NORME INTERNATIONALE

ISO 21149

Deuxième édition
2017-06

Cosmétiques — Microbiologie — Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles

Cosmetics — Microbiology — Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21149:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15c612be-0868-45c7-85ed-627c047e9df2/iso-21149-2017

Numéro de référence
ISO 21149:2017(F)

© ISO 2017

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21149:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15c612be-0868-45c7-85ed-627c047e9df2/iso-21149-2017

DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2017, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

Avant-propos ..... **v**

1 Domaine d'application **1**

2 Références normatives **1**

3 Termes et définitions **1**

4 Principes **2**
4.1 Généralités 2
4.2 Dénombrement sur gélose en boîtes de Petri 2
4.3 Filtration sur membrane 2
4.4 Détection des bactéries par enrichissement 3

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 bactérienne (solution tryptone sel) 4
5.4 Milieux de culture 4

6 Matériel et verrerie **7**

7 Souches de micro-organismes **7**

8 Manipulation des produits cosmétiques et des échantillons de laboratoire **7**

9 Mode opératoire **7**
9.1 Recommandations générales 7
9.2 Préparation de la suspension initiale 8
9.2.1 Généralités 8
9.2.2 Produits miscibles dans l'eau 8
9.2.3 Produits non miscibles dans l'eau 8
9.3 Méthodes de dénombrement 8
9.3.1 Dilutions pour les méthodes de dénombrement 8
9.3.2 Méthodes de dénombrement sur gélose en boîtes de Petri 8
9.4 Enrichissement 9
9.4.1 Généralités 9
9.4.2 Incubation de l'échantillon 9

10 Dénombrement des colonies (méthodes de dénombrement sur gélose en boîtes de Petri et par filtration sur membrane) **10**

11 Détection de croissance (méthode par enrichissement) **10**

12 Expression des résultats **10**
12.1 Méthode de calcul pour le dénombrement sur gélose en boîtes de Petri 10
12.2 Interprétation 11
12.3 Exemples 12
12.4 Détection après enrichissement 14

13 Neutralisation des propriétés antimicrobiennes du produit **14**
13.1 Généralités 14
13.2 Préparation de l'inoculum 14
13.3 Applicabilité des méthodes de dénombrement 14
13.3.1 Principes 14
13.3.2 Essai d'applicabilité de la méthode par ensemencement en profondeur 14
13.3.3 Applicabilité de la méthode par étalement en surface 15
13.3.4 Applicabilité de la méthode par filtration sur membrane 15
13.4 Applicabilité de la méthode de détection par enrichissement 15
13.4.1 Mode opératoire 15
13.4.2 Interprétation des résultats 16
13.5 Interprétation des résultats d'essai d'applicabilité 16

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 21149:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15c612bc-0868-45c7-85ed-827c047e9df2/iso-21149-2017

14 Rapport d'essai **16**
Annexe A (informative) **Autres diluants neutralisants** **17**
Annexe B (informative) **Autres diluants** **19**
Annexe C (informative) **Autres milieux de culture** **20**
Annexe D (informative) **Neutralisants de l'activité antimicrobienne des conservateurs et des liquides de rinçage** **23**
Bibliographie **24**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 21149:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15c612be-0868-45c7-85ed-627c047e9df2/iso-21149-2017

 © ISO 2017 – 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 (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 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. 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.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

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.html.

ISO 21149:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15c612be-086b-45c7-85ed-627c047e9df2/iso-21149-2017

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

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 21149:2006), qui a fait l'objet d'une révision mineure comprenant les modifications suivantes:

— en le domaine d'application, «validée» a été remplacé par «indiquée comme adéquate»;

— en le domaine d'application, «voir ISO 29621» a été ajouté et le référence a été ajouté au Bibliographie;

— en 4.1, «validée» a été remplacé par «démontrée»;

— en 4.3, «validée» a été remplacé par «décrit»;

— en 5.1, «spécifications» a été remplacé par «instructions»;

— en 9.3.2.1, 9.3.2.2 et 9.3.2.3, « validé » a été remplacé par «décrit»;

— en 9.3.2.3, «le mode opératoire mis au point au cours de la validation» a été remplacé par «le mode opératoire d'essai d'applicabilité»;

— en 9.4.1, « validation » a été remplacé par «essai d'applicabilité»;

— en 12.2.1, «validées selon la méthode sélectionnée» a été remplacé par «démontrées comme étant applicables pour la méthode sélectionnée»;

— en 13.3 et 13.4, «validation» a été remplacé par «applicabilité»;

— en 13.3.2, 13.3.3 et 13.3.4, «validation» a été remplacé par «applicabilité»;

© ISO 2017 – Tous droits réservés

— en 13.3.2, 13.3.3 et 13.3.4, «si le dénombrement de validation est au moins égal à 50 % (0,3 log) du dénombrement du témoin» a été remplacé par «si le dénombrement est au moins égal à 50 % du témoin»;

— en 13.4.1, les occurrences de «essai de validation» ont été remplacées par «essai d'applicabilité»;

— en 13.4.2, les occurrences de «gélose de validation» ont été remplacées par «gélose d'essai d'applicabilité»;

— en 13.5, «résultats de validation» a été remplacé par «résultats d'essai d'applicabilité» et «géloses de validation» a été remplacé par «géloses d'essai d'applicabilité»;

— dans l'Article 14 f), «validation de la méthode» a été remplacé par «démonstration de l'applicabilité»;

— en A.1, B.1 et C.1, «validé» a été remplacé par «démontré comme étant applicable».

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 21149:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15c612be-0868-45c7-85ed-627c047e9df2/iso-21149-2017

 © ISO 2017 – Tous droits réservés

Cosmétiques — Microbiologie — Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles

1 Domaine d'application

Le présent document donne des lignes directrices générales pour le dénombrement et la détection des bactéries aérobies mésophiles présentes dans les cosmétiques

— par dénombrement des colonies en milieu gélosé après une incubation aérobie, ou

— en vérifiant l'absence de croissance bactérienne après enrichissement.

En raison de la grande variété de produits cosmétiques entrant dans ce domaine d'application, la présente méthode peut ne pas être, en tout point, applicable à certains produits (par exemple à certains produits non miscibles dans l'eau). Il est possible de remplacer les essais présentés ici par d'autres méthodes (automatisées, par exemple), sous réserve que leur équivalence ait été démontrée ou que la méthode ait été indiquée par ailleurs comme adéquate.

Au besoin, les micro-organismes dénombrés ou détectés peuvent être identifiés à l'aide d'essais d'identification appropriés, décrits dans les normes indiquées en Bibliographie.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Pour garantir la qualité du produit et la sécurité des consommateurs, il est conseillé d'effectuer une analyse de risque microbiologique appropriée, afin de déterminer les types de produits cosmétiques qui relèvent du présent document. Les produits considérés comme présentant un faible risque microbiologique (voir ISO 29621) comprennent ceux ayant une faible activité de l'eau, les produits hydro-alcooliques, les produits ayant des valeurs de pH extrêmes, etc.

ISO 21149:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15c612be-0868-45c7-85ed-627c047e9df2/iso-21149-2017

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 21148:2017, *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 (Legionella incluses), mycobactéricide, sporicide, fongicide et virucide (bactériophages inclus)*

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:

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse http://www.electropedia.org/

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse http://www.iso.org/obp

© ISO 2017 – Tous droits réservés

3.1
bactéries aérobies mésophiles
bactéries mésophiles se développant en aérobie dans les conditions spécifiées dans le présent document

Note 1 à l'article: D'autres types de micro-organismes (par exemple des levures et des moisissures) peuvent également être détectés dans les conditions décrites.

3.2
produit
portion d'un produit cosmétique identifié reçue au laboratoire pour essais

3.3
échantillon
portion du *produit* (3.2) (au moins 1 g ou 1 ml) utilisée dans l'essai pour préparer la *suspension initiale* (3.4)

3.4
suspension initiale
suspension (ou solution) d'un *échantillon* (3.3) dans un volume défini d'un liquide approprié (diluant, agent neutralisant, bouillon ou combinaison de ceux-ci)

3.5
dilution de l'échantillon
dilution de la *suspension initiale* (3.4)

4 Principes

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

4.1 Généralités

Cette méthode est fondée sur le dénombrement de colonies sur un milieu gélosé non sélectif ou sur la présence ou l'absence de croissance bactérienne après enrichissement. L'inhibition potentielle de la croissance microbienne par l'échantillon doit être neutralisée pour permettre la détection de micro-organismes viables[7]. Dans tous les cas et quelle que soit la méthode utilisée, la neutralisation des propriétés antimicrobiennes du produit doit être vérifiée et démontrée (voir Article 13)[8][9][10].

ISO 21149:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15c612be-0868-45c7-85ed-627c047e9df2/iso-21149-2017

4.2 Dénombrement sur gélose en boîtes de Petri

Le dénombrement sur gélose en boîtes de Petri comprend les étapes suivantes:

a) préparation des boîtes de géloses pour ensemencement en profondeur ou pour étalement en surface, au moyen d'un milieu de culture défini, et ensemencement des boîtes de gélose avec une quantité définie de la suspension initiale ou d'une dilution du produit;

b) incubation aérobie des géloses à 32,5 °C ± 2,5 °C pendant 72 h ± 6 h;

c) dénombrement du nombre d'unités formant colonies (UFC) et calcul du nombre de bactéries aérobies mésophiles par millilitre ou par gramme de produit.

4.3 Filtration sur membrane

La filtration sur membrane comprend les étapes suivantes:

a) transfert d'une quantité adaptée d'échantillon préparé tel que décrit dans l'Article 13 dans l'appareil de filtration humidifié à l'aide d'un faible volume de diluant approprié stérile, filtration immédiate et lavage selon un mode opératoire décrit (voir 13.3.4). Transfert de la membrane de filtration à la surface du milieu gélosé spécifié, comme indiqué dans l'ISO 21148;

b) incubation aérobie des membranes à 32,5 °C ± 2,5 °C pendant 72 h ± 6 h;

c) dénombrement du nombre d'unités formant colonies (UFC) et calcul du nombre de bactéries aérobies mésophiles par millilitre ou par gramme de produit.

© ISO 2017 – Tous droits réservés

4.4 Détection des bactéries par enrichissement

La détection des bactéries par enrichissement comprend les étapes suivantes:

a) incubation à 32,5 °C ± 2,5 °C, pendant au moins 20 h, d'une quantité définie de la suspension initiale dans un milieu liquide non sélectif contenant des agents neutralisants et/ou des agents de dispersion appropriés;

b) transfert d'une quantité définie de la suspension précédente sur un milieu gélosé solide non sélectif;

c) incubation aérobie à 32,5 °C ± 2,5 °C pendant 48 h à 72 h;

d) détection de la croissance et expression des résultats sous la forme de « présence/absence » de bactéries aérobies mésophiles par échantillon *S* du produit.

5 Diluants, agents neutralisants et milieux de culture

5.1 Généralités

Les instructions générales sont indiquées dans l'ISO 21148. Lorsque de l'eau est mentionnée dans ce document, utiliser de l'eau distillée ou purifiée tel qu'indiqué dans l'ISO 21148.

Les diluants, agents neutralisants et milieux de culture suivants conviennent pour le dénombrement et la détection de bactéries aérobies mésophiles. D'autres diluants, agents neutralisants et milieux de culture peuvent être utilisés s'il a été démontré qu'ils sont applicables pour cet emploi.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.2 Diluants neutralisants et diluants

5.2.1 Généralités

ISO 21149:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15c612be-0868-45c7-85ed-627c64f7b8d2/iso-21149-2017

Le diluant est utilisé pour disperser l'échantillon. Il peut contenir des agents neutralisants si l'échantillon à soumettre à essai possède des propriétés antimicrobiennes. L'efficacité de la neutralisation doit être démontrée avant la détermination de la concentration microbienne (voir Article 13). Des informations relatives à des agents neutralisants appropriés sont fournies dans l'Annexe D.

5.2.2 Diluants neutralisants

5.2.2.1 Milieu liquide aux hydrolysats de caséine-lécithine de soja-polysorbate 20 (bouillon SCDLP 20)

5.2.2.1.1 Composition

Hydrolysat pancréatique de caséine	20,0 g
Lécithine de soja	5,0 g
Polysorbate 20	40,0 ml
Eau	960,0 ml

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 l'hydrolysat pancréatique de caséine et la lécithine de soja. Chauffer pendant environ 30 min afin d'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.

© ISO 2017 – Tous droits réservés

5.2.2.2 Autres diluants neutralisants

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

5.2.3 Diluant

5.2.3.1 Liquide A

5.2.3.1.1 Composition

Hydrolysat pepsique de tissus animaux	1,0 g
Eau	1 000 ml

5.2.3.1.2 Préparation

Dissoudre 1 g d'hydrolysat dans l'eau pour obtenir 1 l. Chauffer en agitant 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).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.3 Diluant pour la suspension bactérienne (solution tryptone sel)

5.3.1 Composition

ISO 21149:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15c612be-0868-45c7-85ed-627c047e9df2/iso-21149-2017

Tryptone, hydrolysat pancréatique de caséine	1,0 g
Chlorure de sodium	8,5 g
Eau	1 000 ml

5.3.2 Préparation

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

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 en respectant les instructions du fabricant. Des milieux prêts à l'emploi peuvent être utilisés si leur composition et/ou leur rendement de croissance sont comparables à ceux des formulations indiquées ci-après.

© ISO 2017 – Tous droits réservés

5.4.2 Milieux de culture pour le dénombrement

5.4.2.1 Milieu gélosé aux hydrolysats de caséine et de soja (SCDA) ou gélose tryptocaséine de soja (TSA)

5.4.2.1.1 Composition

Hydrolysat pancréatique de caséine	15,0 g
Hydrolysat papaïque de soja	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Gélose	15,0 g
Eau	1 000 ml

5.4.2.1.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en mélangeant tout en chauffant. Répartir le milieu dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après stérilisation et refroidissement, le pH doit être de 7,3 ± 0,2, le mesurage étant effectué à la température ambiante.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.4.2.2 Autres milieux pour le dénombrement

D'autres milieux peuvent être utilisés s'ils sont appropriés (voir Annexe C).

ISO 21149:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15c612be-0868-45c7-85ed-627c047e9df2/iso-21149-2017

5.4.3 Milieux de culture pour la détection

5.4.3.1 Généralités

Un bouillon d'enrichissement et un milieu gélosé doivent être utilisés pour la détection de bactéries, lorsque cette méthode est sélectionnée.

Le bouillon d'enrichissement sert à disperser l'échantillon et à accroître la population microbienne initiale. Il peut contenir des agents neutralisants si l'échantillon à soumettre à essai possède des propriétés antimicrobiennes.

5.4.3.2 Bouillon d'enrichissement: bouillon Eugon LT 100

5.4.3.2.1 Généralités

Ce milieu contient:

— des ingrédients qui neutralisent les substances inhibitrices présentes dans l'échantillon: lécithine et polysorbate 80, et

— un agent dispersant: l'octoxynol 9.

5.4.3.2.2 Composition

Hydrolysat pancréatique de caséine	15,0 g
Hydrolysat papaïque de soja	5,0 g
L-cystine	0,7 g

© ISO 2017 – Tous droits réservés

Chlorure de sodium	4,0 g
Sulfite de sodium	0,2 g
Glucose	5,5 g
Lécithine d'œuf	1,0 g
Polysorbate 80	5,0 g
Octoxynol 9	1,0 g
Eau	1 000 ml

5.4.3.2.3 Préparation

Dissoudre successivement dans l'eau bouillante le polysorbate 80, l'octoxynol 9 et la lécithine d'œuf jusqu'à dissolution complète. Dissoudre les autres composants en mélangeant tout en chauffant. 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 7,0 ± 0,2, le mesurage étant effectué à température ambiante.

5.4.3.3 Milieux gélosés pour la détection par enrichissement

5.4.3.3.1 Milieu gélosé Eugon LT 100

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.4.3.3.1.1 Composition

ISO 21149:2017
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/15c612be-0868-45c7-85ed-627c047e9df2/iso-21149-2017

Hydrolysat pancréatique de caséine	15,0 g
Hydrolysat papaïque de soja	5,0 g
L-cystine	0,7 g
Chlorure de sodium	4,0 g
Sulfite de sodium	0,2 g
Glucose	5,5 g
Lécithine d'œuf	1,0 g
Polysorbate 80	5,0 g
Octoxynol 9	1,0 g
Gélose	15,0 g
Eau	1 000 ml

5.4.3.3.1.2 Préparation

Dissoudre successivement dans l'eau bouillante le polysorbate 80, l'octoxynol 9 et la lécithine d'œuf jusqu'à dissolution complète. Dissoudre les autres composants en mélangeant tout en chauffant. Mélanger doucement pour éviter toute formation de mousse. Répartir le milieu dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après stérilisation et refroidissement, le pH doit être de 7,0 ± 0,2, le mesurage étant effectué à la température ambiante.

 © ISO 2017 – Tous droits réservés