

DIN EN 1657



ICS 11.080.20; 71.100.35

Ersatz für
DIN EN 1657:2000-04

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder
levuroziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für
den Veterinärbereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 1657:2005**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity of
chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German version EN 1657:2005

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 vétérinaire –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);
Version allemande EN 1657:2005

Gesamtumfang 48 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm wurde von der Arbeitsgruppe 2 „Veterinary“ (Sekretariat: BSI) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ (Sekretariat: AFNOR) unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der Arbeitsgruppe 2 des CEN/TC 216 wird über den Arbeitsausschuss „Desinfektionsmittel Tierhaltung/Lebensmittelbereich“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 1657:2000-04 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Ergebnisse eines europäischen Ringversuches (ANDISTAND) wurden aufgenommen;
- b) offensichtliche Fehler und Unklarheiten wurden korrigiert;
- c) die Struktur des Dokuments wurde anderen bestehenden oder in Erarbeitung befindlichen Dokumenten des CEN/TC 216 zu quantitativen Suspensionsversuchen angepasst;
- d) das Dokument wurde entsprechend den derzeit gültigen Gestaltungsregeln redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN 1657: 2000-04

Deutsche Fassung

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der
fungiziden oder levuroziden 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 fungicidal
or yeasticidal 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
fongicide ou levuricide 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 28. Juli 2005 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 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, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



EUROPÄISCHES KOMITEE FÜR NORMUNG
EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION
COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION

Management-Zentrum: rue de Stassart, 36 B-1050 Brüssel

Inhalt

	Seite
Vorwort	4
Einleitung.....	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen.....	6
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	7
5 Prüfverfahren	7
5.1 Prinzip	7
5.2 Materialien und Reagenzien	8
5.2.1 Prüfkeime.....	8
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	8
5.3 Apparate und Glasgeräte	11
5.3.1 Allgemeines.....	11
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	11
5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und Produktprüflösungen	13
5.4.1 Prüfkeimsuspensionen (Prüfungs- und Validierungssuspension)	13
5.4.2 Produktprüflösungen	16
5.5 Verfahrensablauf zur Ermittlung der fungiziden oder levuroziden Wirksamkeit des Produkts	16
5.5.1 Allgemeines	16
5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	18
5.5.3 Membranfiltrationsverfahren	20
5.6 Experimentelle Daten und Berechnung.....	22
5.6.1 Erklärung der Begriffe und Abkürzungen	22
5.6.2 Berechnung	23
5.7 Prüfung der Methodik.....	26
5.7.1 Allgemeines.....	26
5.7.2 Kontrolle der gewichteten Mittelwerte der Auszählungen	26
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte.....	26
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision.....	26
5.8.1 Verminderung.....	26
5.8.2 Kontrolle der aktiven und nichtaktiven Produktprüflösung (5.4.2)	27
5.8.3 Limitierende Prüfkeime und fungizide/levurozide Konzentration	27
5.8.4 Präzision, Wiederholungen.....	27
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	27
5.9.1 Allgemeines.....	27
5.9.2 Fungizide Wirkung für allgemeine Zwecke	27
5.9.3 Fungizide Wirkung für besondere Zwecke	28
5.9.4 Levurozide Wirkung für allgemeine Zwecke	28
5.9.5 Levurozide Wirkung für besondere Zwecke	28
5.10 Prüfbericht.....	28
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	30
Anhang B (informativ) Geeignete Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten	31
Anhang C (informativ) Grafische Darstellung der Prüfverfahren	33
Anhang D (informativ) Beispiel eines üblichen Prüfberichts.....	37
Anhang E (informativ) Präzision der Prüfergebnisse	41
Anhang F (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation Europäischer Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika	44
Literaturhinweise	46

Bilder

Bild C.1 — Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	34
Bild C.2 — Membranfiltrationsverfahren.....	36
Bild E.1 — Präzision des Verminderungsfaktors, der für Pilze erhalten wurde (als logarithmische Ausdrücke).....	42

Tabellen

Tabelle 1 — Anzahl der Zellen, gezählt je ml in den verschiedenen Prüfgemischen.....	22
Tabelle E.1 — Theroretische Verminderungsfaktoren, die für Pilze verwendet wurden (als logarithmische Ausdrücke).....	41
Tabelle E.2 — Präzision des Verminderungsfaktors, der für Pilze erhalten wurde (als logarithmische Ausdrücke).....	43

Vorwort

Dieses Dokument (EN 1657:2005) 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 Juni 2006, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 2006 zurückgezogen werden.

Dieses Dokument ersetzt EN 1657:2000.

Es wurde überarbeitet, um die Ergebnisse eines Ringversuches (ANDISTAND) aufzunehmen, um offensichtliche Fehler und Unklarheiten zu korrigieren, um die Struktur und Formulierungen mit anderen bestehenden oder in Erarbeitung befindlichen quantitativen Suspensionsversuchen des CEN/TC 216 zu harmonisieren und um die Lesbarkeit und damit Verständlichkeit der Norm zu verbessern.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, 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.

Die Laborbedingungen, die durch dieses Dokument festgelegt werden, berücksichtigen Faktoren wie Einwirkzeit, Temperatur, Testorganismen und Belastungssubstanzen, die die Wirkung von Desinfektionsmitteln bei der praktischen Anwendung beeinflussen können.

Die Bedingungen genügen den allgemeinen Ansprüchen und wurden so ausgewählt, dass sie einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten erlauben. Jede durch diesen Test festgelegte Anwendungskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums bezieht sich auf definierte experimentelle Bedingungen. Dennoch dürfen für einige Anwendungen die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt abweichen und deshalb müssen zusätzliche Prüfungen unter entsprechenden Bedingungen durchgeführt 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 hartem Wasser oder im Fall gebrauchsfertiger Lösungen in Wasser eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung bilden. Produkte können nur bis zu einer Konzentration von 80 % geprüft werden, da immer eine bestimmte Verdünnung durch Zugabe der Impfkultur oder der Belastungssubstanz erfolgt.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte aus dem 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.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren dient dazu, die Aktivität handelsüblicher Zubereitungen oder Wirksubstanzen unter deren Anwendungsbedingungen zu bestimmen.

ANMERKUNG 2 Diese Methode entspricht einem Phase 2/Stufe 1-Versuch (Anhang F).

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente 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 Bakterien- und Pilzstämmen für die Prüfung der bakteriziden und fungiziden Wirkung*

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

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Produkt

chemischer Wirkstoff oder Zubereitung, der (die) als chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum verwendet wird

3.2

Fungizid

Produkt, das Pilze (Schimmelpilze und Hefen) einschließlich ihrer Sporen unter festgelegten Bedingungen abtötet

ANMERKUNG Das von „Fungizid“ abgeleitete Adjektiv ist „fungizid“.

3.3

fungizide Wirkung

Fähigkeit eines Produkts, unter festgelegten Bedingungen die Anzahl der lebenden vegetativen Hefezellen und der Schimmelpilzsporen zu vermindern

3.4

fungistatische Wirkung

Fähigkeit eines Produkts, unter festgelegten Bedingungen das Wachstum von Pilzen (Schimmelpilze und/oder Hefen) zu hemmen

3.5

Levurozid

Produkt, das Hefen unter festgelegten Bedingungen abtötet

ANMERKUNG Das von „Levurozid“ abgeleitete Adjektiv ist „levurozid“.

3.6

levurozide Wirkung

Fähigkeit eines Produkts, unter festgelegten Bedingungen die Anzahl der lebenden Hefezellen entsprechender Prüfkeime zu vermindern

4 Anforderungen

Bei dem mit hartem Wasser (5.2.2.7) oder im Fall gebrauchsfertiger Lösungen mit Wasser (5.2.2.2) verdünnten Produkt muss bei Prüfung nach Abschnitt 5 eine logarithmische Verminderung der Lebendkeimzahl um mindestens 10^4 nachgewiesen werden. Die Prüfung erfolgt unter Simulation einer niedrigen Belastung (3 g/l Rinderalbumin — 5.2.2.8.2) oder einer hohen Belastung (10 g/l Rinderalbumin und 10 g/l Hefeextrakt — 5.2.2.8.3) entsprechend den praktischen Anwendungsbereichen und unter den geforderten Prüfbedingungen (ein oder zwei ausgewählte Prüfkeime, 10 °C, 30 min).

Die fungizide Wirkung wird unter Verwendung der folgenden beiden Prüfkeime beurteilt:

- *Candida albicans* (vegetative Zellen);
- *Aspergillus niger* (Sporen).

Die levurozide Wirkung wird unter Verwendung des folgenden Prüfkeimes beurteilt:

- *Candida albicans* (vegetative Zellen).

Wo angebracht, wird zusätzliche spezifische fungizide oder levurozide Wirkung unter Anwendung anderer Einwirkzeiten, Temperaturen und Prüforganismen entsprechend 5.2.1 und 5.5.1.1 bestimmt, um die vorgesehenen spezifischen Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

ANMERKUNG Für diese zusätzlichen Bedingungen kann die als ein Ergebnis festgelegte Konzentration niedriger als die unter obligatorischen Prüfbedingungen erhaltene sein.

5 Prüfverfahren

5.1 Prinzip

5.1.1 Eine Probe des Produkts wird im Lieferzustand und/oder verdünnt mit hartem Wasser oder im Fall gebrauchsfertiger Produkte mit Wasser zu einer Prüfsuspension aus Pilzen (Hefezellen oder Schimmelpilzsporen) in einer Lösung einer Belastungssubstanz gegeben. Das Gemisch wird bei $(10 \pm 1)^\circ\text{C}$ für $30 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ gehalten (obligatorische Prüfbedingungen). Nach dieser Einwirkzeit wird eine aliquote Menge entnommen, die fungizide und/oder fungistatische Wirkung in diesem Anteil wird sofort mittels eines validierten Verfahrens neutralisiert oder unterdrückt. Das Verfahren der Wahl ist dabei das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Falls kein geeignetes Neutralisationsmedium zu ermitteln ist, wird die Membranfiltration durchgeführt. In jeder Probe wird die Anzahl überlebender Pilze bestimmt und die Verminderung der Lebendkeimzahlen berechnet.

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

5.1.3 Zusätzliche und wahlfreie Einwirkzeiten und Temperaturen werden festgelegt. Zusätzliche Prüfkeime dürfen angewendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfkeime

Zur Ermittlung der fungiziden Wirkung sind die folgenden Stämme als Prüforganismen zu verwenden:¹⁾

- *Candida albicans* ATCC 10231;
- *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Die levurozide Wirkung wird nur mit *Candida albicans* ermittelt.

ANMERKUNG Für entsprechende Stammmummern in anderen Stammsammlungen siehe Anhang A.

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

Falls zusätzliche Prüfkeime verwendet werden, sind diese unter optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Zeit, Atmosphäre, Medium) zu bebrüten, diese sind auch im Prüfbericht anzugeben. Falls die ausgewählten zusätzlichen Prüfkeime nicht den angegebenen Stämmen entsprechen, ist ihre Eignung zur Herstellung des erforderlichen Impfansatzes nachzuweisen. Wenn diese weiteren Prüforganismen nicht in einem Referenzzentrum klassifiziert sind, müssen ihre Eigenschaften zur Identifikation angegeben werden. Zusätzlich müssen die Stämme von dem Prüflabor oder der nationalen Stammsammlung fünf Jahre zu Referenzzwecken aufbewahrt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle Gewichtsangaben von chemischen Substanzen in diesem Dokument beziehen sich auf wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die geforderten Gewichtsangaben müssen so vorgesehen werden, dass sie daraus folgende Molekulargewichtsdifferenzen ermöglichen.

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

ANMERKUNG 1 Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern, wird empfohlen, kommerziell erhältliche wasserfreie Materialien zur Herstellung von Kulturmedien zu verwenden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten strengstens befolgt werden.

ANMERKUNG 2 Für jedes Kulturmedium und Reagenz sollte der maximale Anwendungszeitraum festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes und darf nicht demineralisiertes Wasser sein.

Sterilisation im Dampfsterilisator (Autoklaven) [5.3.2.1 a)].

ANMERKUNG 1 Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B für die Herstellung der Kulturmedien benötigt wird und anschließend sterilisiert wird.

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

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

ANMERKUNG 3 Für das Verfahren zur Herstellung von hartem Wasser siehe 5.2.2.7.

5.2.2.3 Malzextraktagar (MEA)

Malzextraktagar, bestehend aus:

Malzextrakt	30,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	3,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	auf 1 000,0 ml

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

ANMERKUNG Falls Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auftreten, kann es notwendig sein, Neutralisationsmedium zum MEA zuzugeben. Anhang B enthält eine Anleitung über die zu verwendenden Neutralisationsmedien.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

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

Sterilisiert im Dampf-Sterilisator (Autoklav) [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 in Übereinstimmung mit 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.2 validiert sein. Das Neutralisationsmedium 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 Spülflüssigkeiten (für Membranfiltration)

Die Spülflüssigkeit muss für das zu prüfende Produkt in Übereinstimmung mit 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.3 validiert sein. Sie muss steril, mit der Filtermembran verträglich und durch diese unter den in 5.5.3 beschriebenen Prüfbedingungen filtrierbar sein.

ANMERKUNG In Anhang B finden sich Angaben über Spülflüssigkeiten, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.7 Hartes Wasser zur Verdünnung der Produkte

1 l hartes Wasser wird wie folgt hergestellt:

- Herstellung von Lösung A: 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Es wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Die Sterilisation im Autoklaven kann zu einem Gewichtsverlust führen. In diesem Fall wird unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml mit Wasser (5.2.2.2) aufgefüllt. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einem Monat aufbewahren.
- Herstellung von Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Es wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einer Woche aufbewahren.
- Es werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) gegeben, dazu gegeben werden 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B. Nach Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des harten Wassers muss $7,0 \pm 0,2$ bei einer Temperatur von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ (5.3.2.4) betragen. Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Chlorwasserstoffsäure (HCl) eingestellt.

Das harte Wasser 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 Produkts in dieses harte Wasser zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas niedriger als 300 mg/l für Calciumcarbonat (CaCO_3).

5.2.2.8 Belastungssubstanzen

5.2.2.8.1 Allgemeines

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

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in der 10fachen in der Prüfung verwendeten Endkonzentration hergestellt werden.

Die Ionenzusammensetzung, z. B. der pH-Wert, Kalzium- und/oder Magnesiumhärte und die chemische Zusammensetzung, z. B. Mineralstoffe, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und Detergentien, müssen vollständig festgelegt sein.

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

5.2.2.8.2 Anwendungsbereiche mit niedrigen Belastungen (Rinderserumalbumin-Lösung)

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

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7), die Aufbewahrung erfolgt im Kühlschrank (5.3.2.8) für bis zu einem Monat.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins im Prüfverfahren (5.5) beträgt 3,0 g/l.

5.2.2.8.3 Anwendungsbereiche mit hohen Belastungen (Albumin-Hefeextrakt-Mischung)

In einem 250-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 50,0 g Hefeextrakt-Pulver in 150 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst. Nachdem sich der Schaum aufgelöst hat, wird mit Wasser (5.2.2.2) zur Marke aufgefüllt. Die Lösung 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 10 ml Wasser (5.2.2.2) zugegeben. 5,0 g Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) werden unter Schütteln in der Lösung im Kolben gelöst. Nachdem sich der Schaum aufgelöst hat, wird mit Wasser (5.2.2.2) zur Marke aufgefüllt. Es wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Das Gemisch wird im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und ist innerhalb eines Monats zu verbrauchen.

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

5.3 Apparate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

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

- a) durch Dampf, im Dampfsterilisator (Autoklav) [5.3.2.1 a)];
- b) durch trockene Hitze, im Heißluft-Sterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²⁾

und besonders folgende Geräte:

5.3.2.1 Sterilisatoren:

- a) zur Dampfsterilisation ein Autoklav (Heißluftofen), der für eine Mindesthaltezeit von 15 min auf eine Betriebstemperatur von $(121^{+3}_0) ^\circ\text{C}$ einstellbar ist;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluft-Sterilisator, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min auf eine Betriebstemperatur von $(180^{+5}_0) ^\circ\text{C}$, für eine Mindesthaltezeit von 1 h auf eine Betriebstemperatur von $(170^{+5}_0) ^\circ\text{C}$ oder für eine Mindesthaltezeit von 2 h auf eine Betriebstemperatur von $(160^{+5}_0) ^\circ\text{C}$ einstellbar ist.

5.3.2.2 Wasserbäder,

einstellbar auf $(10 \pm 1) ^\circ\text{C}$, auf $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (um beim Gussplattenverfahren MEA im flüssigen Zustand zu halten) und auf zusätzliche Untersuchungstemperaturen $\pm 1 ^\circ\text{C}$ (5.5.1).

5.3.2.3 Brutschrank,

einstellbar auf eine Betriebstemperatur von $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

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

5.3.2.4 pH-Messgerät mit einer Kalibrierungsgenauigkeit kleiner

als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei ± 1 °C.

ANMERKUNG Eine Punktionelektrode oder eine Flachmembranelektrode sollte zur Messung des pH-Wertes des Agarmediums verwendet werden (5.2.2.3).

5.3.2.5 Stoppuhr

5.3.2.6 Schüttelgeräte

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

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät

aus einem mit dem zu prüfenden Produkt kompatiblen Material.

Der Filterhalter muss ein Mindest-Nutzvolumen von 50 ml besitzen und zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser zwischen 47 mm und 50 mm mit einer Porengröße von 0,45 µm für die Sterilisation von hartem Wasser (5.2.2.7) und Rinderserumalbumin (5.2.2.8) und zum Einsatz für das Membranfiltrationsverfahren (5.5.3) geeignet sein.

Die Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen auf der Membran zu ermöglichen und um einen zu lange dauernden Filtrationsvorgang zu verhindern, ist die Apparatur so einzustellen, dass 100 ml der Spülflüssigkeit in 20 s bis 40 s filtriert werden.

5.3.2.8 Kühltank, der auf Temperaturen zwischen 2 °C und 8 °C einstellbar ist.

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

5.3.2.10 Petrischalen in den Größen 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 Glasfilterfritte mit einer Porosität von 40 µm bis 100 µm nach ISO 4793.

5.3.2.14 Zentrifuge, (2 000 g_N).

5.3.2.15 Roux-Flaschen oder entsprechende Flaschen

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

5.4 Herstellung der Prüfkeimsuspensionen und Produktprüflösungen

5.4.1 Prüfkeimsuspensionen (Prüfungs- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüfkeim werden zwei verschiedene Suspensionen hergestellt: die „Prüfsuspension“ zur Durchführung der Prüfung und die „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrollen und der Verfahrensvalidierung.

5.4.1.2 Konservierung und Stammkulturen der Prüfkeime

Die Prüfkeime und deren Stammkulturen werden entsprechend den Anforderungen von EN 12353 hergestellt und aufbewahrt.

5.4.1.3 Gebrauchskultur der Prüfkeime

5.4.1.3.1 *Candida albicans* (Hefe)

Um die Gebrauchskultur von *Candida albicans* (5.2.1) herzustellen, wird von der Stammkultur (5.4.1.2) eine Subkultur durch Ausstrich auf MEA (5.2.2.3)-Schrägararröhrchen oder -platten (5.3.2.10) angelegt und bebrütet (5.3.2.3). Nach 42 h bis 48 h wird eine zweite Subkultur aus der ersten Subkultur auf gleiche Weise angelegt und 42 h bis 48 h bebrütet. Von dieser zweiten Subkultur aus kann eine dritte Subkultur auf gleiche Weise angelegt werden. Die zweite und (falls hergestellt) dritte Subkultur ist (sind) die Gebrauchskultur(en).

Falls die Anlegung der zweiten Subkultur an einem bestimmten Tag nicht möglich ist, darf eine 72-h-Subkultur für die weitere Subkultivierung verwendet werden, vorausgesetzt, dass die Subkultur während der 72 h im Brutschrank (5.3.2.3) verblieb.

Eine vierte Subkultur darf nicht hergestellt und verwendet werden.

5.4.1.3.2 *Aspergillus niger* (Schimmelpilz)

Für *Aspergillus niger* (5.2.1) wird nur die erste auf MEA (5.2.2.3) in Roux-Flaschen (5.3.2.15) gewachsene Subkultur verwendet und für 9 d bis 11 d bebrütet. Die Herstellung weiterer Subkulturen ist nicht notwendig.

5.4.1.3.3 Andere Prüfkeime (Hefen oder Schimmelpilze)

Für zusätzliche Prüfkeime ist jedes Abweichen von diesen Kultivierungsverfahren für Hefen oder Schimmelpilze oder für die Herstellung der Suspensionen unter Angabe der Begründungen im Prüfbericht zu erfassen.

5.4.1.4 Prüfsuspensionen („N“)

5.4.1.4.1 *Candida albicans*

Folgendes Verfahren wird zur Herstellung der *Candida albicans*-Prüfsuspension angewendet:

- a) Es werden 10 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3.1) werden ösenweise Zellen in das Verdünnungsmittel (5.2.2.4) gegeben. Die Suspension der Zellen im Verdünnungsmittel sollte erfolgen, indem die Öse an der Wand des feuchten Kolbens gerieben wird, um die Zellen vor dem Eintauchen im Lösungsmittel voneinander zu trennen. Mit dem mechanischen Schüttelgerät [5.3.2.6 b)] wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird von den Glasperlen abgesaugt und in ein Röhrchen überführt.