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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ
СТАНДАРТ

**ГОСТ
ISO 21148—
2020**

ПРОДУКЦИЯ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКАЯ

Микробиология.
Общие требования к микробиологическому контролю

(ISO 21148:2017, Cosmetics — Microbiology — General instructions for microbiological examination, IDT)

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2021

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 по результатам голосования в АИС МГС (протокол от 30 января 2020 г. № 126-П)

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
Армения	AM	ЗАО «Национальный орган по стандартизации и метрологии» Республики Армения
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 24 августа 2021 г. № 759-ст межгосударственный стандарт ГОСТ ISO 21148—2020 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2022 г.

5 Настоящий стандарт идентичен международному стандарту ISO 21148:2017 «Косметика. Микробиология. Общие указания по микробиологическому контролю» («Cosmetics — Microbiology — General instructions for microbiological examination», IDT).

Наименование настоящего стандарта изменено относительно наименования указанного международного стандарта для увязки с наименованиями, принятыми в существующем комплексе межгосударственных стандартов.

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

6 ВЗАМЕН ГОСТ ISO 21148—2013

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.

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

© ISO, 2017
© Оформление. ФГБУ «РСТ», 2021

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

Введение ... VI
1 Область применения ... 1
2 Нормативные ссылки ... 1
3 Термины и определения ... 1
4 Помещения ... 1
4.1 Площади для проведения испытания ... 1
4.2 Дополнительные площади ... 2
4.3 Месторасположение помещений ... 2
4.4 Оснащение помещений ... 2
4.5 Поддержание технического состояния ... 3
5 Оборудование ... 3
5.1 Общие положения ... 3
5.2 Микробиологические (ламинарные) шкафы ... 3
5.3 Весы ... 3
5.4 Гомогенизатор ... 3
5.5 pH-метр ... 3
5.6 Автоклав ... 3
5.7 Инкубатор ... 3
5.8 Водяные бани ... 4
5.9 Холодильник или холодильная камера ... 4
5.10 Морозильная камера ... 4
5.11 Суховоздушный стерилизатор ... 4
5.12 Устройство для подсчета колоний ... 4
5.13 Другое оборудование ... 4
6 Штаммы микроорганизмов ... 5
7 Персонал ... 5
7.1 Компетентность ... 5
7.2 Гигиена ... 5
8 Подготовка инструментов и стеклянной посуды ... 5
8.1 Подготовка ... 5
8.2 Стерилизация ... 6
8.3 Одноразовые посуда и инструменты ... 6
8.4 Обращение с чистым инструментом и стеклянной посудой ... 6
8.5 Обращение со стерильными инструментом и стеклянной посудой ... 6
8.6 Обработка зараженного материала ... 6
8.7 Мытье ... 6
9 Приготовление и стерилизация питательных сред и реактивов ... 7
9.1 Общие положения ... 7
9.2 Вода ... 7
9.3 Приготовление питательных сред ... 7
9.3.1 Общие положения ... 7
9.3.2 Регидратация ... 7
9.3.3 Измерение pH ... 7
9.3.4 Дозирование ... 7
9.4 Стерилизация ... 7
9.4.1 Общие положения ... 7
9.4.2 Паровая стерилизация ... 7
9.4.3 Стерилизация фильтрованием ... 8
9.5 Хранение ... 8
9.5.1 Общие положения ... 8
9.5.2 Приготовленные в лаборатории питательные среды и реактивы ... 8
9.5.3 Готовые к использованию питательные среды и реактивы ... 8
9.6 Плавление агаризованных питательных сред ... 8
9.7 Подготовка чашек Петри ... 8

10 Лабораторные пробы . . . 9
10.1 Общие положения . . . 9
10.2 Отбор проб парфюмерно-косметической продукции . . . 9
10.3 Транспортирование . . . 9
10.4 Приемка и хранение . . . 9
10.5 Обращение с продукцией и пробами . . . 9
10.6 Консервация и утилизация продукции . . . 9
11 Технические приемы . . . 10
11.1 Гигиенические меры предосторожности во время испытаний . . . 10
11.2 Приготовление исходной суспензии и разведений пробы . . . 10
11.2.1 Общие положения . . . 10
11.2.2 Водорастворимая продукция . . . 11
11.2.3 Нерастворимая в воде продукция . . . 11
11.3 Методы подсчета . . . 11
11.4 Методы обнаружения . . . 11
12 Представление результатов . . . 11
13 Нейтрализация антимикробных свойств продукции . . . 11
Приложение А (справочное) Основные методы идентификации . . . 12
Приложение В (справочное) Основные методы посева и подсчета колоний . . . 15
Приложение С (справочное) Приготовление и стандартизация суспензий . . . 16
Библиография . . . 17

Введение

Цель разработки настоящего стандарта заключается в том, чтобы общие методы, применяемые при проведении микробиологических исследований парфюмерно-косметической продукции, оставались одинаковыми для всех лабораторий, которые их применяют, что позволит получить однотипные результаты в различных лабораториях и будет способствовать охране здоровья персонала лаборатории путем предотвращения риска инфицирования.

При проведении микробиологических исследований парфюмерно-косметической продукции особенно важно, чтобы:

- микроорганизмы, которые присутствуют в пробах, были изолированы или подсчитаны;
- микроорганизмы не загрязняли окружающую среду.

Для этого необходимо уделять внимание личной гигиене и использовать методы проведения работ, которые (насколько возможно) исключат внешнюю контаминацию.

Поскольку в настоящем стандарте приводится только несколько примеров мер предосторожности, которые должны предприниматься в ходе микробиологических исследований, доскональное знание микробиологических методов и соответствующих микроорганизмов является важным условием. Важно, чтобы испытания проводились как можно точнее, включая подсчет числа микроорганизмов.

Значительное количество манипуляций может, например, непреднамеренно привести к перекрестной контаминации, и поэтому всегда должна проверяться достоверность результатов, получаемых с помощью того или иного метода. Необходимо предпринимать специальные меры предосторожности не только с целью соблюдения правил гигиены, но также для обеспечения хорошей воспроизводимости полученных результатов. Невозможно установить все меры предосторожности, которых следует придерживаться при любых обстоятельствах. В настоящем стандарте приведены основные критерии, которые следует учитывать при приготовлении, стерилизации и хранении соответствующих питательных сред и соответствующего оборудования.

Приведенные рекомендации позволят осуществлять обнаружение и подсчет мезофильных микроорганизмов, которые могут развиваться в аэробных условиях. Данные рекомендации распространяются на определение отсутствия или ограниченной распространенности специфических микроорганизмов, которые представляют интерес для парфюмерно-косметической продукции.

Методы испытаний приводятся в различных стандартах. Могут использоваться альтернативные микробиологические методы при условии, что их эквивалентность была доказана или была подтверждена их пригодность. Выбор определенного метода или комбинации методов, упоминаемых в этих стандартах, будет зависеть от цели проведения данного испытания. Пользователю следует решить, какой именно подход наиболее оптимален для применения.

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ПРОДУКЦИЯ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКАЯ

Микробиология.
Общие требования к микробиологическому контролю

Perfume and cosmetic prodacts.
Microbiology
General instructions for microbiological examination

Дата введения — 2022—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие указания по проведению микробиологического контроля парфюмерно-косметической продукции для обеспечения ее качества и безопасности в соответствии с надлежащим анализом риска (например, продукции с низкой активностью воды, крайними значениями pH, продукции на водно-спиртовой основе).

Из-за большого разнообразия парфюмерно-косметической продукции и ее возможного применения в данной области эти указания могут быть непригодными для некоторых видов продукции (например, для не растворимой в воде продукции).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте не используются нормативные ссылки.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями.

В целях стандартизации ISO и IEC предоставляют терминологические базы данных по следующим ссылкам:

- электропедия IEC: http://www.electropedia.org/;
- онлайн-библиотека стандартов ISO: gost.e-ecolog.ru

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

3.2 **проба** (sample): Часть продукции (см. 3.1) в количестве не менее 1 г или 1 см^3, которая используется при проведении испытаний для приготовления исходной суспензии (см. 3.3).

3.3 **исходная суспензия** (initial suspension): Суспензия (или раствор) пробы (см. 3.2) в определенном объеме соответствующего бульона для обогащения.

3.4 **разведение пробы** (sample dilution): Разбавление исходной суспензии (см. 3.3).

4 Помещения

4.1 Площади для проведения испытания

Площади, требуемые для функционирования микробиологической лаборатории, отводятся для:

- приемки, хранения, подготовки проб;
- приготовления и стерилизации питательных сред, инструментов и стеклянной посуды;

Издание официальное

- проведения испытания: взвешивание, разведение, посев, пересев, инкубация, поддержание штаммов и т. д.;
- обеззараживания и очистки инструментов, стеклянной посуды и обработки отработанного материала.

4.2 Дополнительные площади

В эту категорию включены следующие площади:
- входы, коридоры, лестницы, лифты;
- административные площади (например, для секретариата, офисов, хранения документации и т. д.);
- гардеробы и туалеты;
- архивы;
- склады.

4.3 Месторасположение помещений

Окружающая среда, в которой проводятся микробиологические испытания, не должна влиять на их достоверность.

Следует выбирать такие помещения, которые исключали бы риск перекрестной контаминации.

Необходимо соблюдать меры предосторожности с целью защиты от экстремальных условий, например повышенной температуры, пыли, влажности, пара, шума, вибрации, воздействия прямого солнечного света и т. д.

Площади должны быть достаточно большими, чтобы содержать рабочие места в чистоте и в надлежащем порядке.

Во время проведения испытаний доступ к месту их проведения должен быть разрешен только тем лицам, которые должны проводить эти испытания.

Отдельные помещения и/или специально отведенные места, и/или специально огороженные участки должны быть предусмотрены для:
- приемки, хранения и подготовки проб;
- операций с микробиологическими культурами;
- подготовки питательных сред, инструментов и стеклянной посуды;
- зоны для обеззараживания и мытья;
- стерилизации;
- инкубаторов, холодильников и морозильных камер.

4.4 Оснащение помещений

4.4.1 Помещения для испытаний должны быть оснащены таким образом, чтобы уменьшить риск контаминации пылью и, следовательно, микроорганизмами:
- стены, потолки и полы должны быть из гладких, непористых материалов, легкомоющимися и стойкими к действию моющих и дезинфицирующих средств, используемых в лабораториях;
- трубы верхней разводки для подачи жидкостей не должны пересекать помещения, если они негерметичны;
- солнцезащитные системы, если они используются, должны монтироваться снаружи окон, где это практически возможно;
- окна и двери должны закрываться при проведении испытаний, для того чтобы свести к минимуму сквозняки. Кроме того, они должны проектироваться таким образом, чтобы исключить образование мест скапливания пыли и, следовательно, облегчить уборку помещений.

4.4.2 Температура окружающей среды и качество воздуха (содержание микроорганизмов, влажность, скорость распространения пыли и т. д.) должны соответствовать условиям проведения испытаний.

Для этой цели рекомендуется использовать вентиляционные системы с фильтрами и/или микробиологический (ламинарный) шкаф.

4.4.3 Рабочие поверхности лабораторных столов и инвентарь должны изготавливаться из гладких, непористых непроницаемых материалов, которые можно легко очистить и дезинфицировать. К верхним частям шкафов и оборудования должен быть обеспечен доступ для их очистки.

Нестационарный лабораторный инвентарь должен проектироваться таким образом, чтобы облегчить мытье полов.

Документы и книги, которыми нечасто пользуются, целесообразно хранить вне площадей для проведения испытаний.

4.5 Поддержание технического состояния

Полы, стены, потолок, рабочие поверхности лабораторных столов и инвентаря должны поддерживаться в хорошем состоянии с целью исключения образования трещин в тех местах, где могут скапливаться загрязнения, служащие источником контаминации.

Регулярная очистка и при необходимости дезинфекция должны проводиться для поддержания помещения в состоянии, пригодном для проведения испытаний.

Вентиляционные системы и их фильтры должны регулярно проверяться, фильтры должны заменяться по мере необходимости.

5 Оборудование

5.1 Общие положения

Все оборудование должно содержаться в чистоте и в надлежащем рабочем состоянии.

Проведение работ по техническому обслуживанию должно контролироваться. Измерительные приборы и инструменты должны регулярно поверяться согласно соответствующему графику, результаты регистрироваться.

5.2 Микробиологические (ламинарные) шкафы

Шкафы разделяются на два вида:

a) шкафы очистки воздуха, предназначенные для защиты продукции от внешнего загрязнения и сведения к минимуму загрязнения со стороны оператора;

b) боксы микробиологической безопасности (ламинарные шкафы), предназначенные для защиты продукции от внешнего загрязнения, а также для защиты оператора и окружающей среды.

Может использоваться любой из двух видов шкафов. Боксы микробиологической безопасности должны использоваться для всех работ, связанных с риском для оператора.

Шкаф представляет собой рабочее место, не содержащее пыли, в котором поддерживается вертикальный ламинарный воздушный поток. В микробиологии бокс микробиологической безопасности используется для удержания микроорганизмов на фильтрах.

5.3 Весы

Микробиологическая лаборатория для испытаний парфюмерно-косметической продукции должна быть оснащена весами соответствующего диапазона и точности для взвешивания различной продукции. Обычно погрешность при взвешивании испытываемых проб и некоторых компонентов питательных сред и реактивов составляет ±0,01 г.

5.4 Гомогенизатор

Это оборудование (например, блендер, гомогенизатор и т. д.) может использоваться для приготовления исходной суспензии из проб нежидкой продукции.

5.5 pH-метр

pH-метр должен проводить измерения с погрешностью ±0,1 единицы pH и его наименьший предел измерения должен составлять 0,01 единицы pH.

5.6 Автоклав

Автоклав должен поддерживаться в исправном рабочем состоянии и подлежать регулярному надзору уполномоченными ведомствами согласно инструкциям изготовителя, что должно быть зарегистрировано в соответствующей документации.

Автоклав не должен использоваться одновременно для стерилизации чистых материалов и для обеззараживания использованных материалов. По возможности для проведения этих двух процессов должны использоваться отдельные автоклавы.

5.7 Инкубатор

Инкубаторы должны быть оснащены системой регулирования, которая позволяет поддерживать одинаковую и стабильную температуру по всему рабочему объему.

Если температура окружающей среды близка или превышает температуру инкубатора, используют инкубатор с системой охлаждения.

Инкубаторы должны быть защищены от воздействия прямого солнечного света.

Если возможно, инкубаторы не должны полностью заполняться за одну отдельную операцию, так как питательным средам требуются продолжительные периоды времени для достижения температурного равновесного состояния, какой бы тип инкубатора ни использовался (конвекционный или какой-либо другой).

Температура должна проверяться и регистрироваться не реже одного раза в течение каждого рабочего дня.

5.8 Водяные бани

Водяные бани делятся на два типа:

- бани с регулируемой температурой, пригодные для инкубации засеянных питательных сред, для идентификационных тестов и т. д.;
- водяные бани с регулируемой температурой для поддержания стерильных агаризованных сред в расплавленном состоянии для дальнейшего использования в определенном порядке.

Требуемая температура и точность ее поддержания оговариваются в каждой применяемой методике.

5.9 Холодильник или холодильная камера

Температура, если не установлено иное, должна быть (5 ± 3) °С.

5.10 Морозильная камера

Температура, если не оговорено иное, должна быть ниже минус 18 °С.

5.11 Суховоздушный стерилизатор

Суховоздушный стерилизатор представляет собой камеру, которая позволяет разрушать микроорганизмы сухим горячим воздухом.

В камере температура должна распределяться равномерно.

Стерилизатор должен быть оснащен:

- термостатом;
- термометром или регистрирующим термоэлектрическим элементом;
- индикатором или программируемым устройством/таймером продолжительности работы.

5.12 Устройство для подсчета колоний

Может использоваться устройство для подсчета колоний.

5.13 Другое оборудование

Предупреждение — Мерную стеклянную посуду не допускается стерилизовать в суховоздушном стерилизаторе.

Другое оборудование и инструменты повседневного использования включают следующее:

a) фильтровальный аппарат (см. ниже);
b) стеклянные или пластмассовые емкости (пробирки, колбы, флаконы, бутыли);
c) стеклянные или пластмассовые чашки Петри (как правило, диаметром от 85 до 100 мм);
d) стеклянные или пластиковые пипетки (1, 2, 10 $см^3$), автоматические пипетки;
e) инструменты для отбора проб;
f) иглы или петли (из никеля/хрома, платины/иридия или одноразовые пластиковые и т. д.);
g) оптический микроскоп;
h) газовую горелку, спиртовку или печь для прокаливания;
i) дозатор для питательных сред и реактивов;
j) механическую мешалку.

Если используется метод мембранной фильтрации, оборудование также должно включать:

- систему мембранной фильтрации или фильтровальный аппарат, изготовленный из соответствующего материала, с держателем фильтра вместимостью не менее 50 $см^3$, пригодного для использования фильтров диаметром от 47 до 50 мм с размером пор не более 0,45 мкм;
- мембранный фильтр, изготовленный из материала, который исключает влияние остаточных компонентов исследуемых проб на бактерии;
- вакуумный источник, способный обеспечить равномерную скорость фильтрования (устройство также должно быть настроено на фильтрование порядка 100 $см^3$ жидкости не менее чем за 2 мин).

6 Штаммы микроорганизмов

Штаммы, необходимые для проверки пригодности методов, указаны в каждом конкретном методе испытания.

7 Персонал

7.1 Компетентность

Весь персонал, работающий в микробиологической лаборатории, должен пройти соответствующую профессиональную подготовку, которая позволила бы ему надлежащим образом осуществлять порученную работу.

Персонал, который проводит испытания, должен обладать хорошими знаниями и достаточным практическим опытом в сфере микробиологических методов и исследуемых микроорганизмов. Ответственные лица должны уметь интерпретировать показатели точности и прецизионности, требуемые для получения приемлемых результатов.

7.2 Гигиена

В области личной гигиены нижеследующие меры предосторожности должны соблюдаться не только для того, чтобы избежать контаминации проб и питательных сред, но также для того, чтобы исключить риск инфицирования персонала:

- необходимо использовать лабораторную одежду, которая должна быть чистой, в хорошем состоянии, окрашена в светлые тона и изготовлена из ткани, ограничивающей риск воспламеняемости; эту одежду нельзя носить за пределами рабочей зоны;
- необходимо поддерживать ногти в идеальной чистоте; они должны быть хорошо обработаны и желательно коротко острижены;
- руки необходимо тщательно мыть до и после микробиологических исследований и сразу же после посещения туалета или приема пищи; для сушки рук используют одноразовые бумажные салфетки или одноразовые тканевые полотенца;
- во время посева нельзя говорить, кашлять и т. д.;
- запрещается курить, пить и принимать пищу в помещениях для проведения испытаний;
- продукты питания для личного потребления запрещается класть в лабораторные холодильники;
- специальные меры предосторожности должны быть предприняты теми лицами, которые инфицированы или больны, так как это может привести к загрязнению проб микроорганизмами и сделать полученные результаты недействительными.

8 Подготовка инструментов и стеклянной посуды

8.1 Подготовка

Инструменты и стеклянную посуду, используемые в микробиологии, следует подготавливать таким образом, чтобы гарантировать их чистоту и/или стерильность до момента использования.

Перед стерилизацией пробирки, колбы и флаконы закрывают пробками из соответствующего материала.

Пипетки закрывают ватой или любым другим соответствующим материалом.

Если необходимо, подлежащие стерилизации инструменты и стеклянную посуду помещают в специальные контейнеры или заворачивают соответствующим материалом (например, специальной бумагой, алюминиевой фольгой и т. д.).

8.2 Стерилизация

8.2.1 Сухожаровая стерилизация

Нагревание проводят в сухожаровом стерилизаторе не менее 1 ч при температуре от 170 °С до 180 °С или используют другие параметры времени и температуры, если была подтверждена их пригодность для данной цели.

Для того чтобы убедиться, что стерилизация достигнута, могут использоваться индикаторы.

8.2.2 Паровая стерилизация

Нагревание проводят в течение не менее 15 мин при температуре не ниже 121 °С в автоклаве. Для того чтобы убедиться, что стерилизация достигнута, могут использоваться индикаторы.

8.3 Одноразовые посуда и инструменты

Одноразовые посуда и инструменты могут использоваться таким же образом, как и стеклянная посуда многоразового применения (чашки Петри, пипетки, пробирки и т. д.), если их технические характеристики одинаковы.

В этом случае следует обращаться к изготовителю с целью определения пригодности предлагаемых инструментов и стеклянной посуды для микробиологии (в особенности в отношении стерильности) и отсутствия в материалах веществ, которые ингибируют рост микроорганизмов.

Одноразовая посуда и инструменты должны обеззараживаться перед утилизацией. Помимо методов, описанных в 8.6, и в зависимости от национального законодательства может применяться сжигание. Если в помещении имеется мусоросжигатель, обеззараживание и утилизация могут быть выполнены за одну операцию.

8.4 Обращение с чистым инструментом и стеклянной посудой

Чистые инструменты и стеклянную посуду необходимо защищать от внешнего загрязнения при хранении в условиях, которые обеспечивают их чистоту.

8.5 Обращение со стерильными инструментом и стеклянной посудой

Перед использованием инструмент и стеклянную посуду необходимо хранить в условиях, которые обеспечивают их стерильность. Одноразовые инструменты и стеклянную посуду необходимо хранить в соответствии с техническими требованиями изготовителя, исключая любое повреждение упаковки; подготовленные в лаборатории инструменты и стеклянная посуда должны храниться в чистых контейнерах.

При стерилизации инструментов и стеклянной посуды, предназначенных для микробиологических исследований, срок годности (или дата изготовления) должны быть указаны на каждой упаковке. Герметично упакованные инструменты и стеклянную посуду можно хранить не более трех месяцев перед использованием, если не установлено иное.

8.6 Обработка зараженного материала

После использования (культуры микроорганизмов или инструменты, соприкасавшиеся с микроорганизмами) инструменты, стеклянная посуда и ее содержимое должны быть обработаны на предмет обеззараживания микроорганизмов перед очисткой или утилизацией независимо от вида микроорганизма.

В зависимости от природы материалов можно использовать дезинфекцию (см. 11.1), стерилизацию (см. 8.2) или сжигание одноразового материала (см. 8.3).

8.7 Мытье

Моют инструменты и стеклянную посуду только после их обработки (см. 8.6). Освобождают емкости от их содержимого.

Перед мытьем отделяют соответствующим образом уплотнения от пробок или крышек.

Смывают остатки моющего средства с инструментов и оборудования водопроводной водой. Промывают инструменты и оборудование водой согласно 9.2.

При отсутствии каких-либо коммерческих очищающих средств можно использовать раствор карбоната натрия с массовой долей 0,125 % с последующим погружением в разбавленную кислоту (например, соляную кислоту $c(HCl) = 0{,}1$ моль/дм^3) [2].

Специализированное вспомогательное оборудование может использоваться с целью облегчения операций мытья (например, пипеточные промыватели, посудомоечные машины, ультразвуковые ванны и т. д.).

9 Приготовление и стерилизация питательных сред и реактивов

9.1 Общие положения

Точность в приготовлении питательных сред – одна из важнейших стадий в микробиологическом испытании, которой должно быть уделено особое внимание.

9.2 Вода

Предупреждение — Вода, пропущенная через ионообменник (деионизированная), может иметь высокое содержание микроорганизмов, поэтому целесообразно не использовать такую воду, не убедившись в том, что содержание микроорганизмов в ней является низким. Обращаются к изготовителю по поводу наиболее эффективного способа минимизации микробной контаминации. Сильно контаминированная деионизированная вода, которая подверглась стерилизационному фильтрованию, может к тому же содержать вещества, ингибирующие рост некоторых микроорганизмов.

Используют дистиллированную воду или воду эквивалентного качества, т. е. очищенную [7], [9], [11] или деионизированную [3]. Если дистиллированную воду приготавливают из хлорированной воды, хлор нейтрализуют перед дистилляцией.

Вода должна храниться в емкостях, изготовленных из инертных материалов (например, нейтрального стекла, полиэтилена и т. д.).

9.3 Приготовление питательных сред

9.3.1 Общие положения

Существуют два способа приготовления питательных сред:

- из составных компонентов, обезвоженных или нет; или
- из готовых сухих сред.

В отношении условий хранения и сроков годности следуют рекомендациям изготовителя. Не используют питательные среды с истекшим сроком годности.

Предохраняют лабораторные сухие питательные среды от поглощения дополнительной влаги из окружающей среды при хранении и использовании.

9.3.2 Регидратация

Следуют рекомендациям изготовителя в отношении регидратации.

9.3.3 Измерение pH

Измеряют pH с помощью pH-метра (см. 5.5) и регулируют его при необходимости таким образом, чтобы после стерилизации и охлаждения до комнатной температуры данная среда имела бы заданный pH ± 0,2 единицы, если не установлено иное.

Примечание — Доведение pH обычно проводят, используя раствор гидроокиси натрия (NaOH) с концентрацией приблизительно 40 г/дм^3 (около 1 моль/дм^3) или раствор соляной кислоты (HCl) с концентрацией приблизительно 36,5 г/дм^3 (около 1 моль/дм^3) [2].

9.3.4 Дозирование

Разливают среду в соответствующую лабораторную посуду вручную либо с помощью автоматического оборудования.

9.4 Стерилизация

9.4.1 Общие положения

Стерилизацию питательных сред и реактивов можно проводить несколькими способами:

- паровая стерилизация;
- стерилизация фильтрованием.

В зависимости от используемого способа после стерилизации среду необходимо контролировать, особенно в отношении pH, цвета, стерильности и микробиологических характеристик.

9.4.2 Паровая стерилизация

Для стерилизации используют автоклав (см. 5.6). Обычно стадия стерилизации занимает не менее 15 мин при температуре 121 °С. При необходимости цикл стерилизации адаптируют в зависимости от объема, количества емкостей, схемы загрузки и типа сред.

Эффективность процесса стерилизации должна быть подтверждена с помощью соответствующих методов.

9.4.3 Стерилизация фильтрованием

Стерилизация посредством фильтрования может быть проведена в вакууме или под давлением.

Используют стерильные мембранные фильтры и фильтровальные элементы с диаметром пор 0,22 мкм (за исключением отдельных случаев, где может допускаться значение 0,45 мкм). Следуют указаниям изготовителя при использовании фильтровальных элементов или мембранных фильтров, которые были приобретены в стерильном состоянии.

Стерилизуют различные компоненты фильтровального устройства в собранном или разобранном состоянии в автоклаве в течение 15 мин при температуре 121 °С. При необходимости может быть проведена сборка в асептических условиях в микробиологическом шкафу после автоклавирования. Некоторые устройства могут приобретаться в стерильном состоянии.

9.5 Хранение

9.5.1 Общие положения

Каждая упаковка флаконов, колб, пробирок и чашек Петри должна иметь маркировку, содержащую следующие требования:

- наименование среды;
- дату приготовления и/или дату истечения срока годности.

9.5.2 Приготовленные в лаборатории питательные среды и реактивы

Питательные среды, разлитые в пробирки или флаконы, и реактивы, которые не подлежат немедленному использованию, должны быть защищены от света и высыхания посредством соответствующих инертных пробок или завинчивающихся колпачков, имеющих инертные прокладки.

Они должны содержаться в условиях, которые препятствуют изменению их химического состава.

Запрещено использование сред, которые стали обезвоженными.

Перед использованием температура питательных сред должна соответствовать температуре окружающей среды в лаборатории, если не установлено иное.

Пример — TSA-среда, приготовленная в лаборатории, хранится в колбах, в темноте, обычно не более двух месяцев, если не установлено иное.

9.5.3 Готовые к использованию питательные среды и реактивы

Необходимо соблюдать указания изготовителя в отношении:

- даты окончания срока годности;
- температуры и условий хранения;
- условий использования (pH и т. д.);
- контроля эффективности (ростовых свойств).

9.6 Плавление агаризованных питательных сред

Питательную среду плавят путем помещения ее в баню с кипящей водой или другим способом, дающим идентичный результат (например, паровой проточный автоклав).

Избегают перегрева питательной среды и извлекают среду, как только она расплавилась. Выдерживают данную питательную среду в расплавленном состоянии на водяной бане при температуре, не превышающей 48 °С, до ее использования. Не допускается использование питательной среды при температуре выше 48 °С. Желательно не выдерживать расплавленную среду более 8 ч. В случае особо чувствительных питательных сред продолжительность плавления может быть сокращена.

Неиспользованная среда не должна подвергаться повторному расплавлению для последующего использования.

9.7 Подготовка чашек Петри

Заливают расплавленной агаризованной питательной средой чашки Петри таким образом, чтобы получить слой толщиной не менее 3—4 мм (например, для чашек диаметром 90 мм обычно требуется от 15 до 20 $см^3$ агаризованной среды).

Дают агаризованной среде остыть и затвердеть путем помещения чашек Петри на холодную горизонтальную поверхность.

Приготовленные указанным способом чашки Петри используют немедленно или хранят их (в темноте и при соответствующей температуре и продолжительности) в условиях, которые препятствуют изменению их состава. Маркируют чашки в соответствии с 9.5.

Перед использованием может потребоваться высушивание чашек Петри.

Готовые к использованию чашки с агаризованной средой доступны для приобретения. Хранят и используют их в соответствии с инструкциями изготовителя.

10 Лабораторные пробы

10.1 Общие положения

Определение продукции и пробы приведено в 3.1 и 3.2 соответственно.

10.2 Отбор проб парфюмерно-косметической продукции

Важно, чтобы лаборатория получила продукцию, которая является действительно представительной для исследуемой парфюмерно-косметической продукции и которая не была повреждена при транспортировании или хранении.

Отбор проб должен проводиться по соответствующим документам. Если такой документ отсутствует, рекомендуется, чтобы заинтересованные стороны пришли к соглашению по данному вопросу.

10.3 Транспортирование

При транспортировании в лабораторию продукция, подлежащая испытанию, должна находиться в условиях, которые сводят к минимуму изменения содержания микроорганизмов.

10.4 Приемка и хранение

Персонал лаборатории должен проверить состояние продукции при приемке и подтвердить, что оно является удовлетворительным, а количество — достаточным. Если ее состояние неудовлетворительное или количество недостаточное, лаборатория не сможет провести испытание.

Однако при особых обстоятельствах, если испытание проведено, персонал должен зарегистрировать состояние продукции и причину ее испытания.

Продукция, допущенная в лабораторию, должна быть документально оформлена таким образом, чтобы процесс ее нахождения прослеживался бы вплоть до момента составления протокола испытания.

Должна быть зафиксирована следующая информация:

- дата поступления пробы;
- данные, касающиеся отбора проб (дата отбора проб, условия отбора проб и т. д.);
- наименование, информация об изготовителе и заявителе;
- характеристики продукции.

При необходимости продукцию, подлежащую испытаниям, хранят при комнатной температуре. Не следует выдерживать в термостате, охлаждать и замораживать продукцию и пробы ни до, ни после испытания.

10.5 Обращение с продукцией и пробами

Для предотвращения контаминации окружающей среды, продукции и проб с продукцией и пробами следует обращаться таким образом, чтобы исключить какой бы то ни было риск загрязнения. Для достижения этого применяют асептические методы, например:

- любой инструмент, который используется для вскрытия упаковки, должен быть стерильным;
- любой инструмент, который используется для извлечения пробы из продукции, должен быть стерильным;
- при необходимости проводят обеззараживание упаковки и укупорочного средства соответствующим образом.

10.6 Консервация и утилизация продукции

За исключением особых случаев продукцию хранят до тех пор, пока не будут получены все необходимые результаты испытаний, а при необходимости и более длительное время.

Продукцию, из которой отбирались пробы, удаляют в отходы, исключая случаи, когда характер и уровень контаминации являются основанием для проведения обработки как контаминированного материала (см. 8.6).

11 Технические приемы

11.1 Гигиенические меры предосторожности во время испытаний

Для проведения работ, насколько это возможно в асептических условиях, должны быть предприняты следующие меры предосторожности:

a) необходимо убедиться, что рабочая зона чистая и в помещении отсутствуют сквозняки (двери и окна закрыты);

b) до и после работы провести обеззараживание рабочей поверхности с помощью соответствующего дезинфицирующего средства;

c) перед тем как приступить к работе, следует убедиться в том, что в наличии имеется все для ее проведения;

d) в случае работы, проводимой в микробиологическом (ламинарном) шкафу, следует использовать стерильные перчатки или провести обеззараживание рук, перед тем как приступить к работе, и избегать скрещивания рук и ладоней;

e) при работе без микробиологического (ламинарного) шкафа следует открывать упаковки с пробами вблизи открытого пламени и держать упаковку в наиболее возможном наклонном положении;

f) необходимо выполнять работу как можно быстрее, не совершая ненужных движений при выполнении исследований;

g) если упаковка одноразовых пипеток, чашек Петри и т. п. расходуется не полностью при проведении испытания, необходимо убедиться в том, чтобы она была надлежащим образом укупорена после извлечения из нее необходимого количества предметов;

h) необходимо стерилизовать петли, иглы (шпильки) для посева и т. д. до и после использования в пламени горелки; чтобы избежать разбрызгивания субстанций и микроорганизмов, желательно использовать печь для прокаливания игл (шпилек), где это возможно, или одноразовые стерильные петли и иглы (шпильки);

i) необходимо помещать использованные пипетки, шпатели и т. д. в специальные емкости для хранения, содержащие соответствующее дезинфицирующее средство (например, раствор гипохлорита натрия для пипеток) перед их обработкой (см. 8.6);

j) необходимо помещать многоразовые инструменты, которые могут содержать микроорганизмы, в специальные контейнеры перед стерилизацией, перед тем как подвергнуть их мытью;

k) следует помещать использованные одноразовые инструменты в соответствующие контейнеры перед стерилизацией или сжиганием (см. 8.6);

l) необходимо немедленно удалять любое пролитие (брызги) с помощью ватных тампонов или любого другого подходящего материала, пропитанного соответствующим дезинфицирующим средством, затем очистить и дезинфицировать рабочую поверхность перед продолжением работы.

Операции с продукцией и впоследствии с культурами, которые могут содержать патогенные бактерии, требуют введения специальных мер предосторожности. Рекомендуется наличие:

- микробиологического (ламинарного) шкафа для всех операций, требуемых при проведении испытаний;
- автоматических пипеток (отбор пипеткой посредством всасывания ртом строго запрещен).

Примечание — Капли являются основной причиной загрязнения окружающей среды и распространения инфекции. Капли могут образовываться, например:

- при использовании шейкеров, шприцев и т. д.;
- при опорожнении пипеток путем выдувания;
- при стерилизации влажных инокуляционных петель или игл.

Поэтому необходимо минимизировать их образование.

11.2 Приготовление исходной суспензии и разведений пробы

11.2.1 Общие положения

При приготовлении исходной суспензии и разведений пробы время между окончанием приготовления и моментом внесения посевного материала в питательную среду не должно превышать 45 мин, если в соответствующих документах не установлено иное.

Исходную суспензию готовят из пробы в количестве не менее 1 г или 1 $см^3$ хорошо перемешанной испытуемой продукции.

Отмечают S, точную массу или точный объем пробы.

11.2.2 Водорастворимая продукция

Переносят количество *S* пробы продукции в подходящую посуду и готовят соответствующее разведение согласно стандарту, который применяется.

Регистрируют коэффициент разведения *d*.

11.2.3 Нерастворимая в воде продукция

Переносят количество *S* пробы продукции в подходящую посуду, содержащую определенное количество солюбилизирующего компонента (например, полисорбата 80), и готовят требуемое разведение согласно стандарту, который применяется.

Регистрируют коэффициент разведения *d*.

11.3 Методы подсчета

Следуют требованиям применяемого стандартного метода. Дополнительную информацию см. в приложении В.

11.4 Методы обнаружения

Следуют требованиям применяемого стандартного метода.

12 Представление результатов

Следуют требованиям применяемого стандартного метода.

13 Нейтрализация антимикробных свойств продукции

Перед обнаружением или подсчетом жизнеспособных микроорганизмов в парфюмерно-косметической продукции возможное ингибирование микробного роста пробой должно быть нейтрализовано. Во всех случаях и независимо от применяемого метода следует проверять и подтверждать нейтрализацию антимикробных свойств продукции.

Следуют требованиям применяемого стандартного метода.

Приложение А
(справочное)

Основные методы идентификации

А.1 Приготовление чистой культуры

А.1.1 Общие положения

Начинают приготовление чистой культуры с выбора колонии на или в агаризованной среде, которая была получена путем посева разведения пробы продукции для испытаний или путем посева культуры.

Затем высевают выбранную колонию на неселективную агаризованную питательную среду. После инкубации выбирают хорошо изолированную колонию. Повторяют операцию при необходимости.

Используют методы посева на чашки, описанные в А.1.2. В отдельных случаях могут использоваться другие методы.

А.1.2 Посев на чашки

А.1.2.1 Общие положения

Отбирают небольшое количество с поверхности хорошо изолированной колонии на кончик стерильной петли.

Затем либо производят посев непосредственно клетками, присутствующими на петле (см. А.1.2.2), либо приготавливают суспензию из этих клеток (см. А.1.2.3).

А.1.2.2 Прямой метод: пример

Чашки с агаризованной средой приблизительно на одну треть поверхности засевают кончиком петли близко расположенными штрихами. Стерилизуют и охлаждают петлю. От края засеянной площади выполняют другой ряд штрихов, менее плотно расположенных, чем первый, занимая часть свободной площади. Повторяют операцию на оставшейся поверхности, делая штрихи еще более широкими (см. рисунок А.1).



Рисунок А.1 — Пример посева на чашку: прямой метод

А.1.2.3 Метод с использованием разведения

Суспендируют клетки в 1—2 $см^3$ выбранного разбавителя, проводя инокулированной петлей по стенкам пробирки у поверхности жидкости, затем хорошо перемешивают.

Стерилизуют и охлаждают петлю. С помощью петли отбирают небольшое количество микробной суспензии и продолжают согласно А.1.2.2.

А.1.3 Инкубация

Переворачивают засеянные чашки Петри вверх дном и помещают их в инкубатор на заданный период времени при заданной температуре.

А.1.4 Отбор колоний

После инкубации выбирают хорошо изолированную колонию из чашки либо для последующего пересева, либо для проведения испытаний.

Если возможно, окончательные испытания следует проводить, используя клетки одной единственной колонии. В случае недостатка клеточного материала от одной колонии сначала необходимо осуществить повторный посев в жидкую среду или на скошенную агаризованную среду, после чего субкультуру можно использовать для проведения испытаний.

А.2 Окраска по Граму [модифицированный метод Хакера]

А.2.1 Общие положения

Такое окрашивание бактериальных клеток позволяет описать морфологию клеток бактерий и классифицировать их на две группы, в зависимости от того, способны они удерживать фиолетовую окраску кристаллического фиолетового в условиях испытаний или нет. Такое деление обусловлено главным образом различиями в структуре клеточных стенок двух групп и коррелируется с другими существенными различиями между этими двумя группами. Существует ряд способов выполнения окраски по Граму, однако все они учитывают последовательность действий, приведенных ниже.

А.2.2 Растворы

А.2.2.1 Общие положения

Можно использовать имеющиеся в продаже растворы. В этом случае следуют рекомендациям изготовителя.

А.2.2.2 Раствор кристаллического фиолетового

А.2.2.2.1 Состав

- кристаллический фиолетовый — 2,0 г;
- этанол (95 %) — 20 $см^3$;
- оксалат аммония $C_2H_8N_2O_4$ — 0,8 г;
- вода — 80 $см^3$.

А.2.2.2.2 Приготовление

Растворяют кристаллический фиолетовый в этаноле и оксалат аммония в дистиллированной воде. Смешивают два раствора и дают отстояться смеси в течение 24 ч перед применением.

А.2.2.3 Раствор йода

А.2.2.3.1 Состав

- йод — 1,0 г;
- йодид калия KI — 2,0 г;
- вода — 100 $см^3$.

А.2.2.3.2 Приготовление

Растворяют йодид калия в 10 $см^3$ дистиллированной воды, добавляют йод частями. После растворения доводят объем раствора до 100 $см^3$ в мерной колбе.

А.2.2.4 Раствор сафранина

А.2.2.4.1 Состав

- сафранин О — 0,25 г;
- этанол (95 %) — 10 $см^3$;
- вода — 100 $см^3$.

А.2.2.4.2 Приготовление

Растворяют сафранин в этаноле, затем смешивают с дистиллированной водой. Доводят до конечного объема 100 $см^3$.

При использовании кристаллического фиолетового следует проверить стабильность раствора. Для проверки смешивают одну каплю раствора кристаллического фиолетового с одной каплей раствора йода на предметном стекле, чтобы проследить за химической реакцией. Если кристаллизация наблюдается на стекле, раствор кристаллического фиолетового не используют.

А.2.2.5 Метод окрашивания

Из культуры, выращенной в течение 18—24 ч, готовят мазок на предметном стекле и фиксируют его над пламенем спиртовки, затем на мазок наносят раствор кристаллического фиолетового (см. А.2.2.2) и дают прореагировать в течение 1 мин.

Осторожно наклоняя, промывают предметное стекло водой в течение нескольких секунд.

Покрывают предметное стекло раствором йода (см. А.2.2.3). Дают ему прореагировать в течение 1 мин. Осторожно наклоняя, промывают предметное стекло водой в течение нескольких секунд.

Осторожно и непрерывно промывают этанолом (95 %) мазок на предметном стекле в течение не более 30 с, до тех пор пока не исчезнет фиолетовый цвет.

Осторожно наклоняя, промывают предметное стекло водой для удаления этанола.

Докрашивают мазок раствором сафранина (см. А.2.2.4) в течение 10 с.

Осторожно наклоняя, промывают предметное стекло водой.

Высушивают предметное стекло.

А.2.2.6 Интерпретация результатов

Исследуют предметное стекло под объективом микроскопа с большим увеличением (см. 5.13). Бактериальные клетки, которые окрасились в синий или фиолетовый цвет, относятся к грамположительным бактериям, а окрашенные в темно-розовый и красный — к грамотрицательным.

Для чистой культуры некоторых видов бактерий как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии могут быть получены в одном и том же поле зрения микроскопа.

Примечание — У плотно расположенных клеток может отмечаться нехарактерная реакция.

А.3 Тест на каталазу

А.3.1 Общие положения

Обнаружение данного фермента, который разлагает перекись водорода (H_2O_2) на воду и кислород, может быть проведено с помощью бульонной культуры, культуры, выросшей на агаризованной среде или одной единственной колонии, взятой с поверхности агаризованной среды.

А.3.2 Из бульонной культуры

Добавляют к 1 $см^3$ бульонной культуры 0,5 $см^3$ десятикратно разбавленного по объему [с массовой долей 3 %] раствора перекиси водорода. Наблюдают появление пузырьков кислорода (каталазоположительные) или их отсутствие (каталазоотрицательные).

А.3.3 С поверхности агаризованной питательной среды

Наливают на культуру 1—2 $см^3$ десятикратно разбавленного по объему [с массовой долей 3 %] раствора перекиси водорода.

Наблюдают сразу же и по истечении 5 мин, образовались или не образовались пузырьки кислорода.

А.3.4 Из колонии

Наносят раздельно две капли десятикратно разбавленного по объему раствора перекиси водорода на предметное стекло.

Отбирают колонию с помощью стерильной стеклянной или пластиковой палочки (но только не металлической иглой) и осторожно эмульгируют ее в одной из этих двух капель. Наблюдают сразу же и через несколько минут (не ранее чем через 1 мин), образовались или не образовались пузырьки кислорода. В случае сомнения покрывают каждую каплю покровным стеклом и сравнивают появление пузырьков между двумя покрывными стеклами.

Наблюдение можно проводить визуально или с помощью микроскопа с малым увеличением.

А.4 Тест на оксидазу

А.4.1 Общее

Наличие оксидазы обнаруживают по изменению цвета соединения во время окисления под действием данного фермента.

А.4.2 Реактив

А.4.2.1 Состав

- *N*,*N*,*N*',*N*'-тетраметил-3-пара-фенилендиаминдигидрохлорид $C_{10}H_{16}N_2 \cdot 2HCl$ — 1,0 г;
- вода — 100 $см^3$.

А.4.2.2 Приготовление

Растворяют реактив в холодной воде. Готовят реактив непосредственно перед его использованием.

Можно использовать доступные, имеющиеся в продаже диски или полоски. В этом случае следуют рекомендациям изготовителя.

А.4.2.3 Метод

Увлажняют фильтровальную бумагу реактивом. Берут часть бактериальной культуры с агаризованной среды с помощью платиновой иглы либо стеклянной или пластиковой палочки (никель-хромовая игла дает ложноположительный результат) и наносят ее на смоченную фильтровальную бумагу.

А.4.2.4 Интерпретация полученного результата

В случае наличия оксидазы появляется фиолетово-пурпурный цвет в течение 5—10 с. Если цвет не изменился в течение 10 с, тест рассматривается как отрицательный.

А.5 Использование биохимических тестов для идентификации

Для идентификации могут использоваться существующие в настоящее время биохимические тесты. Вместе с тем все имеющиеся в продаже тесты не обеспечивают одинаковый уровень достоверности. Их характеристики необходимо оценивать перед использованием, за исключением случаев, когда их пригодность подтверждена изготовителем и/или независимой организацией.

Приложение В
(справочное)

Основные методы посева и подсчета колоний

В.1 Глубинный посев

Готовят среду, чашки Петри, разбавители и разведения, используемые для испытания, в количествах и с номерами, соответствующими плану посева.

Вносят определенные объемы разведений, подлежащих исследованию, в маркированные чашки Петри. Заливают среду в определенном количестве, указанном в 9.7, в каждую чашку. Сразу же осторожно смешивают расплавленную среду и посевной материал таким образом, чтобы получить равномерное распределение микроорганизмов в массе среды. Дают остыть и затвердеть, помещая чашки Петри на горизонтальную холодную поверхность (время застывания агара не должно превышать 10 мин).

В.2 Поверхностный посев

Вносят посевной материал в центр маркированной чашки Петри с агаризованной питательной средой (приготовленной в соответствии с 9.7). Распределяют его равномерно и как можно быстрее по поверхности среды, используя стерильный стеклянный или пластиковый шпатель либо вращая чашку до тех пор, пока нельзя будет заметить какое-либо количество жидкости на поверхности агара.

В.3 Мембранная фильтрация

Переносят соответствующее количество пробы, приготовленной в соответствии с указаниями, приведенными в каждом методе, в фильтровальный аппарат, смоченный небольшим объемом соответствующего стерильного разбавителя. Сразу же фильтруют и промывают согласно установленной методике.

Переносят мембранный фильтр в чашку Петри на поверхность агаризованной среды.

Приложение С
(справочное)

Приготовление и стандартизация суспензий

С.1 Культуры эталонных штаммов

Чтобы улучшить повторяемость и воспроизводимость результатов, рекомендуется использовать третью (по крайней мере вторую) субкультуру, выращенную на агаризованной среде, полученную от культур, хранимых и приготовленных согласно [5], для приготовления посевного материала бактерий. При использовании *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* субкультуры восстанавливают в течение 18—24 ч. При использовании Candida albicans пригодна первая или вторая субкультура, выращенная в течение 36—48 ч.

С.2 Приготовление клеточных суспензий

Берут 10 $см^3$ разбавителя и вносят в стерильную колбу вместимостью 100 $см^3$, содержащую 5 г стеклянных бусинок. Петлей переносят клетки, выращенные на агаризованной среде, в разбавитель. Клетки должны быть ресуспендированы в разбавителе путем погружения петли и приведения ее в соприкосновение со стенкой колбы с целью перемещения клеток в жидкость. Встряхивают колбу в течение 2—3 мин (используя, если возможно, механический шейкер/встряхивающее устройство). Удаляют верхнюю часть суспензии (избегая любого контакта со стеклянными бусинками) и переносят полученную суспензию в стерильную колбу (пробирку).

С.3 Стандартизация суспензий

Регулируют число клеток в суспензии до значений $1 \cdot 10^8$ КОЕ/$см^3$ — $3 \cdot 10^8$ КОЕ/$см^3$ (для *C. albicans* $1 \cdot 10^7$ КОЕ/$см^3$ — $3 \cdot 10^7$ КОЕ/$см^3$), используя разбавитель в соответствии с данными стандартизации, полученными в лаборатории. Например, используют спектрофотометр [длина волны (620 ± 20) нм] и разовую кювету с длиной оптического пути 10 мм. Измеряют оптическую плотность аликвоты суспензии и при необходимости разбавляют ее, чтобы довести оптическую плотность до определенного значения. Соответствующие значения оптической плотности были получены в диапазоне между 0,150 и 0,460 в зависимости от вида штаммов.

Библиография

[1] ISO 6887-1 [1] Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions (Микробиология пищевой цепи. Подготовка образцов для испытаний, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований. Часть 1. Общие правила подготовки исходной суспензии и десятикратных разведений)

[2] ISO 7218 [2] Microbiology of food and animal feeding stuffs — General rules for the microbiological examinations (Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие правила для микробиологических исследований)

[3] ISO 11133 [3] Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media (Микробиология пищевых продуктов, кормов для животных и воды. Приготовление, производство, хранение и определение рабочих характеристик питательных сред)

[4] ISO/IEC 17025 [4] General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий)

[5] EN 12353 [5] Chemical disinfectants and antiseptics — Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal, mycobactericidal, sporicidal and fungicidal activity (Средства дезинфицирующие химические и антисептики. Консервация тест-микроорганизмов, используемых для определения бактерицидной (включая микроорганизмы Legionella), микобактерицидной, спорицидной, фунгицидной и вируцидной (включая бактериофаги) активности)

[6] CTFA, Microbiology Guidelines, pub. Cosmetic, Toiletry and Fragrance Assn., ISBN 1-88261-32-8, 2001 (Руководство по микробиологии)

[7] EP. Microbiological examination of non-sterile products (2.6.12 to 2.6.13). European Pharmacopoeia, Fourth Edition, 2002 (Микробиологическое исследование нестерильной продукции)

[8] FDA. Bacteriological Analytical Manual. U.S. Food and Drug Administration, Eighth Edition, 1995 (Руководство по бактериологическому анализу)

[9] J.P 14:2001, General tests — Microbial limit test, pub. Japanese Pharmacopoeia (Общие испытания. Испытания на предельное содержание микроорганизмов)

[10] JCIA, Microbial test methods for cosmetics, pub. Japanese Cosmetic Industry Association, 1997 (Испытания на предельное содержание микроорганизмов)

[11] USP 28:2005, Microbial limit test (61), pub. U.S. Pharmacopoeia (Испытания на предельное содержание микроорганизмов)

Приняты межгосударственные стандарты:

[1] ГОСТ ISO 6887-1—2019.

[2] ГОСТ ISO 7218—2015.

[3] ГОСТ ISO 11133—2016.

[4] ГОСТ ISO/IEC 17025—2019.

[5] ГОСТ EN 12353—2016.

УДК 665.57/.58:579.2.013(083.74)(476) МКС 07.100.99; 71.100.70 IDT

Ключевые слова: продукция парфюмерно-косметическая, микробиологический контроль, проба, штаммы микроорганизмов

Редактор *Г.Н. Симонова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *Е.О. Асташина*

Сдано в набор 25.08.2021. Подписано в печать 01.09.2021. Формат 60×84¼. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 2,79. Уч.-изд. л. 2,51.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

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

gost.e-ecolog.ru