DIN EN ISO 21322

ICS 07.100.40

Einsprüche bis 2021-10-06

Entwurf

Kosmetische Mittel – Mikrobiologie – Prüfung von getränkten oder beschichteten Feuchttüchern und Masken (ISO 21322:2020); Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 21322:2021

Cosmetics – Microbiology – Testing of impregnated or coated wipes and masks (ISO 21322:2020); German and English version prEN ISO 21322:2021

Cosmétiques – Microbiologie – Essais sur lingettes et masques imprégnés ou enduits (ISO 21322:2020); Version allemande et anglaise prEN ISO 21322:2021

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2021-08-06 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 oder 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 70 Seiten

DIN-Normenausschuss Lebensmittel und landwirtschaftliche Produkte (NAL)

AVA Documents Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

Nationales Vorwort

Der Text von ISO 21322:2020 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 217 „Cosmetics“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 392 „Kosmetische Mittel“ als prEN ISO 21322:2021 übernommen, 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 beigefügt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Für die in diesem Dokument zitierten Dokumente wird im Folgenden auf die entsprechenden deutschen Dokumente hingewiesen:

ISO 11930	siehe	DIN EN ISO 11930
ISO 16212	siehe	DIN EN ISO 16212
ISO 17516	siehe	DIN EN ISO 17516
ISO 18415	siehe	DIN EN ISO 18415
ISO 18416	siehe	DIN EN ISO 18416
ISO 21148	siehe	DIN EN ISO 21148
ISO 21149	siehe	DIN EN ISO 21149
ISO 21150	siehe	DIN EN ISO 21150
ISO 22717	siehe	DIN EN ISO 22717
ISO 22718	siehe	DIN EN ISO 22718
ISO 29621	siehe	DIN EN ISO 29621

Aktuelle Informationen zu diesem Dokument können über die Internetseiten von DIN (www.din.de) durch eine Suche nach der Dokumentennummer aufgerufen werden.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

DIN EN ISO 11930, *Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Bewertung des antimikrobiellen Schutzes eines kosmetischen Produktes*

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

DIN EN ISO 17516, *Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Mikrobiologische Grenzwerte*

DIN EN ISO 18415, *Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Nachweis von spezifizierten und nichtspezifizierten Mikroorganismen*

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

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

DIN EN ISO 21149, *Kosmetische Mittel — 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*

DIN EN ISO 29621, *Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Leitlinien für die Risikobewertung und Identifikation von mikrobiologisch risikoarmen Produkten*

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

— Leerseite —

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

– Entwurf –

2021-08

prEN ISO 21322:2021

Titel de:	Kosmetische Mittel — Mikrobiologie — Prüfung von getränkten oder beschichteten Feuchttüchern und Masken (ISO 21322:2020)
Titel en:	Cosmetics — Microbiology — Testing of impregnated or coated wipes and masks (ISO 21322:2020)
Titel fr:	Cosmétiques — Microbiologie — Essais sur lingettes et masques imprégnés ou enduits (ISO 21322:2020)

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

Inhalt

Seite

Europäisches Vorwort **4**

Vorwort **5**

Einleitung **6**

1 Anwendungsbereich **7**

2 Normative Verweisungen **7**

3 Begriffe **7**

4 Kurzbeschreibung **8**
4.1 Allgemeine Angaben **8**
4.2 Auswahl der Untersuchungsprobe **8**
4.3 Auswahl des Verfahrens **9**
4.4 Wiederfindung von Mikroorganismen auf der Untersuchungsprobe **9**
4.5 Auszählung aerober mesophiler Mikroorganismen **9**
4.5.1 Allgemeines **9**
4.5.2 Überblick über das Plattenzählverfahren **9**
4.5.3 Überblick über das Membranfiltrationsverfahren **10**
4.6 Nachweis festgelegter Mikroorganismen durch das Anreicherungsverfahren **10**

5 Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährmedien **10**
5.1 Allgemeines **10**
5.2 Verdünnungsmittel und Neutralisierungsmittel **10**
5.3 Nährmedien **11**
5.3.1 Medien für die Auszählung und zum Nachweis **11**
5.3.2 Medien für die Vorbereitung von Sporen von *Bacillus subtilis* **11**

6 Geräte und Glasgeräte **11**

7 Mikroorganismenstämme **11**

8 Handhabung von kosmetischen Mitteln und Laborproben **11**

9 Durchführung **12**
9.1 Allgemeine Empfehlungen **12**
9.2 Auswahl und Herstellung der Untersuchungsprobe **12**
9.2.1 Auswahl der Untersuchungsprobe **12**
9.2.2 Herstellung der Erstverdünnung **12**
9.3 Wiederfindung von Mikroorganismen **12**
9.3.1 Allgemeines **12**
9.3.2 Behandlung im sterilen Einwegbeutel **13**
9.3.3 Schütteln/Rühren **13**
9.4 Auszählung aerober mesophiler Mikroorganismen **13**
9.4.1 Allgemeines **13**
9.4.2 Gussplattenverfahren **13**
9.4.3 Spatelplattenverfahren **14**
9.4.4 Membranfiltrationsverfahren **14**
9.4.5 Bebrütung **15**
9.4.6 Auszählung der Kolonien **15**
9.5 Nachweis festgelegter Mikroorganismen durch das Anreicherungsverfahren **15**
9.5.1 Allgemeines **15**

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

9.5.2 Prüfung auf festgelegte Mikroorganismen 15

10 Angabe der Ergebnisse 16
10.1 Auszählung aerober mesophiler Mikroorganismen 16
10.2 Nachweis festgelegter Mikroorganismen 16

11 Eignungsprüfung 16

12 Prüfbericht 17

Anhang A (normativ) Anleitung für Verfahren für die mikrobiologische Prüfung getränkter oder beschichteter Produkte — Reinigungstücher und Masken 18
A.1 Auswahl der Untersuchungsprobe 18
A.2 Auswahl des Zählverfahrens für aerobe mesophile Mikroorganismen 18
A.3 Wiederfindung von Mikroorganismen 19
A.4 Zusammenfassung des Verfahrens für die mikrobiologische Kontrolle von Reinigungstüchern und Masken 21

Anhang B (informativ) Angabe und Auswertung der Ergebnisse 22
B.1 Auszählung und Angabe der Ergebnisse 22
B.2 Beispiele für die Angabe von Ergebnissen — Plattenzählung: Gussplattenverfahren 24
B.2.1 Behandlung der Untersuchungsprobe 24
B.2.2 Einzeldosis-Augenmasken — Untersuchungsprobe 1 Einheit 24
B.2.3 Reinigungstücher-Packung — Untersuchungsprobe 1/5 einer Einheit (Untersuchungsprobe war ein großes Erfrischungstuch, weshalb 1/5 des Erfrischungstuches gewägt und geprüft wurde) 25
B.2.4 Einzeldosis-Gesichtsmasken — Untersuchungsprobe 1/2 Einheit 25
B.2.5 Einzeldosis-Augenmaske — Untersuchungsprobe 2 Einheiten (1 Einheit wiegt weniger als 1 g) 26
B.2.6 Einzeldosis-Gesichtsmaske — Untersuchungsprobe 1 Einheit 26
B.3 Beispiele für die Angabe von Ergebnissen — Plattenzählung: Filtrationsverfahren 26
B.3.1 Behandlung der Untersuchungsprobe 26
B.3.2 Reinigungstücher-Packung — Untersuchungsprobe 1 Einheit 27
B.3.3 Einzeldosis-Gesichtsmaske — Untersuchungsprobe 1/2 Einheit 27
B.3.4 Einzeldosis-Augenmaske — Untersuchungsprobe 2 Einheiten — jede Einheit wiegt weniger als 1 g 27
B.3.5 Einzeldosis-Gesichtsmaske — Untersuchungsprobe 1 Einheit 28
B.3.6 Einzeldosis-Gesichtsmaske — Untersuchungsprobe 1/2 Einheit 28

Anhang C (normativ) Verfahren für die Eignungsprüfung 30
C.1 Herstellung des Inokulums 30
C.1.1 Bakterien 30
C.1.2 *Candida albicans* 30
C.1.3 Herstellung von Sporen von *Bacillus subtilis* 30
C.2 Wiederfindung der Keimbelastung 33
C.3 Neutralisierung der antimikrobiellen Eigenschaften des Produktes 33
C.3.1 Allgemeines 33
C.3.2 Zählverfahren 33
C.3.3 Anreicherungsverfahren 34
C.4 Angabe von Ergebnissen 34
C.4.1 Wiederfindung der Keimbelastung 34
C.4.2 Neutralisierung der antimikrobiellen Eigenschaften des Produktes 34

Literaturhinweise 35

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

Europäisches Vorwort

Der Text von ISO 21322:2020 wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 217 „Cosmetics“ der Internationalen Organisation für Normung (ISO) erarbeitet und vom Technischen Komitee CEN/TC 392 „Kosmetische Mittel“ als prEN ISO 21322:2021 übernommen, dessen Sekretariat von AFNOR gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur CEN-Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO 21322:2020 wurde von CEN als prEN ISO 21322:2021 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Liste dieser Institute ist auf den Internetseiten von CEN abrufbar.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung nationaler Normungsinstitute (ISO Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird üblicherweise von Technischen Komitees von ISO 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 staatliche und nichtstaatliche Organisationen, die in engem Kontakt mit ISO stehen, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet bei allen elektrotechnischen Normungsthemen eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) 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. Es sollten insbesondere die unterschiedlichen Annahmekriterien für die verschiedenen ISO Dokumentenarten 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 erhaltenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname dient nur zur Unterrichtung der Anwender und bedeutet keine Anerkennung.

Für eine Erläuterung des freiwilligen Charakters von Normen, der Bedeutung ISO-spezifischer Begriffe und Ausdrücke in Bezug auf Konformitätsbewertungen sowie Informationen darüber, wie ISO die Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO, en: World Trade Organization) hinsichtlich technischer Handelshemmnisse (TBT, en: Technical Barriers to Trade) berücksichtigt, siehe www.iso.org/iso/foreword.html.

Dieses Dokument wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 217, *Cosmetics*, erarbeitet.

Rückmeldungen oder Fragen zu diesem Dokument sollten an das jeweilige nationale Normungsinstitut des Anwenders gerichtet werden. Eine vollständige Auflistung dieser Institute ist unter www.iso.org/members.html zu finden.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

Einleitung

Aus technischen Gründen sind aktuelle Normen über die Mikrobiologie kosmetischer Mittel möglicherweise nicht auf getränkte oder beschichtete kosmetische Mittel wie etwa Reinigungstücher und Masken anwendbar, bei denen kein direkter Kontakt mit der Rezeptur erfolgt.

Aufgrund ihrer Produktform oder Auslieferung ist es erforderlich, diese Normen anzuwenden, um die mikrobiologische Qualität dieser Produkte zu bewerten.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

1 Anwendungsbereich

Dieses Dokument enthält eine Anleitung für die Auszählung und/oder zum Nachweis von Mikroorganismen, die in kosmetischen Mitteln vorhanden sind, die sich auf einem damit getränkten oder beschichteten Träger befinden (z. B. Reinigungstücher und Masken), wenn die Probenahme und der mikrobiologische Einfluss des hergestellten Produktes im Hinblick auf die mikrobiologische Probenahme und Prüfung eine besondere Herausforderung darstellen.

Der Grundsatz dieses Dokumentes kann auch auf ähnliche Produkte (z. B. Kissen, getränkte Schwämme usw.) oder Applikatoren (z. B. Pinsel, Quasten, Schwämme usw.) angewendet werden, ggf. mit einer Veränderung des Verfahrens.

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 11930, *Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product*

ISO 16212, *Cosmetics — Microbiology — Enumeration of yeast and mould*

ISO 18416, *Cosmetics — Microbiology — Detection of Candida albicans*

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

ISO 21149, *Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria*

ISO 21150, *Cosmetics — Microbiology — Detection of Escherichia coli*

ISO 22717, *Cosmetics — Microbiology — Detection of Pseudomonas aeruginosa*

ISO 22718, *Cosmetics — Microbiology — Detection of Staphylococcus aureus*

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:

— ISO Online Browsing Platform: verfügbar unter https://www.iso.org/obp

— IEC Electropedia: verfügbar unter http://www.electropedia.org/

3.1
kosmetische Rezeptur
Aufbereitung von Rohmaterialien mit einer qualitativ und quantitativ festgelegten Zusammensetzung

3.2
kosmetisches Mittel
kosmetische Rezeptur (3.1), die alle Produktionsschritte durchlaufen hat, einschließlich der Verpackung in der Endverpackung zum Versand

Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

3.3
getränktes Produkt
Produkt, das durch Absorption mit einem Träger verbunden ist

3.4
beschichtetes Produkt
Produkt, das durch Adsorption mit einem Träger verbunden ist

3.5
Untersuchungsprobe
repräsentative Einheit des gesamten *kosmetischen Mittels* (3.2) zur Prüfung

4 Kurzbeschreibung

4.1 Allgemeine Angaben

Das Verfahren bestimmt die Population lebensfähiger Mikroorganismen durch Auszählung der Kolonien auf einem nicht selektiven Agarmedium und durch das Vorhandensein oder Ausbleiben eines festgelegten Wachstums von Mikroorganismen nach der Anreicherung.

Das Verfahren umfasst die folgenden Schritte:

— Auswahl der Untersuchungsprobe;

— Auswahl eines geeigneten Verfahrens;

— Wiederfindung von Mikroorganismen;

— Auszählung der Population lebensfähiger Mikroorganismen mittels Filtrations- oder Plattenzählverfahren;

— Prüfungen für festgelegte Mikroorganismen durch das Anreicherungsverfahren.

Die Prüfbedingungen müssen dahingehend beurteilt werden, dass sichergestellt ist, dass das Verfahren die Lebensfähigkeit der Mikroorganismen und die Wiederfindung der Keimbelastung auf der Probe möglichst nicht beeinträchtigt; sie sollten darüber hinaus eine Überprüfung der Wirksamkeit der Neutralisierung umfassen (siehe Abschnitt 11).

Um die Qualität und Sicherheit des Produktes gegenüber dem Verbraucher sicherzustellen, sollte zur Bestimmung der Arten von kosmetischen Mitteln, für die dieses Dokument anwendbar ist, eine geeignete mikrobiologische Risikoanalyse durchgeführt werden (siehe ISO 29621:2017, Tabelle 2).

Es dürfen auch andere Verfahren angewendet werden, wenn ihre Gleichwertigkeit nachgewiesen wurde.

4.2 Auswahl der Untersuchungsprobe

— Immer wenn es praktisch durchführbar ist, sollte die gesamte Einheit mit einer Masse von mindestens 1 g für die Prüfung verwendet werden. Wenn aus technischen Gründen nicht die gesamte Einheit geprüft werden kann, wird für die Prüfung ein festgelegter Teil einer Einheit eines Stoffes (UIP, en: Unit Item Portion) verwendet. Ein „UIP“ ist eine mikrobiologisch repräsentative Untereinheit der Untersuchungsprobe, auf die im gesamten Dokument verwiesen wird.

— Wenn die Masse einer Einheit <1 g beträgt, so sollte eine Probenahme an der entsprechenden Anzahl an Einheiten erfolgen, um die geeignete Masse oder das geeignete Volumen zu bestimmen.

AVA Documents
Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

— Die Masse der Untersuchungsprobe muss auch dann aufgezeichnet werden, wenn die Ergebnisse in Einheiten angegeben werden.

Die Auswahl der Untersuchungsprobe muss nach A.1 erfolgen.

4.3 Auswahl des Verfahrens

Das Verfahren sollte ausgehend von den Besonderheiten des Produktes (Größe, Volumen, einzeln verpackt oder Großpackung, Stärke der Keimbelastung usw.) nach einer geeigneten Vorgehensweise durchgeführt werden und sicherstellen, dass eine repräsentative Probe bewertet wird.

Die Auswahl des Verfahrens muss A.1 und A.2 entsprechend erfolgen.

4.4 Wiederfindung von Mikroorganismen auf der Untersuchungsprobe

Das Ausmaß, in dem Mikroorganismen an der Oberfläche der Untersuchungsprobe anhaften, hängt von dem Reinigungstuch oder der Maske ab, die mit dem flüssigen Teil der Rezeptur entweder getränkt oder beschichtet wurden. Es könnten Voruntersuchungen erforderlich sein, um Mikroorganismen von der Untersuchungsprobe abzusondern.

Unabhängig von der Behandlung sollte die Überprüfung des Verfahrens der Wiederfindung durchgeführt werden, um nachzuweisen, dass mit dem Verfahren Mikroorganismen aus der Untersuchungsprobe freigesetzt werden können, ohne deren Lebensfähigkeit nachteilig zu beeinflussen (siehe Abschnitt 11).

4.5 Auszählung aerober mesophiler Mikroorganismen

4.5.1 Allgemeines

Die Auszählung aerober mesophiler Mikroorganismen umfasst Bakterien, Hefen und Schimmelpilze.

Ausgehend von der Art der Untersuchungsprobe, dem Volumen des zum Eintauchen der Untersuchungsprobe verwendeten Verdünnungsmittels und der erwarteten Stärke der Keimbelastung dürfen zwei Arten von Zählverfahren angewendet werden:

— Plattenzählverfahren;

— Membranfiltrationsverfahren.

4.5.2 Überblick über das Plattenzählverfahren

Das Plattenzählverfahren besteht in der Anwendung entweder eines Gussplatten- oder Spatelplattenverfahrens.

Jedes Verfahren setzt sich aus folgenden Schritten zusammen.

— Die Agarplatten und das Verdünnungsmittel werden mithilfe eines nicht selektiven Agarmediums für das Ausstreichen des Verdünnungsmittels, in dem die Probe eingetaucht war, vorbereitet.

— Die Platten werden für die Auszählung und/oder zum Nachweis bebrütet.

— Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wird auf der Grundlage der Anzahl der je Einheit oder Gramm wiedergefundenen aeroben mesophilen Mikroorganismen gezählt.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

4.5.3 Überblick über das Membranfiltrationsverfahren

Die Membranfiltration setzt sich aus folgenden Schritten zusammen.

— Das Verdünnungsmittel oder eine festgelegte Menge des Verdünnungsmittels, in dem die Untersuchungsprobe eingetaucht war, wird in ein Filtriergerät, das mit einem geringen Volumen eines geeigneten sterilen Verdünnungsmittels benetzt ist, überführt.

— Nach der Filtration und dem Spülen wird der Membranfilter auf die Oberfläche der Platten mit dem nicht selektiven Agarmedium überführt.

— Aerobes Bebrüten der Platten.

— Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) wird gezählt und die Anzahl der aeroben mesophilen Mikroorganismen je Gramm oder Einheit berechnet.

4.6 Nachweis festgelegter Mikroorganismen durch das Anreicherungsverfahren

Das Ziel des Anreicherungsverfahrens besteht darin, eine Untersuchungsprobe in einer nichtselektiven Bouillon zu bebrüten, um die Anzahl der in einer Untersuchungsprobe vorhandenen Mikroorganismen zu erhöhen.

— Der erste Schritt eines Anreicherungsverfahrens besteht in der Bebrütung einer Untersuchungsprobe in einer nichtselektiven Bouillon, um die Anzahl der in der Untersuchungsprobe vorhandenen Mikroorganismen zu erhöhen.

— Im zweiten Schritt eines Anreicherungsverfahrens werden festgelegte Mikroorganismen, die auf einer Untersuchungsprobe vorhanden sein könnten, mithilfe selektiver Agarmedien isoliert; anschließend werden bestätigende Identifizierungsprüfungen für charakteristische Kolonien durchgeführt. Siehe ISO 18416, ISO 21150, ISO 22717 und ISO 22718.

5 Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährmedien

5.1 Allgemeines

Die für die Zählung und den Nachweis aerober mesophiler Mikroorganismen geeigneten Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährmedien sind in ISO 11930, ISO 16212 und ISO 21149 beschrieben. Es dürfen auch andere Verdünnungsmittel, Neutralisierungsmittel und Nährmedien verwendet werden, wenn nachgewiesen wurde, dass sie sich für die Anwendung eignen.

Die in ISO 21148 enthaltenen allgemeinen Anleitungen werden befolgt. Wenn in diesem Dokument Wasser erwähnt wird, wird destilliertes oder gereinigtes Wasser, wie in ISO 21148 angegeben, verwendet.

5.2 Verdünnungsmittel und Neutralisierungsmittel

Das Verdünnungsmittel wird zu Verdünnung der Probe verwendet. Es wird gefordert, dass es Neutralisierungsmittel enthält, wenn die zu untersuchende Probe antimikrobielle Eigenschaften aufweist oder einen Konservierungsstoff enthält. Die Wirksamkeit der Neutralisierung muss vor der Bestimmung der Keimzahl nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 11). Verdünnungsmittel und Neutralisierungsmittel müssen ISO 11930, ISO 16212, ISO 18416, ISO 21149, ISO 21150, ISO 22717 und ISO 22718 entsprechen.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

5.3 Nährmedien

5.3.1 Medien für die Auszählung und zum Nachweis

Nährmedien für die Auszählung und/oder zum Nachweis müssen ISO 11930, ISO 16212, ISO 18416, ISO 21149, ISO 21150, ISO 22717 und ISO 22718 entsprechen.

5.3.2 Medien für die Vorbereitung von Sporen von *Bacillus subtilis*

Siehe C.1.3.1.

6 Geräte und Glasgeräte

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

7 Mikroorganismenstämme

Die Kultur sollte nach den vom Lieferanten des Referenzstammes angegebenen Verfahrensweisen wiederhergestellt werden. Die Stämme dürfen EN 12353 entsprechend oder nach einem anderen geeigneten Verfahren im Labor gelagert werden.

Zur Prüfung der Wiederfindung von Mikroorganismen auf den Untersuchungsproben werden Sporen von *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (gleichwertiger Stamm CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134 oder eine andere gleichwertige nationale Stammsammlung) verwendet.

Zur Prüfung der Wirksamkeit von Neutralisierungsmitteln werden zwei entsprechend repräsentative Stämme gramnegativer und grampositiver Bakterien und eine Hefe verwendet:

— *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (gleichwertiger Stamm: CIP 4.83, NCIMB 9518, NBRC 13276, KCTC 1916 oder eine andere gleichwertige nationale Stammsammlung);

— *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (gleichwertiger Stamm: CIP 82.118, NCIMB 8626, NBRC 13275, KCTC 2513 oder eine andere gleichwertige nationale Stammsammlung).

Eine Alternative zu dem gramnegativen Stamm kann *Escherichia coli* ATCC 8739 sein (gleichwertiger Stamm: CIP 53.126, NCIMB 8545, NBRC 3972, KCTC 2571 oder eine andere gleichwertige nationale Stammsammlung).

— *Candida albicans* ATCC 10231 (gleichwertiger Stamm: IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594, KCTC 17205 oder eine andere gleichwertige nationale Stammsammlung).

Die Stämme dürfen nach EN 12353 im Labor aufbewahrt werden.

8 Handhabung von kosmetischen Mitteln und Laborproben

Wenn eine Lagerung erforderlich ist, werden die zu prüfenden Produkte bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Produkte und Proben dürfen vor oder nach der Untersuchung nicht bebrütet, gekühlt oder eingefroren werden. Die Probenahme- und Prüfverfahren sollten den in ISO 21148 angegebenen Anleitungen folgen und nach der Beschreibung in Abschnitt 9 durchgeführt werden.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

9 Durchführung

9.1 Allgemeine Empfehlungen

Bei der Herstellung der Untersuchungsprobe und des Verdünnungsmittels werden stets sterile Geräte und aseptische Arbeitstechniken angewendet.

Bei der Herstellung einer Erstverdünnung darf die Zeitdauer zwischen dem Ende der Herstellung der Untersuchungsprobe und dem Zeitpunkt, an dem das Verdünnungsmittel mit dem Nährmedium in Kontakt kommt, (30 ± 15) min nicht überschreiten, sofern es nicht in den bestehenden Unterlagen oder Dokumenten ausdrücklich angegeben ist.

Das Verfahren sollte der während der Eignungsprüfung entwickelten Vorgehensweise folgen, um die Neutralisierung möglicher Hemmwirkungen (siehe Abschnitt 11) und die Wiederfindung von Mikroorganismen sicherzustellen.

9.2 Auswahl und Herstellung der Untersuchungsprobe

9.2.1 Auswahl der Untersuchungsprobe

Die Untersuchungsprobe muss mindestens 1 g wiegen.

Die Untersuchungsprobe kann entweder die gesamte Einheit oder mehrere Einheiten sein, wenn die Masse einer Einheit weniger als 1 g beträgt, oder der UIP (siehe A.1).

Die genaue Masse der Untersuchungsprobe, *S*, und die Anzahl der Einheiten, *n*, werden aufgezeichnet.

Wenn für die Prüfung ein UIP angewendet wird, wird der Wert des UIP der Untersuchungsprobe aufgezeichnet (siehe 4.2).

9.2.2 Herstellung der Erstverdünnung

Die Untersuchungsprobe (siehe 9.2.1) wird in einen geeigneten Behälter mit einem bekannten Volumen an Verdünnungsmittel, wie in der Eignungsprüfung festgelegt (siehe Abschnitt 11), eingebracht. Die Untersuchungsprobe sollte vollständig in das Verdünnungsmittel eingetaucht werden.

Der Wert für „V“, das angewendete Volumen des Verdünnungsmittels, wird aufgezeichnet.

9.3 Wiederfindung von Mikroorganismen

9.3.1 Allgemeines

Nach dem Eintauchen dürfen die folgenden Behandlungen angewendet werden, um Mikroorganismen von der Untersuchungsprobe zu entfernen:

— steriler Einwegbeutel;

— Schütteln/Rühren;

— Verwirbelung (siehe A.3).

ANMERKUNG Bei Bedarf wird das Volumen des Verdünnungsmittels nach der Behandlung im sterilen Einwegbeutel oder dem Schütteln der Untersuchungsprobe aufgezeichnet.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

9.3.2 Behandlung im sterilen Einwegbeutel

Die Erstverdünnung wird mithilfe eines sterilen Einwegbeutels hergestellt, der anschließend in den Homogenisator (Stomacher) überführt wird.

Es wird weiter nach den in der Eignungsprüfung (siehe Abschnitt 11) angegebenen Parametern (Zeit und Geschwindigkeit) verfahren.

Die Zeit und Geschwindigkeit, die für die Behandlung im sterilen Einwegbeutel angewendet wurden, sind aufzuzeichnen.

9.3.3 Schütteln/Rühren

Die Erstverdünnung wird in dem geeigneten geschlossenen Behälter hergestellt und nach den in der Eignungsprüfung (siehe Abschnitt 11) angewendeten Parametern (Dauer und Frequenz) gemischt.

Zur Unterstützung der Durchmischung des Produktes und der Wiederfindung von Organismen dürfen sterile Glasperlen hinzugegeben werden.

Die Zeit, Frequenz und Geschwindigkeit des Schüttel-/Rührvorgangs (wenn zutreffend) und ob Glasperlen hinzugegeben wurden oder nicht werden aufgezeichnet.

9.4 Auszählung aerober mesophiler Mikroorganismen

9.4.1 Allgemeines

Die Auszählung aerober mesophiler Mikroorganismen umfasst Bakterien, Hefen und Schimmelpilze.

Die Auswahl des Verfahrens hängt von dem Volumen des für die Herstellung der Erstverdünnung verwendeten Verdünnungsmittels ab (siehe A.2).

Auf der Grundlage der Größe der Untersuchungsprobe, der Stärke der Keimbelastung und der Empfindlichkeit des Verfahrens wird das gesamte Verdünnungsmittel, in dem die Untersuchungsprobe eingetaucht ist (V), oder ein Teil von V (Vd) für die Auszählung verwendet.

Üblicherweise ist das Volumen V oder Vd der Erstverdünnung das für die Auszählung verwendete Verdünnungsmittel. Es ist keine weitere Verdünnung der Erstverdünnung erforderlich.

Das Mindestvolumen des Verdünnungsmittels muss mindestens 1 g der Untersuchungsprobe entsprechen.

9.4.2 Gussplattenverfahren

Es wird die angemessene Anzahl an Petrischalen genutzt, um das Volumen des zum ordnungsgemäßen Eintauchen und Überführen des auszustreichenden Produktes erforderlichen Verdünnungsmittels abzuschätzen (V oder Vd).

Das Verdünnungsmittel (V) wird in zwei Arbeitsströme unterteilt: eine Hälfte (V/2) dient der Auszählung von Bakterien und die andere Hälfte (V/2) dient der Auszählung von Hefen und Schimmelpilzen.

Wenn die Auszählung mit einem Teil des gesamten Verdünnungsmittels (Vd) durchgeführt wird, müssen zwei gleiche Teile (Vd/2) ausgestrichen werden: einer für Bakterien und der andere für Hefen und Schimmelpilze.

AVA Documents Document Sharing Hub
Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

Wenn Petrischalen mit einem Durchmesser von 85 mm bis 100 mm verwendet werden, wird 1 ml des Verdünnungsmittels hinzugegeben und 15 ml bis 20 ml des geschmolzenen, in einem Wasserbad bei höchstens 48 °C aufbewahrten Agarmediums (nach den Angaben in ISO 21149 und ISO 16212) werden hinzugegossen.

Wenn größere Petrischalen verwendet werden (140 mm Durchmesser), werden höchstens 10 ml des Verdünnungsmittels zu jeder Platte sowie, ausgehend von dem Volumen des hinzugegebenen Verdünnungsmittels, die geeignete Menge an Agarmedium hinzugegeben.

Das überführte Verdünnungsmittel wird langsam mit dem Medium vermischt, wobei die Platten vorsichtig gedreht oder geneigt werden, um das Agar ausreichend zu verteilen. Die Mischung in den Petrischalen wird auf einer waagerechten Oberfläche bei Raumtemperatur aushärten gelassen. Das Volumen des für jedes Medium ausgestrichenen Verdünnungsmittels V/2 oder Vd/2 ist aufzuzeichnen.

9.4.3 Spatelplattenverfahren

Es wird die angemessene Anzahl an Petrischalen genutzt, um das Volumen des zum ordnungsgemäßen Eintauchen und Überführen des auszustreichenden Produktes erforderlichen Verdünnungsmittels abzuschätzen (V oder Vd).

In Petrischalen mit einem Durchmesser von 85 mm bis 100 mm werden 15 ml bis 20 ml des geschmolzenen, in einem Wasserbad bei höchstens 48 °C aufbewahrten Agarmediums gegeben. Wenn größere Petrischalen verwendet werden, ist die Menge des Agarmediums entsprechend zu vergrößern. Die Platten werden auf einer waagerechten Oberfläche bei Raumtemperatur aushärten gelassen.

Das Verdünnungsmittel (V) wird in zwei Arbeitsströme unterteilt: eine Hälfte (V/2) dient der Auszählung von Bakterien und die andere Hälfte (V/2) dient der Auszählung von Hefen und Schimmelpilzen.

Wenn die Auszählung mit einem Teil des gesamten Verdünnungsmittels (Vd) durchgeführt wird, müssen zwei gleiche Teile (Vd/2) ausgestrichen werden: einer für Bakterien und der andere für Hefen und Schimmelpilze.

Über die Oberfläche des Mediums wird/werden ein abgemessenes Volumen (V oder Vd) von mindestens 0,1 ml der Erstverdünnung und/oder eine Probenverdünnung, hergestellt wie in Abschnitt 11 beschrieben, ausgestrichen.

Das Volumen des für jedes Medium ausgestrichenen Verdünnungsmittels V/2 oder Vd/2 wird aufgezeichnet.

9.4.4 Membranfiltrationsverfahren

Es werden Membranfilter mit einer Nennporenweite von höchstens 0,45 µm verwendet.

Wenn das gesamte Verdünnungsmittel (V) filtriert wird, dient eine Hälfte (V/2) der Auszählung von Bakterien und die andere Hälfte (V/2) der Auszählung von Hefen und Schimmelpilzen.

Wenn die Auszählung mit einem Teil des Verdünnungsmittels (Vd) durchgeführt wird, müssen zwei gleiche Teile (Vd/2) filtriert werden: einer für Bakterien und der andere für Hefen und Schimmelpilze.

Das Volumen V/2 des Verdünnungsmittels, in dem die Untersuchungsprobe eingetaucht war, oder der Teil Vd/2 wird durch je einen von zwei sterilen Membranfiltern filtriert und nach den Ergebnissen der Eignungsprüfung (siehe Abschnitt 11) ausgewaschen.

Die Membranfilter werden nach den Angaben in ISO 21149 und ISO 16212 auf die Oberfläche des Agarmediums überführt.

Das Volumen des für jedes Medium filtrierten Verdünnungsmittels V/2 oder Vd/2 wird aufgezeichnet.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

9.4.5 Bebrütung

Sofern nicht anders festgelegt, werden die beimpften Petrischalen (72 ± 6) h in den auf (32,5 ± 2,5) °C eingestellten Brutschrank gestellt (Bakterien) oder, wenn das Medium mit einem Antibiotikum versetzt wurde, werden sie 3 d bis 5 d in den auf (25 ± 2,5) °C eingestellten Brutschrank gestellt (Hefen und Schimmelpilze). Wenn ein Nährmedium ohne Antibiotikum verwendet wird, erfolgt die Bebrütung bei (22,5 ± 2,5) °C über 5 d bis 7 d.

9.4.6 Auszählung der Kolonien

Nach der Bebrütung werden die Kolonien auf jedem Nährmedium (N_b für Bakterien oder N_{ym} für Hefen und Schimmelpilze) innerhalb der empfohlenen zählbaren Bereiche (siehe Anhang B) ausgezählt.

Wenn mehrere Platten verwendet wurden, werden die ausgezählten Kolonien auf jeder Platte für jedes Nährmedium addiert.

Die Bakterienzahl, N_b, und die Anzahl der Hefen und Schimmelpilze, N_{ym}, die in dem Volumen des für jedes Medium geprüften, ausgestrichenen oder filtrierten Verdünnungsmittels (V/2 oder Vd/2), jeweils vorhanden ist, wird wie folgt berechnet.

N_b oder N_{ym} entsprechen der Summe der Kolonienzahl, die von den Platten erhalten wurde (Plattenzählverfahren) oder der Kolonienzahl, die auf einer einzelnen Platte gezählt wurde (Filtrationsverfahren).

Es wird überprüft, dass die Keimzahl unter den Prüfbedingungen ermittelt wurde, die während der Eignungsprüfung (siehe Abschnitt 11) angewendet wurden.

9.5 Nachweis festgelegter Mikroorganismen durch das Anreicherungsverfahren

9.5.1 Allgemeines

Die Prüfung auf festgelegte Mikroorganismen schließt den Nachweis von *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* und *C. albicans* ein.

Der Grundsatz der Prüfung besteht in der Anreicherung in einer nichtselektiven Bouillon, gefolgt von einer Isolation auf selektiven Agarmedien und der Identifizierung charakteristischer Kolonien.

Die Prüfung darf an der Untersuchungsprobe oder an 1 g der Untersuchungsprobe durchgeführt werden.

9.5.2 Prüfung auf festgelegte Mikroorganismen

9.5.2.1 Herstellung der Erstverdünnung in der Anreicherungsbouillon

Die Erstverdünnung wird durch Überführung der Untersuchungsprobe (siehe 9.2) oder von 1 g der Untersuchungsprobe in einen geschlossenen Behälter mit einem geeigneten Volumen der Anreicherungsbouillon hergestellt, das anhand des während der Eignungsprüfung (siehe Abschnitt 11) entwickelten Verfahrens ausgewählt wurde. Die Untersuchungsprobe muss vollständig bedeckt sein und die zu prüfende Mindestmenge sollte mindestens 1 g der Untersuchungsprobe entsprechen. Das Volumen der Anreicherungsbouillon, V, die genaue Masse der Untersuchungsprobe, S, und ggf. die Anzahl der geprüften Einheiten, n, werden aufgezeichnet.

9.5.2.2 Bebrütung der Erstverdünnung

Nach der Wiederfindung der Mikroorganismen (9.3) wird die in der Bouillon hergestellte Erstverdünnung (siehe 9.5.2.1) mindestens 20 h und höchstens 72 h bei (32,5 ± 2,5) °C bebrütet.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

9.5.2.3 Isolation

Nach der Bebrütung wird unter Anwendung einer sterilen Öse ein aliquoter Anteil der bebrüteten Anreicherungsbouillon auf der Oberfläche von geeigneten Nachweis-Agarmedien ausgestrichen.

Die Petrischalen werden umgedreht und 48 h bis 72 h bei (32,5 ± 2,5) °C bebrütet, um isolierte Kolonien nach ISO 21150, ISO 22717, ISO 22718 und ISO 18416 zu erhalten.

9.5.2.4 Nachweis festgelegter Mikroorganismen

Das Wachstum charakteristischer Kolonien weist auf das mögliche Vorhandensein festgelegter Mikroorganismen hin, die durch Identifizierungsprüfungen nach ISO 21150, ISO 22717, ISO 22718 und ISO 18416 zu bestätigen sind.

10 Angabe der Ergebnisse

10.1 Auszählung aerober mesophiler Mikroorganismen

Die in der Einheit vorhandene Gesamtzahl an Bakterien, $NS_{b,}$ und Gesamtzahl an Hefen und Schimmelpilzen, NS_{ym}, wird berechnet. Anhang B enthält Informationen zur Angabe der Ergebnisse.

Die Gesamtzahl an aeroben mesophilen Mikroorganismen kann als KBE je Einheit ($NS_b + NS_{ym}$) oder KBE je Gramm $(NS_b + NS_{ym})/S$ angegeben werden.

10.2 Nachweis festgelegter Mikroorganismen

Wenn die Identifizierung der Kolonien das Vorhandensein festgelegter Mikroorganismen bestätigt, wird das Ergebnis wie folgt angegeben:

— „Vorhandensein von *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* oder *C. albicans* in der Untersuchungsprobe S *oder* 1 g der Untersuchungsprobe“.

Wenn nach der Anreicherung kein Wachstum festgestellt wird und/oder wenn die Identifizierung der Kolonien das Vorhandensein dieser Spezies nicht bestätigt, wird das Ergebnis wie folgt angegeben:

— „Nichtvorhandensein von *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* oder *C. albicans* in der Untersuchungsprobe S *oder* 1 g der Untersuchungsprobe“.

11 Eignungsprüfung

Bei der Eignungsprüfung des Prüfverfahrens wird dargelegt, dass das Verfahren den Nachweis lebensfähiger Mikroorganismen ermöglicht und erfordert:

— Den Nachweis der Fähigkeit des Verfahrens, Mikroorganismen von der Untersuchungsprobe zu entfernen;

— Die Beurteilung der Auswirkung der Bearbeitung der Untersuchungsprobe auf die Mikroorganismen;

— Den Nachweis der Wirksamkeit der Neutralisierung.

Das Verfahren muss der Beschreibung in Anhang C entsprechen.

Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09

12 Prüfbericht

Der Prüfbericht muss Folgendes angeben:

a) alle für die vollständige Identifizierung des Produktes erforderlichen Angaben;

b) Beschreibung des angewendeten Verfahrens, einschließlich der Eignungsprüfung oder Verweisung auf Standardbetriebsverfahren;

c) erhaltene Ergebnisse;

d) jeder nicht in diesem Dokument festgelegte oder als optional angesehene Aspekt sowie Einzelheiten über alle Vorkommnisse, die die Prüfergebnisse beeinflusst haben könnten.

AVA Documents
Document Sharing Hub

Full document details: E DIN EN ISO 21322:2021-09