

DIN EN 17126

ICS 11.080.20

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Quantitativer Suspensionsversuch zur Bestimmung der sporiziden
Wirkung im humanmedizinischen Bereich –
Prüfverfahren und Anforderungen (Phase 2, Stufe 1);
Deutsche Fassung EN 17126:2018**

Chemical disinfectants and antiseptics –
Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants
in the medical area –
Test method and requirements (phase 2, step 1);
German version EN 17126:2018

Antiseptiques et désinfectants chimiques –
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité sporicide des désinfectants
chimiques utilisés dans le domaine médical –
Méthodes d'essai et exigences (phase 2, étape 1);
Version allemande EN 17126:2018

Gesamtumfang 63 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (EN 17126:2018) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 063-04-07 AA „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika in der Humanmedizin“ im DIN-Normenausschuss Medizin (NAMed).

Deutsche Fassung

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

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

Antiseptiques et désinfectants chimiques —
Essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de
l'activité sporicide des désinfectants chimiques utilisés
dans le domaine médical —
Méthodes d'essai et exigences (phase 2, étape 1)

Diese Europäische Norm wurde vom CEN am 28. August 2018 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, der ehemaligen jugoslawischen Republik Mazedonien, Estland, Finnland, Frankreich, Griechenland, Irland, Island, Italien, Kroatien, Lettland, Litauen, Luxemburg, Malta, den Niederlanden, Norwegen, Österreich, Polen, Portugal, 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	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Anforderungen	6
5 Prüfverfahren	7
5.1 Kurzbeschreibung	7
5.2 Materialien und Reagenzien	7
5.2.1 Prüforganismen	7
5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien	8
5.3 Apparate und Glasgeräte	14
5.3.1 Allgemeines	14
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	14
5.4 Herstellung der Prüforganismussuspensionen und der Produktprüflösungen	16
5.4.1 Prüforganismussuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)	16
5.4.2 Produktprüflösungen	21
5.5 Verfahren zur Beurteilung der sporiziden Wirkung des Produkts	22
5.5.1 Allgemeines	22
5.5.2 Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren	23
5.5.3 Membranfiltrationsverfahren	26
5.5.4 Modifiziertes Verfahren für gebrauchsfertige Produkte	28
5.6 Versuchsdaten und Berechnung	30
5.6.1 Erläuterung von Begriffen und Abkürzungen	30
5.6.2 Berechnung	31
5.7 Verifizierung des Verfahrens	36
5.7.1 Allgemeines	36
5.7.2 Kontrolle der gewichteten mittleren Keimzahlen	36
5.7.3 Grundlegende Grenzwerte	36
5.8 Angabe der Ergebnisse und Präzision	37
5.8.1 Reduktion	37
5.8.2 Kontrolle der wirksamen und der unwirksamen Produktprüflösung (5.4.2)	37
5.8.3 Limitierender Prüforganismus und sporizide Konzentration	37
5.8.4 Präzision, Wiederholungen	37
5.9 Interpretation der Ergebnisse — Schlussfolgerung	38
5.9.1 Allgemeines	38
5.9.2 Sporizide Wirkung für Produkte zur Oberflächendesinfektion	38
5.9.3 Sporizide Wirkung für Produkte zur Instrumentendesinfektion	38
5.9.4 Sporizide Wirkung für Produkte zur Textildesinfektion	38
5.9.5 Qualitätsnachweis für bestimmte Anwendungsgebiete	38
5.10 Prüfbericht	38
Anhang A (informativ) Referenzstämme in nationalen Sammlungen	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 Prüfberichts		52
Anhang E (informativ) Präzision des Prüfergebnisses		56
Anhang F (informativ) Graphische Darstellung der Sporenherstellung		57
Anhang G (informativ) Anleitung zur Herstellung einer Referenzprüflösung		58
Anhang H (informativ) Beispiel für eine Titration von Peressigsäure und Wasserstoffperoxid		59
H.1	Allgemeines	59
H.2	Material	59
H.3	Durchführung	60
Literaturhinweise		61

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (EN 17126:2018) 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 Juni 2019, und etwaige entgegenstehende nationale Normen müssen bis Juni 2019 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.

Entsprechend der CEN-CENELEC-Geschäftsordnung sind die nationalen Normungsinstitute der folgenden Länder gehalten, diese Europäische Norm zu übernehmen: Belgien, Bulgarien, Dänemark, Deutschland, die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien, 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 zur Feststellung, ob ein chemisches Desinfektionsmittel in dem im Anwendungsbereich beschriebenen Bereich und Gebiet eine sporizide 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 zu einer Beeinflussung seiner Wirkung in praktischen Situationen führen können.

Jede durch diese Prüfung ermittelte Gebrauchskonzentration des chemischen Desinfektionsmittels entspricht den gewählten Versuchsbedingungen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt ein Prüfverfahren für und die Mindestanforderungen an die sporizide Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln fest, die bei Verdünnung mit Wasser standardisierter Härte als homogene, physikalisch stabile Zubereitung vorliegen, bzw. bei gebrauchsfertigen Produkten bei der Verdünnung mit Wasser. Die Produkte können nur bei einer Konzentration bis zu 80 % (97 % bei einem modifizierten Verfahren für Sonderfälle) geprüft werden, da durch Zugabe der Prüforganismen und der Belastungssubstanz immer eine gewisse Verdünnung bewirkt wird.

Diese Europäische Norm gilt für Produkte, die im medizinischen Bereich bei der Instrumentendesinfektion durch Eintauchen und bei der Oberflächendesinfektion durch Abwischen, Besprühen, Einschwemmen oder auf sonstige Weise verwendet werden.

Diese Europäische Norm gilt für Bereiche und unter Bedingungen, wo eine Desinfektion 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 und im häuslichen Bereich gegeben sein. Eingeschlossen sein können auch Einrichtungen wie Wäschereien und Küchen, die der direkten Versorgung von Patienten dienen.

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

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

EN 14885 legt im Einzelnen die Beziehung der verschiedenen Prüfungen untereinander sowie zu den „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 Testorganismen 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*

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: unter <http://www.electropedia.org/>
- ISO Online Browsing Platform: unter <http://www.iso.org/obp>

4 Anforderungen

Bei einer Prüfung nach Tabelle 1 und Abschnitt 5 muss für das Produkt eine dezimal-logarithmische Reduktion (lg) um mindestens vier Stufen nachgewiesen werden.

Tabelle 1 — Mindestprüfbedingungen und zusätzliche Prüfbedingungen

Prüfbedingungen	Oberflächendesinfektion	Instrumentendesinfektion	Textildesinfektion
Mindestspektrum der Prüforganismen			
sporizide Wirkung gegen <i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
sporizide Wirkung	<i>Bacillus subtilis</i> und <i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> und <i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i> und <i>Bacillus cereus</i>
zusätzlich	jeder relevante Prüforganismus		
Prüftemperatur	entsprechend Herstellerempfehlung, jedoch zwischen		
	4 °C und 30 °C	20 °C und 70 °C	20 °C und 80 °C
Einwirkzeit	entsprechend Herstellerempfehlung, jedoch nicht länger als		
	15 min oder 60 min ^a	60 min	60 min
Belastungssubstanz			
Bedingungen niedriger Belastung	0,3 g/l Rinderserumalbumin	0,3 g/l Rinderserumalbumin	0,3 g/l Rinderserumalbumin
	und/oder	und/oder	und/oder
Bedingungen hoher Belastung	3,0 g/l Rinderserumalbumin plus 3,0 ml/l Erythrozyten	3,0 g/l Rinderserumalbumin plus 3,0 ml/l Erythrozyten	3,0 g/l Rinderserumalbumin plus 3,0 ml/l Erythrozyten
zusätzlich	jede relevante Substanz	jede relevante Substanz	jede relevante Substanz
^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 zur Desinfektion von Oberflächen, die wahrscheinlich mit dem Patienten und/oder dem medizinischen Personal in Kontakt kommen sowie von Oberflächen, die häufig von verschiedenen Personen berührt werden, was eine Übertragung von Mikroorganismen auf den Patienten bewirkt, müssen mit einer Einwirkzeit von höchstens 15 min geprüft werden. Gleiches gilt für Fälle, bei denen die Einwirkzeit des Produktes aus praktischen Gründen begrenzt sein muss. Produkte für andere als die oben genannten Oberflächen dürfen mit einer Einwirkzeit von höchstens 60 min geprüft werden.			
ANMERKUNG Für die zusätzlichen Bedingungen kann die als Ergebnis festgelegte Konzentration geringer sein als eine unter den Mindestprüfbedingungen erhaltene Konzentration.			

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

5.1.1 Einer Prüfsuspension von Sporen in einer Lösung einer Belastungssubstanz wird eine Probe des Produkts im Lieferzustand und/oder des mit Wasser standardisierter Härte (oder Wasser bei gebrauchsfertigen Produkten) verdünnten Produkts gegeben. Das Gemisch wird bei einer der in Abschnitt 4 und 5.5.1.1 festgelegten Temperatur und Einwirkzeit gehalten. Nach dem Ende dieser Einwirkzeit wird ein aliquoter Anteil entnommen; die sporizide Wirkung in dieser Probenmenge wird sofort nach einem validierten Verfahren neutralisiert oder unterdrückt. Beim Verfahren der Wahl handelt es sich um das Verdünnungs-Neutralisations-Verfahren. Wenn kein geeignetes Neutralisationsmedium gefunden werden kann, wird die Membranfiltration angewendet. Die Anzahl der überlebenden Sporen wird in jeder Probe bestimmt und die Reduktion berechnet.

5.1.2 Die Prüfung erfolgt unter Verwendung von Sporen des Erregers *Clostridium difficile* auf sporizide Wirkung gegen *Clostridium difficile* und/oder *Bacillus subtilis* sowie *Bacillus cereus* auf sporizide Wirkung (Abschnitt 4, Tabelle 1).

5.1.3 Zusätzliche und optionale 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 sporizide Wirkung muss unter Verwendung der folgenden als Prüforganismen ausgewählten Stämme¹⁾ nach Abschnitt 4 (Tabelle 1) bewertet werden.

a) <i>Clostridium difficile</i> R027	NCTC 13366
b) <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
c) <i>Bacillus cereus</i>	CIP 105151

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

Die geforderte Bebrütungstemperatur für diese Prüforganismen beträgt $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ oder $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (5.3.2.3). Die gleiche Temperatur (entweder 36 °C oder 37 °C) muss für jede Bebrütung während einer Prüfung, deren Kontrolle und Validierung angewendet werden.

Bei der Verwendung von zusätzlichen Prüforganismen müssen diese unter den im Prüfbericht vermerkten optimalen Wachstumsbedingungen (Temperatur, Dauer, Atmosphäre, Medien) bebrütet werden. Wenn die ausgewählten zusätzlichen Prüforganismen nicht den festgelegten Stämmen entsprechen, muss deren Eignung zur Bereitstellung der geforderten Inokula verifiziert werden. Wenn diese zusätzlichen Prüforganismen nicht an einem Referenzzentrum klassifiziert wurden, müssen deren Identifizierungsmerkmale angegeben werden. Darüber hinaus müssen sie vom Prüflabor oder der nationalen Kultursammlung fünf Jahre als Referenzprobe aufbewahrt werden.

1) Die NCTC-, CIP- und ATCC-Nummern sind die Sammlungsnummern von Stämmen, die von diesen Kultursammlungen geliefert werden. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und stellt keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN dar.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Alle in dieser Europäischen Norm angegebenen Massen chemischer Substanzen beziehen sich auf die wasserfreien Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, aber die erforderlichen Massen müssen angepasst werden, um die sich daraus ergebenden Differenzen in den relativen Molekülmassen zu berücksichtigen.

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 handelsübliche wasserfreie Materialien verwendet werden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten genau befolgt werden.

Für jedes Kulturmedium und Reagens sollte eine zeitliche Begrenzung der Verwendung festgelegt werden.

Alle festgelegten pH-Werte werden bei $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ gemessen.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frei von Substanzen sein, die toxisch oder hemmend auf die Bakteriosporen oder auf die Bakterien wirken. Es muss sich um frisch in einer Glasapparatur destilliertes oder entionisiertes Wasser handeln.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Die Sterilisation ist nicht erforderlich, falls das Wasser z. B. für die Herstellung von Kulturmedien verwendet und anschließend sterilisiert wird.

ANMERKUNG Hinsichtlich des Verfahrens zur Herstellung von Wasser standardisierter Härte siehe 5.2.2.7.

5.2.2.3 Kulturmedien für sporenbildende Bakterien

a) BHIYT-L-Agar für *Clostridium difficile*

BHIYT-L-Agar, bestehend aus:

Hirn-Herz-Infusion	37,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
L-Cystein	1,0 g
Natriumtaurocholat	1,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums $7,0 \pm 0,2$ betragen. Das Medium wird auf $48\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ abgekühlt. Es werden 200 000 Einheiten Lysozym in 10 ml Wasser aufgelöst (5.2.2.2). Die enzymatische Lösung wird durch Membranfiltration sterilisiert (5.3.2.7).

Sollten Probleme bei der Neutralisierung auftreten (5.5.1.2 und 5.5.1.3), kann es notwendig sein, dem BHIYT-L Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält eine Anleitung zu Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen. Es wird empfohlen, kein Neutralisationsmedium zu verwenden, das zu einer Trübung im Agar führt.

b) Trypton-Soja-Agar (TSA) für *Bacillus*-Gattungen

Trypton-Soja-Agar, bestehend aus:

Trypton, tryptisch verdautes Casein	15,0 g
Soja-Pepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	5,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums $7,2 \pm 0,2$ betragen. Dieses Agar sollte für die Auszählung der lebensfähigen Sporen von *Bacillus* verwendet werden.

Wenn Probleme mit der Neutralisation (5.5.1.2 und 5.5.1.3) auftreten, kann es erforderlich sein, dem TSA Neutralisationsmedium zuzusetzen. Anhang B enthält eine Anleitung zu Neutralisationsmedien, die verwendet werden dürfen. Es wird empfohlen, kein Neutralisationsmedium zu verwenden, das zu einer Trübung im Agar führt.

5.2.2.4 Verdünnungsmittel

Trypton-Natriumchlorid-Lösung, bestehend aus:

Trypton, tryptisch verdautes Casein	1,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	8,5 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

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

5.2.2.5 Neutralisationsmedium

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

ANMERKUNG In Anhang B sind Angaben zu Neutralisationsmedien angeführt, die sich für einige Arten von Produkten als geeignet erwiesen haben.

5.2.2.6 Spülflüssigkeit (für die Membranfiltration)

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

ANMERKUNG In Anhang B sind Angaben zu Spülflüssigkeiten angeführt, 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 von Lösung A: Es werden 19,84 g Magnesiumchlorid (MgCl_2) und 46,24 g Calciumchlorid (CaCl_2) in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7) oder im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Sofern das Autoklavieren angewendet wird, kann dies zu einem Flüssigkeitsverlust führen. In diesem Fall wird mit Wasser (5.2.2.2) unter aseptischen Bedingungen auf 1 000 ml aufgefüllt. Die Lösung lässt sich im Kühlschrank (5.3.2.8) bis zu einem Monat aufbewahren.
- Herstellung von Lösung B: Es werden 35,02 g Natriumhydrogencarbonat (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.
- 600 ml bis 700 ml Wasser (5.2.2.2) werden in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) gefüllt, dann werden 6,0 ml (5.3.2.9) der Lösung A und anschließend 8,0 ml der Lösung B dazugegeben. Nach Durchmischen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 1 000 ml aufgefüllt. Der pH-Wert des Wassers standardisierter Härte muss $7,0 \pm 0,2$ betragen, wenn er bei einer Temperatur von $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (5.3.2.4) ermittelt wird. Falls erforderlich, wird der pH-Wert mittels einer Lösung von etwa 40 g/l (etwa 1 mol/l) Natriumhydroxid (NaOH) oder etwa 36,5 g/l (etwa 1 mol/l) Salzsäure (HCl) eingestellt.

Das Wasser standardisierter Härte muss unter aseptischen Bedingungen frisch hergestellt und innerhalb von 12 h verbraucht 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, angegeben als Calciumcarbonat (CaCO_3), im Reagenzglas unter 375 mg/l.

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, 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) müssen festgelegt sein.

ANMERKUNG Der Begriff „Belastungssubstanz“ wird auch dann verwendet, wenn es sich um mehrere Substanzen handelt.

5.2.2.8.2 Bedingungen niedriger Belastung (Rinderserumalbuminlösung — geringe Konzentration)

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

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7), die Lösung ist in einem Kühlschrank (5.3.2.8) aufzubewahren und innerhalb von einem Monat zu verbrauchen.

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

5.2.2.8.3 Bedingungen hoher Belastung (Gemisch von Rinderserumalbuminlösung in hoher 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 (5.2.2.9) hergestellt. Die Erythrozyten werden bei 800 g_N für 10 min (5.3.2.13) zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes werden die Erythrozyten in Verdünnungsmittel (5.2.2.4) resuspendiert. Dieser Vorgang wird mindestens dreimal wiederholt, bis der Überstand farblos ist.

3,0 ml der angereicherten (gepackten) Schaf-Erythrozyten werden in den 97 ml der sterilisierten Rinderserumalbuminlösung (siehe oben) resuspendiert. Um eine spätere Kontamination zu verhindern, sollte dieses Gemisch in Portionen aufgeteilt werden, die wahrscheinlich an einem Tag verwendet werden, und in gesonderten Behältern in einem Kühlschrank (5.3.2.8) für höchstens 7 Tage gelagert werden.

Die Endkonzentration des Rinderserumalbumins und der Schaf-Erythrozyten im Prüfverfahren (5.5) muss 3,0 g/l bzw. 3,0 ml/l betragen.

5.2.2.8.4 Bedingungen geringer und hoher Belastung bei dem modifizierten Verfahren für gebrauchsfertige Produkte (5.5.4)

Generell werden die unter 5.2.2.8.2 und 5.2.2.8.3 genannten Herstellungsverfahrenswesen genutzt, die Belastungssubstanz wird jedoch in einer fünffach höheren Konzentration hergestellt. Für Bedingungen hoher Belastung werden höchstens 50 ml hergestellt, damit bei der Filtration keine Probleme auftreten.

- Bedingungen geringer Belastung (5.2.2.8.2) — 1,50 g Rinderserumalbumin (anstelle von 0,3 g) werden in 100 ml Verdünnungsmittel (5.2.2.4) gelöst.
- Bedingungen hoher Belastung (5.2.2.8.3) — 7,5 g Rinderserumalbumin (anstelle von 1,5 g) werden in 42,5 ml Verdünnungsmittel (anstelle von 48,5 ml) gelöst. Es ist mindestens 20 ml (anstelle von 4,0 ml) Schafsblut herzustellen. 7,5 ml (anstelle von 1,5 ml) gepackte Schaf-Erythrozyten werden in 42,5 ml sterilisierter Rinderserumalbuminlösung resuspendiert, um 50 ml zu erhalten.

5.2.2.9 Defibriniertes Schafsblut

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

5.2.2.10 Sporenbildungsmedium

5.2.2.10.1 Hirn-Herz-Infusion

Hirn-Herz-Infusion, bestehend aus:

Hirn-Infusion Feststoffe	12,5 g
Rinderherz-Infusion Feststoffe	5,0 g
Proteopepton	10,0 g
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	2,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	2,5 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums $7,4 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.10.2 Columbia-Bouillon

Columbia-Bouillon, bestehend aus:

Pankreas verdautes Casein	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
Proteopepton Nr. 3	5,0 g
tryptisch verdautes Rinderherz	3,0 g
L-Cystein HCl	0,1 g
Dextrose (D-Glucose)	2,5 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Magnesiumsulfat (MgSO ₄) (wasserfrei)	0,1 g
Eisensulfat (FeSO ₄)	0,02 g
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	0,6 g
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	0,83 g
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan HCL	2,86 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums $7,5 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.10.3 Flüssiges Sporenbildungsmedium

Flüssiges Sporenbildungsmedium für die Herstellung von *Clostridium difficile* Sporen, bestehend aus:

1 L des Mediums wird in einem 2-L-Erlenmeyerkolben hergestellt, folgende Substanzen werden in nachstehender Reihenfolge beigemischt:

Wasser (5.2.2.2)	700,0 ml
Spezialpepton ²⁾	10,0 g
Kalium-Dihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	2,60 g
Ammoniumsulfat [(NH ₄) ₂ SO ₄]	0,60 g
Calciumchloridmonohydrat (CaCl ₂ × H ₂ O)	0,08 g
Hefeextraktpulver	10,0 g
Kaliumkarbonat (K ₂ CO ₃)	3,48 g
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	0,12 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

2) Spezialpepton ist ein handelsübliches Medium mit einer speziell konzipierten Peptonmischung, bestehend aus: Gesamtstickstoff 11,7 g, Amino-Stickstoff 3,8 g, Natriumchlorid (NaCl) 3,5 g.

Der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums muss vor der Sterilisation $7,9 \pm 0,2$ betragen. Falls erforderlich sollte die Angleichung mit KOH oder HCl erfolgen. Die Sterilisation erfolgt für 15 min im Autoklaven [5.3.2.1 a)] bei 121 °C.

5.2.2.10.4 Natriumphosphatpuffer (0,1 M)

Natriumphosphatpuffer (1 M), bestehend aus:

Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	8,19 g
Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH_2PO_4)	5,84 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

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

5.2.2.10.5 Enzymatischer Puffer

Enzymatischer Puffer, bestehend aus:

800 Einheiten Lysozym und 250 Einheiten Trypsin je mg Nassgewicht zu 25 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (5.2.2.10.4).

Die Sterilisation erfolgt durch Membranfiltration (5.3.2.7).

5.2.2.10.6 Trypton-Glucose-Bouillon (TGB)

Trypton-Glucose-Bouillon für die Herstellung des Inokulums der Gattung *Bacillus*, bestehend aus:

Hefeextrakt	2,5 g
Trypton	5,0 g
Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	1,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Dies wird in Röhrchen überführt und je Röhrchen werden 10 ml eingebracht. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert (5.3.2.4) des Mediums $7,2 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.10.7 Fleisch-Hefeextrakt-Agar (MYA)

Fleisch-Hefeextrakt-Agar für die Herstellung von Sporen der Gattung *Bacillus*, bestehend aus:

Fleischextrakt	10,0 g
Hefeextrakt	2,0 g
Mangansulfat-Tetrahydrat ($\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$)	0,053 g
Agar	15,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Dies wird in sterile Zellkulturkolben mit Belüftungsverschluss überführt. Die Sterilisierung erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)], anschließend wird auf 55 °C abgekühlt und dann in die Kolben verteilt. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.11 Referenz Glutardialdehyd (Glutaral, 1,5-Pentandial) CAS-Nummer 111-30-8

Die erforderlichen chemischen und physikalischen Parameter zur Verwendung als Referenzstandard für die Prüfung von Desinfektionsmittelpräparaten sind in Tabelle 2 festgelegt.

Tabelle 2 — Erforderliche chemische und physikalische Parameter

Parameter	Spezifikation	
	50%ige-Lösung	25%ige-Lösung
Aussehen ^a	klare Flüssigkeit	klare Flüssigkeit
PH-Wert	3,1 bis 4,5	3,1 bis 4,5
Konzentration von Glutardialdehyd (durch Titration)	50,0 % bis 52,0 %	25,0 % bis 26,0 %
Stabilität (Umgebungsbedingungen)	12 Monate	12 Monate
^a Gelbliche Farbe weist auf eine beginnende Polymerisierung hin.		

Die obige Spezifikation (siehe Tabelle 2) sollte auf dem Analysenzertifikat überprüft werden. Die pH-Werte müssen regelmäßig vom Labor geprüft und bestätigt werden. Falls die pH-Werte und/oder das Aussehen außerhalb der Spezifikation liegen, kann Glutardialdehyd nicht mehr verwendet werden.

5.3 Apparate und Glasgeräte

5.3.1 Allgemeines

Mit Ausnahme steril gelieferter sind alle Glasgeräte und alle Geräteteile, die mit den Kulturmedien und 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 Heißluftsterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung³⁾

Dies gilt insbesondere für folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation (feuchte und trockene Hitze)

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

3) Sterile Einwegartikel sind eine zulässige Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, bei $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, bei $70\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ und $75\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (um Agar beim Gussplattenverfahren im geschmolzenen Zustand zu halten; um während der Sporenherstellung die enzymatische Verdauung zu bewirken und für die Wärmeinaktivierung von geernteten Sporen) und auf zusätzliche Prüftemperaturen von $\pm 1\text{ °C}$ (5.5.1).

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ oder $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (5.2.1). Bei allen Bebrütungen während einer Prüfung und deren Kontrolle und Validierung muss die gleiche Temperatur verwendet werden.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

Zur Messung des pH-Wertes der Agarmedien [5.2.2.3 a) oder b)] und der Sporenbildungsmedien (5.2.2.10) sollte eine Einstichelektrode oder eine flache Membranelektrode verwendet werden.

5.3.2.5 Stoppuhr

5.3.2.6 Schüttelgeräte

a) Elektromechanisches Mischgerät, z. B. Vortex®-Mixer⁴⁾;

b) mechanisches Schüttelgerät.

5.3.2.7 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem Material, das mit den zu filtrierenden 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 Porenweite von $0,45\text{ }\mu\text{m}$ 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 um zu verhindern, dass der Filtrationsvorgang zu lange dauert, muss das Gerät so eingestellt werden, dass 100 ml der Spülflüssigkeit in 20 s bis 40 s filtriert werden.

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

5.3.2.9 Messpipetten mit Nennvolumina von 10 ml, 2 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, einstellbar auf 2 °C bis 8 °C (4000 g_N).

5.3.2.14 Anaerobes Gefäß mit einem gaserzeugenden System oder anderen anaeroben Systemen.

4) Der Vortex®-Mixer ist ein Beispiel für ein geeignetes handelsübliches Produkt. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Europäischen Norm und stellt keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN dar.

5.3.2.15 Mikroskop, obligatorisch ein Phasenkontrastmikroskop mit mindestens 400-facher Vergrößerung.

5.3.2.16 Eismaschine oder kommerziell erhältliches Eis

5.4 Herstellung der Prüforganismussuspensionen und der Produktprüflösungen

5.4.1 Prüforganismussuspensionen (Prüf- und Validierungssuspension)

5.4.1.1 Allgemeines

Für jeden Prüforganismus sind zwei verschiedene Suspensionen herzustellen: Die „Prüfsuspension“ für die Prüfdurchführung und die „Validierungssuspension“ für die Kontrollen und zur Validierung des Verfahrens.

5.4.1.2 Aufbewahrung und Stammkulturen von Prüforganismen

Die Prüforganismen und deren Stammkulturen müssen nach EN 12353 hergestellt und aufbewahrt werden.

Das Pellet der gefriergetrockneten Probe der Gattung *Clostridium* sollte in Hirn-Herz-Infusion (BHI) rehydriert werden (5.2.2.10.1). Es sollte auf BHIYT-L ohne Taurocholsäure Natriumsalz-Hydrat und Lysozym [5.2.2.3 a)] beimpft werden, die Inkubation erfolgt in einem anaeroben Gefäß (5.3.2.14) für 72 h bis 78 h.

Das Pellet der gefriergetrockneten Probe der Gattung *Bacillus* sollte in Trypton-Glucose-Bouillon (TGB) rehydriert werden (5.2.2.10.6). Die Beimpfung sollte auf Trypton-Soja-Agar (TSA) erfolgen [5.2.2.3 b)].

5.4.1.3 Herstellung einer Sporenstammsuspension

5.4.1.3.1 Herstellung einer *Clostridium* Sporenstammsuspension (siehe Anhang F)

Tag 1: Um die Sporenstammsuspension der Prüforganismen (5.2.1) herzustellen, wird eine Subkultur von der Stammkultur (5.4.1.2) durch Ausstrich auf BHIYT-L-Schrägararröhrchen oder -platten [5.2.2.3 a)] angelegt und bebrütet (5.3.2.3). Die Beimpfung erfolgt für 48 h in einem anaeroben Gefäß (5.3.2.14), bis die Kolonien einen Durchmesser von ca. 4 mm aufweisen (siehe Anhang F). Eine zweite Subkultur darf niemals hergestellt und verwendet werden.

Tag 2: Eine Lösung aus Columbia-Bouillon (5.2.2.10.2) wird nach Herstelleranweisung hergestellt und im Autoklaven sterilisiert. Ein 15-ml-Kunststoffröhrchen mit Schraubverschluss mit 5 ml Columbia-Bouillon (5.2.2.10.2) wird zur Vorreduzierung des Sauerstoffgehalts in einem anaeroben Gefäß (5.3.2.14) bei Raumtemperatur über Nacht (mindestens 12 h) gelagert.

Tag 3: Es wird eine isolierte Kolonie aus der beimpften BHIYT-L-Platte [5.2.2.3 a)] ausgewählt und in dem Röhrchen mit 5 ml vorreduzierter Columbia-Bouillon suspendiert (5.2.2.10.2). Das Röhrchen wird unter anaeroben Bedingungen 24 h bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ oder $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubiert.

50-ml-Kunststoffröhrchen mit offenem Schraubverschluss mit 20 ml Columbia-Bouillon (5.2.2.10.2) werden in ein anaerobes Gefäß (5.3.2.14) eingebracht. Zur Vorreduzierung des Sauerstoffgehalts wird dieses mindestens 12 h bei Raumtemperatur belassen. An Tag 4 wird ein Röhrchen für jeden zu beimpfenden Kolben vorbereitet.

Tag 4: 50 µl der 24-h-Kultur werden in jeder der 50-ml-Kunststoffröhrchen mit 20 ml vorreduzierter Columbia-Bouillon beimpft (5.2.2.10.2). Es wird unter anaeroben Bedingungen 20 h bei $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ oder $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ inkubiert (offener Schraubverschluss).

Ein flüssiges Sporenbildungsmedium wird durch Zugabe der Bestandteile in genannter Reihenfolge hergestellt [5.2.2.10.3]. Es werden 500 ml des Mediums in jede der 1-L-Kolben gegeben und diese 15 min bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlen auf (50 °C bis 60 °C) werden die Kolben in anaerobe Gefäße gegeben (5.3.2.14) und Vorreduzierung des Sauerstoffgehalts des Mediums 24 h bei 36 °C $\pm$ 1 °C oder 37 °C $\pm$ 1 °C inkubiert. Der pH-Wert wird gegen Ablauf dieses Zeitraums gemessen. Er sollte 8,2 $\pm$ 0,3 betragen.

Tag 5: Das gesamte Inokulum wird aus dem 20-ml-Kunststoffröhrchen in einen 500-ml-Kulturkolben mit flüssigem Sporenbildungsmedium gegeben (5.2.2.10.3). Die Kolben werden unter anaeroben Bedingungen 10 Tage bei 36 °C $\pm$ 1 °C oder 37 °C $\pm$ 1 °C inkubiert.

Tag 15: Die sporulierte Kultur aus jedem Kolben wird zu gleichen Teilen auf zwei 250-ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und die Suspensionen werden 10 min bei 4 000 g_N zentrifugiert. Der Überstand wird entsorgt und das Sediment aus jedem 250-ml-Röhrchen wird mit 50 ml entionisiertem Wasser [5.2.2.2] resuspendiert und dieses resuspendierte Material wird dann in einem 250-ml-Zentrifugenröhrchen zusammengefasst. Das Volumen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 250 ml aufgefüllt und 10 min bei 4 000 g_N zentrifugiert. Mittels Zentrifugieren wird das Pellet zwei weitere Male mit jeweils 250 ml Wasser (5.2.2.2) gewaschen. Nach dem dritten Zentrifugierschritt wird das Pellet in 15 ml Wasser (5.2.2.2) resuspendiert und dann in ein vorgewogenes 50-ml-Zentrifugenröhrchen gegeben (um das Nassgewicht des Pellets zu ermitteln). Das Original-Zentrifugenröhrchen wird zweimal mit 10 ml Wasser (5.2.2.2) ausgewaschen und die Spülflüssigkeit wird in dem vorgewogenen Zentrifugenröhrchen aufgefangen (finales Volumen 35 ml). Nach einem weiteren Zentrifugierschritt bei 4 000 g_N für 10 min muss das Pellet gewogen werden, um das Nassgewicht zu bestimmen. Das Pellet wird über Nacht im Kühlschrank gelagert (5.3.2.8).

ANMERKUNG 1 Die Beschleunigung der Zentrifugierung (z. B. 4 000 g_N) und das Volumen des Zentrifugerröhrchens (< 250 ml) kann abgeändert werden, falls dadurch die Qualität der Sporenreinigung besser wird.

Tag 16: Zur enzymatischen Verdauung der verbleibenden vegetativen Zellen und der Zelltrümmer wird das Pellet in 10 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer (5.2.2.10.4) resuspendiert. Liegt das Nassgewicht des Pellets über 700 mg, wird die Suspension in gleichen Anteilen in zwei separate Röhrchen gegeben und das Volumen in jedem Röhrchen mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer (5.2.2.10.4) auf 10 ml aufgefüllt. Mithilfe des Mixers [5.3.2.6 a)] gut durchmischen. 25 ml einer frisch hergestellten Enzymmischung, wie unter 5.2.2.10.5 beschrieben, werden hinzugegeben und vorsichtig vermischt, aber nicht mit Vortex. Die Suspension wird 5 min im Ultraschall-Wasserbad behandelt und dann bei 45 °C $\pm$ 1 °C für 6 h (5.3.2.2) inkubiert, wobei während der Inkubierung der Ultraschallschritt nach 2 $\pm$ 0,2 h, 4 $\pm$ 0,2 h, 6 $\pm$ 0,2 h zum Aufbrechen der Klumpen wiederholt wird. Die Suspension wird tiefgekühlt über Nacht aufbewahrt (5.3.2.8).

Tag 17: Klärung der *Clostridium*-Sporenstammsuspension

Die Suspension wird bei 4 000 g_N 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird dreimal jeweils mit 10 ml Wasser (5.2.2.2) gewaschen. Das Pellet wird in 30 ml Wasser resuspendiert (5.2.2.2) und 10 min im Wasserbad bei 70 °C $\pm$ 1 °C erwärmt.

ANMERKUNG 2 In ein identisches Röhrchen mit gleicher Menge Wasser wird ein Thermometer gehalten, um festzustellen, wann die gewünschte Temperatur erreicht ist. Zu diesem Zeitpunkt wird mit der Zählung der Erwärmungszeit begonnen.

Sofort gegen Ende der Erwärmungszeit wird das Röhrchen 5 min in Eis (5.3.2.16) gestellt. Die Suspension wird 10 min bei 4000 g_N zentrifugiert. Das Pellet wird je 500 ml verwendete Kultur in 2 ml Wasser (5.2.2.2) resuspendiert.

Zum Auszählen der Sporensuspension wird eine geeignete Anzahl von Verdünnungen mit Wasser [5.2.2.2] hergestellt und auf BHIYT-L-Agar [5.2.2.3 a)] durch Gussplattenverfahren oder Oberflächenverfahren inokuliert. Zur Inkubation und Auszählung siehe 5.4.1.4 c), 5.4.1.6 und das Ergebnis der Auszählung wird vermerkt.