

**DIN EN 14347**

ICS 11.080.20; 71.100.35

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –  
Sporizide Wirkung (Basistest) –  
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1);  
Deutsche Fassung EN 14347:2005**

Chemical disinfectants and antiseptics –  
Basic sporicidal activity –  
Test method and requirements (phase 1);  
German version EN 14347:2005

Antiseptiques et désinfectants chimiques –  
Activité sporicide de base –  
Méthode d'essai et prescriptions (phase 1);  
Version allemande EN 14347:2005

Gesamtumfang 40 Seiten

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

## **Nationales Vorwort**

Diese Europäische Norm wurde von der Horizontalen Arbeitsgruppe (HWG) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der HWG des CEN/TC 216 wird über den Arbeitsausschuss D 7 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin und Gemeinschaftsaufgaben“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) wahrgenommen.

**Deutsche Fassung**

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —  
Sporizide Wirkung (Basistest) —  
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 1)**

Chemical disinfectants and antiseptics —  
Basic sporicidal activity —  
Test method and requirements (phase 1)

Antiseptiques et désinfectants chimiques —  
Activité sporicide de base —  
Méthode d'essai et prescriptions (phase 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 8. Dezember 2004 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, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, Schweden, der Schweiz, der Slowakei, Slowenien, Spanien, der Tschechischen Republik, Ungarn, dem Vereinigten Königreich und Zypern.



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

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

## Inhalt

|                                                                                                                                                              | Seite     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Vorwort .....</b>                                                                                                                                         | <b>3</b>  |
| <b>Einleitung.....</b>                                                                                                                                       | <b>3</b>  |
| <b>1 Anwendungsbereich .....</b>                                                                                                                             | <b>4</b>  |
| <b>2 Normative Verweisungen.....</b>                                                                                                                         | <b>4</b>  |
| <b>3 Begriffe .....</b>                                                                                                                                      | <b>4</b>  |
| <b>4 Anforderungen .....</b>                                                                                                                                 | <b>5</b>  |
| <b>5 Prüfverfahren .....</b>                                                                                                                                 | <b>5</b>  |
| 5.1 Prinzip .....                                                                                                                                            | 5         |
| 5.2 Materialien und Reagenzien .....                                                                                                                         | 5         |
| 5.3 Apparate und Glasgeräte .....                                                                                                                            | 8         |
| 5.4 Herstellung der Sporensuspensionen und Produktprüflösungen .....                                                                                         | 9         |
| 5.5 Verfahren zur Bestimmung der sporiziden Wirkung des Produkts.....                                                                                        | 13        |
| 5.6 Untersuchungsdaten und Berechnung .....                                                                                                                  | 16        |
| 5.7 Verifizierung des Verfahrens .....                                                                                                                       | 20        |
| 5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision.....                                                                                                                 | 21        |
| 5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung .....                                                                                                   | 22        |
| 5.10 Prüfbericht.....                                                                                                                                        | 23        |
| <b>Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Kulturensammlungen .....</b>                                                                           | <b>24</b> |
| <b>Anhang B (informativ) Geeignete Neutralisationsmedien.....</b>                                                                                            | <b>25</b> |
| <b>Anhang C (informativ) Graphische Darstellung des Prüfverfahrens .....</b>                                                                                 | <b>27</b> |
| <b>Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts .....</b>                                                                                     | <b>29</b> |
| <b>Anhang E (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation Europäischer Normen<br/>über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika .....</b> | <b>34</b> |
| <b>Anhang F (normativ) Präzision des Untersuchungsergebnisses .....</b>                                                                                      | <b>36</b> |
| <b>Anhang G (normativ) Bestimmung der Sporenzahl — Mittelwert und Standardabweichung.....</b>                                                                | <b>37</b> |
| <b>Literaturhinweise .....</b>                                                                                                                               | <b>38</b> |

## Vorwort

Dieses Dokument (EN 14347:2005) 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 September 2005, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis September 2005 zurückgezogen werden.

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Texte dieses Dokuments Patentrechte berühren können. CEN [und/oder CENELEC] sind nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren.

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

## Einleitung

Dieses Dokument beschreibt ein Suspensionsprüfverfahren zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum auf den im Anwendungsbereich beschriebenen Gebieten eine sporizide Wirkung aufweist oder nicht.

Wenn ein Produkt die Prüfanforderungen erfüllt, kann es als sporizid wirksam angesehen werden. Die Verwendbarkeit eines Produkts als chemisches Desinfektionsmittel oder Antiseptikum für einen bestimmten Zweck kann durch diese Prüfung nicht festgestellt werden. Chemische Desinfektionsmittel oder Antiseptika werden weiteren relevanten Prüfverfahren nach Europäischen Normen unterzogen, um deren Wirksamkeit unter Bedingungen, die der vorgesehenen Anwendung entsprechen, zu bewerten.

Es gibt keinen Hinweis auf eine Virulenz der in dieser Norm verwendeten Stämme.

## 1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren (Phase 1) und die Mindestanforderungen an die sporizide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln oder Antiseptika fest, die bei Verdünnung mit Wasser eine homogene, physikalisch stabile Zubereitung bilden. Die Produkte können nur bei einer Konzentration von 80 % oder weniger geprüft werden, weil durch Zugabe der Prüfkeime immer eine gewisse Verdünnung erfolgt.

Dieses Dokument gilt für Produkte, die in der Landwirtschaft (außer beim Schutz von Erntegut), in der Hauswirtschaft, in der Lebensmittelhygiene und auf anderen industriellen Gebieten sowie in der medizinischen und veterinärmedizinischen Praxis und in öffentlichen Einrichtungen verwendet werden.

ANMERKUNG 1 Diese Europäische Norm kann nicht auf die Prüfung der sporiziden Wirkung eines Produkts gegen Sporen von *Clostridium* sp. angewendet werden.

ANMERKUNG 2 Diese Europäische Norm dient nicht zur Bewertung der Wirksamkeit des Produkts für eine vorgesehene Verwendung. In Europäischen Normen beschriebene spezifischere Prüfverfahren (siehe Einleitung) werden zur weiterführenden Bewertung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für eine festgelegte Anwendungsart angewendet.

ANMERKUNG 3 Dieses Verfahren entspricht einem Prüfverfahren der Phase 1 (siehe Anhang E).

## 2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. 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 Bakterien- und Pilzstämmen für die Prüfung der bakteriziden und fungiziden Wirkung*

EN 14079, *Nichtaktive Medizinprodukte — Prüfverfahren für Verbandmull aus Baumwolle und Verbandmull aus Baumwolle und Viskose, die zur Herstellung von Kompressen und Tamponaden verwendet werden*

## 3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments 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

**3.2**  
**Sporizid**  
Produkt, das ruhende Bakteriensporen bestimmter Prüfkeime unter festgelegten Bedingungen abtötet.

Das Adjektiv dazu ist sporizid.

**3.3**  
**sporizide Wirkung**  
die Fähigkeit eines Produkts, unter festgelegten Bedingungen die Anzahl lebensfähiger Bakteriensporen bestimmter Prüfkeime zu vermindern

**3.4**  
**sporistatische Wirkung**  
die Fähigkeit eines Produkts, unter festgelegten Bedingungen das Auskeimen ruhender Bakteriensporen zu hemmen

## 4 Anforderungen

Bei dem Produkt muss bei Verdünnung mit Wasser (siehe 5.2.2.2) und Prüfung nach Abschnitt 5 unter den obligatorischen Prüfbedingungen (20 °C; 30 min, 60 min oder 120 min) eine Verringerung der Lebendkeimzahl um mindestens 4 dezimallogarithmische (lg) Stufen nachgewiesen werden, wobei das ONT (Original-Neutralisationsröhrchen) ein sichtbares Wachstum zeigen muss. Es ist auch möglich, das Produkt im Lieferzustand zu prüfen (höchste Prüfkonzentration = 80 %).

Die sporizide Wirkung ist unter Anwendung ruhender Sporen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus* zu ermitteln.

Wo es angezeigt ist, ist eine zusätzliche spezifische sporizide Wirkung durch Anwendung anderer Einwirkzeiten, Temperaturen und Prüfkeime nach 5.2.1 und 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 vorbereitete Probe des zu prüfenden Produkts im Lieferzustand und/oder mit Wasser verdünnt wird zu einer Prüfsuspension von Bakteriensporen gegeben. Das Gemisch wird bei  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$  über eine bestimmte aus 30 min  $\pm$  10 s, 60 min  $\pm$  10 s oder 120 min  $\pm$  60 s wählbaren Einwirkzeit gehalten. Am Ende dieser Einwirkzeit wird daraus eine aliquote Menge entnommen und in ein Original-Neutralisationsröhrchen (ONT) überführt. Dieses Röhrchen dient zur Neutralisation der sporiziden und/oder sporistatischen Wirkung in dieser Probenmenge und ist nach der Bebrütung ein Indikator für eine erfolgreiche Neutralisation in der tatsächlichen Prüfung. Die Anzahl der überlebenden Bakteriensporen in jeder Probe wird (durch Auszählung der sporenbildenden Bakterien) bestimmt und die Verringerung der Lebendkeimzahl berechnet.

**5.1.2** Die Prüfung wird unter Verwendung ruhender Sporen von *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus* als Prüfkeime durchgeführt.

**5.1.3** Zusätzliche und optionale Einwirkzeiten, Temperaturen und Prüfkeime sind festgelegt. Es können weitere Prüfkeime verwendet werden.

### 5.2 Materialien und Reagenzien

#### 5.2.1 Prüfkeime

Zur Ermittlung der sporiziden Wirkung sind ruhende Sporen der folgenden Mikroorganismen<sup>1)</sup> zu verwenden:

- *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633;
- *Bacillus cereus* ATCC 12826.

---

1) Die ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die durch die American Type Culture Collections (ATCC) geliefert werden. Diese Information wird zur Unterstützung der Anwender dieser Norm gegeben und stellt keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN dar.

Bei Verwendung zusätzlicher Prüfkeime müssen diese unter optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Kulturmedium) bebrütet werden, die im Prüfbericht anzugeben sind. Wenn die gewählten zusätzlichen Prüfkeime nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss verifiziert werden, dass sie die Anforderungen an ein geeignetes Inokulum erfüllen. Wenn diese Prüfkeime nicht durch ein Referenzzentrum eingestuft sind, müssen ihre Identifizierungsmerkmale angegeben werden. Zusätzlich müssen sie durch das Prüflaboratorium oder eine nationale Kulturensammlung 5 Jahre als Referenzkeime aufbewahrt werden.

ANMERKUNG Zu entsprechenden Stammnummern in anderen Kulturensammlungen siehe Anhang A.

## 5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

### 5.2.2.1 Allgemeines

Alle in diesem Dokument angegebenen Gewichte chemischer Substanzen beziehen sich auf die wasserfreien Salze. Wasserhaltige Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Gewichte müssen angepasst werden, um daraus folgende Differenzen in den Molekulargewichten zu berücksichtigen.

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

ANMERKUNG 1 Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern, wird empfohlen, kommerziell erhältliche wasserfreie Materialien zur Herstellung von Kulturmedien zu verwenden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten genau befolgt werden.

ANMERKUNG 2 Für jedes Kulturmedium und Reagenz sollte eine Gebrauchsbegrenzung festgelegt werden.

### 5.2.2.2 Wasser

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

Sterilisation im Dampfsterilisator (Autoklaven) [siehe 5.3.2.1 a)].

ANMERKUNG 1 Die Sterilisation ist nicht erforderlich, wenn das Wasser (z. B. zur Herstellung von Kulturmedien) verwendet und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG 2 Falls Wasser geeigneter Qualität nicht zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionslösungen (siehe Literaturhinweise [2]) verwendet werden.

### 5.2.2.3 Trypton-Soja-Agar (TSA)

|                                                  |                   |
|--------------------------------------------------|-------------------|
| Trypton, pankreatischer Aufschluss aus Casein    | 15,0 g            |
| Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl | 3,0 g             |
| Natriumchlorid (NaCl)                            | 5,0 g             |
| Agar                                             | 15,0 g            |
| Wasser (siehe 5.2.2.2)                           | bis zu 1 000,0 ml |

Im Autoklaven [siehe 5.3.2.1 a)] sterilisieren. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums  $7,2 \pm 0,2$ , gemessen bei 20 °C, betragen.

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

**5.2.2.4 Blutagar<sup>2)</sup>**

|                                    |                   |
|------------------------------------|-------------------|
| Proteasen-Pepton                   | 15,0 g            |
| Leberaufschluss                    | 2,5 g             |
| Hefeextrakt                        | 5,0 g             |
| Natriumchlorid (NaCl)              | 5,0 g             |
| Agar                               | 12,0 g            |
| Wasser (siehe 5.2.2.2)             | bis zu 1 000,0 ml |
| Defibriniertes steriles Schafsblut | 70 ml bis 100 ml  |

Der Ansatz wird ohne das Schafsblut im Autoklaven [siehe 5.3.2.1 a)] sterilisiert. Nach der Sterilisation wird er auf 45 °C bis 50 °C abkühlen gelassen, das defibrinierte sterile Schafsblut zugegeben und gründlich durchmischt. Der Agar wird in Petrischalen abgefüllt.

**5.2.2.5 Neutralisationsmedium**

Das Neutralisationsmedium muss für das zu prüfende Produkt nach 5.5.2.4 validiert sein. Das Neutralisationsmedium muss steril sein.

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

ANMERKUNG 2 Bei Zugabe zur TSB [siehe 5.2.2.6 b)] muss das Neutralisationsmedium eine homogene, klare, nicht getriebte Zubereitung ergeben.

**5.2.2.6 Trypton-Soja-Bouillon (TSB)****a) Zusammensetzung der Trypton-Soja-Bouillon (TSB)**

|                                                  |                   |
|--------------------------------------------------|-------------------|
| Trypton, pankreatischer Aufschluss aus Casein    | 17,0 g            |
| Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl | 3,0 g             |
| Natriumchlorid (NaCl)                            | 5,0 g             |
| Dikaliumhydrogenphosphat ( $K_2HPO_4$ )          | 2,5 g             |
| Wasser (siehe 5.2.2.2)                           | bis zu 1 000,0 ml |

Im Autoklaven [siehe 5.3.2.1 a)] sterilisieren. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums  $7,3 \pm 0,2$ , gemessen bei 20 °C, betragen.

**b) Trypton-Soja-Bouillon (TSB) mit Neutralisationsmedium**

TSB siehe 5.2.2.6 a). Ein geeignetes Neutralisationsmedium (siehe 5.2.2.5) ist je nach seinen chemischen Eigenschaften vor oder nach dem Autoklavieren zuzusetzen. TSB mit Neutralisationsmedium sollte in Mengen von sowohl 9 ml als auch 10 ml in Glasröhrchen abgefüllt werden.

---

2) OXOID-Blutagargrundsubstanz ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt.

#### 5.2.2.7 Sporulationsagar (Mangansulfat-Agar)

|                                  |                   |
|----------------------------------|-------------------|
| Pepton USP                       | 10,0 g            |
| Hefeextrakt                      | 2,0 g             |
| Mangansulfat ( $\text{MnSO}_4$ ) | 0,04 g            |
| Agar                             | 15,0 g            |
| Wasser (siehe 5.2.2.2)           | bis zu 1 000,0 ml |

Im Autoklaven [siehe 5.3.2.1 a)] bei  $(121 \pm 1)^\circ\text{C}$  für 20 min sterilisieren. Je 150 ml werden in 1 000-ml-Roux-flaschen (siehe 5.3.2.14) abgefüllt.

### 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 Autoklaven [siehe 5.3.2.1 a)];
- durch trockene Hitze im Heißluft-Sterilisator [siehe 5.3.2.1 b)].

#### 5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung und besonders folgende Geräte<sup>3)</sup>:

##### 5.3.2.1 Sterilisatoren:

- zur Sterilisation durch feuchte Hitze 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 Heißluft-Sterilisator, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min auf  $(180^{+5}_0)^\circ\text{C}$ , für eine Mindesthaltezeit von 1 h auf  $(170^{+5}_0)^\circ\text{C}$  oder für eine Mindesthaltezeit von 2 h auf  $(160^{+5}_0)^\circ\text{C}$  einstellbar ist.

**5.3.2.2 Wasserbäder**, einstellbar auf Betriebstemperaturen von  $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$  (zur Aufbewahrung von verflüssigtem TSA beim Gussplattenverfahren) sowie auf zusätzliche Prüftemperaturen  $\pm 1^\circ\text{C}$  (siehe 5.5.1.1).

**5.3.2.3 Brutschrank**, einstellbar auf eine Betriebstemperatur von  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  oder  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  und  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

Für alle Bebrütungen während einer Prüfung sowie ihrer Kontrollen und Validierung muss die gleiche Temperatur verwendet werden.

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

Für die pH-Messung der Agarmedien (siehe 5.2.2.3, 5.2.2.4 und 5.2.2.7) muss eine Einstichelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

---

3) Sterile Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

**5.3.2.5 Stoppuhr.****5.3.2.6 Schnellschüttelgerät**, elektromechanisch, z. B. Vortex®-Mischer<sup>4</sup>).**5.3.2.7 Behälter**: Reagenzgläser, Flaschen oder Kolben mit geeignetem Volumen.**5.3.2.8 Graduierte Pipetten** mit einem Nennvolumen von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml.

Kalibrierte automatische Pipetten dürfen verwendet werden.

**5.3.2.9 Petrischalen (Platten)** mit einem Durchmesser von 90 mm bis 100 mm.**5.3.2.10 Glasperlen** (Durchmesser: 3 mm bis 4 mm).**5.3.2.11 Messkolben.****5.3.2.12 Mechanisches Orbital-Schüttelgerät.****5.3.2.13 Zentrifuge** mit 3 000 g und einstellbar auf 10 °C bis 15 °C.**5.3.2.14 Röhrchen mit Schraubverschluss** geeigneten Volumens.**5.3.2.15 1000-ml-Roux-Glasflaschen mit geradem Hals.****5.3.2.16 Mikroskop**, vorzugsweise Phasenkontrastmikroskop, mit mindestens 400facher Vergrößerung.**5.3.2.17 Gaze** (EN 14079).**5.3.2.18 Glastrichter** (Durchmesser: 20 cm bis 30 cm).**5.3.2.19 Kühltisch**, einstellbar auf 2 °C bis 8 °C.**5.4 Herstellung der Sporensuspensionen und Produktprüflösungen****5.4.1 Suspensionen der Prüfkeime (zur Prüfung und Validierung)**

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

**5.4.1.1 Stammkultur der Prüfkeime**

Prüfkeime sind nach den Anforderungen von EN 12353 aufzubewahren.

ANMERKUNG Eine gefriergetrocknete Probe der Prüfkeime wird von einer Kulturensammlung bezogen.

Diese Probe wird in Kultur gebracht, zur Aufbewahrung vorbereitet, in Lagerungsgefäße abgefüllt und nach EN 12353 in den Tiefkühlschrank eingebracht. Aus den tiefgefrorenen Proben wird eine Stammkultur hergestellt und in der Folge verwendet, um Gebrauchskulturen für das Prüfverfahren herzustellen.

Eine tiefgefrorene Probe wird bei Raumtemperatur aufgetaut. Mit dieser Suspension wird eine Blutagarplatte (siehe 5.2.2.4) beimpft und bebrütet (siehe 5.3.2.3). Diese Kultur wird als Stammkultur verwendet und durch visuelle Kontrolle auf Reinheit überprüft. Aus der Stammkultur kann die Sporensuspension (siehe 5.4.1.2) hergestellt werden.

---

4) 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 Gebrauchskultur der Prüfkeime (Sporenbildung) — bakterizide Sporensuspension

50 ml TSB [siehe 5.2.2.6 a)] werden in einem 100-ml-Kulturkolben mit einer einzigen Kolonie der Stammkultur (siehe 5.4.1.1) beimpft und 24 h auf einem mechanischen Orbital-Schüttelgerät (siehe 5.3.2.12) bei  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  (oder  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ) bebrütet.

10 ml dieser Vorkultur werden in 1 000-ml-Rouxflaschen mit geradem Hals (siehe 5.3.2.15) überführt, die 150 ml Sporenbildungsagar (siehe 5.2.2.7) enthalten. Die flüssige Kultur wird auf der Agaroberfläche mittels steriler Glasperlen von 3 mm bis 4 mm Durchmesser verteilt. Die Rouxflaschen werden 2 Tage bei  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$  (oder  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ ) und anschließend 21 Tage bei  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  bebrütet. Während der Bebrütung wird die Flasche mit einem sterilen Stopfen (Zellulosegewebe) verschlossen.

Zum Abernten der Sporen werden 10 ml Wasser (siehe 5.2.2.2) in die Roux-Flasche pipettiert und die Sporen werden mit Hilfe der Glasperlen, die in der Flasche belassen wurden, abgelöst und wieder in Suspension gebracht. Die Suspension wird von den Glasperlen abgesaugt und in einen 100-ml-Kulturkolben überführt. Weitere 10 ml Wasser (siehe 5.2.2.2) werden in die Rouxflasche pipettiert und die Sporen werden noch einmal mit Hilfe der Glasperlen abgewaschen und wieder in Suspension gebracht. Die Suspension wird von den Glasperlen abgesaugt und in den 100-ml-Kulturkolben überführt.

Die gesammelte Suspension wird durch Filtration durch zwei Schichten steriler Gaze (siehe 5.3.2.17) in einem sterilen Trichter (siehe 5.3.2.18) gereinigt. Das Filtrat wird in Schraubverschlussröhrchen (siehe 5.3.2.14) abgefüllt und in einer Zentrifuge (siehe 5.3.2.13) bei  $10^\circ\text{C}$  bis  $15^\circ\text{C}$  für 30 min bei 3 000 g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird entfernt und das Sediment in 65%igem 2-Propanol resuspendiert (Höchstfüllung ist 50 % des Gebrauchsvolumens des Röhrchens!). Zur Inaktivierung der verbliebenen vegetativen Zellen bleibt der Ansatz bei  $20^\circ\text{C}$  3 h stehen.

Das 2-Propanol wird durch Zugabe der gleichen Menge Wasser (siehe 5.2.2.2) verdünnt und in einer Zentrifuge (siehe 5.3.2.13) bei  $10^\circ\text{C}$  bis  $15^\circ\text{C}$  für 30 min bei 3 000 g zentrifugiert. Die Flüssigkeit wird entfernt und das Sediment in Wasser (siehe 5.2.2.2) suspendiert. Die Zentrifugations- und Waschschriffe werden 5-mal wiederholt.

Zur Reinheitskontrolle werden Ausstriche der Suspension (pro 100 ml 10 Ausstriche) auf Objektträgern mit einer Sporenfärbung angefärbt und unter dem Mikroskop (siehe 5.3.2.16) untersucht. Die Menge der verbliebenen vegetativen Zellen sollte je Gesichtsfeld 20 % nicht überschreiten, sonst muss die Suspension erneut wie oben beschrieben filtriert und gewaschen oder verworfen werden.

Die Sporensuspension wird mit Wasser (siehe 5.2.2.2) auf  $> 10^9$  KBE/ml eingestellt, wobei die Anzahl der KBE mit einer geeigneten Methode abgeschätzt wird. Die Sporensuspension wird vor der Verwendung 4 Wochen im Kühlschrank bei  $2^\circ\text{C}$  bis  $8^\circ\text{C}$  gelagert.

Zum Auszählen werden mit Wasser (siehe 5.2.2.2) Verdünnungen von  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  hergestellt und es wird durchmischt (siehe 5.3.2.6).

Von jeder Verdünnung wird eine 1,0-ml-Probe als Doppelbestimmung entnommen und jede 1,0-ml-Probe wird auf einer geeigneten Anzahl an der Oberfläche getrockneter Blutagarplatten (siehe 5.2.2.4) ausgestrichen.

Kontaminierende Keime können durch dieses Verfahren leicht entdeckt werden.

Zur Bebrütung und Auszählung siehe 5.4.1.5.

Von einer zentralen Handelseinrichtung oder einem Institut gelieferte Sporensuspensionen können ebenfalls verwendet werden, wenn sie nach dem angegebenen Verfahren hergestellt wurden. In diesem Fall sind die Sporenzählung der Stammsuspension und die Resistenzbestimmung der Sporen gegen Referenzsubstanzen (siehe 5.5.2.2) innerhalb einer Woche nach Eingang durchzuführen und zu dokumentieren.

Bakteriensporen sind in Wasser (siehe 5.2.2.2) bei  $2^\circ\text{C}$  bis  $8^\circ\text{C}$  zu lagern. Sporensuspensionen müssen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber einem Glutaraldehyd-Standard und einem Peressigsäure-Standard (siehe 5.5.2.2) kontrolliert werden, bevor eine Prüfreihe mit einem Desinfektionsmittel begonnen wird und falls dieses ständig mindestens einmal monatlich verwendet wird. Gelagerte Sporensuspensionen sollten zwischen ihren Verwendungen nicht geöffnet werden.