

DIN EN 1656



ICS 71.100.35

Ersatz für
DIN EN 1656:2010-03 und
DIN EN 1656
Berichtigung 1:2010-11

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der bakteriziden
Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für den
Veterinärbereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 1656:2019**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical
disinfectants and antiseptics used in the veterinary area –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German version EN 1656:2019

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité bactéricide des antiseptiques et
des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine vétérinaire –
Méthode d'essai et exigences (phase 2, étape 1);
Version allemande EN 1656:2019

Gesamtumfang 43 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 1656:2019) 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).

Für die in diesem Dokument zitierten internationalen Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO/IEC 17025 siehe DIN EN ISO/IEC 17025

Änderungen

Gegenüber DIN EN 1656:2010-03 und DIN EN 1656 Berichtigung 1:2010-11 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Anmerkung in 5.3.2.4 in normativen Text geändert;
- b) Titel zu Tabelle B.1 ergänzt;
- c) Titel von Bild C.1, Bild C.2, Bild C.3 und Bild C.4 gestrichen;
- d) Anhang D (informativ) „Beispiel für einen typischen Prüfbericht“ überarbeitet;
- e) Norm redaktionell überarbeitet und an die derzeit gültigen Gestaltungsregeln angepasst.

Frühere Ausgaben

DIN EN 1656: 2000-04, 2010-03
DIN EN 1656 Berichtigung 1: 2010-11

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO/IEC 17025, *Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien*

Deutsche Fassung

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der
bakteriziden 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
bactericidal 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 bactéricide des antiseptiques et des
désinfectants chimiques utilisés dans le domaine
vétérinaire —
Méthode d'essai et exigences (phase 2, étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 28. Juli 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	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	7
5.1 Kurzbeschreibung	7
5.2 Materialien und Reagenzien	7
5.2.1 Prüforganismen	7
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	8
5.3 Apparate und Glaswaren	11
5.3.1 Allgemeines	11
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte	11
5.4 Herstellung der Prüforganismussuspensionen und Produktprüflösungen	12
5.4.1 Prüforganismussuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)	12
5.4.2 Produktprüflösungen	14
5.5 Verfahren zur Beurteilung der bakteriziden Wirkung des Produkts	15
5.5.1 Allgemeines	15
5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	16
5.5.3 Membranfiltrationsverfahren	19
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	21
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen	21
5.6.2 Berechnung	21
5.7 Verifizierung der Verfahrensweise	24
5.7.1 Allgemeines	24
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Zählungen	25
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	25
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	25
5.8.1 Reduktion	25
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	26
5.8.3 Limitierender Prüforganismus und bakterizide Konzentration	26
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	26
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	26
5.9.1 Allgemeines	26
5.9.2 Bakterizide Wirkung für Produkte zur Oberflächendesinfektion	26
5.9.3 Bakterizide Wirkung für Produkte zur Sitzendesinfektion	26
5.10 Prüfbericht	27
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	29
Anhang B (informativ) Beispiele von Neutralisationsmedien für die verbleibende antimikrobielle Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika sowie Spülflüssigkeiten	31
Anhang C (informativ) Verdünnungs Neutralisations Verfahren	33
Anhang D (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht	37
Literaturhinweise	41

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 1656:2019) 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 März 2020, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis März 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.

Diese Europäische Norm ersetzt EN 1656:2009 und sie wurde überarbeitet, um mit der Struktur und dem Wortlaut anderer quantitativer Suspensionsprüfungen von CEN/TC 216 (bestehender oder in Vorbereitung) zu harmonisieren.

Mit der vorherigen Version dieser Norm erhaltene Ergebnisse sind nach wie vor gültig.

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

Dieses Dokument legt einen Suspensionsversuch fest, mit dem festgestellt werden soll, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum in den im Anwendungsbereich beschriebenen Bereichen eine bakterizide Wirkung aufweist.

Dieser Laborversuch berücksichtigt praktische Anwendungsbedingungen des Produkts, zu denen die Einwirkzeit, die Temperatur, die Prüforganismen und die Belastungssubstanzen gehören, d. h. Bedingungen, die zu einer Beeinflussung seiner Wirkung in praktischen Situationen führen können.

Die Bedingungen sollen allgemeinen Zwecken dienen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produkten 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 müssen möglicherweise zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die bakterizide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und antiseptischen Produkten fest, die bei Verdünnung in Wasser standardisierter Härte oder – im Falle gebrauchsfertiger Produkte – in Wasser als homogenes und physikalisch stabiles Präparat vorliegen. Die Produkte können nur bei einer Konzentration von höchstens 80 % geprüft werden, da durch die Zugabe der Prüforganismen und der Belastungssubstanz immer eine bestimmte Verdünnung auftritt.

Das beschriebene Verfahren soll der Bestimmung der Wirkung handelsüblicher Zubereitungen oder von Wirkstoffen unter den Bedingungen dienen, unter denen sie in der Praxis angewendet werden. Dieses Dokument gilt für Produkte, die für die Instrumentendesinfektion durch Eintauchen und bei der Oberflächendesinfektion durch Abwischen, Besprühen, Überfluten oder auf sonstige Weise sowie bei der Zitzendesinfektion im Veterinärbereich verwendet werden – z. B. bei der Aufzucht, Haltung, Produktion, in veterinärischen Pflegeeinrichtungen, beim Transport von Tieren sowie bei der Tierkörperbeseitigung aller Tiere mit Ausnahme der Tiere, die nach der Tötung direkt als Nahrungsmittel verwendet oder der weiterverarbeitenden Industrie zugeführt werden. Dieses Dokument gilt auch für Produkte, die bei der Zitzendesinfektion in diesen Veterinärbereichen verwendet werden.

Dieses Verfahren kann nicht angewendet werden, um die Wirkung von Produkten der Handhygiene zu überprüfen. Für diese Produkte wird auf EN 14885 verwiesen, die im Einzelnen den Zusammenhang zwischen den verschiedenen Prüfungen sowie zu den „Anwendungsempfehlungen“ festlegt.

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

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*

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 um 5 Stufen aufweisen, wenn es mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) oder – im Falle gebrauchsfertiger Produkte – mit Wasser (5.2.2.2) gemischt wird und nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 unter simulierten Bedingungen niedriger Belastung (3 g/l Rinderserumalbumin) oder hoher Belastung (10 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Rinderserumalbumin) oder 10 g/l Magermilch für Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken oder 3 g/l Rinderserumalbumin für Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken oder in zusätzlichen Prüfbedingungen geprüft werden.

Tabelle 1 — Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	bakterizide Wirkung auf Oberflächen	bakterizide Wirkung für Zitzendesinfektionsmittel
Mindestspektrum an Prüforganismen	<i>Enterococcus hirae</i> <i>Proteus hauseri</i> ¹⁾ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus uberis</i>
zusätzlich	alle relevanten Prüforganismen	alle relevanten Prüforganismen
Prüftemperatur	in Intervallen von 5 °C	
mindestens	(5 ± 1) °C	(20 ± 1) °C
höchstens	(40 ± 1) °C	(30 ± 1) °C
Einwirkzeit	in Intervallen von 30 s von 30 s bis 5 min und in Intervallen von 5 min von 5 min bis 120 min	
mindestens	1 min ± 5 s	1 min ± 5 s für Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken 30 s ± 5 s für Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken
höchstens	120 min ± 10 s	30 min ± 10 s für Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken 3 min ± 10 s für Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken
Belastungssubstanz		Belastungssubstanz
niedrige Belastung	3,0 g/l Rinderserumalbumin	nach dem Melken: 10,0 g/l Milchpulver
hohe Belastung	10 g/l Hefeextrakt plus 10 g/l Rinderserumalbumin	vor dem Melken: 3,0 g/l Rinderserumalbumin
zusätzlich	jede relevante Substanz	jede relevante Substanz

Jede weitere spezifische bakterizide Wirkung muss nach 5.2.1 und 5.5.1.1 bestimmt werden, um die bestimmungsgemäßen Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

1) Wurde auch als *Proteus vulgaris* bezeichnet.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

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

5.1.2 Für allgemeine Desinfektionsprodukte wird die Prüfung mit *Enterococcus hirae*, *Proteus hauseri*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* als Prüforganismen durchgeführt. Für Zitzendesinfektionsmittel wird die Prüfung mit *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus uberis* als Prüforganismen durchgeführt.

5.1.3 Zusätzliche und optionale Einwirkzeiten und Temperaturen sind festgelegt. Zusätzliche Prüforganismen können verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die bakterizide Wirkung muss unter Anwendung der folgenden Stämme als Prüforganismen bestimmt werden: ²⁾

a) Allgemeine Desinfektionsprodukte

— <i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541
— <i>Proteus hauseri</i>	ATCC 13315
— <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442
— <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538

b) Zitzendesinfektionsmittel

— <i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
— <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
— <i>Streptococcus uberis</i>	ATCC 19436

ANMERKUNG Verweisungen auf Stämme aus einigen anderen Kulturensammlungen sind in Anhang A genannt.

2) Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern der Stämme, die von der American Type Culture Collection (ATCC) vertrieben werden. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

Die erforderliche Bebrütungstemperatur für diese Prüforganismen liegt bei $(36 \pm 1) ^\circ\text{C}$ oder $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.3). Für alle während eines Versuchs sowie dessen Kontrolle und Validierung durchgeführten Inkubationen muss die gleiche Temperatur (entweder $36 ^\circ\text{C}$ oder $37 ^\circ\text{C}$) angewendet werden.

Wenn zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, müssen sie 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 Kulturensammlung für fünf Jahre als Referenzprobe zurückgestellt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in dieser 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 genauestens befolgt werden.

Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte eine Gebrauchsfähigkeitsdauer festgelegt werden (siehe ISO/IEC 17025:2017).

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)].

Hinsichtlich des Verfahrens für die Herstellung von Wasser standardisierter Härte wird auf 5.2.2.7 verwiesen.

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

ANMERKUNG 2 Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionszwecke (siehe Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

5.2.2.3 Trypton-Soja-Agar (TSA)

Trypton-Soja-Agar bestehend aus:

- Trypton aus Casein, pankreatisch verdaut 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) auf 1 000,0 ml.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums $7,2 \pm 0,2$ 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 TSA Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält eine Anleitung zu den Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

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

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.

In Anhang B sind Angaben zu Neutralisationsmedien aufgeführt, die sich für einige Kategorien von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.6 Spülflüssigkeit (für die Membranfiltration)

Die Spülflüssigkeit muss für das zu prüfende Produkt nach 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.3 validiert sein. Die Spülflüssigkeit muss steril, mit der Filtermembran kompatibel und unter den in 5.5.3 beschriebenen Untersuchungsbedingungen durch die Filtermembran filtrierbar sein.

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

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte für die Verdünnung der Produkte

Die Vorgehensweise bei der Herstellung von 1 000 ml Wasser standardisierter Härte ist wie folgt:

- Herstellung der 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 verdünnt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Wenn das Autoklavieren angewendet wird, kann es zu einem Flüssigkeitsverlust kommen. In diesem Fall wird das Volumen unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens einen Monat aufbewahrt.
- Herstellung der Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml verdünnt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens eine Woche aufbewahrt.
- In einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden (600 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 $7,0 \pm 0,2$ (5.3.2.4) betragen, gemessen bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$. Falls erforderlich, wird der pH-Wert mit Hilfe 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 300 mg/l bezogen auf Calciumcarbonat (CaCO_3).

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz muss nach den für das Produkt festgelegten Einsatzbedingungen 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 festgelegt werden.

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

5.2.2.8.2 Niedrige Belastung und Zitzendesinfektionsmittel vor dem Melken (Rinderserumalbuminlösung)

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

Es wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert, die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verwendet. Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins im Prüfverfahren (5.5) beträgt 3,0 g/l.

5.2.2.8.3 Hohe Belastung (Gemisch aus Rinderserumalbuminlösung und Hefeextrakt)

50,0 g Hefeextrakt-Pulver werden in einem 250-ml-Messkolben (5.3.2.12) in 150 ml Wasser (5.2.2.2) aufgelöst, und es wird gewartet, bis sich der Schaum aufgelöst hat. Es wird mit Wasser (5.2.2.2) 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 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlt.

25 ml dieser Lösung werden in einen 50-ml-Messkolben (5.3.2.12) pipettiert, und es werden 10 ml Wasser (5.2.2.2) zugegeben. Anschließend werden 5,0 g Rinderserumalbuminfraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) in der Lösung durch Schütteln aufgelöst, und es wird gewartet, bis sich der Schaum aufgelöst hat. Es wird mit Wasser (5.2.2.2) bis zur Marke aufgefüllt und durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert; die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verwendet.

Die Endkonzentration im Prüfverfahren (5.5) beträgt 10,0 g/l Hefeextrakt und 10,0 g/l Rinderserumalbumin.

5.2.2.8.4 Milch für Zitzendesinfektionsmittel nach dem Melken

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 100 g Milchpulver in 1 000 ml Wasser (5.2.2.2) hergestellt. Diese wird für 30 min bei $(105^{+3})^\circ\text{C}$ oder für 5 min bei $(121^{+3})^\circ\text{C}$ erhitzt.

Die Endkonzentration im Prüfverfahren (5.5) beträgt 10,0 g/l Milchpulver.

5.3 Apparate und Glaswaren

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme von steril gelieferten werden alle Glaswaren 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 Sterilisator (Autoklaven) [5.3.2.1 a)];
- b) durch trockene Hitze im Heißluftschrank [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung³⁾ und insbesondere folgende Geräte

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation:

- a) zur Sterilisation durch feuchte Hitze ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min bei $(121^{+3})^\circ\text{C}$ gehalten werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluftschrank, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min bei $(180^{+5})^\circ\text{C}$, für eine Mindesthaltezeit von 1 h bei $(170^{+5})^\circ\text{C}$ oder für eine Mindesthaltezeit von 2 h bei $(160^{+5})^\circ\text{C}$ gehalten werden kann.

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar zwischen $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$ und $(40 \pm 1)^\circ\text{C}$, wie in den Prüfbedingungen vorgesehen und auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ (um den TSA für den Fall des Gussplattenverfahrens im geschmolzenen Zustand zu halten).

3) Sterile Einwegmaterialien sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.