

DIN EN ISO 18415

ICS 07.100.40

Einsprüche bis 2017-02-16
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 18415:2011-08

Entwurf

**Kosmetische Mittel –
Mikrobiologie –
Nachweis von spezifizierten und nichtspezifizierten Mikroorganismen
(ISO/FDIS 18415:2017);
Deutsche und Englische Fassung FprEN ISO 18415:2017**

Cosmetics –
Microbiology –
Detection of specified and non-specified microorganisms (ISO/FDIS 18415:2017);
German and English version FprEN ISO 18415:2017

Cosmétiques –
Microbiologie –
Détection des micro-organismes spécifiés et non spécifiés (ISO/FDIS 18415:2017);
Version allemande et anglaise FprEN ISO 18415:2017

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-12-16 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 nal@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 Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL), 10772 Berlin, Burggrafenstr. 6, 10787 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 53 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 18415:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 217 „Cosmetics“ (Sekretariat: ISIRI, Iran) in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 392 „Kosmetische Mittel“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR (Frankreich) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Normungsgremium ist der Arbeitsausschuss NA 057-07-01 AA „Kosmetische Mittel“ im DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung des FprEN ISO 18415 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 16212	siehe	DIN EN ISO 16212
ISO 18416	siehe	DIN EN ISO 18416
ISO 21148	siehe	DIN EN ISO 21148
ISO 21150	siehe	DIN EN ISO 21150
ISO 22717	siehe	DIN EN ISO 22717
ISO 22718	siehe	DIN EN ISO 22718

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 18415:2011-08 wurden folgende Änderungen vorgenommen:

- a) Normative Verweisungen aktualisiert;
- b) die Benennung „Validierung“ wurde im gesamten Dokument durch die Benennung „Eignung“ ersetzt;
- c) redaktionelle Änderungen vorgenommen.

Nationaler Anhang NA (informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 16212, *Kosmetik — Mikrobiologie — Zählung von Hefen und Schimmelpilzen*

DIN EN ISO 18416, *Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Nachweis von Candida albicans*

DIN EN ISO 21148, *Kosmetik — Mikrobiologie — Allgemeine Anleitungen zur mikrobiologischen Untersuchung*

DIN EN ISO 21149, *Kosmetik — Mikrobiologie — Zählung und Nachweis von aeroben mesophilen Bakterien*

DIN EN ISO 21150, *Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Nachweis von Escherichia coli*

DIN EN ISO 22717, *Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Nachweis von Pseudomonas aeruginosa*

DIN EN ISO 22718, *Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Nachweis von Staphylococcus aureus*

— Leerseite —

**Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Nachweis von spezifizierten und
nichtspezifizierten Mikroorganismen (ISO/FDIS 18415:2017)**

Élément introductif — Élément central — Élément complémentaire (ISO/FDIS 18415:2017)

Cosmetics — Microbiology — Detection of specified and non-specified microorganisms (ISO/FDIS 18415:2017)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokumentstufe: parallele formelle Abstimmung vorgelegt

Dokumentsprache: D

STD Version 2.8f

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	4
Vorwort	5
Einleitung	6
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Kurzbeschreibung	9
5 Verdünnungsmittel und Nährmedien	10
5.1 Allgemeines	10
5.2 Verdünnungsmittel für die Mikroorganismensuspension (Trypton-Natriumchlorid-Lösung)	10
5.2.1 Allgemeines	10
5.2.2 Zusammensetzung	10
5.2.3 Herstellung	10
5.3 Nährmedien	10
5.3.1 Allgemeines	10
5.3.2 Anreicherungsbouillon	11
5.3.3 Nicht selektives Agarmedium	11
6 Geräte und Glasgeräte	12
7 Mikroorganismenstämme	12
8 Handhabung von kosmetischen Mitteln und Laborproben	13
9 Durchführung	13
9.1 Allgemeine Empfehlungen	13
9.2 Herstellung der Erstverdünnung in der Anreicherungsbouillon	13
9.2.1 Allgemeines	13
9.2.2 Mit Wasser mischbare Produkte	13
9.2.3 Mit Wasser nicht mischbare Produkte	13
9.2.4 Filtrierbare Produkte	13
9.3 Bebrütung der Erstverdünnung	14
9.4 Isolierung spezifizierter und nichtspezifizierter Mikroorganismen	14
9.5 Verfahren zur Identifizierung des spezifizierten Mikroorganismus:	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
9.5.1 Gram-Färbung	14
9.5.2 Untersuchung auf Oxidase	14
9.5.3 Identifizierungsprüfung	14
9.6 Verfahren zur Identifizierung des spezifizierten Mikroorganismus: <i>Escherichia coli</i>	15
9.6.1 Gram-Färbung	15
9.6.2 Untersuchung auf Oxidase	15
9.6.3 Identifizierungsprüfung	15
9.7 Verfahren zur Identifizierung des spezifizierten Mikroorganismus:	
<i>Staphylococcus aureus</i>	15
9.7.1 Gram-Färbung	15
9.7.2 Untersuchung auf Katalase	15

9.7.3	Identifizierungsprüfung.....	15
9.8	Verfahren zur Identifizierung des spezifizierten Mikroorganismus: <i>Candida albicans</i>	16
9.8.1	Gram-Färbung.....	16
9.8.2	Identifizierungsprüfung.....	16
9.9	Verfahren zur Identifizierung nicht spezifizierter Mikroorganismen	16
9.9.1	Gram-Färbung.....	16
9.9.2	Untersuchung auf Oxidase	16
9.9.3	Untersuchung auf Katalase	16
9.9.4	Identifizierungsprüfungen.....	16
10	Auswertung der Ergebnisse.....	17
10.1	Nachweis von spezifizierten Mikroorganismen.....	17
10.2	Nachweis von nichtspezifizierten Mikroorganismen	17
10.3	Abwesenheit von Mikroorganismen	17
11	Neutralisierung der antimikrobiellen Eigenschaften des Produkts	17
11.1	Allgemeines	17
11.2	Herstellung des Inokulums.....	17
11.3	Eignung des Nachweisverfahrens durch Anreicherung.....	18
11.3.1	Kurzbeschreibung.....	18
11.3.2	Durchführung	18
11.3.3	Interpretation der Ergebnisse der Eignungsprüfung.....	18
12	Prüfbericht.....	19
Anhang A (informativ) Allgemeines Schema zur Identifizierung von Mikroorganismen		20
Anhang B (informativ) Weitere Medien.....		21
B.1	Weitere Anreicherungsbouillon	21
B.1.1	Modifizierte Letheen-Bouillon [11]	21
B.1.2	Caseinpepton-Sojalecithin-Polysorbat 20-Flüssigmedium (FCDLP 20).....	21
B.1.3	Soja-Casein-Pepton-Medium mit Lecithin und Polysorbat 80 (SCDLP 80-Bouillon).....	22
B.1.4	D/E-Neutralisierungs-Bouillon (Dey/Engley-Neutralisierungs-Bouillon) [14].....	22
B.2	Weiteres nicht selektives Agarmedium — Soja-Casein-Pepton-Nährmedium mit Agar (SCD-Bouillon mit Agar).....	23
B.2.1	Zusammensetzung	23
B.2.2	Herstellung	23
Anhang C (informativ) Neutralisierungsmittel für die antimikrobielle Wirkung von Konservierungsmitteln und Spülflüssigkeiten.....		24
Literaturhinweise.....		25

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 18415:2017) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 217 *Cosmetics* in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 392 *Kosmetische Mittel* erarbeitet, dessen Sekretariat vom AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 18415:2011 ersetzen.

Dieses Dokument wurde unter einem Mandat erarbeitet, das die Europäische Kommission und die Europäische Freihandelszone dem CEN erteilt haben.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/FDIS 18415:2017 wurde vom CEN als FprEN ISO 18415:2017 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/TC 217, *Cosmetics*.

Diese zweite Ausgabe ersetzt die erste Ausgabe (ISO 18415:2007), welche in Form einer Minor Revision mit folgenden Änderungen überarbeitet wurde:

- in 3.8 wurde „validiert“ in „sich als geeignet erwiesen hat“ geändert;
- in Abschnitt 4 wurde „validiert“ in „nachgewiesen“ geändert;
- in 5.1 wurde „validiert wurde/wurden“ in „sich als geeignet erwiesen hat/haben“ geändert;
- in 5.2.1, 5.3.3.1, 11.3.1, 11.3.2 und in der Überschrift von 11.3.3 wurden die Begriffe „Validierungsverfahren“, „Validierung“ und „Validierungsprüfung“ in „Eignungsprüfung“ geändert;
- in der Überschrift von 11.3. wurde der Begriff „Validierung“ in „Eignung“ geändert;
- in 11.3.3 wurde „validiert“ in „zufriedenstellend“ geändert;
- in Abschnitt 12 wurde der Begriff „Validierung“ in „Nachweis der Eignung“ geändert.

Einleitung

Mikrobiologische Untersuchungen von kosmetischen Mitteln werden nach einer geeigneten mikrobiologischen Risikoanalyse durchgeführt, um deren Qualität und Sicherheit für Verbraucher sicherzustellen.

Die mikrobiologische Risikoanalyse hängt von verschiedenen Parametern ab, beispielsweise:

- mögliche Veränderung von kosmetischen Mitteln;
- Pathogenität von Mikroorganismen;
- Stelle, an der das kosmetische Mittel aufgetragen wird (Haare, Haut, Augen, Schleimhäute);
- Verbrauchertyp (Erwachsene, Kinder, einschließlich Kinder unter 3 Jahren).

Für kosmetische und weitere topische Mittel kann der Nachweis von Hautpathogenen, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans*, maßgeblich sein, da sie Haut- oder Augeninfektionen verursachen können. Der Nachweis anderer Arten von Mikroorganismen könnte wichtig sein, da diese Mikroorganismen (einschließlich Indikatoren für fäkale Verunreinigungen, z. B. *Escherichia coli*) auf Fehler hinsichtlich der Hygiene während des Herstellungsprozesses schließen lassen.

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument gibt allgemeine Anleitungen sowohl für den Nachweis und die Identifizierung von spezifizierten Mikroorganismen in kosmetischen Mitteln als auch für den Nachweis und die Identifizierung von anderen Arten nichtspezifizierter aerober mesophiler Mikroorganismen in kosmetischen Mitteln.

Die in diesem Dokument als spezifiziert angesehenen Mikroorganismen könnten nach den nationalen Praktiken oder Regelungen von Land zu Land unterschiedlich sein. Die meisten der als spezifiziert angesehenen Mikroorganismen schließen eine oder mehrere der folgenden Arten ein: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans*.

Um die Qualität des Produkts und die Sicherheit für Verbraucher sicherzustellen, ist es ratsam, eine geeignete mikrobiologische Risikoanalyse zur Bestimmung der Arten von kosmetischen Mitteln durchzuführen, für die dieses Dokument anwendbar ist. Produkte, die ein geringes mikrobiologisches Risiko darstellen, umfassen jene mit geringer Wasseraktivität, alkoholisch-wässrige Produkte, Produkte mit extremen pH-Werten usw.

Das in diesem Dokument beschriebene Verfahren basiert auf dem Nachweis von mikrobiellem Wachstum in einem nicht selektiven Flüssigmedium (Anreicherungsbouillon), geeignet für den Nachweis einer mikrobiellen Kontamination, gefolgt von einer Isolierung der Mikroorganismen auf einem nicht selektiven Agarmedium. In Abhängigkeit von der erforderlichen Nachweisgrenze können andere Verfahren geeignet sein.

In diesem Dokument sind spezielle Hinweise zur Identifizierung von *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* angeführt. Andere Mikroorganismen, die unter den in diesem Dokument beschriebenen Bedingungen wachsen, können unter Anwendung geeigneter Untersuchungen nach einem allgemeinen Schema identifiziert werden (siehe Anhang A). Weitere Normen (z. B. ISO 18416, ISO 21150, ISO 22717, ISO 22718) können angebracht sein.

Wegen der großen Vielfalt an kosmetischen Mitteln innerhalb dieses Anwendungsbereichs könnte dieses Verfahren möglicherweise für einige Produkte nicht in allen Einzelheiten geeignet sein (z. B. bestimmte mit Wasser nicht mischbare Produkte). Ersatzweise können für die hier aufgeführten Untersuchungen andere Verfahren (z. B. automatisierte) zur Anwendung kommen, vorausgesetzt, dass deren Gleichwertigkeit nachgewiesen oder das Verfahren anderweitig validiert wurde.

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).

ISO 21148:—¹⁾, *Cosmetics — Microbiology — General instructions for microbiological examination*

EN 12353, *Chemische Desinfektionsmittel und Antiseptika — Aufbewahrung von Testorganismen für die Prüfung der bakteriziden, mykobakteriziden, sporiziden und fungiziden Wirkung*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

ISO und IEC stellen terminologische Datenbanken für die Verwendung in der Normung unter den folgenden Adressen bereit:

1) Veröffentlichung ausstehend.

— IEC Electropedia: unter <http://www.electropedia.org/>

— ISO Online browsing platform: unter <http://www.iso.org/obp>

3.1

Produkt

Anteil eines bestimmten kosmetischen Mittels, das im Labor zur Untersuchung entgegengenommen wird

3.2

Probe

Anteil des *Produkts* (3.1) (mindestens 1 g oder 1 ml), der bei der Untersuchung eingesetzt wird, um die *Erstverdünnung* (3.3) herzustellen

3.3

Erstverdünnung

Suspension (oder Lösung) der *Probe* (3.2) in einem festgelegten Volumen einer geeigneten *Anreicherungsbouillon* (3.8)

3.4

Probenverdünnung

Verdünnung der *Erstverdünnung* (3.3)

3.5

aerobe mesophile Mikroorganismen

mesophile Bakterien oder Hefe, die unter den in diesem Dokument festgelegten aeroben Bedingungen wachsen

Anmerkung 1 zum Begriff: Unter den beschriebenen Bedingungen sind andere Arten von Mikroorganismen (z. B. Schimmelpilze) nachweisbar.

3.6

spezifizierte Mikroorganismen

aerobe mesophile Bakterien oder Hefe, die in einem kosmetischen Mittel nicht erwünscht und als hautpathogene Art anerkannt sind/ist, welche sich nachteilig auf die Gesundheit des Menschen auswirken können/kann, oder die ein Indikator für Fehler hinsichtlich der Hygiene während des Herstellungsprozesses sind/ist

3.6.1

Pseudomonas aeruginosa

Gram-negative stäbchenförmige Bakterie, beweglich; glatte Kolonien, die braun oder grünlich pigmentiert sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Haupteigenschaften für die Identifizierung sind Wachstum auf selektivem Cetrimid-Agarmedium, Oxidase-positiv, Bildung von diffusionsfähigen fluoreszierenden Pigmenten und Bildung eines löslichen Phenazinpigments (Pyocyanin) in geeigneten Nährmedien.

Anmerkung 2 zum Begriff: *Pseudomonas aeruginosa* kann aus einer großen Vielfalt von Umweltquellen isoliert werden, insbesondere aus Wasser, und es hat ein sehr hohes Potential, viele verschiedene Substrate zu verderben. Es kann beim Menschen Infektionen der Haut bzw. im Bereich der Augen hervorrufen. Es ist aufgrund seiner potentiellen Pathogenität und seinem Vermögen, die physikalisch-chemischen Eigenschaften der kosmetischen Zusammensetzung zu beeinträchtigen, nicht in kosmetischen Mitteln erwünscht.

3.6.2

Escherichia coli

Gram-negative stäbchenförmige Bakterie, beweglich, glatte Kolonien

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Haupteigenschaften sind Katalase-positiv, Oxidase-negativ, Fermentation von Lactose, Bildung von Indol, Wachstum auf selektivem Nährmedium, das Gallensalze enthält mit charakteristischen Kolonien.

Anmerkung 2 zum Begriff: *Escherichia coli* kann aus feuchten Umweltquellen (Luft, Wasser, Böden) isoliert werden und ist ein Indikator für fäkale Verunreinigungen.

3.6.3

Staphylococcus aureus

Gram-positive Kokken, die hauptsächlich in traubenähnlichen Clustern angeordnet sind, glatte Kolonien, die üblicherweise gelb pigmentiert sind

Anmerkung 1 zum Begriff: Die Haupteigenschaften für die Identifizierung sind Wachstum auf speziellem selektivem Nährmedium, Katalase-positiv, Koagulase-positiv.

Anmerkung 2 zum Begriff: *Staphylococcus aureus* ist bei Menschen eine opportunistisch pathogene Bakterie, die auch auf der Haut von gesunden Personen vorhanden sein kann, ohne bei ihnen eine offensichtliche Krankheit hervorzurufen. Es ist ein spezifizierter Mikroorganismus und in kosmetischen Mitteln nicht erwünscht.

3.6.4

Candida albicans

Hefe, die weiße bis beige, weiche und konvexe Kolonien auf der Oberfläche eines nicht selektiven Agarmediums bildet

Anmerkung 1 zum Begriff: Das Hauptmerkmal für die Identifizierung besteht in der Ausbildung von Keimschlauch und/oder Pseudomycel und Chlamydospore, wenn die Untersuchung nach dem in diesem Dokument festgelegten Verfahren durchgeführt wird.

3.7

nichtspezifizierter Mikroorganismus

aerobe mesophile Bakterien oder Hefe, die in kosmetischen Mitteln vorkommen und nicht in 3.6 definiert sind

3.8

Anreicherungsbouillon

nicht selektives Flüssigmedium, das geeignete Neutralisierungsmittel und/oder Dispergiermittel enthält und das für das zu untersuchende Produkt (3.1) als geeignet erwiesen hat

4 Kurzbeschreibung

Der erste Schritt des Verfahrens ist die Durchführung einer Anreicherung unter Verwendung einer nicht-selektiven Bouillon, um die Anzahl der Mikroorganismen zu erhöhen ohne das Risiko der Hemmung durch die selektiven Zusatzstoffe, die in selektiven/differenzierenden Nährmedien vorhanden sind.

Die folgenden Schritte (Isolierung und Identifizierung) werden nach Bedarf unter Anwendung entsprechender Bebrütungsbedingungen und geeigneter Identifizierungsprüfungen, wie in dem vorliegenden Dokument beschrieben, durchgeführt.

Die mögliche Hemmungswirkung von mikrobiellem Wachstums durch die Probe muss neutralisiert werden, um den Nachweis von lebensfähigen Mikroorganismen zu ermöglichen [9]. In allen Fällen und unabhängig von der Verfahrensweise muss die Neutralisierung der antimikrobiellen Eigenschaften des Produkts überprüft und nachgewiesen werden [9], [10], [11].

5 Verdünnungsmittel und Nährmedien

5.1 Allgemeines

Allgemeine Festlegungen sind in ISO 21148 angegeben. Wenn in einer Zusammensetzung Wasser verwendet wird, wird destilliertes oder gereinigtes Wasser, wie in ISO 21148 festgelegt, verwendet.

Die Anreicherungsbouillon ist zu verwenden, um die Probe zu dispergieren und die mikrobielle Ausgangspopulation zu erhöhen. Sie darf Neutralisierungsmittel enthalten, wenn die zu untersuchende Probe antimikrobielle Eigenschaften hat. Die Wirksamkeit der Neutralisierung muss nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 11). Informationen bezüglich geeigneter Neutralisierungsmittel sind in Anhang C angegeben.

Die Anreicherungsbouillon (siehe 5.3.2.1) oder alle in Anhang B angegebenen Bouillons ist/sind unter der Voraussetzung, dass sie sich nach Abschnitt 11 als geeignet erwiesen hat/haben, für die Überprüfung auf das Vorhandensein von spezifizierten und nichtspezifizierten Mikroorganismen nach diesem Dokument.

Andere Verdünnungsmittel und Nährmedien dürfen verwendet werden, wenn sie sich für die Anwendung als geeignet erwiesen haben.

5.2 Verdünnungsmittel für die Mikroorganismensuspension (Trypton-Natriumchlorid-Lösung)

5.2.1 Allgemeines

Das Verdünnungsmittel wird für die Herstellung der Bakterien- und Hefesuspensionen verwendet, die dann in der Eignungsprüfung verwendet werden (siehe Abschnitt 11).

5.2.2 Zusammensetzung

— Trypton, pankreatisch verdautes Casein	1,0 g
— Natriumchlorid	8,5 g
— Wasser	1 000 ml

5.2.3 Herstellung

Die Bestandteile werden in Wasser durch Mischen unter Erwärmen gelöst. Es wird in geeignete Behälter abgefüllt. Es wird 15 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert, gemessen bei Raumtemperatur, $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.3 Nährmedien

5.3.1 Allgemeines

Nährmedien dürfen wie nachstehend beschrieben oder aus wasserfreien Nährmedien nach den Anweisungen des Herstellers hergestellt werden.

Fertigmedien dürfen verwendet werden, wenn deren Zusammensetzung und/oder Ertragskoeffizienten mit der in der vorliegenden Norm angegebenen Zusammensetzung vergleichbar ist/sind.

5.3.2 Anreicherungsbouillon

5.3.2.1 Eugon LT 100-Bouillon

5.3.2.1.1 Allgemeines

Dieses Nährmedium enthält Inhaltsstoffe, die Hemmstoffe neutralisieren, die in der Probe vorhanden sind: Lecithin und Polysorbat 80 sowie das Dispergiermittel Octoxynol 9.

5.3.2.1.2 Zusammensetzung

— Casein, pankreatisch verdaut	15,0 g
— Sojamehl, papainisch verdaut	5,0 g
— L-Cystin	0,7 g
— Natriumchlorid	4,0 g
— Natriumsulfit	0,2 g
— Glucose	5,5 g
— Ei-Lecithin	1,0 g
— Polysorbat 80	5,0 g
— Octoxynol 9	1,0 g
— Wasser	1 000 ml

5.3.2.1.3 Herstellung

Nacheinander werden Polysorbat 80, Octoxynol 9 und Ei-Lecithin in siedendem Wasser vollständig gelöst. Die übrigen Bestandteile werden durch Mischen unter Erwärmen gelöst. Es wird in geeignete Behälter abgefüllt. Es wird 15 min bei 121 °C im Autoklaven sterilisiert. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert, gemessen bei Raumtemperatur, $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.3.2.2 Weitere Anreicherungsbouillons

Weitere Anreicherungsbouillons dürfen je nach Eignung verwendet werden (siehe Anhang B).

5.3.3 Nicht selektives Agarmedium

5.3.3.1 Allgemeines

Dieses Medium wird für die Isolierung und den Nachweis von spezifizierten und nichtspezifizierten Mikroorganismen, die nach der Anreicherung in der Erstverdünnung vorliegen, und zur Herstellung des in dem Verfahren der Eignungsprüfung verwendeten Inokulums verwendet.

5.3.3.2 Soja-Casein-Pepton-Agar (SCDA) oder Trypton-Soja-Agar (TSA)

5.3.3.2.1 Zusammensetzung

— Casein, pankreatisch verdaut	15,0 g
— Sojamehl, papainisch verdaut	5,0 g
— Natriumchlorid	5,0 g
— Agar	15,0 g
— Wasser	1 000 ml

5.3.3.2.2 Herstellung

Die Bestandteile bzw. das wasserfreie Fertigmedium werden/wird in Wasser durch Mischen unter Erwärmen gelöst. Das Nährmedium wird in geeignete Behälter abgefüllt. Es wird im Autoklaven bei 121 °C 15 min sterilisiert. Nach der Sterilisation und dem Abkühlen muss der pH-Wert, gemessen bei Raumtemperatur, $7,3 \pm 0,2$ betragen.

5.3.3.3 Weitere nicht selektive Agarmedien

Weitere nicht selektive, nicht neutralisierende Agarmedien dürfen verwendet werden (siehe Anhang B).

6 Geräte und Glasgeräte

Die Laborausrüstung, Geräte und Glasgeräte sind in ISO 21148 beschrieben.

7 Mikroorganismenstämme

Zur Untersuchung der Wiederfindungsrate der Versuchsbedingungen werden drei spezifizierte Mikroorganismen verwendet: zwei Stämme, die sowohl für Gram-negative als auch für Gram-positive Bakterien repräsentativ sind, und ein Hefestamm.

— *Pseudomonas aeruginosa* ATCC²⁾ 9027 (gleichwertiger Stamm: CIP³⁾ 82.118, NCIMB⁴⁾ 8626, NBRC⁵⁾ 13275, KCTC⁶⁾ 2513 oder ein anderer gleichwertiger Stamm aus einer nationalen Stammsammlung).

Eine Alternative für einen Gram-negativen Stamm kann sein: *Escherichia coli* ATCC 8739 (gleichwertiger Stamm: CIP 53.126, NCIMB 8545, NBRC 3972 oder KCTC 2571 oder ein anderer gleichwertiger Stamm aus einer nationalen Stammsammlung).

— *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (gleichwertiger Stamm: CIP 4.83, NCIMB 9518, NBRC 13276, KCTC 1916 oder ein anderer gleichwertiger Stamm aus einer nationalen Stammsammlung);

— *Candida albicans* ATCC 10231 (gleichwertiger Stamm: IP⁷⁾ 48.72, NCPF⁸⁾ 3179, NBRC 1594, KCTC 17205 oder ein anderer gleichwertiger Stamm aus einer nationalen Stammsammlung).

Die Kultur sollte nach den vom Lieferanten des Referenzstamms angegebenen Verfahren rekonstituiert werden.

Die Stämme können nach EN 12353 im Labor aufbewahrt werden.

2) ACCT = American Type Culture Collection.

3) CIP = Collection de l'Institut Pasteur.

4) NCIMB = National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria.

5) NBRC = Biological Resource Center, NITE.

6) KCTC = Korean Collection for Type Culture.

7) IP = Institut Pasteur

8) NCPF = National Collection of Pathogenic Fungi.