

Malzextraktagar, bestehend aus:

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

Der Malzextrakt sollte Lebensmittelqualität (z. B. Cristomalzpulver von Difal) oder eine entsprechende Qualität aufweisen, nicht stark gereinigt sein und nicht nur auf Maltose basieren (z. B. Malzextrakt von OXOID)¹⁾. Sollte es jedoch Probleme geben, mindestens 75 % stachelige Sporen herzustellen, 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 $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

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

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

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

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

1) 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 sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen können.

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 Spülflüssigkeiten (für 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 Prüfbedingungen durch die Filtermembran filtrierbar sein.

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

5.2.2.7 Hartes Wasser 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) werden in Wasser (5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die 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) für höchstens einen Monat aufzubewahren.
- Herstellung von Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7). Die Lösung ist im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens eine Woche aufzubewahren.
- 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 (5.3.2.9) Lösung A und anschließend 8,0 ml Lösung B gegeben. Es wird durchmischt und mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.4). Falls erforderlich, wird der pH-Wert 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 muss unter aseptischen Bedingungen frisch hergestellt und innerhalb von 12 h verwendet werden.

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

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Allgemeines

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

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem 10-Fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

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

ANMERKUNG Der Begriff „Belastungssubstanz“ wird auch dann verwendet, wenn mehr als eine Substanz enthalten ist.

5.2.2.8.2 Bedingungen niedriger Belastung (Rinderserumalbuminlösung — geringe Konzentration)

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

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) beträgt 0,3 g/l.

5.2.2.8.3 Bedingungen hoher Belastung (Rinderserumalbuminlösung — hohe Konzentration)

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

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) beträgt 3,0 g/l.

5.2.2.8.4 Milch (Molkereien usw.)

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

- Es wird eine Lösung von 10,0 % (v/v) in Wasser (5.2.2.2) durch Hinzufügen von 10 Teilen rekonstituierter Milch zu 90 Teilen Wasser hergestellt. Diese wird für 30 min bei $(105 \pm 3) ^\circ\text{C}$ [oder für 5 min bei $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$] erhitzt.

Die Endkonzentration der rekonstituierten Milch im Prüfverfahren (5.5) beträgt 1,0 % (v/v) der rekonstituierten Milch.

5.3 Geräte und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

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

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

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²⁾ und besonders folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation

- a) zur Dampfsterilisation ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min bei (121^{+3}_0) °C gehalten werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluftsterilisator, 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 Wasserbäder, einstellbar auf (20 ± 1) °C, auf (45 ± 1) °C (um den MEA für den Fall des Gussplattenverfahrens im geschmolzenen Zustand zu halten) und auf zusätzliche Prüftemperaturen ± 1 °C (5.5.1).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf (30 ± 1) °C.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungenauigkeit von nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei (20 ± 1) °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 Schüttelgerät.

- a) elektromechanisches Schüttelgerät, z. B. Vortex[®]-Mischer³⁾;
- b) mechanisches Schüttelgerät.

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem Material, das mit den zu filtrierenden Substanzen verträglich ist.

Das Gerät muss mit einem Filterhalter mit einem Mindestvolumen von 50 ml ausgestattet sein. Es muss geeignet sein für die Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von $0,45 \mu\text{m}$ für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7), Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2 und 5.2.2.8.3) und für den Fall der Anwendung des Membranfiltrationsverfahrens (5.5.3).

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

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

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

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