ISO 11930 : s'assurer de sa bonne application

La norme NF EN ISO 11930 pour la réalisation des challenge tests est parue en juin 2012. Comment être sûr que le référentiel est bien appliqué ? Quelles sont les exigences de ce référentiel ? Le secteur cosmétique a vécu, ces dernières années, de profondes mutations, tant au niveau réglementaire qu'au niveau des exigences qualité. L'apparition et la révision des référentiels microbiologiques en est un exemple significatif.

De l'importance d'un challenge test réalisé dans de bonnes conditions !

Ce secteur industriel a normalisé depuis quelques années ses propres référentiels microbiologiques pour le contrôle libératoire des produits finis et pour l'évaluation de l'efficacité des conservateurs. Ces référentiels, utilisés par l'ANSM lors des contrôles, décrivent précisément comment réaliser les analyses sur ces produits. Ces normes sont toutes des normes internationales *(cf.* Tableau 1 p.28). La dernière éditée est la norme pour la réalisation des challenge tests (NF EN ISO 11930), en application depuis juin 2012.

Les référentiels microbiologiques sont nombreux et, s'il est facile de les identifier, il reste néanmoins complexe de s'assurer de leur strict respect. En France, le Cofrac, Comité Français d'Accréditation, est le seul organisme habilité à le faire. L'accréditation Cofrac, démarche volontaire de la part des laboratoires d'analyses, permet de confirmer par tierce partie indépendante leur engagement quant au respect de ces référentiels. La portée d'accréditation, strictement limitée aux analyses qui ont été auditées par un expert technique, permet seule d'informer clairement les industriels sur les compétences techniques du laboratoire.

Si la norme NF EN ISO 11930 est aujourd'hui la plus adaptée aux produits cosmétiques pour le contrôle de l'efficacité des conservateurs, elle doit être appliquée selon des conditions très précises et il est souvent difficile pour un non « microbiologiste » de pouvoir juger de la conformité de son application. Il en va de même pour les autres référentiels de challenge tests : Pharmacopée Européenne ou Pharmacopée Américaine*. Un challenge test réalisé dans de mauvaises conditions peut être lourd de conséquences en cas de contrôle par les autorités, en cas de litige avec un client ou, surtout, au regard des risques de contamination de votre produit chez le consommateur. Quel que soit son prix, un challenge test réalisé dans de mauvaises conditions ne sert à rien !

Quelques points sensibles à vérifier pour le respect des référentiels

- La validation du bouillon neutralisant (nature du diluant et dilution de travail) est-elle systématiquement effectuée ?
- Ces conditions de validation et les résultats obtenus sont-ils décrits dans votre rapport ?
- Les dénombrements à chaque échéance sont-ils réalisés en double ?
- La préparation des inocula est-elle toujours réalisée extemporanément ?
- L'ensemencement des souches est-il fait de manière individuelle ? (Une souche à la fois par unité challengée)
- Plus particulièrement pour la norme NF EN ISO 11930 : les dénombrements sont-ils bien réalisés en masse ? La préparation des spores *d'Aspergillus brasiliensis* est-elle filtrée ?

À ces questions, si au moins une réponse est non, cela signifie que les référentiels ne sont pas respectés et qu'il y a un risque sérieux de mal évaluer la qualité de la conservation du produit.

Mieux comprendre les points sensibles

• À quoi sert la validation du bouillon neutralisant ?

La validation du bouillon neutralisant selon la norme NF EN ISO 11930 ou validation de méthode selon les référentiels USP et Ph. Eur., est une étape de l'analyse qui valide la fiabilité du résultat obtenu lors de l'essai proprement dit. Cette validation est obligatoire pour les trois référentiels (elle l'était également pour la norme NF T75-611). Elle consiste à vérifier que, dans les conditions de dilution (choix du diluant et du niveau de dilution), les germes potentiellement présents sont cultivables. Autrement dit, s'ils sont présents lors du dénombrement, ils ne doivent pas être stressés

Ensuring the correct application of ISO 11930

The NF EN ISO 11930 standard concerning challenge tests was introduced in June 2012. How to be sure that the standard is being correctly applied ? What are the requirements of this standard? The cosmetics sector has undergone a number of significant changes over recent years, in terms of both regulation and quality requirements. The introduction and revision of microbiological standards is a prime example of this.

The importance of a challenge test performed under the right conditions!

This industrial sector has introduced its own microbiological standards for testing finished products for release and assessing the effectiveness of preservatives, over the past few years. These standards, used by the ANSM at the testing stage, accurately describe the process for analysing such products, and are all international standards (see Table 1 p.28). *The latest to be released is the standards governing the performance of challenge tests (NF EN ISO 11930), which was introduced in June 2012.*

There are many microbiological standards in place, and whilst they may be easily identified, it is nevertheless difficult to ensure that they are being strictly complied with. In the case of France, the Cofrac ('French Accreditation Committee') is the only body with the authority to do so. Seeking Cofrac accreditation is a voluntary approach on the part of analysis laboratories seeking independent third-party confirmation that they are indeed complying with the appropriate standards. The awarding of the accreditation alone, which is strictly limited to analyses that have been audited by a technical expert, provides manufacturers with a clear indication of the laboratory's technical expertise.

Whilst the NF EN ISO 11930 standard is now the best suited to cosmetics products with regard to monitoring the effectiveness of preservatives, it must be applied in accordance with a series of very specific conditions and it is often difficult for a 'nonmicrobiologist' to judge just how strictly it is being applied. The same is true of the other standards relating to challenge tests, these being the European Pharmacopoeia and the American Pharmacopoeia. A challenge test performed under poor conditions can have significant consequences, in the event that it is checked by the authorities, in the event of a dispute with a client or, more importantly, in terms of the risk of your product being contaminated once it reaches the consumer. A challenge test performed under poor conditions, whatever it might cost, is of no use to anyone!*

A few key check-points for complying with standards

- *Is the neutralising medium (nature of the diluent and working dilution) systematically verified?*
- *Are these validation conditions and the results achieved outlined in your report?*
- *Are duplicate counts performed at each interval?*
- *Are inocula always prepared extemporaneously?*
- *Are stems individually seeded? (One stem at a time per unit tested)*
- *More specifically for the NF EN ISO 11930 standard: are counts correctly performed en masse ?* Is Aspergillus brasiliensis *spore preparation filtered?*

If the answer to at least one of the

TABLEAU 1 : RÉCAPITULATIF DES NORMES ISO EN MICROBIOLOGIE.
TABLE 1: SUMMARY OF MICROBIOLOGICAL ISO STANDARDS.

Référence de la norme et date de parution *Name of the standard and date of introduction*	Intitulé de la norme *Description of the standard*	Intérêt de la norme *Benefits of the standard*
NF EN ISO 29621 Juin / *June* 2011	Lignes directrices pour l'appréciation du risque et l'identification des produits à faible risque. *Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products.*	Norme donnant des outils afin d'évaluer le risque microbiologique d'un produit cosmétique. Cette norme permet ainsi de pouvoir déterminer si les contrôles de routine ou le challenge test sont réellement nécessaires. / *Standard providing the tools required to assess the microbiological risk of a cosmetic product. This standard therefore helps establish whether routine checks or the challenge test are actually necessary.*
NF EN ISO 18415 Août / *August* 2011	Détection des micro-organismes spécifiés (*Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans*) et des micro-organismes non spécifiés. *Detection of specified* (Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa *and* Candida albicans) *and non-specified microorganisms.*	Norme « 2 en 1 » permettant la vérification de l'absence des germes pathogènes et un niveau de contamination acceptable pour les non pathogènes. *A '2-in-1' standard enabling the absence of pathogens to be verified and an acceptable level of contamination for non-pathogens.*
NF EN ISO 21149 Septembre / *September* 2009	Dénombrement et détection des bactéries aérobies mésophiles. *Counting and detection of mesophilic aerobic bacteria.*	Norme permettant d'évaluer le niveau de contamination en bactéries (mais pas la présence de pathogènes). / *Standard enabling the level of bacterial contamination (but not the presence of pathogens) to be assessed.*
NF EN ISO 16212 Août / *August* 2011	Dénombrement des levures et des moisissures. *Enumeration of yeast and mould.*	Norme permettant d'évaluer le niveau de contamination en levures et moisissures (mais pas la présence de pathogènes). / *Standard enabling the level of yeast and mould contamination (but not the presence of pathogens) to be assessed.*
NF EN ISO 22718 Septembre / *September* 2009.	Détection de *Staphylococcus aureus.* *Detection of* Staphylococcus aureus	Norme spécifique permettant la vérification de l'absence dans une prise d'essai définie de *Staphylococcus aureus.* / *Specific standard enabling the absence of* Staphylococcus aureus *in a given test sample to be verified.*
NF EN ISO 21150 Septembre / *September* 2009.	Détection d'*Escherichia coli* *Detection of* Escherichia coli.	Norme spécifique permettant la vérification de l'absence dans une prise d'essai définie d'*Escherichia coli.* / *Specific standard enabling the absence of* Escherichia coli *in a given test sample to be verified.*
NF EN ISO 18416 Septembre / *September* 2009.	Détection de *Candida albicans* *Detection of* Candida albicans.	Norme spécifique permettant la vérification de l'absence dans une prise d'essai définie de *Candida albicans.* / *Specific standard enabling the absence of* Candida albicans *in a given test sample to be verified.*
NF EN ISO 22717 Septembre / *September* 2009	Détection de *Pseudomonas aeruginosa* *Detection of* Pseudomonas aeruginosa.	Norme spécifique permettant la vérification de l'absence dans une prise d'essai définie de *Pseudomonas aeruginosa.* / *Specific standard enabling the absence of* Pseudomonas aeruginosa *in a given test sample to be verified.*
NF EN ISO 11930 Juin / *June* 2012	Évaluation de la protection antimicrobienne d'un produit cosmétique *Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product.*	Norme décrivant le protocole de réalisation des challenge tests. *Standard outlining the protocol for performing challenge tests.*

above questions is 'no', then the standards are not being observed, and there is a serious risk of the product preservation quality being incorrectly assessed.

Better understanding the key points

• Why should the neutralising medium be validated?

Validating the neutralising medium in accordance with the NF EN ISO 11930 standard, and validating the method in accordance with the USP and Eur. Ph. standards is a stage in the analysis that verifies the reliability of the results achieved during the test itself. This validation is a compulsory part of all three frames of reference (as indeed it was for the NF T75-611 standard) and involves verifying that any bacteria that might be present can be cultivated under the dilution conditions at play (choice of diluent and of level of dilution). In other words, if they are present at the time the count is performed, they should not be stressed or inhibited and should be able to develop normally.

If this stage is not completed, there is a significant risk of the challenge test being declared compliant with a series of criteria, when in reality it is not.

Following a study we carried out at our laboratory on several hundred products, the standard dilution conditions of the NF EN ISO 11930 standard (Eugon LT100 diluted 1:10) were found not to have been verified for around 25% of products, in which case the laboratory must either change the neutralising medium or increase the level of dilution.

• Are these validation conditions outlined in your report?

This is a requirement of the NF EN ISO 11930 standard. It should also be borne in mind that this notion of validation is compulsory for both challenge tests and routine checks. The validation results obtained for the challenge test can therefore be reused to perform counts as part of a routine check.

• Are duplicate counts performed at each interval?

This is a compulsory requirement of the NF EN ISO 11930 standard and both the European and American Pharmacopoeia methods. Indeed, performing these counts in

** Pour rappel, le détail des référentiels pour la réalisation des challenge test (Référentiels NF EN ISO 11930, Pharmacopée européenne et Pharmacopée américaine USP) avait été publié pages 51-52 du numéro 16 d'Expression Cosmétique.*

**As a reminder, the standards reference for the performance of challenge tests (NF EN ISO 11930, European Pharmacopoeia and USP American Pharmacopoeia standards) had been detailed on pages 51-52 of issue 16 of Expression Cosmétique.*

ou inhibés, et doivent pouvoir se développer normalement. Si cette étape n'est pas réalisée, il y a un risque important de déclarer un challenge test conforme à un profil attendu alors qu'il ne l'est pas. Suite à une étude que nous avons réalisée dans notre laboratoire sur plusieurs centaines de produits, les conditions de dilution standard de la norme NF EN ISO 11930 (Eugon LT100 dilution 1/10e) ne sont pas validées pour environ 25 % des produits, et le laboratoire doit alors mettre en œuvre soit un changement du bouillon neutralisant, soit un niveau de dilution supérieur.

• Ces conditions de validation sont-elles décrites dans votre rapport ?

La norme NF EN ISO 11930 l'impose. Il ne faut pas oublier que si cette notion de validation est obligatoire pour les challenge tests, elle l'est également pour les contrôles de routine. Les résultats de validation obtenus pour le challenge test pourront donc être réutilisés pour la réalisation des dénombrements en contrôle de routine.

• Les dénombrements à chaque échéance sont-ils réalisés en double ?

Cette exigence est obligatoire dans la norme NF EN ISO 11930 et les méthodes des Pharmacopées européenne et américaine. Le fait de réaliser ces dénombrements en double permet d'apporter une sécurité supplémentaire au résultat rendu.

• La préparation des inocula est-elle réalisée extemporanément ?

La norme NF EN ISO 11930, impose un délai maximum de 2h entre le temps de préparation des inocula et leur utilisation. Dans le cadre du groupe de travail microbiologie de la commission de normalisation Afnor, lorsqu'il travaillait sur la norme NFT 75-611, il a été démontré que l'utilisation d'un inoculum au-delà de quelques heures après sa préparation pouvait modifier sa résistance aux conservateurs d'un facteur 10, avec le risque de classer alors indûment un produit comme non conforme.

• L'ensemencement des souches est-il fait de manière individuelle ?

Aucun référentiel international, américain ou européen, n'autorise le mélange des souches. Chaque souche doit être individuellement ensemencée dans une quantité d'échantillon définie. Mélanger les souches, c'est certes cinq fois moins de travail, mais c'est malheureusement donner la possibilité aux souches d'interagir entre elles et donc de surestimer l'efficacité des conservateurs. De plus, il est difficile de différencier macroscopiquement certaines souches les unes des autres, surtout par la technique d'ensemencement en masse telle qu'exigée par la norme NF EN ISO 11930.

• Si vous suivez le référentiel NF EN ISO 11930, la préparation des spores d'*Aspergillus brasiliensis* est-elle filtrée ?

Cette exigence permet de s'assurer que l'inoculum est constitué exclusivement de spores d'*Aspergillus brasiliensis* et non pas de fragments mycéliens pouvant interférer de manière significative dans le résultat des dénombrements. La filtration doit être réalisée sur un filtre frité en verre de porosité de 40 à 100 micromètres.

Dans le cadre des BPF, les industriels doivent considérer leurs prestataires d'analyses comme des fournisseurs critiques et, à ce titre, s'assurer de leur strict respect des référentiels. N'oublions pas que, sur la base de ces résultats analytiques, des décisions importantes sont prises sur la formulation du produit, son packaging, sa PAO... Ici comme ailleurs, le trop bon marché finit toujours par coûter cher.... ■

duplicate helps improve the security of the results produced.

• Are inocula prepared extemporaneously?

The NF EN ISO 11930 standard requires inocula to be used within a maximum of 2 hours after their preparation. The microbiological working group set up by the AFNOR standardisation committee, when it was working on the NFT 75-611 standard, found that using an inoculum more than a few hours after it was prepared could alter its resistance to preservatives by a factor of 10, with the risk of a product then being wrongly identified as being non-compliant.

• Are stems individually seeded ?

No international standard, whether American or European, permits the mixing of stems. Each stem must be individually seeded with a specified amount of the sample. Mixing stems may well result in a five-fold decrease in workload, but unfortunately, it also gives the stems the opportunity to interact with one another, in which case it is possible to overestimate the effectiveness of preservatives. Furthermore, it is difficult to macroscopically distinguish certain stems from others, particularly using the mass seeding technique required by the NF EN ISO 11930 standard.

• If you are complying with the NF EN ISO 11930 framework, is Aspergillus brasiliensis spore preparation filtered ?

This requirement helps ensure that the inoculum comprises exclusively Aspergillus brasiliensis *spores, and not mycelial fragments that might significantly interfere with the enumeration results. The filtration should be performed by a glass-sintered filter with a porosity of 40-100 micrometres.*

In the interests of GMPs, manufacturers should consider their analysis service providers to be critical suppliers, and consequently ensure that they are strictly adhering to the appropriate standards. Let us not forget, after all, that major decisions regarding the formulation of the product — its packaging, its PAO, etc. will be made based on the results of such analyses. As is the case in other sectors, if you pay cheap, you inevitably end up paying twice! ■

Michel Butin
ALBHADES PROVENCE
Expert toxicologue et Président/ Expert Toxicologist and President
info@albhades.com
www.albhades.com