

DIN EN 14348

ICS 11.080.20

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der
mykobakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im
humanmedizinischen Bereich einschließlich der
Instrumentendesinfektionsmittel –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 14348:2005**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of mycobactericidal activity of chemical
disinfectants in the medical area including instrument disinfectants –
Test methods and requirements (phase 2, step 1);
German version EN 14348:2005

Désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité mycobactéricide des
désinfectants chimiques utilisés en médecine y compris les désinfectants pour instruments –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 1);
Version allemande EN 14348:2005

Gesamtumfang 38 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

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 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin und Gemeinschaftsaufgaben“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) wahrgenommen.

Deutsche Fassung

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der
mykobakteriziden Wirkung chemischer Desinfektionsmittel im
humanmedizinischen Bereich einschließlich der
Instrumentendesinfektionsmittel
Prüfverfahren und Anforderungen
(Phase 2, Stufe 1)**

Chemical disinfectants and antiseptics —
Quantitative suspension test for the evaluation of
mycobactericidal activity of chemical disinfectants in the
medical area including instrument disinfectants —
Test methods and requirements
(phase 2, step 1)

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

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 22. November 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
Vorwort	3
Einleitung	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	7
5.1 Prinzip	7
5.2 Materialien und Reagenzien.....	7
5.3 Apparate und Glasgeräte	10
5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüfkeime und der Produktprüflösungen.....	11
5.5 Verfahren zur Beurteilung der mykobakteriziden Wirkung des Produkts	14
5.6 Untersuchungsdaten und Berechnung	17
5.7 Verifizierung des Verfahrens	23
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	23
5.9 Interpretation der Ergebnisse - Schlussfolgerung	24
5.10 Prüfbericht	25
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Kulturensammlungen	26
Anhang B (informativ) Geeignete Neutralisationsmedien	27
Anhang C (informativ) Grafische Darstellungen des Prüfverfahrens	29
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts	31
Anhang E (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation Europäischer Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika	33
Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen diesem Dokument und den grundlegenden Anforderungen der EU-Richtlinie 93/42/EWG über Medizinprodukte	35
Literaturhinweise	36

Vorwort

Dieses Dokument (EN 14348:2005) 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 Juli 2005, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juli 2005 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.

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

Es wurde ein Ringversuch durchgeführt, der noch ausgewertet wird, um für dieses Dokument einen Anhang über die Präzision zu erarbeiten.

Weitere Verfahren zur Bewertung der Wirksamkeit chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika für verschiedene Anwendungsgebiete im medizinischen Bereich befinden sich in Vorbereitung.

Entsprechend der CEN/CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm anzukündigen: 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 eine Suspensionsprüfung zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel auf dem im Anwendungsbereich festgelegten Gebiet eine mykobakterizide Wirkung aufweist oder nicht.

Diese Laboratoriumsprüfung berücksichtigt verschiedene praktische Anwendungsbedingungen des Produktes zu diesen gewählten Bedingungen gehören die Einwirkzeit, die Temperatur, die Prüfkeime und die Belastungssubstanzen, d. h. Bedingungen, die die Wirksamkeit dieses Produktes in praktischen Situationen beeinflussen können.

Die Bedingungen sind dafür vorgesehen, allgemeine Aufgabenstellungen zu erfassen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten zu ermöglichen. Jede in dieser Prüfung gefundene Konzentration des chemischen Desinfektionsmittels entspricht den gewählten Versuchsbedingungen. Bei einigen Anwendungsarten können jedoch die Gebrauchsanweisungen für ein Produkt unterschiedlich sein und deshalb müssen zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die mykobakterizide (oder tuberkulozide) Wirkung chemischer Desinfektionsmittel fest, die bei Verdünnung in Wasser standardisierter Härte als homogenes, physikalisch stabiles Präparat vorliegen (oder bei gebrauchsfertigen Produkten bei Verdünnung in Wasser). Die Produkte können nur bei einer Konzentration von 80 % oder weniger geprüft werden, weil durch Zugabe der Prüfkeime und Belastungssubstanzen immer eine gewisse Verdünnung erfolgt.

Dieses Dokument gilt für im humanmedizinischen Bereich verwendete Produkte einschließlich derer, die in der Richtlinie 93/42/EWG über Medizinprodukte behandelt werden.

Dieses Dokument gilt für Bereiche und Bedingungen, wo eine Desinfektion aus medizinischen Gründen indiziert ist. Solche Indikationen ergeben sich bei der Versorgung von Patienten, beispielsweise

- in Krankenhäusern, kommunalen medizinischen Einrichtungen und zahnärztlichen Einrichtungen,
- in medizinischen Bereichen in Schulen, Kindergärten und Pflegeeinrichtungen,

und können auch am Arbeitsplatz oder im häuslichen Bereich vorliegen. Es kann sich auch um Einrichtungen handeln wie Wäschereien und Küchen, die direkt Produkte für die Patienten liefern.

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

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

2 Normative Verweisungen

Die folgenden 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 genommene Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

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

EN 14820, *Gefäße zur einmaligen Verwendung für die venöse Blutentnahme beim Menschen*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Produkt

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

3.2

Mykobakterizid

Produkt, das Mykobakterien unter festgelegten Bedingungen abtötet

ANMERKUNG Das Adjektiv dazu ist mykobakterizid.

3.3

mykobakterizide Wirkung

die Fähigkeit eines Produkts, die Anzahl der lebensfähigen Mykobakterien-Zellen bestimmter Prüfkeime unter festgelegten Bedingungen zu verringern

3.4

mykobakteristatische Wirkung

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

3.5

Tuberkulozid

Produkt, das *Mycobacterium tuberculosis* unter festgelegten Bedingungen abtötet

ANMERKUNG Das Adjektiv dazu ist tuberkulozid.

3.6

tuberkulozide Wirkung

die Fähigkeit eines Produkts zur Abtötung von *Mycobacterium tuberculosis*, nachgewiesen durch die Fähigkeit, die Anzahl der lebensfähigen Zellen von *Mycobacterium terrae* unter festgelegten Bedingungen zu verringern

3.7

Bedingungen niedriger Belastung

Belastung, die der Belastung von Oberflächen entspricht, die einem ausreichenden Reinigungsprogramm unterzogen worden sind und/oder bei denen bekannt ist, dass sie nur einen minimalen Grad der Verunreinigung mit organischen und/oder anorganischen Substanzen aufweisen

3.8

Bedingungen hoher Belastung

Belastung, die der Belastung von Oberflächen entspricht, bei denen bekannt ist oder die Möglichkeit besteht, dass sie mit organischen und/oder anorganischen Substanzen verunreinigt sind

4 Anforderungen

Bei dem mit Wasser standardisierter Härte verdünnten (oder bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser) Produkt muss bei Prüfung nach Abschnitt 5 unter simulierter niedriger Belastung (0,3 g/l Rinderserumalbumin) oder hoher Belastung (3 g/l Rinderserumalbumin und 3 ml/l Schaf-Erythrozyten) entsprechend den praktischen Anwendungsbereichen unter den obligatorischen Prüfbedingungen (ein oder zwei ausgewählte Prüfkeime, 20 °C, 60 min) eine dezimal-logarithmische Verminderung der Lebendkeimzahl um mindestens 4 Stufen nachgewiesen werden. Es ist auch möglich, das Produkt im Lieferzustand zu prüfen (die höchste Prüfkonzentration beträgt 80 %).

Zur Ermittlung der mykobakteriziden Wirkung sind die beiden folgenden Prüfkeime zu verwenden:

Mycobacterium avium und *Mycobacterium terrae*.

Zur Ermittlung der tuberkuloziden Wirkung ist folgender Prüfkeim zu verwenden:

Mycobacterium terrae.

Wo es angezeigt ist, ist eine zusätzliche spezifische mykobakterizide oder tuberkulozide Wirkung durch 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 Zu einer vorbereiteten Probe des im Lieferzustand befindlichen und/oder mit Wasser standardisierter Härte (oder bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser) verdünnten zu prüfenden Produkts wird eine Prüfsuspension von Mykobakterien in eine Lösung von Belastungssubstanzen gegeben. Das Gemisch wird 60 min $\pm$ 10 s bei (20 ± 1) °C gehalten (obligatorische Prüfbedingungen). Am Ende dieser Einwirkzeit wird eine Teilmenge entnommen; die mykobakterizide und/oder mykobakteriostatische Wirkung in dieser Probenmenge wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt.

Die Anzahl der überlebenden Mykobakterien in jeder Probe wird bestimmt und die Verringerung der Lebendkeimzahlen berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird unter Verwendung von *Mycobacterium avium* und *Mycobacterium terrae* oder nur von *Mycobacterium terrae* als Prüfkeim durchgeführt.

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

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfkeime

Die mykobakterizide Wirkung ist unter Verwendung der beiden folgenden Prüfkeime¹⁾ zu bewerten:

— *Mycobacterium avium* ATCC 15769

— *Mycobacterium terrae* ATCC 15755

Die tuberkulozide Wirkung ist unter Verwendung von lediglich *Mycobacterium terrae* zu bewerten.

ANMERKUNG Zu entsprechenden Verweisungen auf Stämme in einigen anderen Kultursammlungen siehe Anhang A.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle Gewichtsangaben für chemische Substanzen, die in dieser Norm angegeben werden, beziehen sich auf wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen können alternativ genutzt werden, allerdings müssen dann die vorgeschriebenen Gewichte entsprechend angepasst werden, für die Einhaltung der molekularen Gewichtsverhältnisse.

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 Reagens sollte eine Verbrauchsbegrenzung festgelegt werden.

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

5.2.2.2 Wasser

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

Sterilisation im Autoklaven (5.3.1).

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

ANMERKUNG 2 Falls destilliertes Wasser geeigneter Qualität nicht zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionslösungen (siehe Literaturhinweise [1]) verwendet werden.

5.2.2.3 Middlebrook-Cohn-Medium 7H10 mit 10 % Anreicherungsmittel OADC (MCO)

Middlebrook-Agarpulver 7H10	19,0 g
Glycerol ($C_3H_8O_3$) (siehe [1])	5,0 ml
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 900,0 ml

Zur vollständigen Auflösung wird zum Sieden erhitzt. Nach Sterilisation im Autoklaven (siehe 5.3.1) erfolgt Abkühlen auf 50 °C bis 55 °C. Unter aseptischen Bedingungen werden 100 ml Middlebrook-OADC-Anreicherungsmittel zugegeben. Je Platte (siehe 5.3.2.10) werden 18 ml bis 20 ml abgefüllt. Der pH-Wert des Mediums muss $6,6 \pm 0,2$, gemessen (siehe 5.3.2.4) bei 25 °C, betragen.

ANMERKUNG Unter besonderen Bedingungen (Probleme mit der Neutralisation, siehe 5.5.1.2 und 5.5.1.3) kann es erforderlich sein, dem MCO-Medium Neutralisationsmedium (siehe Anhang B.2) zuzusetzen. Es ist kein Neutralisationsmedium zu verwenden, das im Agar eine Opaleszenz hervorruft.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung:

Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Trypton)	1,0 g
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.

ANMERKUNG Es gibt wissenschaftliche Erfahrungen, dass Natriumchlorid (NaCl) das Wachstum von Mykobakterien hemmen kann. Das Vorhandensein von NaCl in Produkten und in der Belastungssubstanz (siehe 5.2.2.8) ist jedoch unvermeidbar und deshalb könnte zur Herstellung des Neutralisationsmediums (siehe 5.5.1.2) Verdünnungsmittel verwendet werden.

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

5.2.2.6 Middlebrook-Bouillon 7H9 mit 10 % Anreicherungsmittel ADC (MADC-Bouillon)

MADC-Bouillon wird für die Aufbewahrung im tiefgefrorenen Zustand verwendet.

Middlebrook-Bouillonpulver 7H9	4,7 g
--------------------------------	-------

Glycerol ($C_3H_8O_3$) (siehe [1])	100,0 ml
Wasser (siehe 5.2.2.2)	750,0 ml

Nach Sterilisation im Autoklaven (siehe 5.3.1) erfolgt Abkühlen auf 45 °C. Unter aseptischen Bedingungen werden 100 ml Middlebrook-ADC-Anreicherungsmittel und sterilisiertes Wasser (siehe 5.2.2.2) auf 1 000 ml zugegeben. Der pH-Wert des Mediums muss $6,6 \pm 0,2$, gemessen (siehe 5.3.2.4) bei 25 °C, betragen.

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 Natriumbikarbonat ($NaHCO_3$) 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 Liter werden in einen 1 000-ml-Messkolben (siehe 5.3.2.12) 600 ml bis 700 ml Wasser (siehe 5.2.2.2) gegeben, dazugegeben 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 mit 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) Chlorwasserstoffsäure (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/l bezogen auf Calciumkarbonat ($CaCO_3$).

5.2.2.8 Belastungssubstanzen

5.2.2.8.1 Allgemeines

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

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in der 10fachen in der Prüfung verwendeten Endkonzentration hergestellt werden.

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

ANMERKUNG Im Folgenden wird der Begriff „Belastungssubstanz“ verwendet, auch wenn diese 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), bei Aufbewahrung im Kühlschrank (bei 2 °C bis 8 °C) ist die Substanz 1 Monat haltbar.

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 3,00 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 frisch defibriniertes Schafsblut (siehe 5.2.2.9) hergestellt oder solches Blut wird von einem kommerziellen Lieferanten (siehe 5.2.2.9) bezogen. Die Erythrozyten werden bei 800 g 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 Schafserythrozyten werden in den 97 ml 3%iger sterilisierter Rinderserumalbuminlösung (siehe oben) resuspendiert. Um spätere Kontaminationen zu verhindern, sollte dieses Gemisch in Portionen aufgeteilt werden, die wahrscheinlich an einem Tag verbraucht werden, und darf in gesonderten Behältern im Kühlschrank bei 2 °C bis 8 °C höchstens 7 Tage gelagert werden.

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

5.2.2.9 Steriles defibriniertes Schafsblut

Das sterile defibrinierte Schafsblut kann handelsüblich bezogen oder nach EN 14820 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:

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

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²⁾ und besonders folgende Geräte:

5.3.2.1 Sterilisatoren

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf Betriebstemperaturen von (20 ± 1) °C, 50 °C bis 55 °C (zur Herstellung des MCO, siehe 5.2.2.3) und zusätzliche Prüftemperaturen ± 1 °C (siehe 5.5.1).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf eine Betriebstemperatur von (36 ± 1) °C oder (37 ± 1) °C.

ANMERKUNG 1 Für alle Bebrütungen während einer Prüfung sowie ihrer Kontrollen und Validierung sollte die gleiche Temperatur verwendet werden.

2) Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.