

Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie

Teil 6: Anforderungen an Kontrollstämme

DIN
58959-6

ICS 07.100.10

Deskriptoren: Qualitätsmanagement, Mikrobiologie, Medizin

Ersatz für
DIN 58941-2:1984-05 und
DIN 58941-3:1984-05

Quality management in medical microbiology – Part 6:
Requirements for control strains

Management de la qualité dans la microbiologie médicale – Partie 6:
Prescriptions pour souches de contrôle

In case of doubt, the German-language version should be referred to as the authoritative text.

Vorwort

Diese Norm wurde vom Normenausschuß Medizin, Arbeitsausschuß E12 "Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie", erarbeitet.

Anhang A ist informativ.

Die Normen und Beiblätter der Reihe DIN 58959 "Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie" sind im Beiblatt 1 "Übersicht und Stichwortverzeichnis" zu DIN 58959 aufgeführt.

Änderungen

Gegenüber DIN 58941-2:1984-05 und DIN 58941-3:1984-05 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

Die Festlegungen wurden redaktionell überarbeitet, dem neuesten wissenschaftlichen Stand angepaßt, in die Normen der Reihe DIN 58959 eingegliedert und damit auf den Anwendungsbereich der gesamten medizinischen Mikrobiologie erweitert.

Frühere Ausgaben

DIN 58941-2:1984-05

DIN 58941-3:1984-05

Foreword

This standard was drafted by the Normenausschuß Medizin (medical standards department), technical committee E12 "Quality management in medical microbiology".

Annex A is informative.

The standards and supplements of the series DIN 58959 "Quality management in medical microbiology" are listed in supplement 1 "Overview and index" to DIN 58959.

Amendments

In comparison to DIN 58941-2:1984-05 and DIN 58941-3:1984-05 the following amendments have been made:

The requirements were revised editorially, adapted to the state of the art, assigned to the standards of the series DIN 58959 and the field of application therefore broadened to encompass the entire field of medical microbiology.

1 Anwendungsbereich

Diese Norm gilt für alle Kontrollstämme von Bakterien und Pilzen, die als Referenzstämme, Stamm- und Gebrauchskulturen zur Qualitätssicherung im medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium eingesetzt werden.

Diese Norm spezifiziert die standardisierte Züchtung, Lagerung, Bereitstellung und laufende Kontrolle von definierten und einheitlichen Reinkulturen, die als Kontrollstämme zur Qualitätssicherung eingesetzt werden, um reproduzierbare Resultate und eine gesicherte mikrobiologische Diagnostik zu ermöglichen.

1 Field of application

This standard applies to all bacterial and fungal strains which serve as reference strains, stock cultures and working cultures for quality assurance purposes in the medical microbiological laboratory.

This standard specifies the standardized growth, storage, provision and continuous control of defined and uniform pure cultures, which are used for quality assurance to achieve reproducible results and ensure safe microbiological diagnostic work.

Fortsetzung Seite 2 bis 15
Continued on pages 2 to 15

Normenausschuß Medizin (NAMed) im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

2 Normative Verweisungen

Diese Norm enthält durch datierte oder undatierte Verweisungen Festlegungen aus anderen Publikationen. Diese normativen Verweisungen sind an den jeweiligen Stellen im Text zitiert, und die Publikationen sind nachstehend aufgeführt. Bei datierten Verweisungen gehören spätere Änderungen oder Überarbeitungen dieser Publikationen nur zu dieser Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation.

DIN 12950-10

Laboreinrichtungen – Sicherheitswerkbänke für mikrobiologische und biotechnische Arbeiten – Teil 10: Anforderungen, Prüfung

DIN 58946-1

Sterilisation – Dampf-Sterilisatoren für medizinische Sterilisiergüter – Teil 1: Begriffe

DIN 58946-5

Sterilisation – Dampf-Sterilisatoren für medizinische Sterilisiergüter – Teil 5: Klein-Sterilisatoren – Anforderungen

DIN 58956-1

Medizinische Mikrobiologie – Medizinisch-mikrobiologische Laboratorien – Teil 1: Klassifizierung, Abgrenzung der Arbeitsstätten, Räumlichkeiten – Sicherheitstechnische Anforderungen und Prüfung

DIN 58956-3

Medizinische Mikrobiologie – Medizinisch-mikrobiologische Laboratorien – Teil 3: Anforderungen an den Organisationsplan

DIN 58959-1

Qualitätsmanagement im medizinisch-mikrobiologischen Laboratorium – Teil 1: Anforderungen an das QM-System

Beiblatt 1 zu DIN 58959-6

Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie – Teil 6: Anforderungen an Kontrollstämme – Beispiele zur Herstellung und Aufbewahrung von Bakterien als Stamm- und Gebrauchskulturen

Beiblatt 2 zu DIN 58959-6

Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie – Teil 6: Anforderungen an Kontrollstämme – Beispiele zur Herstellung und Aufbewahrung von Pilzen als Stamm- und Gebrauchskulturen

Beiblatt 1 zu DIN 58959-7

Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie – Teil 7: Allgemeine Anforderungen an das Mitführen von Kontrollstämmen – Bezugsquellen für Kontrollstämme

Beiblatt 2 zu DIN 58959-7

Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie – Teil 7: Allgemeine Anforderungen an das Mitführen von Kontrollstämmen – ATCC- und DSM-Nummern häufig verwendeter Kontrollstämme

Beiblatt 3 zu DIN 58959-7

Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie – Teil 7: Allgemeine Anforderungen an das Mitführen von Kontrollstämmen – Beispiele für Kontrollkarten zur Dokumentation von Prüfergebnissen

DIN EN 1659

In-vitro-Diagnostik/Diagnostika – Kulturmedien für die Mikrobiologie – Begriffe; Deutsche Fassung EN 1659:1996

DIN ISO 8362-5

Injektionsbehältnisse für Injektionspräparate und Zubehör – Teil 5: Gefriertrocknungsstopfen für Injektionsflaschen (ISO 8362-5:1995)

2 Normative references

This standard incorporates by dated or undated reference, provisions from other publications. These normative references are cited at the appropriate places in the text and the publications are listed hereafter. For dated references, subsequent amendments to or revisions of any of these publications apply to this standard only when incorporated in it by amendment or revision. For undated references the latest editions of the publication referred to applies.

DIN 12950-10

Laboratory furniture – Safety cabinets for microbiological and biotechnological work – Part 10: Requirements and testing

DIN 58946-1

Sterilization – Steam-sterilizers for medical products – Part 1: Terminology

DIN 58946-5

Sterilization – Steam-sterilizers for medical products – Part 5: Small sterilizers – Requirements

DIN 58956-1

Medical microbiology – Medical microbiological laboratories – Part 1: Classification, areas of risk, localities, safety requirements and testing

DIN 58956-3

Medical microbiology – Medical microbiological laboratories – Part 3: Requirements for the organization scheme

DIN 58959-1

Quality management in medical microbiology – Part 1: Requirements for the QM system

Supplement 1 to DIN 58959-6

Quality management in medical microbiology – Part 6: Requirements for control strains – Examples for production and preservation of bacteria used as stock cultures and working cultures

Supplement 2 to DIN 58959-6

Quality management in medical microbiology – Part 6: Requirements for control strains – Examples for production and preservation of fungi used as stock and working cultures

Supplement 1 to DIN 58959-7

Quality management in medical microbiology – Part 7: General requirements for the use of control strains – Sources of supply for control strains

Supplement 2 to DIN 58959-7

Quality management in medical microbiology – Part 7: General requirements for the use of control strains – ATCC and DSM numbers of commonly used control strains

Supplement 3 to DIN 58959-7

Quality management in medical microbiology – Part 7: General requirements for the use of control strains – Examples of control sheets for documentation of test results

DIN EN 1659

In vitro diagnostic systems – Culture media for microbiology – Terms and definitions; German version EN 1659:1996

DIN ISO 8362-5

Injection containers for injectables and accessories – Part 5: Freeze drying closures for injection vials (ISO 8362-5:1995)

3 Definitionen

ANMERKUNG: Begriffe der medizinischen Mikrobiologie, die als bekannt vorausgesetzt werden, sind in dieser Norm nicht definiert.

Für die Anwendung dieser Norm gelten die Definitionen nach DIN EN 1659 und DIN 58959-1 zusammen mit folgenden:

3.1 Referenzstamm: Ein von Kultursammlungen (siehe Beiblatt 1 zu DIN 58959-7) erhältlicher, katalogisierter und in seinen Merkmalen charakterisierter und definierter Bakterien- oder Pilzstamm, der bei der Qualitätssicherung zur Herstellung von Stammkulturen eingesetzt wird.

3.2 Stammkultur: Eine Subkultur eines Referenzstammes, die in den einzelnen Laboratorien weitergezüchtet und aufbewahrt wird. Sie dient als Ausgangsmaterial für die Gebrauchskulturen (Kontrollstämme) im mikrobiologischen Laboratorium.

3.3 Gebrauchskultur: Eine Subkultur einer Stammkultur, die als Ausgangsmaterial (= Kontrollstamm) für die Qualitätssicherung dient.

4 Allgemeine Anforderungen

4.1 Bakterien- und Pilzstämme

4.1.1 Referenzstämme

Referenzstämme sind von geeigneten Kultursammlungen zu beziehen (siehe Beiblatt 1 zu DIN 58959-7) und müssen in geeigneten, z. B. in den von den Kultursammlungen empfohlenen Kulturmedien angezüchtet werden. Sie müssen auf Reinheit und stammestypische Merkmale untersucht und anschließend in ein empfohlenes Stammkulturmedium überimpft bzw. entsprechend aufbewahrt werden, siehe 4.3 und 5.1.4.

4.1.2 Stammkulturen und Gebrauchskulturen

Von jedem Referenzstamm sollte einmalig eine ausreichende Anzahl von Stammkulturen zur Aufbewahrung angelegt werden. Die Anlage von Subkulturen von Stammkulturen zur Aufbewahrung oder zum Aufbau einer Stammsammlung ist nicht zulässig.

Stammkulturen und Gebrauchskulturen müssen in ihren Merkmalen mit den Merkmalen des Referenzstammes übereinstimmen. Sie müssen die entsprechenden Merkmale besitzen, die bei der Qualitätsprüfung von Bedeutung sind.

Von Gebrauchskulturen dürfen keine weiteren Subkulturen zur Verwendung als Stammkulturen angelegt werden.

Bewährte Methoden zur Herstellung und Aufbewahrung von Stamm- und Gebrauchskulturen zur Qualitätssicherung sind im Beiblatt 1 und Beiblatt 2 zu DIN 58959-6 aufgeführt.

4.1.3 Kennzeichnung

Die Referenzstämme sind durch Angabe des abgekürzten Namens der Sammlung, der Sammlungsnummer und einer taxonomischen Bezeichnung eindeutig gekennzeichnet (z. B. *E. coli* DSM 1103); ATCC- und DSM-Nummern siehe Beiblatt 2 zu DIN 58959-7.

Bei der laborinternen Kennzeichnung der Stamm- und Gebrauchskulturen sollten die Empfehlungen der ECCO (European Culture Collections' Organization) eingehalten werden [1]:

3 Definitions

NOTE: Terms, generic for medical microbiology, which are considered to be known by specialists in this field, are not defined in this standard.

For the purposes of this standard the definitions according to DIN EN 1659 and DIN 58959-1 apply together with the following:

3.1 reference strain: A reference strain is a strain used for quality assurance, which is catalogued and described and defined according to its characteristics and obtainable from a culture collection for the preparation of stock cultures (see supplement 1 of DIN 58959-7).

3.2 stock culture: A stock culture is a subculture of a reference strain, which is maintained in individual laboratories and multiplied further. It serves as the starting material for the working cultures (control strains) in the microbiological laboratory.

3.3 working culture: A working culture is a subculture of a stock culture, which serves as the starting material (control strain) for quality assurance purposes.

4 General requirements

4.1 Bacterial and fungal strains

4.1.1 Reference strains

Reference strains shall be obtained from suitable culture collections (see supplement 1 to DIN 58959-7) and shall be cultured in appropriate media, e.g. media recommended by the culture collections. They have to be tested for purity and typical characteristics of the strain, and subsequently subcultured in a recommended stock culture medium respectively maintained appropriately, see 4.3 and 5.1.4.

4.1.2 Stock cultures and working cultures

A sufficient number of stock cultures should be prepared from each reference strain only once. Stock cultures shall not be maintained by subculturing or such subcultures shall not be used for building a strain collection.

The characteristics of stock cultures and working cultures shall conform to those of the reference strain. They shall possess the appropriate characteristics, which are important for the intended quality control purposes.

Further subcultures for use as stock cultures shall not be grown from working cultures.

Reliable methods for the storage of stock cultures and working cultures for quality assurance are given in supplements 1 and 2 of DIN 58959-6.

4.1.3 Marking

The reference strains are clearly marked by the abbreviated name of the culture collection, the collection number and a taxonomic abbreviation (e.g. *E. coli* DSM 1103); ATCC and DSM numbers according to supplement 2 of DIN 58959-7.

For internal laboratory marking purposes of the stock and working cultures, the recommendations of the ECCO (European Culture Collections' Organization) should be followed [1]:

- Die Stämme sind nur mit der vollen Bezeichnung zu verwenden.
- Wurden die Stämme ursprünglich von einer Kultursammlung bezogen und im eigenen Labor weiter subkultiviert und als Kontrollstämme aufbewahrt, werden sie mit der ursprünglichen Nummer und einem Zusatz neu gekennzeichnet. Der Zusatz kann numerisch oder alphanumerisch gewählt werden.
- Es ist anzuraten, als Zusatz einen speziellen Code zu verwenden, der Bezug auf die Firma bzw. das Laboratorium nimmt (z. B. aus E. coli DSM 1103 wird E. coli DSM 1103/LAB3, wobei LAB3 das Laboratorium ist, in dem der Kontrollstamm aufbewahrt wird).
- Stammt der Kontrollstamm nicht aus einer Kultursammlung, wird der Stamm neu gekennzeichnet mit der Ursprungsbezeichnung und dem Kontrollcode des Laboratoriums oder vorzugsweise mit dem Kontrollcode des Laboratoriums und einer Nummer oder einer Kombination von Buchstaben und Ziffern, die in der Stammkartei die genaue Bezeichnung und Herkunft des Stammes erkennen lassen müssen (siehe Abschnitt 8).
- Jede Änderung der Stammeseigenschaften und Weiterzüchtung dieses Stammes bedingt eine Änderung des Zusatzes der Identifikationsnummer.

Nicht gekennzeichnetes Material bzw. ein Stamm ohne Identifikationsnummer darf nicht verwendet werden.

4.1.4 Anzuchtbedingungen

Die Kulturmedien zur Aufbewahrung von Stamm- und Gebrauchskulturen dürfen keine Selektivmedien sein.

Zur Aufbewahrung von Stammkulturen von Bakterien sollen die Kulturmedien keine Kohlenhydrate enthalten.

Gebräuchliche Kulturmedien [2], [3], sofern nicht anders angegeben, zur Anzüchtung von Referenzstämmen sowie die Herstellung von Stamm- und Gebrauchskulturen sind in den Handbüchern der Kultursammlungen sowie im Beiblatt 1 und Beiblatt 2 zu DIN 58959-6 aufgeführt.

4.2 Bebrütungsdauer und Bebrütungstemperatur

Die Bebrütung der Stamm- und Gebrauchskulturen erfolgt für Bakterien bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ für 24 h bis 48 h, für Pilze bei 22 °C bis 25 °C für 5 d bis 16 d, je nach Reifezeit des Pilzes (als Richtwert 10 d) bzw. 72 h bei Hefen, sofern im Einzelfall keine abweichende Temperatur oder Bebrütungszeit angegeben wird oder organismenbedingt anzuwenden ist.

4.3 Aufbewahrung und Langzeitkonservierung von Bakterien und Pilzen

Für die Aufbewahrung von Bakterien- und Pilzkulturen im Laboratorium stehen neben der Gefriertrocknung zahlreiche und einfache Methoden zur Langzeitkonservierung zur Verfügung, die jedoch nicht für alle Spezies gleichermaßen geeignet sind [2], z. B.:

- Trocknen in sterilem Sand, wasserfreiem Silica-Gel oder Molekularsieben;
- Trocknen an Glas- oder Keramikperlen;
- Trocknen in Gelatineplättchen;
- Vakuumtrocknung (L-Trocknung);
- Einfrieren bei -80 °C bis -76 °C ;
- Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff.

Neben den verwendeten Methoden zur Langzeitkonservierung, siehe Tabelle 1 und Tabelle 2 sowie Beiblatt 1 und Beiblatt 2 zu DIN 58959-6, haben sich miniaturisierte Verfahren zur Tieftemperaturlagerung (Behälter mit flüssigem Stickstoff, Tiefkühlschrank bzw. Tiefkühltruhe) als besonders vorteilhaft erwiesen. Hierbei werden Zellsuspensionen

- Strains should only be used under their full designation.
- If the strains were originally obtained from one of the major culture collections and are subcultured in the laboratory and kept as control strains, they are renumbered with their original number and an added suffix. The suffix may be numeric or alphanumeric.
- It is advisable to use a special code indicating the company or the laboratory. For instance, E. coli DSM 1103 could be renumbered E. coli DSM 1103/LAB3 (LAB3 being the code of the laboratory where it is kept as control strain).
- If the strain does not originate from a culture collection, the strain is renumbered with its original number and the control code of the laboratory, or preferentially with the laboratory code and a suffix, either numeric or alphanumeric, which allows the exact origin and classification of the strain to be reconstructed from the strain file (see clause 8).
- Every modification of the characteristics of the strain and its further culturing induces a suffix change in the identification number.

Non-labelled material or strains without identification numbers shall not be used.

4.1.4 Conditions of growth

The culture media used for the maintenance of stock and working cultures shall not be selective.

The media used for the maintenance of stock and working cultures of bacteria should not contain any carbohydrates.

Frequently used culture media [2], [3], if not otherwise specified, for the growth of reference strains as well as for the preparation of stock and working cultures are listed in the manuals of the culture collections as well as in supplement 1 and supplement 2 of DIN 58959-6.

4.2 Temperatures and duration of incubation

Stock and working cultures of bacteria are incubated at $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ for 24 h to 48 h, for fungi at 22 °C to 25 °C for 5 days to 16 days according to the maturation time of the fungi (in general 10 days), respectively 72 h for yeasts, unless a different temperature or incubation time is stated or to be applied in dependence of the strain.

4.3 Maintenance and long-term preservation of bacteria and fungi

In addition to lyophilization, many simple methods are available for the maintenance and long-term storage of bacteria and fungi in the laboratory, not all of which are equally suitable for all species [2], for example:

- drying in sterile sand, anhydrous silica gel or with molecular sieves;
- drying on glass or ceramic beads;
- drying in gelatine discs;
- vacuum-drying (L-drying);
- deep-freezing at -80 °C to -76 °C ;
- storage in liquid nitrogen.

Besides the methods for long-term preservation still used (see table 1 and 2 and supplement 1 and 2 of DIN 58959-6), miniaturized methods for the deep-freeze storage (containers with liquid nitrogen, deep-freezer) have been shown to be particularly advantageous. With these methods, cell-

sionen in Kunststoffhalmen, Glas- oder Keramikperlen, Glas- oder Kunststoffkapillaren als Träger eingefroren [2]. Bewährte Methoden sind im Beiblatt 1 und Beiblatt 2 zu DIN 58959-6 beschrieben.

4.4 Sicherheitsmaßnahmen

Die als Referenzstämme vorgesehenen Bakterien- und Pilzstämme sind mit einem unterschiedlichen Risiko für den Arbeitsausführenden und die Umwelt behaftet. Der Umgang mit solchen Kulturen erfordert entsprechende sicherheitstechnische Maßnahmen nach DIN 58956-1 und [4].

Kulturen sind nur durch fachlich vorgebildete oder durch unterwiesene Personen zu bearbeiten. Entsprechend der jeweiligen Risiko-Gruppe darf mit Bakterien- und Pilzstämmen nur in entsprechenden Laboratorien Typ 2 oder Typ 3 nach DIN 58956-1 und [4], gegebenenfalls muß in einer Sicherheitswerkbank der Klasse 1, 2 oder 3 nach DIN 12950-10 gearbeitet werden.

Darüber hinaus sind die Empfehlungen nach [5], [6] und [7] zu beachten.

5 Anzucht und Kontrolle

5.1 Referenzstämme

5.1.1 Bezugsquellen

Um reproduzierbare Resultate bei mikrobiologischen Prüfverfahren und der Qualitätssicherung zu erhalten, ist die Bereitstellung von einheitlichem und standardisiertem Versuchsmaterial erforderlich. Die Referenzstämme, die für die Qualitätssicherung eingesetzt werden, sind daher von Kulturensammlungen zu beziehen. Bezugsquellen sind im Beiblatt 1 zu DIN 58959-7 aufgeführt.

5.1.2 Anzucht

Die Anzucht ist unter Beachtung der von den Kulturensammlungen beigelegten Informationen bzw. in deren Katalogen ausgedruckten Hinweise und gültigen mikrobiologischen Methoden durchzuführen.

Sofern nicht anders angegeben, kann die Anzucht für Bakterien in Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon oder -Agar bei $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 24 h bis 48 h, für Pilze bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 2 d bis 7 d in Sabouraud-, Malzextrakt-, Kimmig- oder Czapek-Dox-Medium erfolgen.

5.1.2.1 Ab Lyophilisat (gefriergetrocknete Kulturen)

Die Ampullen mit gefriergetrockneten Kulturen sind nach 5.1.2.1.1 bis 5.1.2.1.5 zu öffnen.

Zur Zeit sind 5 verschiedene Arten von Ampullen in Gebrauch (siehe 5.1.2.1.1, Bild 1 bis Bild 5).

Die Ampullentypen der verschiedenen Kulturensammlungen und deren Öffnung sind unter 5.1.2.1.1 und 5.1.2.1.2 zusammengefaßt.

5.1.2.1.1 Öffnen von Einzelampullen

Die Ampulle wird z. B. mit einer Ampullensäge etwa in halber Höhe rundherum angeritzt (siehe Pfeil) und anschließend oberflächendesinfiziert (z. B. 5 min Einlegen in sporenfreiem Ethanol mit einer Volumenkonzentration von 80 %).

Danach wird die Ampulle mit einem sterilen Watte- oder Filzstreifen, steriler Gaze oder sterilem Zellstoff umwickelt und an der angeritzten Stelle aufgebrochen.

suspensions are frozen in plastic straws, glass or ceramics beads, glass or synthetic capillaries [2].

Reliable methods are to be found in supplement 1 and supplement 2 of DIN 58959-6.

4.4 Safety measures

The bacterial and fungal strains intended for reference carry a certain, though variable, risk for those working with them and for the environment. Such bacteria shall be handled using appropriate safety measures according to DIN 58956-1 and [4].

Cultures shall only be handled by professionally qualified or adequately trained personnel. Depending on the risk group, work with bacterial strains may only be carried out in the corresponding type 2 or type 3 laboratories according to DIN 58956-1 and, if necessary, in a safety cabinet corresponding to class 1, 2 or 3 according to DIN 12950-10.

Additionally the recommendations of [5], [6] and [7] have to be observed.

5 Growth and control

5.1 Reference strains

5.1.1 Sources of supply

The provision of uniform and standardized test material is essential, if reproducible results are to be obtained in microbiological tests and quality assurance. The reference strains, which are used for quality assurance, shall therefore be obtained from culture collections. Sources of supply are listed in supplement 1 of DIN 58959-7.

5.1.2 Growing of cultures

The growing of the cultures should be carried out according to the instructions supplied by the culture collections or published in their catalogues, and in accordance with valid microbiological methods.

If no other instructions are given, bacteria should be grown in casein-peptone soy-meal-peptone broth or agar at $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h to 48 h and fungi in Sabouraud's malt extract, Kimmig medium or Czapek Dox medium at $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 days to 7 days.

5.1.2.1 From lyophilisates (freeze-dried cultures)

Ampoules of freeze-dried cultures shall be opened according to 5.1.2.1.1 to 5.1.2.1.5.

Five different types of ampoules are in current use (see 5.1.2.1.1, figure 1 to figure 5).

The different types of ampoules and their opening are summarized in 5.1.2.1.1 and 5.1.2.1.2.

5.1.2.1.1 Opening of single ampoules

The ampoules are scored e.g. with an ampoule saw around their circumference at approximately the middle (see arrow) and their surface is then disinfected (e.g. by submerging for 5 min in spore-free ethanol, 80 %).

The ampoule is then wrapped in a strip of sterile wadding, sterile gauze or sterile cellulose and broken at the marked place.