

DIN EN 13624

ICS 11.080.20

Ersatz für
DIN EN 13624:2022-01

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der fungiziden oder
levuroziden Wirkung im humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 13624:2021**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity in the
medical area –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German version EN 13624:2021

Désinfectants chimiques et antiseptiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide en
médecine –
Méthode d'essai et exigences (phase 2, étape 1);
Version allemande EN 13624:2021

Gesamtumfang 63 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 13624:2021) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium 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 13624:2013-12 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Deharmonisierung der Norm (Anhang ZA und Verweis auf MDR/MDD gelöscht);
- b) Aufnahme der Wäschedesinfektion (siehe Tabelle 1, 5.5.1.3);
- c) die Mengen für die hohe Belastung für gebrauchsfertige Produkte wurden reduziert [5.2.2.8.4 b)];
- d) Klarstellung, dass für alle Produkte mit einer Einwirkzeit von 10 min oder weniger eine Neutralisationszeit von 10 s verwendet werden muss [5.5.2.2 c) und 5.5.2.5 b)];
- e) Erläuterung von alternativen Kontrollen für die chemothermische Desinfektion (5.5.2.3);
- f) der Verweis auf CIP-Nummern für Pilzstämme wurde gelöscht und die UMIP-Nummern wurden aufgenommen (Anhang A);
- g) Harmonisierung des Textes mit EN 13727;
- h) Norm redaktionell überarbeitet.

Gegenüber DIN EN 13624:2022-01 wurden folgende Korrekturen vorgenommen:

- a) in 5.4.1.4.1 c) 1) und in 5.5.2.2 c) 1) wurde jeweils „etwa die Hälfte jeder 1,0-ml-Probe“ ersetzt durch „jede 1,0-ml-Probe“;
- b) in 5.8.3 wurde die Überschrift korrigiert;
- c) in 5.9.4 und 5.9.8 wurde jeweils der Text in der Klammer geändert in „(hohe Belastung)“;
- d) redaktionelle Änderungen.

Frühere Ausgaben

DIN EN 13624: 2004-02, 2013-12, 2022-01

Deutsche Fassung

Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der
fungiziden oder levuroziden Wirkung im
humanmedizinischen Bereich —
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1)

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

Désinfectants chimiques et antiseptiques —
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de
l'activité fongicide ou levuricide en médecine —
Méthode d'essai et exigences (phase 2, étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 3. Oktober 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	7
4 Anforderungen	7
5 Prüfverfahren	8
5.1 Kurzbeschreibung	8
5.2 Materialien und Reagenzien	9
5.2.1 Prüforganismen	9
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	9
5.3 Apparate und Glasgeräte	13
5.3.1 Allgemeines	13
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und insbesondere folgende Geräte:	13
5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüforganismen und der Produktprüflösungen	14
5.4.1 Suspensionen der Prüforganismen (Prüf- und Validierungssuspension)	14
5.4.2 Produktprüflösungen	19
5.5 Verfahrensablauf zur Bewertung der fungiziden und levuroziden Wirkung des Produkts	20
5.5.1 Allgemeines	20
5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	22
5.5.3 Membranfiltrationsverfahren	25
5.5.4 Modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte	27
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	29
5.6.1 Erklärung von Begriffen und Abkürzungen	29
5.6.2 Berechnung	30
5.7 Verifizierung des Verfahrens	35
5.7.1 Allgemeines	35
5.7.2 Kontrolle der gewichteten Mittelwerte der Auszählungen	35
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	36
5.7.4 Zusätzliche Grenzwerte für <i>Aspergillus brasiliensis</i>	36
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	36
5.8.1 Keimreduktion	36
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	37
5.8.3 Grenzwert-Prüforganismus und fungizide und levurozide Konzentration	37
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	37
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	37
5.9.1 Allgemeines	37
5.9.2 Fungizide Wirksamkeit bei Produkten für die Instrumentendesinfektion	37
5.9.3 Fungizide Wirksamkeit bei Produkten für die Oberflächendesinfektion	38
5.9.4 Fungizide Wirksamkeit bei Produkten für die Wäschedesinfektion	38
5.9.5 Levurozide Wirksamkeit für Produkte der Händedesinfektion und Händewaschung	38
5.9.6 Levurozide Wirksamkeit bei Produkten für die Instrumentendesinfektion	38
5.9.7 Levurozide Wirksamkeit bei Produkten für die Oberflächendesinfektion	38
5.9.8 Levurozide Wirksamkeit bei Produkten für die Wäschedesinfektion	39
5.9.9 Qualitätsnachweis für bestimmte Anwendungsgebiete	39

5.10	Prüfbericht.....	39
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Stammsammlungen		41
Anhang B (informativ) Neutralisationsmedien und Spülflüssigkeiten		42
Anhang C (informativ) Graphische Darstellung der Prüfverfahren		44
C.1	Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	44
C.2	Membranfiltrationsverfahren	46
C.3	Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren (modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte)	48
C.4	Membranfiltrationsverfahren (modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte)	50
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichtes.....		52
Anhang E (informativ) Präzision der Prüfergebnisse.....		57
Literaturhinweise.....		61

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 13624:2021) 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 Mai 2022, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Mai 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 13624:2013.

Dieses Dokument wurde überarbeitet, um es an den letzten Stand der Wissenschaft anzupassen, Fehler und Mehrdeutigkeiten zu korrigieren, es mit der Struktur und dem Wortlaut der anderen existierenden und in Vorbereitung befindlichen Prüfmethoden des CEN/TC 216 zu harmonisieren, die Lesbarkeit zu verbessern und dadurch den Text besser verständlich zu machen. Nachfolgend werden wesentliche technische Änderungen seit der letzten Ausgabe aufgelistet:

- Deharmonisierung der Norm (Anhang ZA und Verweisungen auf MDR/MDD gelöscht);
- Aufnahme der Wäschedesinfektion (siehe Tabelle 1, 5.5.1.3);
- die Mengen für die hohe Belastung für gebrauchsfertige Produkte wurden reduziert [5.2.2.8.4 b)];
- Klarstellung, dass für alle Produkte mit einer Einwirkzeit von 10 min oder weniger eine Neutralisationszeit von 10 s verwendet werden muss [5.5.2.2 c) und 5.5.2.5 b)];
- Erläuterung von alternativen Kontrollen für die chemothermische Desinfektion (5.5.2.3);
- der Verweis auf CIP-Nummern für Pilzstämme wurde gelöscht und die UMIP-Nummern wurden aufgenommen (Anhang A);
- Harmonisierung des Textes mit EN 13727;
- Korrektur von redaktionellen Fehlern.

Die Änderungen dieser Überarbeitung haben keinen Einfluss auf die Prüfergebnisse, die mit Bezug auf die Version EN 13624:2013 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

Dieses Dokument legt einen Suspensionsversuch fest, mit dem festgestellt werden soll, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum auf den im Anwendungsbereich beschriebenen Gebieten eine fungizide oder levurozide Wirkung aufweist.

Dieser Laborversuch berücksichtigt praktische Anwendungsbedingungen des Produkts, zu denen die Einwirkzeit, die Temperatur, die Prüforganismen und die Belastungssubstanzen gehören, d. h. Bedingungen, die seine Wirkung in praktischen Situationen beeinflussen können. Jede in diesem Versuch ermittelte Anwendungskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels oder Antiseptikums entspricht den gewählten Prüfbedingungen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren und Mindestanforderungen für die fungizide oder levurozide (Hefen abtötende) Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte bzw. – im Fall von gebrauchsfertigen Produkten – mit Wasser als homogenes physikalisch stabiles Präparat vorliegen. Die Produkte können nur in einer Konzentration bis zu 80 % (97 % bei einem modifizierten Verfahren in Sonderfällen) geprüft werden, da durch Zugabe der Prüforganismen und der Belastungssubstanz stets eine gewisse Verdünnung bewirkt wird.

Dieses Dokument ist anzuwenden für Produkte, die im humanmedizinischen Bereich für hygienische Händedesinfektion, hygienische Händewaschung, chirurgische Händedesinfektion, chirurgische Händewaschung, für die Instrumentendesinfektion durch Eintauchen sowie für die Oberflächendesinfektion mittels Wischen, Sprühen, Spülen o. Ä. verwendet werden.

Dieses Dokument ist anzuwenden für Bereiche und Bedingungen, wo eine Desinfektion oder Antisepsis aus medizinischen Gründen angezeigt ist. Indikationen dieser Art liegen z. B. bei der Patientenbetreuung in

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

vor und können auch am Arbeitsplatz oder im häuslichen 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 jeweiligen Anwendungsbedingungen.

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

EN 14885 legt detailliert die Beziehungen der unterschiedlichen Prüfungen untereinander und zu „Anwendungsempfehlungen“ fest.

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 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Aufbewahrung von Prüforganismen für die Prüfung der bakteriziden (einschließlich Legionella), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung*

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

ISO 4793:1980, *Laboratory sintered (fritted) filters — Porosity grading, classification and designation*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die Begriffe nach EN 14885.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

- IEC Electropedia: verfügbar unter <https://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter <https://www.iso.org/obp>

4 Anforderungen

Bei Prüfung nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 muss das Produkt eine Verminderung der Keimzahl um mindestens 4 dezimallogarithmische Stufen (lg-Stufen) nachweisen (für hygienische Händewaschung eine Verminderung um mindestens 2 lg-Stufen).

Tabelle 1 — Mindest- und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüf- bedingungen	Hygienische Hände- desinfektion und Händewaschung	Chirurgische Hände- desinfektion und Händewaschung	Instrumenten- desinfektion	Oberflächen- desinfektion	Wäsche- desinfektion ^d
Mindest- spektrum von Prüf- organismen	<i>Candida albicans</i> (vegetative Zellen)	<i>Candida albicans</i> (vegetative Zellen)	a) fungizide Wirkung: <i>Aspergillus brasiliensis</i> (Conidiosporen) <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen) b) levurozide Wirkung: <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen)	a) fungizide Wirkung: <i>Aspergillus brasiliensis</i> (Conidiosporen) <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen) b) levurozide Wirkung: <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen)	a) fungizide Wirkung: <i>Aspergillus brasiliensis</i> (Conidiosporen) <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen) b) levurozide Wirkung: <i>Candida albicans</i> (veg. Zellen)
zusätzlich	jeder zutreffende Prüforganismus				
Prüf- temperatur	bei 20 °C	bei 20 °C	im Allgemeinen zwischen 20 °C und 50 °C für <i>Candida spec.</i> und zwischen 20 °C und 60 °C für <i>Aspergillus spec.</i> ^e	zwischen 4 °C und 30 °C	im Allgemeinen zwischen 20 °C und 50 °C für <i>Candida spec.</i> und zwischen 20 °C und 60 °C für <i>Aspergillus spec.</i> ^e
Einwirkzeit	entsprechend der Empfehlung des Herstellers,				
	jedoch zwischen		jedoch nicht länger als		
	30 s und 60 s	1 min und 5 min	60 min	5 min oder 60 min ^a	

Prüf- bedingungen	Hygienische Hände- desinfektion und Händewaschung	Chirurgische Hände- desinfektion und Händewaschung	Instrumenten- desinfektion	Oberflächen- desinfektion	Wäsche- desinfektion ^d
Belastungs- substanz	0,3 g/l Rinderserum- albuminlösung (hygienische Hände- desinfektion) ^b	0,3 g/l Rinderserum- albuminlösung (chirurgische Hände- desinfektion) ^b	0,3 g/l Rinderserum- albuminlösung	0,3 g/l Rinderserum- albuminlösung	
hohe Belastung	3,0 g/l Rinderserum- albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten (hygienische Händewaschung) ^c	3,0 g/l Rinderserum- albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten (chirurgische Händewaschung) ^c	und/oder 3,0 g/l Rinderserum- albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten	und/oder 3,0 g/l Rinderserum- albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten	3,0 g/l Rinderserum- albuminlösung plus 3,0 ml/l Erythrozyten
zusätzlich	—	—	jede zutreffende Substanz	jede zutreffende Substanz	—
ANMERKUNG Für die zusätzlichen Bedingungen kann die als ein Ergebnis festgelegte Konzentration geringer sein als die unter den Mindestprüfbedingungen erhaltene Konzentration.					
^a Die in dieser Tabelle angegebenen Einwirkzeiten für Oberflächendesinfektionsmittel werden auf der Grundlage der praktischen Anwendungsbedingungen des Produkts ausgewählt. Die empfohlene Einwirkzeit für die Anwendung des Produkts liegt in der Verantwortung des Herstellers. Produkte, die zur Desinfektion von Oberflächen vorgesehen sind, die wahrscheinlich mit dem Patienten und/oder dem medizinischen Personal in Kontakt kommen, und Oberflächen, die häufig von verschiedenen Personen berührt werden, was zu einer Übertragung von Mikroorganismen auf den Patienten führt, sind mit einer Einwirkzeit von höchstens 5 min zu prüfen. Das Gleiche gilt für Fälle, bei denen die Einwirkzeit des Produktes aus praktischen Gründen begrenzt sein muss. Produkte für andere als die oben angeführten Oberflächen dürfen mit einer Einwirkzeit von höchstens 60 min geprüf werden. ^b Die hygienische und chirurgische Händedesinfektion muss mindestens unter den Bedingungen niedriger Belastung geprüft werden. ^c Die hygienische und chirurgische Händewaschung muss mindestens unter den Bedingungen hoher Belastung geprüft werden. ^d Für weitere Informationen siehe EN 16616:2015, Abschnitt 4. ^e Für weitere Informationen zur Validität bei erhöhten Temperaturen siehe EN 14885.					

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Probe des Produkts im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (oder bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser) verdünnten Produkts wird zu einer Prüfsuspension von Pilzen (Hefezellen oder Schimmelpilzsporen) in einer Lösung einer Belastungssubstanz gegeben. Das Gemisch wird bei den in Abschnitt 4 und 5.5.1.1 festgelegten Werten für Temperatur und Einwirkzeit gehalten. Nach dem Ende dieser Einwirkzeit wird ein Aliquot entnommen; die fungizide und/oder fungistatische Wirkung in dieser Probenmenge wird sofort in einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. Das vorzuziehende Verfahren ist das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Kann kein geeignetes Neutralisationsmedium gefunden werden, wird die Membranfiltration angewendet. Die Anzahl der überlebenden Pilze in jeder Probe wird bestimmt und die Reduktion berechnet.

ANMERKUNG Produkte für die Händewaschung werden immer mit Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7) vorverdünnt. Die entstandene Lösung wird als gebrauchsfertiges Produkt (5.4.2) angesehen.

5.1.2 Für die Prüfung werden die vegetativen Zellen von *Candida albicans* und die Conidiosporen von *Aspergillus brasiliensis* (fungizide Wirkung) oder nur die vegetativen Zellen von *Candida albicans* (levurozide Wirkung) als Prüforganismen verwendet (Abschnitt 4, Tabelle 1).

5.1.3 Zusätzliche Einwirkzeiten und Temperaturen sind festgelegt (Abschnitt 4, Tabelle 1). Zusätzliche Belastungssubstanzen und Prüforganismen dürfen verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Die fungizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden Stämme als Prüforganismen zu bewerten, ausgewählt nach Abschnitt 4 (Tabelle 1)¹:

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

Die levurozide Wirkung ist ausschließlich unter Verwendung von *Candida albicans* zu bewerten.

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

Die erforderliche Bebrütungstemperatur für diese Prüforganismen beträgt $(30 \pm 1) ^\circ\text{C}$ (5.3.2.3).

Werden zusätzliche Prüforganismen verwendet, müssen diese unter optimalen Wachstumsbedingungen bebrütet werden (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien), die im Prüfbericht zu dokumentieren sind. Entsprechen die gewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den festgelegten Stämmen, muss ihre Eignung zur Bereitstellung der erforderlichen Inokula verifiziert werden. Wurden diese zusätzlichen Prüforganismen nicht durch ein Referenz-Zentrum klassifiziert, sind ihre Identifizierungsmerkmale anzugeben. Darüber hinaus müssen sie von dem Prüflabor oder der nationalen Kulturensammlung für fünf Jahre als Referenzprobe aufbewahrt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in diesem Dokument angegebenen Massen chemischer Substanzen beziehen sich auf die wasserfreien Salze. Wasserhaltige Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um dadurch folgende Differenzen in den relativen Molekulargewichten auszugleichen.

Die Reagenzien müssen analysenrein und/oder für mikrobiologische Zwecke geeignet sein. Sie müssen frei von Substanzen sein, die toxisch oder hemmend auf die Prüforganismen wirken.

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.

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

1 Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die durch diese Kulturensammlungen geliefert werden. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes und darf kein entmineralisiertes Wasser sein. Steht kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung, kann Wasser für Injektionszwecke (siehe Literaturhinweis [2]) verwendet werden.

Sterilisation in einem Dampf-Sterilisator (Autoklav) [5.3.2.1 a)]. Eine Sterilisation ist nicht erforderlich, wenn das Wasser – z. B. zur Herstellung von Kulturmedien – verwendet und anschließend sterilisiert wird.

Siehe 5.2.2.7 zum Verfahren für die Herstellung von Wasser standardisierter Härte.

5.2.2.3 Malzextraktagar (MEA)

Malzextraktagar bestehend aus:

Malzextrakt (lebensmittelunbedenklich [z. B. Cristomalzpulver von Difal] oder entsprechend, das nicht stark gereinigt ist und das nicht allein auf Maltose basiert [z. B. Malzextrakt von OXOID] ²⁾	30,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Sterilisation im Autoklav (5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums $5,6 \pm 0,2$ betragen.

Beim Auftreten von Problemen bei der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3), ist es möglicherweise erforderlich, dem MEA ein Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält Leitlinien zu den Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen. Es wird empfohlen, keine Neutralisationsmedien anzuwenden, die eine Opaleszenz des Agars hervorrufen.

Sollte es jedoch Probleme bereiten, mindestens 75 % stachelige Sporen herzustellen, siehe 5.4.1.4.2.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

Trypton, pankreatisch verdaut aus Casein	1,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Sterilisation im Autoklav [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Verdünnungsmittels $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

Das Neutralisationsmedium muss für das nach 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.2 zu prüfende Produkt validiert sein. Es muss steril sein.

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

2 Malzextrakt von OXOID ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.2.2.6 Spülflüssigkeit (für die Membranfiltration)

Die Spülflüssigkeit muss für das nach 5.5.1.2, 5.5.1.3 und 5.5.3 zu prüfende Produkt validiert sein. Sie muss steril, mit der Filtermembran kompatibel und unter den in 5.5.3 beschriebenen Untersuchungsbedingungen durch die Filtermembran filtrierbar sein.

Anhang B enthält Angaben zu Spülflüssigkeiten, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.7 Wasser standardisierter Härte zur Verdünnung der Produkte

Die Vorgehensweise bei der Herstellung von 1 l Wasser standardisierter Härte ist wie folgt:

- Herstellung der Lösung A: 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) werden in Wasser (5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird mittels Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Dampf-Sterilisator (Autoklav) [5.3.2.1 a)] sterilisiert. Bei Sterilisierung im Autoklav kann es zu einem Flüssigkeitsverlust kommen. In diesem Fall wird das Volumen unter aseptischen Bedingungen mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) höchstens einen Monat aufbewahrt;
- Herstellung der Lösung B: 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) werden in Wasser (5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml verdünnt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) höchstens eine Woche aufbewahrt;
- in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) werden 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) gegeben, dazu werden 6,0 ml (5.3.2.9) Lösung A und anschließend 8,0 ml Lösung B gegeben. Es wird durchmischt und mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert (5.3.2.4) des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen. Bei Bedarf wird der pH-Wert mit Hilfe einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Chlorwasserstoffsäure (HCl) eingestellt.

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

ANMERKUNG Bei Herstellung der Produktprüflösungen (5.4.2) führt die Zugabe des Produkts zum Wasser standardisierter Härte zu einer unterschiedlichen endgültigen Wasserhärte in jedem Reagenzglas. In jedem Fall liegt die endgültige Wasserhärte im Reagenzglas unter 375 mg/l, bezogen auf Calciumcarbonat (CaCO_3).

5.2.2.8 Belastungssubstanz

5.2.2.8.1 Allgemeines

Die Belastungssubstanz muss nach den für das Produkt festgelegten Anwendungsbedingungen ausgewählt werden.

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in einer Konzentration hergestellt werden, die dem 10-Fachen der in der Prüfung verwendeten Endkonzentration entspricht (dem 50-Fachen im Falle des modifizierten Verfahrens, siehe 5.2.2.8.4).

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

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

5.2.2.8.2 Niedrige Belastung (Rinderserumalbuminlösung – geringe Konzentration)

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

Es wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert, die Lösung wird im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt und innerhalb eines Monats verwendet.

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

5.2.2.8.3 Hohe Belastung (Gemisch von Rinderserumalbuminlösung – hohe Konzentration mit Schaf-Erythrozyten)

In 97 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) werden 3,00 g Rinderserumalbumin Fraktion V (für mikrobiologische Zwecke geeignet) gelöst.

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7).

Es werden mindestens 8,0 ml frisches defibriniertes Schafsblut hergestellt (5.2.2.9). Die Erythrozyten werden bei 800 g_N für 10 min abzentrifugiert (5.3.2.13). Nach Verwerfen des Überstandes werden die Erythrozyten in Verdünnungsmittel (5.2.2.4) resuspendiert. Dieser Vorgang wird mindestens 3-mal 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 verbraucht werden, und in gesonderten Behältern im Kühlschrank (5.3.2.8) höchstens 7 d gelagert werden.

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

5.2.2.8.4 Niedrige und hohe Belastung beim modifizierten Verfahren für gebrauchsfertige Produkte (5.5.4)

Im Allgemeinen sind die Herstellungsverfahren nach 5.2.2.8.2 und 5.2.2.8.3 zu befolgen, die Belastungssubstanz ist jedoch in 5-fach höheren Konzentrationen herzustellen, bei hoher Belastung maximal 50 ml, um Probleme bei der Filtration zu vermeiden.

- a) Niedrige Belastung (5.2.2.8.2) – 1,50 g (statt 0,3 g) Rinderserumalbumin werden in 100 ml Verdünnungsmittel aufgelöst;
- b) hohe Belastung (5.2.2.8.3) – 7,5 g (statt 1,5 g) Rinderserumalbumin werden in 42,5 ml (statt 48,5 ml) Verdünnungsmittel aufgelöst. Vorbereitung von mindestens 20 ml (statt 4,0 ml) Schafsblut. 7,5 ml (statt 1,5 ml) der gepackten Schaf-Erythrozyten werden in 42,5 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung (siehe oben) resuspendiert, um 50 ml zu erhalten.

5.2.2.9 Defibriniertes Schafsblut

Das defibrinierte Schafsblut sollte steril sein (aseptischer Aderlass und Vorbereitung), aus mehr als einem Schaf gewonnen sein und kann von einem kommerziellen Lieferanten bezogen werden.

5.3 Apparate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Sofern nicht steril geliefert, 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:

- a) durch feuchte Hitze im Dampfsterilisator (Autoklav) [5.3.2.1 a)];
- b) durch trockene Hitze im Heißluftsterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung³ und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation durch feuchte und trockene Hitze

- a) zur Dampfsterilisation ein Autoklav, einstellbar auf (121^{+3}_0) °C für eine Mindesthaltezeit von 15 min;
- b) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluftsterilisator, einstellbar auf (180^{+5}_0) °C für eine Mindesthaltezeit von 30 min, auf (170^{+5}_0) °C für eine Mindesthaltezeit von 1 h oder auf (160^{+5}_0) °C für eine Mindesthaltezeit von 2 h.

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf (20 ± 1) °C, (45 ± 1) °C (um den MEA im Fall des Gussplattenverfahrens verflüssigt zu halten) und zusätzliche Prüftemperaturen ± 1 °C (5.5.1).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf (30 ± 1) °C.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit kleiner als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei (20 ± 1) °C. Zur Ermittlung des pH-Wertes des Agars (5.2.2.3) sollte eine Stichelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

5.3.2.5 Stoppuhr.

5.3.2.6 Schüttelgeräte

- a) Schnellschüttelgerät, elektromechanisch, z. B. Vortex[®]-Mischer⁴;
- b) mechanisches Schüttelgerät.

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät aus einem Material, das mit den zu filternden Substanzen 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 maximalen Porenweite von 0,45 µm für die Sterilisation von Wasser standardisierter Härte (5.2.2.7), Rinderserumalbumin (5.2.2.8.2, 5.2.2.8.3 und 5.2.2.8.4) und für den Fall der Anwendung des Membranfiltrationsverfahrens (5.5.3).

Die verwendete Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Mikroorganismen auf der Membran zu erreichen und zur Vermeidung eines übermäßig langen Filtrationsvorgangs muss das Gerät so eingestellt werden, dass 100 ml der Spülflüssigkeit innerhalb von 20 s bis 40 s filtriert werden.

3 Sterile Einweggeräte sind eine zulässige Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

4 Vortex[®] ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.3.2.8 Kühlschranks, einstellbar auf 2 °C bis 8 °C.

5.3.2.9 Messpipetten mit einem Nennvolumen von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml oder kalibrierte automatische Pipetten.

5.3.2.10 Petrischalen, (Platten) in den Größen 90 mm bis 100 mm.

5.3.2.11 Glasperlen (Durchmesser 3 mm bis 4 mm).

5.3.2.12 Messkolben.

5.3.2.13 Zentrifuge (800 g_N).

5.3.2.14 Flaschen mit belüfteten Verschlusssteilen, Roux-Flaschen oder ähnliche Kolben.

5.3.2.15 Glasfilterfritten mit einer Porenweite von 40 µm bis 100 µm, entsprechend ISO 4793:1980, Abschnitt 2.

5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüforganismen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Suspensionen der Prüforganismen (Prüf- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

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

5.4.1.2 Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüforganismen

Die Prüforganismen und ihre Stammkulturen sind nach EN 12353 vorzubereiten und aufzubewahren.

5.4.1.3 Gebrauchskultur der Prüforganismen

5.4.1.3.1 *Candida albicans* (Hefe)

Zur Herstellung der Gebrauchskultur von *Candida albicans* (5.2.1) ist eine Subkultur von der Stammkultur (5.4.1.2) durch Ausstrich auf MEA-Schrägagarrröhrchen oder MEA-Platten (5.2.2.3) anzulegen und zu bebrüten (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 zweiten Subkultur darf auf gleiche Weise eine dritte Subkultur angelegt werden. Die zweite und (sofern hergestellt) dritte Subkultur sind die Gebrauchskulturen.

Ist das Anlegen der zweiten Subkultur an einem bestimmten Tag nicht möglich, darf eine 72-h-Subkultur für nachfolgende Subkulturen unter der Voraussetzung verwendet werden, dass die Subkultur während der 72 h im Brutschrank (5.3.2.3) verblieben ist.

Eine vierte Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

5.4.1.3.2 *Aspergillus brasiliensis* (Schimmelpilz)

Für *Aspergillus brasiliensis* (5.2.1) wird nur die erste auf MEA (5.2.2.3) in Petrischalen (5.3.2.10) oder Flaschen mit belüfteten Verschlusssteilen (5.3.2.14) gewachsene Subkultur verwendet und für 7 d bis 9 d bebrütet. Die Herstellung weiterer Subkulturen ist nicht notwendig. Die Petrischalen während der Bebrütung übereinander zu stapeln, könnte die gleichmäßige Temperaturverteilung beeinträchtigen.

Am Ende der Bebrütung müssen alle Kulturen eine dunkelbraune oder schwarze Oberfläche mit nur wenigen kleinen weißen oder grauen Flecken aufweisen. Beispiele für geeignete und ungeeignete Kulturen sind in Bild 1 und Bild 2 dargestellt.

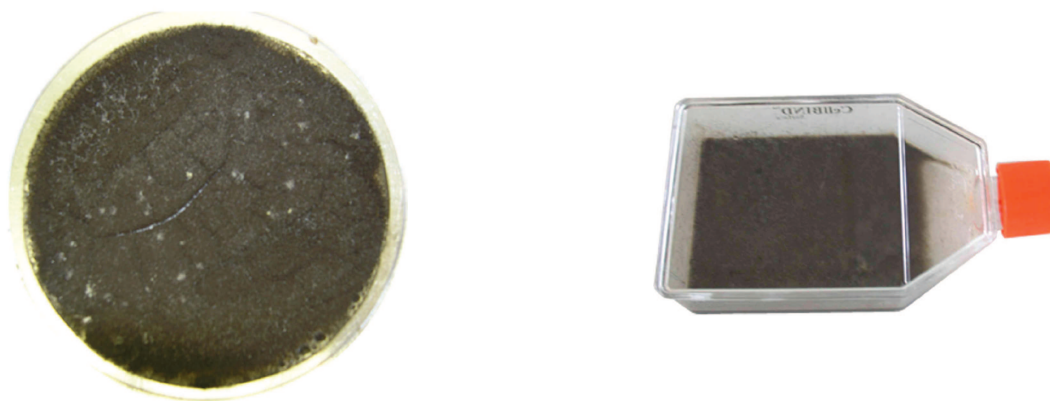


Bild 1 — Foto Nr. 1: Beispiele für geeignete Kulturen des *A. brasiliensis* ATCC 16404 nach 7 d der Bebrütung bei 30 °C

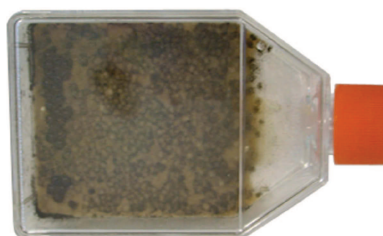


Bild 2 — Foto Nr. 2: Beispiel für ungeeignete (nicht verwendbare) Kulturen des *A. brasiliensis* ATCC 16404 nach 7 d der Bebrütung bei 30 °C

5.4.1.3.3 Andere Prüfororganismen (Hefen oder Schimmelpilze)

Bei zusätzlichen Prüfororganismen muss jedes Abweichen von diesem Verfahren zur Kultivierung der Hefen oder Schimmelpilze oder zur Herstellung der Suspensionen aufgezeichnet werden, wobei die Gründe im Prüfbericht anzugeben sind.

5.4.1.4 Prüfsuspension (N)

5.4.1.4.1 *Candida albicans*

- 10 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) werden mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) in einen 100-ml-Kolben gefüllt. Von der Gebrauchskultur (5.4.1.3.1) werden ösenweise Zellen in das Verdünnungsmittel (5.2.2.4) gegeben. Das Suspendieren der Zellen im Verdünnungsmittel sollte durch Reiben der Öse an der nassen Wand des Kolbens erfolgen, um die Zellen vor dem Eintauchen in das Verdünnungsmittel voneinander zu trennen. Unter Verwendung eines mechanischen Schüttelgerätes [5.3.2.6 b)] wird der Kolben 3 min geschüttelt. Die Suspension wird durch Absaugen von den Glasperlen getrennt und in ein Reagenzglas überführt.

- b) Die Anzahl der Zellen in der Suspension wird mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) auf $1,5 \times 10^7$ KBE/ml⁵ bis $5,0 \times 10^7$ KBE/ml ($1,5 \times 10^8$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml beim modifizierten Verfahren, 5.5.4) eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mit einem geeigneten Verfahren abgeschätzt wird. Diese Prüfsuspension ist im Wasserbad bei 20 °C aufzubewahren und innerhalb von 2 h zu verwenden. Die Temperatur ist entsprechend 5.5.1.1 a) und 5.5.1.4 erst unmittelbar vor Prüfbeginn einzustellen.

Die Verwendung eines Spektrophotometers zur Einstellung der Anzahl der Zellen wird dringend empfohlen (Wellenlänge etwa 620 nm, optische Wegstrecke der Küvette 10 mm). Jedes Laboratorium sollte deshalb Kalibrierdaten erarbeiten, wobei bekannt ist, dass geeignete Werte der optischen Dichte gewöhnlich zwischen 0,200 und 0,350 liegen. Um reproduzierbare Ergebnisse dieser Messung zu erreichen, kann es erforderlich sein, die Prüfsuspension zu verdünnen, z. B. 1 + 9.

ANMERKUNG Ein Kolorimeter ist eine geeignete Alternative.

- c) Zur Auszählung werden von der Prüfsuspension mit dem Verdünnungsmittel (5.2.2.4) Verdünnungen von 10^{-5} und 10^{-6} (von 10^{-6} und 10^{-7} beim modifizierten Verfahren [5.5.4]) hergestellt. Es wird durchmischt [5.3.2.6 a)].

Von jeder Verdünnung wird eine Probe von 1,0 ml als Doppelbestimmung entnommen und im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren beimpft.

- 1) Bei Anwendung des Gussplattenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe in gesonderte Petrischalen pipettiert und 15 ml bis 20 ml verflüssigter und auf (45 ± 1) °C abgekühlter MEA (5.2.2.3) werden zugegeben.
- 2) Bei Anwendung des Oberflächenverfahrens wird jede 1,0-ml-Probe, in Anteile etwa gleicher Größe aufgeteilt, auf einer geeigneten Anzahl von an der Oberfläche getrockneten MEA-Platten (5.2.2.3) (mindestens zwei) ausgespatelt.

Die zur Auszählung der Prüfsuspension angewendete Verfahrensweise ist bei allen anderen Auszählungen, 5.4.1.5 d), 5.5.2.2 c) und d), 5.5.2.3 b), 5.5.2.4 b) und 5.5.2.5 b), anzuwenden.

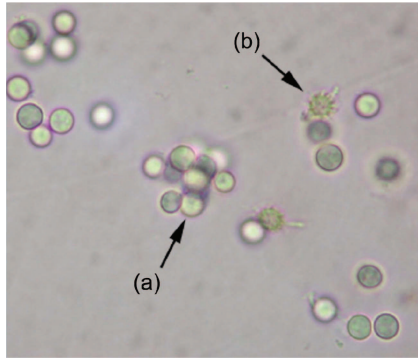
Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.6.

5.4.1.4.2 *Aspergillus brasiliensis*

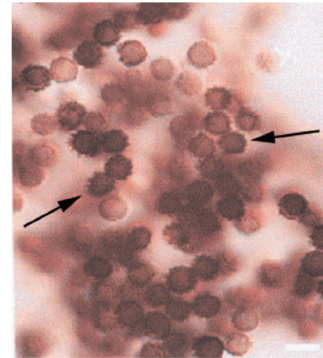
Folgendes Verfahren wird zur Herstellung der *Aspergillus brasiliensis*-Prüfsuspension angewendet:

- a) Unter Verwendung der Gebrauchskultur (5.4.1.3.2) werden die Conidiosporen in 10 ml einer sterilen Polysorbat 80-Lösung (Massenkonzentration 0,05 %) in Wasser (5.2.2.2) suspendiert. Die Conidiosporen werden mit einem Glasstab oder Spatel von der Oberfläche der Kultur abgelöst. Die Suspension wird in einen Kolben überführt und mit 5 g Glasperlen (5.3.2.11) 1 min leicht per Hand geschüttelt. Die Suspension wird durch eine Glasfilterfritte (5.3.2.15) filtriert.
- b) Die mikroskopische Untersuchung bei 400-facher Vergrößerung ist unmittelbar nach der Herstellung durchzuführen, um:
 - 1) das Vorhandensein einer hohen Konzentration von charakteristischen, reifen Conidiosporen, d. h. stacheligen Sporen (im Vergleich zu glatten Sporen) nachzuweisen. Siehe Bild 3 a) und Bild 3 b).

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



a) Foto Nr. 3: Vorhandensein von glatten (a) und stacheligen (b) Sporen [ungeeignete (nicht verwendbare) Suspension]



b) Foto Nr. 4: Hohe Konzentration von charakteristischen, reifen Sporen mit stacheligem Aussehen (geeignete Suspension)

Bild 3 — Foto Nr. 3 und Foto Nr. 4: Beobachtung von Conidiosporen unter dem Lichtmikroskop

Wenn weniger als 75 % stachelige Conidiosporen vorhanden sind, kann dies auf den verwendeten *Aspergillus*-Stamm oder auf das Medium zurückzuführen sein. In dieser Situation wird es notwendig sein, einen anderen Keim, vorzugsweise von einem anderen Lieferanten, und/oder andere Medien zu verwenden;

- 2) das Nichtvorhandensein von Sporenauskeimung (es sind mindestens zehn Zählfelder zu prüfen) nachzuweisen;
- 3) bei Vorhandensein ausgekeimter Conidiosporen, die Suspension zu verwerfen;
- 4) das Nichtvorhandensein von Myzelfragmenten (es sind mindestens zehn Zählfelder zu prüfen) nachzuweisen.

Bei Vorhandensein von Myzelien ist mit einer zweiten gefrittierten Filtration fortzufahren. Sollten noch immer Myzelien vorhanden sein, ist die Suspension zu verwerfen.

- c) Die Anzahl der Conidiosporen in der Suspension wird mit Verdünnungsmittel (5.2.2.4) auf $1,5 \times 10^7$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^7$ KBE/ml ($1,5 \times 10^8$ KBE/ml bis $5,0 \times 10^8$ KBE/ml beim modifizierten Verfahren [5.5.4]) eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mit einem geeigneten Verfahren abgeschätzt wird. Diese Suspension ist innerhalb von 4 h in einem Wasserbad (5.3.2.2), eingestellt auf $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, zu verwenden. In jedem Fall wird die Temperatur erst unmittelbar vor Beginn der Prüfung (5.5.2, 5.5.3 oder 5.5.4) nach 5.5.1.4 eingestellt.

Die Verwendung eines Zellzählgerätes zur Einstellung der Anzahl der Zellen wird dringend empfohlen. Bei Verwendung einer geeigneten Zählkammer sind die Anweisungen detailliert zu befolgen.

Jedes Laboratorium sollte deshalb Kalibrierdaten erarbeiten, um das Verhältnis zwischen den mit dem Zählgerät ermittelten Zahlen und den Zahlen (5.4.1.6) herzustellen, die im Gussplatten- oder Oberflächenverfahren [d)] bestimmt wurden. Erfahrene Laboratorien fanden heraus, dass eine bessere Annäherung an die geforderte Anzahl der Conidiosporen erreicht wird, wenn die in dem Gerät gezählte Anzahl der Zellen in der Conidiosporensuspension um 10 % bis 50 % höher liegt als die angestrebte Anzahl.