

DIN EN 12353

ICS 11.080.20; 71.100.35

Ersatz für
DIN EN 12353:2013-04

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Aufbewahrung von Prüforganismen für die Prüfung der bakteriziden
(einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und
viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung;
Deutsche Fassung EN 12353:2021**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal (including
Legionella), mycobactericidal, sporicidal, fungicidal and virucidal (including bacteriophages)
activity;
German version EN 12353:2021

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Conservation des micro-organismes d'essai utilisés pour la détermination de l'activité
bactéricide (Legionella incluses), mycobactéricide, sporicide, fongicide et virucide
(bactériophages inclus);
Version allemande EN 12353:2021

Gesamtumfang 40 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)
DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 12353:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed).

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 12353:2013-04 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Methode zur Aufbewahrung von Viren wurde detaillierter beschrieben (5.8);
- b) MEM ist nicht das einzige geeignete Zellkulturmedium, daher wurde es durch den allgemeinen Begriff „Zellkulturmedium“ ersetzt (5.2.2.17 und im gesamten Text);
- c) die Beschreibung des BCYE-Agars für *Legionella* wurde aufgenommen (5.2.2.24);
- d) die Information zur Quellenangabe für Stämme wurde aufgenommen (5.10.2);
- e) die Information zur Aufbewahrung der Dokumentation wurde aufgenommen (5.11.6);
- f) *Clostrioide difficile* (A.3.3) wurde aufgenommen;
- g) die IP Nummern für Pilze wurden gelöscht (und durch UMIP Nummern ersetzt) (A.4);
- h) die verwendeten Virenstämme wurden überarbeitet (A.5);
- i) die Norm wurde redaktionell überarbeitet.

Frühere Ausgaben

DIN EN 12353: 2000-01, 2007-02, 2013-04

Deutsche Fassung

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Aufbewahrung von Prüforganismen für die Prüfung
der bakteriziden (einschließlich Legionella),
mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden
(einschließlich Bakteriophagen) Wirkung**

Chemical disinfectants and antiseptics —
Preservation of test organisms used for the
determination of bactericidal (including Legionella),
mycobactericidal, sporicidal, fungicidal and virucidal
(including bacteriophages) activity

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Conservation des micro-organismes d'essai utilisés
pour la détermination de l'activité bactéricide
(Legionella incluses), mycobactéricide, sporicide,
fongicide et virucide (bactériophages inclus)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 1. Februar 2021 angenommen.

Die CEN-Mitglieder sind gehalten, die CEN/CENELEC-Geschäftsordnung zu erfüllen, in der die Bedingungen festgelegt sind, unter denen dieser Europäischen Norm ohne jede Änderung der Status einer nationalen Norm zu geben ist. Auf dem letzten Stand befindliche Listen dieser nationalen Normen mit ihren bibliographischen Angaben sind beim CEN-CENELEC-Management-Zentrum oder bei jedem CEN-Mitglied auf Anfrage erhältlich.

Diese Europäische Norm besteht in drei offiziellen Fassungen (Deutsch, Englisch, Französisch). Eine Fassung in einer anderen Sprache, die von einem CEN-Mitglied in eigener Verantwortung durch Übersetzung in seine Landessprache gemacht und dem Management-Zentrum mitgeteilt worden ist, hat den gleichen Status wie die offiziellen Fassungen.

CEN-Mitglieder sind die nationalen Normungsinstitute von Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, der Republik Nordmazedonien, Rumänien, Schweden, der Schweiz, Serbien, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, der Türkei, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

CEN-CENELEC Management-Zentrum: Rue de la Science 23, B-1040 Brüssel

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich.....	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	7
5.1 Kurzbeschreibung	7
5.2 Prüforganismen, Kulturmedien und Reagenzien	7
5.2.1 Prüforganismen	7
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien.....	7
5.2.3 Zellkulturen.....	14
5.2.4 Wirtsstämme für Bakteriophagen in Milcherzeugnissen (<i>Lactococcus lactis</i>)	16
5.3 Apparate und Glasgeräte	16
5.3.1 Allgemeines	16
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung.....	17
5.4 Prüfverfahren für die Aufbewahrung von Prüforganismen — Allgemeines	18
5.4.1 Handhabung von gefriergetrockneten/gefrorenen Prüforganismen aus Kultursammlungen	18
5.4.2 Auswahl des Bebrütungsverfahrens, des Agarmediums, der Zellkultur/Zelllinie	18
5.5 Verfahren für die Aufbewahrung von Bakterien (einschließlich <i>Legionella</i> , aerober sporenbildender Bakterien, außer Mykobakterien und Bakteriensporen) und Hefen.....	18
5.5.1 Wiederherstellung von gefriergetrockneten Prüforganismen.....	18
5.5.2 Vorbereitung zur Lagerung.....	19
5.5.3 Herstellung der Stammkultur/Gebrauchskulturen.....	19
5.6 Verfahren für die Aufbewahrung von Mykobakterien	19
5.6.1 Wiederherstellung von gefriergetrockneten Prüforganismen.....	19
5.6.2 Vorbereitung zur Lagerung.....	20
5.6.3 Herstellung der Gebrauchskulturen.....	20
5.7 Verfahren für die Aufbewahrung von Schimmelpilzen (z. B. <i>Aspergillus brasiliensis</i>)	21
5.7.1 Wiederherstellung von gefriergetrockneten Prüforganismen.....	21
5.7.2 Vorbereitung zur Lagerung.....	21
5.7.3 Herstellung der Stammkultur/Gebrauchskulturen.....	22
5.8 Verfahren zur Aufbewahrung von Viren (außer Bakteriophagen in Milcherzeugnissen)	22
5.8.1 Wiederherstellung der gefrorenen Viren.....	22
5.8.2 Vorbereitung zur Lagerung von Stammvirussuspension	22
5.8.3 Herstellung der Virenprüfsuspension	22
5.9 Prüfverfahren zur Aufbewahrung von Bakteriophagen	23
5.9.1 Wiederherstellung gefrorener Bakteriophagen	23
5.9.2 Vorbereitung zur Lagerung.....	23
5.9.3 Vorbereitung bakteriophager Gebrauchssuspensionen.....	24
5.10 Verifizierung der Reinheit und Identität der Prüforganismen	24
5.10.1 Allgemeines	24
5.10.2 Informationen zur Quelle der Stämme	24
5.10.3 Reinheit.....	24
5.10.4 Identität.....	24
5.11 Dokumentation	25

5.11.1	Allgemeines	25
5.11.2	Gefriergetrockneter Prüforganismus/gefrorene Viren.....	25
5.11.3	Kryoröhrchen mit gefrorenen Prüforganismen	25
5.11.4	Stammkultur	25
5.11.5	Nachweis von Reinheit und Identität.....	25
5.11.6	Aufbewahrung der Dokumentation.....	25
Anhang A (informativ) Prüforganismen — Referenzen und Beziehungen der		
	Kultursammlungen zu den Normen des CEN/TC 216	26
A.1	Bakterien (außer Mykobakterien und sporenbildende Bakterien).....	26
A.1.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	26
A.1.2	<i>Enterococcus hirae</i>	26
A.1.3	<i>Enterococcus faecium</i>	26
A.1.4	<i>Escherichia coli</i> (1)	26
A.1.5	<i>Escherichia coli</i> (2) K12	26
A.1.6	<i>Lactobacillus brevis</i>	26
A.1.7	<i>Legionella pneumophila</i> , subsp. <i>Pneumophila</i>	27
A.1.8	<i>Proteus hauseri</i>	27
A.1.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
A.1.10	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> , Serotyp <i>Typhimurium</i>	27
A.1.11	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	27
A.2	Mykobakterien.....	27
A.2.1	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	27
A.2.2	<i>Mycobacterium terrae</i>	27
A.3	Sporenbildende Bakterien.....	28
A.3.1	<i>Bacillus cereus</i>	28
A.3.2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	28
A.3.3	<i>Clostridioides difficile</i> (früher „ <i>Clostridium difficile</i> “) R027	28
A.3.4	<i>Clostridium sporogenes</i>	28
A.4	Pilze (Schimmelpilze und Hefen)	28
A.4.1	<i>Aspergillus brasiliensis</i> (früher „ <i>A. niger</i> “) (Schimmelpilz)	28
A.4.2	<i>Candida albicans</i> (Hefe)	28
A.4.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1) (Hefe)	29
A.4.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2) var. <i>diastaticus</i> (Hefe).....	29
A.5	Viren.....	29
A.5.1	Adenovirus Typ 5, Stamm Adenoid 75.....	29
A.5.2	Enterovirus E (Enterovirus Bovine Typ 1), Stamm LCR 4 [früher „Bovine Enterovirus Typ 1 (ECBO)“].....	29
A.5.3	Katzen-Coronavirus (en: feline coronavirus) (Alphacoronavirus 1), Stamm München (FeCoV).....	29
A.5.4	winziges Virus von Mäusen (en: minute virus of mice) (Nagetier-Protoparvovirus 1) (früher „Murines Parvovirus, winziges Virus von Mäusen, Stamm Crawford“).....	29
A.5.5	Murines Norovirus, Stamm S99 Berlin	29
A.5.6	Poliovirus Typ 1, Sabin Stamm LSc-2ab	30
A.5.7	Schweine-Parvovirus (en: Porcine parvovirus) (Ungulat-Protoparvovirus I), Stamm NADL-2 (PPV).....	30
A.5.8	Vacciniavirus, Stamm modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA).....	30
A.5.9	Vacciniavirus, Stamm Elstree.....	30
A.6	Bakteriophagen.....	30
A.6.1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Bakteriophage P008	30
A.6.2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Bakteriophage P001	30
Anhang B (informativ) Graphische Darstellungen.....		31
Literaturhinweise.....		36

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 12353:2021) 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 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis März 2022 zurückgezogen werden.

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

Dieses Dokument ersetzt EN 12353:2013.

Dieses Dokument wurde überarbeitet, um dieses an den letzten Stand der Wissenschaften anzupassen, Fehler und Mehrdeutigkeiten zu korrigieren. Nachfolgenden werden die wesentlichen technischen Änderungen seit der letzten Ausgabe aufgelistet:

- die Methoden zur Aufbewahrung von Viren wurde detaillierter beschrieben (5.8);
- MEM ist nicht das einzige geeignete Zellkulturmedium, daher wurde es durch den allgemeinen Begriff „Zellkulturmedium“ ersetzt (5.2.2.17 und im gesamten Text);
- die Beschreibung des BCYE-Agars für *Legionella* wurde aufgenommen (5.2.2.24);
- die Information über die Quelle von Stämmen wurde aufgenommen (5.10.2);
- die Information zur Aufbewahrung von Dokumentationen wurde aufgenommen (5.11.6);
- *Clostridioide difficile* (A.3.3) wurde aufgenommen;
- die CIP Nummern für Pilze wurden gelöscht (und durch UMIP Nummern ersetzt) (siehe Abschnitt A.4);
- die verwendeten Virenstämme wurden überarbeitet (siehe Abschnitt A.5).

Die oben genannten Änderungen haben keinen Einfluss auf die Prüfergebnisse, die mit Bezug auf die vorherige Version erhalten wurden. Diese Ergebnisse sind weiterhin gültig.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

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

Für genormte Prüfungen zur Bestimmung der bakteriziden (einschließlich *Legionella pneumophila*), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika ist die Verwendung von Prüforganismen erforderlich, deren Reinheit und Identität nachgewiesen sind und deren biologisches Verhalten stabil bleibt. Es ist daher dringend erforderlich, die Anforderungen an die Lagerung festzulegen.

Ziel dieses Dokumentes ist die Beschreibung von Verfahren zur Aufbewahrung der Prüforganismen, die für die beschriebenen Zwecke verwendet werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Verfahren zur Haltung von Prüforganismen fest, wie sie in den Europäischen Normen des CEN/TC 216 zur Bestimmung der bakteriziden (einschließlich *Legionella pneumophila*), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika verwendet und festgelegt werden. Diese Verfahren zur Haltung von Prüforganismen können nur in Verbindung mit mindestens einer der Normen erfolgen, in denen auf dieses Dokument verwiesen wird.

ANMERKUNG 1 Anhang A (informativ) enthält eine nicht abschließende Liste von Prüforganismen, auf die dieses Dokument angewendet werden kann.

ANMERKUNG 2 Europäische Normen (EN), die auf dieses Dokument verweisen, sind in den Literaturhinweisen aufgelistet.

ANMERKUNG 3 Eine spezifische Beschreibung über die Aufbewahrung von bakteriellen Sporen könnten hinzugefügt werden, sobald die Ergebnisse der laufenden Ringversuche vorliegen.

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 13610, *Chemische Desinfektionsmittel — Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der viruziden Wirkung gegenüber Bakteriophagen von chemischen Desinfektionsmitteln in den Bereichen Lebensmittel und Industrie — Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)*

EN 14885, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Anwendung Europäischer Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika*

3 Begriffe

In diesem Dokument werden keine Begriffe aufgeführt.

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

Jeder Prüforganismus, der in einer Europäischen Norm des CEN/TC 216 festgelegt wurde und auf den in diesem Dokument verwiesen wird, muss so wie in diesem Dokument beschrieben gehandhabt werden. Eine Übersicht aller Normen des CEN/TC 216 und die Festlegung, welche Normen die Produkte erfüllen müssen, um bestimmte Angaben zur mikrobiziden Wirksamkeit zu unterstützen, ist in EN 14885 zusammengefasst.

Die Reinheit und Identität der aufbewahrten Prüforganismen muss während der Herstellung und auch regelmäßig während der Lagerung abgesichert werden, außer bei Viren, bei denen nur die Identität geprüft wird, bevor die Stammvirususpension gelagert wird.

Die aufbewahrten Prüforganismen – einschließlich der Viren, insbesondere in Verbindung mit den verwendeten Zelllinien – sollten in regelmäßigen Zeitabständen (spätestens im Falle einer Lagerung von mehr als 14 Monaten) überprüft werden, um sicherzustellen, dass deren Empfindlichkeit für Produkte sich nicht geändert hat. Bei allen Normen, bei denen kein interner Standard implementiert ist, sollte die Empfindlichkeit der Prüforganismen unter Verwendung relevanter Referenzsubstanzen geprüft werden.

Solange das CEN/TC 216 keine spezifischen Prüfungen für diesen Zweck entwickelt hat, kann jedes geeignete Verfahren angewendet werden, wie z. B. EN 1040 für Bakterien, EN 1275 für Pilze, EN 14348 für Mykobakterien, EN 13623 für *Legionella pneumophila*, EN 14476 für Viren oder EN 13610 für Bakteriophagen in Milcherzeugnissen.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Eine Probe des Prüforganismus – üblicherweise in gefriergetrockneter Form – wird von einer Kultursammlung bezogen. Diese Probe wird kultiviert, für die Lagerung vorbereitet, in Aufbewahrungsgefäße abgefüllt und in einer Tiefgefriereinrichtung angeordnet.

Von diesen Proben wird eine Stammkultur hergestellt und anschließend wird diese verwendet um die Gebrauchskulturen für das Prüfverfahren herzustellen. In einigen Fällen wird die Gebrauchskultur direkt aus den tiefgefrorenen Proben hergestellt.

5.2 Prüforganismen, Kulturmedien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Siehe Anhang A für Beispiele von Prüforganismen.

Die Dokumentation der Prüforganismen sollte nach 5.10.2 und 5.11 erfolgen.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Die Formulierungen aller Medien und Reagenzien sind angegeben, sofern kein kommerzielles gebrauchsfertiges Material verwendet wird. Es muss überprüft werden, ob jeder kommerzielle Anbieter ein geeignetes System zur Qualitätskontrolle eingeführt hat.

Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich alle Massenangaben für chemische Substanzen, die in diesem Dokument angegeben werden, auf wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, allerdings müssen die erforderlichen Massen entsprechend angepasst werden, um daraus resultierende 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 auf die Prüforganismen toxisch oder hemmend wirken.

Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern, wird empfohlen, wo immer möglich, handelsübliche wasserfreie Materialien zur Herstellung von Kulturmedien zu verwenden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten strengstens befolgt werden.

Alle aufgeführten pH-Werte werden bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gemessen.

Die in 5.2.2 genannten Medien und Substanzen sind unter kontrollierten Bedingungen entsprechend den Empfehlungen des Herstellers zu lagern.

Für jedes Kulturmedium, jede Zellkultur und jedes Reagens sollte ein Verfallsdatum festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes und darf nicht demineralisiertes Wasser sein. Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionszwecke (siehe [30]) verwendet werden.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Die Sterilisation ist nicht erforderlich, wenn das Wasser z. B. zur Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

5.2.2.3 Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (Trypton-Soja-Bouillon, TSB) für Bakterien, mit Ausnahme von *Legionella*

Trypton-Soja-Bouillon, bestehend aus:

Trypton, tryptisch verdautes Casein	17,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	3,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Wasser (5.2.2.2)	800,0 ml
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	2,5 g
Glucose	2,5 g
Wasser (5.2.2.2)	bis 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.

5.2.2.4 Malzextrakt-Bouillon (MEB) für Pilze

Malzextrakt-Bouillon, bestehend aus:

Malzextrakt (lebensmitteltauglich, z. B. „Christomalt“, Malzextraktpulver von Difal oder etwas Gleichwertiges, das nicht hochgereinigt ist und nicht nur aus Maltose besteht, z. B.

Malzextrakt von OXOID) ¹	20,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

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.

5.2.2.5 Kälteschutzlösung für Bakterien und Pilze

Die Kälteschutzlösung, bestehend aus:

Rindfleischextrakt	3,0 g
Trypton, tryptisch verdautes Casein	5,0 g
Glycerin ($C_3H_8O_3$) [31]	150,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Die Bestandteile werden in kochendem Wasser gelöst. Die Sterilisation erfolgt in einem Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert der Lösung $6,9 \pm 0,2$ betragen.

1 Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Entsprechende Produkte, die von anderen Herstellern geliefert werden, dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

Jedes im Handel erhältliche Kälteschutzmittel, das Glycerin enthält und eine gleichwertige Aufbewahrung der Stämme wie durch die vorstehend angeführte Lösung sicherstellt, darf verwendet werden.

Es darf jede nachweislich gleichwertige Kälteschutzlösung verwendet werden, z. B. für *Legionella* (5.5.2).

5.2.2.6 Middlebrook-Bouillon 7 H 9 mit 10 % ADC-Anreicherung und Glycerin als Rekonstitutions- und Kälteschutzlösung für Mykobakterien (MADC)

Middlebrook-Bouillon 7 H 9, bestehend aus:

Middlebrook-Bouillonpulver 7 H 9	4,7 g
Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃) [31]	100,0 ml
Wasser (5.2.2.2)	800,0 ml

Nach einer Sterilisation im Autoklaven [5.3.2.1 a)] für eine Verweilzeit von nur 10 min erfolgt ein Abkühlen auf 45 °C. Unter aseptischen Bedingungen werden 100 ml Middlebrook-ADC-Anreicherungsmittel auf 1 000,0 ml zugegeben. Der pH-Wert des Mediums muss $6,6 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.7 Polysorbat 80-Lösung

Polysorbat 80-Lösung, bestehend aus:

Polysorbat 80	0,5 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

5.2.2.8 DMSO als Kälteschutzmittel beim Einfrieren von Zellkulturen

Dimethylsulfoxid (DMSO) wird verwendet, um zum Schutz der Zellen vor Zerstörung durch die Bildung von Eiskristallen beizutragen.

WARNUNG — DMSO ist toxisch und sollte mit Vorsicht gehandhabt werden. Es kann über die Haut absorbiert werden und zu Reizungen und/oder Verätzungen führen. Es wirkt teratogen und allergieauslösend. Bei der Handhabung sollten geeignete Handschuhe getragen werden.

5.2.2.9 Glutamin-Lösung (3%ige m/V-Lösung)

12 g Glutamin werden in 400 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst und die Lösung wird durch Membranfiltration sterilisiert. Die Lösung wird bei $(-22,5 \pm 2,5)$ °C gelagert.

5.2.2.10 TV (Trypsin-Versen)

0,05 g Trypsin werden in 100 ml EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) mit einer Konzentration von 0,53 mM gelöst und die Lösung wird durch Membranfiltration sterilisiert. Die Lösung wird bei (4 ± 1) °C gelagert.

5.2.2.11 Antibiotika-Suspension

Chemikalien

50 Millionen Einheiten Penicillin G	(z. B. Sigma PENNA) ²
50 g Streptomycinsulfat (entspricht etwa 750 I.E./mg)	(z. B. Sigma, Kat.-Nr: S 6501) ²
25 × 500 000 Einheiten Mycostatin	(z. B. Nystatin: Sigma N 3503) ²
Wasser (5.2.2.2) bis auf 2,5 l	

Herstellung

Die Gehalte der Antibiotika in den Glasfläschchen werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 2,5 l aufgefüllt.

Die Suspension wird unter aseptischen Bedingungen in aliquote Anteile von 50 ml und 5 ml geteilt.

Die Lagerung erfolgt bei –20 °C. Nach dem Auftauen wird die Flasche geschüttelt.

Die aliquoten Anteile werden um das 200-fache (z. B. 5 ml je l) verdünnt, um folgende Endkonzentrationen zu erreichen:

Penicillin	100 Einheiten/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Mycostatin	25 Einheiten/ml

5.2.2.12 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS-Pufferlösung)

Natriumchlorid (NaCl)	8,00 g
Kaliumchlorid (KCl)	0,20 g
Dinatriumhydrogenphosphat-12-hydrat (Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	2,89 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,20 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

5.2.2.13 Fetales Kälberserum (FKS)

FKS muss hinsichtlich des Fehlens von Viren und Mykoplasma zertifiziert sein.

Fremde Viren oder Mykoplasmen können das Zell- und Virenwachstum beeinträchtigen und somit zu falschen Ergebnissen führen.

5.2.2.14 Earle's BSS

Natriumchlorid (NaCl)	68,0 g
Kaliumchlorid (KCl)	4,0 g
Calciumchlorid (CaCl ₂)	2,0 g
Magnesiumsulfat, 7-fach hydratisiert (MgSO ₄ · 7 H ₂ O)	2,0 g
Natriumhydrogenphosphat, 2-fach hydratisiert (NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O)	1,4 g
Glucose	10,0 g
Phenolrot, 1%ig (5.2.2.15)	20,0 ml
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

2 Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Entsprechende Produkte, die von anderen Herstellern geliefert werden, dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.