

DIN EN 14562

ICS 11.080.20

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der fungiziden oder
levuroziden Wirkung für Instrumente im humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2);
Deutsche Fassung EN 14562:2006**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative carrier test for the evaluation of fungicidal or yeasticidal activity for
instruments used in the medical area –
Test method and requirements (phase 2, step 2);
German version EN 14562:2006

Désinfectants et antiseptiques chimiques –
Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de l'activité fongicide ou levuricide pour
instruments utilisés en médecine humaine –
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2);
Version allemande EN 14562:2006

Gesamtumfang 43 Seiten

Normenausschuss Medizin (NAMed) im DIN

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 14562:2006) wurde von der Arbeitsgruppe 1 „Humanmedizin“ (Sekretariat: DIN, Deutschland) des Technischen Komitees CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ (Sekretariat: AFNOR, Frankreich) unter Beteiligung deutscher Experten ausgearbeitet.

Die Mitarbeit des DIN in der Arbeitsgruppe 1 des CEN/TC 216 wird über den Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin und Gemeinschaftsaufgaben“ des Normenausschusses Medizin (NAMed) wahrgenommen.

Deutsche Fassung

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika —
Quantitativer Keimträgerversuch zur Prüfung der fungiziden oder
levuroziden Wirkung für Instrumente im humanmedizinischen
Bereich —
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 2)**

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

Désinfectants et antiseptiques chimiques —
Essai quantitatif de porte germe pour l'évaluation de
l'activité fongicide ou levuricide pour instruments utilisés en
médecine humaine —
Méthode d'essai et prescriptions (phase 2, étape 2)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 29. August 2005 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, Rumänien, 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	6
5.1 Kurzbeschreibung	6
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 fungiziden/levuroziden Wirksamkeit des Produkts	15
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	19
5.7 Verifizierung des Verfahrens	25
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision.....	25
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	26
5.10 Prüfbericht.....	27
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Kulturensammlungen	29
Anhang B (informativ) Geeignete Neutralisationsmedien.....	30
Anhang C (informativ) Graphische Darstellungen des Prüfverfahrens.....	32
Anhang D (informativ) Beispiel eines typischen Prüfberichts	34
Anhang E (informativ) Informationen zur Anwendung und Interpretation Europäischer Normen über chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika.....	38
Anhang ZA (informativ) Zusammenhang zwischen dieser Europäischen Norm und den grundlegenden Anforderungen der EG-Richtlinie 93/42/EWG über Medizinprodukte	40
Literaturhinweise	41

Vorwort

Dieses Dokument (EN 14562:2006) 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 November 2006, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis November 2006 zurückgezogen werden.

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

Es wird ein Ringversuch durchgeführt werden, um für diese Norm einen Anhang zur Präzision zu erarbeiten.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben, und unterstützt grundlegende Anforderungen der EG-Richtlinien.

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

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, Rumänien, Schweden, Schweiz, Slowakei, Slowenien, Spanien, Tschechische Republik, Ungarn, Vereinigtes Königreich und Zypern.

Einleitung

Diese Europäische Norm beschreibt einen Keimträgerversuch zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel zur Behandlung von Instrumenten (chirurgischen Instrumenten, Anästhesiematerial, Endoskopen usw.) im Rahmen der im Anwendungsbereich beschriebenen Anwendungsgebiete eine fungizide oder levurozide Wirkung aufweist oder nicht.

Der Laboratoriumsversuch bildet praktische Anwendungsbedingungen nahe nach, einschließlich des vorherigen Antrocknens von Pilzen auf einem Träger, der Einwirkzeit, Temperatur, Prüfkeime und Belastungssubstanzen, d. h. Bedingungen, die die Wirkung chemischer Desinfektionsmittel in Praxissituationen beeinflussen können.

Die obligatorischen Versuchsbedingungen sollen allgemeinen Ansprüchen genügen und einen Vergleich zwischen Laboratorien und Produktarten ermöglichen. Jede in dieser Prüfung gefundene Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels entspricht festgelegten Versuchsbedingungen. Bei einigen Anwendungsarten können jedoch die Empfehlungen und/oder Gebrauchsanweisungen für ein Produkt unterschiedlich sein, und deshalb müssen zusätzliche Prüfbedingungen angewendet werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Europäische Norm legt ein Prüfverfahren und die Mindestanforderungen an die fungizide oder levurozide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln fest, die in Wasser standardisierter Härte als homogenes physikalisch stabiles Präparat vorliegen bzw. bei gebrauchsfertigen Produkten in Wasser.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die zur Instrumentendesinfektion im humanmedizinischen Bereich durch Untertauchen verwendet werden, selbst wenn diese nicht durch die Richtlinie 93/42/EWG über Medizinprodukte erfasst sind.

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

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

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

ANMERKUNG Das Verfahren entspricht einer Prüfung der Phase 2, Stufe 2 (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 Prüfkeimen für die Prüfung der bakteriziden, mykobakteriziden, sporiziden und fungiziden Wirkung*

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

Fungizid

Produkt, das Pilze (Schimmelpilze und Hefen) und deren Sporen unter festgelegten Bedingungen abtötet

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

3.3

fungizide Wirkung

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

3.4

Levurozid

Produkt, das Hefen unter festgelegten Bedingungen abtötet

ANMERKUNG Das von „Levurozid“ abgeleitete Adjektiv ist „levurozid“.

3.5

levurozide Wirkung

Fähigkeit eines Produkts, die Anzahl der lebensfähigen Hefezellen einschlägiger Prüfkeime unter festgelegten Bedingungen zu verringern

3.6

Bedingungen niedriger Belastung

Belastung, die der Belastung von Oberflächen entspricht, die einem ausreichenden Reinigungsprogramm unterzogen wurden und/oder bekannterweise mit einem minimalen Ausmaß organischer und/oder anorganischer Substanzen verschmutzt sind

3.7

Bedingungen hoher Belastung

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

4 Anforderungen

Bei dem mit Wasser standardisierter Härte oder – bei gebrauchsfertigen Produkten – mit Wasser (5.2.2.2) verdünnten nach Abschnitt 5 geprüften Produkt muss mindestens eine dezimal-logarithmische (lg) Reduktion der Lebendkeimzahl um 4 Stufen nachgewiesen werden; die Prüfung erfolgt unter simulierten Bedingungen niedriger Belastung (Lösung von 0,3 g/l Rinderalbuminlösung) oder hoher Belastung (Lösung von 3 g/l Rinderalbumin plus 3 ml/l gewaschene Schaf-Erythrozyten) entsprechend seinen praktischen Anwendungsbedingungen und unter den obligatorischen Prüfbedingungen (zwei gewählte Prüfkeime, 20 °C, 60 min).

Die fungizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden zwei Prüfkeime zu bewerten: *Candida albicans* (vegetative Zellen) und *Aspergillus niger* (Sporen).

Die levurozide Wirkung ist unter Verwendung des folgenden Prüfkeims zu bewerten: *Candida albicans* (vegetative Zellen).

Wo es angezeigt ist, muss die spezifische fungizide oder levurozide Wirkung zusätzlich unter Anwendung anderer Einwirkzeiten, Temperaturen und Belastungssubstanzen (5.5.1.1) bestimmt werden, um besondere vorgesehene Anwendungsbedingungen zu berücksichtigen.

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

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Eine Prüfsuspension von Pilzen (Hefezellen oder Schimmelpilzsporen) in einer Lösung von Belastungssubstanzen wird auf einem Glasträger ausgestrichen. Nach dem Trocknen wird der Träger in einer Probe des Produkts im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (oder bei gebrauchsfertigen Produkten mit Wasser) verdünnten Produkts untergetaucht. Der Träger wird für $60 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gehalten (obligatorische Prüfbedingungen). Am Ende dieser Einwirkzeit wird der Träger in ein Glasperlen enthaltendes Neutralisationsmedium überführt. Die Hefezellen oder Schimmelpilzsporen sind durch Schütteln von der Oberfläche abzulösen. Die Anzahl überlebender Hefezellen oder Schimmelpilzsporen in jeder Probe wird bestimmt und die Reduktion der Lebendkeimzahl berechnet.

5.1.2 Die Prüfung wird unter Verwendung von *Candida albicans* und *Aspergillus niger* oder nur *Candida albicans* als Prüfkeime (obligatorische Prüfbedingungen) durchgeführt.

5.1.3 Zusätzliche und wahlfreie Einwirkzeiten und Temperaturen sind festgelegt. Zusätzliche Belastungs-substanzen können verwendet werden.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüfkeime

Die fungizide Wirkung ist unter Verwendung der folgenden zwei Stämme¹⁾ zu ermitteln:

- *Candida albicans* ATTC 10231;
- *Aspergillus niger* ATTC 16404.

Die levurozide Wirkung ist nur unter Verwendung von *Candida albicans* ATCC 10231 zu bewerten.

ANMERKUNG Zu Verweisen auf Stämme in einigen anderen Kulturensammlungen siehe Anhang A.

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

Wenn zusätzliche Prüfkeime verwendet werden, müssen sie unter den im Prüfbericht anzugebenden optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Kulturmedien) bebrütet werden. Falls die gewählten zusätzlichen Prüfkeime nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss ihre Eignung zur Lieferung der erforderlichen Impfansätze verifiziert werden. Falls diese zusätzlichen Prüfkeime nicht in einem Referenzzentrum klassifiziert sind, müssen ihre Identifizierungsmerkmale angegeben werden. Zusätzlich müssen sie durch das Prüflaboratorium oder die nationale Kulturensammlung für fünf Jahre als Referenzmaterial aufbewahrt werden.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in dieser Europäischen Norm 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 Zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit wird empfohlen, dass zur Herstellung von Kulturmedien im Handel erhältliche wasserfreie Materialien verwendet werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten strengstens 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 darf nicht entmineralisiertes Wasser sein.

Sterilisation im Autoklaven (5.3.1).

ANMERKUNG 1 Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

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

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

ANMERKUNG 3 Für die Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.7

5.2.2.3 Malzextraktagar (MEA)

Malzextrakt	30,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss aus Sojabohnenmehl	3,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Sterilisation im Autoklaven (5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $5,6 \pm 0,2$ betragen (5.3.2.4).

ANMERKUNG Unter besonderen Umständen (Probleme mit der Neutralisation, siehe 5.5.1.2 und 5.5.1.3) kann es erforderlich sein, dem MEA Neutralisationsmedium (B.3) zuzusetzen. Es wird empfohlen, kein Neutralisationsmedium zu verwenden, das eine Opaleszenz des Agars hervorruft.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung:

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

Sterilisation im Autoklaven (5.3.1). Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Verdünnungsmittels, gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

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

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

5.2.2.6 Steriles defibriniertes Schafsblut

Bezug von einem kommerziellen Lieferanten oder Herstellung nach EN 14820.

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 (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird im Autoklaven (5.3.1) sterilisiert. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einem Monat aufbewahren.
- Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumbikarbonat (NaHCO_3) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einer Woche aufbewahren.

- Wasser standardisierter Härte: Für die Herstellung von 1 l werden in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) gegeben, dazu gegeben werden 6,0 ml Lösung A und danach 8,0 ml Lösung B. Nach Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss gemessen bei $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ $7,0 \pm 0,2$ 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 (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 Belastungssubstanzen müssen nach den für das Produkt festgelegten Anwendungsbedingungen ausgewählt werden.

Die Belastungssubstanz muss steril sein und in ihrer 10fachen Endkonzentration bei der Prüfung zubereitet werden.

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

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

5.2.2.8.2 Bedingungen niedriger Belastung (Rinderserumalbumin-Lösung niedriger Konzentration)

- in 100 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) werden 0,30 g Rinderserumalbumin Fraktion V (geeignet für mikrobiologische Zwecke) gelöst;
- die Lösung ist durch Membranfiltration (5.3.2.7) zu sterilisieren, im Kühlschrank (bei $2 ^\circ\text{C}$ bis $8 ^\circ\text{C}$) aufzubewahren und innerhalb eines Monats zu verbrauchen;
- die Endkonzentration des Rinderserumalbumins im Prüfverfahren (5.5) beträgt 0,3 g/l.

5.2.2.8.3 Bedingungen hoher Belastung [Gemisch von Rinderserumalbumin-Lösung hoher Konzentration und Schaf-Erythrozyten (5.2.2.6)]

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

Es wird durch Membranfiltration (5.3.2.7) sterilisiert.

Es werden mindestens 8,0 ml frisches steriles defibriniertes Schafsblut (5.2.2.6) hergestellt. Die Erythrozyten werden bei $800 g_N$ 10 min abzentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, werden die Erythrozyten in Verdünnungsmittel (5.2.2.4) resuspendiert. Dieser Vorgang wird mindestens dreimal, bis der Überstand farblos ist, wiederholt. 3 ml der gepackten Schaf-Erythrozyten werden in den 97 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung (siehe oben) resuspendiert. Um eine Kontamination zu verhindern, sollte dieses Gemisch in Portionen aufgeteilt, die wahrscheinlich an einem Tag verbraucht werden, und in gesonderten Behältern im Kühlschrank bei $2 ^\circ\text{C}$ bis $8 ^\circ\text{C}$ höchstens 7 Tage gelagert werden.

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

5.3 Apparate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme der steril gelieferten 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 [5.3.2.1 a)];
- b) durch trockene Hitze im Heißluft-Sterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung²⁾

und insbesondere folgende Geräte:

5.3.2.1 Sterilisatoren

- c) zur Sterilisation durch feuchte Hitze ein Autoklav, der für eine Mindesthaltezeit von 15 min bei $(121 \pm 3)_0^\circ\text{C}$ gehalten werden kann;
- d) zur Sterilisation durch trockene Hitze ein Heißluft-Sterilisator, der für eine Mindesthaltezeit von 30 min auf einer Betriebstemperatur von $(180 \pm 5)_0^\circ\text{C}$, für mindestens 1 h auf einer Betriebstemperatur von $(170 \pm 5)_0^\circ\text{C}$ oder für mindestens 2 h auf einer Betriebstemperatur von $(160 \pm 5)_0^\circ\text{C}$ gehalten werden kann.

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf die Betriebstemperatur von $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ sowie auf $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ (bei Verwendung des Gussplattenverfahrens, siehe 5.1.1.7) und die zusätzlichen Prüftemperaturen $\pm 1^\circ\text{C}$ (5.5.1).

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

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Messungenauigkeit der Kalibrierung von nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$.

ANMERKUNG Für die Messung des pH-Werts der Agarmedien (5.2.2.3) sollte eine Punktelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

5.3.2.5 Stoppuhr.

5.3.2.6 Schüttelgeräte.

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

b) Mechanisches Orbital-Schüttelgerät.

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem mit dem Produkt kompatiblen Material, mit einem Filterhalter mit einem Mindest-Nutzvolumen von 50 ml und geeignet zur Verwendung mit Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porengröße von $0,22\ \mu\text{m}$ zur Sterilisation des Wassers standardisierter Härte (5.2.2.7) und des Rinderserumalbumins (5.2.2.8).

2) Einweggeräte sind eine akzeptable Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

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

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

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

5.3.2.9 Messpipetten mit einem Nennvolumen von 10 ml, 1 ml und 0,1 ml. Kalibrierte automatische Pipetten dürfen verwendet werden.

5.3.2.10 Petrischalen (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.

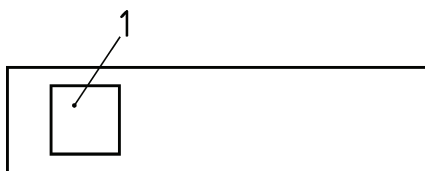
5.3.2.13 Glasperlen (Durchmesser: 0,25 mm bis 0,5 mm).

5.3.2.14 Zentrifuge (800 g_N und 2 000 g_N).

5.3.2.15 Zylindrische Röhrchen aus Kunststoff mit Schraubverschluss, Volumen etwa 15 ml, Durchmesser etwa 8 mm (für den Keimträger).

5.3.2.16 Ösen (aus Metall oder Kunststoff).

5.3.2.17 Objektträger aus Mattglas, 15 mm × 60 mm × 1 mm, bei denen eine Fläche mit Sand abgestrahlt ist. Zur Vorbereitung wird der Glasträger 10 min in einer Seifenlösung gekocht, mindestens dreimal mit Wasser und abschließend einmal mit Ethanol (70 % Volumenkonzentration) gespült. An einem Ende des getrockneten Glasträgers wird auf der abgestrahlten Fläche ein Quadrat von 10 mm Seitenlänge etwa 2 mm von den drei Rändern entfernt markiert. Sterilisation im Heißluft-Sterilisator [5.3.1 b)]. Nach dem Sterilisationsprozess müssen die Kennzeichnungen für das „Beimpfungsquadrat“ deutlich sichtbar sein.



Legende

1 Beimpfungsquadrat

Bild 1 — Mattglasträger mit markiertem Prüffeld

5.3.2.18 Roux-Flaschen oder ähnliche Kolben.

5.3.2.19 Glasfilterfritten mit einer Porengröße zwischen 40 µm und 100 µm (siehe ISO 4793).

5.4 Herstellung der Suspensionen der Prüfkeime und der Produktprüflösungen

5.4.1 Suspensionen der Prüfkeime (für Prüfung und Validierung)

5.4.1.1 Allgemeines

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