

DIN EN 13624

ICS 11.080.20

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden Wirkung
chemischer Desinfektionsmittel für Instrumente im
humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 13624:2003**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical
disinfectants for instruments used in the medical area –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German version EN 13624:2003

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide des désinfectants
chimiques utilisés pour les instruments en médecine –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);
Version allemande EN 13624:2003

Gesamtumfang 41 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Die Europäische Norm EN 13624:2003 hat den Status einer Deutschen Norm.

Nationales Vorwort

Diese Europäische Norm wurde von der Arbeitsgruppe 1 „Humanmedizin“ (Sekretariat: DIN) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ (Sekretariat: AFNOR) unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der Arbeitsgruppe 1 des CEN/TC 216 wird über den Arbeitsausschuss D 7 „Desinfektionsmittel im Bereich der Humanmedizin“ des Normenausschusses Medizin (NAMED) wahrgenommen.

Für die im Abschnitt 2 zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 6710 siehe DIN ISO 6710

Eine DIN EN ISO 6710 befindet sich in Vorbereitung.

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN ISO 6710, *Gefäße zur einmaligen Verwendung für die venöse Blutentnahme* (ISO 6710:1995; Stand: 1996-02-01).

Deutsche Fassung

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika
Quantitativer Suspensionsversuch zur Prüfung der fungiziden
Wirkung chemischer Desinfektionsmittel für Instrumente im
humanmedizinischen Bereich
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)**

Chemical disinfectants and antiseptics —
Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal
activity of chemical disinfectants for instruments used in
the medical area —
Test method and requirements (phase 2, step 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de
l'activité fongicide des désinfectants chimiques utilisés pour
les instruments en médecine —
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 3. November 2003 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, der Slowakei, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn 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	9
5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüfkeime und der Produktprüflösungen	10
5.5 Verfahrensablauf zur Bewertung der fungiziden Wirkung des Produkts.....	14
5.6 Untersuchungsdaten und Berechnung	19
5.7 Verifizierung des Verfahrens	23
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	24
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung.....	25
5.10 Prüfbericht	25
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Stammsammlungen	27
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten	28
B.1 Neutralisationsmedien.....	28
B.2 Spülflüssigkeiten.....	29
B.3 Dem Agar für die Keimzählungen zuzusetzende Neutralisationsmedien	29
Anhang C (informativ) Fließdiagramme	30
C.1 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren.....	30
C.2 Membranfiltrationsverfahren	32
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts	34
Anhang E (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation von Europäischen Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika	36
E.1 Einleitung	36
E.2 Allgemeine Hinweise für die Anwendung und Interpretation von Prüfverfahren nach Europäischen Normen für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika.....	36
E.3 Leitfaden für die Interpretation der Prüfverfahren für chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika	37
Anhang ZA (informativ) Abschnitte in dieser Europäischen Norm, die grundlegende Anforderungen oder andere Vorgaben von EU-Richtlinien betreffen	38
Literaturhinweise	39

Vorwort

Dieses Dokument (EN 13624:2003) 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 2004, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 2004 zurückgezogen werden.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EU-Richtlinien 93/42/EWG über Medizinprodukte.

Zum Zusammenhang mit EU-Richtlinien siehe informativen Anhang ZA, der Bestandteil dieses Dokumentes ist.

Zur Erarbeitung eines Anhangs über Präzisionsdaten dieser Norm ist ein Ringversuch durchgeführt worden.

Weitere Verfahren zur Bewertung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für andere medizinische Anwendungsgebiete sind in Vorbereitung.

Die Anhänge A, 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, Slowakei, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn und Vereinigtes Königreich.

Einleitung

Diese Europäische Norm beschreibt einen Suspensionsversuch zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel zur Behandlung von Instrumenten (chirurgischen Instrumenten, Anästhesiematerial, Endoskope usw.) im Rahmen des im Anwendungsbereich beschriebenen Arbeitsgebiets eine fungizide Wirkung aufweist oder nicht.

Zu den in diesem Laboratoriumsversuch gewählten Bedingungen gehören die Einwirkzeit, die Temperatur, die Prüfkeime und die Belastungssubstanzen, d. h. Bedingungen, die die Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in praktischen Situationen beeinflussen können.

Die festgelegten Bedingungen sollen allgemeinen Ansprüchen genügen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten ermöglichen. Jede in diesem Versuch ermittelte Konzentration des chemischen Desinfektionsmittels entspricht den gewählten Versuchsbedingungen. Bei einigen Anwendungsarten können jedoch die Anwendungsempfehlungen für ein Produkt unterschiedlich sein, und deshalb müssen zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren und Mindestanforderungen an die fungizide oder Hefen abtötende Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte als homogenes physikalisch stabiles Präparat vorliegen, bzw. bei gebrauchsfertigen Produkten bei der Verdünnung mit Wasser. Die Produkte können nur in einer Konzentration von 80 % oder darunter geprüft werden, da durch Zugabe der Prüfkeime und der Belastungssubstanz immer eine gewisse Verdünnung bewirkt wird.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die zur Desinfektion von Instrumenten im humanmedizinischen Bereich durch Eintauchen verwendet werden — selbst wenn diese nicht in der Richtlinie 93/42/EWG über Medizinprodukte erfasst sind.

Diese Europäische Norm gilt für Bereiche und unter Bedingungen, wo eine Desinfektion aus medizinischen Gründen angezeigt ist, z. B. bei der Patientenbetreuung in

- Krankenhäusern, kommunalen medizinischen Einrichtungen und im Dentalbereich;
- medizinischen Einrichtungen in Schulen, Kindergärten und Heimen;

und können auch am Arbeitsplatz oder im privaten Bereich gegeben sein. Eingeschlossen sein können auch Einrichtungen wie Wäschereien und Küchen, die der direkten Versorgung der Patienten dienen.

ANMERKUNG 1 Das beschriebene Verfahren dient zur Bestimmung der Wirksamkeit kommerziell erhältlicher Zubereitungen oder Wirkstoffe unter den praktischen Bedingungen, unter denen sie angewendet werden.

ANMERKUNG 2 Dieses Verfahren entspricht einer Prüfung der Phase 2, Stufe 1 (siehe Anhang E).

2 Normative Verweisungen

Diese Europäische 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 Europäischen Norm, falls sie durch Änderung oder Überarbeitung eingearbeitet sind. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe der in Bezug genommenen Publikation (einschließlich Änderungen).

EN 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Haltung von Bakterien- und Pilzstämmen, die für die Prüfung der bakteriziden und fungiziden Wirkung eingesetzt werden.*

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

ISO 6710, *Single-use containers for venous blood specimen collection.*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieser Europäischen Norm gelten die folgenden Begriffe.

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

3.2**Fungizid**

Produkt, das Pilze und ihre Sporen unter festgelegten Bedingungen abtötet

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

3.3**fungizide Wirkung**

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

3.4**fungistatische Wirkung**

die Fähigkeit eines Produkts, das Wachstum von Pilzen unter festgelegten Bedingungen zu hemmen

3.5**Hefen abtötendes Produkt**

Produkt, das Hefen unter festgelegten Bedingungen abtötet

[das englische Adjektiv „yeastocidal“ ist nicht übersetzbar]

3.6**Hefen abtötende Wirkung**

die Fähigkeit eines Produkts, die Anzahl der lebensfähigen Hefezellen bestimmter Prüfkeime unter festgelegten Bedingungen zu vermindern

3.7**Bedingungen niedriger Belastung**

Belastung, die der Belastung von Instrumenten entspricht, die einem ausreichenden Reinigungsprogramm unterzogen worden sind und/oder bekanntermaßen minimal mit einer organischen und/oder anorganischen Substanz verschmutzt sind

3.8**Bedingungen hoher Belastung**

Belastung, die der Belastung von Instrumenten entspricht, die bekanntermaßen oder vermutlich mit organischen und/oder anorganischen Substanzen verschmutzt sind

4 Anforderungen

Das mit Wasser standardisierter Härte (oder bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser) verdünnte und nach Abschnitt 5 unter simulierter niedriger Belastung (0,3 g/l Rinderalbuminlösung) oder hoher Belastung (3 g/l Rinderalbuminlösung und 3 ml/l gewaschene Schaf-Erythrozyten) entsprechend seiner praktischen Anwendung und unter den obligatorischen Prüfbedingungen (ein oder zwei ausgewählte Prüfkeime, 20 °C, 60 min) geprüfte Produkt muss eine Verminderung der Lebendkeimzahl um mindestens vier dekadisch-logarithmische Stufen nachweisen. Es ist möglich, auch das Produkt im Lieferzustand (höchste Prüfkonzentration 80 %) zu prüfen.

Die fungizide Wirksamkeit ist unter Anwendung der beiden folgenden Prüfkeime zu bewerten: *Aspergillus niger* und *Candida albicans*.

Die Hefen abtötende Wirkung ist unter Anwendung des folgenden Prüfkeims zu bewerten: *Candida albicans*.

Wo es angezeigt ist, ist eine zusätzliche fungizide oder Hefen abtötende Wirksamkeit unter Anwendung anderer Einwirkzeiten, Temperaturen und Belastungssubstanzen (siehe 5.5.1.1) zu ermitteln, um vorgesehene besondere Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

ANMERKUNG Bei diesen zusätzlichen Bedingungen kann die als deren Ergebnis festgelegte Konzentration niedriger sein als die unter den obligatorischen Prüfbedingungen erreichte.

5 Prüfverfahren

5.1 Prinzip

5.1.1 Eine Prüfsuspension von Pilzen (Hefezellen und Schimmelpilzsporen) in einer Lösung von Belastungssubstanzen wird zu einer Probe des Produkts im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (bei gebrauchsfertigen Produkten: mit Wasser) verdünnten Produkts gegeben. Das Gemisch wird 60 min $\pm$ 10°s bei (20 $\pm$ 1) °C gehalten (obligatorische Prüfbedingungen). Nach jedem Ende dieser Einwirkzeit wird eine Teilmenge entnommen; die fungizide und/oder fungistatische Wirkung in dieser Probenmenge wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. Das Verfahren der Wahl ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Wenn ein geeignetes Neutralisationsmedium nicht gefunden werden kann, wird die Membranfiltration angewendet. Die Anzahl der überlebenden Pilze in jeder Probe wird bestimmt und die Verminderung berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird unter Verwendung der Sporen von *Aspergillus niger* und der vegetativen Zellen von *Candida albicans* oder nur der vegetativen Zellen von *Candida albicans* als Prüfkeimen durchgeführt (obligatorische Prüfbedingungen).

5.1.3 Zusätzliche und optionale Einwirkzeiten und Temperaturen sind festgelegt. Zusätzliche Belastungssubstanzen können verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die fungizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden beiden Prüfkeime zu bewerten¹⁾:

— *Candida albicans* ATCC 10231;

— *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Die Hefen abtötende Wirkung ist lediglich unter Verwendung von *Candida albicans* zu bewerten.

ANMERKUNG Zum Verweis auf korrespondierende Stämme in einigen anderen Kulturensammlungen siehe Anhang A.

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 toxisch oder hemmend auf die Prüfkeime wirken.

ANMERKUNG Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien kommerziell erhältliche wasserfreie Materialien verwendet werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten genau befolgt werden. Für jedes Kulturmedium und Reagenz sollte eine zeitliche Begrenzung der Verwendung festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

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

1) Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die durch die American Type Culture Collection (ATCC) geliefert werden. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

Sterilisation in einem Dampf-Sterilisator (Autoklav) (siehe 5.3.1).

ANMERKUNG 1 Eine Sterilisation ist nicht erforderlich, wenn das Wasser — z. B. zur Herstellung von Kulturmedien — verwendet und nachfolgend sterilisiert wird.

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

5.2.2.3 Malzextraktagar (MEA)

Malzextrakt	30,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	3,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (siehe 5.2.2.2)	bis zu 1.000 ml

Sterilisation im Autoklaven (siehe 5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($5,6 \pm 0,2$), gemessen bei 20 °C, betragen (siehe 5.3.2.4).

ANMERKUNG Unter besonderen Umständen (Probleme mit der Neutralisation — siehe 5.5.1.2 und 5.5.1.3) kann es erforderlich sein, dem MEA Neutralisationsmedium (siehe B.3) zuzusetzen.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung:

— Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Trypton)	1,0 g
— Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g
— Wasser (siehe 5.2.2.2) bis zu	1.000,0 ml

Sterilisation im Autoklaven (siehe 5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums ($7,0 \pm 0,2$), gemessen bei 20 °C, betragen.

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

Das Neutralisationsmedium muss für das zu prüfende Produkt nach 5.5.1 und 5.5.2 validiert sein. Das Neutralisationsmedium muss steril sein.

ANMERKUNG In B.1 sind Neutralisationsmedien angegeben, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.6 Spülflüssigkeit (für die Membranfiltration)

Die Flüssigkeit muss steril, mit der Filtermembran kompatibel und unter den in 5.5.3 beschriebenen Prüfbedingungen durch die Filtermembran filtrierbar sein.

ANMERKUNG In B.2 sind Spülflüssigkeiten angegeben, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

Es sind herzustellen:

- Lösung A: Es werden 19,84 g wasserfreies Magnesiumchlorid (MgCl_2) oder eine äquivalente Menge wasserhaltiges Magnesiumchlorid und 46,24 g wasserfreies Calciumchlorid (CaCl_2) oder eine äquivalente Menge wasserhaltiges Calciumchlorid in Wasser (siehe 5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird im Autoklaven (siehe 5.3.1) sterilisiert. Die Lösung lässt sich bei 2 °C bis 8 °C bis zu einem Monat aufbewahren.
- Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) in Wasser (siehe 5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (siehe 5.3.2.7) sterilisiert. Die Lösung lässt sich bei 2 °C bis 8 °C bis zu einer Woche aufbewahren.
- Wasser standardisierter Härte: Für die Herstellung von 1 l werden in einen 1 000-ml-Messkolben (siehe 5.3.2.12) 600 ml bis 700 ml Wasser (siehe 5.2.2.2) gegeben, dazu gegeben werden 6,0 ml Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B. Nach Durchmischen wird mit Wasser (siehe 5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $(7,0 \pm 0,2)$ betragen. Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt. Das Wasser standardisierter Härte ist unter aseptischen Bedingungen frisch herzustellen und innerhalb von 12 h zu verbrauchen.

ANMERKUNG Bei Herstellung der Produktprüflösungen (siehe 5.4.2) führt die Zugabe des Produkts in dieses Wasser standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas unter 300 mg/kg bezogen auf 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 mit einer zehnfach höheren Konzentration, als für die Prüfung benötigt wird, hergestellt werden.

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

ANMERKUNG Im Folgenden wird der Ausdruck „Belastungssubstanz“ verwendet, auch wenn der Ansatz mehr als eine Substanz enthält.

5.2.2.8.2 Substanz für niedrige Belastung (Rinderserumalbuminlösung in niedriger Konzentration)

In 100 ml Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.4) werden 0,30 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (siehe 5.3.2.7). Die Lösung ist im Kühlschrank (bei 2 °C bis 8 °C) aufzubewahren und innerhalb 1 Monat zu verbrauchen.

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

5.2.2.8.3 Substanz für hohe Belastung (Gemisch von Rinderserumalbuminlösung in hoher Konzentration mit Schaf-Erythrozyten)

In 97 ml Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.4) werden 3,0 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (siehe 5.3.2.7).

Es werden mindestens 8,0 ml frisches defibriniertes Schafsblut nach ISO 6710 hergestellt oder solches Blut wird von einem kommerziellen Lieferanten bezogen (siehe 5.2.2.8.4). Die Erythrozyten werden bei 800 min^{-1} 10 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Erythrozyten in Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.4) resuspendiert. Dieser Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt, bis der Überstand farblos ist. 3 ml der gepackten Schaf-Erythrozyten werden in den 97 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung (siehe oben) resuspendiert. Um eine spätere Kontamination zu verhindern, sollte dieses Gemisch in Portionen aufgeteilt werden, die wahrscheinlich an einem Tag verwendet werden, und in gesonderten Behältern im Kühlschrank bei 2°C bis 8°C höchstens 7 Tage gelagert werden.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins und der Schaf-Erythrozyten im Prüfverfahren (siehe 5.5) beträgt 3g/l bzw. 3 ml/l.

5.2.2.8.4 Steriles defibriniertes Schafsblut

Das sterile defibrinierte Schafsblut kann handelsüblich bezogen oder nach ISO 6710 hergestellt werden.

5.3 Apparate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

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

- Durch feuchte Hitze im Dampfsterilisator (Autoklav) (siehe 5.3.2.1 a)) bei $(121^{+3}_0)^\circ\text{C}$ für eine Mindesthaltezeit von 15 min;
- Durch trockene Hitze im Heißluftsterilisator (siehe 5.3.2.1 b)) bei 180°C für eine Mindesthaltezeit von 30 min, bei 170°C für eine Mindesthaltezeit von 1 h oder bei 160°C für eine Mindesthaltezeit von 2 h.

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²⁾ und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf Betriebstemperaturen von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ (um den TSA im Fall des Gussplattenverfahrens verflüssigt zu halten) und zusätzliche Prüftemperaturen $\pm 1^\circ\text{C}$ (siehe 5.5.1).

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

2) Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

5.3.2.4 pH-Messgerät, kalibriert auf $\pm 0,1$ Einheiten des pH-Wertes bei 20 °C. Die zusätzliche Messungengenauigkeit der Elektroden darf nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten betragen.

ANMERKUNG Zur Ermittlung des pH-Wertes des Agars (siehe 5.2.2.3) sollte eine Stichelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

5.3.2.5 Stoppuhr

5.3.2.6 Schnellschüttelgerät, elektromechanisch, z. B. Vortex[®]-Mischer³⁾.

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät aus einem Material, das mit dem Produkt verträglich ist, mit einem Filterhalter von mindestens 50 ml Nutzvolumen und geeignet zur Verwendung von Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von 0,45 μm [oder 0,22 μm für die Sterilfiltration des Wassers standardisierter Härte (siehe 5.2.2.7) und des Rinderserumalbumins (siehe 5.2.2.8)].

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

5.3.2.8 Behälter: Reagenzgläser, Kolben oder Kulturflaschen mit geeignetem Volumen.

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

Kalibrierte automatische Pipetten dürfen verwendet werden.

5.3.2.10 Petrischalen in den Größen 90 mm bis 100 mm.

5.3.2.11 Glasperlen von 3 mm bis 4 mm Durchmesser.

5.3.2.12 Messkolben.

5.3.2.13 Mechanisches Orbitalschüttelgerät.

5.3.2.14 Zentrifuge (800 g_N und 2 000 g_N).

5.3.2.15 Roux-Flaschen oder ähnliche Kolben.

5.3.2.16 Frittenfilter mit einer Porenweite von 40 μm bis 100 μm (siehe ISO 4793).

5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüfkeime und der Produktprüflösungen

5.4.1 Suspensionen der Prüfkeime (Suspension für die Prüfung und die Validierung)

5.4.1.1 Allgemeines

Es sind zwei unterschiedliche Suspensionen der Prüfkeime herzustellen: Die „Prüfsuspension“ zur Durchführung der Prüfung und die „Validierungssuspension“ zur Durchführung der Kontrolluntersuchungen und der Verfahrensvalidierung.

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

5.4.1.2 Stammkulturen von Prüfkeimen

Die Prüfkeime und ihre Stammkulturen sind gemäß den Anforderungen von EN 12353 vorzubereiten und aufzubewahren.

5.4.1.3 Gebrauchskultur der Prüfkeime

5.4.1.3.1 *Candida albicans* (Hefe)

Um die Gebrauchskultur von *Candida albicans* (siehe 5.2.1) herzustellen, ist eine Subkultur von der Stammkultur (siehe 5.4.1.2) durch Ausstrich auf MEA-Schräggarröhrchen oder MEA-Platten (siehe 5.2.2.3) anzulegen und zu bebrüten (siehe 5.3.2.3). Nach 42 h bis 48 h wird eine zweite Subkultur auf gleiche Weise aus der ersten Subkultur angelegt und ebenfalls 42 h bis 48 h bebrütet. Aus dieser Subkultur darf auf gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden. Die zweite und/oder 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 (siehe 5.3.2.3) verblieben ist.

Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

5.4.1.3.2 *Aspergillus niger* (Schimmelpilz)

Bei *Aspergillus niger* wird nur die erste auf MEA (siehe 5.2.2.3) in Roux-Flaschen (siehe 5.3.2.15) gewachsene Subkultur verwendet und 7 bis 9 Tage bebrütet. Eine weitere Subkultivierung ist nicht erforderlich.

5.4.1.4 Prüfsuspension (N)

5.4.1.4.1 *Candida albicans*

- a) Es werden 10 ml Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.4) mit 10 g Glasperlen (siehe 5.3.2.11) in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Von der Gebrauchskultur (siehe 5.4.1.3.1) werden ösenweise Zellen in das Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.4) gegeben. Die Suspension der Zellen im Verdünnungsmittel sollte erfolgen, indem die Öse in das Verdünnungsmittel eingetaucht und an der Wand des Kolbens gerieben wird, um die Zellen voneinander zu trennen. Unter Verwendung eines mechanischen Schüttelgeräts (siehe 5.3.2.13) wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in ein anderes Röhrchen überführt.
- b) Die Anzahl der Zellen in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel (siehe 5.2.2.4) auf $1,5 \times 10^7$ KBE je ml⁴⁾ bis $5,0 \times 10^7$ KBE je ml eingestellt. Die Anzahl der Einheiten wird mit einem geeigneten Verfahren abgeschätzt. Diese Suspension ist im Wasserbad bei der Prüftemperatur θ (siehe 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, optische Wegstrecke der Küvette 10 mm). Jedes Laboratorium sollte deshalb für jeden Prüfkeim Kalibrierdaten erarbeiten, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte zwischen 0,200 und 0,350 zu finden sind. Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

4) KBE/ml = koloniebildende Einheiten je ml.