



GÖCH Arbeitskreis „Mikrobiologie“

„Ringversuch zum Konservierungsbelastungstest (KBT) für kosmetische Mittel“

Inhaltsverzeichnis

1. Hintergrund/Ausgangslage	2
2. Durchführung.....	3
2.1. Material und Methoden:.....	3
2.1.1. Material.....	3
2.1.2. Methoden	4
2.2. Aufbau des Versuchs	5
2.3 Definitionen	6
3. Ergebnisse	7
3.1. Ringversuch Test 1	7
3.2. Ringversuch Test 2.....	9
3.3. Ringversuch Test 3.....	9
4. Interpretation der Ergebnisse	12
5. Anhang.....	14
5.1. Tabellenverzeichnis	14
5.2. Abbildungsverzeichnis	14
5.3. Abkürzungsverzeichnis (alphabetisch)	14
5.4. Literaturverzeichnis.....	14
5.5. Danksagung.....	15

1. Hintergrund/Ausgangslage

Nach der EU Richtlinie 76/768 EWG und Verordnung 1223/2009 EG muss der Hersteller bzw. die verantwortliche Person die Sicherheit inkl. der mikrobiologischen Sicherheit von kosmetischen Produkten im Rahmen der Sicherheitsbewertung belegen. Für kosmetische Mittel, die für das Wachstum von Mikroorganismen anfällig sind, ist ein wirksames Konservierungssystem notwendig, um die mikrobiologische Stabilität während Herstellung, Lagerung und Anwendung sicherzustellen.

Dem Hersteller war es bisher freigestellt, welche Methode zum Nachweis der mikrobiologischen Stabilität zur Anwendung kommt (SCCS Notes of Guidance, 7th revision, 4-4.3). Mit der Norm ISO 11930 Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product (First edition 2012-04-01) liegt eine Norm vor, die als Referenzmethode zur Überprüfung der Konservierung eines kosmetischen Mittels im Markt dient.

Das in der Norm ISO 11930 beschriebene Verfahren ist mit dem Konservierungsbelastungstest der European Pharmacopoeia (Ph. Eur. 5.1.3, Efficacy of antimicrobial preservation) vergleichbar.

Nach dem Beimpfen eines kosmetischen Mittels mit Testmikroorganismen erfolgt die Bestimmung der wachstumsfähigen Mikroorganismen (KBE) zu festgelegten Zeitpunkten. Aus den ermittelten KBE-Werten wird die logarithmische (log) Reduktionsrate (ausgedrückt als log 10) pro Testkeim bestimmt, die als Beurteilungsmaßstab für das im kosmetischen Mittel eingesetzte Konservierungssystem gilt. Die Beurteilung beruht auf zwei Kriterien:

1. Die Abnahme der vermehrungsfähigen Mikroorganismen erfolgt in einem bestimmten Zeitintervall.
2. Die Zahl der Kolonien bildenden Einheiten, unter Berücksichtigung der mikrobiologischen Messunsicherheit, darf zu keinem Zeitpunkt des Testes ansteigen.

Es ist anzumerken, dass diese Methode hinsichtlich Haltung der Teststämme, Vorbereitung der Keimsuspension und Vorkonditionierung Variabilität zulässt.

Derzeit wird der Konservierungsbelastungstest nach European Pharmacopoeia (Ph. Eur. 5.1.3) häufig eingesetzt, um im Rahmen der Sicherheitsbewertung kosmetischer Mittel den erforderlichen Nachweis ausreichender Konservierung zu erbringen.

In einem vom Arbeitskreis „Mikrobiologie“ der GÖCH organisierten Ringversuch, der von einer akkreditierten Inspektionsstelle betreut und statistisch ausgewertet wurde, sollte die Vergleichbarkeit der Methode für die Prüfung auf ausreichende Konservierung von kosmetischen Mitteln eingeschätzt werden.

Hierzu wurde ein kosmetisches Produkt hergestellt und in verschiedenen Laboratorien (Betriebslabore und Prüfinstitute) nach dem Konservierungsbelastungstest gemäß Ph. Eur. 5.1.3. untersucht. Jedes Labor erhielt für die erste Testphase die Vorgabe das Produkt mittels der hauseigenen KBT-Methode zu testen.

Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen wurden eine 2. und 3. Testphase mit erweiterten Vorgaben eingeleitet.

2. Durchführung

2.1. Material und Methoden:

2.1.1. Material

Das bei dem Ringversuch eingesetzte kosmetische Mittel wurde speziell für diesen Zweck formuliert und hergestellt. Es handelte sich hierbei um eine O/W Emulsion, welche zu Beginn 2010 für den Teil 1 des Ringversuchs hergestellt wurde. Für die Teile 2 und 3 des Ringversuchs wurden im 1. Quartal 2011 neue Muster der gleichen Rezeptur hergestellt und verwendet.

Da bei diesem Ringversuch die Keimzahlergebnisse in KBE/g verglichen werden sollten, wurde das Konservierungssystem so gewählt, dass auch zu einem späteren Testzeitpunkt auswertbare, vermehrungsfähige Mikroorganismen vorhanden sein sollten.

Tabelle 1: Rezeptur für den Konservierungsbelastungstest

Natural O/W Emulsion mit Konservierung für Ringversuch (GÖCH):	
Konservierungsmittelbelastungstest für kosmetische Mittel	
Hersteller: LOGOCOS Naturkosmetik AG	
Rezeptur, Deklaration gemäß INCI - Nomenklatur pH-Wert: 5,3 - 5,5	
	Anteil [%]
Aqua (Water)	70,5400
Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil	7,0000
Glycerin	6,9650
Tricaprylin	6,0000
Polyglyceryl-3 Stearate	3,0000
Cetearyl Alcohol	2,0000
Palmitic Acid	1,5000
Stearic Acid	1,5000
Sodium Stearoyl Lactylate	1,0000
Xanthan Gum	0,2200
Phenoxyethanol	0,1450
Phytic Acid	0,0750
Methylparaben	0,0310
Butylparaben	0,0080
Ethylparaben	0,0080
Propylparaben	0,0040
Isobutylparaben	0,0040
Sodium Hydroxide	q.s.
	100,0000

Jeder Teilnehmer erhielt in jeder Testphase zwei Probenmuster zur jeweiligen Doppelbestimmung. Die genauen Definitionen zur Vorgehensweise wurden den Teilnehmern vor der Untersuchung mitgeteilt.

2.1.2. Methoden

Nach der Durchführung des Ringversuchs Test 1 zu Beginn 2010, hat man für die beiden folgenden Ringversuche Test 2 und 3, im Vorfeld Vorgaben zur Aufzucht und Inokulierung der beiden eingesetzten Mikroorganismen *S.aureus* und *A.brasiliensis* festgelegt und an jeden Teilnehmer gesendet.

2.1.2.1. Anzucht

Für den Mikroorganismus *A.brasiliensis* wurde von mikrobiologischen Labor SGS Institut Fresenius GmbH in Taunusstein eine sporenhaltige Suspension hergestellt, die auf eine Keimzahl von 50.000.000 KBE/ml eingestellt war und von den Teilnehmern direkt zur Inokulierung verwendet werden sollte.

Im Fall von *S.aureus* wurde eine Ampulle mit einer gefriergetrockneten Kultur von *S.aureus* (6538) von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bestellt, gemäß Beiblatt der DSMZ reaktiviert und nach folgenden Vorgaben für eine darauffolgende Inokulierung angezüchtet.

Tabelle 2: Vorgaben zur Anzucht von *S.aureus* für den Ringversuch Test 2 und Test 3

Schritte zur Anzucht	Beschreibung	Zeitplan
Erhalt der Ampulle mit einer gefriergetrockneten Kultur des jeweiligen Mikroorganismen von DSMZ	Ampulle öffnen und den Inhalt mit 0,9% NaCl Lösung lösen (gemäß Beiblatt DSMZ)	angegebener Untersuchungsbeginn
Erste Anreicherung in Flüssigmedium	Inhalt der Ampulle in CASO-Boullion (<i>S.aureus</i>) überführen. Bebrütung der CASO Boullion für 24+/-2 h bei 30-35°C	24 +/- 2 h
Ösenausstrich	Ösenausstrich auf CASO-Agar (<i>S.aureus</i>) und Bebrütung für 24+/-2h bei 30-35°C	24 +/- 2 h
Abschwemmen und Keimzahlbestimmung	Von Agarplatte mit Spatel/Tupfer mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) abschwemmen, Lösung abpipettieren und anschließend Keimzahlbestimmung durchführen (Lagerzeit für diese Suspension max. 2 h bei Raumtemperatur).	maximal 2h bei Raumtemperatur
Einstellen des Keimgehalts auf 50.000.000 KBE/ml	Verdünnung mit 0,9% NaCl-Lösung auf 50.000.000 KBE/ml.	unmittelbar vor Inokulierung

2.1.2.2. Herstellung des Inokulums (Ringversuch Test 2 und Test 3)

Für eine möglichst standardisierte Inokulierung wurden für beide verwendeten Mikroorganismen ebenfalls Vorgaben im Vorfeld festgelegt.

Tabelle 3: Vorgaben zur Inokulierung beider Mikroorganismen für den Ringversuch Test 2 und Test 3

Schritte zur Inokulierung	Beschreibung	Zeitplan
Halbieren der kosmetischen Probe (100 g) für jeweiligen Keim in 2 Teilmengen (je 50g)	zwecks Doppelbestimmung	unmittelbar vor angegebenem Untersuchungsbeginn
Inokulierung der kosmetischen Proben	Zugabe von 0,5ml der Suspension zum Produkt mit Endkonzentration im Produkt von 500.000 KBE/g (entspricht 1%iger Konzentration)	angegebener Untersuchungsbeginn
Homogenisieren der inokulierten Proben	Erfolgt durch einfaches manuelles Rühren mittels Glasstab, Spatel oder Löffel für 60 Sekunden. Das beimpfte Prüfmuster wird bei 20 bis 25°C (<i>A.brasiliensis</i>) bzw. bei 30 - 37°C (<i>S.aureus</i>) und dunkel gelagert.	unmittelbar nach Zugabe des Keims zur Probe.
Entnahme der jeweiligen Untersuchungsmenge zu den entsprechenden Zeitpunkten	Die Untersuchungsmenge beträgt zu allen Zeitpunkten 1,0g	Durchführung zu definierten Zeitpunkten

2.1.2.3. Keimzahlbestimmung (Ringversuch Test 2 und Test 3)

Die Keimzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe von Caso- und Sabouraud-Agar gemäß Ph. Eur. Version 6 Punkt 5.1.3 zu den Untersuchungszeitpunkten 0, 2, 7, 14 und 28 Tagen (und zusätzlich dem Inokulum). Hierzu wurden für jeden verwendeten Mikroorganismus die Plattenzählergebnisse von jeweils 2 Proben in je 2 Verdünnungsreihen für je 4 Verdünnungsschritte (Verdünnung 1-4) in Doppelbestimmung (2 Petrischalen) für eine Keimzahlbestimmung in KBE/g herangezogen und ausgewertet.

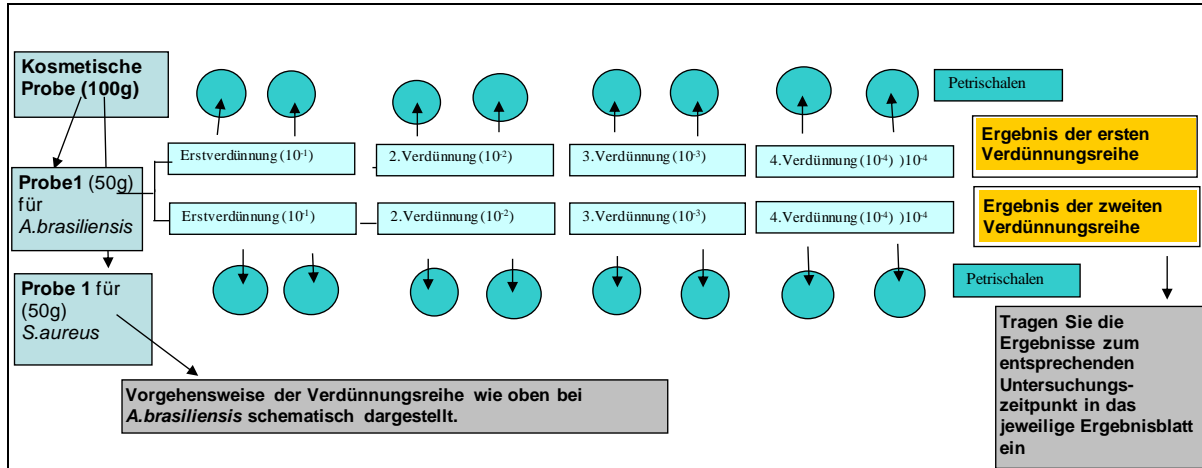


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Doppelbestimmung, wie sie für den Ringversuch Test 2 und Test 3 angewendet wurde.

2.2. Aufbau des Versuchs

Der Ringversuch besteht aus 3 einzelnen Testphasen:

Tabelle 4: Übersicht des Testaufbaus

	Zeitraum der Durchführung	Testmikroorganismen	Vorgaben an die teilnehmenden Labore	Anzahl der teilnehmenden Labore
Ringversuch Test 1	1. Quartal 2010	<i>E. coli</i> (freie Wahl), <i>S. aureus</i> (ATCC 6538) <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027) <i>C. albicans</i> (ATCC 10231) <i>A. brasiliensis</i> (ATCC 16404)	Durchführung gemäß Ph. Eur., sonst keine weitere Vorgaben	20
Ringversuch Test 2	2. Quartal 2011	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538) <i>A. brasiliensis</i> (ATCC 16404)	(a) Mikroorganismen werden zur Verfügung gestellt, <i>S. aureus</i> als Lyophilisat; <i>A. brasiliensis</i> als Sporensuspension, (b) Vorgabe des Zeitverlaufs und der Methode zur Herstellung des Inokulums, (c) Keimzahlbestimmung nach 0, 2, 7, 14 und 28 Tagen	15
Ringversuch Test 3	3. Quartal 2011	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	(a) <i>S. aureus</i> wurde als Lyophilisat zur Verfügung gestellt, (b) Keimzahlbestimmung nach 0, 2, 3, 5, 6, 7, 9 und 12 Tagen	5

2.3 Definitionen

m_{\log} = logarithmischer Mittelwert der Keimzahlen in KBE/g

s = Standardabweichung des Mittelwertes eines jeweiligen ausgewerteten Datensatzes.

U_{ex} = erweiterte Unsicherheit = $s \cdot k$, sie beschreibt die Streuung der einzelnen Labormittelwerte um den Mittelwert des Datensatzes in einem Wahrscheinlichkeitsintervall von 95,5%.

k = Erweiterungsfaktor, $k = 2$ entspricht einem 95,5%igen Unsicherheitsintervall.

s_{rel} = relative Standardabweichung = $s/m_{\log} \cdot 100$. Beschreibt eine prozentuale Standardabweichung vom ermittelten logarithmierten Mittelwert

$U_{ex,rel}$ = relative erweiterte Unsicherheit = $2 \cdot (s/m_{\log} \cdot 100)$ Beschreibt eine prozentuale erweiterten Unsicherheit vom ermittelten logarithmierten Mittelwert

S_D = Standardabweichung eines einzelnen Labors hinsichtlich der Analyse einer einzelnen Probe in der hier beschriebenen Doppelbestimmung

s_L = Laborunsicherheit eines einzelnen Labors = $\sqrt{(s_{D1}^2 + s_{D2}^2)/2}$. Beschreibt die Unsicherheit eines einzelnen Labors für die Analyse von 2 identischen Proben jeweils in Doppelbestimmung.

S_{ML} = mittlere Laborunsicherheit = $\sqrt{\sum (s_{Ln})^2}/n$. Beschreibt die durchschnittliche Unsicherheit aller Laboratorien über den gesamten Datensatz für die Analyse von 2 identischen Proben jeweils in Doppelbestimmung.

u = Unsicherheit = U_{ex}/\sqrt{n} mit n =Anzahl der Labormittelwerte. Die Unsicherheit beschreibt die statistische Sicherheit der Lage des Mittelwertes des Datensatzes in einem 95,5% Intervall.

3. Ergebnisse

3.1. Ringversuch Test 1

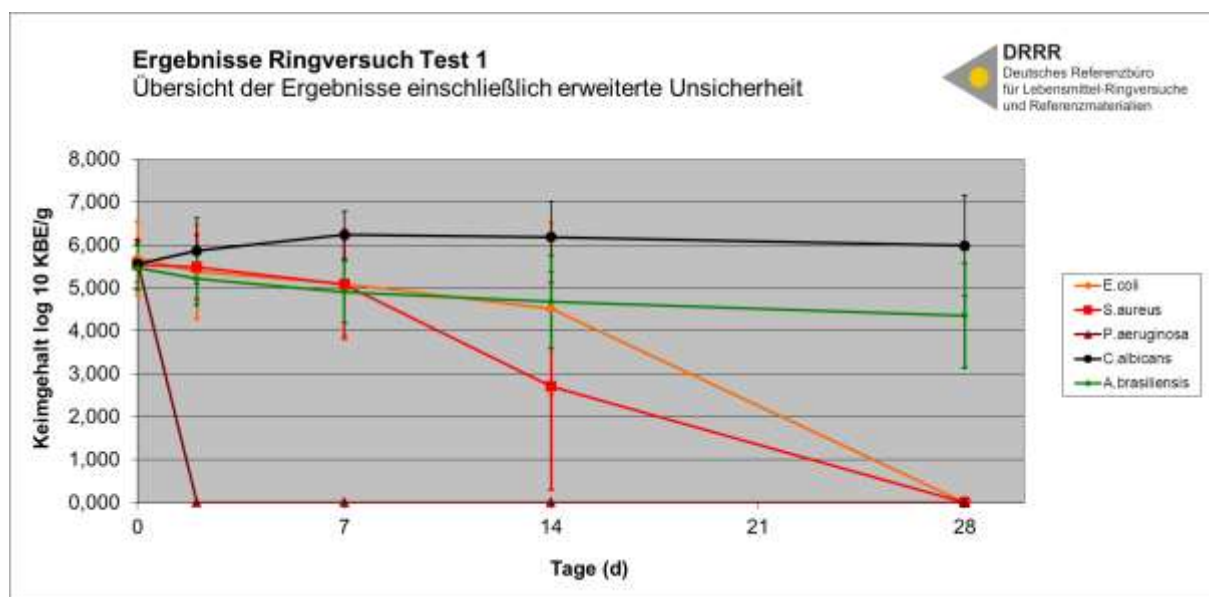
Die Ergebnisse des ersten Ringversuchs sind in der Tabelle 5 sowie in der Abbildung 2 zusammengefasst.

Tabelle 5: Ringversuch Test 1, log KBE/g zu den Testzeitpunkten, mit Standardabweichung s, relativer Standardabweichung s rel%, Unsicherheit u, mittlere Laborunsicherheit S_{ML} und erweiterter Unsicherheit U_{ex}

Ringversuch Test 1												
Tage	E.coli						S.aureus					
	mlog [log10]	u [log10]	s [log10]	s rel [%]	U _{ex} [log10]	S _{ML} [log10]	mlog [log10]	u [log10]	s [log10]	s rel [%]	U _{ex} [log10]	S _{ML} [log10]
0	5,689	0,153	0,432	7,594	0,864	0,063	5,536	0,098	0,276	4,986	0,552	0,095
2	5,383	0,208	0,549	10,199	1,098	0,079	5,488	0,131	0,375	6,833	0,750	0,104
7	5,095	0,203	0,592	11,619	1,184	0,102	5,088	0,213	0,638	12,539	1,276	0,128
14	4,515	0,378	1,001	22,171	2,002	0,096	2,708	0,504	1,209	44,645	2,418	0,232
28	<0						<0					

Ringversuch Test 1												
Tage	P.aeruginosa						C.albicans					
	mlog [log10]	u [log10]	s [log10]	s rel [%]	U _{ex} [log10]	S _{ML} [log10]	mlog [log10]	u [log10]	s [log10]	s rel [%]	U _{ex} [log10]	S _{ML} [log10]
0	5,570	0,079	0,224	4,021	0,448	0,041	5,561	0,100	0,291	5,233	0,582	0,026
2	<0						5,862	0,130	0,380	6,482	0,760	0,067
7	<0						6,234	0,106	0,279	4,475	0,558	0,055
14	<0						6,185	0,146	0,412	6,661	0,824	0,093
28	<0						5,987	0,200	0,584	9,754	1,168	0,126

Ringversuch Test 1						
Tage	A.brasiliensis					
	mlog [log10]	u [log10]	s [log10]	s rel [%]	U _{ex} [log10]	S _{ML} [log10]
0	5,465	0,094	0,262	4,794	0,524	0,053
2	5,213	0,111	0,305	5,851	0,610	0,102
7	4,909	0,127	0,361	7,354	0,722	0,123
14	4,673	0,185	0,541	11,577	1,082	0,155
28	4,354	0,218	0,608	13,964	1,216	0,167



bei *P.aeruginosa*. Dieser Teststamm war bereits nach 2 Tagen nicht mehr nachweisbar.

Bei den Teststämmen *E.coli* und *S.aureus* konnten bis zum Testzeitpunkt 14 Tage, bei den Teststämmen *C.albicans* und *A.brasiliensis* bis zum Testzeitpunkt 28 Tage koloniebildende Einheiten nachgewiesen werden.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass bei kleineren log KBE/g die Streuung der Einzelergebnisse um den Mittelwert steigt (z.B. Tabelle 1 *S.aureus* zum Testzeitpunkt 0d $U_{ex} = 0,552$ bei $m \log KBE/g$ von 5,536 und zum Testzeitpunkt 14d $U_{ex} = 2,418$ bei $m \log KBE/g$ von 2,708. Der Wert s_{rel} stieg von 4,968% auf 44,645%).

Da jedes Laboratorium den Konservierungsbelastungstest zweimal durchgeführt hat, konnte die laborinterne Messunsicherheit S_L bestimmt werden. Aus all diesen Werten lässt sich die mittlere Laborunsicherheit S_{ML} berechnen (siehe Tabelle 5). Bei einer Gesamtbetrachtung aller Keime und Messzeitpunkte hinsichtlich der mittleren Laborunsicherheit S_{ML} , wurde ein Mittelwert von 0,10 log₁₀ KBE/g berechnet. Dies zeigt, dass die Messunsicherheit innerhalb der Laboratorien deutlich geringer ist als zwischen den Laboratorien.“

Die Abbildung des Youdenplots (Abb. 3) zeigt exemplarisch, dass in Ringversuch Test 1 zu Untersuchungszeitpunkt 2 Tage ein systematischer Fehler in der Durchführung vorhanden ist, da einige Laboratorien mit ihren Messwerten systematisch zu niedrig bzw. systematisch zu hoch liegen.

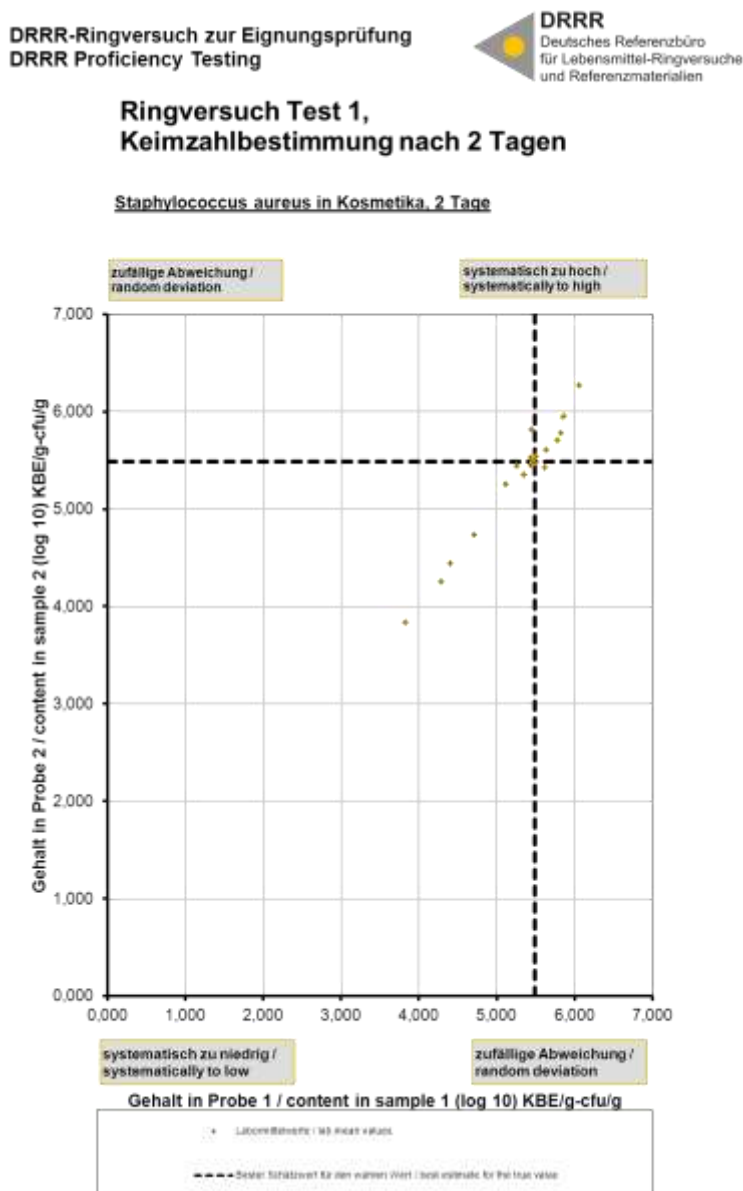


Abbildung 3: exemplarische Darstellung der Laborstreuung in einem Youdenplot für *S.aureus* zu Untersuchungszeitpunkt 2 in Ringversuch Test 1

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Resultate der Keimzahlbestimmungen, die im Rahmen des Konservierungsbelastungstests in verschiedenen Laboratorien ermittelt wurden, im Bereich von 2 – 3 log₁₀ KBE/g größere statistische Unsicherheiten aufweisen als bei Keimzahlen im Bereich von 5 log₁₀ KBE/g. Aber auch in diesem Bereich lagen die erweiterten Unsicherheiten bei bis zu mehr als einer Log-Stufe.

Da der Keimzahlbereich von 2 – 3 log₁₀ KBE/g wichtig für die Beurteilungskriterien ist und Streuungen der ermittelten log KBE/g – Werte eine Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse zwischen Laboratorien erschweren, wurde versucht in einem zweiten Test durch Vorgaben hinsichtlich der Herstellung des Inokulums die Schwankungsbreite der log KBE-Werte zu reduzieren.

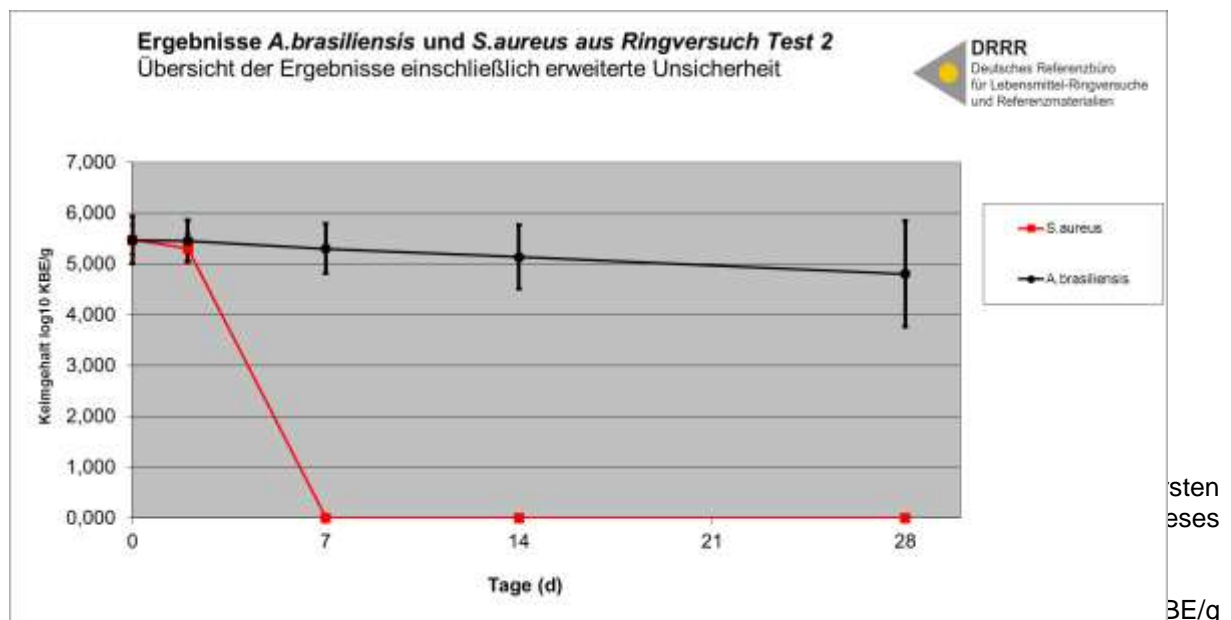
Hierzu wurden die Teststämme *S.aureus* und *A.brasiliensis* ausgewählt, da dort die größten Schwankungen (*S.aureus*) und die niedrigste Absterberate (*A.brasiliensis*) zu beobachten waren.

3.2. Ringversuch Test 2

Die Ergebnisse des zweiten Ringversuchs sind in der Tabelle 6, sowie in der Abbildung 4 zusammengefasst.

Tabelle 6: Ringversuch Test 2, log KBE/g zu den Testzeitpunkten, mit Standardabweichung s, relativer Standardabweichung s rel%, Unsicherheit u, mittlere Laborunsicherheit S_{ML} und erweiterter Unsicherheit U_{ex}

Ringversuch Test 2												
Tage	A.brasiliensis						S.aureus					
	mlog [log10]	u [log10]	s [log10]	s rel [%]	Uex [log10]	S _{ML} [log10]	mlog [log10]	u [log10]	s [log10]	s rel [%]	Uex [log10]	S _{ML} [log10]
0	5,468	0,098	0,276	5,048	0,552	0,101	5,474	0,098	0,276	5,042	0,552	0,136
2	5,457	0,077	0,203	3,720	0,406	0,095	5,303	0,083	0,149	2,810	0,298	0,103
7	5,3	0,095	0,243	4,585	0,486	0,063	<0					
14	5,136	0,123	0,313	6,094	0,626	0,138	<0					
28	4,807	0,2	0,521	10,838	1,042	0,093	<0					



bei dem Teststamm *S.aureus* nicht geprüft werden, da bereits nach 7 Tagen die log₁₀ KBE/g unter der Nachweisgrenze lag.

3.3. Ringversuch Test 3

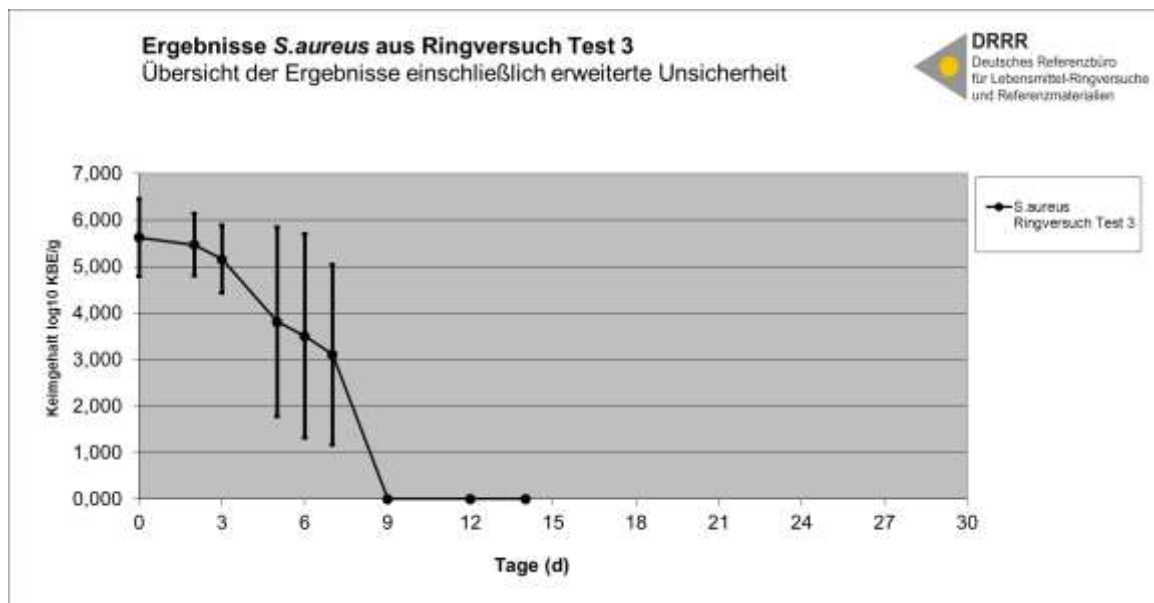
In einem dritten Ringversuch wurde der Test nur mit *S.aureus* wiederholt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Ringversuch Test 2 wurden zusätzliche Testzeitpunkte zur Keimzahlbestimmung eingefügt (siehe Tabelle 7), um den Verlauf der Inaktivierungskinetik zu ermitteln.

Die Ergebnisse des dritten Ringversuchs sind in der Tabelle 7, sowie in der Abbildung 5 zusammengefasst.

Tabelle 7: Ringversuch Test 3, log₁₀ KBE/g zu den Testzeitpunkten, mit Standardabweichung s, relativer Standardabweichung s rel%, Unsicherheit u, mittlere Laborunsicherheit S_{ML} und erweiterter Unsicherheit U_{ex}

Ringversuch Test 3						
Tage	S.aureus	Unsicherheit	s	s rel	Uex	S _{ML}

	[log10]	U [log10]	[log10]	[%]	[log10]	[log10]
0	5,627	0,264	0,418	7,428	0,836	0,072
2	5,472	0,211	0,334	6,104	0,668	0,056
3	5,158	0,256	0,362	7,018	0,724	0,059
5	3,811	0,643	1,016	26,66	2,032	0,082
6	3,509	0,773	1,094	31,18	2,188	0,106
7	3,108	0,792	0,970	31,21	1,940	0,072
9	<0					
12	<0					
14	<0					
28	n.d.					



Test 2 beibehalten.

der
such

Tabelle 8: Tabellarische Gegenüberstellung von Mittelwert, Unsicherheit, Standardabweichung, erweiterter Unsicherheit und mittlere Laborunsicherheit S_{ML} aller KBT-Untersuchungen bezüglich *S.aureus*

Tage	Ringversuch Test 1						Ringversuch Test 2					
	mlog [log10]	u [log10]	s [log10]	s rel [%]	U _{ex} [log10]	S _{ML} [log10]	mlog [log10]	u [log10]	s [log10]	s rel [%]	U _{ex} [log10]	S _{ML} [log10]
0	5,536	0,098	0,276	4,986	0,552	0,095	5,474	0,078	0,146	2,667	0,292	0,136
2	5,488	0,131	0,375	6,833	0,75	0,104	5,303	0,083	0,149	2,81	0,298	0,103
3	n.d.						n.d.					
5	n.d.						n.d.					
6	n.d.						n.d.					
7	5,088	0,213	0,638	12,54	1,276	0,128	<0					
9	n.d.						n.d.					
12	n.d.						n.d.					
14	2,708	0,504	1,209	44,65	2,418	0,232	<0					
28	<0						<0					

Tage	Ringversuch Test 3					
	mlog [log10]	u [log10]	s [log10]	s rel [%]	U _{ex} [log10]	S _{ML} [log10]
0	5,627	0,264	0,418	7,428	0,836	0,072
2	5,472	0,211	0,334	6,104	0,668	0,056
3	5,158	0,256	0,362	7,018	0,724	0,059
5	3,811	0,643	1,016	26,66	2,032	0,082
6	3,509	0,773	1,094	31,18	2,188	0,106
7	3,108	0,792	0,970	31,21	1,940	0,072
9	<0					
12	<0					
14	<0					
28	n.d.					

Hier wurde die Zahl der Testzeitpunkte in der Absterbephase (3, 5, 6, 7, 9 und 12 Tage) erhöht. Die Standardabweichung zum Zeitpunkt der höchsten Reduktion wurde von $\pm 1,2 \log_{10}$ KBE/g auf ca. $\pm 1,0 \log_{10}$ KBE/g verringert. Das erweiterte Messunsicherheitsintervall von ca. $\pm 2,4 \log_{10}$ KBE/g reduzierte sich auf ca. $\pm 2,0 \log_{10}$ KBE/g. Die Reduzierung der Streuung auf den anzustrebenden Wert einer maximalen Messunsicherheit von $0,5 \log_{10}$ KBE/g wurde nicht erreicht.

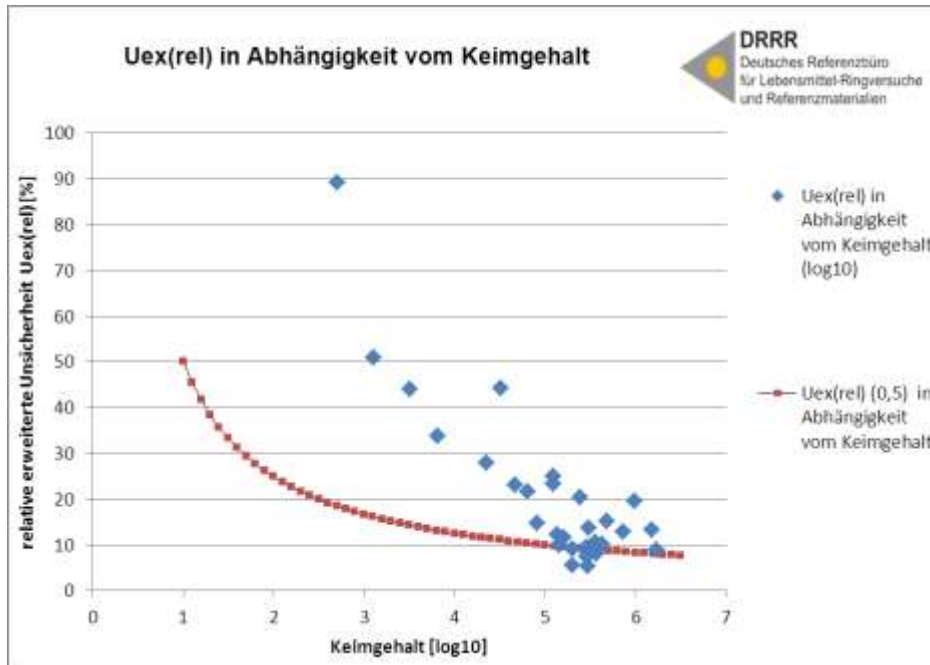


Abbildung 6: Relative erweiterte Unsicherheit $U_{ex,rel}$ in Abhängigkeit von der \log_{10} KBE/g - Auswertung aller mlog aus den drei Ringversuchen für alle untersuchten Mikroorganismen

In Abbildung 6 ist die prozentuale, relative Standardabweichung aller Laboratorien zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten aus allen 3 Ringversuchen und zu allen untersuchten Mikroorganismen in Abhängigkeit von dem Keimgehalt [\log_{10}] der Proben aufgetragen (blau).

Weiterhin ist in Abhängigkeit vom Keimgehalt [\log_{10}] die prozentuale, relative erweiterte Unsicherheit $U_{ex,rel(0,5)}$ als Standard eingetragen (rot). Diese erweiterte Unsicherheit U_{ex} von $0,5 \log_{10}$ KBE/g ist für mikrobiologische Untersuchungen nach ISO 11930 akzeptabel.

Anhand von $U_{ex,rel(0,5)}$ (rot) wird deutlich, dass es sich in der Graphik bei der relativen erweiterten Unsicherheit um einen prozentualen Vergleich von \log_{10} -Werten handelt, weshalb bei niedriger werdenden Keimgehalten der prozentuale Anteil der erweiterten Unsicherheit U_{ex} ansteigt und dementsprechend auch $U_{ex,rel(0,5)}$.

Es wird deutlich, dass bei höheren Keimgehalten von 5-6 \log_{10} KBE/g die relative erweiterte Unsicherheit der Laboratorien insgesamt zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten noch im akzeptablen Bereich liegt. Die prozentuale Abweichung vom Mittelwert mlog liegt für einen Großteil der Werte im Bereich von 6-15 % und damit noch akzeptabel zu $U_{ex,rel(0,5)}$ in diesem Keimzahlbereich.

Die Werte der relativen erweiterten Unsicherheit der Laboratorien liegen bei Keimgehalten im Bereich von 3-4 \log_{10} KBE/g der einzelnen Untersuchungszeitpunkte bei 34 - 50 %. Die Werte liegen damit deutlich über der für diesen Keimzahlbereich berechneten $s_{rel(0,25)}$ von 12-20%.

Bei noch geringeren Keimzahlen scheint der Unterschied zwischen den Laboratorien (ca. 90% relative erweiterte Unsicherheit) und $U_{ex,rel(0,5)}$ (ca. 20-50%) noch größer zu werden.

Während $U_{ex,rel(0,5)}$ (rot) einer e-Funktion folgt, scheint sich der Anstieg der durch die Laboratorien ermittelten Werte mit sinkenden Keimgehalten linear zu verhalten.

4. Interpretation der Ergebnisse

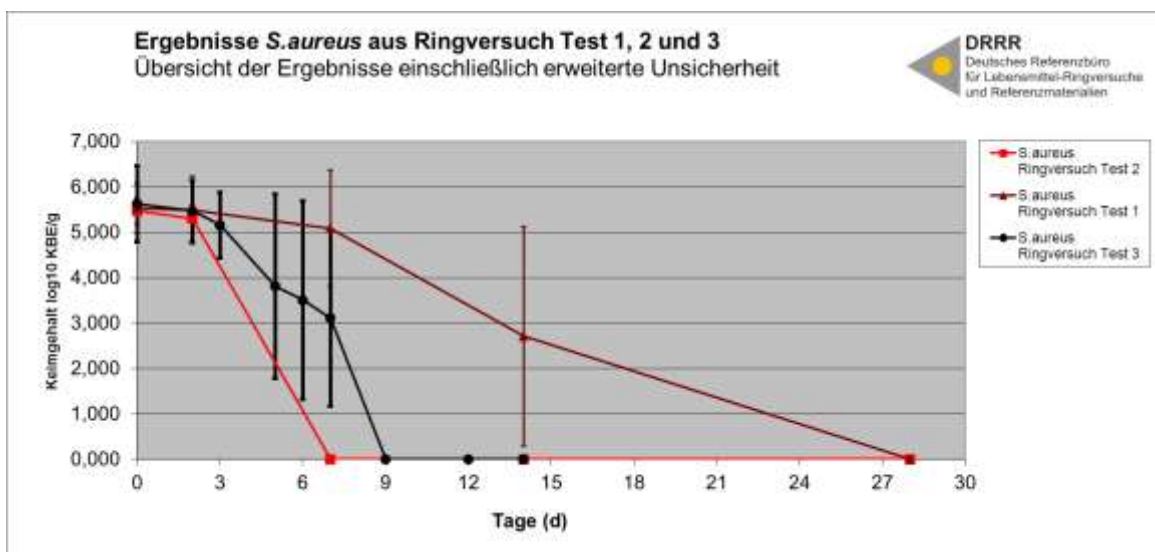
Ziel des Ringversuchs war es zu überprüfen, ob in verschiedenen Laboratorien durchgeführte Prüfungen auf ausreichende Konservierung (Konservierungsmittelbelastungstest) gemäß Ph. Eur. zu vergleichbaren Ergebnissen führen. Da hierfür ein kosmetisches Mittel mit bewusst nicht ausreichender Konservierung eingesetzt wurde, stand nicht die Gesamtbeurteilung im Vordergrund sondern die Vergleichbarkeit der Keimzahlergebnisse zu den verschiedenen Testzeitpunkten.

Trotz der Vorgaben und der Versendung von Teststämmen im Rahmen der Ringversuche 2 und 3 und der damit verbundenen Vereinheitlichung der Testdurchführung, war es nicht möglich, die in Tabelle A der ISO 11930 angegebene akzeptable Abweichung von $\pm 0,5 \log_{10}$ KBE/g in der Reduktionsphase zu erreichen.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Streuung bei KBE-Werten im Bereich von $3 \log_{10}$ KBE/g größer ist als in KBE-Werten im Bereich $5 \log_{10}$ KBE/g. (Abbildung 6)

Damit sind erstens der Vergleichbarkeit von KBE-Werten, die in verschiedenen Laboratorien ermittelt wurden Grenzen gesetzt und zweitens kann es zu unterschiedlichen Bewertungen kommen, wenn KBE-Werte im Bereich von $2 - 3 \log_{10}$ KBE/g herangezogen werden müssen. Erfahrungsgemäß sind größere Schwankungsbreiten bei der Bestimmung von koloniebildenden Einheiten in diesem Bereich beobachtet worden.

Die Streuungen im Bereich von $2 - 3 \log_{10}$ KBE/g, also bei den Bakterien nach 7 Tagen bzw. 14 Tagen, könnten auch auf unterschiedliche Zeitpunkte des Einsetzens der Wirkung des Konservierungsmittelsystems zurückzuführen sein. Dieses würde zur Erklärung des unterschiedlichen Verlaufes der Inaktivierungskinetik von *S.aureus* in Ringversuchen Test 1 - 3 beitragen. Das scheint besonders plausibel unter der Berücksichtigung, dass das Prüfmuster nur schwach konserviert war.



Im Rahmen der Marktüberwachung werden kosmetische Mittel durch Überwachungsbehörden auf ausreichende Konservierung wahrscheinlich zukünftig nach *ISO 11930(2012-01) Cosmetics – Microbiology - Efficacy test and evaluation of the preservation of a cosmetic product* geprüft und beurteilt werden.

Wenn das Ergebnis eindeutig ist (Reduktion der Keimzahl unter die Nachweisgrenze nach 7 Tagen oder keine Abnahme der Keimzahl), wird man sehr wahrscheinlich zu einer übereinstimmenden Beurteilung kommen.

Bei Keimzahlen im Bereich von $2 - 3 \log_{10}$ KBE/g wird man durch möglicherweise größere Streuungen der Ergebnisse zu unterschiedlichen Bewertungen kommen, ganz besonders wenn Ergebnisse laborübergreifend verglichen werden.

In solchen Fällen ist es erforderlich, zumindest die Versuchsbedingungen laborübergreifend zu vergleichen. Hierzu gehören unter anderem die Vorbereitung der Testkeime, die Keimzahlbestimmungsmethode und die Probenaufbereitung. Selbst dann ist jedoch nicht sichergestellt, dass ein vergleichbares Ergebnis erzielt wird.

In diesen Fällen kann es erforderlich sein, zu einer finalen Bewertung der ausreichenden Konservierung nicht nur die einzelnen Keimzahlergebnisse zu bewerten, sondern auch weitere Aspekte zu berücksichtigen, wie den Verlauf der Inaktivierungskinetik, die Rezepturhistorie und Ergebnisse aus Anwendungstests.

Fazit: Der Konservierungsmittelbelastungstest ist die allgemein akzeptierte Methodik zum Nachweis der ausreichenden Konservierung eines kosmetischen Mittels. Aufgrund der erzielten Untersuchungsergebnisse sind bei der Beurteilung der ermittelten Ergebnisse die methodischen Limitierungen zu berücksichtigen, besonders wenn die Testungen in verschiedenen Laboratorien durchgeführt wurden. Vor einer finalen Bewertung sind zusätzliche Aspekte wie der Verlauf der Inaktivierungskinetik, die Rezepturhistorie, Reklamationsstatistik und Ergebnisse aus Anwendungstests mit einzubeziehen.

Arbeitskreisverantwortliche:

Dr. Sheida Hönlinger
Head of Personal & Homecare Germany/Austria
SGS Institut Fresenius GmbH
Fritz-Atz Str. 8.
Phone 0049-7148 744- 214
Mobil: 0043-664-4107510
Email:sheida.hoenlinger@sgs.com

oder Ringversuchskoordinator:

Dr. Ulrich Leist
DRRR
Deutsches Referenzbüro für Lebensmittel-Ringversuche und Referenzmaterialien GmbH
Bodmanstraße 4 D-87435 Kempten

Fon: +49 (0)8 31/960 878-0
Fax: +49 (0)8 31/960 878-99
E-mail: info@DRRR.de Website: www.DRRR.de

5. Anhang

5.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Rezeptur für den Konservierungsbelastungstest	3
Tabelle 2: Vorgaben zur Anzucht von <i>S.aureus</i> für den Ringversuch Test 2 und Test 3	4
Tabelle 3: Vorgaben zur Inokulierung beider Mikroorganismen für den Ringversuch Test 2 und Test 3	4
Tabelle 4: Übersicht des Testaufbaus	5
Tabelle 5: Ringversuch Test 1, log KBE/g zu den Testzeitpunkten, mit Standardabweichung s , relativer Standardabweichung $s_{rel}\%$, Unsicherheit u , mittlere Laborunsicherheit S_{ML} und erweiterter Unsicherheit U_{ex}	7
Tabelle 6: Ringversuch Test 2, log KBE/g zu den Testzeitpunkten, mit Standardabweichung s , relativer Standardabweichung $s_{rel}\%$, Unsicherheit u , mittlere Laborunsicherheit S_{ML} und erweiterter Unsicherheit U_{ex}	9
Tabelle 7: Ringversuch Test 3, log ₁₀ KBE/g zu den Testzeitpunkten, mit Standardabweichung s , relativer Standardabweichung $s_{rel}\%$, Unsicherheit u , mittlere Laborunsicherheit S_{ML} und erweiterter Unsicherheit U_{ex}	9
Tabelle 8: Tabellarische Gegenüberstellung von Mittelwert, Unsicherheit, Standardabweichung, erweiterter Unsicherheit und mittlere Laborunsicherheit S_{ML} aller KBT-Untersuchungen bezüglich <i>S.aureus</i>	10

5.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Doppelbestimmung, wie sie für den Ringversuch Test 2 und Test 3 angewendet wurde.	5
Abbildung 2: Ringversuch Test 1, Verlauf der Inaktivierung der Teststämmen – log ₁₀ KBE/g pro Testzeitpunkt	7
Abbildung 3: exemplarische Darstellung der Laborstreuung in einem Youdenplot für <i>S.aureus</i> zu Untersuchungszeitpunkt 2 in Ringversuch Test 1	8
Abbildung 4: Ringversuch Test 2, Verlauf der Inaktivierung der Teststämmen – log ₁₀ KBE/g pro Testzeitpunkt	9
Abbildung 5: Ringversuch Test 3, Verlauf der Inaktivierung der Teststämmen - log ₁₀ KBE/g pro Testzeitpunkt	10
Abbildung 6: Relative erweiterte Unsicherheit $U_{ex,rel}$ in Abhängigkeit von der log ₁₀ KBE/g - Auswertung aller m_{log} aus den drei Ringversuchen für alle untersuchten Mikroorganismen	11
Abbildung 7: Ringversuch Test 1, 2 und 3, Verlauf der Inaktivierung von <i>S.aureus</i> - log KBE/g pro Testzeitpunkt	12

5.3. Abkürzungsverzeichnis (alphabetisch)

<i>A.brasiliensis</i>	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GÖCH	Gesellschaft Österreichischer Chemiker
KBE	Koloniebildende Einheiten
KBT	Konservierungsbelastungstest
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Ph. Eur	European Pharmacopoeia
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

5.4. Literaturverzeichnis

- RICHTLINIE DES RATES vom 27. Juli 1976 zur Angleichung der Rechtsvorschriften der Mitgliedstaaten über kosmetische Mittel (76/768/EWG)
- VERORDNUNG (EG) Nr. 1223/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 30. November 2009 über kosmetische Mittel
- SCCS Notes of Guidance, 7th revision, 4-4.3
- ISO 11930 Cosmetics – Microbiology – Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product (First edition 2012-04-01)
- ISO 11930 (2012-01) Cosmetics –Microbiology – Efficacy test and evaluation of the preservation of a cosmetic product
- European Pharmacopoeia (Ph. Eur. 5.1.3, Efficacy of antimicrobial preservation)

5.5. Danksagung

Die Gesellschaft Österreichischer Chemiker (GÖCH) möchte den folgenden Mitwirkenden des Arbeitskreises Mikrobiologie für die Mitarbeit an dieser Publikation danken (in alphabetischer Reihenfolge):

Michael Bogdahn (Beiersdorf AG)
Erhard Diwald (Plantapharm GmbH)
Karin Gromann (Bundesministerium für Gesundheit)
Viviane Handler-Kunze (GW Cosmetics GmbH)
Sheida Hönlinger (SGS Institut Fresenius GmbH)
Claudia Hoidn (Adler Pharma Produktion und Vertrieb GmbH)
Fernando Ibarra (Dr. Straetmans GmbH)
Erich Leitner (GÖCH)
Birgit Mathes (Adler Pharma Produktion und Vertrieb GmbH)
Monika Meyer (Logocos Naturkosmetik AG)
Bettina Mosser (SGS Institut Fresenius Austria GmbH)
Joelle Nussbaum (WIN COSMETIC GmbH & Co. KG)
Gregor Özelt (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH)
Wolfgang Stelzhammer (Donau Kanol GmbH & Co KG)
Andrea Weber (Dr. Babor GmbH & Co. KG)
Axel Wehrmann (SGS Institut Fresenius GmbH)
Nadine Wentzel (Dr. Babor GmbH & Co. KG)

Ganz besonders bedanken möchten wir uns bei:

- Frau Karin Gromann (Österreichisches Bundesministerium für Gesundheit)
für ihre Unterstützung bei der Organisation,
- Frau Monika Meyer (Logocos Naturkosmetik AG)
für die Entwicklung und Produktion der einheitlichen Testformulierungen,
- Herrn Michael Bogdahn (Beiersdorf AG),
• Herrn Fernando Ibarra (Dr. Straetmans GmbH),
• Herrn Axel Wehrmann (SGS Institut Fresenius GmbH)
für die Durchführung der Vortests,
- Frau Joelle Nussbaum (WIN COSMETIC GmbH & Co. KG)
• Herrn Michael Bogdahn (Beiersdorf AG)
• Herrn Gregor Özelt (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH)
für die fachliche Prüfung,
- Herrn Ulrich Leist (Deutsches Referenzbüro für Lebensmittel-Ringversuche und Referenzmaterialien GmbH)
- Herrn Norman Sander (Deutsches Referenzbüro für Lebensmittel-Ringversuche und Referenzmaterialien GmbH)
für die Unterstützung hinsichtlich der statistischen Auswertung und Interpretation der Ergebnisse.

Sheida Hönlinger
Fachliche Leitung und
Organisation des Arbeitskreises
Mikrobiologie

Erich Leitner
Geschäftsführer GÖCH

Erhard Diwald
Vorsitzender Arbeitsgruppe
Kosmetik, GÖCH