МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СОВЕТ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ, МЕТРОЛОГИИ И СЕРТИФИКАЦИИ
(МГС)
INTERSTATE COUNCIL FOR STANDARDIZATION, METROLOGY AND CERTIFICATION
(ISC)

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ ISO 18416— 2013

Продукция парфюмерно-косметическая

МИКРОБИОЛОГИЯ

Обнаружение *Candida albicans*

(ISO 18416:2007, Cosmetics — Microbiology — Detection of *Candida albicans*, IDT)

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН Республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ) на основе собственного перевода на русский язык англоязычной версии стандарта, указанного в пункте 5

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 7 июня 2013 г. № 43)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004—97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 июня 2016 г. № 612-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 18416—2013 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 июля 2017 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 18416:2007 «Косметика. Микробиология. Обнаружение Candida albicans» («Cosmetics — Microbiology — Detection of Candida albicans», IDT).

Международный стандарт ISO 18416:2007 разработан техническим комитетом ISO/TC 217 «Косметика» Международной организации по стандартизации (ISO).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие с ГОСТ 1.5 (подраздел 3.6).

При применении настоящего стандарта рекомендуется использовать вместо ссылочных международных стандартов соответствующие им межгосударственные стандарты, сведения о которых приведены в дополнительном приложении ДА

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

7 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2019 г.

Информация о введении в действие (прекращении действия) настоящего стандарта и изменений к нему на территории указанных выше государств публикуется в указателях национальных стандартов, издаваемых в этих государствах, а также в сети Интернет на сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации.

В случае пересмотра, изменения или отмены настоящего стандарта соответствующая информация будет опубликована на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации в каталоге «Межгосударственные стандарты»

© ISO, 2007 — Все права сохраняются
© Стандартинформ, оформление, 2016, 2019

В Российской Федерации настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения . . . 1
2 Нормативные ссылки . . . 1
3 Термины и определения . . . 2
4 Сущность метода . . . 2
5 Разбавители и питательные среды . . . 2
6 Инструменты и стеклянная лабораторная посуда . . . 4
7 Штаммы микроорганизмов . . . 4
8 Отбор и хранение проб . . . 4
9 Проведение анализа . . . 5
10 Обработка результатов (обнаружение ***Candida albicans***) . . . 6
11 Нейтрализация антимикробных свойств продукции . . . 6
12 Протокол испытания . . . 7
Приложение А (справочное) Другие питательные среды . . . 8
Приложение В (справочное) Нейтрализаторы антимикробной активности консервантов и промывные жидкости . . . 11
Приложение ДА (справочное) Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам . . . 12
Библиография . . . 13

Введение

Микробиологический контроль парфюмерно-косметической продукции должен выполняться согласно соответствующему анализу степени микробиологического риска, для того чтобы обеспечить ее качество и безопасность для потребителей.

Анализ микробиологического риска зависит от таких параметров, как:

- возможное изменение парфюмерно-косметической продукции;
- патогенность микроорганизмов;
- область нанесения парфюмерно-косметической продукции (волосы, кожа, глаза, слизистые оболочки и т. п.);
- тип потребителей (взрослые, дети, включая детей до 3 лет).

Для парфюмерно-косметической и другой аналогичной продукции является важным обнаружение кожных болезнетворных микроорганизмов, таких как *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida albicans*. Обнаружение других видов микроорганизмов также может представлять интерес, поскольку эти микроорганизмы (включая индикаторы фекального загрязнения, например *Escherichia coli*) указывают на несоблюдение гигиенических требований в процессе производства.

М Е Ж Г О С У Д А Р С Т В Е Н Н Ы Й С Т А Н Д А Р Т

Продукция парфюмерно-косметическая

МИКРОБИОЛОГИЯ

Обнаружение *Candida albicans*

Perfumery and cosmetic products. Microbiology.
Detection of *Candida albicans*

Дата введения — 2017—07—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие требования к методу обнаружения и идентификации *Candida albicans* в парфюмерно-косметической продукции.

В целях обеспечения качества и безопасности парфюмерно-косметической продукции рекомендуется проводить микробиологический анализ для видов парфюмерно-косметической продукции с высокой степенью микробиологического риска.

К парфюмерно-косметической продукции с низкой степенью микробиологического риска относится продукция с низкой водной активностью, продукция на спиртовой основе, продукция с крайними значениями pH и т. д.

Метод, приведенный в настоящем стандарте, основан на обнаружении *Candida albicans* в неселективной жидкой среде (бульоне для обогащения) с последующим выделением микроорганизмов на селективной агаризованной среде.

Допускается в зависимости от требуемого уровня обнаружения применять и другие методы.

Примечание — Для обнаружения *Candida albicans* субкультуры могут быть пересеяны на неселективные питательные среды с последующей поэтапной идентификацией (например, с помощью идентификационных тестов).

Отдельные детали данного метода могут быть неприменимы для некоторых видов продукции (например, для нерастворимой в воде продукции). Могут использоваться другие стандарты (например, ISO 18415).

Для обнаружения *Candida albicans* в парфюмерно-косметической продукции допустимо использовать другие методы, изложенные в соответствующих стандартах, если выполняются условия прецизионности, а также обеспечивается сопоставимость результатов.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходимы следующие ссылочные стандарты. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных — последнее издание (включая все изменения).

ISO 21148:2005[1)], Cosmetics — Microbiology — General instructions for microbiological examination (Косметика. Микробиология. Общие требования к микробиологическому контролю)

EN 12353:2006, Chemical disinfectants and antiseptics — Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal, sporicidal and fungicidal activity (Средства дезинфицирующие химические и антисептики. Сохранение микроорганизмов для испытаний, используемых для определения бактерицидной, спороцидной и фунгицидной активности)

[1)] Действует ISO 21148:2017.

Издание официальное

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1 **продукция** (product): Часть идентифицированной парфюмерно-косметической продукции, полученная лабораторией для испытания (анализа).

3.2 **проба** (sample): Часть продукции в количестве не менее 1 г или 1 $см^3$, которая используется при проведении испытаний для приготовления исходной суспензии.

3.3 **исходная суспензия** (initial suspension): Суспензия (или раствор) пробы в определенном объеме соответствующего бульона для обогащения.

3.4 **разведение пробы** (sample dilution): Разведение исходной суспензии.

3.5 **специфические микроорганизмы** (specified microorganisms): Мезофильные аэробные бактерии или дрожжи, нежелательные в парфюмерно-косметической продукции, которые способны вызывать инфекции на коже человека или в области глаз или являются признаком нарушения гигиенических требований в процессе производства.

3.6 ***Candida albicans***: Дрожжи, которые образуют выпуклые колонии от белого до бежевого и кремового цветов на поверхности селективной среды.

Примечание — Главными признаками для идентификации являются образование «ростковой трубки» и/или псевдомицелия и хламидоспоры при проведении испытания по методу, установленному в настоящем стандарте.

3.7 **бульон для обогащения** (enrichment broth): Неселективная жидкая питательная среда, содержащая соответствующие нейтрализаторы и/или диспергирующие вещества и валидированная для испытуемой продукции.

4 Сущность метода

Первым этапом испытания является обогащение в неселективной питательной среде (бульоне) для увеличения числа микроорганизмов без риска подавления селективными ингредиентами, которые присутствуют в селективной/дифференциальной среде.

Второй этап испытания (выделение) выполняется на селективной среде с последующей идентификацией.

Возможное подавление микробного роста пробой должно быть нейтрализовано для обеспечения обнаружения жизнеспособных микроорганизмов [1]. Во всех случаях и независимо от применяемой методики нейтрализация антимикробных свойств продукции должна быть проверена и валидирована [2]—[4].

5 Разбавители и питательные среды

5.1 Общие положения

Общие рекомендации приведены в ISO 21148. Если в настоящем стандарте упоминается вода, то это означает, что применяют дистиллированную или очищенную воду, как установлено в ISO 21148.

Бульон для обогащения используют для диспергирования пробы и для увеличения первоначальной микробной популяции. Он может содержать нейтрализаторы, если испытуемая проба обладает антимикробными свойствами. Проверка эффективности нейтрализации проводится в соответствии (см. раздел 11). Информация относительно подходящих нейтрализаторов приведена в приложении В.

Бульон для обогащения (5.3.3.1) или любая из сред, приведенных в приложении А, пригодны для обнаружения *Candida albicans* в соответствии с настоящим стандартом при условии, что они валидированы согласно разделу 11.

Можно использовать другие разбавители и питательные среды, если была продемонстрирована их пригодность.

5.2 Разбавитель для дрожжевой суспензии (раствор хлорида натрия с триптоном)

5.2.1 Общие положения

Разбавитель используется для приготовления дрожжевой суспензии, применяемой для процедуры валидации (см. раздел 11).

5.2.2 Состав

триптон, панкреатический гидролизат казеина — 1,0 г;

хлорид натрия — 8,5 г;

вода — 1000 $см^3$.

5.2.3 Приготовление

Компоненты растворяют в воде, перемешивая при нагревании. Разливают раствор в лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

После стерилизации и охлаждения раствора pH должен быть равен 7,0 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

5.3 Питательные среды

5.3.1 Общие положения

Питательные среды могут быть приготовлены, как указано ниже, или из готовых сухих питательных сред согласно инструкциям изготовителя. Должны соблюдаться инструкции поставщика среды.

Примечание — Готовые к употреблению среды можно использовать, если их состав и/или ростовые свойства сопоставимы с приведенными ниже.

5.3.2 Агаризованная среда для подтверждения

5.3.2.1 Декстрозный агар Сабуро (SDA)

5.3.2.1.1 Состав

- декстроза — 40,0 г;
- пептический перевар животной ткани — 5,0 г;
- панкреатический гидролизат казеина — 5,0 г;
- агар — 15,0 г;
- вода — 1000 $см^3$.

5.3.2.1.2 Приготовление

Компоненты или готовую сухую среду растворяют в воде, перемешивая при нагревании. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121°С в течение 15 мин. После стерилизации pH среды должен быть равен 5,6 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

5.3.2.2 Другие агаризованные среды для валидации

Могут использоваться другие подходящие агаризованные среды (см. приложение А).

5.3.3 Бульон для обогащения

5.3.3.1 Бульон Eugon LT 100

5.3.3.1.1 Общие положения

Данная среда содержит ингредиенты: лецитин и полисорбат 80, которые нейтрализуют ингибирующие вещества, присутствующие в пробе, а также диспергирующий агент октоксинол 9.

5.3.3.1.2 Состав

- панкреатический гидролизат казеина — 15,0 г;
- папаиновый перевар соевой муки — 5,0 г;
- L-цистин — 0,7 г;
- хлорид натрия — 4,0 г;
- сульфит натрия — 0,2 г;
- глюкоза — 5,5 г;
- яичный лецитин — 1,0 г;
- полисорбат 80 — 5,0 г;
- октоксинол 9 — 1,0 г;
- вода — 1000 $см^3$.

5.3.3.1.3 Приготовление

Последовательно растворяют компоненты (полисорбат, октоксинол 9 и яичный лецитин) в кипящей воде до их полного растворения. Остальные компоненты растворяют в воде, перемешивая их при нагревании. Разливают среду в лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,0 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

5.3.3.2 Другие бульоны для обогащения

Можно использовать и другие подходящие бульоны для обогащения (см. приложение А).

5.3.4 Селективная агаризованная среда для выделения *Candida albicans*

5.3.4.1 Декстрозный агар Сабуро с хлорамфениколом

5.3.4.1.1 Состав

- декстроза — 40,0 г;
- пептический перевар животной ткани — 5,0 г;
- панкреатический гидролизат казеина — 5,0 г;
- хлорамфеникол — 0,050 г;
- агар — 15,0 г;
- вода — 1000 см^3.

5.3.4.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты (включая хлорамфеникол) или готовую сухую среду в воде, перемешивая при нагревании. Разливают среду в лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH среды должен быть равен 5,6 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

5.3.4.2 Другие селективные агаризованные среды

Можно использовать другие селективные агаризованные среды (см. приложение А).

5.3.5 Кукурузный агар с 1%-ным полисорбатом 80

5.3.5.1 Состав

- кукурузный экстракт — 50,0 г;
- агар — 15,0 г;
- полисорбат 80 (ТВИН) — 10,0 г;
- вода — 1000 см^3.

5.3.5.2 Приготовление

Растворяют компоненты или готовую сухую среду в воде, перемешивая при нагревании. Разливают среду в лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH среды должен быть равен 6,0 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

6 Инструменты и стеклянная лабораторная посуда

Лабораторное оборудование, инструменты и стеклянная посуда должны соответствовать ISO 21148.

7 Штаммы микроорганизмов

Для валидации условий проведения испытаний используется следующий контрольный штамм:

Candida albicans ATCC[1)] 10231, или один из следующих эквивалентных штаммов: IP[2)] 48.72, или NCPF[3)] 3179, или NBRC[4)] 1594, или KCTC[5)] 17205, или другой эквивалентный штамм из национальной коллекции.

Культуру следует восстановить согласно процедурам, предоставляемым поставщиком контрольного штамма.

Штаммы хранят в лаборатории в соответствии с инструкцией поставщика.

8 Отбор и хранение проб

При необходимости продукцию, подлежащую испытаниям, хранят при комнатной температуре.

Не следует выдерживать в термостате, охлаждать и замораживать продукцию (3.1) и пробы (3.2) ни до, ни после анализа.

[1)] ATCC — American Type Culture Collection [Американская коллекция типовых культур (микроорганизмов)].

[2)] IP — Institute Pasteur (Институт Пастера).

[3)] NCPF — National Collection of Pathogenic Fungi (Национальная коллекция патогенных грибов).

[4)] NBRC — National Biological Resource Center (Национальный центр биологических исследований).

[5)] KCTC — Korean Collection for Type Culture (Корейская коллекция типовых культур).

Отбор и подготовку проб парфюмерно-косметической продукции для анализа следует проводить в соответствии с ISO 21148. Анализируют пробы по ISO 21148 или в соответствии с разделом 9 настоящего стандарта.

9 Проведение анализа

9.1 Общие положения

Для подготовки пробы, приготовления исходной суспензии и разведений используют стерильные материалы, оборудование и асептические методы. В случае приготовления исходной суспензии в подходящем разбавителе время между окончанием приготовления суспензии и моментом ее внесения в бульон для обогащения не должно превышать 45 мин, если иное не оговорено в соответствующих протоколах или документах.

9.2 Приготовление исходной суспензии в бульоне для обогащения

9.2.1 Общие положения

Пробу из хорошо перемешанной испытуемой продукции в количестве не менее 1 г или 1 $см^3$ вносят в бульон для обогащения объемом не менее 9 $см^3$.

Отмечают навеску *S*, точную массу или точный объем пробы.

Метод необходимо контролировать для гарантии того, что состав (с добавленным в конце приготовления нейтрализатором) и объем бульона удовлетворяют требованиям (см. 11.3).

Примечание — В некоторых случаях (когда это возможно) фильтруют парфюмерно-косметическую продукцию через мембранный фильтр, который затем погружают в бульон для обогащения, что облегчает нейтрализацию антимикробных свойств продукции (см. 11.3).

9.2.2 Водорастворимая продукция

Навеску *S* пробы продукции вносят в соответствующий объем бульона.

9.2.3 Нерастворимая в воде продукция

Навеску *S* пробы продукции вносят в соответствующий объем разбавителя (например, полисорбат 80).

Диспергируют пробу в разбавителе и добавляют соответствующий объем бульона.

9.2.4 Продукция, подвергающаяся фильтрованию

Используют мембранный фильтр с номинальным размером пор не более 0,45 мкм.

Навеску *S* пробы продукции помещают на мембранный фильтр в фильтровальном аппарате (см. ISO 21148). Сразу же фильтруют и промывают мембранный фильтр, используя определенные объемы воды и/или разбавителя.

Погружают мембранный фильтр в пробирку или колбу подходящего размера, содержащую соответствующий объем бульона.

9.3 Инкубация бульона для обогащения

Инкубируют исходную суспензию, приготовленную в бульоне (см. 9.2), при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение не менее 20 ч, но не более 72 ч.

9.4 Обнаружение и идентификация *Candida albicans*

9.4.1 Выделение

Стерильной петлей делают пересев аликвоты инкубированного бульона для обогащения на поверхность декстрозного агара Сабуро с хлорамфениколом, чтобы получить изолированные колонии.

Переворачивают чашку Петри и инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение не менее 24 ч, но не более 48 ч. Проверяют наличие характерных колоний (см. таблицу 1).

Таблица 1 — Морфологические характеристики *Candida albicans* на селективной агаризованной среде

Селективная среда	Характеристика колоний *Candida albicans*
Декстрозный агар Сабуро с хлорамфениколом	От белого до бежевого и кремового цветов, выпуклые

9.4.2 Идентификация

9.4.2.1 Общие положения

Candida albicans могут быть диморфными и способны создавать псевдогифы, некоторые — истинные гифы и грозди круглых бластоконидий, а также крупные толстостенные хламидоспоры. При низкой температуре окружающей среды данная культура может представлять эту псевдомицелиальную форму, однако она может изменяться на одноклеточную форму при повышенных температурах.

Проводят дальнейшее изучение подозрительных колоний, изолированных на декстрозной агаризованной среде Сабуро с хлорамфениколом. Наличие *Candida albicans* может быть подтверждено и другими подходящими культуральными и биохимическими тестами.

9.4.2.2 Окраска по Граму

Окраску проводят по ISO 21148

Под микроскопом клетки *Candida albicans* фиолетовые, короткие овальные или удлиненные, иногда почкуются.

9.4.2.3 Образование «ростковой трубки»

9.4.2.3.1 Помещают 0,5—1 $см^3$ сыворотки (фетальная телячья или лошадиная сыворотка) в небольшую пробирку.

9.4.2.3.2 Эмульгируют небольшую часть колонии дрожжей в сыворотке.

9.4.2.3.3 Инкубируют на водяной бане при температуре (37 ± 1) °С в течение 1,5—2 ч или в термостате при температуре (37 ± 2) °С в течение 3 ч.

9.4.2.3.4 Помещают каплю сыворотки на предметное стекло, закрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом образование «ростковой трубки».

«Ростковые трубки» появляются в виде цилиндрических волокон (нитей) из бластопор без каких-либо сужений (перетяжек) в месте возникновения и без утолщений вдоль длины волокна.

Образование «ростковых трубок» является признаком присутствия *Candida albicans*.

Если «ростковые трубки» не были сформированы, колонии исследуют на образование псевдогифов и хламидоспор согласно 9.4.2.4.

9.4.2.4 Культура на кукурузном агаре с 1%-ным полисорбатом 80

9.4.2.4.1 Петлей делают посев небольшой части дрожжевой колонии на поверхности среды через центр чашки Петри. На штрих помещают стерильное покровное стекло.

9.4.2.4.2 Инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С до 3 дней.

9.4.2.4.3 Через 24 ч снимают крышку чашки Петри и изучают полученный рост через стекло под микроскопом с увеличением от $100^{\times}$ до $400^{\times}$.

Candida albicans образует крупную, сильно преломляющую, толстостенную хламидоспору, которая может быть расположена терминально или на коротких боковых ветвях.

10 Обработка результатов (обнаружение *Candida albicans*)

Если при идентификации колоний подтверждено наличие данного вида, результат представляют следующим образом: «бактерии вида *Candida albicans* обнаружены в навеске *S* пробы».

Если после обогащения роста не наблюдалось и/или если идентификация колоний не подтвердила наличие данного вида, результат представляют следующим образом: «бактерии вида *Candida albicans* не обнаружены в навеске *S* пробы».

11 Нейтрализация антимикробных свойств продукции

11.1 Общие положения

Описанные требования подтверждают, что микроорганизм *Candida albicans* может расти в условиях проведения анализа.

11.2 Приготовление инокулята (посевного материала)

Перед проведением испытаний засевают поверхность среды, содержащей соевый и казеиновый гидролизаты (SCDA) или декстрозный агар Сабуро (SDA), штаммом *Candida albicans*. Инкубируют чашки при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 18—24 ч.

Стерильной петлей штриховыми движениями снимают с поверхности среды выросшие колонии и ресуспендируют в разбавителе для приготовления калиброванной суспензии с концентрацией клеток $1 \cdot 10^6$ КОЕ/$см^3$ [количество клеток можно измерить, используя спектрофотометр, см. ISO 21148 (приложение С)].

Калиброванную суспензию и ее разведения используют в течение 2 ч.

11.3 Валидация метода обнаружения

11.3.1 Метод

11.3.1.1 В пробирках, содержащих по 9 $см^3$ разбавителя, готовят разведения калиброванной суспензии, чтобы в конечном счете получить концентрацию микроорганизмов, равную 100—500 КОЕ/$см^3$. Для подсчета окончательного количества жизнеспособных микроорганизмов в разведенной калиброванной суспензии вносят 1 $см^3$ суспензии в чашку Петри и заливают 15—20 $см^3$ расплавленной агаризованной среды. Температура расплавленной среды поддерживается с помощью водяной бани на уровне не более 48 °С. Дают среде в чашках застыть, а затем инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 20—24 ч.

11.3.1.2 Параллельно готовят две (две повторности) исходные суспензии пробы в пробирке или колбе, соблюдая выбранные для анализа условия (не менее 1 г или 1 $см^3$ испытуемой продукции и определенный объем бульона для обогащения). Если используют метод мембранной фильтрации, то фильтруют в двух повторностях не менее 1 $см^3$ испытуемой продукции и переносят каждый мембранный фильтр в пробирку или колбу, содержащую бульон для обогащения в условиях, выбранных для проведения испытаний.

11.3.1.3 Стерильно вносят 0,1 $см^3$ разведенной калиброванной суспензии (11.3.1.1) тест-культуры *Candida albicans* в одну пробирку или колбу (валидационный тест). Перемешивают, затем инкубируют обе пробирки или колбы (валидационный тест и неконтаминированный контроль) при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 20—24 ч.

11.3.1.4 Проводят выделение из каждой пробирки или колбы (валидационный тест и неконтаминированный контроль). Используя стерильную петлю, делают высев методом истощающего штриха на поверхность декстрозной агаризованной среды Сабуро с хлорамфениколом, разлитой в чашки Петри (диаметр от 85 до 100 мм) в количестве приблизительно 15—20 $см^3$. Инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 20—24 ч.

11.3.2 Обработка результатов валидации

Проверяют, что разведенная калиброванная суспензия дрожжей содержит от 100 до 500 КОЕ/$см^3$ микроорганизмов.

Нейтрализация и метод обнаружения являются достоверными, когда ростовые характеристики *Candida albicans* наблюдаются у микроорганизмов, выросших на чашке с высевом из пробирки или колбы с валидационным тестом (контаминированной калиброванной суспензией), и отсутствует рост на чашке с высевом из пробирки или колбы с неконтаминированным контролем.

Когда обнаружен рост на чашке с высевом из пробирки или колбы с неконтаминированным контролем (контаминированная продукция), нейтрализация и метод обнаружения являются достоверными, если бактерии вида *Candida albicans* выделены на чашке Петри с высевом из пробирки или колбы с валидационным тестом.

Отсутствие роста на чашках Петри с высевом из пробирки или колбы с валидационным тестом указывает на то, что антимикробная активность все еще не нейтрализована и требуется изменение условий метода путем увеличения объема питательного бульона, при этом количество продукции остается тем же, или путем добавления большего количества инактивирующего вещества в бульон для обогащения, или путем подбора условий, которые позволят выделить *Candida albicans*.

Если, несмотря на введение подходящих инактивирующих веществ и значительное увеличение объема бульона, все еще невозможно выделить жизнеспособные культуры, как описано выше, это указывает на малую вероятность контаминации продукции бактериями вида *Candida albicans*.

12 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать следующую информацию:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации продукции;

b) используемый метод;

c) полученные результаты;

d) все детали приготовления исходной суспензии;

e) описание метода с указанием использованных нейтрализующих веществ и питательных сред;

f) валидацию метода, даже если испытание проводилось отдельно;

g) любые моменты, не указанные в настоящем стандарте или рассматриваемые как необязательные, вместе с деталями, которые могут повлиять на полученные результаты.

Приложение А
(справочное)

Другие питательные среды

А.1 Другие бульоны для обогащения

А.1.1 Жидкая среда, содержащая соевый и казеиновый гидролизаты

А.1.1.1 Состав

- панкреатический гидролизат казеина — 17,0 г;
- папаиновый перевар соевой муки — 3,0 г;
- хлорид натрия — 5,0 г;
- двузамещенный фосфат калия — 2,5 г;
- декстроза — 2,5 г;
- вода — 1000 $см^3$.

А.1.1.2 Приготовление

Растворяют все компоненты (или готовую сухую среду) в воде, нагревая при необходимости. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

После стерилизации и охлаждения раствора pH должен быть равен 7,3 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

А.1.2 Модифицированный бульон Letheen

А.1.2.1 Состав

- пептический перевар мяса — 20,0 г;
- панкреатический гидролизат казеина — 5,0 г;
- говяжий экстракт — 5,0 г;
- дрожжевой экстракт — 2,0 г;
- лецитин — 0,7 г;
- полисорбат 80 (ТВИН) — 5,0 г;
- хлорид натрия — 5,0 г;
- бисульфит натрия — 0,1 г;
- вода — 1000 $см^3$.

А.1.2.2 Приготовление

Последовательно растворяют в кипящей воде полисорбат 80 и лецитин до их полного растворения. Растворяют другие компоненты, перемешивая при нагревании. Перемешивают осторожно во избежание пенообразования. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,2 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

А.1.3 Глюкозо-пептонная среда с лецитином и полисорбатом 80 (бульон GPLP 80)

А.1.3.1 Состав

- глюкоза — 20,0 г;
- дрожжевой экстракт — 2,0 г;
- сульфат магния — 0,5 г;
- пептон — 5,0 г;
- двузамещенный фосфат калия — 1,0 г;
- лецитин — 1,0 г;
- полисорбат 80 (ТВИН) — 7,0 г;
- вода — 1000 $см^3$.

А.1.3.2 Приготовление

Последовательно растворяют компоненты или готовую сухую среду в кипящей воде до их полного растворения. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

После стерилизации pH среды должен быть равен 5,7 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

А.1.4 Нейтрализующий бульон D/E (нейтрализующий бульон Dey/Engley) [5]

А.1.4.1 Состав

- глюкоза — 10,0 г;
- соевый лецитин — 7,0 г;
- тиосульфат натрия 5-водный ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) — 6,0 г;
- полисорбат 80 (ТВИН) — 5,0 г;
- панкреатический гидролизат казеина — 5,0 г;

- бисульфит натрия — 2,5 г;
- дрожжевой экстракт — 2,5 г;
- тиогликолят натрия — 1,0 г;
- бромкрезол пурпуровый — 0,02 г;
- вода — 1000 см^3.

А.1.4.2 Приготовление

Последовательно растворяют компоненты или готовую сухую среду в кипящей воде до их полного растворения. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,6 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

А.1.5 Среда, содержащая соевый и казеиновый гидролизаты с лецитином и полисорбатом 80 (бульон SCDLP 80)

А.1.5.1 Состав

- казеиновый пептон — 17,0 г;
- соевый пептон — 3,0 г;
- хлорид натрия — 5,0 г;
- двузамещенный фосфат калия — 2,5 г;
- глюкоза — 2,5 г;
- лецитин — 1,0 г;
- полисорбат 80 (ТВИН) — 7,0 г;
- вода — 1000 см^3.

А.1.5.2 Приготовление

Последовательно растворяют компоненты или готовую сухую среду в кипящей воде до их полного растворения. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации pH среды должен быть равен 7,6 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

А.2 Другие агаризованные среды для валидации

А.2.1 Картофельный декстрозный агар (PDA)

А.2.1.1 Состав

- картофельный экстракт — 4,0 г;
- декстроза — 20,0 г;
- агар — 15,0 г;
- вода — 1000 см^3.

А.2.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты или готовую сухую среду в воде, перемешивая при нагревании. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 5,6 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

А.2.2 Агаризованная среда, содержащая соевый и казеиновый гидролизаты (SCDA) или триптический соевый агар (TSA)

А.2.2.1 Состав

- панкреатический гидролизат казеина — 15,0 г;
- папаиновый перевар соевой муки — 5,0 г;
- хлорид натрия — 5,0 г;
- агар — 15,0 г;
- вода — 1000 см^3.

А.2.2.2 Приготовление

Растворяют компоненты или готовую среду в воде, перемешивая при нагревании. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,3 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

А.3 Другие селективные агаризованные среды. Картофельный декстрозный агар с антибиотиками

А.3.1 Состав

- картофельный экстракт — 4,0 г;
- декстроза — 20,0 г;
- агар — 15,0 г;
- хлорамфеникол — 0,05 г;
- вода — 1000 см^3.

А.3.2 Приготовление

Смешивают компоненты и разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 5,6 ± 0,2 ед. pH при измерении при комнатной температуре.

Вместо хлорамфеникола можно использовать 0,10 г бензилпенициллина калия и 0,10 г тетрациклина на кубический дециметр среды, которые добавляются в качестве стерильного раствора непосредственно перед использованием среды.

Приложение В
(справочное)

Нейтрализаторы антимикробной активности консервантов и промывные жидкости

Консерванты	Химические вещества, способные нейтрализовать антимикробную активность консервантов	Примеры подходящих нейтрализаторов и промывных жидкостей (для методов мембранной фильтрации)
Фенольные соединения: - парабены; - феноксиэтанол; - фенилэтанол и др. Анилиды	Лецитин Полисорбат 80 Конденсат этиленоксида жирного спирта Неионогенные поверхностно-активные вещества	Полисорбат 80, 30 г/дм^3, + лецитин, 3 г/дм^3 Конденсат этиленоксида жирного спирта, 7 г/дм^3, + + лецитин, 20 г/дм^3, + полисорбат 80, 4 г/дм^3 D/E-нейтрализующий бульон[a)] Промывная жидкость: дистиллированная вода; триптон, 1 г/дм^3, + NaCl, 9 г/дм^3; полисорбат 80, 5 г/дм^3
Четвертичные аммониевые соединения Катионогенные поверхностно-активные вещества	Лецитин, сапонин, полисорбат 80, додецил сульфат натрия Конденсат этиленоксида жирного спирта	Полисорбат 80, 30 г/дм^3, + додецил сульфат натрия, 4 г/дм^3, + лецитин, 3 г/дм^3 Полисорбат 80, 30 г/дм^3, + сапонин, 30 г/дм^3, + + лецитин, 3 г/дм^3 D/E-нейтрализующий бульон[a)] Промывная жидкость: дистиллированная вода; триптон, 1 г/дм^3, + NaCl, 9 г/дм^3; полисорбат 80, 5 г/дм^3
Альдегиды Вещества, выделяющие формальдегид	Глицин, гистидин	Лецитин, 3 г/дм^3, + полисорбат 80, 30 г/дм^3, + + L-гистидин, 1 г/дм^3 Полисорбат 80, 30 г/дм^3, + сапонин, 30 г/дм^3, + + L-гистидин, 1 г/дм^3, + L-цистеин, 1 г/дм^3 D/E-нейтрализующий бульон[a)] Промывная жидкость: полисорбат 80, 3 г/дм^3, + L-гистидин, 0,5 г/дм^3
Окисляющие соединения	Тиосульфат натрия	Тиосульфат натрия, 5 г/дм^3 Промывочная жидкость: тиосульфат натрия, 3 г/дм^3
Изотиазолиноны, имидазолы	Лецитин, сапонин Амины, сульфаты, меркаптаны, бисульфит натрия, тиогликолят натрия	Полисорбат 80, 30 г/дм^3, + сапонин, 30 г/дм^3, + + лецитин, 3 г/дм^3 Промывная жидкость: триптон, 1 г/дм^3, + + NaCl, 9 г/дм^3; полисорбат 80, 5 г/дм^3
Бигуаниды	Лецитин, сапонин, полисорбат 80	Полисорбат 80, 30 г/дм^3, + сапонин, 30 г/дм^3, + + лецитин, 3 г/дм^3 Промывная жидкость: триптон, 1 г/дм^3, + + NaCl, 9 г/дм^3; полисорбат 80, 5 г/дм^3
Соли металлов (Cu, Zn, Hg) Ртутьорганические соединения	Бисульфит натрия, L-цистеин Сульфгидрильные соединения, тиогликолевая кислота	Тиогликолят натрия, 0,5 г/дм^3 или 5 г/дм^3 L-цистеин, 0,8 г/дм^3 или 1,5 г/дм^3 D/E-нейтрализующий бульон[a)] Промывная жидкость: тиогликолят натрия, 0,5 г/дм^3

[a)] D/E-нейтрализующий бульон (Dey/Engley-нейтрализующий бульон), см. приложение А.

Приложение ДА
(справочное)

Сведения о соответствии ссылочных международных стандартов межгосударственным стандартам

Таблица ДА.1

Обозначение ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 21148:2005	IDT	ГОСТ ISO 21148—2013 «Продукция парфюмерно-косметическая. Микробиология. Общие требования к микробиологическому контролю»
EN 12353	—	*

* Соответствующий межгосударственный стандарт отсутствует. До его принятия рекомендуется использовать перевод на русский язык европейского стандарта EN ISO 3696.

Примечание — В настоящем стандарте использовано следующее условное обозначение степени соответствия стандартов:

- IDT — идентичные стандарты.

Библиография

[1] COLIPA, Guidelines on Microbial Quality Management, 1997, published by the European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association (COLIPA)
(Руководство по менеджменту качества в микробиологии)

[2] CTFA, Microbiology Guidelines, 2001, published by the Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, ISBN 1-882621-32-8
(Руководство по микробиологии)

[3] EP, Microbiological Examination of non-sterile products, 4th edition, 2002, published by the European Pharmacopoeia
(Микробиологическая экспертиза нестерильной продукции)

[4] FDA, Bacteriological Analytical Manual, 8th edition, 1995 published by the U.S. Food and Drug Administration,
gost.e-ecolog.ru
(Руководство по бактериологическому анализу)

[5] JP 14, General Tests — Microbial Limit Test, 2001, published by the Japanese Pharmacopoeia
(Общие испытания. Испытания на предельное содержание микроорганизмов)

[6] USP 28, Microbial Limit Test (61), 2005, published by the U.S. Pharmacopoeia
(Испытания на предельное содержание микроорганизмов)

[7] Atlas R.M., Handbook of Microbiological Media, CRC Press, 1993, ISBN 0-8493-2944-2
(Справочник по микробиологическим средам)

[8] Singer S., The Use of Preservative Neutralizers in Diluents and Plating Media, Cosmetics and Toiletries, 102, December 1987, p. 55
(Применение нейтрализаторов консервантов в разбавителях и средах для чашек Петри, косметике и парфюмерии)

[9] ISO 21149 Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria
(Косметика. Микробиология. Подсчет и обнаружение аэробных мезофильных бактерий)

[10] ISO 18415 Cosmetics — Microbiology — Detection of specified microorganisms (Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans,) and non-specified microorganisms
(Косметика. Микробиология. Обнаружение специфических и неспецифических микроорганизмов)

[11] EN 1040 Chemical disinfectants and antiseptics — Basic bactericidal activity — Test method and requirements (phase 1)
[Средства дезинфицирующие химические и антисептики. Количественное испытание суспензии для оценки основной бактерицидной активности химических дезинфицирующих и антисептических средств. Метод испытания и требования (фаза 1)]

[12] Kelly J.P., and Funitiello F., Candida albicans: A study of media designed to promote chlamydospore production, J. Lab. & Clin. Med., 53, 1959, pp. 807—809
(Candida albicans. Исследование сред, предназначенных для стимулирования образования хламидоспор)

[13] Gordon M.A., and Little T.N., Effective dehydrated media with surfactants for identification of Candida albicans, J. of Int. Soc. for Human and Animal Mycol., 2, 1963, pp. 171—175
(Эффективные дегидрированные питательные среды с поверхностно-активными веществами для определения Candida albicans)

[14] ISO 16212 Cosmetics — Microbiogy — Enumeration of yeast and mould
(Косметика. Микробиология. Подсчет дрожжей и плесневых грибов)

[15] Evans E.G.V., and Richard M.D., Medical mycology: a practical approach, Oxford University Press, 1989
(Медицинская микология: практический подход)

УДК 665.57/.58:579:006.354 МКС 07.100.99; 71.100.70

Ключевые слова: продукция парфюмерно-косметическая, микробиологические исследования, микроорганизмы, разбавители, питательные среды, штаммы микроорганизмов

Редактор *Е.И. Мосур*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *Л.С. Лысенко*
Компьютерная верстка *А.А. Ворониной*

Сдано в набор 04.04.2019. Подписано в печать 13.05.2019. Формат 60×84 1/8. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,32. Уч.-изд. л. 1,86.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении во ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ» для комплектования Федерального информационного фонда стандартов, 117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru gost.e-ecolog.ru

gost.e-ecolog.ru