
**Cosmétiques — Microbiologie —
Essais sur lingettes et masques
imprégnés ou enduits**

*Cosmetics — Microbiology — Testing of impregnated or coated wipes
and masks*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21322:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5287e11-21ca-43ff-b0be-70fbd3a75d6/iso-21322-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5287e11-21ca-43ff-b0be-70fbd3a75d6/iso-21322-2020>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21322:2020

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5287e11-21ca-43ff-b0be-70fbd3a75d6/iso-21322-2020>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2020

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
Fax: +41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	v
Introduction.....	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
4.1 Informations générales.....	2
4.2 Sélection de l'échantillon pour essai.....	2
4.3 Sélection de la méthode.....	3
4.4 Extraction des micro-organismes de l'échantillon pour essai.....	3
4.5 Dénombrement des micro-organismes aérobies mésophiles.....	3
4.5.1 Généralités.....	3
4.5.2 Aperçu de la méthode par dénombrement sur plaques.....	3
4.5.3 Aperçu de la méthode par filtration sur membrane.....	3
4.6 Détection de micro-organismes spécifiés selon une méthode par enrichissement.....	4
5 Diluants, neutralisants et milieux de culture	4
5.1 Généralités.....	4
5.2 Diluants et neutralisants.....	4
5.3 Milieux de culture.....	4
5.3.1 Milieux utilisés pour le dénombrement et la détection.....	4
5.3.2 Milieux utilisés pour la préparation de spores de <i>Bacillus subtilis</i>	4
6 Appareillage et verrerie	4
7 Souches de micro-organismes	5
8 Manipulation des produits cosmétiques et des échantillons de laboratoire	5
9 Mode opératoire	5
9.1 Recommandations générales.....	5
9.2 Sélection et préparation de l'échantillon pour essai.....	5
9.2.1 Sélection de l'échantillon pour essai.....	5
9.2.2 Préparation de la suspension initiale.....	6
9.3 Extraction des micro-organismes.....	6
9.3.1 Généralités.....	6
9.3.2 Passage au stomacher.....	6
9.3.3 Agitation.....	6
9.4 Dénombrement des micro-organismes aérobies mésophiles.....	6
9.4.1 Généralités.....	6
9.4.2 Méthode par ensemencement en profondeur.....	7
9.4.3 Méthode par étalement en surface.....	7
9.4.4 Méthode par filtration sur membrane.....	7
9.4.5 Incubation.....	8
9.4.6 Dénombrement des colonies.....	8
9.5 Détection de micro-organismes spécifiés selon une méthode par enrichissement.....	8
9.5.1 Généralités.....	8
9.5.2 Recherche des micro-organismes spécifiés.....	8
10 Expression des résultats	9
10.1 Dénombrement des micro-organismes aérobies mésophiles.....	9
10.2 Détection de micro-organismes spécifiés.....	9
11 Essai d'applicabilité	9
12 Rapport d'essai	10

Annexe A (normative) Recommandations relatives aux méthodes d'essais microbiologiques de produits imprégnés ou enduits — Lingettes et masques	11
Annexe B (informative) Expression et interprétation des résultats	14
Annexe C (normative) Méthode de l'essai d'applicabilité	21
Bibliographie	26

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21322:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5287e11-21ca-43ff-b0be-70fdb3a75d6/iso-21322-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5287e11-21ca-43ff-b0be-70fdb3a75d6/iso-21322-2020>

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 le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 217, *Cosmétiques*.

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/fr/members.html.

Introduction

Pour des raisons techniques, les normes actuelles relatives à la microbiologie des cosmétiques peuvent ne pas être applicables aux produits cosmétiques imprégnés ou enduits, tels que les masques et les lingettes, dont la formulation n'est pas directement accessible.

Compte tenu de leur forme ou de l'état dans lequel ils sont mis sur le marché, il est nécessaire d'adapter lesdites normes pour évaluer la qualité microbiologique de ces produits.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 21322:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5287e11-21ca-43ff-b0be-70fbd3a75d6/iso-21322-2020)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5287e11-21ca-43ff-b0be-70fbd3a75d6/iso-21322-2020>

Cosmétiques — Microbiologie — Essais sur lingettes et masques imprégnés ou enduits

1 Domaine d'application

Le présent document fournit des recommandations pour le dénombrement et/ou la détection des micro-organismes présents dans les produits cosmétiques imprégnés ou enduits sur un substrat (lingettes et masques), pour lesquels l'échantillonnage et le contexte microbiologique du produit fabriqué posent des problèmes particuliers lorsqu'il s'agit de réaliser un échantillonnage et des essais microbiologiques.

Le principe du présent document peut également être appliqué à des produits similaires (par exemple, cushion, éponges imprégnées, etc.) ou des applicateurs (par exemple, pinceau, houppette, éponge, etc.), en modifiant le mode opératoire comme approprié.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte 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).

ISO 11930, *Cosmétiques — Microbiologie — Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique*

ISO 16212, *Cosmétiques — Microbiologie — Dénombrement des levures et des moisissures*

ISO 18416, *Cosmétiques — Microbiologie — Détection de *Candida albicans**

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

ISO 21149, *Cosmétiques — Microbiologie — Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles*

ISO 21150, *Cosmétiques — Microbiologie — Détection d'*Escherichia coli**

ISO 22717, *Cosmétiques — Microbiologie — Détection de *Pseudomonas aeruginosa**

ISO 22718, *Cosmétiques — Microbiologie — Détection de *Staphylococcus aureus**

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions 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 <http://www.electropedia.org/>

3.1

formulation cosmétique

préparation constituée de matières premières dont la composition est qualitativement et quantitativement définie

3.2

produit cosmétique

formulation cosmétique (3.1) ayant subi toutes les étapes de la production, y compris le conditionnement dans son emballage final, en vue de son expédition

3.3

produit imprégné

produit absorbé sur le support

3.4

produit enduit

produit adsorbé sur le support

3.5

échantillon pour essai

unité représentative de la totalité du *produit cosmétique* (3.2) destiné à être soumis à essai

4 Principe

4.1 Informations générales

Cette méthode permet de déterminer la population de micro-organismes viables par dénombrement des colonies sur un milieu gélosé non sélectif et par détection de la présence ou de l'absence de croissance des micro-organismes spécifiés après enrichissement.

La méthode comprend les étapes suivantes:

- sélection de l'échantillon pour essai;
- sélection d'une méthode appropriée; [ISO 21322:2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5287e11-21ca-43ff-b0be-70fbd3a75d6/iso-21322-2020)
- extraction des micro-organismes; [70fbd3a75d6/iso-21322-2020](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5287e11-21ca-43ff-b0be-70fbd3a75d6/iso-21322-2020)
- dénombrement de la population de micro-organismes viables selon une méthode par filtration ou par dénombrement sur plaques;
- recherche des micro-organismes spécifiés selon une méthode par enrichissement.

Les conditions expérimentales doivent être évaluées afin de garantir que la méthode utilisée n'affecte pas la viabilité des micro-organismes et la récupération de la biocharge de l'échantillon; il convient également d'intégrer la vérification de l'efficacité de la neutralisation (voir [Article 11](#)).

Pour garantir la qualité du produit et la sécurité des consommateurs, il convient de procéder à une appréciation du risque microbiologique appropriée afin de déterminer les types de produits cosmétiques auxquels le présent document est applicable (voir ISO 29621:2017, Tableau 2).

D'autres méthodes peuvent être utilisées sous réserve que leur équivalence ait été démontrée.

4.2 Sélection de l'échantillon pour essai

- Chaque fois que possible, il convient d'utiliser pour l'essai l'unité dans sa totalité, d'une masse minimale d'un gramme (1 g). Si, pour des raisons techniques, l'unité dans sa totalité ne peut pas être soumise à essai, une portion de l'unité de produit (PUP) définie est utilisée pour les essais. Une portion de l'unité de produit est une sous-unité, représentative sur le plan microbiologique, de l'échantillon pour essai, à laquelle il est fait référence dans tout le document.
- Si l'unité pèse moins d'un gramme (< 1 g), il convient d'échantillonner le nombre approprié d'unités pour obtenir la masse ou le volume nécessaire.
- La masse de l'échantillon pour essai doit être consignée, même si les résultats sont exprimés par unité.

L'échantillon pour essai doit être sélectionné conformément à [A.1](#).

4.3 Sélection de la méthode

Il convient que la méthode soit mise en œuvre conformément à un mode opératoire approprié fondé sur les caractéristiques spécifiques du produit (taille, volume, emballage individuel/multiple, niveau de biocharge, etc.) et qu'elle garantisse la représentativité de l'échantillon à évaluer.

La méthode doit être sélectionnée conformément à [A.1](#) et [A.2](#).

4.4 Extraction des micro-organismes de l'échantillon pour essai

Le degré d'adhérence des micro-organismes à la surface de l'échantillon pour essai dépend de la lingette ou du masque dans lequel la portion de liquide de la formulation a été imprégnée ou enduite. Des traitements préliminaires peuvent s'avérer nécessaires pour séparer les micro-organismes de l'échantillon pour essai.

Indépendamment du traitement, il convient de vérifier la méthode de récupération afin de démontrer qu'elle permet d'extraire les micro-organismes de l'échantillon pour essai sans nuire à leur viabilité (voir [Article 11](#)).

4.5 Dénombrement des micro-organismes aérobies mésophiles

4.5.1 Généralités

Le dénombrement des micro-organismes aérobies mésophiles inclut les bactéries, les levures et les moisissures.

En fonction de la nature de l'échantillon pour essai, du volume de diluant utilisé pour immerger l'échantillon pour essai et du niveau de biocharge attendu, deux types de méthode de dénombrement peuvent être utilisés:

- la méthode par dénombrement sur plaques;
- la méthode par filtration sur membrane.

4.5.2 Aperçu de la méthode par dénombrement sur plaques

Deux méthodes peuvent être utilisées pour le dénombrement sur plaques: la méthode par ensemencement en profondeur ou la méthode par étalement en surface.

Chaque méthode comprend les étapes suivantes:

- préparation des boîtes de gélose et du diluant en utilisant un milieu gélosé non sélectif pour ensemercer le diluant dans lequel l'échantillon a été immergé;
- incubation des plaques en vue du dénombrement et/ou de la détection;
- dénombrement du nombre d'unités formant colonies (UFC), sur la base du nombre de micro-organismes aérobies mésophiles récupérés par unité ou par gramme (g).

4.5.3 Aperçu de la méthode par filtration sur membrane

La filtration sur membrane comprend les étapes suivantes:

- transfert du diluant ou d'une quantité définie du diluant dans lequel l'échantillon pour essai a été immergé dans un appareil de filtration humidifié avec un faible volume de diluant approprié stérile;
- après filtration et rinçage, transfert de la membrane de filtration à la surface des boîtes contenant le milieu gélosé non sélectif;

- incubation en aérobiose des boîtes;
- dénombrement du nombre d'unités formant colonies (UFC) et calcul du nombre de micro-organismes aérobies mésophiles par gramme (g) ou par unité.

4.6 Détection de micro-organismes spécifiés selon une méthode par enrichissement

L'objectif de la méthode par enrichissement est d'incuber un échantillon pour essai dans un bouillon nutritif non sélectif pour augmenter le nombre de micro-organismes présents sur l'échantillon pour essai.

- La première étape d'une méthode par enrichissement consiste à incuber l'échantillon pour essai dans un bouillon nutritif non sélectif pour augmenter le nombre de micro-organismes présents sur l'échantillon pour essai.
- La seconde étape d'une méthode par enrichissement consiste à isoler les micro-organismes spécifiés susceptibles d'être présents sur un échantillon pour essai à l'aide de milieux sélectifs de gélose et à confirmer ensuite la présence de colonies caractéristiques par des essais d'identification. Voir les normes ISO 18416, ISO 21150, ISO 22717 et ISO 22718.

5 Diluants, neutralisants et milieux de culture

5.1 Généralités

Les diluants, neutralisants et milieux de culture appropriés pour le dénombrement et la détection de micro-organismes aérobies mésophiles sont décrits dans les normes ISO 11930, ISO 16212 et ISO 21149. D'autres diluants, neutralisants et milieux de culture peuvent être utilisés s'il a été démontré qu'ils sont applicables.

Se référer aux instructions générales figurant dans l'ISO 21148. Lorsqu'il est fait mention d'eau dans le présent document, utiliser de l'eau distillée ou de l'eau purifiée comme spécifié dans l'ISO 21148.

5.2 Diluants et neutralisants

Le diluant sert à disperser l'échantillon. Il est nécessaire qu'il contienne des neutralisants si l'échantillon devant être soumis à essai possède des propriétés antimicrobiennes ou contient un conservateur. L'efficacité de la neutralisation doit être démontrée avant le dénombrement (voir [Article 11](#)). Les diluants et les neutralisants doivent être conformes aux normes ISO 11930, ISO 16212, ISO 18416, ISO 21149, ISO 21150, ISO 22717 et ISO 22718.

5.3 Milieux de culture

5.3.1 Milieux utilisés pour le dénombrement et la détection

Les milieux de culture utilisés pour le dénombrement et/ou la détection doivent être conformes aux normes ISO 11930, ISO 16212, ISO 18416, ISO 21149, ISO 21150, ISO 22717 et ISO 22718.

5.3.2 Milieux utilisés pour la préparation de spores de *Bacillus subtilis*

Voir [C.1.3.1](#).

6 Appareillage et verrerie

Les équipements, l'appareillage et la verrerie de laboratoire sont décrits dans l'ISO 21148.

7 Souches de micro-organismes

Il convient de reconstituer la culture conformément aux modes opératoires indiqués par le fournisseur de la souche de référence. Il est possible de conserver les souches au laboratoire conformément à l'EN 12353 ou à une autre méthode appropriée.

Pour effectuer les essais de récupération des micro-organismes de l'échantillon pour essai, des spores de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (souche équivalente CIP 52.62 ou NCIMB 8054 ou NBRC 3134, ou toute autre souche équivalente issue d'une collection nationale) sont utilisées.

Afin de vérifier l'efficacité des neutralisants, deux souches représentatives de bactéries à Gram négatif et de bactéries à Gram positif et une levure sont utilisées:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (souche équivalente: CIP 4.83 ou NCIMB 9518 ou NBRC 13276 ou KCTC 1916, ou toute autre souche équivalente issue d'une collection nationale);
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (souche équivalente: CIP 82.118 ou NCIMB 8626 ou NBRC 13275 ou KCTC 2513, ou toute autre souche équivalente issue d'une collection nationale).

Escherichia coli ATCC 8739 (souche équivalente: CIP 53.126 ou NCIMB 8545 ou NBRC 3972 ou KCTC 2571, ou toute autre souche équivalente issue d'une collection nationale) peut être utilisée comme souche à Gram négatif alternative.

- *Candida albicans* ATCC 10231 (souche équivalente: IP 48.72 ou NCPF 3179 ou NBRC 1594 ou KCTC 17205, ou toute autre souche équivalente issue d'une collection nationale).

Il est possible de conserver les souches au laboratoire conformément à l'EN 12353.

8 Manipulation des produits cosmétiques et des échantillons de laboratoire

Si nécessaire, conserver les produits devant être soumis à essai à température ambiante. Ne pas incuber, réfrigérer ou congeler les produits et les échantillons avant ou après l'analyse. Il convient que les modes opératoires d'échantillonnage et d'essai soient conformes aux lignes directrices spécifiées dans l'ISO 21148 ainsi qu'au mode opératoire décrit à [l'Article 9](#).

9 Mode opératoire

9.1 Recommandations générales

Utiliser un équipement stérile, ainsi que des règles d'asepsie, pour la préparation de l'échantillon pour essai et du diluant.

Pour la préparation de la suspension initiale, le temps écoulé entre la fin de la préparation de l'échantillon pour essai et le moment où le diluant de la suspension initiale entre en contact avec le milieu de culture ne doit pas dépasser (30 ± 15) min, sauf mention particulière dans la documentation ou les protocoles établis.

Il convient que la méthode se conforme au mode opératoire mis au point au cours de l'essai d'applicabilité afin de s'assurer de la neutralisation des effets inhibiteurs potentiels (voir [Article 11](#)) et de garantir la récupération des micro-organismes.

9.2 Sélection et préparation de l'échantillon pour essai

9.2.1 Sélection de l'échantillon pour essai

L'échantillon pour essai doit peser au moins un gramme (1 g).

L'échantillon pour essai peut être constitué soit de l'unité dans sa totalité, soit de plusieurs unités si la masse d'une unité est inférieure à 1 g, soit d'une portion de l'unité de produit (PUP) (voir [A.1](#)).

Consigner la masse exacte, S , de l'échantillon pour essai et le nombre d'unités, n .

Si une portion de l'unité de produit (PUP) est utilisée pour les essais, consigner la valeur de la portion correspondant à l'échantillon pour essai (voir [4.2](#)).

9.2.2 Préparation de la suspension initiale

Placer l'échantillon pour essai (voir [9.2.1](#)) dans un récipient approprié contenant un volume de diluant connu, défini dans l'essai d'applicabilité (voir [Article 11](#)). Il convient que l'échantillon pour essai soit totalement immergé dans le diluant.

Consigner la valeur du volume, V , de diluant utilisé.

9.3 Extraction des micro-organismes

9.3.1 Généralités

Après immersion, les traitements suivants peuvent être utilisés pour extraire les micro-organismes de l'échantillon pour essai:

- passage au stomacher;
- agitation;
- passage à l'agitateur type Vortex (voir [A.3](#)).

NOTE Si nécessaire, consigner le volume de diluant après passage au stomacher ou agitation de l'échantillon pour essai.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d5287e11-21ca-43ff-b0be-70fbdf3a75d6/iso-21322-2020>

9.3.2 Passage au stomacher

Préparer la suspension initiale en utilisant un sac stérile pour stomacher qui est ensuite placé dans l'appareil.

Procéder conformément aux paramètres (durée et vitesse) appliqués dans l'essai d'applicabilité (voir [Article 11](#)).

Consigner la durée et la vitesse appliquées lors du passage au stomacher.

9.3.3 Agitation

Préparer la suspension initiale dans un récipient approprié fermé et mélanger conformément aux paramètres (durée et fréquence) appliqués dans l'essai d'applicabilité (voir [Article 11](#)).

Des billes en verre stériles peuvent être ajoutées pour optimiser le mélange du produit et améliorer la récupération des organismes.

Consigner la durée, la fréquence et la vitesse appliquées lors de l'agitation (le cas échéant); mentionner l'ajout éventuel de billes en verre.

9.4 Dénombrement des micro-organismes aérobies mésophiles

9.4.1 Généralités

Le dénombrement des micro-organismes aérobies mésophiles inclut les bactéries, les levures et les moisissures.