

DIN EN 12353



ICS 11.080.20; 71.100.35

Einsprüche bis 2019-04-01
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN 12353:2013-04

Entwurf

**Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika –
Aufbewahrung von Prüforganismen für die Prüfung der bakteriziden
(einschließlich *Legionella*), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und
viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung;
Deutsche und Englische Fassung prEN 12353:2019**

Chemical disinfectants and antiseptics –

Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal (including *Legionella*), mycobactericidal, sporicidal, fungicidal and virucidal (including bacteriophages) activity;

German and English version prEN 12353:2019

Antiseptiques et désinfectants chimiques –

Conservation des organismes test utilisés pour la détermination de l'activité bactéricide (*Legionella* inclus), mycobactéricide, sporicide, fongicide et virucide (bacteriophages inclus);

Version allemande et anglaise prEN 12353:2019

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2019-02-01 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfs besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal von DIN unter www.din.de/go/entwuerfe bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an named@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/go/stellungnahmen-norm-entwuerfe oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED), 10772 Berlin, Saatwinkler Damm 42/43, 13627 Berlin.

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 77 Seiten

DIN-Normenausschuss Medizin (NAMED)
DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN 12353:2019) 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).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Änderungen

Gegenüber DIN EN 12353:2013-04 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) die Methode zur Aufbewahrung von Viren wurde detaillierter beschrieben (5.8.3);
- b) die Beschreibung des BCYE-Agars für Legionella wurde aufgenommen (5.2.2.24);
- c) die Information zur Quellenangabe für Stämme wurde aufgenommen (5.10.2);
- d) die Information zur Aufbewahrung der Dokumentation wurde aufgenommen (5.11.6);
- e) die IP Nummern für Pilze wurden gelöscht (A.4);
- f) die verwendeten Virenstämme wurden überarbeitet (A.5);
- g) die Norm wurde redaktionell überarbeitet.

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

*Antiseptiques et désinfectants chimiques — Conservation des organismes test utilisés pour la détermination de l'activité bactéricide (*Legionella* inclus), mycobactéricide, sporicide, fongicide et virucide (*Legionella* inclus), mycobactéricide, sporicide, fongicide et virucide (bacteriophages inclus)*

*Chemical disinfectants and antiseptics — Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal (including *Legionella*), mycobactericidal, sporicidal, fungicidal and virucidal (including bacteriophages) activity*

ICS:

Deskriptoren

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokument-Stage: CEN-Umfrage
Dokument-Sprache: D

STD Version 2.9p

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	6
2 Normative Verweisungen	6
3 Begriffe	6
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	7
5.2.3 Zellkulturen	16
5.2.4 Wirtsstämme für Bakteriophagen in Milcherzeugnissen (<i>Lactococcus lactis</i>)	18
5.3 Apparate und Glasgeräte	18
5.3.1 Allgemeines	18
5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung	19
5.4 Prüfverfahren für die Aufbewahrung von Prüforganismen — Allgemeines	20
5.4.1 Handhabung von gefriergetrockneten/gefrorenen Prüforganismen aus Kultursammlungen	20
5.4.2 Auswahl des Bebrütungsverfahrens, des Agarmediums, der Zellkultur/Zelllinie	20
5.5 Verfahren für die Aufbewahrung von Bakterien (einschließlich <i>Legionella</i> , sporenbildender Bakterien, außer Mykobakterien und Bakteriensporen) und Hefen	20
5.5.1 Wiederherstellung von gefriergetrockneten Prüforganismen	20
5.5.2 Vorbereitung zur Lagerung	21
5.5.3 Herstellung der Stammkultur/Gebrauchskulturen	21
5.6 Verfahren für die Aufbewahrung von Mykobakterien	21
5.6.1 Wiederherstellung von gefriergetrockneten Prüforganismen	21
5.6.2 Vorbereitung zur Lagerung	22
5.6.3 Herstellung der Gebrauchskulturen	22
5.7 Verfahren für die Aufbewahrung von Schimmelpilzen (z. B. <i>Aspergillius brasiliensis</i>)	23
5.7.1 Wiederherstellung von gefriergetrockneten Prüforganismen	23
5.7.2 Vorbereitung zur Lagerung	23
5.7.3 Herstellung der Stammkultur/Gebrauchskulturen	24
5.8 Verfahren zur Aufbewahrung von Viren (außer Bakteriophagen in Milcherzeugnissen)	24
5.8.1 Wiederherstellung der gefrorenen Viren	24
5.8.2 Vorbereitung zur Lagerung von Stammvirussuspension	24
5.8.3 Herstellung der Virenprüfsuspension	24
5.9 Prüfverfahren zur Aufbewahrung von Bakteriophagen	25
5.9.1 Wiederherstellung gefrorener Bakteriophagen	25
5.9.2 Vorbereitung zur Lagerung	25
5.9.3 Vorbereitung bakteriophager Gebrauchssuspensionen	26
5.10 Verifizierung der Reinheit und Identität der Prüforganismen	26
5.10.1 Allgemeines	26
5.10.2 Informationen zur Quelle der Stämme	26
5.10.3 Reinheit	26

5.10.4	Identität	26
5.11	Dokumentation	27
5.11.1	Allgemeines	27
5.11.2	Gefriergetrockneter Prüforganismus/ gefrorene Viren	27
5.11.3	Kryoröhrchen mit gefrorenen Prüforganismen	27
5.11.4	Stammkultur	27
5.11.5	Nachweis von Reinheit und Identität.....	27
5.11.6	Aufbewahrung der Dokumentation.....	27
Anhang A (informativ) Prüforganismen — Referenzen und Beziehungen der		
	Kultursammlungen zu den Normen und Norm-Entwürfen des CEN/TC 216	28
A.1	Bakterien (außer Mykobakterien und sporenbildende Bakterien).....	28
A.1.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	28
A.1.2	<i>Enterococcus hirae</i>	28
A.1.3	<i>Enterococcus faecium</i>	28
A.1.4	<i>Escherichia coli</i> (1)	28
A.1.5	<i>Escherichia coli</i> (2) K12	28
A.1.6	<i>Lactobacillus brevis</i>	28
A.1.7	<i>Legionella pneumophila</i> , subsp. <i>Pneumophila</i>	28
A.1.8	<i>Proteus hauseri</i>	29
A.1.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
A.1.10	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> , Serotyp <i>typhimurium</i>	29
A.1.11	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	29
A.2	Mykobakterien.....	29
A.2.1	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	29
A.2.2	<i>Mycobacterium terrae</i>	29
A.3	Sporenbildende Bakterien.....	29
A.3.1	<i>Bacillus cereus</i>	29
A.3.2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	30
A.3.3	<i>Clostridium sporogenes</i>	30
A.4	Pilze (Schimmelpilze und Hefen)	30
A.4.1	<i>Aspergillus brasiliensis</i> (früher „ <i>A. niger</i> “) (Schimmelpilz)	30
A.4.2	<i>Candida albicans</i> (Hefe)	30
A.4.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1) (Hefe)	30
A.4.4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2) var. <i>diastaticus</i> (Hefe).....	30
A.5	Viren.....	30
A.5.1	<i>Adenovirus</i> Typ 5, Stamm Adenoid 75	30
A.5.2	<i>Bovine Enterovirus</i> (Rinderenterovirus) Typ 1 (ECBO).....	30
A.5.3	<i>Murines Norovirus</i> , Stamm S99 Berlin	31
A.5.4	<i>Murines Parvovirus</i> , winziger Virus von Mäusen, Stamm Crawford	31
A.5.5	<i>Poliovirus</i> Typ 1, Sabin original 2. Passage (LSc-2ab)	31
A.5.6	<i>Vacciniavirus</i> , Stamm modifiziertes <i>Vacciniavirus</i> Ankara (MVA)	31
A.5.7	<i>Vacciniavirus</i> , Stamm <i>Elstree</i>	31
A.6	Bakteriophagen.....	31
A.6.1	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Bakteriophage P008	31
A.6.2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> Bakteriophage P001	31
Anhang B (informativ) Graphische Darstellungen.....		32
Literaturhinweise.....		37

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN 12353:2019) wurde vom Technischen Komitee CEN/TC 216 „Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika“ erarbeitet, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN 12353:2013 ersetzen.

Dieses Dokument wurde überarbeitet, um dieses an den letzten Stand der Wissenschaften anzupassen, Fehler und Mehrdeutigkeiten zu korrigieren. Nachfolgenden werden die wesentlichen technischen Änderungen seit der letzten Ausgabe aufgelistet:

- Die Methoden zur Aufbewahrung von Viren wurde detaillierter beschrieben (5.8.3);
- Die Beschreibung des BCYE-Agars für *Legionellen* wurde aufgenommen (5.2.2.24);
- Die Information über die Quelle von Stämmen wurde aufgenommen (5.10.2);
- Die Information zur Aufbewahrung von Dokumentationen wurde aufgenommen (5.11.6);
- Die IP Nummern für Pilze wurden gelöscht (siehe A.4);
- Die verwendeten Virenstämme wurden überarbeitet (see A.5).

Die oben genannten Änderungen haben keinen Einfluss auf die Prüfergebnisse, die mit Bezug auf die vorherige Version erhalten wurden. Diese Ergebnisse sind weiterhin gültig.

Einleitung

Für genormte Prüfungen zur Bestimmung der bakteriziden (einschließlich *Legionella pneumophila*), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung von chemischen Desinfektionsmitteln und Antiseptika ist die Verwendung von Prüforganismen erforderlich, deren Reinheit und Identität nachgewiesen sind und deren biologisches Verhalten stabil bleibt. Es ist daher dringend erforderlich, die Anforderungen an die Lagerung festzulegen.

Ziel dieses Dokumentes ist die Beschreibung von Verfahren zur Aufbewahrung der Prüforganismen, die für die beschriebenen Zwecke verwendet werden.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument legt Verfahren zur Haltung von Prüforganismen fest, wie sie in den Europäischen Normen des CEN/TC 216 zur Bestimmung der bakteriziden (einschließlich *Legionella pneumophila*), mykobakteriziden, sporiziden, fungiziden und viruziden (einschließlich Bakteriophagen) Wirkung chemischer Desinfektionsmittel und Antiseptika verwendet und festgelegt werden. Diese Verfahren zur Haltung von Prüforganismen können nur in Verbindung mit mindestens einer der Normen erfolgen, in denen auf dieses Dokument verwiesen wird.

ANMERKUNG 1 Anhang A (informativ) enthält eine nicht abschließende Liste von Prüforganismen, auf die dieses Dokument angewendet werden kann.

ANMERKUNG 2 Europäische Normen (EN und prEN), die auf dieses Dokument verweisen, sind in den Literaturhinweisen aufgelistet.

ANMERKUNG 3 Ein spezifischer Teil über die Aufbewahrung von bakteriellen Sporen kann hinzugefügt werden, sobald die Ergebnisse der laufenden Ringversuche vorliegen.

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

4 Anforderungen

Jeder Prüforganismus, der in einer Europäischen Norm des CEN/TC 216 festgelegt wurde und auf den in diesem Dokument verwiesen wird, muss so wie in diesem Dokument beschrieben gehandhabt werden.

Die Reinheit und Identität der aufbewahrten Prüforganismen muss während der Verarbeitung und auch regelmäßig während der Lagerung abgesichert werden.

Die aufbewahrten Prüforganismen — mit Ausnahme der Viren — sollten in regelmäßigen Zeitabständen (spätestens im Falle einer Lagerung von mehr als 14 Monaten) überprüft werden, um sicherzustellen, dass deren Empfindlichkeit für Produkte sich nicht geändert hat. Solange das CEN/TC 216 keine spezifischen Prüfungen für diesen Zweck entwickelt hat, kann jedes geeignete Verfahren angewendet werden, wie z. B. EN 1040 für Bakterien, EN 1275 für Pilze, EN 14348 für Mykobakterien, EN 13623 für *Legionella pneumophila*, EN 14476 für Viren oder EN 13610 für Bakteriophagen in Milcherzeugnissen.

5 Prüfverfahren

5.1 Kurzbeschreibung

Eine Probe des Prüforganismus — üblicherweise in gefriergetrockneter Form — wird von einer Kultursammlung bezogen. Diese Probe wird kultiviert, für die Lagerung vorbereitet, in Aufbewahrungsgefäße abgefüllt und in einer Tiefgefriereinrichtung angeordnet.

Von diesen Proben wird eine Stammkultur hergestellt und anschließend wird diese verwendet um die Gebrauchskulturen für das Prüfverfahren herzustellen. In einigen Fällen wird die Gebrauchskultur direkt aus den tiefgefrorenen Proben hergestellt.

5.2 Materialien und Reagenzien

5.2.1 Prüforganismen

Siehe Anhang A für Beispiele von Prüforganismen.

Die Dokumentation der Prüforganismen sollte nach 5.10.2 und 5.11.3 erfolgen.

5.2.2 Kulturmedien und Reagenzien

5.2.2.1 Allgemeines

Die Formulierungen aller Medien und Reagenzien sind angegeben, sofern kein kommerzielles gebrauchsfertiges Material verwendet wird. Es muss überprüft werden, ob jeder kommerzielle Anbieter ein geeignetes System zur Qualitätskontrolle eingeführt hat.

Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich alle Massenangaben für chemische Substanzen, die in diesem Dokument angegeben werden, auf wasserfreie Salze. Hydratisierte Formen dürfen als Alternative verwendet werden, allerdings müssen die erforderlichen Massen entsprechend angepasst werden, um daraus resultierende 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 auf die Prüforganismen toxisch oder hemmend wirken.

Um die Reproduzierbarkeit zu verbessern, wird empfohlen, wo immer möglich, handelsübliche wasserfreie Materialien zur Herstellung von Kulturmedien zu verwenden. Die Anweisungen des Herstellers zur Verarbeitung dieser Erzeugnisse sollten strengstens befolgt werden.

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

Für jedes Kulturmedium, jede Zellkultur und jedes Reagens sollte ein Verfallsdatum festgelegt werden.

5.2.2.2 Wasser

Das Wasser muss frisch in einer Glasapparatur destilliertes und darf nicht demineralisiertes Wasser sein. Falls kein destilliertes Wasser geeigneter Qualität zur Verfügung steht, kann Wasser für Injektionszwecke (siehe Literaturhinweis [1]) verwendet werden.

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

5.2.2.3 Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (Trypton-Soja-Bouillon, TSB) für Bakterien, Ausnahme *Legionella*

Trypton-Soja-Bouillon, bestehend aus:

Trypton, tryptisch verdautes Casein	17,0 g
Sojapepton, Papain-Aufschluss von Sojabohnenmehl	3,0 g
Natriumchlorid (NaCl)	5,0 g
Wasser (5.2.2.2)	800,0 ml
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	2,5 g
Glucose	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 des Mediums $7,2 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.4 Malzextrakt-Bouillon (MEB) für Pilze

Malzextrakt-Bouillon, bestehend aus:

Malzextrakt (lebensmitteltauglich, z. B. „Christomalt“, Malzextraktpulver von Difal oder etwas Gleichwertiges, das nicht hochgereinigt ist und nicht nur aus Maltose besteht, z. B. Malzextrakt von OXOID ¹⁾)	20,0 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 des Mediums $5,6 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.5 Kälteschutzlösung für Bakterien, sporenbildende Bakterien und Pilze

Die Kälteschutzlösung, bestehend aus:

Rindfleischextrakt	3,0 g
Trypton, tryptisch verdautes Casein	5,0 g
Glycerin ($C_3H_8O_3$) [2]	150,0 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Die Bestandteile werden in kochendem Wasser gelöst. Die Sterilisation erfolgt in einem Autoklaven [5.3.2.1 a)]. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert der Lösung $6,9 \pm 0,2$ betragen.

Jedes im Handel erhältliche Kälteschutzmittel, das Glycerin enthält und eine gleichwertige Aufbewahrung der Stämme wie durch die vorstehend angeführte Lösung sicherstellt, darf verwendet werden.

Es darf jede nachweislich gleichwertige Kälteschutzlösung verwendet werden, z. B. für *Legionella* (5.5.2).

1) Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Entsprechende Produkte, die von anderen Herstellern geliefert werden, dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

5.2.2.6 Middlebrook-Bouillon 7 H 9 mit 10 % ADC-Anreicherung und Glycerin als Rekonstitutions- und Kälteschutzlösung für Mykobakterien (MADC)

Middlebrook-Bouillon 7 H 9, bestehend aus:

Middlebrook-Bouillonpulver 7 H 9	4,7 g
Glycerin (C ₃ H ₈ O ₃) [2]	100,0 ml
Wasser (5.2.2.2)	800,0 ml

Nach einer Sterilisation im Autoklaven [5.3.2.1 a)] für eine Verweilzeit von nur 10 min erfolgt ein Abkühlen auf 45 °C. Unter aseptischen Bedingungen werden 100 ml Middlebrook-ADC-Anreicherungsmittel auf 1 000 ml zugegeben. Der pH-Wert des Mediums muss $6,6 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.7 Polysorbat 80-Lösung

Polysorbat 80-Lösung, bestehend aus:

Polysorbat 80	0,5 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

5.2.2.8 DMSO als Kälteschutzmittel beim Einfrieren von Zellkulturen

Dimethylsulfoxid (DMSO) wird verwendet, um zum Schutz der Zellen vor Zerstörung durch die Bildung von Eiskristallen beizutragen.

DMSO ist toxisch und sollte mit Vorsicht gehandhabt werden. Es kann über die Haut absorbiert werden und zu Reizungen und/oder Verätzungen führen. Es wirkt teratogen und allergieauslösend. Bei der Handhabung sollten Latexhandschuhe getragen werden.

5.2.2.9 Glutamin-Lösung, 3%ig

12 g L-Glutamin werden in 400 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst und die Lösung wird durch Membranfiltration sterilisiert. Die Lösung wird bei $(-20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ gelagert.

5.2.2.10 TV (Trypsin-Versen)

0,05 g Trypsin werden in 100 ml EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) mit einer Konzentration von 0,53 mM gelöst und die Lösung wird durch Membranfiltration sterilisiert. Die Lösung wird bei $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$ gelagert.

5.2.2.11 Antibiotika-Suspension

Chemikalien

50 Millionen Einheiten Penicillin G	(z. B. Sigma PEN-K ²)
50 g Streptomycinsulfat (entspricht etwa 750 I.E./mg)	(z. B. Sigma, Kat.-Nr: 56501 ²)
25 × 500 000 Einheiten Mycostatin	(z. B. Nystatin: E R Squibb 59150 ²)
Wasser (5.2.2.2) bis auf 2,5 Liter	

2) Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN. Entsprechende Produkte, die von anderen Herstellern geliefert werden, dürfen verwendet werden, wenn sie nachweisbar zu den gleichen Ergebnissen führen.

Herstellung

Die Gehalte der Antibiotika in den Glasfläschchen werden in Wasser (5.2.2.2) gelöst und auf 2,5 l aufgefüllt.

Die Suspension wird unter aseptischen Bedingungen in aliquote Anteile von 50 ml und 5 ml geteilt.

Die Lagerung erfolgt bei -20°C . Nach dem Auftauen wird die Flasche geschüttelt.

Es werden 5 ml je Liter Medium verwendet, um folgende Endkonzentrationen zu erreichen:

Penicillin	100 Einheiten/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Mycostatin	25 Einheiten/ml

5.2.2.12 Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS-Pufferlösung)

Natriumchlorid (NaCl)	8,00 g
Kaliumchlorid (KCl)	0,20 g
Dinatriumhydrogenphosphat-12-hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2,89 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	0,20 g
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

5.2.2.13 Fetales Kälberserum (FKS)

FKS muss hinsichtlich des Fehlens von Viren und Mykoplasma zertifiziert sein.

Fremde Viren oder Mykoplasmen können das Zell- und Virenwachstum beeinträchtigen und somit zu falschen Ergebnissen führen.

5.2.2.14 Earle's BSS

Natriumchlorid (NaCl)	68,0 g
Kaliumchlorid (KCl)	4,0 g
Calciumchlorid (CaCl_2)	2,0 g
Magnesiumsulfat, 7fach hydratisiert ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	2,0 g
Natriumhydrogenphosphat, 7fach hydratisiert ($\text{NaH}_2\text{PO}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	1,4 g
Glucose	10,0 g
Phenolrot, 1%ig (5.2.2.15)	20,0 ml
Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml

CaCl_2 sollte getrennt in 100 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst und unmittelbar bevor die Lösung mit den anderen gelösten Reagenzien auf das Endvolumen aufgefüllt wird zu dieser hinzugefügt werden. Die Lösung ist 10-fach konzentriert. Sie wird durch Filtration durch einen $0,22 \mu\text{m}$ Millipore- oder Seitz-Filter³⁾ sterilisiert und kann 4 Wochen bei $(4 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Für den Gebrauch wird die Lösung 10-fach mit Wasser (5.2.2.2) verdünnt und durch Zugabe von 2,5 % einer 8,8%igen Natriumhydrogencarbonat-Lösung (NaHCO_3 -Lösung) abgepuffert.

3) Millipore® und Seitz® sind Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte. Diese Information dient lediglich zur Unterrichtung der Anwender dieser Norm und bedeutet keine Anerkennung des genannten Produkts durch CEN.

5.2.2.15 Phenolrot, 1%ige Lösung

- a) Es wird eine 1,0 N Natriumhydroxid-Lösung (NaOH-Lösung) hergestellt.
- b) 10 g alkohollösliches Phenolrot, Europäische Pharmakopöe [2], werden in einen 100-ml-Kolben (5.3.2.12) gegeben, 20 ml der NaOH-Lösung werden hinzugefügt, alles wird gemischt und einige Minuten stehengelassen.
- c) Die gelöste Farbe wird in einen 1 000-ml-Messkolben (5.3.2.12) überführt.
- d) Eine zusätzliche Menge von 10 ml NaOH-Lösung wird in den Kolben gegeben und das gelöste Material wird in den Messkolben gegeben. Insgesamt sollten nicht mehr als 70 ml der NaOH-Lösung verwendet werden.
- e) Die Lösung wird mit Wasser (5.2.2.2) auf ein Endvolumen von 1 000 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

5.2.2.16 Natriumbikarbonat (8,8 %ige Lösung)

8,8 g Natriumbikarbonat sind in Wasser (5.2.2.2) bis auf 100 ml zu lösen und im Autoklaven zu sterilisieren [5.3.2.1a)]. Die Lagerung erfolgt bei $(4 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

5.2.2.17 Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) für Zellkulturen

MEM wird für das Wachstum und die Erhaltung von Zellkulturen eingesetzt. Zuerst wird eine Stammlösung hergestellt. Für den Gebrauch wird die Stammlösung 10-fach mit Wasser (5.2.2.2) verdünnt. 1 % der 3%igen Glutamin-Lösung (= 0,03 %) (5.2.2.9), Antibiotika (5.2.2.11) und 2,5 % einer 8,8%igen Natriumbicarbonat-Lösung (5.2.2.16) werden hinzugefügt. Vor dem Gebrauch wird eine geeignete Konzentration inaktiviertes und mykoplasmafreies fetales Kälberserum [FKS (5.2.2.13), 10 % für das Wachstum, 2 % für die Erhaltung] hinzugefügt.

Die folgenden Lösungen müssen hergestellt werden:

Lösung A

je Liter Stammlösung

L-Arginin-HCl	1,05 g
L-Histidin-HCl	0,31 g
Lysin-HCl	0,58 g
Tryptophan	0,10 g
L-Phenylalanin	0,32 g
L-Threonin	0,48 g
L-Leucin	0,52 g
L-Valin	0,46 g
L-Isoleucin	0,52 g
L-Methionin	0,15 g

Diese Aminosäuren werden in 200 ml 0,075 N HCL gelöst und dabei vorsichtig erhitzt (80 °C). 0,075 N HCL wird durch die Zugabe von 1,5 ml kommerziell verfügbarer C. P. HCL (11,9 N) in 236,6 ml Wasser hergestellt. Von den hergestellten 238,1 ml sind 200 ml zu verwenden.

Lösung B

je Liter Stammlösung

L-Tyrosin	0,36 g
L-Cystein	0,24 g

Diese beiden Aminosäuren werden in 200 ml 0,075 N Salzsäure (HCl) gelöst, in dem die Lösung 2 h auf bis zu 80 °C erhitzt und dann auf 20 °C abgekühlt wird.

Lösung C

je Liter Stammlösung

Nicotinamid	0,20 g
Pyridoxal	0,20 g
Thiamin	0,20 g
Pantothensäure	0,20 g
Cholin	0,20 g
Inositol	0,40 g
Riboflavin	0,02 g

Diese Reagenzien werden in etwa 175 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst, anschließend wird mit Wasser (5.2.2.2) auf ein Endvolumen von 200 ml aufgefüllt. Die Lösung wird in Volumina von 10 ml aufgeteilt.

ANMERKUNG Die Lösungen A, B und C sind 10-fach konzentrierte Zubereitungen und können im Kühlschrank (5.3.2.8) gelagert werden.

Lösung D

200 mg Biotin werden in 150 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst. Um die Stabilität für die Lagerung zu erhöhen, wird 1 ml 1 N Salzsäure (HCl) hinzugefügt.

Das Gesamtvolumen wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 200 ml aufgefüllt und die Lösung wird in aliquote Anteile von 10 ml aufgeteilt und bei $(-20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gelagert.

Lösung E

200 mg Folsäure (kristallin) werden in 200 ml einfach konzentrierter Earle's BSS (5.2.2.14), pH = 7,4, gelöst. Die Lösung wird in aliquote Anteile von 10 ml geteilt und bei $(-20 \pm 1)^\circ\text{C}$ gelagert.

Herstellung der Endmischung von Eagle's MEM

a) Die folgenden Reagenzien werden in 200 ml Lösung B gelöst:

Natriumchlorid (NaCl)	68,0 g
Kaliumchlorid (KCl)	4,0 g
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	2,0 g

b) 1,4 g Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) werden in 55 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst und zu der vorstehend unter a) angeführten Reagenzienmischung hinzugefügt.

c) 10 g Glucose werden in 50 ml Wasser (5.2.2.2) gelöst und 20 ml 1%ige Phenolrot-Lösung (5.2.2.15) werden zu der Reagenzienmischung b) hinzugefügt.

- d) Das Volumen der Reagenzienmischung c) wird mit Wasser (5.2.2.2) auf 600 ml aufgefüllt und die folgenden Lösungen werden hinzugefügt:

je Liter Stammlösung

Lösung C	10 ml
Lösung D	10 ml
Lösung E	10 ml

- e) In einem getrennten Kolben mit 160 ml Wasser (5.2.2.2) werden 2 g Calciumchlorid (CaCl_2) gelöst und anschließend unter kräftigem Schütteln bis zur vollständigen Auflösung zu der Reagenzienmischung d) hinzugefügt.
- f) 200 ml von Lösung A werden zu der Reagenzienmischung e) hinzugefügt; die Mischung kann im Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt werden.
- g) Das Gesamtvolumen von f) wird mit Wasser (5.2.2.2) auf genau 1 000 ml aufgefüllt und die Lösung wird durch Membranfiltration (5.3.2.16) sterilisiert. Dieses 10-fach konzentrierte Medium wird bei 4 °C gelagert.
- h) Für den Gebrauch wird das Medium 10-fach mit Wasser (5.2.2.2) verdünnt. Es werden 1% der 3%igen Glutamin-Lösung (5.2.2.9) und 2,5 % der 8,8%igen Natriumbicarbonat-Lösung (5.2.2.16) hinzugefügt. Diese Lösung kann höchstens 2 h gelagert werden.

5.2.2.18 M17-Bouillon

M17-Bouillon wird verwendet für die Aufbewahrung des Bakterienwirtsstammes (*Lactococcus lactis*) und die Vermehrung von Bakteriophagen in Milcherzeugnissen.

Phytonpepton (aus Sojamehl)	5,00 g
Polypepton (aus Kasein und Tiergewebe)	5,00 g
Rinderextraktpulver	5,00 g
Hefeextrakt	2,50 g
D(+)-Lactose	5,00 g
Ascorbinsäure	0,50 g
Natrium- β -Glycerinphosphat	19,00 g
Magnesiumsulfat, 7 H_2O	0,25 g
Wasser (5.2.2.2)	1 000 ml

Es wird im Autoklaven [5.3.2.1a)] sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.2.2.19 M17-Agar (Unterschichtagar)

Unterschichtagar für das quantitative Auszählen von Lysebereichen (Plaques), die von einzelnen infektiösen Bakteriophagenpartikeln in dem Bakterienrasen der Wirtsbakterien erhalten werden.

15 g Agar werden zu 1 000 ml M17-Bouillon (5.2.2.18) gegeben. Der Agar wird durch Kochen unter ständigem Rühren aufgelöst.

Es wird im Autoklaven [5.3.2.1a)] sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert des Mediums $7,0 \pm 0,2$ betragen, gemessen bei 20 °C. Wenn der Agar auf (47 ± 1) °C abgekühlt ist, werden 10 ml einer sterilen 1 mol/l CaCl_2 -Stammlösung (5.2.2.21) zugegeben. Es wird leicht gemischt und 15 ml bis 18 ml Agar in Petrischalen (5.3.2.10) gefüllt.

5.2.2.20 Überschichtungssagar (Deckagar, Weichagar)

Zum Auszählen der Bakteriophagen: 6,5 g Agar werden zu 1 000 ml M17-Bouillon (5.2.2.18) gegeben und unter ständigem Rühren bis zum Kochen erwärmt. Der geschmolzene Agar wird in Teströhrchen gefüllt (jeweils 2,5 ml bis 3 ml).

Es wird im Autoklaven [5.3.2.1a)] sterilisiert.

Um in dem Rasen aus Wirtsbakterienzellen klare von dem Phagen stammende Lysebereiche (Plaques) zu erhalten, sollte nur gut definierter Agar verwendet werden, der vom Lieferanten für die Phagenauszählung mittels der Überschichtungstechnik spezifiziert ist.

5.2.2.21 CaCl_2 -Stammlösungen (1 mol/l und 0,05 mol/l)

Es werden entweder 110,99 oder 5,55 g wasserfreies CaCl_2 in Wasser (5.2.2.2) aufgelöst und auf 1 000 ml aufgefüllt, um die 1 mol/l bzw. die 0,05 mol/l Stammlösung herzustellen. Es wird im Autoklaven [5.3.2.1a)] sterilisiert.

5.2.2.22 Magermilch

Rekonstituierte Magermilch (1,5 % Fettgehalt) wird wie folgt für die Prüfbedingungen hergestellt:

- Magermilchpulver, garantiert frei von Antibiotika oder Zusatzstoffen, wird im Verhältnis von 100 g je Liter Wasser (5.2.2.2) rekonstituiert;
- die Lösung wird bei 100 °C an drei aufeinander folgenden Tagen (jeweils 30 min) dampfsterilisiert und dazwischen bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Die Lösung darf zwischen den Dampfbehandlungen nicht in einem Kühlschrank aufbewahrt werden!

ANMERKUNG Unverdünnte Magermilch wird für die Aufbewahrung des Bakterienwirtstammes verwendet (5.4.1).

Alternativ wird bei (115 ± 3) °C für 15 min im Autoklaven sterilisiert [5.3.2.1a)].

Zur Herstellung einer Gebrauchslösung mit 10 % Volumenkonzentration wird 1 Teil Magermilch mit 9 Teilen sterilen Wassers (5.2.2.2) verdünnt, was als wahlweise Belastungssubstanz für den Phagensuspensionsversuch (5.7.2) gefordert wird.

Die Magermilch mit 10 % Volumenkonzentration wird bei 4 °C bis 8 °C aufbewahrt.

Die Endvolumenkonzentration der Magermilch bei dem Prüfverfahren (5.7.1) muss 1 % Volumenkonzentration betragen.

5.2.2.23 Gepufferte Aktivkohle-Hefeextrakt-Boullion (en: Buffered Charcoal Yeast Extract [BCYE] Broth), für Legionellen

BCYE-Agar, der aus Folgendem besteht:

— Hefeextrakt (Reinheit für bakteriologische Untersuchungen)	10,0 g;
— Aktivkohle	2,0 g;
— α -Ketoglutarat, Monokaliumsalz	1,0 g;
— ACES-Pufferlösung (N-2-Acetamido-2-aminoethansulfonsäure)	10,0 g;
— Kaliumhydroxid (KOH) (Plätzchen)	2,8 g;
— L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat	0,4 g;
— Eisen(III)-pyrophosphat [$\text{Fe}_4(\text{P}_2\text{O}_7)_3$]	0,25 g;
— Destilliertes Wasser	bis auf 1 000,0 ml.

Herstellung von BCYE

a) Cystein- bzw. Eisenlösung

Es sind frische Lösungen von L-Cysteinhydrochlorid und Eisen(III)-pyrophosphat herzustellen, indem 0,4 g bzw. 0,25 g zu 10-ml-Volumina Wasser (5.2.2.2) hinzugefügt werden. Jede Lösung ist durch Membranfiltration (5.3.2.16) zu sterilisieren. Die Lösungen sind in sauberen sterilen Behältern bei $(20 \pm 3)^\circ\text{C}$ für höchstens 3 Monate aufzubewahren.

b) ACES-Pufferlösung

Die ACES-Körnchen sind zu 500 ml Wasser (5.2.2.2) zu geben und durch Stehen in einem Wasserbad bei 45°C bis 50°C zu lösen. Zu weiteren 480 ml Wasser (5.2.2.2) sind die gesamten Kaliumhydroxid-Plätzchen zu geben und durch vorsichtiges Schütteln zu lösen. Zur Herstellung der ACES-Pufferlösung sind die beiden Lösungen zu mischen.

ANMERKUNG Die ACES-Pufferlösung kann zu einer Denaturierung des Hefeextrakts führen, wenn die nachfolgende Reihenfolge nicht eingehalten wird.

c) Endmedium

Zu den 980 ml ACES-Pufferlösung sind nacheinander die Aktivkohle, der Hefeextrakt und α -Ketoglutarat hinzuzufügen. Durch Lösen von 5,6 g Kaliumhydroxid (KOH) in 1 l Wasser (5.2.2.2) ist eine Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mol/l herzustellen. Durch vorsichtige Zugabe von 5,3 ml Schwefelsäure (H_2SO_4) zu 1 l Wasser (5.2.2.2) ist eine Schwefelsäure-Lösung mit einer Konzentration von 0,1 mol/l herzustellen. Je nach Bedarf ist die Kaliumhydroxid-Lösung oder die Schwefelsäure-Lösung, jeweils mit einer Konzentration von 0,1 mol/l, zum Einstellen des pH-Wertes auf $6,9 \pm 0,2$ zu verwenden. Nach dem Autoklavieren ist das Gemisch in einem Wasserbad (5.3.2.2) auf $(47 \pm 2)^\circ\text{C}$ abkühlen zu lassen.

Die L-Cystein- und Eisen(III)-pyrophosphat-Lösungen sind aseptisch hinzuzufügen, wobei zwischen den Zugaben gut zu mischen ist.

Der pH-Wert des Endmediums beträgt $6,9 \pm 0,2$, gemessen bei 25°C .

Ein längeres Erhitzen während der Sterilisation oder ein Erhitzen auf eine zu hohe Temperatur sind zu vermeiden, weil das den Nährwert des BCYE-Mediums beeinträchtigen kann. Schwankungen zwischen den Chargen der Bestandteile des Mediums (insbesondere α -Ketoglutarat) können ebenfalls dessen Leistungsverhalten beeinflussen. Deshalb ist es unbedingt notwendig, die Qualität jeder neu hergestellten

Mediencharge auf deren Fähigkeit zu prüfen, das Wachstum des Prüforganismus innerhalb einer Bebrütungsdauer von drei Tagen zu fördern. Diese Eignung sollte quantitativ abgeschätzt werden entweder durch bekannte Quantitäten des obligatorischen *Legionella*-Stammes oder durch direkten Vergleich mit früheren Chargen.

5.2.2.24 Gepufferte Aktivkohle-Hefeextrakt-Agar (en: Buffered Charcoal Yeast Extract [BCYE] Agar), für Legionellen

Für die Herstellung des Grundmediums siehe 5.2.2.23. Nach der Einstellung des pH-Wertes auf $6,9 \pm 0,2$ werden 15 g/l des bakteriologischen Agars vor dem Autoklavieren hinzugefügt.

5.2.2.25 Salzlösung nach Page

Salzlösung, die aus Folgendem besteht:

— Natriumchlorid (NaCl)	0,120 g;
— Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	0,004 g;
— Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	0,004 g;
— Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	0,142 g;
— Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	0,136 g;
— Wasser (5.2.2.2)	bis auf 1 000,0 ml.

Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven [5.3.2.1 a)].

Zur Unterstützung einer genauen Herstellung wird empfohlen, ein Volumen von 10 l der Salzlösung nach Page herzustellen und auf kleinere Volumina aufzuteilen, wie sie für das Autoklavieren erforderlich sind. Alternativ dürfen die Salzlösungen einzeln in konzentrierter Form hergestellt und bei Bedarf entsprechend verdünnt werden.

5.2.3 Zellkulturen

5.2.3.1 Lagerung von Zellkulturen

- Für die Lagerung sind aktiv wachsende Zellkulturen (log-Phase) zu verwenden. Die Zellkultur wird in MEM (5.2.2.17), das mit 10 % FKS (5.2.2.13) angereichert ist, angezogen. Das Wachstumsmedium wird aus dem Kolben abgesaugt und die Zellen werden mit PBS gespült — bei einem 75-cm²-Kolben werden 5 ml bis 10 ml verwendet. PBS (5.2.2.12) wird abgesaugt und 5 ml ATV (5.2.2.10) (bei 37 °C) werden auf den einschichtigen Zellrasen im Kolben pipettiert. Die Bebrütung erfolgt 2 min bis 5 min bei 37 °C. Die Kolbenseite wird gegen die innere Handfläche geschlagen um die Zellen leichter abzulösen. Es ist zu warten, bis sich die Zellen abgelöst haben. Mit einer 10-ml-Pipette werden 5 ml MEM (5.2.2.17) + 10 % FKS (5.2.2.13) hinzugefügt und es wird gründlich gewaschen, um die verbliebenen Zellen vom Kolbenboden abzulösen und möglicherweise vorliegende Zellklumpen zu vereinzeln. Anschließend wird die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Eine Probe wird zum Auszählen zurückgestellt und dann wird 5 min bei 100 g_N bis 150 g_N zentrifugiert (5.3.2.14). Der Überstand wird entfernt und die Zellen werden in ausreichend FKS (5.2.2.13) + 6 % bis 10 % DMSO (5.2.2.8) erneut suspendiert, um eine Endkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml bis 2×10^6 Zellen/ml zu erhalten. Die Suspension wird in Kryoröhrchen aufgeteilt (je Röhrchen etwa 1,8 ml).
- Die Röhrchen werden kurz auf Eis gegeben: der Einfrierprozess soll innerhalb von 5 min beginnen. Die Zellen sollten langsam eingefroren werden (mit -1 °C je min). Dies ist einfach mit einer programmierbaren Gefriereinrichtung zu realisieren. Falls eine derartige Gefriereinrichtung nicht zur Verfügung steht werden die Röhrchen in eine isolierte vorgekühlte Box überführt (oder in Watte eingewickelt) und

für 2 h in eine Tiefgefriereinrichtung (5.3.2.13) bei (–20 bis –25) °C gegeben; danach in eine Tiefgefriereinrichtung bei (–70 bis –90) °C für ein bis zwei Tage. Abschließend werden die Röhrchen für die Langzeit-Lagerung in eine Tiefgefriereinrichtung bei –196 °C (flüssiger Stickstoff) (5.3.2.13) überführt.

5.2.3.2 Herstellung neuer Zellkulturen

- a) Ein Röhrchen [5.2.3.1 b)] wird aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in einem Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut. Ein vollständiges Eintauchen ist zu vermeiden.
- b) Die Suspension wird in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen überführt, 5 ml MEM (5.2.2.17) + 10 % FKS (5.2.2.13) werden hinzugefügt und die Suspension wird 5 min bei 100 g_N zentrifugiert (5.3.2.14). Die überstehende Flüssigkeit wird entfernt, die Zellen werden in 5 ml MEM + 10 % FKS erneut suspendiert und einem neuen Kolben (5.3.2.15) beimpft, der 10 ml bis 15 ml MEM + 10 % FKS enthält — bei einem 75-cm²-Kolben werden 15 ml bis 22 ml Kulturmedium verwendet. Das Bebrüten erfolgt bei 37 °C (5.3.2.3).
- c) Wenn der einschichtige Zellrasen konfluent (zusammengewachsen) ist, kann die Zellkultur entweder infiziert (5.8) oder zur Herstellung neuer Subkulturen verwendet werden. Die ursprüngliche Zelllinie, die aus einer offiziellen Zellkultursammlung (z. B. ATCC) stammt, wird im Verlauf von 10 Passagen propagiert. Aliquots der ersten Passage werden eingefroren und bei < –196 °C gelagert und repräsentieren die Arbeitszellenbank [en: work cell bank (WCB)]. Diese Arbeitszellenbank wird als „Arbeitspassage 0“ bezeichnet. Zellen für die Plattenvorbereitung können bis zum Durchgang 30 verwendet werden, der aus dem „Arbeitsdurchgang 0“ berechnet wird.

Primärzellen können für niedrigere Durchgänge verwendet werden.

Die Zellen können in einem Verhältnis von 1: 3 oder höher bis zu mehreren Passagen (Übertragungen) (manchmal bis zu 40) subkultiviert werden, bevor sie verworfen werden und ein frischer aliquoter Anteil aus dem Bestand im flüssigen Stickstoff genommen wird.

Um eine Subkultur anzulegen wird das Wachstumsmedium aus dem Kolben abgesaugt und die Zellen werden mit PBS (5.2.2.12) gespült — bei einem 75-cm²-Kolben werden 5 ml bis 10 ml verwendet. PBS wird abgesaugt und 5 ml ATV (5.2.2.10) (bei 37 °C) werden auf den einschichtigen Zellrasen im Kolben pipettiert. Die Bebrütung erfolgt 2 min bis 5 min bei 37 °C. Die Kolbenseite wird gegen die innere Handfläche geschlagen um die Zellen leichter abzulösen. Es ist zu warten, bis sich die Zellen abgelöst haben. Mit einer 10-ml-Pipette werden 5 ml MEM (5.2.2.17) + 10 % FKS (5.3.2.13) hinzugefügt und es wird gründlich gewaschen, um die verbliebenen Zellen vom Kolbenboden abzulösen und möglicherweise vorliegende Zellklumpen zu vereinzeln. Ein aliquoter Anteil von Zellen, der dem gewünschten Verhältnis entspricht, wird entnommen und in frisches MEM (5.2.2.17) + 10 % FKS (5.2.2.13) in einem neuen Kolben (15 ml bis 22 ml bei einem 75-cm²-Kolben) gegeben.

- d) Zellkulturen sollten regelmäßig auf das Fehlen von Mykoplasma und verunreinigende Viren überprüft werden. Die Zelllinien müssen routinemäßig auf Mykoplasmen-Infektion durch ein hochempfindliches Verfahren, z.B. PCR, überprüft werden. Quellen der Mykoplasmen-Kontamination können Kultur-reagenzien (vorwiegend fötales Rinderserum), Laborpersonal, Kreuzkontaminationen aus infizierten Kulturen sein. In der Literatur wurden 90 % bis 95 % der Verunreinigungen entweder als M. orale, M. hyorhinitis, M. arginini, M. fermentans, M. hominis oder A. laylawii identifiziert. Es wird empfohlen, Zellen aus zuverlässigen Zellbanken bereitzustellen, da die Hauptquelle der Mykoplasmen-Kontamination von außerhalb des Labors kommt. Ein Indikator für mikrobielle Kontaminationen in Zellkulturen ist das Wachstum von Antibiotika. Verunreinigungen lassen sich dann leicht durch Trübung oder Farbveränderungen im Zellkulturmedium nachweisen.

5.2.4 Wirtsstämme für Bakteriophagen in Milcherzeugnissen (*Lactococcus lactis*)

5.2.4.1 Vorratskulturen von Wirtsbakterien

Lactococcus lactis subsp. *lactis* F 7/2 (DSM 4366) wird in M17-Bouillon (5.2.2.18) beimpft (1 % Volumenkonzentration) und für 24 h bei 30 °C (5.3.2.3) bebrütet.

Magermilch (5.2.2.22) wird mit Flüssigkultur mit 1 % Volumenkonzentration beimpft, 2 h bei einer Temperatur von 30 °C $\pm$ 1 °C (5.3.2.3) bebrütet und dann wird diese Vorratskultur des Wirtsstammes in Magermilch in einem Kühlschrank (5.3.2.8) aufbewahrt. In 2-Wochen-Abständen werden diese Vorratskulturen über Nacht bei (30 $\pm$ 1) °C wachsen gelassen und dann das Verfahren wiederholt, um eine frische Vorratskultur zu erhalten.

Wird eine längere Aufbewahrung notwendig, werden die Magermilchkulturen bei (–18 bis –20) °C oder niedriger eingefroren.

Alternativ dürfen lyophilisierte Kulturen verwendet werden und *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* F 7/2 (DSM 4366) darf entsprechend den Empfehlungen des Herstellers auf M17-Schrägaragarröhrchen (5.2.2.19) oder von Agarplatten reaktiviert oder beimpft werden. Die Vorratskultur ist dann in einem Kühlschrank (5.3.2.8) aufzubewahren.

5.2.4.2 Gebrauchskulturen von Wirtsbakterien

Um die Gebrauchskultur von Wirtsbakterien herzustellen, wird von der Stammkultur (5.2.4.1) eine Subkultur in M17-Bouillon (5.2.2.18) angelegt und bei einer Temperatur von (30 $\pm$ 1) °C (5.3.2.3) bebrütet. Es wird eine Impfkultur mit 1 % Volumenkonzentration aus Flüssigkultur oder eine mit Bakterien behaftete Platinöse aus M17-Schrägaragarröhrchen oder eine Agarplatte verwendet.

Nach 16 h bis 24 h wird eine zweite Subkultur aus der ersten Subkultur in M17-Bouillon (Impfkultur mit 1 % Volumenkonzentration) angelegt und 16 h bis 24 h bei einer Temperatur von (30 $\pm$ 1) °C bebrütet.

Aus der zweiten Subkultur darf auf die gleiche Weise eine dritte Subkultur hergestellt werden. Die zweite und/oder dritte Subkultur werden (wird) die Gebrauchskultur(en).

Wenn es nicht möglich ist, die zweite Subkultur an einem bestimmten Tag herzustellen, darf für das nachfolgende Subkultivieren eine 48-h-Subkultur verwendet werden, vorausgesetzt, dass die Subkultur nach einer 2-h-Bebrütung bei einer Temperatur von (30 $\pm$ 1) °C in einem Kühlschrank bei (2 bis 8) °C aufbewahrt worden ist. Unter diesen Umständen wird vor Fortsetzung des Verfahrens eine weitere 16-h- bis 24-h-Subkultur hergestellt. Eine vierte Subkultur darf nicht 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 Heißluft-Sterilisator [5.3.2.1 b)].

5.3.2 Übliche mikrobiologische Laborausrüstung⁴⁾

und besonders folgende Geräte:

5.3.2.1 Geräte zur Sterilisation (feuchte und trockene Hitze)

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

5.3.2.2 Wasserbäder, einstellbar auf (20 ± 1) °C, (37 ± 1) °C und (45 ± 1) °C, wenn das Gussplattenverfahren verwendet wird.

5.3.2.3 Brutschrank, einstellbar auf entweder (36 ± 1) °C oder (37 ± 1) °C [für Bakterien (einschließlich *Legionella*), Mykobakterien und Viren] oder (30 ± 1) °C (für Pilze und *Lactococcus lactis* Wirtsstämme für Bakteriophagen in Milcherzeugnissen). Für Mykobakterien und eukaryotische Zellkulturen ist ein Brutschrank mit CO₂-Atmosphäre (95 % Luft, 5 % CO₂) und einer Temperatur von (36 ± 1) °C besser geeignet. Wenn bei Mykobakterien kein CO₂-Brutschrank verwendet wird, sollten die beimpften Platten durch Abschluss mit isolierendem Klebeband oder Verpacken in Polyethylenbeutel gegen Austrocknen geschützt werden.

5.3.2.4 pH-Messgerät, mit einer Kalibrierungsgenauigkeit von nicht mehr als $\pm 0,1$ pH-Einheiten bei (20 ± 1) °C. Eine Einstichelektrode oder eine flache Membranelektrode sollte für die pH-Messung der Agarmedien (5.4.2) verwendet werden.

5.3.2.5 Frittenfilter mit einer Porenweite von 40 µm bis 100 µm (ISO 4793).

5.3.2.6 Elektromechanisches Rührwerk, z. B. Vortex®-Mischer⁵⁾.

5.3.2.7 Pinzette oder Draht.

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) mit einem Durchmesser von 90 mm bis 100 mm.

5.3.2.11 Glas- oder Keramikperlen (3 mm bis 4 mm Durchmesser).

5.3.2.12 Messkolben.

5.3.2.13 Gerät zum Tiefgefrieren von Prüforganismen bei einer Temperatur von –20 °C, –70 °C und –196 °C — Flüssigstickstoff, inklusive Kryoröhrchen mit einem Nennfassungsvermögen von 0,5 ml (min.) bis 2,0 ml (max.).

⁴⁾ Sterile Einweggeräte sind eine annehmbare Alternative zu wiederverwendbaren Glasgeräten.

⁵⁾ 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.

5.3.2.14 Zentrifuge (100 g_N bis 4 000 g_N).

5.3.2.15 Kolben/Flaschen zur Kultivierung von Zellkulturen (z. B. 25 cm², 75 cm²).

5.3.2.16 Membranfiltrationsgerät, hergestellt aus einem mit der zu filtrierenden Substanz kompatiblen Material, ausgestattet mit einem Filterhalter mit einem Mindest-Nutzvolumen von 50 ml, geeignet für die Verwendung mit Filtern mit einem Durchmesser von 47 mm bis 50 mm und einer Porenweite von 0,22 µm zur Sterilisation von Lösungen und Suspensionen. Für Bakteriophagen werden Einwegfiltermembraneinheiten (mit einer Porenweite von 0,45 µm) verwendet.

Die verwendete Vakuumquelle muss eine stetige Filtrationsdurchflussrate ermöglichen.

5.3.2.17 Biologische Sicherheitswerkbank, Klasse II oder höher, zum Züchten von Zellkulturen oder Viren.

5.4 Prüfverfahren für die Aufbewahrung von Prüforganismen — Allgemeines

5.4.1 Handhabung von gefriergetrockneten/gefrorenen Prüforganismen aus Kultursammlungen

Für die Wiederherstellung (Rekonstitution) der gefriergetrockneten Proben der Prüforganismen (Viren werden meistens im gefrorenen Zustand versandt) sind die Verfahren wie in 5.5 bis 5.9 beschrieben anzuwenden. Falls dies in Sonderfällen nicht möglich oder sachgemäß ist, sind die Empfehlungen des Anbieters zu befolgen.

5.4.2 Auswahl des Bebrütungsverfahrens, des Agarmediums, der Zellkultur/Zelllinie

Es ist immer dasselbe Bebrütungsverfahren [Temperatur, Zeit und Art des Brutschrankes (5.3.2.3)] anzuwenden und derselbe Agar und dieselbe Zellkultur/Zelllinie zu verwenden, wie er/sie für die Herstellung der Gebrauchskulturen/Prüfsuspension (z. B. „N“) der Prüforganismen in der entsprechenden Europäischen Norm beschrieben wird.

ANMERKUNG In den meisten Normen des CEN/TC 216 stehen diese Informationen in „5.4.1“.

5.5 Verfahren für die Aufbewahrung von Bakterien (einschließlich *Legionella*, sporenbildender Bakterien, außer Mykobakterien und Bakteriensporen) und Hefen⁶⁾

5.5.1 Wiederherstellung von gefriergetrockneten Prüforganismen

Die Rehydratisierung der Pellets aus den gefriergetrockneten Proben der Prüforganismen erfolgt unter Verwendung von etwa 1,0 ml TSB (5.2.2.3) für Bakterien, BCYE Boullion (5.2.2.23) für *Legionella* oder MEB (5.2.2.4) für Hefen als Suspensionsmedium und 30 min Zeit zum Quellen. Diese Suspension wird mit etwa 5,0 ml des Suspensionsmediums (TSB für Bakterien, BCYE Boullion für *Legionella* oder MEB für Hefen) verdünnt und durchmischt (5.3.2.6), bis die Homogenität erreicht wird, jedoch mindestens für 30 s.

Es werden zwei Agarplatten (5.4.2) mit Proben dieser Suspension beimpft — eine Platte mit höchstens 0,1 ml, die andere mit einer Ösenfüllung um einzelne Kolonien zu erhalten. Es wird bebrütet (5.4.2). Der Rest von der Suspension kann verworfen werden.

Von der Agarplatte mit einzelnen Kolonien wird eine Probe zur Verifizierung der Reinheit und Identität der Prüforganismen, wie sie in 5.10 beschrieben ist, entnommen. Gleichzeitig wird mit 5.5.2 fortgefahren.

⁶⁾ Eine graphische Darstellung der Verfahren ist in Bild B.1 für Bakterien und in Bild B.3 für Hefen zu sehen.

5.5.2 Vorbereitung zur Lagerung

- a) Es wird Kälteschutzlösung (5.2.2.5) auf die Oberfläche von einer oder beiden Agarplatten (10 ml je Platte) gegeben und die Zellen werden in dieser Lösung unter Verwendung eines Glasspatels resuspendiert. Die Zellsuspension wird von der Agaroberfläche abgesaugt und mit Kälteschutzlösung (5.2.2.5) auf 10 ml oder mehr — in Abhängigkeit von der jährlich benötigten Menge — verdünnt. Das Durchmischen (5.3.2.6) erfolgt für 30 s. Für *Legionella* kann entweder Wasser (5.2.2.2) oder Salzlösung nach Page (5.2.2.25) anstelle der Kälteschutzlösung verwendet werden. Im Fall, dass kein Wachstum auf dem Ager der BCYE Boullion (5.2.2.23) erfolgt, kann beimpft werden und eine Subkultur von dieser Boullion bebrütet (5.3.2.3) und wie oben beschrieben bearbeitet werden.

Anstelle von 10 ml dürfen auch 5 ml je Platte für die Resuspendierung mit anschließendem Absaugen verwendet werden. In diesem Fall dürfen dann weitere 5 ml hinzugegeben und erneut resuspendiert und abgesaugt werden.

- b) Direkt nach der Durchmischung werden Portionen von 0,5 ml von der verdünnten Suspension (a) in Kryoröhrchen pipettiert.

Ein alternatives Verfahren zur Lagerung ist das Beschichten von Perlen:

1 ml Suspension wird in ein Kryoröhrchen mit zwei Perlen (5.3.2.11) pipettiert. Das Röhrchen wird geschüttelt, um die Suspension auf den Perlen zu verteilen. Der Ansatz wird 30 min bei 20 °C stehen gelassen. Anschließend wird mit einer Pipette die überschüssige Kälteschutzlösung abgesaugt.

Es wird empfohlen, eine ausreichende Menge an Kryoröhrchen herzustellen.

- c) Die Kryoröhrchen werden bei –70 °C oder weniger (5.3.2.13) angeordnet und für höchstens 14 Monate gelagert. Längere Lagerzeiten sind möglich, sofern eine ausreichende Lebensfähigkeit ermittelt werden kann. Die Dauer ist auch abhängig von den Ergebnissen der Empfindlichkeitsprüfungen, die durchzuführen sind.

Alle Kryoröhrchen sind zu verwerfen, wenn die Reinheit oder Identität nicht in Übereinstimmung mit 5.5.1 und 5.11 nachgewiesen werden kann.

5.5.3 Herstellung der Stammkultur/Gebrauchskulturen

Ein Kryoröhrchen [5.5.2 c)] oder eine einzige Perle eines Kryoröhrchens [entnommen unter Verwendung eines Drahtes oder einer Pinzette (5.3.2.7)] wird bei Raumtemperatur aufgetaut. Eine Agarplatte (Agarplatten) oder ein Schrägagar (Schrägagare) (5.4.2) wird (werden) mit dieser Suspension oder der beschichteten Perle beimpft und bebrütet (5.4.2). Diese Kultur(en) ist (sind) die Stammkultur(en) und dürfen nicht länger als neun Wochen im Kühlschrank (5.3.2.8) gelagert werden (*Pseudomonas aeruginosa* nicht länger als sechs Wochen). Von der (den) Stammkultur(en) können Gebrauchskulturen entsprechend der zugehörigen Norm hergestellt werden.

5.6 Verfahren für die Aufbewahrung von Mykobakterien⁷⁾

5.6.1 Wiederherstellung von gefriergetrockneten Prüforganismen

Die Rehydratisierung der Pellets aus den gefriergetrockneten Proben der Prüforganismen erfolgt unter Verwendung von etwa 1,0 ml MADC (5.2.2.6) als Suspensionsmedium. Diese Suspension wird mit etwa 5,0 ml des Suspensionsmediums MADC (5.2.2.6) verdünnt und durchmischt (5.3.2.6), bis die Homogenität erreicht wird, jedoch mindestens für 30 s.

⁷⁾ Eine graphische Darstellung dieses Verfahrens ist in Bild B.2 zu sehen.

Es werden zwei Agarplatten (5.4.2) mit Proben dieser Suspension beimpft — eine Platte mit höchstens 0,1 ml, die andere mit einer Ösenfüllung um einzelne Kolonien zu erhalten. Es wird bebrütet (5.4.2). Der Rest von der Suspension kann verworfen werden.

Von der Agarplatte mit einzelnen Kolonien wird eine Probe zur Verifizierung der Reinheit und Identität der Prüforganismen, wie sie in 5.10 beschrieben ist, entnommen. Gleichzeitig wird mit 5.6.2 fortgefahren.

5.6.2 Vorbereitung zur Lagerung

- a) MADC (5.2.2.6) wird auf die Oberfläche von einer oder beiden Agarplatten (10 ml je Platte) gegeben und die Zellen werden in dieser Lösung unter Verwendung eines Glasspatels resuspendiert. Die Zellsuspension wird von der Agaroberfläche abgesaugt und mit MADC (5.2.2.6) auf 10 ml oder mehr — in Abhängigkeit von der jährlich benötigten Menge — verdünnt. Das Durchmischen (5.3.2.6) erfolgt für 30 s.

Anstelle von 10 ml dürfen auch 5 ml je Platte für die Resuspendierung mit anschließendem Absaugen verwendet werden. In diesem Fall dürfen dann weitere 5 ml hinzugegeben sowie erneut resuspendiert und abgesaugt werden.

- b) Direkt nach der Durchmischung werden Portionen von 0,5 ml von der verdünnten Suspension (a) in Kryoröhrchen pipettiert. Die Menge kann auf 2,0 ml je Kryoröhrchen erhöht werden, wenn es geplant ist, mehr als zwei Platten mit Gebrauchskulturen herzustellen (5.6.3).

Ein alternatives Verfahren zur Lagerung ist das Beschichten von Perlen:

1 ml Suspension wird in ein Kryoröhrchen mit zwei Perlen (5.3.2.11) pipettiert. Das Röhrchen wird geschüttelt, um die Suspension auf den Perlen zu verteilen. Der Ansatz wird 30 min bei 20 °C stehen gelassen. Anschließend wird mit einer Pipette die überschüssige Kälteschutzlösung abgesaugt.

Es wird empfohlen, eine ausreichende Menge an Kryoröhrchen herzustellen.

- c) Die Kryoröhrchen werden bei –70 °C oder weniger (5.3.2.13) angeordnet und für höchstens 14 Monate gelagert. Längere Lagerzeiten sind möglich, sofern eine ausreichende Lebensfähigkeit ermittelt werden kann. Die Dauer ist auch abhängig von den Ergebnissen der Empfindlichkeitsprüfungen, die durchzuführen sind.

Alle Kryoröhrchen sind zu verwerfen, wenn die Reinheit oder Identität nicht in Übereinstimmung mit 5.6.1 und 5.11 nachgewiesen werden kann.

5.6.3 Herstellung der Gebrauchskulturen

Ein Kryoröhrchen [5.6.2 c)] oder eine einzige Perle eines Kryoröhrchens [entnommen unter Verwendung eines Drahtes oder einer Pinzette (5.3.2.7)] wird bei Raumtemperatur aufgetaut. Eine Agarplatte (Agarplatten) oder ein Schrägagar (Schrägagare) (5.4.2) wird (werden) mit dieser Suspension oder der beschichteten Perle beimpft und bebrütet (5.4.2). Diese Kultur(en) wird (werden) als Gebrauchskultur(en) und/oder zur Herstellung weiterer Gebrauchskulturen des Prüforganismus nach den Festlegungen der zugehörigen Norm verwendet. Stammkulturen werden nicht hergestellt.