NORME INTERNATIONALE

ISO 14730

Deuxième édition
2014-10-01

Optique ophtalmique — Produits d'entretien des lentilles de contact — Essais de l'efficacité de conservation antimicrobienne et lignes directrices pour la détermination de la durée d'utilisation après première ouverture

Ophthalmic optics — Contact lens care products — Antimicrobial preservative efficacy testing and guidance on determining discard date

Numéro de référence
ISO 14730:2014(F)

© ISO 2014



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2014

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
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**
Introduction ..... **v**
1 Domaine d'application **1**
2 Références normatives **1**
3 Termes et définitions **1**
4 Principe **1**
5 Méthodes d'essai **2**
5.1 Matériaux et réactifs 2
5.2 Échantillons pour essai et maintenance de la culture 3
5.3 Préparation de l'ensemencement microbien (inoculum) 3
5.4 Méthode d'essai d'ensemencement de l'inoculum 4
5.5 Contrôles 5
5.6 Critères de performance 6
5.7 Rapport d'essai 6
Annexe A (informative) **Exemple de méthode II de filtration sur membrane** **7**
Annexe B (informative) **Méthode I pour la durée d'utilisation après première ouverture** **9**
Annexe C (informative) **Méthode pour la durée d'utilisation après première ouverture** **13**
Annexe D (informative) **Méthode III pour la durée d'utilisation après première ouverture** **17**
Annexe E (informative) **Méthode IV pour la durée d'utilisation après première ouverture** **21**
Annexe F (informative) **Organismes d'essai provenant d'autres collections de cultures** **25**
Bibliographie **26**

© ISO 2014 – 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 procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/CEI, 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/CEI, 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.

Pour une explication de 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'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: Avant-propos — Informations supplémentaires.

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 172, *Optique et photonique*, sous-comité SC 7, *Optique et instruments ophtalmiques* en collaboration avec le Comité technique CEN/TC 170, *Optique ophtalmique*.

Cette seconde édition annule et remplace la première édition (ISO 14730:2000), dont elle constitue une révision mineure.

 © ISO 2014 – Tous droits réservés

Introduction

Les produits d'entretien des lentilles de contact (PELC) sont utilisés avec des lentilles de contact. Ces produits permettent de rincer, de nettoyer, de désinfecter, de stocker, d'humidifier, de conditionner les lentilles de contact et d'en améliorer le confort. Certains produits ont une seule fonction, d'autres sont multi-fonctions.

En règle générale, les produits fabriqués en vue d'une utilisation avec des lentilles souples peuvent être utilisés avec des lentilles rigides perméables aux gaz (RPG) ou avec des lentilles polyméthylméthacrylates (PMMA), mais les produits utilisés spécifiquement avec les lentilles RPG ou PMMA ne conviennent généralement pas aux lentilles souples.

La plupart des PELC sont fabriqués sous forme de solutions et sont en général conditionnés et vendus en emballages multi-doses. Des produits secs sont vendus sous forme de comprimés ou de granulés et doivent être dissous dans un solvant approprié immédiatement avant utilisation.

Si la solution de produit d'entretien des lentilles de contact n'a pas en elle-même une activité antimicrobienne, il est possible d'ajouter un conservateur antimicrobien au produit pour inhiber la prolifération de micro-organismes pouvant être introduits à l'occasion de versements répétés pendant l'utilisation et le stockage qui suit. Tous les agents antimicrobiens présentent un risque de toxicité pour l'utilisateur. En vue d'une protection maximale de l'utilisateur, il convient que la concentration du conservateur soit telle qu'elle offre une activité de conservation adéquate pour une toxicité minimale.

Il existe des différences entre les préparations ophtalmiques et les produits d'entretien des lentilles de contact. Certaines de ces différences sont significatives par rapport à l'essai de l'efficacité de préservation. En règle générale, les préparations ophtalmiques sont conditionnées dans des emballages de faible volume, et sont utilisées pour de courtes périodes sur des yeux présentant des troubles fonctionnels. Les produits d'entretien des lentilles de contact sont distribués en doses plus grandes et sont utilisés sur des yeux sains avec des lentilles de contact sur une longue période. Les risques potentiels liés à l'entretien des lentilles de contact sont l'interaction solution/lentilles qui provoque une irritation oculaire et les risques de contamination de la solution par l'utilisation répétée (quotidienne) du produit.

Par conséquent, lorsque les produits d'entretien des lentilles de contact sont formulés, le risque d'effet indésirable sur le patient lié aux lentilles et/ou à l'interaction avec la solution doit être mis en balance avec les bénéfices en termes de sécurité dus à l'activité antimicrobienne de la solution.

La présente Norme internationale spécifie la méthode d'essai et les critères de performance applicables à l'efficacité de la conservation. Elle a été adaptée à partir des Pharmacopées qui donnent une limite de temps de 28 jours dans leur méthode d'essai. Les annexes informatives donnent quatre exemples de méthodes d'essai de l'efficacité de conservation développées par des fabricants de produits d'entretien des lentilles de contact afin de présenter l'efficacité de conservation des produits dont les dates d'utilisation après première ouverture sont supérieures à 28 jours.

© ISO 2014 – Tous droits réservés

Optique ophtalmique — Produits d'entretien des lentilles de contact — Essais de l'efficacité de conservation antimicrobienne et lignes directrices pour la détermination de la durée d'utilisation après première ouverture

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie la méthode suivie pour évaluer l'activité de conservation antimicrobienne de tous les produits d'entretien des lentilles de contact conservés en emballages multi-doses et fournit des lignes directrices sur les méthodes à utiliser pour la détermination de la durée d'utilisation après première ouverture, en annexes informatives.

Le présent essai est applicable pour une durée d'utilisation après première ouverture allant jusqu'à 28 jours.

L'essai ne s'applique pas aux produits stériles emballés en doses unitaires destinées à un usage unique ni aux emballages multi-doses constituant des barrières physiques à la contamination microbienne (exemple: emballages aérosol).

NOTE 1 Les principes de l'essai peuvent être utilisés pour étendre la durée d'utilisation au-delà de 28 jours. Voir Annexes B, C, D et E.

NOTE 2 L'usage d'inoculums multiples ou mixtes et/ou l'inclusion de lentilles de contact ou d'autres charges organiques peut modifier l'activité antimicrobienne apparente d'un produit particulier. L'évaluation de ces variables, associée à l'essai sur une large gamme de micro-organismes et l'essai d'échantillons provenant de doses utilisées partiellement peuvent être intéressants pour développer un produit d'entretien des lentilles de contact, mais ne font pas partie du domaine d'application de la présente Norme internationale.

2 Références normatives

Les documents ci-après, en totalité ou en partie, sont référencés de manière normative dans le présent document et sont indispensables pour son application. 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 14534, *Optique ophtalmique — Lentilles de contact et produits d'entretien des lentilles de contact — Exigences fondamentales*

ISO 18369-1, *Optique ophtalmique — Lentilles de contact — Partie 1: Vocabulaire, système de classification et recommandations pour l'étiquetage des spécifications*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 18369-1 s'appliquent.

4 Principe

4.1 L'essai consiste à contaminer la préparation avec un inoculum microbien défini et convenable au début de l'essai, puis à nouveau au 14ème jour. Les préparations inoculées sont conservées à une température donnée. Des échantillons des préparations inoculées sont prélevés à intervalles donnés,

© ISO 2014 – Tous droits réservés

et sont mis en culture pour déterminer les organismes viables. L'aptitude du produit à empêcher toute nouvelle prolifération est confirmée par le dénombrement des organismes viables sur des durées prolongées.

4.2 La dimension de l'ensemencement microbien sélectionné dans le présent essai n'est pas censée être représentative de l'ensemencement probable en pratique, mais permet plutôt d'obtenir des informations chiffrées à partir desquelles l'estimation du taux et de l'importance de la perte de viabilité peut être déterminée.

4.3 Les propriétés de conservation antimicrobienne du produit sont adéquates si, dans les conditions de l'essai, il existe une réduction significative des bactéries et aucune augmentation des levures et des moisissures dans la préparation inoculée après le temps indiqué et à la température prescrite. Les critères de performance figurent en 5.6.

4.4 Il faut prendre des mesures appropriées pour inactiver ou éliminer les agents antimicrobiens pendant la culture et le dénombrement des micro-organismes survivants. L'efficacité de ces mesures doit être validée.

5 Méthodes d'essai

5.1 Matériaux et réactifs

5.1.1 Organismes d'essai

Les souches énumérées au Tableau 1 doivent être utilisées.

NOTE Les organismes d'essai provenant d'autres collections de cultures pouvant être utilisés figurent à l'Annexe F.

Tableau 1 — Organismes d'essai

Pseudomonas aeruginosa	ATCC 9027
Staphylococcus aureus	ATCC 6538
Escherichia coli	ATCC 8739
Candida albicans	ATCC 10231
Aspergillus brasiliensis	ATCC 16404

5.1.2 Milieux de culture et réactifs

5.1.2.1 **Gélose de tryptone soja (TSA)**.

5.1.2.2 **Gélose Sabouraud (SDA)**.

5.1.2.3 **Solution saline tamponnée au phosphate Dulbecco**, sans chlorure de calcium ni chlorure de magnésium (DPBS).

Mélanger 200 mg/l de KCl, 200 mg/l de KH_2PO_4, 8 000 mg/l de NaCl et 2 160 mg/l de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ou autre diluant approprié.

5.1.2.4 **Solution saline tamponnée au phosphate Dulbecco**, plus 0,05 % (en masse volumique) de polysorbate 80 (DPBST) ou autre diluant approprié.

© ISO 2014 – Tous droits réservés

5.1.2.5 Milieux/agents neutralisants validés, comme spécifié, par exemple bouillon neutralisant Dey-Engley (DEB) et bouillon Letheen.

5.1.3 Appareillage d'essai

L'équipement normal de laboratoire suivant est nécessaire*:* pipettes, compresses, tubes, boîtes de Pétri (90 mm à 100 mm × 20 mm) stériles, etc. et appareils appropriés pour la détermination spectrophotométrique de la densité des cellules, pour le dénombrement des colonies et pour la centrifugation.

5.2 Échantillons pour essai et maintenance de la culture

Le produit à soumettre à l'essai doit être représentatif du produit à commercialiser. Il convient de prélever les parties aliquotes directement dans l'emballage de produit final immédiatement avant l'essai.

Trois lots de produits doivent être soumis à l'essai. Chaque lot de produit doit être soumis à l'essai avec des contaminants distincts pour chaque organisme à inoculer.

Maintenir les cultures d'essai selon les recommandations du centre de collection dont elles sont issues.

Il convient de ne pas repiquer les cultures plus de 5 fois à partir du stock provenant de la collection (ATCC, NCIB, NCTC, NCPF ou autres, voir Annexe F). Chaque repiquage est une sous-culture du repiquage précédent.

5.3 Préparation de l'ensemencement microbien (inoculum)

Chaque organisme d'essai est mis en culture sur de la gélose dans les conditions énoncées au Tableau 2.

Tableau 2 — Milieux et conditions d'incubation pour la prolifération des organismes d'ensemencement

Organisme	Moyene	Température °C	Durée d'incubation
P. aeruginosa	TSA	30 à 35	18 h à 24 h
S. aureus	TSA	30 à 35	18 h à 24 h
E. coli	TSA	30 à 35	18 h à 24 h
C. albicans	SDA	20 à 25	42 h à 48 h
		ou 30 à 35	18 h à 24 h
A. brasiliensis	SDA	20 à 25	7 à 10 jours

Utiliser un DPBST stérile ou un diluant approprié pour collecter chaque culture. Laver le milieu de culture, le transférer dans un godet adéquat et agiter. Filtrer les suspensions de spores à travers de la laine de verre stérile, de la mousseline ou de la gaze pour enlever les fragments d'hyphal.

Après la collecte, les organismes mis en culture peuvent être lavés par centrifugation. Les bactéries en suspension peuvent être filtrées pour produire une unique dispersion de cellules (par exemple granulométrie des pores de 3 µm à 5 µm). Ajuster ensuite toutes les suspensions de cellules d'ensemencement avec du DPBST ou un autre diluant approprié à une concentration comprise entre $1{,}0 \times 10^7$ ufc/ml et $1{,}0 \times 10^8$ ufc/ml. Estimer la concentration approximative en cellules de chaque suspension en mesurant la turbidité de la suspension ou de la dilution de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration réelle des unités formant colonie par millilitre doit être déterminée pour chaque suspension, par exemple par la méthode du dénombrement sur plaque, au moment de l'essai.

En utilisant la centrifugation, il convient de réaliser chaque centrifugation entre 20 °C et 25 °C pour une durée qui ne dépasse pas l'équivalent de 10 min à 4 000 g ou moins.

© ISO 2014 – Tous droits réservés

Utiliser les suspensions de cellules de levures et de bactéries le jour de leur préparation.

NOTE 1 Il se peut que des durées de centrifugation supérieures soient nécessaires à des vitesses inférieures.

NOTE 2 Les suspensions de spores peuvent être utilisées jusqu'à sept jours après la préparation, si elles sont conservées au réfrigérateur (entre 2 °C et 8 °C).

5.4 Méthode d'essai d'ensemencement de l'inoculum

5.4.1 Préparer un ou plusieurs tubes (pour chaque lot utilisé) contenant un minimum de 10 ml de solution d'essai par organisme à inoculer.

NOTE Des tubes échantillons sont utilisés de préférence à des boîtes à lentilles pour permettre une exécution technique efficace de l'essai. Du fait d'incompatibilités qui peuvent exister entre la composition de la solution et les matériaux des tubes, il convient d'utiliser des tubes dont le matériau est compatible avec la composition de la solution d'essai.

Inoculer dans le tube à échantillon de produit à soumettre à l'essai une suspension d'organismes d'essai suffisante pour obtenir un dénombrement final compris entre $1{,}0 \times 10^5$ ufc/ml et $1{,}0 \times 10^6$ ufc/ml. S'assurer que le volume de l'inoculum ne dépasse pas 1 % du volume d'échantillon. Mélanger correctement pour obtenir une dispersion complète de l'inoculum.

5.4.2 Entreposer le produit inoculé entre 20 °C et 25 °C. La température doit être contrôlée à l'aide d'un dispositif étalonné et consignée dans le rapport d'essai.

Si le produit est sensible à la lumière, il convient de le protéger pendant la durée de l'essai.

5.4.3 Prélever des échantillons de 1,0 ml du produit inoculé pour dénombrer les cellules viables à 7 jours et 14 jours.

5.4.4 Après prélèvement de l'échantillon à 14 jours, chaque échantillon est réensemencé comme en 5.4.1 en utilisant un inoculum à une concentration comprise entre $1{,}0 \times 10^4$ ufc/ml et $1{,}0 \times 10^5$ ufc/ml.

5.4.5 Prélever des échantillons de 1,0 ml du produit inoculé pour dénombrer les cellules viables à 21 jours et 28 jours.

5.4.6 Soumettre chacune des aliquotes de 1,0 ml prélevées aux intervalles spécifiés à une série adéquate de dilutions décimales dans un milieu neutralisant validé. Mélanger la suspension en l'agitant vigoureusement et laisser reposer pour permettre une neutralisation intégrale. Les conditions de la neutralisation doivent être basées sur l'essai de contrôle du milieu de récupération (voir 5.5.2).

Si un agent antimicrobien de la formulation ne peut pas être inactivé ou neutralisé de manière adéquate, l'éliminer en utilisant une méthode appropriée de filtration sur membrane (voir Annexe A).

5.4.7 Procéder au dénombrement des organismes viables dans chacune des dilutions en triple (sauf spécification contraire) en utilisant des boîtes de milieu de récupération approprié (par exemple TSA pour les bactéries et SDA pour la moisissure et la levure).

Si une filtration sur membrane a été utilisée pour éliminer ou neutraliser les agents antimicrobiens, cultiver les membranes sur ces milieux, s'il y a lieu.

Si la méthode par inclusion est utilisée, conserver la gélose des boîtes à une température inférieure à 50 °C, avant la distribution.

NOTE Les milieux de gélose utilisés pour le dénombrement des cellules viables peuvent également contenir des inactivateurs ou des neutralisants antimicrobiens, si nécessaire.

© ISO 2014 – Tous droits réservés

5.4.8 Incuber les boîtes de récupération de bactéries entre 30 °C et 35 °C. Incuber les boîtes de récupération de levures entre 20 °C et 25 °C ou entre 30 °C et 35 °C. Incuber les boîtes de récupération de moisissures entre 20 °C et 25 °C. Il faut déterminer les durées d'incubation permettant la récupération optimale des bactéries, des levures et des moisissures. Les durées d'incubation minimales doivent se baser sur l'essai de contrôle du milieu de récupération (voir 5.5.2). Noter le nombre d'ufc observées dans les boîtes dénombrables.

Il convient d'examiner périodiquement les boîtes pendant l'incubation afin d'empêcher que les boîtes ne deviennent incomptables en raison d'une surcroissance.

5.4.9 Déterminer le nombre moyen d'unités formant colonie sur des boîtes dénombrables. Calculer la réduction microbienne à des points temporels spécifiés.

NOTE Ne sont comptables que les boîtes contenant entre 30 et 300 ufc/boîte pour les bactéries et les levures et entre 8 et 80 ufc/boîte pour les moisissures, sauf si les colonies ne sont observées que sur les boîtes de dilution 10^0 ou 10^{-1}.

5.4.10 L'absence de micro-organismes doit être documentée, par exemple en enregistrant « 0 » ou « NR » (pas de récupération) pour toutes les dilutions d'un échantillon, prélevé à un intervalle de temps donné unique, qui ont zéro colonie.

5.4.11 La concentration de survivants est calculée à chaque intervalle de temps. La concentration d'organismes viables après le réensemencement au 14ème jour correspond à la somme de la concentration de l'inoculum réensemencé et de la concentration de survivants au 14ème jour.

5.5 Contrôles

5.5.1 Contrôles de l'inoculum

La concentration initiale de l'inoculum et celle de l'inoculum réensemencé sont déterminées en diluant un volume identique d'inoculum dans le même volume d'un diluant approprié que celui utilisé en 5.4.1. Le dénombrement des colonies doit montrer que l'inoculum contient entre $1{,}0 \times 10^5$ ufc/ml et $1{,}0 \times 10^6$ ufc/ml pour l'inoculum initial, ou entre $1{,}0 \times 10^4$ ufc/ml et $1{,}0 \times 10^5$ ufc/ml pour le réensemencement. Le volume de l'inoculum n'excède pas 1 % du volume de l'échantillon. Mélanger correctement pour s'assurer de la dispersion de l'inoculum. Au début de l'essai, évaluer la quantité d'ufc/ml dans cet échantillon témoin afin de démontrer l'adéquation du milieu utilisé pour la prolifération de l'organisme d'essai et d'obtenir une estimation de la concentration initiale de l'inoculum. Distribuer la partie aliquote de chaque tube sur les boîtes de récupération de gélose en triple exemplaire (sauf spécification contraire justifiée).

5.5.2 Contrôle du milieu de récupération

Procéder à une dilution à 1:10 du produit conservé dans le bouillon neutralisant validé (1 ml dans 9 ml) et agiter. Laisser reposer pour terminer la neutralisation. Préparer un second tube de contrôle avec 10 ml d'un diluant adapté (par exemple le DPBST). Inoculer suffisamment d'inoculum dans les tubes pour obtenir une concentration d'organisme d'ensemencement comprise entre 10 ufc et 100 ufc par boîte. Incuber pendant une durée appropriée à température ambiante. Distribuer la partie aliquote de chaque tube sur les boîtes de récupération de gélose en triple exemplaire (sauf spécification contraire justifiée).

Incuber les boîtes de récupération bactérienne à une température comprise entre 30 °C et 35 °C. Incuber les boîtes de récupération de levures à une température comprise entre 20 °C et 25 °C ou entre 30 °C et 35 °C. Incuber les boîtes de récupération de moisissures entre 20 °C et 25 °C. Déterminer la durée d'incubation minimale pour obtenir une récupération optimale de bactéries, levures et moisissures.

Vérifier que la récupération dans le bouillon neutralisant est égale ou supérieure à 50 % de la récupération dans le second tube de contrôle. Procéder à ce contrôle pour chaque organisme d'ensemencement.

© ISO 2014 – Tous droits réservés

Si une dilution supérieure à 1:10 est nécessaire pour la neutralisation, il convient d'utiliser la filtration sur membrane.

Valider la neutralisation du produit avec chaque organisme d'ensemencement initialement, et lorsque nécessaire.

5.6 Critères de performance

5.6.1 Généralités

Les produits doivent être capables de satisfaire aux critères tout au long de leur durée de conservation indiquée sur l'emballage et jusqu'à leur date limite d'utilisation après ouverture.

La satisfaction aux critères indiqués en 5.6.2 et 5.6.3 doit justifier une période d'utilisation de 28 jours après ouverture (durée d'utilisation après première ouverture).

NOTE Se référer aux Annexes B, C, D et E pour les méthodes suggérées, si une durée d'utilisation supérieure à 28 jours est souhaitée.

5.6.2 Bactéries

Le nombre de chaque organisme d'ensemencement récupéré par millilitre doit être diminué d'une valeur moyenne supérieure ou égale à 3,0 logs à 14 jours. Après le réensemencement à 14 jours, la concentration de chaque organisme d'ensemencement doit être de nouveau réduite d'une valeur moyenne minimum de 3,0 logs à 28 jours.

5.6.3 Moisissures et levures

Le nombre de chaque organisme d'ensemencement récupéré par ml doit rester égal ou inférieur aux concentrations initiales (avec une tolérance d'erreur expérimentale de ± 0,5 logs) pendant 14 jours. À 28 jours, la concentration de chaque organisme d'ensemencement par ml doit rester égale ou inférieure aux concentrations (avec une tolérance d'erreur expérimentale de ± 0,5 logs) de chaque organisme d'ensemencement après le réensemencement.

5.7 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit comporter les éléments suivants:

a) le titre de la présente Norme internationale,

b) l'identification du produit, y compris le nom du produit, le numéro de lot, la date de péremption, le fabricant, les conditions d'entreposage et la ou les substance(s) active(s) et leur(s) concentration(s) (si disponibles),

c) le nom du ou des opérateur(s),

d) les écarts par rapport au protocole,

e) la date et la durée d'incubation,

f) la durée de stockage du produit inoculé,

g) les résultats obtenus, incluant le nombre d'organismes récupérés à chaque point.

© ISO 2014 – Tous droits réservés

Annexe A
(informative)

Exemple de méthode II de filtration sur membrane

A.1 Matériaux et réactifs

A.1.1 Milieux de culture et réactifs

A.1.1.1 Diluant liquide, avec ou sans neutralisants.

A.1.1.2 Gélose de tryptone soja (TSA).

A.1.1.3 Solution saline tamponnée au phosphate Dulbecco, sans chlorure de calcium ni chlorure de magnésium (DPBS): 200 mg/l de KCl, 200 mg/l de KH_2PO_4, 8 000 mg/l de NaCl et 2 160 mg/l de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ou autre diluant approprié.

A.1.1.4 Solution saline tamponnée au phosphate Dulbecco, plus 0,05 % (en masse volumique) de polysorbate 80 (DPBST) ou autre diluant approprié.

A.1.1.5 Milieux/agents neutralisants validés, comme spécifié, par exemple bouillon neutralisant Dey-Engley (DEB) et bouillon Letheen.

A.1.2 Appareillage d'essai

Appareillage normal de laboratoire (tel que pipettes stériles, boîtes de Pétri, récipients) ainsi que les appareils suivants.

A.1.2.1 Filtre à membrane stérile.

A.1.2.2 Appareillage stérile approprié, pour maintenir le filtre à membrane stérile et le filtrat.

A.1.2.3 Appareillage approprié permettant de créer un vide ou une pression, pour faire passer la phase liquide de la solution d'essai inoculée à travers le filtre à membrane dans des conditions aseptiques.

Il convient que le filtre à membrane ait des pores d'une granulométrie nominale inférieure ou égale à 0,45 µm et un diamètre supérieur ou égal à 47 mm, et qu'il ne contienne aucun produit chimique risquant d'être toxique pour les cellules microbiennes.

A.2 Méthode d'essai et résultats

A.2.1 Humidifier le filtre à membrane stérile (A.1.2.1) dans un bloc à filtre stérile (A.1.2.2) avec du DPBST stérile (A.1.1.4) ou un diluant approprié.

A.2.2 Transférer dans des conditions aseptiques le volume mesuré de solution d'essai inoculée dans un DPBST stérile (A.1.1.4) ou dans un diluant liquide.

© ISO 2014 – Tous droits réservés

A.2.3 Transférer la solution diluée sur la membrane et filtrer immédiatement par effet de vide ou de pression. Diluer l'échantillon appliqué sur le filtre avec 50 ml à 100 ml de diluant liquide et mélanger soigneusement pour garantir une distribution uniforme de l'échantillon sur la surface entière du filtre.

NOTE Cette manipulation fera décroître la probabilité que plusieurs unités formant colonie ne se soient placées au même endroit sur le filtre.

A.2.4 Laver le filtre à membrane en utilisant plusieurs volumes de diluant liquide pouvant contenir des agents neutralisants supplémentaires si nécessaire. Il convient de déterminer le volume réel de manière empirique pour chaque formulation et chaque organisme d'ensemencement.

NOTE En règle générale, trois volumes de diluant liquide (de 100 ml chacun) suffisent pour éliminer et/ou diluer l'agent antimicrobien.

A.2.5 Incuber le filtre à membrane avec des milieux adéquats pour permettre la croissance des unités formant colonie à la surface du filtre.

Cette opération est possible en retirant dans des conditions aseptiques le filtre à membrane du bloc filtre et en plaçant la membrane à la surface d'une boîte de gélose stérile ne comportant pas de liquide en évidence à la surface. La membrane peut également être incluse sous une couche de gélose. Un autre moyen consiste à utiliser une membrane stérile qui peut nécessiter l'addition de milieux stériles au filtre hermétique, et l'incubation peut se faire *in situ*. Il convient d'utiliser des milieux appropriés au type d'organisme à inoculer et à la formulation spécifique soumise à l'essai. Il convient d'établir la durée d'incubation.

A.2.6 Déterminer le nombre moyen d'unités formant colonie sur les filtres à membrane dénombrables (3 ufc à 100 ufc par filtre de 47 mm pour les bactéries et les levures et 3 ufc à 10 ufc par filtre de 47 mm pour les moisissures). Calculer et documenter le nombre d'unités formant colonie par millilitre de solution inoculée.

A.3 Contrôles

Confirmer l'efficacité du neutralisant en transférant une aliquote de la solution d'essai non inoculée sur 50 ml à 100 ml de diluant liquide stérile en utilisant le même rapport volumétrique de solution d'essai par rapport au diluant liquide. Appliquer le volume entier sur la membrane et filtrer par effet de vide ou de pression. Laver le filtre avec plusieurs volumes de diluant liquide en utilisant le même volume que dans la méthode d'essai précédente. Transférer entre 5 ufc et 100 ufc d'organismes à inoculer (une seule espèce par filtre) dans 100 ml de diluant liquide et appliquer sur la membrane. Incuber le filtre à membrane en contact avec les milieux comme décrit dans la méthode d'essai (voir A.2.5).

Recommencer l'opération en utilisant du diluant liquide non exposé à la solution d'essai. Comparer le dénombrement avec ceux précédemment obtenus par la même méthode en utilisant un diluant adapté (par exemple DPBST), au lieu de la solution d'essai. Confirmer l'inoculum sur un milieu adapté en triple exemplaire (sauf spécification contraire). S'assurer que la récupération dans le bouillon neutralisant est au moins égale à 50 % de l'inoculum.

© ISO 2014 – Tous droits réservés