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

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 33918— 2016

Продукция парфюмерно-косметическая

МИКРОБИОЛОГИЯ

Метод определения стерильности

Издание официальное

Москва
Стандартинформ
2019

gost.e-ecolog.ru

Предисловие

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

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Рабочей группой по стандартизации МТК 529/ТК 360 «Парфюмерно-косметическая продукция»

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии

3 ПРИНЯТ Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 25 октября 2016 г. № 92-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
Беларусь	BY	Госстандарт Республики Беларусь
Киргизия	KG	Кыргызстандарт
Россия	RU	Росстандарт

4 Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 25 ноября 2016 г. № 1791-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33918—2016 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 января 2018 г.

5 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

6 ПЕРЕИЗДАНИЕ. Апрель 2019 г.

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

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

© Стандартинформ, оформление, 2016, 2019

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

МКС 07.100.99
71.100.70

Поправка к ГОСТ 33918—2016 Продукция парфюмерно-косметическая. Микробиология. Метод определения стерильности

В каком месте	Напечатано	Должно быть		
Предисловие. Таблица согласования	—	Казахстан	KZ	Госстандарт Республики Казахстан

(ИУС № 7 2019 г.)

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

Продукция парфюмерно-косметическая

МИКРОБИОЛОГИЯ

Метод определения стерильности

Perfumery and cosmetic production. Microbiology.
Method of determination of sterility

Дата введения — 2018—01—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает метод определения стерильности парфюмерно-косметической продукции, для которой установлены требования стерильности (далее — продукция).

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие межгосударственные стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 177 Водорода перекись. Технические условия

ГОСТ 4233 Реактивы. Натрий хлористый. Технические условия

ГОСТ 5556 Вата медицинская гигроскопическая. Технические условия

ГОСТ 6038 Реактивы. D-глюкоза. Технические условия

ГОСТ 6672 Стекла покровные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 6709[1)] Вода дистиллированная. Технические условия

ГОСТ 9284 Стекла предметные для микропрепаратов. Технические условия

ГОСТ 9412 Марля медицинская. Общие технические условия

ГОСТ 12026 Бумага фильтровальная лабораторная. Технические условия

ГОСТ 13739 Масло иммерсионное для микроскопии. Технические требования. Методы испытаний

ГОСТ 13805 Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия

ГОСТ 14919 Электроплиты, электроплитки и жарочные электрошкафы бытовые. Общие технические условия

ГОСТ 17206 Агар микробиологический. Технические условия

ГОСТ 18300[2)] Спирт этиловый ректификованный технический. Технические условия

[1)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 58144—2018.

[2)] В Российской Федерации действует ГОСТ Р 55878—2013.

Издание официальное

ГОСТ 21241 Пинцеты медицинские. Общие технические требования и методы испытаний

ГОСТ 25336 Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры

ГОСТ 29188.0 Продукция парфюмерно-косметическая. Правила приемки, отбор проб, методы органолептических испытаний

ГОСТ 29230 Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные

ГОСТ ISO 21148 Продукция парфюмерно-косметическая. Микробиология. Общие требования к микробиологическому контролю

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов и классификаторов на официальном интернет-сайте Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации (gost.e-ecolog.ru указателям национальных стандартов, издаваемым в государствах, указанных в предисловии, или на официальных сайтах соответствующих национальных органов по стандартизации. Если на документ дана недатированная ссылка, то следует использовать документ, действующий на текущий момент, с учетом всех внесенных в него изменений. Если заменен ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, то следует использовать указанную версию этого документа. Если после принятия настоящего стандарта в ссылочный документ, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение применяется без учета данного изменения. Если документ отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, применяется в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины и определения

В настоящем стандарте применены термины по ГОСТ ISO 21148, а также следующие термины с соответствующими определениями.

3.1 **асептические условия:** Условия проведения испытаний, исключающие внешнюю микробную контаминацию.

3.2 **бокс:** Изолированное оборудованное помещение, предназначенное для микробиологических испытаний в асептических условиях.

3.3 **чистое помещение класса В:** Помещение, в котором количество взвешенных в воздухе частиц размером 0,5 мкм и более не превышает 1 × 3500 шт./м^3, количество жизнеспособных микроорганизмов не превышает 1 × 10 КОЕ/м^3, которое построено и используется так, чтобы свести к минимуму поступление, выделение и удержание частиц внутри помещения, и в котором, по мере необходимости, контролируются другие параметры, например температура, влажность и давление.

3.4 **стерильная парфюмерно-косметическая продукция:** Парфюмерно-косметическая продукция, расфасованная в герметичную упаковку, предназначенная для одноразового применения, к которой установлены требования стерильности.

Примечание — Ампульная косметика является видом стерильной парфюмерно-косметической продукции.

3.5 **стерильность:** Отсутствие жизнеспособных микроорганизмов в единице продукции.

4 Условия выполнения испытания и требования безопасности

4.1 Условия выполнения испытания

4.1.1 Все работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) регламентируются нормативными документами государства, принявшего стандарт.

4.1.2 Общие требования проведения микробиологических испытаний, в том числе общие требования к персоналу, — по ГОСТ ISO 21148.

4.1.3 Испытание на стерильность проводят в асептических условиях, чтобы избежать микробной контаминации во время посева, используя, например, ламинарный бокс, бокс, или проводят испытание в чистом помещении класса В.

4.2 Требования безопасности

4.2.1 Требования безопасности при работе с химическими реактивами — по ГОСТ 12.1.007, с электрооборудованием — по ГОСТ 12.1.019. Требования пожарной безопасности — по ГОСТ 12.1.004.

4.2.2 При нарушении целостности единицы продукции и загрязнении продукцией рабочей поверхности необходимо провести обработку загрязненной поверхности раствором ректификованного этилового спирта объемной долей 70 % или раствором хлорамина Б, или раствором перекиси водорода, или другими дезинфицирующими средствами, обеспечивающими уничтожение микроорганизмов III—IV групп патогенности.

5 Сущность метода

Сущность метода заключается в определении наличия (отсутствия) микроорганизмов в высевах пробы продукции на питательные среды.

6 Оборудование, средства измерений, реактивы, материалы

6.1 Оборудование и средства измерений

Бокс ламинарный.

Весы неавтоматического действия высокого класса точности по ГОСТ OIML R 76-1 с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0,01 г.

Стерилизатор паровой медицинский (автоклав).

Баня водяная с терморегулятором, позволяющим поддерживать температуру от 20 °С до 100 °С и пределом допускаемой погрешности ± 1 °С.

Термостат электрический с автоматическим терморегулятором, обеспечивающий поддержание температуры нагрева от 20 °С до 55 °С с погрешностью ± 0,5 °С.

pH-метр с пределом допускаемой абсолютной погрешности ± 0,01 ед. pH при температуре от 20 °С до 25 °С.

Штативы для пробирок металлические или из полимерных материалов.

Микроскоп биологический с приспособлением для фазово-контрастного микроскопирования, обеспечивающий увеличение 900—1000^{x}.

Холодильник бытовой, обеспечивающий поддержание температуры от 0 °С до 10 °С.

Плитка электрическая по ГОСТ 14919.

Дистиллятор.

Пипетки мерные вместимостью 1 и 2 см^3 по ГОСТ 29230.

Колбы стеклянные вместимостью 100, 250, 1000 см^3 по ГОСТ 25336.

Пробирки различной вместимостью типа П1 или П2 по ГОСТ 25336.

Воронки стеклянные по ГОСТ 25336.

Груши резиновые различной вместимости.

Горелка газовая или спиртовка по ГОСТ 25336.

Вата медицинская гигроскопическая по ГОСТ 5556.

Марля по ГОСТ 9412.

Ножницы бытовые.

Пинцет медицинский по ГОСТ 21241.

Стекла покровные по ГОСТ 6672.

Стекла предметные по ГОСТ 9284.

Устройство перемешивающее типа Вортекс.

Пробки автоклавируемые.

Посуда металлическая различной вместимости эмалированная или из нержавеющей стали.

Бумага фильтровальная по ГОСТ 12026.

Петля бактериологическая.

Чашки Петри ЧБН-1-100 или ЧБН-2 по ГОСТ 25336.

Фильтры для мембранной фильтрации из нитрата целлюлозы или ацетата целлюлозы с размером пор (0,45 ± 0,02) мкм и внешним диаметром 47 мм.

Система мембранной фильтрации или фильтрационный аппарат с держателем фильтра вместимостью не менее 50 см^3, пригодный для использования соответствующих фильтров.

Источник вакуумный, способный обеспечить равномерную скорость фильтрования (устройство также должно быть настроено на получение фильтрования порядка 100 $см^3$ жидкости не менее чем за 2 мин).

6.2 Реактивы и материалы

Стандартный образец мутности на 10 единиц (ЕД) мутности по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

Спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300.

Хлорамин Б, раствор массовой долей 26 %.

Казеина гидролизат панкреатический.

Экстракт дрожжевой.

Натрий хлористый по ГОСТ 4233.

Цистеин.

Кислота тиогликолевая.

Натрия тиогликолят.

Агар микробиологический по ГОСТ 17206.

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Натрия резазурин, свежеприготовленный раствор массовой концентрацией 1,0 $г/дм^3$.

Резазурин натрия растворяют в дистиллированной воде в соотношении 1 : 1000.

Пептон сухой ферментативный по ГОСТ 13805.

D-глюкоза по ГОСТ 6038, ч.

Полисорбат-80.

Водорода перекись по ГОСТ 177, раствор массовой долей 3 % или 6 %.

Масло иммерсионное для микроскопии по ГОСТ 13739.

Допускается применение других средств измерений с метрологическими характеристиками и оборудования с техническими характеристиками, а также материалов и реактивов по качеству не ниже указанных.

6.3 Допускается использование готовых и сухих питательных сред, предназначенных для указанных целей, а также сред, приготовленных по инструкции производителя.

6.4 Допускается использование одноразового оборудования и материалов, если они аналогичны по техническим характеристикам, подходят для использования в микробиологии и не содержат веществ, подавляющих рост микроорганизмов.

7 Проба для испытания

7.1 Отбор проб

Отбор проб проводят в соответствии с ГОСТ 29188.0 со следующим дополнением.

Для выборки продукции с целью возможного повтора испытания от одной партии, вне зависимости от ее размера, отбирают десять единиц продукции.

Для проведения испытания от отобранных десяти единиц продукции берут три единицы продукции.

7.2 Подготовка пробы для испытаний

Перед вскрытием упаковку с продукцией обрабатывают этиловым спиртом. Горлышко ампулы (флакона) осторожно обжигают в пламени спиртовки (или горелки) в течение 2—3 с. Затем вскрывают.

Посев проводят из отобранных единиц продукции (метод прямого посева).

Из отобранных единиц продукции составляют объединенную пробу (метод мембранной фильтрации).

7.2.1 Водорастворимая продукция

Водорастворимую продукцию перемешивают и асептически переносят в питательную среду (метод прямого посева) или на фильтр (метод мембранной фильтрации).

7.2.2 Нерастворимая в воде продукция

Содержимое упаковочной единицы продукции переносят в пробирку подходящей вместимости, содержащую раствор полисорбат-80 (см. 8.3.2) в отношении 1:10, и тщательно перемешивают.

7.3 Подготовка пробы для проведения повторного испытания

Для проведения повторного испытания используют шесть единиц продукции, отобранных по 7.1, с учетом 7.2.1 (7.2.2).

Для проведения повторного испытания методом прямого посева составляют три объединенные пробы и проводят посев из каждой из этих проб.

Для проведения повторного испытания методом мембранной фильтрации составляют одну объединенную пробу из шести единиц продукции.

8 Подготовка к испытанию

8.1 Приготовление и хранение питательных сред

8.1.1 Приготовление жидкой тиогликолевой среды

Для приготовления жидкой тиогликолевой среды в посуде подходящей вместимости смешивают 15,0 г панкреатического гидролизата казеина, 5,0 г дрожжевого экстракта, 2,5 г хлористого натрия, 5,0 г глюкозы, 0,5 г цистеина, 0,5 г тиогликолевой кислоты или тиогликолята натрия, 0,75 г микробиологического агара (заранее замоченного в воде).

Доводят объем раствора дистиллированной водой до 1000 $см^3$ и нагревают на электрической плитке при постоянном перемешивании до полного растворения всех компонентов. Затем фильтруют через ватно-марлевый фильтр, добавляют 1,0 $см^3$ свежеприготовленного раствора резазурина натрия, перемешивают и разливают по 10 $см^3$ в пробирки вместимостью 20 $см^3$. Среду стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Допускается приготовление жидкой тиогликолевой среды без резазурина.

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

Хранят при температуре от 2 °С до 8 °С в защищенном от света месте не более 30 сут.

8.1.2 Приготовление жидкой среды Сабуро

Для приготовления жидкой среды Сабуро в посуду подходящей вместимости наливают 1000 $см^3$ дистиллированной воды и добавляют 10 г сухого ферментативного пептона, кипятят на электрической плитке в течение 10 мин, фильтруют через ватно-марлевый фильтр, прибавляют 40 г глюкозы, разливают по 10 $см^3$ в пробирки вместимостью 20 $см^3$ и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

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

Хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 30 сут.

8.1.3 Условия и сроки хранения питательных сред

Необходимо соблюдать условия и сроки хранения питательных сред. Сухие питательные среды и реактивы хранят в сухом защищенном от света месте при температуре и влажности воздуха, рекомендуемых производителем.

Обеспечивают герметичность вскрытых упаковок со средами. Повышение влажности и комкование сухой питательной среды существенно ухудшают ее качество. Если питательная среда упакована в пакет из ламинированной бумаги и весь объем среды не используется за один раз, то после вскрытия пакета оставшуюся часть среды переносят в чистую сухую емкость из оранжевого стекла (или другого светозащитного инертного материала) с плотно закрывающейся крышкой. Емкость маркируют.

Приготовленные в лаборатории питательные среды должны быть промаркированы с указанием названия среды, даты ее приготовления и срока ее годности.

Если при хранении тиогликолевой среды, содержащей резазурин, верхний слой среды (более 1/3 объема) окрасится в розовый цвет, то среду можно регенерировать нагреванием на кипящей водяной бане в течение 10—15 мин до исчезновения розовой окраски, с последующим быстрым охлаждением. Если окраска не исчезает после нагревания, то среду считают непригодной к употреблению. Регенерацию среды можно проводить только один раз.

Питательные среды промышленного производства, готовые к использованию, хранят в плотно укупоренных емкостях при условии сохранения их стерильности и эффективности в течение срока годности.

Сухие питательные среды промышленного производства хранят в сухом защищенном от света месте в соответствии с инструкцией по использованию. После вскрытия упаковки необходимо указать дату вскрытия и далее хранить при комнатной температуре до окончания срока годности. По истечении срока годности, указанного производителем, среды уничтожают.

8.2 Контроль питательных сред

8.2.1 Общие требования

Приготовление сред следует проводить со строгим соблюдением рецептуры приготовления и условий стерилизации, определенных изготовителем среды.

Контроль питательных сред включает:

- оценку внешнего вида готовой среды;
- измерение pH питательной среды после автоклавирования;
- определение стерильности (отсутствия контаминации) готовой среды;
- контроль эффективности (ростовых свойств).

При использовании готовых к использованию питательных сред необходимо соблюдать инструкции изготовителя.

8.2.2 Оценка внешнего вида готовой среды

Оценку внешнего вида готовой питательной среды проводят визуально. Цвет, прозрачность и консистенция приготовленной среды должны быть типичны для данной питательной среды и соответствовать нормативным документам изготовителя.

На некоторые наиболее часто встречающиеся ошибки при приготовлении сред указывают:

- потемнение среды вследствие перегревания или недостаточного перемешивания;
- неполное растворение (комки) порошкообразной среды;
- образование осадка.

8.2.3 Измерение водородного показателя pH

Значение водородного показателя определяют с помощью pH-метра. Определение проводят согласно инструкции по использованию приборов.

Величину водородного показателя измеряют у стерилизованной среды.

Отклонение pH среды за пределы диапазона, указанного в паспорте, приводит к ухудшению ее биологических свойств, вплоть до полной непригодности. Допускается корректировка pH среды до стерилизации.

Отклонения водородного показателя или другие проблемы с pH могут быть вызваны:

- перегревом, в том числе при стерилизации;
- недостаточным перемешиванием (менее 15 мин);
- использованием щелочного стекла;
- загрязнением емкостей, в которых готовилась среда;
- дистиллированной водой низкого качества;
- некорректной работой pH-метра.

При измерении водородного показателя pH учитывают требования ГОСТ ISO 21148, пункт 8.3.3.

8.2.4 Определение стерильности питательных сред

Определение стерильности проводят путем инкубации в термостате при условиях, указанных в таблице 1.

Таблица 1

Питательная среда	Контрольный штамм микроорганизма		Условия инкубации	
	Вид	Штамм	Температура	Время инкубации
Жидкая тиогликолевая среда	Bacillus subtilis ATCC* 6633 Staphylococcus aureus ATCC* 6538-P Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027 Clostridium sporogenes ГИСК** 272		(32,5 ± 2,5) °С	3 сут
Жидкая среда Сабуро	Candida albicans NCTC*** 885-653		(22,5 ± 2,5) °С	5 сут

*АТСС — Американская коллекция типовых культур, США.

**ГИСК — Государственная коллекция патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л.А. Тарасевича, Россия.

***NCTC — Национальная коллекция типовых культур.

Примечание — Допускается использовать другие эквивалентные штаммы из официально признанных коллекций микроорганизмов.

По истечении срока инкубации на исследуемых питательных средах должны отсутствовать визуально определяемые признаки роста микроорганизмов, после чего среда может быть использована для проведения исследований.

Каждую новую приготовленную партию питательной среды подвергают контролю. Для проверки качества питательной среды от партии приготовленной среды отбирают 5 % пробирок и помещают в термостат при температуре, указанной в таблице 1, и инкубируют в течение не менее 14 сут параллельно с посевом на стерильность.

8.2.5 Контроль эффективности

Эффективность питательных сред определяют для каждой партии коммерческой питательной среды (сухой и готовой к использованию) и для каждой партии среды, приготовленной в лаборатории.

Эффективность питательных сред определяют с периодичностью один раз в квартал.

8.2.5.1 Подготовка контрольных (референсных) штаммов микроорганизмов

Контрольные штаммы следует получать из официально признанной коллекции микроорганизмов. Контрольный штамм микроорганизма готовят за сутки до исследования. Для этого его высевают со среды хранения (например, с полужидкого агара) на пробирки со скошенным питательным агаром или средой в соответствии с таблицей 1. Посевы инкубируют в условиях, указанных в таблице 1.

Из полученной суточной агаровой культуры контрольного штамма микроорганизма готовят суспензию.

Приготовление суспензий с заданной концентрацией клеток контрольного штамма микроорганизма осуществляют с использованием оптического стандарта мутности на 10 ед, соответствующего 1 млрд микробных клеток/см^3.

В стерильную пробирку вносят 3—4 см^3 разбавителя. В качестве разбавителя может быть использован физиологический раствор (см. 8.3.1) или пептонно-солевой разбавитель (см. 8.3.3). Агаровую культуру контрольного штамма микроорганизма бактериологической петлей переносят в пробирку и растирают по внутренней поверхности пробирки, постепенно смешивая с содержащимся в ней разбавителем.

Возможно приготовление суспензии методом смыва выросшей культуры контрольного штамма микроорганизма со скошенного агара 5 см^3 разбавителя.

Полученную взвесь микроорганизмов интенсивно встряхивают, добиваясь полного и равномерного распределения клеток. Мутность полученной взвеси сравнивают с мутностью отраслевого стандартного образца мутности, который также предварительно тщательно встряхивают.

При визуальном несоответствии мутности приготовленной суспензии стандарту ее доводят либо добавлением агаровой культуры, либо добавлением разбавителя. После каждого внесения культуры или разбавителя суспензию тщательно встряхивают.

При совпадении мутности приготовленной суспензии и мутности оптического стандарта считается, что концентрация клеток контрольного штамма микроорганизма в данной суспензии примерно соответствует значению, указанному для данного стандарта (0,9—1х10^9 клеток/см^3).

Для получения суспензии с нужной концентрацией контрольного штамма микроорганизма выполняют серийные разведения полученной стандартной суспензии методом десятикратных разведений.

В соответствии с выбранной степенью разведения культуры контрольного штамма микроорганизма отбирают необходимое количество пробирок и вносят в каждую пробирку по 4,5 $см^3$ стерильного разбавителя.

В первую пробирку, содержащую 4,5 $см^3$ разбавителя, не касаясь стенок пробирки и поверхности разбавителя, стерильной пипеткой вносят 0,5 $см^3$ суспензии культуры контрольного штамма микроорганизма, содержащую 1×10^9 клеток/$см^3$ и тщательно перемешивают пипетированием. Пипетирование следует проводить новой стерильной пипеткой либо суспензию можно перемешать с помощью перемешивающего устройства. Полученное первое разведение в 1 $см^3$ содержит 0,1 $см^3$ исходной культуры контрольного штамма микроорганизма (разведение в 10 раз — 10^{-1}). В следующую (вторую) пробирку, также содержащую 4,5 $см^3$ разбавителя, не касаясь стенок пробирки и поверхности разбавителя, новой пипеткой вносят 0,5 $см^3$ хорошо перемешанного первого разведения. Смесь тщательно перемешивают пипетированием. Получаем второе разведение, в 1 $см^3$ этой суспензии содержится 0,01 $см^3$ исходного образца (разведение в 100 раз — 10^{-2}).

Процедуру приготовления разведений продолжают по схеме (см. рисунок 1) до получения суспензии с необходимым показателем разведения.

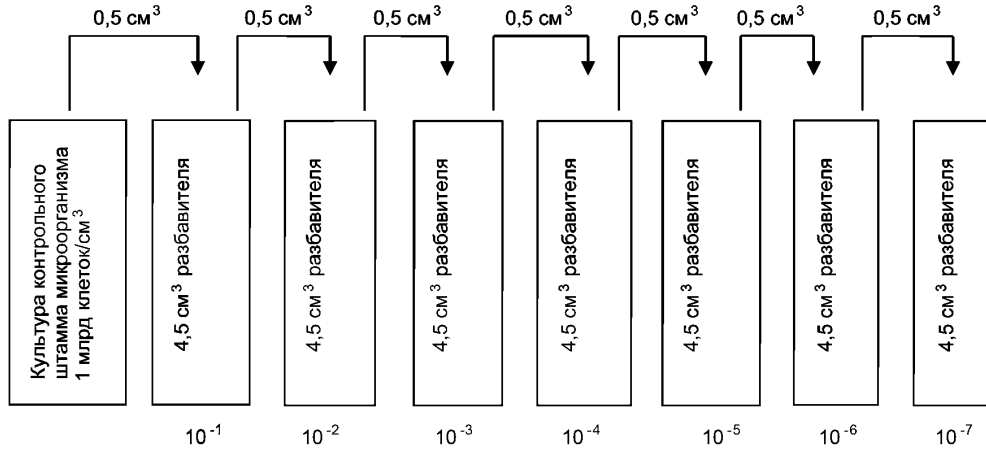


Рисунок 1 — Схема разведения и высева культуры контрольного штамма микроорганизма

Для контроля правильности приготовления суспензии, правильности выполнения разведений и расчета заражающей дозы проводят контрольный высев.

Для контроля разбавления из шестого и седьмого разведений высевают по 0,1 $см^3$ суспензии прямым поверхностным посевом на чашки (пробирки) с питательным агаром. Из каждого разведения делают по три таких посева. После высева чашки (пробирки) с разведениями немедленно переносятся в холодильник. Чашки (пробирки) с посевами инкубируют в термостате при (36 ± 1) °С в течение 18—24 ч.

В день исследования для каждой серии посевов подсчитывают среднее число колоний, выросшее на трех чашках (пробирках). При правильно выполненном разведении среднее количество колоний, выросших при посеве 0,1 $см^3$ суспензии контрольного штамма микроорганизма из шестого разведения, должно составлять примерно 100 КОЕ. Соотношение полученных средних значений при посеве из шестого и седьмого разведений должно быть близко к 10:1. В случае если концентрация микроорганизмов в разведениях значительно отклоняется от расчетной и/или не соблюдена кратность разведения, данный инокулят контрольного штамма микроорганизма непригоден для дальнейшего использования. Подготовку инокулята необходимо повторить.

Приготовленные суспензии можно использовать, если они были охлаждены сразу же после приготовления и проведения контрольных высевов и хранились не более 24 ч. Перед исследованием инокулят следует тщательно перемешивать, чтобы добиться однородности суспензии микроорганизмов.

8.2.5.2 Контроль эффективности

В две пробирки с жидкой средой Сабуро и две пробирки с жидкой тиогликолевой средой вносят культуру контрольного штамма микроорганизма (каждого отдельно) в количестве 10—100 КОЕ/см^3. Инкубируют в соответствии с условиями, изложенными в таблице 1.

Если в течение времени инкубации в инокулированных средах визуально отмечают рост микроорганизмов, среду считают пригодной для использования.

Контроль эффективности проводят один раз в квартал.

8.3 Приготовление растворов и разбавителей

8.3.1 Приготовление изотонического 0,85 %-ного раствора хлористого натрия (физиологический раствор)

0,85 г хлористого натрия растворяют в 100 см^3 дистиллированной воды и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 30 сут.

8.3.2 Приготовление раствора полисорбата-80

4,0 г полисорбата-80 растворяют соответственно в 96 см^3 физиологического раствора (см. 8.3.1), фильтруют через ватно-марлевый фильтр и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Хранят при температуре от 2 °С до 8 °С не более 30 сут.

8.3.3 Приготовление пептонно-солевого разбавителя

8,5 г хлористого натрия и 1,0 г пептона растворяют в 1 дм^3 дистиллированной воды при медленном нагревании. Полученный раствор при необходимости фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают pH (7,0 ± 0,1) ед. pH, разливают в пробирки или в другую посуду, укупоривают и стерилизуют в автоклаве при температуре (121 ± 1) °С в течение 15 мин.

Раствор хранят в темном месте при температуре от 2 °С до 8 °С не более 30 дней в условиях, исключающих испарение влаги.

Температура пептонно-солевого раствора должна соответствовать температуре анализируемой продукции.

9 Определение собственной антимикробной активности парфюмерно-косметической продукции

9.1 Сущность метода

Метод основан на подавлении роста контрольных штаммов микроорганизмов испытуемой продукцией.

9.2 Общие положения

Определение собственной антимикробной активности продукции проводят перед проведением испытания на стерильность посредством анализа рецептуры продукции.

В случае наличия в составе продукции консервантов и/или других веществ, обладающих антимикробным действием, проводят определение собственной антимикробной активности.

9.3 Проведение испытания

Готовят взвеси культур контрольных штаммов микроорганизмов (см. 8.2.5.1) с конечной концентрацией не более 100 КОЕ в 1 см^3.

Испытание проводят дважды с каждым видом микроорганизма в отдельности.

В две пробирки с 10 см^3 жидкой тиогликолевой среды и в две пробирки с 10 см^3 жидкой среды Сабуро вносят по 1 см^3 приготовленной взвеси культуры контрольного штамма микроорганизма.

В одну пробирку с инокулированной жидкой тиогликолевой средой и в одну пробирку с инокулированной жидкой средой Сабуро вносят по 1 см^3 исследуемой пробы, в две другие — по 1 см^3 стерильной дистиллированной воды. Посевы инкубируют в условиях, указанных в таблице 1.

В случае отсутствия роста контрольных штаммов микроорганизмов на соответствующих питательных средах в пробирках с добавлением пробы продукции отмечают наличие антимикробного действия испытуемой продукции.

Для устранения антимикробного действия консервантов и/или веществ в продукции отбирают стерильно и помещают в пробирки (колбы), содержащие 4 %-ный раствор полисорбата-80 (см. 8.3.2), пробу в соотношении 1:10.

Дальнейшие испытания проводят в соответствии с разделом 10 или 11.

10 Метод прямого посева

10.1 Сущность метода

Метод основан на непосредственном внесении анализируемой пробы в питательную среду, инкубации посевов и определении наличия (отсутствия) микроорганизмов.

10.2 Проведение испытания

По 1 $см^3$ (или 0,5 $см^3$) продукции, подготовленной в соответствии с 7.2, высевают в три пробирки с 10 $см^3$ жидкой среды Сабуро и в три пробирки с 10 $см^3$ жидкой тиогликолевой среды. Слегка перемешивают среды после посева, чтобы не вызвать сильную аэрацию.

Посевы в среде Сабуро инкубируют при температуре (22,5 ± 2,5) °С, а посевы в тиогликолевой среде — при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 14 сут.

11 Метод мембранной фильтрации

11.1 Сущность метода

Метод мембранной фильтрации основан на фильтрации растворов через стерильные мембранные фильтры, на которых улавливается основное количество микроорганизмов, с последующим культивированием их в жидкой тиогликолевой среде и в жидкой среде Сабуро.

Преимущественно метод мембранной фильтрации используют для продукции, обладающей антимикробной активностью.

11.2 Проведение испытания

Фильтрование проводят в асептических условиях с использованием фильтрационной установки, включающей фильтровальные воронки с крышками, фильтродержатель, соединенный с колбой-приемником и насосом. Фильтродержатель состоит из фильтровального столика, на который помещают мембранный фильтр диаметром 47 мм и колбы приемника.

Примечание — Допускается использовать другое коммерчески доступное оборудование для проведения испытания на стерильность (например, «прибор Стеритест»).

Фильтрование проводят под вакуумом 93,3 кПа и при скорости прохождения жидкости 55—75 $см^3$/мин.

Внутренние поверхности воронки фильтровальной установки и фильтровального столика смачивают раствором ректификованного этилового спирта объемной долей 96 % и обжигают. После сгорания спирта и остывания воронки одну из воронок снимают.

Примечание — Использование одноразовых стерильных комплектов, состоящих из воронки и мембраны, позволяет исключить стадию стерилизации фильтровального прибора.

С помощью стерильного пинцета помещают мембранный фильтр на основание держателя фильтра, затем снова присоединяют фильтровальную воронку. При отключенном вакууме прибавляют 20—30 $см^3$ стерильной дистиллированной воды или физиологического раствора.

Пробу, подготовленную по 7.2, тщательно перемешивают и асептически переносят в воронку со стерильной дистиллированной водой или физиологическим раствором, включают вакуум и немедленно отфильтровывают.

Фильтрацию заканчивают в момент исчезновения влаги на поверхности фильтра. Дважды/трижды, при включенном вакууме, ополаскивают воронку 100 $см^3$ стерильной дистиллированной водой. Вакуум отключают, снимают фильтровальную воронку и стерильным пинцетом переносят мембранный фильтр с основания. Мембранный фильтр разрезают стерильными ножницами пополам, и одну половину по-

мещают в пробирку, содержащую жидкую среду Сабуро, а вторую половину — в пробирку, содержащую жидкую тиогликолевую среду. Важно, чтобы среда покрывала мембранный фильтр полностью.

Посевы в среде Сабуро инкубируют при температуре (22,5 ± 2,5) °С, а посевы в тиогликолевой среде — при температуре (32,5 ± 2,5) °С в течение 7 сут.

12 Обработка результатов

Посевы просматривают в рассеянном свете ежедневно и по окончании периода инкубации. Наличие роста микроорганизмов в питательных средах оценивают визуально по появлению мутности, пленки, осадка и других макроскопических изменений. Выявленный рост микроорганизмов подтверждают микроскопированием.

Испытуемую продукцию считают стерильной при отсутствии признаков роста микроорганизмов (появления мутности пленки, осадка и других макроскопических изменений).

Наличие роста микроорганизмов определяют визуально. Если исследуемая проба вызывает помутнение питательной среды и визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов, то через 14 сут после начала испытания 1 $см^3$ помутневшей среды переносят в две пробирки с той же стерильной средой. Инкубируют повторные посевы в течение 4 сут для определения характера помутнения (микробиологический/немикробиологический). Общее время инкубации должно составлять не менее чем (14 + 4) сут от начала испытания.

При обнаружении роста хотя бы в одной пробирке повторяют испытание (см. 10.2 или 11.2) с подготовкой пробы по 7.3. При обнаружении роста микроорганизмов хотя бы в одной пробирке при повторном испытании продукцию считают нестерильной.

При отсутствии признаков роста микроорганизмов при повторном испытании продукцию считают стерильной.

УДК 665.58:006.354

МКС 07.100.99
71.100.70

Ключевые слова: стерильная парфюмерно-косметическая продукция, оценка стерильности, метод прямого посева, метод мембранной фильтрации, микробиология

Редактор *Н.Е. Рагузина*
Технический редактор *В.Н. Прусакова*
Корректор *М.И. Першина*
Компьютерная верстка *Е.А. Кондрашовой*

Сдано в набор 02.04.2019. Подписано в печать 15.04.2019. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 1,86. Уч.-изд. л. 1,68.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ»
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