МКС 07.100.99; 71.100.70

к ГОСТ ISO 22718-2013 Продукция парфюмерно-косметическая. Микробиология. Обнаружение Staphylococcus aureus

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 22718-2013

ПРОДУКЦИЯ ПАРФЮМЕРНО-КОСМЕТИЧЕСКАЯ. МИКРОБИОЛОГИЯ

Обнаружение Staphylococcus aureus

ПРАДУКЦЫЯ ПАРФЮМЕРНА-КАСМЕТЫЧНАЯ. МІКРАБІЯЛОГІЯ

Выяўленне Staphylococcus aureus

(ISO 22718:2006, 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 22718:2006 Cosmetics – Microbiology – Detection of Staphylococcus aureus (Косметика. Микробиология. Обнаружение Staphylococcus aureus).

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 и европейского стандартов, на которые даны ссылки, имеются в Госстандарте 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 ссылки на международный и европейский стандарты актуализированы.

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 5
7 Штаммы микроорганизмов 5
8 Обращение с парфюмерно-косметической продукцией и лабораторными пробами 5
9 Методика 5
10 Выражение результатов (обнаружение Staphylococcus aureus) 6
11 Нейтрализация антимикробных свойств продукции 7
12 Протокол испытания 8
Приложение А (справочное) Другие бульоны для обогащения 9
Приложение В (справочное) Нейтрализаторы антимикробной активности консервантов и промывные жидкости 11
Библиография 12
Приложение Д.А (справочное) Сведения о соответствии межгосударственного стандарта ссылочному международному стандарту 13

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 Staphylococcus aureus

ПРАДУКЦЫЯ ПАРФЮМЕРНА-КАСМЕТЫЧНАЯ. МІКРАБІЯЛОГІЯ
Выяўленне Staphylococcus aureus

Perfume and cosmetic products
Microbiology
Detection of Staphylococcus aureus

Дата введения 2014-01-01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие требования к методу обнаружения и идентификации специфического микроорганизма Staphylococcus aureus 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 Staphylococcus aureus 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 Staphylococcus aureus 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 [10]. 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 необходимы следующие ссылочные стандарты. 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

EN 12353:2006 Средства дезинфицирующие химические и антисептики. Сохранение микроорганизмов для испытаний, используемых для определения бактерицидной, микобактерицидной, спороцидной и фунгицидной активности.

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).

Издание официальное

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

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

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

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

3.6 Staphylococcus aureus (Staphylococcus aureus): Грамположительные кокки, собранные в скопления, напоминающие гроздья винограда; гладкие колонии, окрашенные обычно в желтый цвет.

Примечания

1 Основные характеристики для идентификации: характерный рост на селективной среде, наличие ферментов каталазы и плазмокоагулазы.

2 Бактерии вида Staphylococcus aureus для людей являются условно патогенными бактериями, которые могут также присутствовать на коже здоровых людей, не причиняя беспокойства. Их присутствие неприемлемо в парфюмерно-косметической продукции по причине их потенциальной патогенности.

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 [1]. Во всех случаях и независимо от применяемой методики нейтрализация антимикробных свойств должна быть проверена и валидирована [2] – [4].

5 Разбавители и питательные среды

5.1 Общие положения

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

Бульон для обогащения используют для диспергирования пробы и 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 Staphylococcus aureus согласно настоящему стандарту при условии, что он валидирован в соответствии с разделом 11.

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

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

5.2.1 Общие положения

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

5.2.2 Состав

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

5.2.3 Приготовление

Компоненты растворяют в воде, перемешивая 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, как указано ниже или из готовой сухой питательной среды согласно инструкциям изготовителя. Должны соблюдаться инструкции поставщика среды.

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

5.3.2 Агаризованная среда для подтверждения (см. раздел 11) [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 Staphylococcus aureus

5.3.4.1 Агаризованная среда Байрд-Паркер (Baird Parker)

5.3.4.1.1 Основная среда

5.3.4.1.1.1 Состав

– панкреатический гидролизат казеина – 10,0 г;
– дрожжевой экстракт – 1,0 г;
– мясной экстракт – 5,0 г;
– пируват натрия – 10,0 г;
– L-глицин – 12,0 г;
– хлорид лития – 5,0 г;
– агар – 12 г до 22 г [1];
– вода – до окончательного объема 950 см^3.

5.3.4.1.2 Приготовление

Растворяют компоненты или готовую сухую основу среды в кипящей воде. Разливают по 100 см^3 в колбы или флаконы соответствующего объема. Стерилизуют среду 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.

5.3.4.1.2 Раствор теллурита калия

5.3.4.1.2.1 Состав

– теллурит калия (K_2TeO_3) – 1,0 г;
– вода – 100 см^3.

5.3.4.1.2.2 Приготовление

Полностью растворяют теллурит калия в воде при минимальном нагревании.

Фильтруют раствор, используя мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм. Раствор может храниться при температуре (3 ± 2) °С не более одного месяца. Если образуется белый осадок, то раствор не пригоден к использованию.

Твердые частички должны легко растворяться. Если в воде присутствует белое нерастворимое вещество, то порошок не пригоден к использованию.

5.3.4.1.3 Яичная эмульсия (концентрация около 20 % или согласно инструкциям изготовителя)

Если промышленность не выпускает данную среду, ее готовят согласно требованиям, приведенным ниже.

Берут куриные яйца с неповрежденной скорлупой. Очищают яйца щеткой и жидким моющим средством. Ополаскивают их проточной водой из крана, затем дезинфицируют скорлупу, погружая яйца в 70%-ный (объемная доля) этанол на 30 с, и дают им высохнуть на воздухе либо обрызгивают их спиртом и затем стерилизуют в пламени спиртовки. Продолжая приготовление в асептических условиях, разбивают каждое яйцо и отделяют желток от белка, перенося желток из одной половинки скорлупы в другую. Кладут желтки в стерильную колбу и добавляют в четыре раза больше по объему стерильной воды. Тщательно перемешивают. Выдерживают смесь при температуре 47 °С в течение 2 ч и оставляют на 18 – 24 ч при температуре (3 ± 2) °С, чтобы образовался осадок. Стерильно переносят супернатант в новый стерильный флакон.

Эмульсия может храниться при температуре (3 ± 2) °С не более 72 ч.

5.3.4.1.4 Полная среда

5.3.4.1.4.1 Состав

– основная среда (5.3.4.1.1) – 100 см^3;
– раствор теллурита калия (5.3.4.1.2) – 1,0 см^3;
– яичная эмульсия (5.3.4.1.3) – 5,0 см^3.

5.3.4.1.4.2 Приготовление

Расплавляют основную среду (5.3.4.1.1), затем охлаждают ее приблизительно до 47 °С. Добавляют в асептических условиях два других раствора (5.3.4.1.2 и 5.3.4.1.3), каждый из них предварительно прогревается при температуре 47 °С, хорошо перемешивается после каждого добавления.

5.3.4.2 Дополнительная селективная агаризованная среда

Разрешается использование дополнительной селективной агаризованной среды (см. приложение А).

---

[1] В зависимости от плотности агара.

6 Инструменты и стеклянная лабораторная посуда

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

7 Штаммы микроорганизмов

Для валидации условий проведения испытаний используют следующий референсный штамм: Staphylococcus aureus ATCC [2] 6538 (эквивалентный штамм: CIP [3] 4.83 или NCIMB [4] 9518).

Культуру следует восстановить согласно процедурам, представленным поставщиком референсного штамма.

Штаммы могут храниться в лаборатории в соответствии с EN 12353.

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 бульон для обогащения объемом не менее 9 см^3.

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

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

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

9.2.2 Водорастворимая продукция

Переносят навеску *S* пробы продукции в подходящую лабораторную посуду, содержащую соответствующий объем бульона.

9.2.3 Нерастворимая в воде продукция

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

Диспергируют пробу в разбавителе и добавляют соответствующий объем бульона.

---

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

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

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

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 проводят фильтрацию и промывают мембранный фильтр, используя определенные объемы воды и/или разбавителя.

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

9.3 Инкубация 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 Staphylococcus aureus

9.4.1 Выделение

Стерильной петлей делают пересев аликвоты инкубированного бульона для обогащения на поверхность агаризованной среды Байрд-Паркер, чтобы получить изолированные колонии.

Переворачивают чашку Петри и инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение не менее 24 ч, но не более 48 ч.

Проверяют наличие характерных колоний (см. таблицу 1).

Таблица 1 – Морфологические характеристики Staphylococcus aureus на селективной среде

Селективная среда	Характеристика колоний Staphylococcus aureus
Агаризованная среда Байрд-Паркер	Черные блестящие колонии, окруженные светлыми зонами размером от 2 до 5 мм

9.4.2 Идентификация Staphylococcus aureus

9.4.2.1 Общие положения

Для выделенных на агаризированной среде Байрд-Паркер подозрительных колоний проводят дальнейшее подтверждение. Наличие Staphylococcus aureus может быть подтверждено разными биохимическими и культуральными тестами.

9.4.2.2 Окраска по Граму

Следуют процедуре, установленной в ISO 21148. Проверяют наличие грамположительных кокков, собранных в скопления, напоминающие гроздья винограда.

9.4.2.3 Тест на каталазу

Следуют процедуре, установленной в ISO 21148.

Проверяют на наличие положительной каталазной активности.

9.4.2.4 Тест на наличие фермента плазмокоагулазы

Используя микробиологическую петлю, переносят подозрительные хорошо изолированные колонии с поверхности агаризованной среды Байрд-Паркер в индивидуальные стерильные пробирки, в каждой из которых находится по 0,5 $см^3$ плазмы млекопитающего, предпочтительно кролика или лошади, с соответствующими добавками или без них.

Проводят инкубацию при (37 ± 2) °С и исследуют пробирки через 3, 4, 6 и до 24 ч, если реакция коагуляции не проявилась в течение 6 ч или иное не установлено изготовителем. Положительную реакцию коагуляции, появившуюся только через 24 ч, необходимо подтвердить.

Согласно рекомендациям изготовителя необходима постановка данного теста для контрольных референсных штаммов одновременно с анализом подозрительных колоний.

Тест должен давать положительную реакцию на плазмокоагулазу.

10 Выражение результатов (обнаружение Staphylococcus aureus)

Если при идентификации колоний подтверждено наличие данного вида, результат представляют как: бактерии вида Staphylococcus aureus 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 Staphylococcus aureus 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 другой подходящей среды (неселективной и не оказывающей нейтрализующее действие) штаммом Staphylococcus aureus (см. раздел 7). Инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 18 – 24 ч.

Стерильной петлей штриховыми движениями снимают с поверхности среды выросшие колонии и ресуспендируют в разбавителе для приготовления калиброванной суспензии с концентрацией клеток 1×10^8 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, чтобы в конечном счете получить концентрацию микроорганизмов, равную 100 – 500 КОЕ/см^3 суспензии. Для подсчета окончательного количества жизнеспособных микроорганизмов в разведенной калиброванной суспензии вносят 1 см^3 суспензии в чашку Петри и заливают 15 – 20 см^3 расплавленной агаризованной среды. Температура расплавленной среды поддерживается с помощью водяной бани на уровне не более 48 °С. Дают среде в чашках застыть, а затем инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 20 – 24 ч.

11.3.1.2 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, 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 (11.3.1.1) тест-культуры Staphylococcus aureus 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). Используя стерильную петлю, делают высев методом истощающего штриха на поверхность агаризованной среды Байрд-Паркер, разлитой в чашки Петри (диаметр от 85 до 100 мм) в количестве приблизительно 15 – 20 см^3. Инкубируют при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 24 – 48 ч.

11.3.2 Интерпретация результатов валидации

Проверяют, что разведенная калиброванная суспензия бактерий вида Staphylococcus aureus (11.3.1.1) содержит от 100 до 500 КОЕ/см^3 микроорганизмов.

Нейтрализация и метод обнаружения являются достоверными, когда ростовые характеристики Staphylococcus aureus 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 Staphylococcus aureus 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 Staphylococcus aureus.

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 Staphylococcus aureus.

12 Протокол испытания

Протокол испытания должен содержать:

a) всю информацию, необходимую для полной идентификации продукции;

b) используемый метод;

c) полученные результаты;

d) все детали приготовления исходной суспензии;

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

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

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

Приложение А
(справочное)

Другие бульоны для обогащения

А.1 Другие бульоны для обогащения

А.1.1 Жидкая питательная среда, содержащая соевый и казеиновый гидролизаты

А.1.1.1 Состав

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

А.1.1.2 Приготовление

Последовательно растворяют все компоненты (или готовую сухую среду) в воде, нагревая при необходимости. 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.

Разливают среду в подходящую лабораторную посуду.

А.1.2 D/E нейтрализующий бульон (Dey/Engley нейтрализующий бульон) [7]

А.1.2.1 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;
– гидросульфит натрия – 2,5 г;
– дрожжевой экстракт – 2,5 г;
– тиогликолят натрия – 1,0 г;
– краситель бромкрезоловый пурпурный – 0,02 г;
– вода – 1 000 см^3.

А.1.2.2 Приготовление

Последовательно растворяют все компоненты или готовую сухую среду 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.1.3 Модифицированный Letheen бульон

А.1.3.1 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.1.3.2 Приготовление

Последовательно растворяют в кипящей воде полисорбат 80 и лецитин до их полного растворения. Растворяют другие 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.

А.2 Другая селективная агаризованная среда

А.2.1 Агаризованная среда с маннитом и хлоридом натрия (агар Chapman)

А.2.1.1 Состав

– говяжий экстракт – 1,0 г;
– панкреатический гидролизат казеина – 5,0 г;
– панкреатический гидролизат мяса – 5,0 г;
– хлорид натрия – 75,0 г;
– D-маннитол – 10,0 г;
– агар – 15,0 г;
– феноловый красный – 0,025 г;
– вода – 1 000 $см^3$.

А.2.1.2 Приготовление

Смешивают все компоненты, нагревают при интенсивном помешивании и кипятят в течение 1 мин для растворения. Разливают по флаконам и стерилизуют.

После стерилизации и охлаждения pH среды должен быть равен 7,4 ± 0,2 при измерении при комнатной температуре.

А.2.2 Vogel – Johnson агаризованная среда

А.2.2.1 Состав

– панкреатический гидролизат казеина – 10,0 г;
– дрожжевой экстракт – 5,0 г;
– маннитол – 10,0 г;
– однозамещенный фосфат калия – 5,0 г;
– хлорид лития – 5,0 г;
– глицин – 10,0 г;
– агар – 16,0 г;
– феноловый красный – 0,025 г;
– вода – 1 000 $см^3$.

А.2.2.2 Приготовление

Кипятят раствор, состоящий из растворенных компонентов в течение 1 мин. Стерилизуют, охлаждают до температуры 45 °С – 50 °С и добавляют 20 $см^3$ стерильного раствора теллурита калия.

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
Примечание – См. [8], [11].		
[a)] D/E нейтрализующий бульон (Dey/Engley нейтрализующий бульон), см. приложение А.		

Библиография

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

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

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

[4] FDA, Bacteriological Analytical Manual, 8th edition, published by the U.S. Food and Drug Administration, 1995, http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-23.html
(Руководство по бактериологическому анализу)

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

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

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

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

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

[10] 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)

[11] 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)]

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/.58:579.861.2.083.12(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. 2,20. Уч.- изд. л. 0,91. Тираж 7 экз. Заказ 712

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