

DIN EN 1657

ICS 71.100.35

Entwurf

Einsprüche bis 2014-07-09
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 1657:2006-03 und
DIN EN 1657
Berichtigung 1:2007-06

**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 prEN 1657:2014**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeastcidal activity of
chemical disinfectants and antiseptics used in the veterinary area –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German version prEN 1657:2014

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 prEN 1657:2014

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2014-05-09 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und
Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses
Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-
Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de,
sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an nal@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann
im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter
www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im
DIN, 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten
Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 47 Seiten

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 1657:2014) 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.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 1657:2006-03 und DIN EN 1657 Berichtigung 1:2007-06 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Aufnahme von EN 14885 in die normativen Verweisungen;
- b) Abschnitt „Begriffe“ (3) überarbeitet;
- c) Anforderungen (4) überarbeitet (Tabelle 1 „Obligatorische und zusätzliche Prüfbedingungen“ neu aufgenommen);
- d) als neuer Prüforganismus *Aspergillus brasiliensis* (anstelle von *Aspergillus niger*) aufgenommen;
- e) Bild 1 und Bild 2 in 5.4.1.3.2 und Bild 3 und Bild 4 in 5.4.1.4.2 aufgenommen;
- f) 5.7.4 „Zusätzliche Grenzwerte für *Aspergillus brasiliensis*“ aufgenommen;
- g) die Abkürzungen für die Referenzstämme in nationalen Sammlungen in Anhang A aufgenommen;
- h) Anhang B „Geeignete Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten“ überarbeitet und neu gestaltet (Tabellenform);
- i) Anhang F (informativ) „Informationen zur Anwendung und Interpretation Europäischer Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ gestrichen;
- j) Norm redaktionell überarbeitet.

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)

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)

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)

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.5a

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
5.3 Apparate und Glasgeräte	10
5.4 Herstellung der Prüforganismus-Suspensionen und der Produktprüflösungen.....	11
5.5 Verfahrensablauf zur Beurteilung der fungiziden oder levuroziden Wirkung des Produkts.....	16
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	22
5.7 Verifizierung des Verfahrens	26
5.8 Auswertung und Präzision	27
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	28
5.10 Prüfbericht.....	29
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	31
Anhang B (informativ) Geeignete Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten	32
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung von Prüfverfahren	34
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichtes.....	38
Anhang E (informativ) Präzision der Prüfergebnisse	42
Literaturhinweise	45

Vorwort

Dieses Dokument (prEN 1657:2014) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 1657:2005 ersetzen.

Diese Europäische Norm wurde überarbeitet, um die Zubereitung der Pilzsporensuspension mit anderen fungiziden Prüfungen des CEN/TC 216 zu harmonisieren und für alle EN-Normen geltende Änderungen zu integrieren.

Eine weitere Anforderung wurde für die Aspergillus-Sporensuspension hinzugefügt (damit eine Sporensuspension zu verwenden ist, die mindestens 75 % stachelige Sporen enthält); deshalb müssen die Ergebnisse, die mit früheren, diese zusätzliche Anforderung nicht erfüllenden Versionen der EN 1657 erhalten wurden, durch Wiederholung der Prüfungen nach EN 1657:2014 bestätigt werden.

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 die praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts, einschließlich Einwirkzeit, Temperatur, Prüforganismen und Belastungssubstanzen, d. h. Bedingungen, die dessen Wirkung bei der praktischen Anwendung beeinflussen können.

Die Bedingungen sollen den allgemeinen Ansprüchen genügen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten ermöglichen. Jede in dieser Prüfung festgestellte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums bezieht sich auf genau festgelegte Untersuchungsbedingungen. Bei einigen Anwendungen dürfen 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 Lösungen in Wasser eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung bilden. Die Produkte können nur bis zu einer Konzentration von 80 % geprüft werden, da immer eine bestimmte Verdünnung durch Zugabe der Prüforganismen oder der Belastungssubstanz erfolgt.

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 gelangen.

EN 14885 legt im Einzelnen die Beziehung der verschiedenen Prüfungen untereinander sowie zu den „Anwendungsempfehlungen“ fest.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren ist zur Bestimmung der Wirkung von handelsüblichen Zubereitungen oder Wirkstoffen unter deren Anwendungsbedingungen vorgesehen.

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

2 Normative Verweisungen

Die folgenden Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses 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 Verdünnung mit hartem Wasser (5.2.2.7) oder – im Fall gebrauchsfertiger Lösungen – mit Wasser (5.2.2.2) und Prüfung nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 muss das Produkt unter Simulation einer niedrigen Belastung (3 g/l Rinderalbumin) oder einer hohen Belastung (10 g/l Hefeextrakt und 10 g/l Rinderserumalbumin) eine Verminderung der Keimzahl (der Lebendkeimzahl) um mindestens 4 dezimallogarithmische (lg) Stufen nachweisen.

Tabelle 1 — Obligatorische und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Fungizide oder levurozide Wirkung im Veterinärbereich
Prüforganismus fungizide Wirkung	
a) obligatorisch	<i>Aspergillus brasiliensis</i> und <i>Candida albicans</i>
Prüforganismus levurozide Wirkung	
a) obligatorisch	<i>Candida albicans</i>
b) zusätzlich	jeder geeignete Prüforganismus
Prüftemperatur	
a) obligatorisch	(10 ± 1) °C
b) zusätzlich	(4 ± 1) °C; (20 ± 1) °C; (40 ± 1) °C
Einwirkzeit ^a	
a) obligatorisch	30 min ± 10 s
b) zusätzlich	5 min ± 10 s, 60 min ± 10 s, 120 min ± 10 s ^a
Belastungssubstanz	
a) obligatorische	
Verschmutzung niedrigen Grades	3,0 g/l Rinderserumalbumin
Verschmutzung hohen Grades	10 g/l Hefeextrakt plus 10 g/l Rinderserumalbumin
b) zusätzlich	jede geeignete Substanz
Die in Tabelle 1 angegebenen obligatorischen Einwirkzeiten für Desinfektionsmittel 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.	

Eine 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

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 für 30 min ± 10 s bei (10 ± 1) °C gehalten (obligatorische Prüfbedingungen). Nach dieser Einwirkzeit wird eine aliquote Menge entnommen, die fungizide und/oder fungistatische Wirkung in diesem Anteil wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. Das gewählte Verfahren ist 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 brasiliensis* (fungizide Wirkung) oder nur den vegetativen Zellen von *Candida albicans* (levurozide Wirkung) als Prüforganismen durchgeführt (obligatorische Prüfbedingungen).

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

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

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

- *Candida albicans* ATCC 10231;
- *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404; (früher *Aspergillus niger*).

Die levurozide Wirkung muss ausschließlich mit *Candida albicans* ermittelt werden.

ANMERKUNG Für entsprechende Stammmummern in anderen Stammsammlungen siehe Anhang A.

Die erforderliche Bebrütungstemperatur dieser Prüforganismen beträgt $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.3). Die gleiche Temperatur ist bei allen Bebrütungen anzuwenden, die bei einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung vorgenommen werden.

Falls zusätzliche Prüforganismen verwendet werden, sind diese unter optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Zeit, Atmosphäre, Medien) zu bebrüten. Diese sind auch im Prüfbericht anzugeben. Falls die ausgewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den angegebenen Stämmen entsprechen, ist deren Eignung zur Herstellung des erforderlichen Impfansatzes nachzuweisen. Wenn diese weiteren Prüforganismen nicht in einem Referenzzentrum klassifiziert sind, müssen deren 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 dieser Europäischen Norm beziehen sich auf wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die geforderten Gewichtsangaben müssen angepasst werden, um daraus resultierende Differenzen in den 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.

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.

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 kein demineralisiertes Wasser sein.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

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

ANMERKUNG 2 Falls kein destilliertes Wasser von 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 5.2.2.7.

1) ATCC-Nummern sind Sammlungsnummern für Stämme, die von der American Type Culture Collection (ATCC) geliefert werden. Diese Information dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts 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)	bis zu 1 000,0 ml

* Der Malzextrakt sollte lebensmitteltauglich (empfohlen wird Cristomalzpulver von Difal) oder entsprechend sein. Er sollte nicht stark aufgereinigt sein und nicht nur auf Maltose basieren (empfohlen wird Malzextrakt von OXOID²⁾).

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 $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

Falls Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auftreten, ist es möglicherweise erforderlich, dem MEA Neutralisationsmedium zuzusetzen. Im Anhang B finden sich Beispiele von Neutralisationsmedien, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchloridlösung, bestehend aus:

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

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Verdünnungsmittels $7,0 \pm 0,2$, 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 Neutralisationsmedium, die sich für einige Produktkategorien als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.6 Spülflüssigkeit (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. 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 Produktkategorien als geeignet erwiesen haben.

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

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung von Produkten

Zur Herstellung von 1 l hartem Wasser kommt folgende Verfahrensweise zum Einsatz:

- 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. Die Lösung ist durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)] zu sterilisieren. Die Sterilisation im Autoklaven, falls angewendet, kann 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.
- 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; dazu sind 6,0 ml Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B zu geben. 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 300 mg/l 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 einer Konzentration hergestellt werden, die dem Zehnfachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht.

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

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

5.2.2.8.2 Verschmutzung niedrigen Grades (Rinderserumalbumin-Lösung)

3,0 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) sind in 100 ml Wasser (5.2.2.2) zu lösen.

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.

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

In einem 250-ml-Messkolben (5.3.2.12) sind 50,0 g Hefeextraktpulver in 150 ml Wasser (5.2.2.2) zu lösen und es ist zu warten, bis der Schaum sich aufgelöst hat. Danach ist mit Wasser (5.2.2.2) bis zur Marke aufzufüllen. Die Lösung ist in eine saubere trockene Flasche zu überführen und im Autoklaven [5.3.2.1 a)] zu sterilisieren. Danach ist auf $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ abzukühlen.

25 ml dieser Lösung sind in einen 50-ml-Messkolben (5.3.2.12) zu pipettieren und 10 ml Wasser (5.2.2.2) hinzuzufügen. 5,0 g Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) sind 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 (5.3.2.7) zu sterilisieren. Die Lösung ist im Kühlschrank (5.3.2.8) aufzubewahren und innerhalb eines Monats zu verwenden.

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 Glasgeräte und Geräteteile sind alle mit den Kulturmedien, den Reagenzien oder der Probe in Berührung kommenden Glasgeräte und Geräteteile 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 Laborausrüstung³⁾ und besonders 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 $(121^{+3}_0)^\circ\text{C}$ gehalten werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze, ein Heißluft-Sterilisator, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min bei $(180^{+5}_0)^\circ\text{C}$, für eine Mindesthaltezeit von 1 h bei $(170^{+5}_0)^\circ\text{C}$ oder für eine Mindesthaltezeit von 2 h bei $(160^{+5}_0)^\circ\text{C}$ gehalten werden kann.

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf $(10 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ und $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ (um MEA im flüssigen Zustand zu halten, falls das Gussplattenverfahren angewendet wird) und auf weitere Prüftemperaturen $\pm 1^\circ\text{C}$ (5.5.1).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit kleiner als $\pm 0,1$ 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[®]-Mischer⁴⁾;
- b) mechanisches Schüttelgerät.

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

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

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

Das Gerät muss mit einem Filterhalter von mindestens 50 ml Volumen ausgestattet sein. Es muss geeignet sein zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von 0,45 µm für die Sterilfiltration von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7), Rinderserumalbumin (5.2.2.8), und für den Fall der Anwendung des Membranfiltrationsverfahrens (5.5.3).

Die verwendete Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen. Für eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen auf der Membran und zur Vermeidung eines übermäßig langen Filtrationsvorgangs, 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.

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 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 Glasflaschen mit belüfteten Kappen.

5.3.2.16 Mikroskop, geeignet für eine 400fache Vergrößerung.

5.4 Herstellung der Prüforganismus-Suspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüforganismus-Suspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüforganismus muss eine Suspension hergestellt werden: die „Prüfsuspension“ wird zur Durchführung der Prüfung und die „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrollversuche und der Verfahrensvalidierung verwendet.

5.4.1.2 Konservierung und Stammkulturen der Prüforganismen

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

5.4.1.3 Gebrauchskultur der Prüforganismen

5.4.1.3.1 *Candida albicans* (Hefe)

Zur Herstellung der Gebrauchskultur von *Candida albicans* (5.2.1) ist aus der Stammkultur (5.4.1.2) eine Subkultur durch Ausstrich auf Schrägagar oder Platten (5.3.2.10) aus MEA (5.2.2.3) anzulegen und zu bebrüten (5.3.2.3). Nach 42 h bis 48 h ist aus der ersten Subkultur auf die gleiche Weise eine zweite Subkultur anzulegen und 42 h bis 48 h zu bebrüten. Aus dieser zweiten Subkultur darf auf die gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden. Die zweite und (falls angelegt) dritte Subkultur ist (sind) die Gebrauchskultur(en).

Wenn es nicht möglich ist, die zweite Subkultur an einem bestimmten Tag anzulegen, darf eine 72-h-Subkultur für die folgenden Subkulturen unter der Voraussetzung verwendet werden, dass die Subkultur während der 72 h im Brutschrank (5.3.2.3) verblieben ist.

Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

5.4.1.3.2 *Aspergillus brasiliensis* (Schimmelpilz)

Bei *Aspergillus brasiliensis* (5.2.1) ist nur die erste Subkultur, die auf MEA (5.2.2.3) in Petrischalen oder Glasflaschen mit belüfteten Kappen (5.3.2.15) angelegt wurde, zu verwenden und 7 Tage bis 9 Tage bei $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ zu bebrüten. Das Anlegen weiterer Subkulturen ist nicht erforderlich. Um eine gleichmäßige Temperaturverteilung zu verbessern, dürfen die Petrischalen während der Bebrütung nicht übereinander gestapelt werden. Nach Ablauf der Bebrütung müssen alle Kulturen eine dunkelbraune oder schwarze Oberfläche aufweisen. Kulturen, die vereinzelte, kleine weiße oder graue Flächen aufweisen, dürfen verwendet werden (siehe Bild 1).

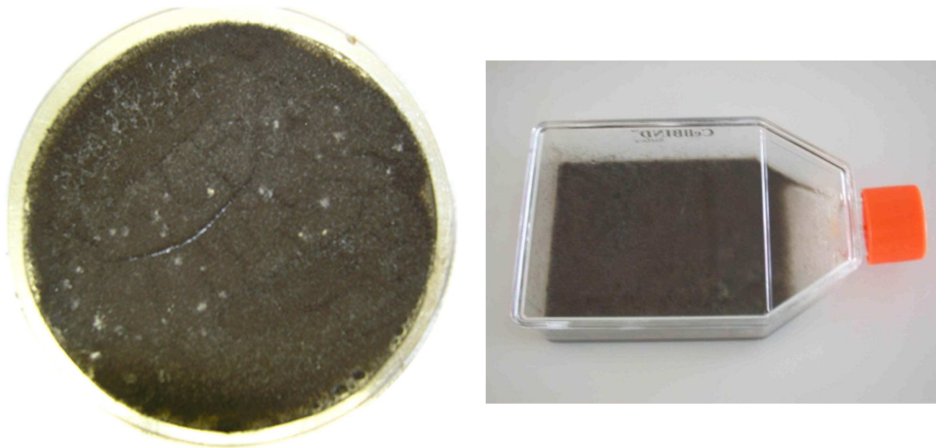


Bild 1 — Foto Nr. 1: *A. brasiliensis* ATCC 16404 nach 7 Tagen Bebrütung bei 30 °C



Bild 2 — Foto Nr. 2: Beispiel für eine ungeeignete (nicht brauchbare) Kultur von *A. brasiliensis* ATCC 16404 nach 7 Tagen Bebrütung bei 30 °C

5.4.1.3.3 Andere Prüforganismen (Hefen oder Schimmelpilze)

Bei zusätzlichen Prüforganismen sind alle Abweichungen von diesem Verfahren zur Kultivierung der Hefen oder Schimmelpilze oder zur Herstellung der Suspension aufzuzeichnen, wobei die Gründe dafür im Prüfbericht anzugeben sind.

5.4.1.4 Prüfsuspension („N“)

5.4.1.4.1 *Candida albicans*

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

- a) Es sind 10 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) in einem 100-ml-Kolben zu geben. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3.1) sind ösenweise Zellen in das Verdünnungsmittel (5.2.2.4) zu überführen. Die Suspension der Zellen im Verdünnungsmittel sollte erfolgen, indem die Öse vor dem Eintauchen in das Verdünnungsmittel an der feuchten Wand des Kolbens gerieben wird, um die Zellen voneinander zu trennen. Mit dem mechanischen Schüttelgerät [5.3.2.6 b)] ist der Kolben 3 min zu schütteln. Die Suspension ist von den Glasperlen abzusaugen und in ein Reagenzglas zu überführen.
- b) Mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) ist die Zellzahl in der Suspension auf $1,5 \times 10^7$ KBE/ml⁵⁾ bis $5,0 \times 10^7$ KBE/ml einzustellen, wobei die Anzahl der KBE mittels eines geeigneten Verfahrens abgeschätzt wird. Diese Prüfsuspension ist im Wasserbad bei der Prüftemperatur θ [5.5.1.1 a)] aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden.

ANMERKUNG Die Verwendung eines Spektrophotometers zur Einstellung der Zellzahl wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, Küvette mit 10 mm optischer Weglänge). Jedes Laboratorium sollte deshalb Kalibrierdaten für jeden Prüforganismus erarbeiten, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte im Allgemeinen zwischen 0,200 und 0,350 zu finden sind. Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

- c) Zur Auszählung sind von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) Verdünnungen von 10^{-5} und 10^{-6} herzustellen. Es ist zu durchmischen [5.3.2.6 a)].

Von jeder Verdünnung ist eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung zu entnehmen und zur Beimpfung im Gussplattenverfahren oder im Oberflächenverfahren zu verwenden.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens ist jede 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen zu überführen und es sind 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ abgekühlter MEA (5.2.2.3) zuzugeben.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens ist jede 1,0-ml-Probe – in etwa gleiche Anteile geteilt – auf einer geeigneten Anzahl (mindestens zwei) vorgetrockneter MEA-Platten (5.2.2.3) auszustreichen.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.4.2 *Aspergillus brasiliensis*

Folgendes Verfahren wird zur Herstellung der *Aspergillus brasiliensis*-Prüfsuspension angewendet:

- a) Unter Verwendung der Gebrauchskultur (5.4.1.3.2) sind die Sporen in 10 ml einer sterilen Polysorbat 80-Lösung (Massenkonzentration 0,05 %) in Wasser (5.2.2.2) zu suspendieren. Die Conidiosporen sind mit einem sterilen Glasstab oder Spatel von der Oberfläche der Kultur abzulösen. Die Suspension ist in eine Glasflasche zu überführen und mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) eine Minute von Hand leicht zu schütteln. Die Suspension ist durch eine Glasfilterfritte (5.3.2.13) zu filtrieren.
- b) Unmittelbar nach der Herstellung der Prüfsuspension ist eine mikroskopische Untersuchung mit einer 400fachen Vergrößerung (5.3.2.16) durchzuführen, um Folgendes aufzuzeigen:
 - 1) Das Vorhandensein einer hohen Konzentration (mindestens 75 %) an charakteristischen reifen Conidiosporen, d. h. stachelige Sporen (im Vergleich zu glatten Sporen) [siehe Bild 3 und Bild 4].

Sollte ein Anteil von 75 % stacheliger Conidiosporen nicht erreicht werden, kann es an der verwendeten *Aspergillus-brasiliensis*-Kultur oder den zur Herstellung der Sporen verwendeten Medien liegen. In diesem Fall ist es notwendig, den gleichen Stamm von einer anderen Stammsammlung zu beziehen und/oder MEA von einem anderen Lieferanten zu verwenden.

5) KBE/ml = koloniebildende Einheit(en) je Milliliter