

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)
Deutsche Fassung EN 13610:2002

DIN
EN 13610

ICS 11.080.20; 67.050; 71.100.35

Chemical disinfectants — Quantitative suspension test for the evaluation
of virucidal activity against bacteriophages of chemical disinfectants used
in food and industrial areas —
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German version EN 13610:2002

Désinfectants chimiques — Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de
l'activité virucide vis à vis des bactériophages des désinfectants chimiques utilisés
dans le domaine de l'agro-alimentaire et dans l'industrie —
Méthode d'essai et exigences (phase 2, étape 1);
Version allemande EN 13610:2002

Die Europäische Norm EN 13610:2002 hat den Status einer Deutschen Norm.

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm wurde von der Arbeitsgruppe 3 „Food hygiene, industrial, domestic and institutional use“ (Sekretariat: AFNOR) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ (Sekretariat: AFNOR) unter wesentlicher Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der Arbeitsgruppe 3 des CEN/TC 216 wird über den Arbeitsausschuss „Desinfektionsmittel im Lebensmittelbereich“ des Normenausschusses Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL) wahrgenommen.

Fortsetzung 42 Seiten EN

Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)
im DIN Deutsches Institut für Normung e. V.

— Leerseite —

Deutsche Fassung

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)**

Chemical disinfectants —
Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal
activity against bacteriophages of chemical disinfectants
used in food and industrial areas —
Test method and requirements (phase 2, step 1)

Désinfectants chimiques —
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de
l'activité virucide vis à vis des bactériophages des
désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-
alimentaire et dans l'industrie —
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 23. Oktober 2002 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, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Luxemburg, Malta, Niederlande, Norwegen, Österreich, Portugal, Schweden, Schweiz, Spanien, der Tschechischen Republik und dem Vereinigten Königreich.



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

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

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung	3
1 Anwendungsbereich	4
2 Normative Verweisungen	4
3 Begriffe	4
4 Anforderungen	5
5 Prüfverfahren	6
5.1 Prinzip	6
5.2 Materialien und Reagenzien.....	6
5.3 Apparate und Glasgeräte.....	11
5.4 Herstellung der Wirtsbakteriensuspensionen.....	12
5.5 Herstellung der Bakteriophagensuspension.....	13
5.6 Produktprüflösung.....	15
5.7 Verfahrensablauf.....	16
5.8 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse.....	19
5.9 Prüfbericht	22
Anhang A (normativ) Prüfung zur Validierung des Verdünnungs-Neutralisations- und des Molekularsiebverfahrens	24
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien	32
Anhang C (informativ) Beispiel für einen typischen Prüfbericht	34
Anhang D (informativ) Informationen über die Anwendung und Interpretation von Europäischen Normen zu chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika	38
Anhang E (informativ) Beispiel von Plaques aus den Lysaten der Phagen P001 und P008	40
Literaturhinweise	42

Vorwort

Dieses Dokument EN 13610:2002 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 2003, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 2003 zurückgezogen werden.

In dieser Europäischen Norm ist der Anhang A normativ, und die Anhänge B, C, D und E sind informativ.

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

Einleitung

Diese Europäische Norm beschreibt ein Suspensionsverfahren zur Feststellung, ob ein Produkt, das als Desinfektionsmittel für die in Abschnitt 1 beschriebenen Bereiche vorgeschlagen wurde, eine viruzide Wirkung gegenüber Bakteriophagen aufweist oder nicht.

ANMERKUNG Virulente Bakteriophagen (Phagen), die für Starterkulturen von *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, die zur Herstellung von Käse und anderer fermentierter Milchprodukte eingesetzt werden, lytisch (d. h. virulent) sind, werden als Modellviren zur Prüfung der viruziden Wirkung eines Produktes verwendet.

Dieses Verfahren ist ein Laborversuch und simuliert praxisnahe Anwendungsbedingungen. Die gewählten Bedingungen (Einwirkzeit, Temperatur, Viren [d. h. Bakteriophagen] in Suspension, ...) spiegeln Parameter wider, wie sie in der Praxis vorkommen, einschließlich der Bedingungen, die die Wirkung von Desinfektionsmitteln beeinflussen können.

Jede Konzentration in der Anwendung, die aus dieser Prüfung resultiert, entspricht festgelegten experimentellen Bedingungen.

Die Bedingungen genügen den allgemeinen Ansprüchen und wurden so ausgewählt, dass sie einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten erlauben.

Unter besonderen Bedingungen dürfen die Anwendungsempfehlungen abweichen, in diesem Fall werden zusätzliche Prüfbedingungen benötigt.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren (Phase 2, Stufe 1) und Anforderungen an die viruzide Mindestwirkung von chemischen Desinfektionsmitteln gegenüber Bakteriophagen fest, die in hartem Wasser eine homogene, physikalisch stabile Lösung ergeben, und die im Lebensmittelbereich und in der Industrie benutzt werden, ausgenommen davon sind Bereiche und Situationen, in denen die Desinfektion medizinisch indiziert ist und Produkte, die auf lebenden Geweben benutzt werden.

Diese Europäische Norm gilt grundsätzlich für den folgenden Anwendungsbereich:

a) Verarbeitung, Vertrieb und Verkauf von:

1) Lebensmitteln tierischer Herkunft:

- Milch und Milchprodukte;
- Fleisch und Fleischprodukte;
- Fisch, Meerestiere und daraus hergestellte Zubereitungen;
- Eier und Eierprodukte;
- Tiernahrung;
- usw.

2) Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft:

- Getränke;
- Früchte, Gemüse und daraus hergestellte Zubereitungen (einschließlich Zucker, Destillationsprodukte usw.);
- Mehl, gemahlene und gebackene Produkte;
- Tiernahrung;
- usw.

b) Andere industrielle Bereiche:

- Biotechnologie (Hefe, Proteine, Enzyme usw.).

Bei Anwendung dieser Europäischen Norm ist die Bestimmung der viruziden Wirkung gegenüber Bakteriophagen in dem unverdünnten Produkt nicht möglich, da immer eine bestimmte Verdünnung durch Zugabe der Impfkultur und der Belastungssubstanz auftritt.

Bei chemischen Desinfektionsmitteln, die ohne Verdünnung verwendet werden können, ist es nicht möglich zu bestimmen, ob diese Produkte bei einer Konzentration über 80 % eine viruzide Wirkung gegenüber Bakteriophagen besitzen.

ANMERKUNG Das beschriebene Verfahren bestimmt die Wirksamkeit gewerblich hergestellter Produkte (Zubereitungen) oder anderer aktiver Substanzen auf Viren (Bakteriophagen) unter Anwendungsbedingungen.

Diese Europäische Norm gilt nur für Desinfektionsmittel, die die Validierungsprüfung bestehen (siehe Anhang A).

2 Normative Verweisungen

Nicht verwendet.

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Europäischen Norm gelten die folgenden Begriffe.

3.1**Produkt (zur chemischen Desinfektion und/oder Antisepsis)**

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

[EN 1040:1997]

3.2**Viruzid gegenüber Bakteriophagen**

Produkt, das Bakteriophagen inaktiviert

ANMERKUNG Das von „Viruzid“ abgeleitete Adjektiv ist „viruzid“.

3.3**viruzide Wirkung gegenüber Bakteriophagen**

Fähigkeit eines Produktes, die Infektiosität intakter Bakteriophagen der Referenz-Bakteriophagenstämme P001 und P008 unter den durch diese Europäische Norm festgelegten Bedingungen um mindestens 4 lg-Stufen zu vermindern

3.4**Infektiosität von Bakteriophagen**

Fähigkeit eines Bakteriophagen, sich in einer geeigneten Wirtsbakterienzelle zu vermehren, was zu einer Freisetzung von Bakteriophagen-Nachkommenschaft führt

3.5**Inaktivierung von Bakteriophagen**

die Herabsetzung der Infektiosität eines Bakteriophagen durch ein Produkt, das als chemisches Desinfektionsmittel bestimmt ist

3.6**Referenz-Bakteriophagensuspension**

Bakteriophagensuspension eines definierten Virusstammes, der in Referenzzentren erhältlich ist und nicht mehr als zehn Passagen erfahren sollte

3.7**Vorrats-Bakteriophagensuspension**

Bakteriophagensuspension eines definierten Stammes, der sehr stark vermehrt wurde, um eine Bakteriophagensuspension herzustellen, die identische Eigenschaften wie die Referenz-Bakteriophagensuspension besitzt

ANMERKUNG Diese Stamm-Bakteriophagensuspension wird zur Herstellung einer Bakteriophagen-Prüfsuspension mit hohem Titer für die Bakteriophagen-Inaktivierungsprüfung verwendet.

3.8**Bakteriophagensuspension mit hohem Titer**

von Agarplatten mit konfluenter Lyse im Bakterienrasen gewonnene Bakteriophagensuspension mit hohem Titer, die zur Herstellung der Bakteriophagen-Prüfsuspension für die Viruzidieprüfung des Desinfektionsmittels verwendet wird

3.9**Bakteriophagen-Prüfsuspension**

Bakteriophagensuspension eines definierten Titers zur Verwendung bei der Viruzidieprüfung eines Desinfektionsmittels

4 Anforderungen

Das Produkt, das in hartem Wasser gelöst ist und nach Abschnitt 5 untersucht wird, muss bei Prüfung mit Sauermolke mit 1 % Volumenkonzentration (hergestellt aus angesäuerter Milch mit niedrigem Fettgehalt) oder wahlweise mit Magermilch mit 1 % Volumenkonzentration als Belastungssubstanz entsprechend der praktischen Anwendung und unter den geforderten Prüfbedingungen (20 °C, 15 min, 2 ausgewählte Referenz-Bakteriophagenstämme) eine Herabsetzung der Infektiosität von Bakteriophagen von mindestens 4 lg aufweisen.

Die viruzide Wirkung gegenüber Bakteriophagen muss bewertet werden durch die Verwendung der zwei virulenten *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Bakteriophagen P001 und P008.

Beide Phagen müssen auf dem Wirtstamm *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F7/2 vermehrt werden.

Die ermittelte viruzide Konzentration des geprüften Produktes ist dann für die praktische Anwendung geeignet.

Wo erforderlich, muss die viruzide Wirkung gegenüber Bakteriophagen zusätzlich unter anderen Bedingungen an Einwirkzeit, Temperatur, zusätzlichen Stämmen und Belastungssubstanzen in Übereinstimmung mit 5.7.1 geprüft werden, um beabsichtigten spezifischen Anwendungsbedingungen Rechnung zu tragen.

ANMERKUNG Unter diesen zusätzlichen Bedingungen kann die gefundene Konzentration niedriger sein als diejenige, die unter den festgelegten Bedingungen von 20 °C, 15 min und 2 ausgewählten Referenz-Bakteriophagenstämmen erhalten wurde.

5 Prüfverfahren

5.1 Prinzip

5.1.1 Eine Prüfsuspension von Bakteriophagen in einer Lösung mit Belastungssubstanzen wird zu einer vorbereiteten Probe des in hartem Wasser gelösten Prüfproduktes gegeben.

Das Gemisch wird bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ für eine Dauer von $15 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ gehalten (geforderte obligatorische Prüfbedingungen).

Nach der Einwirkzeit wird eine aliquote Menge entnommen, und die in dieser Probenmenge vorhandene viruzide Wirkung wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. Das Verfahren der Wahl ist das Verdünnungs-Neutralisationsverfahren mit einem validierten Neutralisationsmedium. Sollte für ein spezifisches Produkt kein geeignetes Neutralisationsmedium zur Verfügung stehen, muss das Produkt durch Molekularsiebung (d. h. Gelfiltration) neutralisiert werden.

Die Anzahl der überlebenden Bakteriophagenpartikel und die Anzahl der Bakteriophagenpartikel in der Prüfsuspension werden durch geeignete Verdünnungsreihen mit einem Faktor von 10, die im Medium in Teströhrchen hergestellt werden, bestimmt.

5.1.2 Zusätzliche gewählte Einwirkzeiten, Temperaturen und Belastungssubstanzen werden festgelegt (siehe 5.7.1).

ANMERKUNG 1 Die beschriebene Prüfung beruht auf einer Bewertung (unter spezifischen Bedingungen), die eine Herabsetzung der Infektiosität der verschiedenen Phagen nach verschiedenen Einwirkzeiten von mindestens 99,99 % (4 lg) ergibt.

ANMERKUNG 2 Aus prinzipiellen Gründen ist das Ergebnis einer auf eine Viruspopulation angewendete Inaktivierung nicht unbedingt 100 %: d. h. es kann nicht gefolgert werden, dass eine 100%ige Inaktivierung eintritt, wenn bei Durchführung des Versuches kein infektiöser Phage innerhalb einer begrenzten Anzahl von Proben gefunden wird.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfkeime

Die viruzide Wirkung muss unter Verwendung der beiden folgenden Bakteriophagenstämme bewertet werden:¹⁾

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Bakteriophage P001 DSM 4262;
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Bakteriophage P008 DSM 10567.

1) DSM 4262, DSM 10567 und DSM 4366 stellen die Sammlungsnummern von Bakteriophagen- und Bakterienstämmen dar, die durch die DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) vertrieben werden. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung der genannten Kultursammlung durch CEN. Gleichwertige Stämme anderer Kultursammlungen dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

Beide Phagen müssen auf folgendem Wirtstamm vermehrt werden:

— *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F7/2 DSM 4366.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Die Reagenzien müssen analysenrein und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Sie müssen frei von Substanzen sein, die toxische oder inaktivierende Wirkungen entweder auf die Bakteriophagen oder auf die Wirtsbakterien, die für das Auszählen der von den Phagen stammenden Plaques verwendet werden, hervorrufen.

ANMERKUNG Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, die für die Herstellung von Kulturmedien handelsüblich verfügbaren dehydratisierten Materialien zu verwenden. Bei der Herstellung dieser Präparate sollten die Anweisungen der Hersteller strikt eingehalten werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch destilliertes Wasser, darf jedoch kein demineralisiertes Wasser sein.

Es wird im Autoklaven (siehe 5.3.1) sterilisiert.

ANMERKUNG 1 Falls das Wasser während der Sterilisation der Reagenzien mitsterilisiert wird, ist dies nicht erforderlich.

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

5.2.2.3 M17-Bouillon

Für die Aufbewahrung des Bakterienwirtsstammes, die Vermehrung von Bakteriophagen und für die Phagen-Verdünnungsmittelzubereitung (siehe 5.2.2.6).

Phytonpepton (aus Sojamehl)	5,00 g
Polypepton (aus Kasein und Tiergewebe)	5,00 g
Rinderextraktpulver	5,00 g
Hefeextrakt	2,50 g
D(+)-Lactose	5,00 g
Ascorbinsäure	0,50 g
Natrium- β -glycerophosphat	19,00 g
Magnesiumsulfat $\cdot$ 7 H ₂ O	0,25 g
Wasser (siehe 5.2.2.2)	1 000 ml

Es wird im Autoklaven (siehe 5.3.1) sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($7,0 \pm 0,2$) betragen, gemessen bei 20 °C. Wenn die M17-Bouillon das Lösemittel für die Neutralisationsmediumzubereitung ist (siehe 5.2.2.12 und Anhang B), ist für die Zubereitung doppelt konzentrierte M17-Bouillon zu verwenden (d. h. alle Reagenzien müssen in doppelter Konzentration zu 1 000 ml Wasser gegeben werden).

5.2.2.4 M17-Agar (Unterschichtagar)

Unterschichtagar für das quantitative Auszählen von Lysebereichen (Plaques), die von einzelnen infektiösen Bakteriophagenpartikeln in dem Bakterienrasen der Wirtsbakterien erhalten werden.

15 g Agar werden zu 1 000 ml M17-Bouillon (siehe 5.2.2.3) gegeben. Der Agar wird durch Kochen unter ständigem Rühren aufgelöst.

Es wird im Autoklaven (siehe 5.3.1) sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($7,0 \pm 0,2$) betragen, gemessen bei 20 °C. Wenn der Agar auf (47 ± 1) °C abgekühlt ist, werden 10 ml einer sterilen 1 mol/l CaCl_2 -Stammlösung (siehe 5.2.2.8) zugegeben. Es wird leicht gemischt und 15 ml bis 18 ml Agar in Petrischalen (siehe 5.3.2.10) gefüllt.

5.2.2.5 Überschichtungsagar (Deckagar, Weichagar)

Zum Auszählen der Bakteriophagen: 6,5 g Agar werden zu 1 000 ml M17-Bouillon (siehe 5.2.2.3) gegeben und unter ständigem Rühren bis zum Kochen erwärmt. Der geschmolzene Agar wird in Teströhrchen gefüllt (jeweils 2,5 ml bis 3 ml).

Es wird im Autoklaven (siehe 5.3.1) sterilisiert.

ANMERKUNG Um in dem Rasen aus Wirtsbakterienzellen klare von dem Phagen stammende Lysebereiche zu erhalten, sollte nur gut definierter Agar verwendet werden, der vom Lieferanten für die Phagenauszählung mittels der Überschichtungs-technik spezifiziert ist (siehe 5.5.2 und 5.5.3).

5.2.2.6 Phagen-Verdünnungsmittel (auf der Grundlage von 1/4-konzentrierter Ringer-Lösung)

Zur Herstellung von Verdünnungsreihen für die Titration des Phagen (Auszählen der von dem Phagen stammenden Lysebereiche):

— 1/4-konzentrierte Ringer-Lösung:

— Natriumchlorid	2,250 g;
— Kaliumchlorid	105 g;
— Calciumchlorid, wasserfrei	0,06 g;
— Natriumhydrogencarbonat	0,050 g;
— Wasser (siehe 5.2.2.2)	auf 1 000 ml.

10 ml M17-Bouillon (siehe 5.2.2.3) sind zu 90 ml 1/4-konzentrierter Ringer-Lösung hinzuzugeben.

Es wird im Autoklaven (siehe 5.3.1) sterilisiert. Vor Gebrauch wird 1 ml einer 1 mol/l CaCl_2 -Stammlösung (siehe 5.2.2.8) zu 100 ml der Verdünnungsbouillon zugegeben.

ANMERKUNG Ringer-Lösung kann aus fertigen Tabletten nach den Empfehlungen des Herstellers hergestellt werden.

5.2.2.7 SM-Pufferlösung

Zur Resuspension und Aufbewahrung der intakten Phagenpartikel:

— Tris-HCl	2,4 g;
— NaCl	5,8 g;
— $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2,5 g;
— Wasser (siehe 5.2.2.2)	auf 1 000 ml.

Der pH-Wert der Pufferlösung wird auf $7,4 \pm 0,1$ eingestellt. Es wird im Autoklaven (siehe 5.3.1) sterilisiert.

5.2.2.8 CaCl_2 -Stammlösungen (1 mol/l und 0,05 mol/l)

Es werden entweder 110,99 oder 5,55 g wasserfreies CaCl_2 in Wasser (siehe 5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt, um die 1 mol/l bzw. die 0,05 mol/l Stammlösung herzustellen. Es wird im Autoklaven (siehe 5.3.1) sterilisiert.

5.2.2.9 Milchsäurelösung (10 % Volumenkonzentration)

Sie dient zur Ansäuerung von Milch mit niedrigem Fettgehalt für die Zubereitung von Sauermolke.

Eine Stammlösung mit 90 % Volumenkonzentration aus Milchsäure wird mit Wasser (siehe 5.2.2.2) verdünnt, um eine Gebrauchslösung mit 10 % Volumenkonzentration herzustellen. Dafür werden 8 Teile Wasser zu einem Teil Stammlösung gegeben. Es wird im Autoklaven (siehe 5.3.1) sterilisiert.

5.2.2.10 Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung

Zuerst wird eine 10 mmol/l Natriumphosphatpufferlösung (pH = 7,2) hergestellt:

- Lösung A: 1,42 g wasserfreies Na_2HPO_4 werden in Wasser (siehe 5.2.2.2) aufgelöst und mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt;
- Lösung B: 1,20 g wasserfreies NaH_2PO_4 werden in Wasser (siehe 5.2.2.2) aufgelöst und mit Wasser auf 1 000 ml aufgefüllt.

Die Lösungen A und B werden unter ständigem Rühren zu einer Endlösung mit einem pH-Wert von 7,2 gemischt.

8,5 g NaCl werden in 10 mmol/l Natriumphosphatpufferlösung (pH = 7,2) aufgelöst und mit dieser Pufferlösung auf 1 000 ml aufgefüllt. Es wird im Autoklaven (siehe 5.3.1) sterilisiert.

5.2.2.11 Sephadex® 2) G-25 Gel für die Molekularsiebung (d. h. Gelfiltration)

22 g Sephadex® 2) G-25 Pulver werden in 100 ml phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (5.2.2.10) resuspendiert. Es wird im Autoklaven (siehe 5.3.1) sterilisiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden 20 ml der Gel-Suspension in sterile Kunststoffspritzen gefüllt, die sich in einer sterilen Zentrifugenflasche befinden. Der Überschuss an Pufferlösung wird durch Zentrifugieren in einer Tischzentrifuge (siehe 5.3.2.13) bei 1 000facher Erdbeschleunigung für 10 min unter aseptischen Bedingungen entfernt. Diese gebrauchsfertigen Einheiten werden bei 4 °C bis 8 °C aufbewahrt. Sie müssen innerhalb von 4 h verbraucht werden.

ANMERKUNG Als Alternative dürfen handelsübliche gebrauchsfertige Einmalsäulen geeigneten Volumens verwendet werden.

5.2.2.12 Neutralisationsmedium

Das Neutralisationsmedium muss für das zu prüfende Produkt nach dem in Anhang A beschriebenen Verfahren validiert werden. Das Neutralisationsmedium muss steril sein.

ANMERKUNG In Anhang B sind Informationen über Neutralisationsmedien angegeben, die sich für bestimmte Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

2) Analytische Qualität von quervernetzten Dextranperlen zur Molekularsiebung (d. h. Gelfiltration). Sephadex® G-25 ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produktes durch CEN.

5.2.2.13 Hartes Wasser für die Verdünnung der Produkte

Hartes Wasser muss wie folgt hergestellt werden:

- Lösung A: 19,84 g wasserfreies Magnesiumchlorid (MgCl_2) oder eine vergleichbare Menge an wasserhaltigem Magnesiumchlorid und 46,24 g wasserfreies Calciumchlorid (CaCl_2) oder eine vergleichbare Menge an wasserhaltigem Calciumchlorid werden in Wasser (siehe 5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt.

Es wird im Autoklaven (siehe 5.3.1) sterilisiert. Die Lösung wird bei 2 °C bis 8 °C nicht länger als einen Monat gelagert.

- Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (siehe 5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Es wird durch Membranfiltration (siehe 5.3.2.7) sterilfiltriert. Die Lösung wird bei 2 °C bis 8 °C nicht länger als eine Woche gelagert.

Hartes Wasser: Zur Herstellung von 1 l werden mindestens 600 ml Wasser (siehe 5.2.2.2) in einen 1 000-ml-Messkolben (siehe 5.3.2.12) gegeben und anschließend 6,0 ml Lösung A und dann 8,0 ml Lösung B hinzugefügt. Es wird gemischt und mit Wasser (siehe 5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des harten Wassers muss $7,0 \pm 0,2$ betragen. Falls erforderlich, muss der pH-Wert eingestellt werden durch Verwendung einer ungefähren 40 g/l (ungefähr 1 mol/l) Natriumhydroxidlösung (NaOH) oder einer ungefähren 36,5 g/l (ungefähr 1 mol/l) Salzsäurelösung (HCl).

Das harte Wasser muss frisch unter aseptischen Bedingungen hergestellt werden und innerhalb von 12 h verwendet werden.

ANMERKUNG Wenn die Produktprüflösungen (siehe 5.4.2) hergestellt werden, führt die Zugabe des Produktes in dieses harte Wasser zu einer Änderung der Wasserhärte in jedem Teströhrchen. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte unter 300 mg/kg Calciumkarbonat (CaCO_3) im Teströhrchen.

5.2.2.14 Belastungssubstanzen

5.2.2.14.1 Allgemeines

Die Ionen-Zusammensetzung (pH-Wert, Calcium- und/oder Magnesiumhärte) und chemische Zusammensetzung (mineralische Substanzen, Protein, Glycoside, Lipide, Detergentien usw.) müssen genau festgelegt werden.

Die Belastungssubstanzen müssen nach den Anwendungsbedingungen, die für das Produkt festgelegt wurden, ausgewählt werden.

Die Belastungssubstanz muss steril sein und mit einer 10-fach höheren Konzentration, als für die Prüfung benötigt wird, zubereitet werden.

Das Verfahren der Herstellung und Sterilisation und die Zusammensetzung müssen im Prüfbericht aufgezeichnet werden (siehe 5.9).

5.2.2.14.2 Molkelösung

Die Sauermolkelösung wird aus pasteurisierter Milch mit niedrigem Fettgehalt (1,5 % Fettgehalt) für die Prüfbedingungen wie folgt hergestellt:

0,3 ml einer Milchsäurelösung mit 10 % Volumenkonzentration (siehe 5.2.2.9) werden zu 10 ml Milch gegeben, gemischt (siehe 5.3.2.6) und die Probe 30 min auf Raumtemperatur gehalten. Während dieser Zeit wird gelegentlich gemischt (siehe 5.3.2.6). Danach werden die ausgefällten Milchproteine in einer Tischzentrifuge (siehe 5.3.2.13) bei größter Drehzahl (mindestens 4 000fache Erdbeschleunigung) 30 min sedimentiert. Die überstehende Molke wird durch Membranfiltration (Porenweite 0,45 μm) (siehe 5.3.2.7) sterilfiltriert und bei 4 °C bis 8 °C aufbewahrt.

Zur Herstellung einer Gebrauchslösung mit 10 % Volumenkonzentration, die als obligatorische Belastungssubstanz für die Phagensuspensionsprüfung (siehe 5.7.2) gefordert wird, wird 1 Teil der Sauermolkelösung mit 9 Teilen Wasser (siehe 5.2.2.2) verdünnt. Die Molkelösung mit 10 % Volumenkonzentration wird bei 4 °C bis 8 °C aufbewahrt.

Die Molkelösungen müssen für eine Lagerung bis zu einem Monat bei 4 °C bis 8 °C aufbewahrt werden. Bei längeren Aufbewahrungszeiträumen müssen sie bei – 18 °C bis – 20 °C oder tiefer gefroren aufbewahrt werden.

Die Endvolumenkonzentration der Molkelösung im Prüfverfahren (siehe 5.7.1) muss 1,0 % Volumenkonzentration betragen.

5.2.2.14.3 Magermilch

Rekonstituierte Magermilch (1,5 % Fettgehalt) wird wie folgt für die Prüfbedingungen hergestellt:

Magermilchpulver, garantiert frei von Antibiotika oder Zusatzstoffen, wird im Verhältnis von 100 g je Liter Wasser (siehe 5.2.2.2) rekonstituiert.

Die Lösung wird bei 100 °C an drei aufeinander folgenden Tagen (jeweils 30 min) dampfsterilisiert und dazwischen bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die Lösung darf zwischen den Dampfbehandlungen nicht in einem Kühlschrank aufbewahrt werden.

ANMERKUNG Unverdünnte Magermilch wird für die Aufbewahrung des Bakterienwirstammes verwendet (siehe 5.4.1).

Alternativ wird bei (115^{+3}_0) °C für 15 min sterilisiert.

Zur Herstellung einer Gebrauchslösung mit 10 % Volumenkonzentration wird 1 Teil Magermilch mit 9 Teilen sterilen Wassers (5.2.2.2) verdünnt, was als wahlweise Belastungssubstanz für den Phagensuspensionstest (siehe 5.7.2) gefordert wird.

Die Magermilch mit 10 % Volumenkonzentration wird bei 4 °C bis 8 °C aufbewahrt.

Die Endvolumenkonzentration der Magermilch bei dem Prüfverfahren (siehe 5.7.1) muss 1 % Volumenkonzentration betragen.

5.3 Apparate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme steril gelieferter sind alle Glasgeräte und alle Apparateteile, die mit den Kulturmedien, den Reagenzien oder der Probe in Berührung kommen, nach einem der folgenden Verfahren zu sterilisieren:

- a) im Dampf-Sterilisator (Autoklav) (siehe 5.3.2.1) bei (121^{+3}_0) °C für eine Haltezeit von mindestens 15 min;
- b) im Heißluft-Sterilisator (siehe 5.3.2.1) bei 180 °C für eine Haltezeit von mindestens 30 min, bei 170 °C für eine Haltezeit von mindestens 1 h oder bei 160 °C für eine Haltezeit von mindestens 2 h.

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laboratoriumsausrüstung³⁾, und besonders folgende Geräte:

5.3.2.1 Sterilisatoren

- a) zur Sterilisation durch Dampf ein Dampf-Sterilisator (Autoklav), der für eine Haltezeit von mindestens 15 min auf eine Temperatur von (121^{+3}_0) °C eingestellt werden kann;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluft-Sterilisator, der für eine Haltezeit von mindestens 30 min auf 180 °C, für eine Haltezeit von mindestens 1 h auf 170 °C oder für eine Haltezeit von mindestens 2 h auf 160 °C eingestellt werden kann.

3) Einmalgeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf eine Betriebstemperatur von $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, auf zusätzliche Prüftemperaturen $\pm 1 ^\circ\text{C}$ (siehe 5.7.1) und auf $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$ zum Abkühlen des geschmolzenen M17-Deckagars (siehe 5.5.2 und 5.5.3).

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

5.3.2.4 pH-Messgerät, kalibriert auf $\pm 0,1$ Einheiten des pH-Wertes bei $25 ^\circ\text{C}$.

5.3.2.5 Stoppuhr

5.3.2.6 Elektromechanisches Schnellschüttelgerät (z. B. Vortex[®]-Mischer⁴⁾)

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät mit einem Filterhalter, der für die Verwendung von Filtern mit einer Porenweite von $0,45 \mu\text{m}$ geeignet ist.

ANMERKUNG Es werden ausdrücklich Einmalgeräte empfohlen.

5.3.2.8 Behältnisse: Teströhrchen, Kulturkolben oder -flaschen mit geeignetem Volumen.

5.3.2.9 Messpipetten mit Nennvolumen von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml.

Kalibrierte automatische Pipetten dürfen verwendet werden.

ANMERKUNG Es sollte darauf geachtet werden, dass eine Verschmutzung der automatischen Pipetten mit Virus (d. h. Bakteriophagen)aerosolen vermieden wird.

5.3.2.10 Petrischalen in den Größen 90 mm bis 100 mm.

5.3.2.11 Messkolben

5.3.2.12 Mechanisches Schüttelgerät/Rührapparat

5.3.2.13 Tischzentrifuge mit einer Mindest-Zentrifugationskraft der 4 000fachen Erdbeschleunigung

5.3.2.14 Mikrowellenofen

Es muss besondere Sorgfalt aufgebracht werden, um ein unkontrolliertes Überhitzen in dem Ofen zu vermeiden, was zu einem unkontrollierten Überkochen des verflüssigten Agars führen kann. Die Verschlüsse müssen nur unverschraubt lose auf den Behältnissen aufliegen, um die Gefahr einer Explosion zu vermeiden.

5.3.2.15 Spektralphotometer für den sichtbaren Bereich (wahlweise) mit geeigneten optischen Filtern. Wahlweise mit geeigneten Probenhalterungen für Teströhrchen aus Glas, um ein direktes Ablesen der optischen Dichte (z. B. bei 620 nm) der Bakteriensuspensionen zu ermöglichen.

5.4 Herstellung der Wirtsbakteriensuspensionen

5.4.1 Vorratskulturen von Wirtsbakterien

Rekonstituierte Magermilch (siehe 5.2.2.14.3) wird mit Flüssigkultur mit 1 % Volumenkonzentration oder eine mit Bakterien behaftete Platinöse aus M17-Schrägagarröhrchen oder von Agarplatten beimpft, 2 h bei einer Temperatur von $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (siehe 5.3.2.3) bebrütet und diese Vorratskultur des Wirtsstammes in rekonstituierter Magermilch in einem Kühlschrank bei $4 ^\circ\text{C}$ bis $8 ^\circ\text{C}$ aufbewahrt. In 2-Wochen-Abständen werden diese Vorratskulturen über Nacht bei $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ wachsen gelassen und dann das Verfahren wiederholt, um eine frische Vorratskultur zu erhalten.

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