МКС 07.100.99; 71.100.70

к ГОСТ ISO 21150-2013 Продукция парфюмерно-косметическая. Микробиология. Обнаружение Escherichia coli

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Пункт 3. Таблица согласования	–	Российская Федерация	RU	Росстандарт

(ИУ ТНПА № 3-2018)

gost.e-ecolog.ru

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСТ ISO 21150-2013

ПРОДУКЦИЯ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКАЯ. МИКРОБИОЛОГИЯ

Обнаружение Escherichia coli

ПРАДУКЦЫЯ ПАРФЮМЕРНА-КАСМЕТЫЧНАЯ. МІКРАБІЯЛОГІЯ

Выяўленне Escherichia coli

(ISO 21150:2006, IDT)

Издание официальное



Госстандарт
Минск

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств.

Цели, основные принципы и основной порядок проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0-92 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2-2009 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, применения, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 ПОДГОТОВЛЕН республиканским унитарным предприятием «Белорусский государственный институт метрологии» (БелГИМ)

2 ВНЕСЕН Государственным комитетом по стандартизации Республики Беларусь

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации по переписке (протокол № 55-П от 25 марта 2013 г.)

За принятие стандарта 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
Кыргызстан	KG	Кыргызстандарт
Молдова	MD	Молдова-Стандарт
Таджикистан	TJ	Таджикстандарт
Узбекистан	UZ	Узстандарт

4 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 21150:2006 Cosmetics – Microbiology – Detection of Escherichia coli (Косметика. Микробиология. Обнаружение Escherichia coli).

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

Перевод с английского языка (en).

Официальные экземпляры международного стандарта, на основе которого подготовлен настоящий межгосударственный стандарт, и международного стандарта, на который даны ссылки, имеются в Национальном фонде ТНПА Республики Беларусь.

В стандарт внесено следующее редакционное изменение: наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для приведения в соответствие ГОСТ 1.5.

В разделе «Нормативные ссылки» и тексте стандарта ссылка на международный стандарт актуализирована.

Сведения о соответствии межгосударственного стандарта ссылочному международному стандарту приведены в дополнительном приложении Д.А.

Степень соответствия – идентичная (IDT)

5 ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ постановлением Госстандарта Республики Беларусь от 29 мая 2013 г. № 27 непосредственно в качестве государственного стандарта Республики Беларусь с 1 января 2014 г.

6 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

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

© Госстандарт, 2013

Настоящий стандарт не может быть воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Госстандарта Республики Беларусь

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины и определения 1
4 Принцип 2
5 Разбавители и питательные среды 2
6 Инструменты и стеклянная лабораторная посуда 4
7 Штаммы микроорганизмов 4
8 Обращение с парфюмерно-косметической продукцией и лабораторными пробами 5
9 Методика 5
10 Выражение результатов (обнаружение Escherichia coli) 6
11 Нейтрализация антимикробных свойств продукции 6
12 Протокол испытания 7
Приложение А (справочное) Другие бульоны для обогащения 8
Приложение В (справочное) Нейтрализаторы антимикробной активности консервантов и промывные жидкости 10
Библиография 11
Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии межгосударственного стандарта ссылочному международному стандарту 12

Введение

Микробиологические исследования парфюмерно-косметической продукции должны 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.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ПРОДУКЦИЯ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКАЯ. МИКРОБИОЛОГИЯ
Обнаружение Escherichia coli

ПРАДУКЦЫЯ ПАРФЮМЕРНА-КАСМЕТЫЧНАЯ. МІКРАБІЯЛОГІЯ
Выяўленне Escherichia coli

Perfume and cosmetic products
Microbiology
Detection of Escherichia coli

Дата введения 2014-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие требования к методу обнаружения и идентификации специфического микроорганизма Escherichia coli в парфюмерно-косметической продукции.

Чтобы обеспечить качество и безопасность продукции для потребителя, рекомендуется проводить соответствующий анализ микробиологического риска с целью определения видов парфюмерно-косметической продукции, к которой применим настоящий стандарт. К 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, описанный в настоящем стандарте, основан на обнаружении Escherichia coli в неселективной жидкой среде (бульоне для обогащения) с последующим выделением микроорганизмов на селективной агаризованной среде. Можно применять и другие методы в зависимости от требуемого уровня обнаружения.

Примечание – Для обнаружения Escherichia coli субкультуры могут быть пересеяны на неселективные питательные среды с последующей поэтапной идентификацией (например, с помощью идентификационных тестов).

Из-за большого разнообразия парфюмерно-косметической продукции в рассматриваемой области применения отдельные детали данного метода могут быть непригодными для некоторых видов продукции (например, для нерастворимой в воде продукции). Могут применяться другие международные стандарты. Установленный в настоящем стандарте метод испытания можно заменить другими методами (например, автоматизированными) при условии, что была продемонстрирована их равнозначность или что альтернативный метод валидирован иным образом.

2 Нормативные ссылки

Для применения настоящего стандарта необходим следующий ссылочный стандарт. Для датированных ссылок применяют только указанное издание ссылочного стандарта, для недатированных ссылок применяют последнее издание ссылочного стандарта (включая все его изменения).

ISO 21148:2005 Косметика. Микробиология. Общие требования к микробиологическому контролю

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применяют 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.

Издание официальное

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 Escherichia coli (Escherichia coli): Грамотрицательные подвижные палочки, имеющие гладкие колонии.

Примечания

1 Основные характеристики для идентификации: каталазаположительные, оксидазаотрицательные, ферментация лактозы, образование индола, характерный рост на селективной среде, содержащей соли желчи.

2 Бактерии вида Escherichia coli могут быть выделены из источников окружающей среды (воздух, вода, почва) и являться индикатором фекального загрязнения.

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

4 Принцип

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 [5]. Во всех случаях и независимо от применяемой методики нейтрализация антимикробных свойств должна быть проверена и валидирована [6] – [8].

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 увеличения первоначальной микробной популяции. Он может содержать нейтрализаторы, если испытуемая проба обладает антимикробными свойствами. Эффективность нейтрализации должна быть продемонстрирована (см. раздел 11). Информация относительно подходящих нейтрализаторов приведена в приложении В.

Бульон для обогащения пригоден для контроля наличия Escherichia coli согласно настоящему стандарту при условии, что он валидирован согласно разделу 11.

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

5.2 Разбавители для бактериальной суспензии (раствор хлорида натрия с триптоном)

Разбавитель используют для приготовления бактериальной суспензии, применяемой для процедуры подтверждения метода (см. раздел 11).

5.2.1 Состав

– триптон, панкреатический гидролизат казеина – 1,0 г;
– хлорид натрия – 8,5 г;
– вода – 1 000 $см^3$.

5.2.2 Приготовление

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

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

5.3 Питательные среды

5.3.1 Общие положения

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

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

5.3.2 Агаризованная среда для подтверждения [агаризованная среда с соевым и казеиновым гидролизатами (SCDA) или триптон-соевый агар (TSA)]

5.3.2.1 Состав

– панкреатический гидролизат казеина –15,0 г;
– папаиновый гидролизат соевой муки – 5,0 г;
– хлорид натрия – 5,0 г;
– агар – 15,0 г;
– вода – 1 000 $см^3$.

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

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 гидролизат 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 – 1 000 $см^3$.

5.3.3.1.3 Приготовление

Последовательно растворяют компоненты (полисорбат 80, октоксинол 9 и яичный лецитин) в кипящей воде до их полного растворения. Остальные компоненты 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 и охлаждения pH среды должен быть равен 7,0 ± 0,2 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 Escherichia coli

5.3.4.1 Агаризованная среда МакКонки

5.3.4.1.1 Состав

– панкреатический гидролизат желатина – 17,0 г;
– панкреатический гидролизат казеина – 1,5 г;
– пептический гидролизат животной ткани – 1,5 г;
– лактоза – 10,0 г;
– смесь солей желчи – 1,5 г;
– хлорид натрия – 5,0 г;

– агар – 13,5 г;
– нейтральный красный – 30,0 мг;
– кристаллический фиолетовый – 1,0 мг;
– вода – 1 000 см^3.

5.3.4.1.2 Приготовление

Растворяют все твердые компоненты в воде и кипятят в течение 1 мин до их полного растворения.

Разливают среду в подходящую лабораторную посуду и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,1 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

5.3.5 Селективная агаризованная среда для подтверждения Escherichia coli

5.3.5.1 Агаризованная среда Левина с эозином и метиленовым голубым

5.3.5.1.1 Состав

– панкреатический гидролизат желатина – 10,0 г;
– однозамещенный фосфат калия (KH_2PO_4) – 2,0 г;
– агар – 15,0 г;
– лактоза – 10,0 г;
– эозин Y – 400 мг;
– метиленовый голубой – 65 мг;
– вода – 1 000 см^3.

5.3.5.1.2 Приготовление

Растворяют панкреатический гидролизат желатина, однозамещенный фосфат калия и агар в воде при нагревании и дают остыть. Непосредственно перед использованием расплавляют желеобразную агаризованную среду, добавляют остальные ингредиенты в качестве растворов в соответствующих количествах и смешивают; на каждые 100 см^3 расплавленной агаризованной среды добавляют:

– 5 см^3 20%-ного раствора лактозы;
– 2 см^3 2%-ного раствора эозина Y и
– 2 см^3 0,033%-ного раствора метиленового голубого.

Готовая среда может оказаться непрозрачной.

Разливают среду в подходящую лабораторную посуду и стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин.

После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,1 ± 0,2 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 используют следующий референсный штамм: Escherichia coli ATCC [1] 8739 (или эквивалентные штаммы: CIP [2] 53.126, или NCIMB [3] 8545, или NBRC [4] 3972, или КСТС [5] 2571, или другой эквивалентный штамм из национальной коллекции).

Культуру следует восстановить согласно процедурам, представленным поставщиком референсного штамма.

Штамм разрешается хранить в лаборатории согласно [4].

---

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

[2] CIP – Institut Pasteur Collection (Коллекция института Пастера).

[3] NCIMB – National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Национальная коллекция промышленных и морских бактерий).

[4] NBRC – National Biological Resource center (Национальный центр биологических исследований).

[5] КСТС – Korean Collection for type culture (Корейская коллекция типовых культур).

8 Обращение с парфюмерно-косметической продукцией и лабораторными пробами

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.

Отбор и подготовку проб парфюмерно-косметической продукции для анализа следует проводить в соответствии с ISO 21148. Анализируют пробы согласно ISO 21148 и методике, приведенной в разделе 9.

9 Методика

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

Для обогащения вносят пробу (3.2) хорошо перемешанной испытуемой продукции в количестве не менее 1 г или 1 $см^3$ в бульоне 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 соответствуют 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

Переносят навеску *S* пробы в подходящую лабораторную посуду, содержащую соответствующий объем бульона (5.3.3).

9.2.3 Нерастворимая в воде продукция

Переносят навеску *S* пробы продукции в подходящую лабораторную посуду, содержащую соответствующее количество разбавителя (например, полисорбат 80).

Диспергируют пробу в разбавителе и добавляют соответствующий объем бульона (5.3.3).

9.2.4 Фильтруемая продукция

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

Переносят навеску *S* пробы продукции на мембранный фильтр в фильтровальном аппарате (см. ISO 21148). Сразу же фильтруют и промывают мембранный фильтр, используя определенные объемы воды (5.1) и/или разбавителя (5.2).

Погружают мембранный фильтр в пробирку или колбу подходящего размера, содержащую соответствующий объем бульона (5.3.3).

9.3 Инкубация инокулированного бульона для обогащения

Инкубируют исходную суспензию, приготовленную в бульоне (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 Escherichia coli

9.4.1 Выделение

Стерильной петлей делают пересев аликвоты инкубированного бульона для обогащения (9.3) на поверхность агаризованной среды МакКонки (5.3.4.1) для получения изолированных колоний.

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 Escherichia coli на агаризованной среде МакКонки

Селективная среда	Характеристика колоний Escherichia coli
Агаризованная среда МакКонки	Кирпично-красные, могут быть окружены зоной лизиса

9.4.2 Идентификация Escherichia coli

9.4.2.1 Общие положения

Для выявленных подозрительных колоний, изолированных на агаризованной среде МакКонки, проводят дальнейшее подтверждение. Наличие Escherichia coli может быть подтверждено различными биохимическими и культуральными тестами.

9.4.2.2 Окраска по Граму

Следуют процедуре, установленной в ISO 21148. Проверяют наличие грамотрицательных палочек.

9.4.2.3 Рост на агаризованной среде Левина с эозином и метиленовым голубым (EMB агаризованная среда)

Инокулируют поверхность агаризованной среды Левина с эозином и метиленовым голубым подозрительными изолированными колониями, выращенными на агаризованной среде МакКонки, таким образом, 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 согласно таблице 2.

Таблица 2 – Морфологические характеристики Escherichia coli на агаризованной среде Левина с эозином и метиленовым голубым

Селективная среда	Характеристика колоний Escherichia coli
Агаризованная среда Левина с эозином и метиленовым голубым	Металлический блеск под отраженным светом и сине-черный внешний вид под проходящим светом

10 Выражение результатов (обнаружение Escherichia coli)

Если при идентификации колоний подтверждено наличие данного вида, результат представляют как: бактерии вида Escherichia coli обнаружены в навеске *S* пробы.

Если после обогащения роста не наблюдалось и/или если идентификация колоний не подтвердила наличие данного вида, результат представляют как: бактерии вида Escherichia coli не обнаружены в навеске *S* пробы.

11 Нейтрализация антимикробных свойств продукции

11.1 Общие положения

Описанные ниже процедуры демонстрируют, что микроорганизмы могут расти в условиях проведения анализа.

11.2 Приготовление инокулята

Перед проведением испытания засевают поверхность среды, содержащей соевый и казеиновый гидролизаты (SCDA) или триптон соевый агар (TSA), или другой подходящей среды (неселективной и не оказывающей нейтрализующее действие) штаммом Escherichia coli. 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 (5.2) для приготовления калиброванной суспензии с концентрацией клеток 1×10^8 КОЕ/см^3 [количество клеток можно измерить, используя спектрофотометр, см. ISO 21148:2005 (приложение С)].

Калиброванную суспензию и ее разведения используют в течение 2 ч.

11.3 Валидация метода обнаружения

11.3.1 Процедура

11.3.1.1 В пробирках, содержащих по 9 см^3 разбавителя, готовят разведения калиброванной суспензии (11.2), 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 (5.3.2), которая поддерживалась в таком состоянии на водяной бане при температуре не более чем 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 Выполняют два параллельных приготовления (две повторности) исходной 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 (9.2.4), 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 теста.

11.3.1.3 Стерильно вносят 0,1 см^3 разведенной калиброванной суспензии микроорганизмов в одну пробирку или колбу (валидированный тест). Перемешивают, затем инкубируют обе пробирки или колбы (валидированный тест и контроль неконтаминированной пробы) при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 20 – 24 ч.

11.3.1.4 Проводят выделение для каждой пробирки или колбы (валидационный тест и контроль неконтаминированной пробы). Стерильной петлей делают высев методом истощающего штриха на поверхность агаризованной среды МакКонки (приблизительно от 15 до 20 см^3), разлитой в чашки Петри (диаметр от 85 до 100 мм). Инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 24 – 48 ч.

11.3.2 Интерпретация результатов валидации

Проверяют, что разведенная калиброванная суспензия бактерий вида Escherichia coli содержит от 100 до 500 КОЕ/см^3 микроорганизмов.

Нейтрализация и метод обнаружения являются достоверными, когда ростовые характеристики Escherichia coli наблюдаются у микроорганизмов, выросших на чашке с высевом из обогащения пробы, контаминированной калиброванной суспензией, и отсутствует рост на чашке с высевом из обогащения неконтаминированной пробы.

Когда обнаружен рост на чашке с высевом из обогащения неконтаминированной пробы (естественно контаминированная продукция), нейтрализация и метод обнаружения являются достоверными, если бактерии вида Escherichia coli выделены на чашке Петри с высевом из обогащения пробы, контаминированной калиброванной суспензией.

Отсутствие роста на чашках Петри с высевом из обогащения пробы, контаминированной калиброванной суспензией, 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 Escherichia coli.

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 Escherichia coli.

12 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать:

a) ссылку на настоящий стандарт;

b) всю информацию, необходимую для полной идентификации продукции;

c) используемый метод;

d) полученные результаты;

e) все детали приготовления исходной суспензии;

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

g) валидацию метода, даже если испытание было выполнено отдельно;

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

Приложение А
(справочное)
Другие бульоны для обогащения

А.1 Жидкая лактозная среда с нейтрализирующими и диспергирующими агентами

Эта среда содержит ингредиенты (летицин и полисорбат 80), которые нейтрализуют ингибирующие вещества, присутствующие в пробе, а также диспергирующий агент (октоксинол 9).

А.1.1 Состав

– мясной экстракт – 3,0 г;
– панкреатический гидрализат желатина – 5,0 г;
– лактоза – 5,0 г;
– яичный лецитин – 1,0 г;
– полисорбат 80 – 5,0 г;
– октоксинол 9 – 1,0 г;
– вода – 1 000 $см^3$.

А.1.2 Приготовление

Последовательно растворяют компоненты, полисорбат 80, октоксинол 9 и яичный лецитин в кипящей воде до полного их растворения. Растворяют остальные компоненты, перемешивая при нагревании. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации охлаждают среду как можно быстрее. pH среды должен быть равен 6,9 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

А.2 Жидкая лактозная среда

А.2.1 Состав

– мясной экстракт – 3,0 г;
– панкреатический гидрализат желатина – 5,0 г;
– лактоза – 5,0 г;
– вода – 1 000 $см^3$.

А.2.2 Приготовление

Растворяют компоненты в воде. Разливают среду в подходящую лабораторную посуду. Стерилизуют в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 мин. После стерилизации охлаждают среду как можно быстрее. pH среды должен быть равен 6,9 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

А.3 Среда, содержащая соевый и казеиновый гидролизаты, летицин и полисорбат 80 (SCDLP 80 бульон)

А.3.1 Состав

– казеиновый пептон – 17,0 г;
– соевый пептон – 3,0 г;
– хлорид натрия – 5,0 г;
– двузамещенный фосфатнокислый калий – 2,5 г;
– глюкоза – 2,5 г;
– лецитин – 1,0 г;
– полисорбат 80 – 7,0 г;
– вода – 1 000 $см^3$.

А.3.2 Приготовление

Растворяют все компоненты или готовую сухую среду последовательно 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 7,2 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

А.4 D/E нейтрализирующий бульон (Dey/Engley нейтрализирующий бульон) [11]

А.4.1 Состав

– глюкоза – 10,0 г;
– соевый лецитин – 7,0 г;
– пятиводный тиосульфат натрия – 6,0 г;
– полисорбат 80 – 5,0 г;
– панкреатический гидролизат казеина – 5,0 г;
– бисульфит натрия – 2,5 г;
– дрожжевой экстракт – 2,5 г;
– тиогликолят натрия – 1,0 г;
– бромкрезоловый пурпурный – 0,02 г;
– вода – 1 000 $см^3$.

А.4.2 Приготовление

Растворяют все компоненты или готовую сухую среду последовательно в кипящей воде до 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 при измерении при комнатной температуре.

А.5 Модифицированный Letheen бульон

А.5.1 Состав

– ферментативный гидролизат 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 – 5,0 г;
– хлорид натрия – 5,0 г;
– бисульфит натрия – 0,1 г;
– вода – 1 000 $см^3$.

А.5.2 Приготовление

Последовательно растворяют полисорбат 80 и летицин в кипящей воде до полного их растворения. Растворяют остальные компоненты, помешивая 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 при измерении при комнатной температуре.

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.		

Библиография

[1] ISO 18415:2007 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)

[2] ISO 21149:2006 Cosmetics – Microbiology – Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria
(Косметика. Микробиология. Подсчет и обнаружение аэробных мезофилических бактерий)

[3] EN 1040:2005 Chemical disinfectants and antiseptics – Basic bactericidal activity – Test method and requirements (phase 1)
[Средства дезинфицирующие химические и антисептики. Количественный суспензионный метод испытания для оценки основной бактерицидной активности химических дезинфицирующих и антисептических средств. Метод испытания и требования (фаза 1)]

[4] EN 12353:2006 Chemical disinfectants and antiseptics – Preservation of microbial strains used for the determination of bactericidal and fungicidal activity
(Средства дезинфицирующие химические и антисептики. Сохранение микроорганизмов для испытаний, используемых для определения бактерицидной, микобактерицидной, спорицидной и фунгицидной активности)

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

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

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

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

[9 J.P 14, General Tests – Microbial limit test, 2001 published by the Japanese Pharmacopoeia
(Общие испытания. Испытания на предельное содержание микроорганизмов)

[10] USP 28, Microbial limit test (61), 2005 published by the U.S. Pharmacopoeia
(Испытания на предельное содержание микроорганизмов)

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

[12] 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 туалетных принадлежностях)

Приложение Д.А
(справочное)

Сведения о соответствии межгосударственного стандарта ссылочному международному стандарту

Обозначение и наименование ссылочного международного стандарта	Степень соответствия	Обозначение и наименование межгосударственного стандарта
ISO 21148:2005 Косметика. Микробиология. Общие указания по микробиологическому контролю	IDT	ГОСТ ISO 21148-2013 Продукция парфюмерно-косметическая. Микробиология. Общие требования к микробиологическому контролю

УДК 665.57/.58:579.63.083.12(083.74)(476) МКС 07.100.99; 71.100.70 IDT

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

Ответственный за выпуск *Т. В. Варивончик*

Сдано в набор 01.07.2013. Подписано в печать 31.07.2013. Формат бумаги 60×84/8. Бумага офсетная.
Гарнитура Arial. Печать ризографическая. Усл. печ. л. 2,09. Уч.- изд. л. 0,88. Тираж 7 экз. Заказ 710

Издатель и полиграфическое исполнение:
Научно-производственное республиканское унитарное предприятие
«Белорусский государственный институт стандартизации и сертификации» (БелГИСС)
ЛИ № 02330/0552843 от 08.04.2009.
ул. Мележа, 3, комн. 406, 220113, Минск.

gost.e-ecolog.ru