
**Chaussures et composants de
chaussures — Méthode d'essai
qualitative pour évaluer l'activité
antifongique (essai de croissance)**

*Footwear and footwear components — Qualitative test method to
assess antifungal activity (growth test)*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 19574:2022](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c3ea3ad5-dfcb-42c3-91c5-5172ba04cebc/iso-19574-2022)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c3ea3ad5-dfcb-42c3-91c5-5172ba04cebc/iso-19574-2022>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19574:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c3ea3ad5-dfcb-42c3-91c5-5172ba04cebc/iso-19574-2022>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2022

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
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 Principe	2
5 Sécurité	2
6 Appareillage	2
7 Réactifs et milieu de culture	3
7.1 Généralités	3
7.2 Eau	3
7.3 Milieu à base de gélose à l'extrait de malt (MEA, de l'anglais « <i>Malt Extract Agar</i> »)	3
7.3.1 Composition	3
7.3.2 Préparation	4
7.4 Sérum physiologique (solution de chlorure de sodium)	4
7.4.1 Composition	4
7.4.2 Préparation	4
7.5 Agent mouillant (tensio-actif anionique)	4
7.6 Solution tampon	4
7.6.1 Solution tampon mère	4
7.6.2 Préparation de la solution tampon mère	4
7.6.3 Préparation de la solution tampon	5
8 Micro-organismes d'essai	5
9 Préparation d'une suspension de spores pour essai	6
10 Préparation des éprouvettes d'essai	6
10.1 Généralités	6
10.2 Éprouvettes d'essai et éprouvettes témoins	7
10.3 Prétraitement des éprouvettes d'essai et des éprouvettes témoins	7
11 Mode opératoire d'essai	7
11.1 Ensemencement des boîtes de gélose solidifiées	7
11.2 Mise en place des éprouvettes d'essai et des éprouvettes témoins	7
11.3 Ensemencement des éprouvettes d'essai et des éprouvettes témoins	7
11.4 Incubation	8
11.5 Contrôle de viabilité des spores	8
11.6 Évaluation de la croissance des microchampignons	8
12 Expression des résultats	8
13 Rapport d'essai	9
Bibliographie	11

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 216, *Chaussure*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 309, *Chaussure*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/members.html.

Chaussures et composants de chaussures — Méthode d'essai qualitative pour évaluer l'activité antifongique (essai de croissance)

PRÉCAUTION — Les méthodes d'essai spécifiées dans le présent document nécessitent l'utilisation de microchampignons (mycomycètes). Ces essais doivent être réalisés exclusivement dans des installations comportant des dispositifs de confinement adaptés à la manipulation des micro-organismes et par des personnes formées et expérimentées dans la mise en œuvre des techniques microbiologiques.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode d'essai (essai de croissance) en vue de l'évaluation qualitative de l'activité antifongique de chaussures et de composants de chaussures soumis à l'action de microchampignons filamenteux.

Le présent document ne s'applique qu'aux chaussures et composants de chaussures pour lesquels des effets thérapeutiques antifongiques (antimycotiques) ou antimicrobiens sont déclarés.

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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).

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c3ea3ad5-dfeb-42c3-91c5-5172ba04cebc/iso-19574-2022>
ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations*

ISO 11133, *Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

ISO 16187, *Chaussure et composants de chaussure — Méthode d'essai pour évaluer l'activité antibactérienne*

ISO 19952, *Chaussures — Vocabulaire*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 19952 ainsi que les suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>

3.1

activité antifongique

activité antimycotique

efficacité d'un matériau ou d'un apprêt servant à empêcher ou à limiter la croissance des micromycètes, à réduire leur nombre ou à les tuer

3.2

épreuves témoins

matériau identique au matériau d'essai mais n'ayant pas subi de traitement antifongique

4 Principe

Les éprouvettes d'essai et les éprouvettes témoins sont ensemencées avec une suspension mixte de spores de souches de moisissures sélectionnées pour l'essai ou avec une unique souche d'essai, en fonction des propriétés particulières déclarées.

Les performances antifongiques font l'objet d'une détermination qualitative par évaluation visuelle de la croissance fongique après une période d'incubation spécifiée ou convenue.

5 Sécurité

La manipulation de micro-organismes qui sont potentiellement dangereux nécessite un haut degré de compétence technique et peut être soumise à la législation et aux réglementations nationales en vigueur. Il convient que seul le personnel formé aux techniques microbiologiques effectue de tels essais.

NOTE Se référer aux codes de bonnes pratiques propres à chaque pays en matière d'hygiène du personnel, de désinfection et de stérilisation.

Il convient que le personnel qui effectue l'essai consulte l'Annexe A de l'IEC 60068-2-10:2005+AMD1:2018 ainsi que l'ISO 7218.

6 Appareillage

6.1 Généralités

Le matériel à usage unique, dès lors qu'il présente les caractéristiques appropriées, est une alternative acceptable à la verrerie et au plastique réutilisables.

Le matériel habituel pour laboratoire de microbiologie, conformément à l'ISO 7218 et, notamment, les éléments suivants doivent être utilisés.

6.2 Poste de sécurité biologique.

6.3 Incubateur microbiologique, permettant de maintenir une température de (28 ± 2) °C et une humidité relative de (85 ± 5) %.

6.4 Autoclave, permettant de maintenir une température de (121 ± 2) °C et une pression de (103 ± 5) kPa, pour la stérilisation par voie humide, utilisé conformément à l'ISO 7218.

6.5 Agitateur vortex.

6.6 pH-mètre, exact à 0,1 unité de pH près.

6.7 Centrifugeuse de laboratoire, 2 000g.

NOTE 2 000g \approx 4 000 r/min.

6.8 Microscope, grossissement de 20 \times au minimum (idéalement, 50 \times).

6.9 Billes de verre, de 2 mm à 3 mm de diamètre, pour la préparation de solutions de spores fongiques.

6.10 Laine de verre ou gaze médicale (double couche), pour la préparation de solutions de spores fongiques.

6.11 Récipients à large ouverture munis d'un bouchon, d'une capacité de 500 ml et pouvant être autoclavés (6.4).

6.12 Four, pour la stérilisation à sec.

6.13 Balance, précise à 0,01 g près.

6.14 Spectrophotomètre, permettant des mesures aux longueurs d'onde comprises entre 500 nm et 700 nm, ou néphélomètre McFarland.

6.15 Boîtes de Petri, stérilisées, en verre ou en plastique, mesurant de 90 mm à 100 mm ou de 55 mm à 60 mm de diamètre.

6.16 Pipettes, ayant le volume le plus adapté à chaque usage.

6.17 Grille, pour l'évaluation de la croissance fongique, soit divisée en carrés de 5 mm sur 5 mm, soit divisant la surface de l'éprouvette d'essai en cent carrés de dimensions égales.

7 Réactifs et milieu de culture

7.1 Généralités

Les réactifs utilisés lors des essais doivent être de qualité analytique et/ou adaptés à des fins microbiologiques.

Il convient d'utiliser des produits déshydratés disponibles dans le commerce pour préparer les milieux de culture. Il convient de suivre rigoureusement les instructions du fabricant concernant la préparation de ces produits.

La préparation, la production et les essais de performance des milieux de culture doivent être réalisés conformément à l'ISO 11133.

7.2 Eau

L'eau utilisée pour les essais doit être une eau de qualité analytique reconnue pour la préparation de milieux microbiologiques, fraîchement obtenue par distillation et/ou échange d'ions et/ou ultra-filtration et/ou filtration par osmose inverse.

Elle doit être exempte de toutes substances toxiques ou inhibitrices pour les micro-organismes.

7.3 Milieu à base de gélose à l'extrait de malt (MEA, de l'anglais «*Malt Extract Agar*»)

7.3.1 Composition

Extrait de malt	30,0 g
Peptone de soja	3,0 g
Gélose	15,0 g
Eau	1 000 ml

7.3.2 Préparation

Le mélange une fois préparé, agiter et ajuster le pH à $(5,5 \pm 0,2)$ à température ambiante. Tout en agitant, chauffer sur une plaque chauffante ou dans un bain-marie à ébullition jusqu'à ce que les composants soient complètement dissous. Stériliser à (121 ± 2) °C pendant 15 min dans un autoclave (6.4) à vapeur d'eau saturée. Laisser refroidir la solution et, après l'avoir bien agitée, en verser 25 ml dans chaque boîte de Petri stérile. Laisser refroidir et solidifier.

NOTE 1 La gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA, de l'anglais «*Potato Dextrose Agar*») peut également fournir un milieu complet pour la croissance de microchampignons. La composition standard du milieu PDA vendu dans le commerce peut être utilisée.

NOTE 2 Le milieu à base de gélose à l'extrait de malt (MEA) peut être acheté dans le commerce.

7.4 Sérum physiologique (solution de chlorure de sodium)

7.4.1 Composition

Chlorure de sodium (NaCl), CAS RN ¹⁾ : 7647-14-5	8,5 g
Eau	1 000 ml

7.4.2 Préparation

Après avoir bien mélangé, ajuster le pH à $(6,9 \pm 0,2)$ à température ambiante et stériliser à (121 ± 2) °C pendant 15 min.

7.5 Agent mouillant (tensio-actif anionique)

L'agent mouillant doit être utilisé pour la récolte des spores dans la suspension de spores pour essai. Il convient qu'il ne réagisse pas avec d'autres réactifs, tels que le polysorbate 80 (TWEEN 80), le N-méthyltauride, le TritonTM X-100²⁾ ou l'éther polyglycole, etc., et qu'il n'entraîne ni réduction, ni augmentation du nombre de microchampignons. Utiliser en concentration finale de 0,01 %.

NOTE L'agent mouillant (tensio-actif anionique) peut s'utiliser lorsque les éprouvettes sont pourvues d'un revêtement.

7.6 Solution tampon

7.6.1 Solution tampon mère

Dihydrogéo-phosphate de potassium (KH ₂ PO ₄), CAS RN ¹⁾ : 7778-77-0	34,0 g
Eau	1 000 ml

7.6.2 Préparation de la solution tampon mère

Verser la quantité pesée de dihydrogéo-phosphate de potassium dans une fiole de 1 000 ml, ajouter 500 ml d'eau distillée, ajuster le pH à $(7,2 \pm 0,2)$ (à température ambiante) avec la solution de NaOH

1) CAS Registry Number[®] (CAS RN[®]) est une marque commerciale de CAS corporation. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

2) TritonTM X-100 est le nom commercial d'un produit distribué par SIGMA-ALDRICH. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

diluée à 0,01 mol/l. Diluer à 1 000 ml avec de l'eau distillée et conserver à 4 °C pendant 6 mois au maximum.

7.6.3 Préparation de la solution tampon

Transvaser 1 ml de la solution tampon mère et 0,08 g d'agent mouillant (7.5), correspondant à une concentration finale de 0,01 %, et diluer à 800 ml avec de l'eau distillée. Après avoir bien mélangé, stériliser à (121 ± 2) °C pendant 15 min.

NOTE L'agent mouillant (7.5) peut être omis s'il ne s'avère pas nécessaire.

8 Micro-organismes d'essai

La souche utilisée doit être indiquée dans le rapport d'essai.

Les espèces à utiliser sont recensées dans le [Tableau 1](#).

En cas de déclaration de propriétés antimycotiques vis-à-vis des moisissures, les essais peuvent être réalisés en utilisant une souche d'*Aspergillus sp.* ou une souche de *Penicillium funiculosum*, mélangées en suspension ou prises séparément. En cas de déclaration de propriétés antimycotiques vis-à-vis des dermatophytes (pied d'athlète), les *Trichophyton mentagrophytes* doivent être utilisés pour les essais.

Ne pas utiliser pour les essais une suspension mixte contenant des souches de moisissures et des souches de dermatophytes.

Il convient de réaliser un essai distinct pour chaque organisme.

Les souches peuvent être conservées conformément aux instructions du fournisseur ou conformément à l'EN 12353.

Tableau 1 — Souches d'essai

Micro-champignons ^a	Nom	n° WDCM	n° CGMCC	n° ATCC® ^c
Moisissure/ Aspergillus sp. ^b	<i>Aspergillus niger</i>	00144	CGMCC 3 4463	ATCC® 6275™
	ou <i>Aspergillus brasiliensis</i>	ou 00053	ou CGMCC 3 5487	ou ATCC® 16404™
Moisissure / Penicillium sp.	<i>Penicillium funiculosum</i>	00194	CGMCC 3 3875	ATCC® 9644™
Dermatophytes	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	00191	—	ATCC® 9533™

Légende

WDCM: World Data Centre for Microorganisms (Centre mondial de données sur les micro-organismes)

CGMCC: China General Microbiological Culture Collection Centre (Centre général chinois de collection de cultures microbiologiques)

ATCC®: American Type Culture Collection (Collection américaine de cultures types)

NOTE D'autres microchampignons (espèces appropriées, ou autres souches appropriées) peuvent être utilisés après validation en bonne et due forme.

a Les souches d'essai doivent provenir des agences de la World Federation of Culture Collection (WFCC) (Fédération mondiale de collections de cultures). Les espèces de microchampignons et leur provenance doivent être consignées dans le rapport d'essai.

b Choisir une des souches d'*Aspergillus* (*A. niger* ou *A. brasiliensis*).

c ATCC est une marque commerciale de American Type Culture Collection. ATCC® 6275™, ATCC® 16404™, ATCC® 9644™ et ATCC® 9533™ sont des exemples de produits appropriés disponibles dans le commerce. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi des produits ainsi désignés.

9 Préparation d'une suspension de spores pour essai

9.1 Appliquer les souches de 4 générations.

9.2 Inoculer les spores de microchampignons sur la surface du milieu à base de gélose à l'extrait de malt (7.3) ou sur la surface d'un milieu PDA standard; incubé à (28 ± 2) °C jusqu'à ce que la surface soit remplie de spores de microchampignons (environ 1 semaine à 2 semaines pour *Aspergillus sp./ Penicillium sp.* et 2 semaines à 3 semaines pour *Trichophyton sp.*).

9.3 Transférer dans chaque tube à culture ou boîte de culture 5 ml de sérum physiologique (7.4), ainsi qu'un agent mouillant (7.5) non toxique, qui peut être ajouté pour obtenir une concentration finale de 0,01 %. Racler doucement la surface du milieu de sporulation à l'aide d'une anse d'inoculation et introduire les spores dans le tube ou la boîte de culture pour en obtenir une suspension aqueuse. Agiter doucement le tube ou la boîte de culture pour disperser les spores dans le liquide. Procéder au lavage des spores et verser dans une fiole conique stérile de 125 ml contenant de 10 à 15 billes de verre stériles (6.9).

Répéter ce mode opératoire deux fois avec la même boîte de culture. Agiter la fiole conique pour obtenir une suspension de spores parfaitement homogène. Filtrer la suspension de spores de chaque culture fongique au moins deux fois à travers quatre minces couches de gaze médicale ou de laine de verre (6.10) pour éliminer les fragments de mycélium et les morceaux de gélose et pour séparer les spores collées.

Centrifuger, en conditions d'aseptie, la suspension de spores filtrée en appliquant une force centrifuge relative de 2 000g pendant 1 min; éliminer le surnageant. Remettre le résidu en suspension dans 20 ml de sérum physiologique (7.4) et centrifuger de nouveau. Procéder encore au moins trois fois au lavage des spores selon cette méthode et vérifier au microscope s'il reste des fragments de mycélium.

Diluer les suspensions de spore avec la solution tampon (7.6); ajuster la concentration aux valeurs de $1,0 \times 10^6$ spores par millilitre à $5,0 \times 10^6$ spores par millilitre, par détermination à l'aide d'une chambre de comptage ou d'un spectrophotomètre (6.14). D'autres méthodes appropriées de détermination de la concentration en spores pourraient également être appliquées.

9.4 Répéter ces opérations avec chaque microchampignon d'essai. Pour les essais portant sur les moisissures, lors de l'utilisation d'une suspension mixte de spores, mélanger à volume égal une suspension d'*Aspergillus sp.* et une suspension de *Penicillium sp.* contenant le même nombre de spores pour obtenir finalement la suspension mixte de spores prête à être inoculée. Utiliser la suspension de spores fraîche ou, conservée au réfrigérateur à une température comprise entre 2 °C et 8 °C, dans les 4 jours qui suivent sa préparation.

Ne pas mélanger une suspension de *Trichophyton mentagrophytes* à une autre suspension de microchampignons, quelle qu'elle soit.

10 Préparation des éprouvettes d'essai

10.1 Généralités

L'essai doit seulement porter sur les composants ou matériaux déclarés antifongiques. Si la chaussure entière est déclarée antifongique, ses principaux composants, notamment la tige, la doublure, la première de montage, la première de propreté, la semelle d'usure, doivent être soumis à essai séparément.

Si seul un matériau d'un composant est déclaré antifongique, il doit, si possible, être soumis à essai séparément. Dans le cas contraire, l'essai doit porter sur l'ensemble du composant.

La surface de chaque éprouvette d'essai doit être au moins égale à 80 % de celle des composants ou matériaux concernés. Si un seul matériau représente moins de 80 %, prendre les deux principaux matériaux entrant dans la composition du composant.