NORME INTERNATIONALE

ISO 16212

Première édition
2008-10-15

Cosmétiques — Microbiologie — Dénombrement des levures et des moisissures

Cosmetics — Microbiology — Enumeration of yeast and mould

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fafe223b-b7dd-4f4d-8190-b3ae250f4a02/iso-16212-2008

Numéro de référence
ISO 16212:2008(F)

© ISO 2008

PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fafe2e3b-b7dd-4f4d-8190-b3ae250f4a02/iso-16212-2008

DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2008

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos iv

1 Domaine d'application 1

2 Références normatives 1

3 Termes et définitions 1

4 Principes 2
4.1 Généralités 2
4.2 Comptage sur gélose 2
4.3 Filtration sur membrane 2

5 Diluants, agents neutralisants et milieux de culture 3
5.1 Généralités 3
5.2 Diluants neutralisants et diluants 3
5.3 Diluant pour la suspension de levure (solution tryptone chlorure de sodium) 4
5.4 Milieux de culture 4

6 Appareillage et verrerie 5

7 Souches de micro-organismes 5

8 Manipulation des produits cosmétiques et des échantillons de laboratoire 6

9 Mode opératoire 6
9.1 Recommandation générale 6
9.2 Préparation de la suspension mère 6
9.3 Méthodes de comptage 6

10 Comptage des colonies (méthode de comptage sur gélose et méthode par filtration sur membrane) 8

11 Expression des résultats 8
11.1 Méthode de calcul pour le comptage sur gélose des boîtes de Petri 8
11.2 Interprétation 9

12 Neutralisation des propriétés fongicides du produit 11
12.1 Généralités 11
12.2 Préparation de l'inoculum 11
12.3 Validation des méthodes de dénombrement 11

13 Rapport d'essai 12

Annexe A (informative) Autres diluants neutralisants 13

Annexe B (informative) Autres diluants 15

Annexe C (informative) Autres milieux de culture 16

Annexe D (informative) Neutralisants de l'activité fongicide des conservateurs et des liquides de rinçage 18

Bibliographie 19

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fafe2e3a-b4dd-4f4d-8190-b3ae250f4a02/iso-16212-2008

© ISO 2008 – Tous droits réservés

Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est en général confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 16212 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 217, *Cosmétiques*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1afe2e3b-b7dd-4f4d-8190-b3ae250f4a02/iso-16212-2008

 © ISO 2008 – Tous droits réservés

Cosmétiques — Microbiologie — Dénombrement des levures et des moisissures

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale donne des lignes directrices générales pour le dénombrement des levures et des moisissures présentes dans les cosmétiques par comptage des colonies en milieu gélosé sélectif après une incubation aérobie.

Afin de garantir la qualité du produit et la sécurité des consommateurs, il est conseillé d'effectuer une analyse de risque microbiologique pour déterminer les types de produits cosmétiques auxquels la présente Norme internationale s'applique. Les produits considérés comme présentant un faible risque microbiologique comprennent ceux ayant une faible activité de l'eau, les produits hydro-alcooliques, les produits ayant des valeurs de pH extrêmes, etc.

En raison de la grande variété de produits cosmétiques couverts dans ce domaine d'application, la présente méthode pourrait ne pas être adaptée en tout point à certains produits (par exemple à certains produits non miscibles à l'eau). D'autres méthodes (par exemple automatisées) peuvent être utilisées pour l'essai présenté ici sous réserve que leur équivalence ait été démontrée ou que la méthode ait été validée par ailleurs.

Les levures dénombrées peuvent être identifiées à l'aide d'essais d'identification appropriés, par exemple ceux décrits dans les normes données dans la Bibliographie. Les moisissures dénombrées peuvent être identifiées en utilisant d'autres méthodes appropriées, si nécessaire.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fafe2e3c-b7dd-4f4d-8190-b3ae50f4a02/iso-16212-2008

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 21148, *Cosmétiques — Microbiologie — Instructions générales pour les examens microbiologiques*

EN 12353, *Antiseptiques et désinfectants chimiques — Conservation des microorganismes d'essai utilisés pour la détermination de l'activité bactéricide, mycobactéricide, sporicide et fongicide*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1
levure
champignon unicellulaire qui se multiplie principalement de manière végétative en bourgeonnant, capable de se développer dans les conditions d'essais spécifiées dans la présente Norme internationale

3.2
moisissure
mycélium formant des micromycètes, y compris les spores et les conidies, capable de se développer dans les conditions d'essai spécifiées par la présente Norme internationale

© ISO 2008 – Tous droits réservés

3.3
produit
portion d'un produit cosmétique identifié reçue au laboratoire pour essais

3.4
échantillon
portion du produit (au moins 1 g ou 1 ml) utilisée lors de l'essai pour préparer la suspension mère

3.5
suspension mère
suspension (ou solution) d'un échantillon dans un volume défini d'un liquide approprié (diluant, agent neutralisant, bouillon ou combinaison de ceux-ci)

3.6
dilution(s) de l'échantillon
dilution(s) de la suspension mère

4 Principes

4.1 Généralités

La présente méthode implique le dénombrement des colonies dans un milieu gélosé sélectif. L'inhibition possible du développement fongique par l'échantillon doit être neutralisée pour permettre la détection des micro-organismes viables (voir la Référence [2]). Dans tous les cas et quelle que soit la méthodologie, la neutralisation des propriétés fongicides du produit doit être vérifiée et validée (voir les Références [3], [5], [6]).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4afe2e3b-b7dd-4f4d-8120-b3ae250f4a02/iso-16212-2008

4.2 Comptage sur gélose

Le comptage sur gélose comprend les étapes suivantes.

a) Préparation des boîtes pour ensemencement en profondeur ou étalement en surface, à l'aide d'un milieu de culture défini, et inoculation des boîtes avec une quantité définie de la suspension mère ou d'une dilution du produit.

b) Incubation aérobie des boîtes de 3 jours à 5 jours à 25 °C ± 2,5 °C.

c) Comptage du nombre d'unités formant colonie (UFC) et dénombrement du nombre de levures et de moisissures par millilitre ou par gramme de produit.

NOTE Une condition d'incubation de 5 jours à 7 jours à 22,5 °C ± 2,5 °C en utilisant un milieu de culture sans antibiotique est également possible.

4.3 Filtration sur membrane

La filtration sur membrane comprend les étapes suivantes.

a) Transfert d'une quantité adaptée de l'échantillon préparé selon une méthode validée dans l'appareillage de filtration, humidifié avec un faible volume de diluant stérile approprié. Filtration et lavage immédiats selon un mode opératoire validé. Transfert de la membrane filtrante à la surface du milieu gélosé spécifié, comme indiqué dans l'ISO 21148.

b) Incubation aérobie des membranes de 3 jours à 5 jours à 25 °C ± 2,5 °C.

c) Comptage du nombre d'unités formant colonie (UFC) et dénombrement du nombre de levures et de moisissures par millilitre ou par gramme de produit.

NOTE Une condition d'incubation de 5 jours à 7 jours à 22,5 °C ± 2,5 °C en utilisant un milieu de culture sans antibiotique est également possible.

 © ISO 2008 – Tous droits réservés

5 Diluants, agents neutralisants et milieux de culture

5.1 Généralités

Les spécifications générales sont décrites dans l'ISO 21148. Lorsque de l'eau est mentionnée dans une formule, utiliser de l'eau distillée ou purifiée, comme spécifié dans l'ISO 21148.

Les diluants, agents neutralisants et milieux de culture suivants conviennent pour le dénombrement des levures et des moisissures. D'autres diluants et agents neutralisants ainsi que d'autres milieux de culture peuvent être utilisés s'il a été démontré qu'ils sont adaptés pour cet emploi.

5.2 Diluants neutralisants et diluants

5.2.1 Généralités

Le diluant est utilisé pour disperser l'échantillon. Il peut contenir des agents neutralisants si l'échantillon à soumettre à essai a des propriétés fongicides. L'efficacité de la neutralisation doit être démontrée avant la détermination de la concentration fongique (voir Article 12). Les informations relatives à des agents neutralisants appropriés sont données dans l'Annexe D.

5.2.2 Diluants neutralisants

5.2.2.1 Milieu à la caséine, à la lécithine de soja et au polysorbate 20 (bouillon SCDLP 20)

5.2.2.1.1 Composition

— peptone pancréatique de caséine 20,0 g

— lécithine de soja 5,0 g

— polysorbate 20 40 ml

— eau 960 ml

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fafe2e3b-b7dd-45d-8120-b3ae250f4a02/iso-16212-2008

5.2.2.1.2 Préparation

Dissoudre le polysorbate 20 dans 960 ml d'eau en mélangeant pendant le chauffage au bain-marie à 49 °C ± 2 °C. Ajouter la peptone pancréatique de caséine et la lécithine de soja. Chauffer pendant environ 30 min pour obtenir une solution. Mélanger et répartir le milieu dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après la stérilisation, le pH doit être de 7,3 ± 0,2, le mesurage étant effectué à température ambiante.

5.2.2.2 Autres diluants neutralisants

D'autres diluants neutralisants peuvent être utilisés s'ils sont appropriés (voir Annexes A et D).

5.2.3 Diluants

5.2.3.1 Liquide A

5.2.3.1.1 Composition

— peptone pepsique de tissus animaux 1,0 g

— eau 1 000 ml

© ISO 2008 – Tous droits réservés

5.2.3.1.2 Préparation

Dissoudre 1 g de peptone dans l'eau pour obtenir 1 l. Chauffer en remuant fréquemment. Répartir dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après la stérilisation, le pH doit être de 7,1 ± 0,2, le mesurage étant effectué à température ambiante.

5.2.3.2 Autres diluants

D'autres diluants peuvent être utilisés s'ils sont appropriés (voir Annexe B).

5.3 Diluant pour la suspension de levure (solution tryptone chlorure de sodium)

5.3.1 Composition

— tryptone, peptone pancréatique de caséine 1,00 g

— chlorure de sodium 8,50 g

— eau 1 000 ml

5.3.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en mélangeant pendant le chauffage. Répartir dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après la stérilisation, le pH doit être de 7,0 ± 0,2, le mesurage étant effectué à température ambiante.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/afe0e3b-b7dd-4f4d-8100-b3ac250f4a02/iso-16212-2008

5.4 Milieux de culture

5.4.1 Généralités

Les milieux de culture peuvent être préparés comme suit ou à partir de milieux de culture déshydratés, conformément aux instructions du fabricant. Les milieux prêts à l'emploi peuvent être utilisés lorsque leur composition et/ou leur rendement de croissance sont comparables à ceux des formules indiquées ci-après.

5.4.2 Gélose Sabouraud au dextrose chloramphénicol (SDCA)

5.4.2.1 Composition

— dextrose 40,0 g

— peptone peptique de tissus animaux 5,0 g

— peptone pancréatique de caséine 5,0 g

— chloramphénicol 0,050 g

— gélose 15,0 g

— eau 1 000 ml

5.4.2.2 Préparation

Dissoudre les composants (y compris le chloramphénicol) ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en mélangeant pendant le chauffage. Répartir le milieu dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après la stérilisation, le pH doit être de 5,6 ± 0,2, le mesurage étant effectué à température ambiante.

NOTE Pour les produits connus et non contaminés (par des bactéries) le milieu sera utilisé sans chloramphénicol.

 © ISO 2008 – Tous droits réservés

5.4.3 Autres milieux

D'autres milieux peuvent être utilisés, le cas échéant (voir Annexe C).

5.4.4 Milieu gélosé pour la culture de la souche de référence: gélose Sabouraud au dextrose (SDA)

5.4.4.1 Composition

— dextrose	40 g
— peptone peptique de tissus animaux	5,0 g
— peptone pancréatique de caséine	5,0 g
— gélose	15,0 g
— eau	1 000 ml

5.4.4.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en mélangeant pendant le chauffage. Répartir le milieu dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après la stérilisation, le pH doit être de 5,6 ± 0,2, le mesurage étant effectué à température ambiante.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fa1e2e3b-b7dd-4f4d-8190-b3ae250f4a02/iso-16212-2008

6 Appareillage et verrerie

L'équipement de laboratoire, le matériel et la verrerie doivent être tels que décrits dans l'ISO 21148.

7 Souches de micro-organismes

Pour la validation des conditions d'essai, une souche de levure de référence est utilisée.

Candida albicans ATCC[1] 10231 ou une souche équivalente (IP[2] 48.72, NCPF[3] 3179, NBRC[4] 1594, KCTC[5] 7205, TISTR[6] 5779) ou toute autre souche équivalente issue de collections nationales.

La souche de levure sélectionnée considérée comme étant plus sensible à l'activité fongicide que les moisissures peut être acceptée comme représentative des champignons (levures et moisissures) pour la validation de la méthode. Cependant, en cas de besoins spécifiques, l'essai d'efficacité des agents neutralisants peut être réalisé avec une souche de référence supplémentaire de moisissure, en utilisant un protocole approprié pour la préparation d'un inoculum calibré (par exemple, voir l'EN 13624:2003[11], 5.4.1.4).

Il convient de reconstituer la culture conformément aux méthodes indiquées par le fournisseur de la souche de référence.

La souche peut être conservée au laboratoire, conformément à l'EN 12353.

---

1) ATCC = American Type Culture Collection.

2) IP = Institute Pasteur.

3) NCPF = National Collection of Pathogenic Fungi.

4) NBRC = National Biological Resource Centre.

5) KCTC = Korean Collection for Type Culture.

6) TISTR = Thailand Institue of Scientific and Technological Research.

© ISO 2008 – Tous droits réservés

8 Manipulation des produits cosmétiques et des échantillons de laboratoire

Si nécessaire, conserver les produits à soumettre à essai à température ambiante.

Ne pas incuber, réfrigérer ou congeler les produits (3.3) et les échantillons (3.4) avant ou après analyse.

Il convient d'effectuer l'échantillonnage des produits cosmétiques à analyser comme décrit dans l'ISO 21148. Analyser les échantillons comme décrit dans l'ISO 21148 et conformément au mode opératoire décrit dans l'Article 9.

9 Mode opératoire

9.1 Recommandation générale

Utiliser du matériel et des équipements stériles ainsi que des techniques aseptiques pour préparer l'échantillon, la suspension mère et les dilutions. En cas de préparation d'une suspension mère, le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation et le moment où l'inoculum entre en contact avec le milieu de culture ne doit pas dépasser 45 min, sauf indications particulières mentionnées dans les protocoles ou documents établis.

9.2 Préparation de la suspension mère

9.2.1 Généralités

La suspension mère est préparée à partir d'un échantillon d'au moins 1 g ou 1 ml du produit à analyser préalablement mélangé.

Noter la masse ou le volume exact de l'échantillon, S.

La suspension mère est généralement une dilution 1:10. Des volumes plus importants de diluant peuvent être requis si des niveaux de contamination élevés sont attendus et/ou si des propriétés fongicides persistent dans la dilution 1:10.

9.2.2 Produits solubles dans l'eau

Transférer l'échantillon, S, de produit dans un volume approprié (par exemple 9 ml) de diluant neutralisant (voir 5.2.2) ou de diluant (voir 5.2.3).

Noter, d, le facteur de dilution.

9.2.3 Produits insolubles à l'eau

Transférer l'échantillon, S, de produit dans un récipient approprié contenant une quantité adéquate d'agent solubilisant (par exemple solution polysorbate 80). Disperser l'échantillon dans l'agent solubilisant et ajouter un volume approprié (par exemple 9 ml) de diluant neutralisant (voir 5.2.2) ou de diluant (voir 5.2.3).

Noter le facteur de dilution, d.

9.3 Méthodes de comptage

9.3.1 Dilutions pour les méthodes de comptage

La suspension mère est généralement la première dilution comptée. Au besoin, d'autres dilutions (par exemple dilution 1:10) peuvent être réalisées à partir de la suspension mère en utilisant le même diluant (selon le niveau de contamination attendu pour le produit).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
Full standard:
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/fafe2e3b-b7dd-4f4d-8190-8ae250f4a02/iso-16212-2008

 © ISO 2008 – Tous droits réservés