

DIN EN ISO 18416



ICS 07.100.99; 71.100.70

Einsprüche bis 2015-06-17
Vorgesehen als Ersatz für
DIN EN ISO 18416:2009-10

Entwurf

**Kosmetische Mittel –
Mikrobiologie –
Nachweis von *Candida albicans* (ISO FDIS 18416:2015);
Deutsche und Englische Fassung FprEN ISO 18416:2015**

Cosmetics –
Microbiology –
Detection of *Candida albicans* (ISO FDIS 18416:2015);
German and English version FprEN ISO 18416:2015

Cosmétiques –
Microbiologie –
Détection de *Candida albicans* (ISO FDIS 18416:2015);
Version allemande et anglaise FprEN ISO 18416:2015

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2015-04-17 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

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

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de 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/stellungnahme 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 (Hausanschrift: 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 41 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 18416:2015) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 217 „Cosmetics“ (ISIRI, Iran) in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 392 „Kosmetische Mittel“ erarbeitet, dessen Sekretariat von 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 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 18415	siehe	DIN EN ISO 18415
ISO 21148	siehe	DIN EN ISO 21148
ISO 21149	siehe	DIN EN ISO 21149
ISO 29261	siehe	DIN EN ISO 29261

Änderungen

Gegenüber DIN EN ISO 18416:2009-10 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 18415, *Kosmetik — Mikrobiologie — Nachweis von spezifizierten und nichtspezifizierten Mikroorganismen*

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 29261, *Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Leitlinien für die Risikobewertung und Identifikation von mikrobiologisch risikoarmen Produkten*

Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Nachweis von *Candida albicans* (ISO/FDIS 18416:2015)

*Cosmétiques — Microbiologie — Détection de *Candida albicans* (ISO/FDIS 18416:2015)*

*Cosmetics — Microbiology — Detection of *Candida albicans* (ISO/FDIS 18416:2015)*

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm

Dokument-Untertyp:

Dokumentstufe: parallele formelle Abstimmung vorgelegt

Dokumentsprache: D

Inhalt

	Seite
Vorwort	3
Einleitung.....	4
1 Anwendungsbereich	5
2 Normative Verweisungen	5
3 Begriffe	5
4 Kurzbeschreibung	6
5 Verdünnungsmittel und Nährmedien.....	6
5.1 Allgemeines	6
5.2 Verdünnungsmittel für die Hefesuspension (Trypton Natriumchlorid Lösung)	7
5.3 Nährmedien	7
6 Geräte und Glasgeräte	9
7 Mikroorganismenstämme	9
8 Handhabung von kosmetischen Mitteln und Laborproben.....	10
9 Durchführung	10
9.1 Allgemeine Empfehlungen.....	10
9.2 Herstellung der Erstverdünnung in der Anreicherungsbouillon	10
9.3 Bebrütung der beimpften Anreicherungsbouillon	11
9.4 Nachweis und Identifizierung von <i>Candida albicans</i>	11
10 Angabe der Ergebnisse (Nachweis von <i>Candida albicans</i>)	12
11 Neutralisierung der antimikrobiellen Eigenschaften des Produkts	12
11.1 Allgemeines	12
11.2 Herstellung des Inokulums.....	12
11.3 Eignung des Nachweisverfahrens	13
12 Untersuchungsbericht	14
Anhang A (informativ) Weitere Nährmedien	15
A.1 Weitere Anreicherungsbouillons	15
A.2 Weitere Agarmedien zur Eignungsprüfung	17
A.3 Weiteres selektives Agarmedium — Kartoffel-Dextrose-Agarmedium mit Antibiotika	18
Anhang B (informativ) Neutralisierungsmittel für die antimikrobielle Wirkung von Konservierungsmitteln und Spülflüssigkeiten	19
Literaturhinweise	20

Vorwort

Dieses Dokument (FprEN ISO 18416:2015) 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 formellen Abstimmung vorgelegt.

Dieses Dokument wird EN ISO 18416:2009 ersetzen.

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

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/FDIS 18416:2015 wurde vom CEN als FprEN ISO 18416:2015 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Einleitung

Mikrobiologische Untersuchungen von kosmetischen Mitteln werden entsprechend einer geeigneten mikrobiologischen Risikoanalyse durchgeführt, um deren Qualität und Sicherheit für Konsumenten 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 *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Candida albicans* maßgeblich sein, da sie Haut- oder Augeninfektionen verursachen können. Der Nachweis anderer Arten von Mikroorganismen kann wichtig sein, da derartige Mikroorganismen (einschließlich Indikatoren für fäkale Verunreinigungen, z. B. *Escherichia coli*) auf Fehler hinsichtlich der Hygiene während des Herstellungsprozesses schließen lassen.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm gibt allgemeine Anleitungen für den Nachweis und die Identifizierung des vorgeschriebenen Mikroorganismus *Candida albicans* in kosmetischen Mitteln. Die in dieser Internationalen Norm vorgegebenen Mikroorganismen können in Übereinstimmung mit nationalen Praktiken oder Regelungen von Land zu Land unterschiedlich sein.

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 diese Internationale Norm anwendbar ist. Produkte, die ein geringes mikrobiologisches Risiko (siehe ISO 29261) darstellen, umfassen Produkte mit geringer Wasseraktivität, alkoholisch-wässrige Produkte, Produkte mit extremen pH-Werten usw.

Das in dieser Internationalen Norm beschriebene Verfahren basiert auf dem Nachweis von *Candida albicans* in einem nicht-selektiven Flüssigmedium (Anreicherungsbouillon), gefolgt von einer Isolation auf einem selektiven Agarmedium. In Abhängigkeit von der erforderlichen Nachweisgrenze können andere Verfahren angemessen sein.

ANMERKUNG Für den Nachweis von *Candida albicans* kann eine Subkultivierung auf nicht-selektiven Nährmedien erfolgen, gefolgt von geeigneten Schritten zur Identifizierung (z. B. unter Anwendung von Identifizierungskits).

Wegen der großen Vielfalt an kosmetischen Mitteln innerhalb dieses Anwendungsbereichs ist dieses Verfahren möglicherweise für einige Produkte nicht in allen Einzelheiten geeignet (z. B. bestimmte mit Wasser nicht mischbare Produkte). Andere Internationale Normen (z. B. ISO 18415) können geeignet sein. 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, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 21148:2005, *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*

ISO 29621, *Cosmetics — Microbiology — Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

Produkt

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

3.2

Probe

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

3.3
Erstverdünnung
Suspension (oder Lösung) der Probe in einem festgelegten Volumen einer geeigneten Anreicherungsbouillon

3.4
Probenverdünnung
Verdünnung der Erstverdünnung

3.5
vorgegebene Mikroorganismen
aerobe mesophile Bakterien oder Hefe, die in einem kosmetischen Mittel nicht erwünscht sind/ist, weil sie Haut- oder Augeninfektionen verursachen können/kann oder die ein Indikator für Fehler hinsichtlich der Hygiene sind/ist

3.6
Candida albicans
Hefe, die weiße bis beige, weiche und konvexe Kolonien auf der Oberfläche eines selektiven Nährmediums bildet

ANMERKUNG Das Hauptmerkmal für die Identifizierung besteht in der Ausbildung von Keimschlauch und/oder Pseudomycel und Chlamydospore, wenn die Untersuchung nach dem in dieser Internationalen Norm festgelegten Verfahren durchgeführt wird.

3.7
Anreicherungsbouillon
nicht-selektives Flüssigmedium, das geeignete Neutralisierungsmittel und/oder Dispergiermittel enthält und das sich für das zu untersuchende Produkt 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.

Der zweite Schritt (Isolierung) des Versuchs wird auf einem selektiven Nährmedium, gefolgt von Untersuchungen zur Identifizierung, durchgeführt.

Zur Verhinderung der möglichen Hemmung mikrobiellen Wachstums durch die Probe muss sie neutralisiert werden, um den Nachweis von lebensfähigen Mikroorganismen zu ermöglichen [1]. In allen Fällen und unabhängig von der Verfahrensweise muss die Neutralisierung der antimikrobiellen Eigenschaften des Produkts überprüft und nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 11).

5 Verdünnungsmittel und Nährmedien

5.1 Allgemeines

Allgemeine Anleitungen sind in ISO 21148 angegeben. Wenn in dieser Internationalen Norm Wasser erwähnt wird, muss destilliertes oder gereinigtes Wasser, wie in ISO 21148 festgelegt, verwendet werden.

Die Anreicherungsbouillon wird verwendet, um die Probe zu dispergieren und die mikrobielle Ausgangspopulation zu erhöhen. Sie kann 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 B angegeben.

Die Anreicherungsbouillon (5.3.3.1) bzw. alle in Anhang A 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 *Candida albicans* nach dieser Internationalen Norm geeignet.

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

5.2 Verdünnungsmittel für die Hefesuspension (Trypton Natriumchlorid Lösung)

5.2.1 Allgemeines

Das Verdünnungsmittel wird für die Herstellung der Hefesuspension verwendet, die dann im geeigneten Untersuchungsverfahren verwendet wird (siehe Abschnitt 11).

5.2.2 Zusammensetzung

— Trypton; Casein, pankreatisch verdaut	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. Die Lösung wird in geeignete Behälter abgefüllt. Die Sterilisation wird im Autoklaven 15 min bei 121 °C durchgeführt.

Nach der Sterilisation und dem Abkühlen der Lösung muss der pH-Wert bei Messung bei Raumtemperatur $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.3 Nährmedien

5.3.1 Allgemeines

Nährmedien können unter Anwendung der nachstehend angegebenen Beschreibungen oder aus wasserfreien Nährmedien nach den Anweisungen des Herstellers hergestellt werden. Die beigelegten Anweisungen des Lieferanten der Nährmedien sollten befolgt werden.

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

5.3.2 Agarmedium zur geeigneten Untersuchung (siehe Abschnitt 11)

5.3.2.1 Sabouraud-Dextrose-Agar (SDA)

5.3.2.1.1 Zusammensetzung

— Dextrose	40,0 g
— tierisches Gewebe, peptisch verdaut	5,0 g
— Casein, pankreatisch verdaut	5,0 g
— Agar	15,0 g
— Wasser	1 000 ml

5.3.2.1.2 Herstellung

Die Bestandteile bzw. das wasserfreie Fertigmedium werden/wird in Wasser unter Erwärmen gelöst. Das Nährmedium wird in geeignete Behälter abgefüllt. Die Sterilisation wird in einem Autoklaven 15 min bei 121 °C durchgeführt. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert bei Messung bei Raumtemperatur $5,6 \pm 0,2$ betragen.

5.3.2.2 Weitere Agarmedien zur geeigneten Untersuchung

Weitere Agarmedien zur geeigneten Untersuchung dürfen je nach Eignung verwendet werden (siehe Anhang A).

5.3.3 Anreicherungsbouillon

5.3.3.1 Eugon LT 100-Bouillon

5.3.3.1.1 Allgemeines

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

5.3.3.1.2 Zusammensetzung

— Casein, pankreatisch verdaut	15,0 g
— Sojapepton	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

5.3.3.1.3 Herstellung

Die Bestandteile Polysorbat 80, Octoxynol-9 und Ei-Lecithin werden nacheinander in siedendem Wasser vollständig gelöst. Die weiteren Bestandteile werden durch Mischen unter Erwärmen gelöst. Das Nährmedium wird in geeignete Behälter abgefüllt. Die Sterilisation wird im Autoklaven 15 min bei 121 °C durchgeführt.

Nach der Sterilisation und dem Abkühlen der Lösung muss der pH-Wert bei Messung bei Raumtemperatur $7,0 \pm 0,2$ betragen.

5.3.3.2 Weitere Anreicherungsbouillons

Weitere Anreicherungsbouillons können je nach Eignung verwendet werden (siehe Anhang A).

5.3.4 Selektives Agarmedium zur Isolierung von *Candida albicans*

5.3.4.1 Sabouraud-Dextrose-Chloramphenicol-Agar

5.3.4.1.1 Zusammensetzung

— Dextrose	40,0 g
— tierisches Gewebe, peptisch verdaut	5,0 g
— Casein, pankreatisch verdaut	5,0 g
— Chloramphenicol	0,050 g
— Agar	15,0 g
— Wasser	1 000 ml

5.3.4.1.2 Herstellung

Die Bestandteile (einschließlich Chloramphenicol) bzw. das wasserfreie Fertigmedium werden/wird in Wasser durch Mischen unter Erwärmen gelöst. Das Nährmedium wird in geeignete Behälter abgefüllt. Die Sterilisation wird in einem Autoklaven 15 min bei 121 °C durchgeführt. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert bei Messung bei Raumtemperatur $5,6 \pm 0,2$ betragen.

5.3.4.2 Weitere selektive Agarmedien

Weitere selektive Agarmedien können je nach Eignung verwendet werden (siehe Anhang A).

5.3.5 Maismehlagar mit 1 % Polysorbat 80

5.3.5.1 Zusammensetzung

— Maismehlauszug	50,0 g
— Agar	15,0 g
— Polysorbat 80	10,0 g
— Wasser	1 000 ml

5.3.5.2 Herstellung

Die Bestandteile bzw. das wasserfreie Fertigmedium werden/wird in Wasser durch Mischen unter Erwärmen gelöst. Das Nährmedium wird in geeignete Behälter abgefüllt. Die Sterilisation wird in einem Autoklaven 15 min bei 121 °C durchgeführt. Nach der Sterilisation muss der pH-Wert bei Messung bei Raumtemperatur $6,0 \pm 0,2$ betragen.

6 Geräte und Glasgeräte

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

7 Mikroorganismenstämme

Für die Verifizierung der geeigneten Versuchsbedingungen wird der folgende repräsentative Stamm verwendet:

Candida albicans ATCC¹⁾ 10231 oder gleichwertiger Stamm: IP²⁾ 48.72, NCPF³⁾ 3179, NBRC⁴⁾ 1594, KCTC⁵⁾ 17205 oder eine andere gleichwertige nationale Stammsammlung.

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

Der Stamm kann im Labor nach EN 12353 aufbewahrt werden.

1) American Type Culture Collection.

2) Collection de l'Institut Pasteur.

3) National Collection of Pathogenic Fungi.

4) National Biological Resource Center.

5) Korean Collection for Type Culture.

8 Handhabung von kosmetischen Mitteln und Laborproben

Die zu untersuchenden Produkte sind bei Raumtemperatur aufzubewahren, falls erforderlich.

Vor oder nach der Untersuchung dürfen die Produkte (3.1) und Proben (3.2) nicht bebrütet, gekühlt oder eingefroren werden.

Die Probenahme der zu untersuchenden kosmetischen Produkte sollte wie in ISO 21148 beschrieben vorgenommen werden. Die Proben sind nach den Festlegungen in ISO 21148 und entsprechend dem in Abschnitt 9 angegebenen Verfahren zu untersuchen.

9 Durchführung

9.1 Allgemeine Empfehlungen

Zur Herstellung der Probe, Erstverdünnung und weiterer Verdünnungen sind steriles Material, Geräte und aseptische Arbeitstechniken anzuwenden. Bei der Herstellung der Erstverdünnung in einem entsprechenden Lösungsvermittler darf die Zeitdauer zwischen dem Ende der Herstellung und dem Zeitpunkt, zu dem das Inokulum in Kontakt mit der Anreicherungsbouillon kommt, 45 min nicht überschreiten, sofern es nicht in den bestehenden Unterlagen oder Dokumenten anders angegeben ist.

9.2 Herstellung der Erstverdünnung in der Anreicherungsbouillon

9.2.1 Allgemeines

Die Anreicherung wird aus einer Probe mit mindestens 1 g oder 1 ml des gut gemischten zu untersuchenden Produkts hergestellt, das in mindestens 9 ml Anreicherungsbouillon dispergiert wird.

Die genaue Masse bzw. das genaue Volumen der Probe S ist aufzuzeichnen.

Das Verfahren ist zu überprüfen, um sicherzustellen, dass die Zusammensetzung (Neutralisierungsmittel möglicherweise hinzugefügt) und das Volumen der Bouillon ausreichend aufeinander abgestimmt sind (siehe 11.3).

ANMERKUNG In einigen Fällen, und falls möglich, erleichtert die Filtration des kosmetischen Mittels durch ein Membranfilter, das anschließend in die Anreicherungsbouillon eingetaucht wird, die Neutralisierung der antimikrobiellen Eigenschaften des Produkts (siehe 11.3).

9.2.2 Mit Wasser mischbare Produkte

Die Probe S des Produkts wird in einen geeigneten Behälter überführt, der ein angemessenes Volumen an Bouillon enthält.

9.2.3 Mit Wasser nicht mischbare Produkte

Die Probe S des Produkts wird in einen geeigneten Behälter überführt, der eine geeignete Menge Lösungsvermittler (z. B. Polysorbat 80) enthält.

Die Probe wird im Lösungsvermittler dispergiert, und es wird ein angemessenes Volumen an Bouillon hinzugefügt.

9.2.4 Filtrierbare Produkte

Es ist ein Membranfilter mit einer Nennporenweite von höchstens 0,45 μm anzuwenden.

Die Probe S wird auf das Membranfilter in einem Filtriergerät (siehe ISO 21148) überführt. Es wird sofort filtriert, und das Membranfilter wird unter Anwendung festgelegter Volumina an Wasser und/oder Verdünnungsmittel gewaschen.

Das Membranfilter wird in ein Röhrchen oder einen Kolben von geeigneter Größe überführt und eingetaucht, das/der ein angemessenes Volumen an Bouillon enthält.

9.3 Bebrütung der beimpften Anreicherungsbouillon

Die in Bouillon hergestellte Erstverdünnung (siehe 9.2) wird mindestens 20 h bei $(32,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$, aber nicht länger als 72 h bebrütet.

9.4 Nachweis und Identifizierung von *Candida albicans*

9.4.1 Isolation

Unter Anwendung einer sterilen Öse wird ein aliquoter Anteil der bebrüteten Anreicherungsbouillon auf der Oberfläche des Sabouraud-Dextrose-Chloramphenicol-Agar ausgestrichen, um isolierte Kolonien zu erhalten.

Die Petrischale wird umgedreht und dann 24 h bis 48 h bei $(32,5 \pm 2,5) ^\circ\text{C}$ bebrütet.

Es wird auf charakteristische Kolonien überprüft (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 — Morphologische Eigenschaften von *Candida albicans* auf selektivem Agarmedium

Selektives Nährmedium	Erscheinungsbild der Kolonien von <i>Candida albicans</i>
Sabouraud-Dextrose-Chloramphenicol-Agar	Weiß bis beige, weich und konvex

9.4.2 Identifizierung von *Candida albicans*

9.4.2.1 Allgemeines

Candida albicans kann dimorph auftreten und sowohl Pseudohyphen, einige echte Hyphen und Cluster von runden Blastokonidien als auch große, dickwandige Chlamydosporen ausbilden. Bei niedriger Umgebungstemperatur hat die Kultur möglicherweise die Form eines Pseudomycels; sie kann jedoch bei höheren Temperaturen zur einzelligen Form wechseln.

Es ist mit den folgenden Untersuchungen der verdächtigen Kolonien fortzufahren, die auf dem Sabouraud-Dextrose-Chloramphenicol-Agarmedium isoliert sind. Das Vorhandensein von *Candida albicans* kann durch weitere geeignete Untersuchungen von Kulturen sowie biochemische Untersuchungen bestätigt werden.

9.4.2.2 Gram-Färbung

Es ist die in ISO 21148 festgelegte Verfahrensweise zu befolgen.

Bei der mikroskopischen Betrachtung müssen eine violette Färbung, kurze ovoide oder verlängerte Zellen, manchmal mit Sprosszellen, erkennbar sein.

9.4.2.3 Ausbildung eines Keimschlauchs

9.4.2.3.1 0,5 ml bis 1 ml Serum (fetales Kalbs oder Pferdeserum) wird in ein kleines Reagenzglas gegeben.

9.4.2.3.2 Ein geringer Teil der zu untersuchenden Hefekolonie wird im Serum emulgiert.

9.4.2.3.3 Das Serum wird 1,5 h bis 2 h bei $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ in einem Wasserbad oder 3 h bei $(37 \pm 2) ^\circ\text{C}$ in einem Brutschrank bebrütet.

9.4.2.3.4 Es wird ein Tropfen Serum auf einen Objektträger gegeben; darüber wird ein Deckgläschen gelegt und das Untersuchungsgut wird mikroskopisch auf die Ausbildung eines Keimschlauchs untersucht.