



## **Sicurezza microbiologica nei prodotti cosmetici**

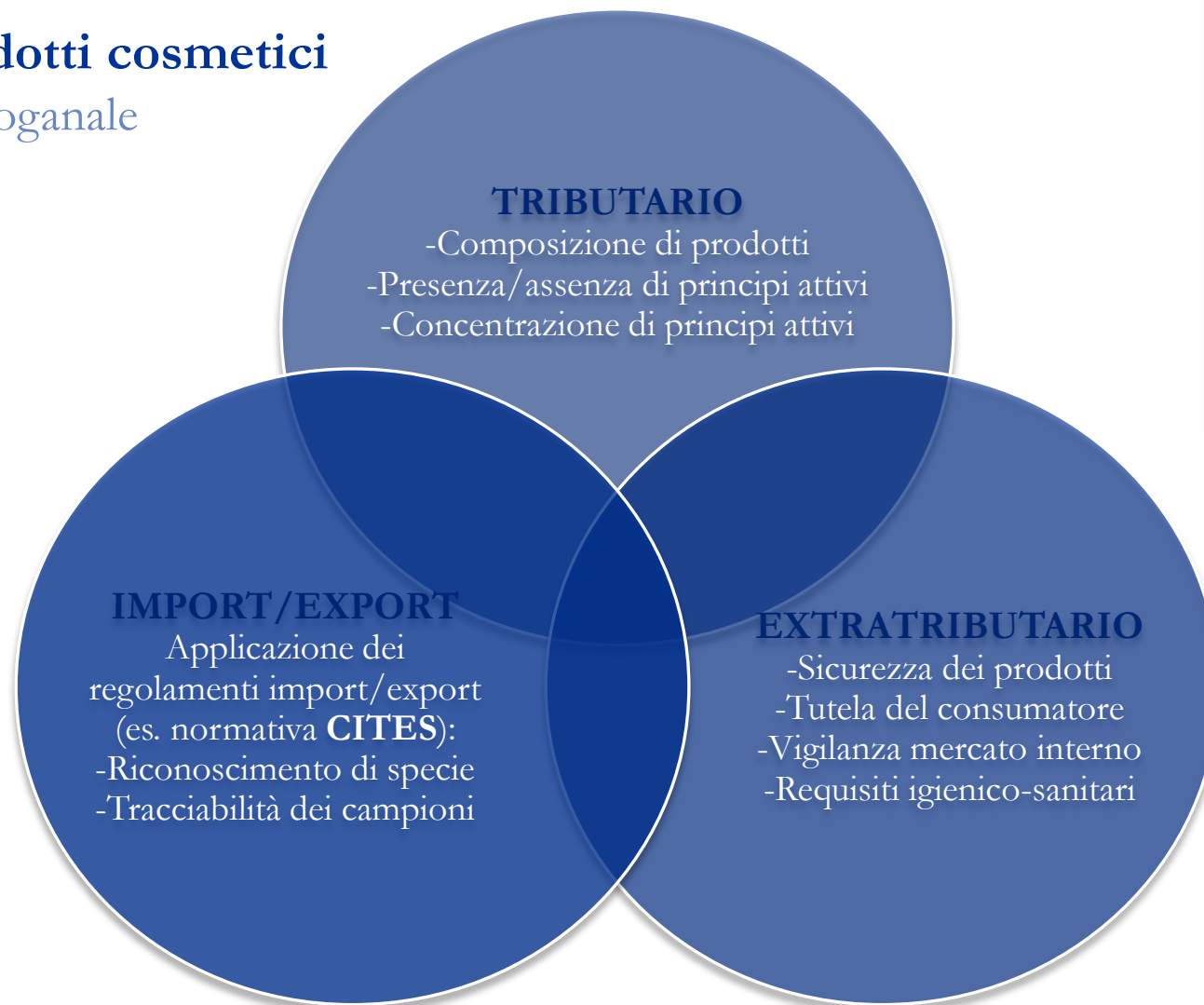
Sicurezza del consumatore – Qualità microbiologica dei cosmetici – Regolamento CE 1223/2009 – Dal campionamento all'analisi quali-quantitativa

LAB Italia - Corso ECM

Dott. Liberato Simone Corsaro

## Sicurezza nei prodotti cosmetici

Campo di interesse doganale



## Sicurezza nei prodotti cosmetici

### Qualità microbiologica dei cosmetici

In Italia il settore cosmetico è stato disciplinato, fino all'11 luglio 2013, dalla **Legge 11 ottobre 1986 n. 713** e successive modifiche e integrazioni, che costituisce il recepimento della **Direttiva Cosmetici 76/768/CEE** e s.m.i.

Obiettivo principale di questa normativa è la sicurezza del consumatore che utilizza prodotti cosmetici.

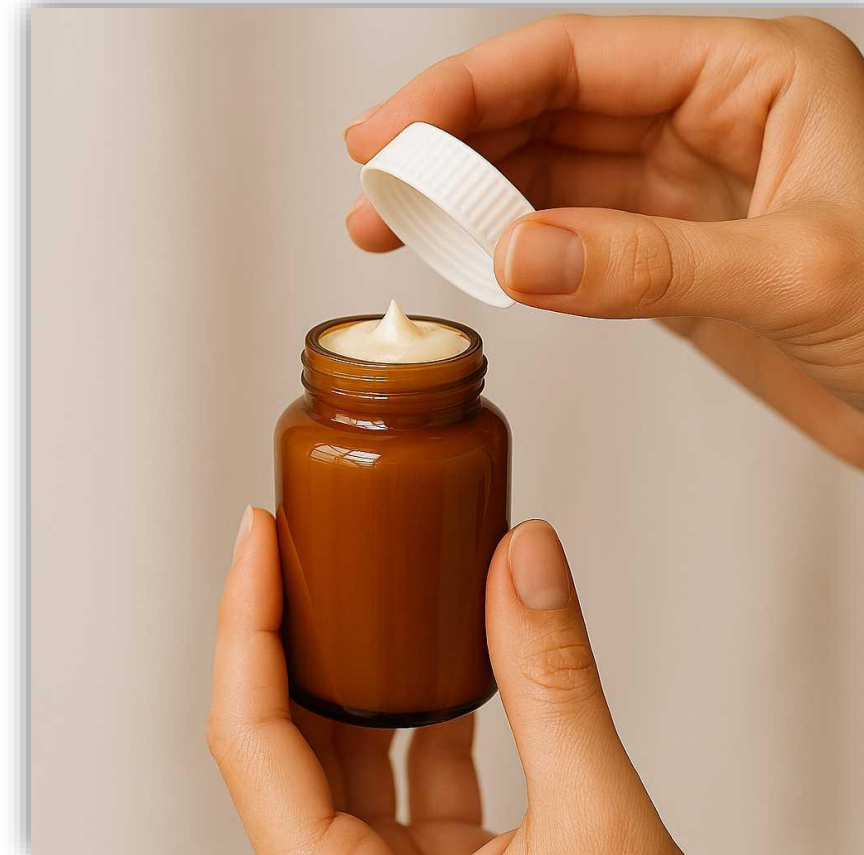


## Sicurezza nei prodotti cosmetici

### Qualità microbiologica dei cosmetici

Con la **Direttiva 2003/15/CE** (nota anche come VII Modifica), adottata in Italia con il D. Lgs. n. 50 del 15 febbraio 2005, è stato introdotto un nuovo requisito per le etichette dei prodotti cosmetici denominato “**Periodo post-apertura**” o **PaO** (dall’inglese *Period after Opening*).

Il PaO indica **il periodo, successivo al primo utilizzo da parte del consumatore, durante il quale il prodotto, se utilizzato e conservato in modo corretto, può rimanere conforme ai requisiti generali di sicurezza.** In questo ambito si tiene conto dei diversi fattori che possono influire sulla qualità microbiologica dei cosmetici dal momento in cui il consumatore “apre” il prodotto.



## Sicurezza nei prodotti cosmetici

### Regolamento CE 1223/2009



La cosiddetta Direttiva Cosmetici sarà sostituita comunque dal **Regolamento 1223/2009** che, entrato in vigore l'11 gennaio 2010, ebbe completa ed effettiva applicazione in data 11 luglio 2013.

Grazie all'introduzione del meccanismo della valutazione della sicurezza, la legislazione europea ha fatto un ulteriore decisivo passo in avanti a protezione del consumatore durante l'utilizzo dei prodotti cosmetici.

## Sicurezza nei prodotti cosmetici

Regolamento CE 1223/2009



**Regolamento CE 1223/2009:** impone che i prodotti cosmetici siano sicuri, con limiti suddivisi in due categorie secondo la normativa EN ISO 17516:2014

CATEGORIA 1 – prodotti per bambini o contorno occhi/mucose:  $\leq 1 \times 10^2$  CFU/g o ml, assenza di patogeni

CATEGORIA 2 – tutti i restanti cosmetici:  $\leq 1 \times 10^3$  CFU/g o ml, assenza di patogeni



# Sicurezza nei prodotti cosmetici

## Campionamento

Le modalità di campionamento e il trattamento dei prodotti cosmetici sono specificate nel **DM 22 dicembre 1986** che stabilisce che i prodotti cosmetici devono essere prelevati nella loro confezione originale e inviati al laboratorio.

In particolare, si definiscono per questo tipo di campionamenti:

- **le aliquote**, che costituiscono la frazione rappresentativa del campione e quindi ciascuna delle parti equivalenti in cui è suddiviso il campione;
- **le unità campionarie** (di cui una o più di una vanno a costituire un'aliquota) sono costituite dal prodotto da analizzare in laboratorio per la verifica della qualità microbiologica.



## Sicurezza nei prodotti cosmetici

### Campionamento



**Per i prodotti confezionati**, prelevare, quando possibile, confezioni originali, integre e ancora sigillate. Non eseguire frazionamenti.

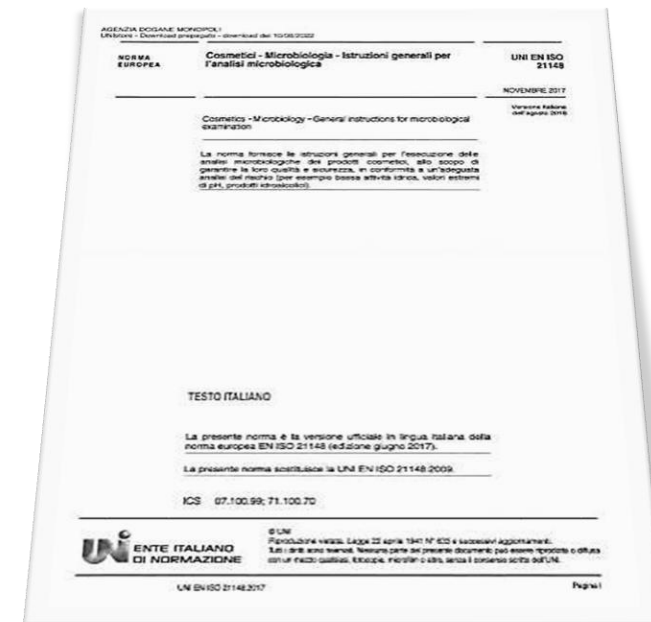
**Per i prodotti non confezionati e sfusi** utilizzare sempre strumenti sterili, contenitori sterili e tecniche di prelievo che variano in funzione dello stato fisico del prodotto (solido, liquido, in polvere, granuli, ecc.). In questo caso, il prelievo deve essere preceduto da una razionale miscelazione del prodotto che consenta di disperdere in maniera omogenea gli eventuali microrganismi presenti per ottenere un campionamento rappresentativo del prodotto da esaminare.

# Sicurezza nei prodotti cosmetici

## Analisi microbiologiche



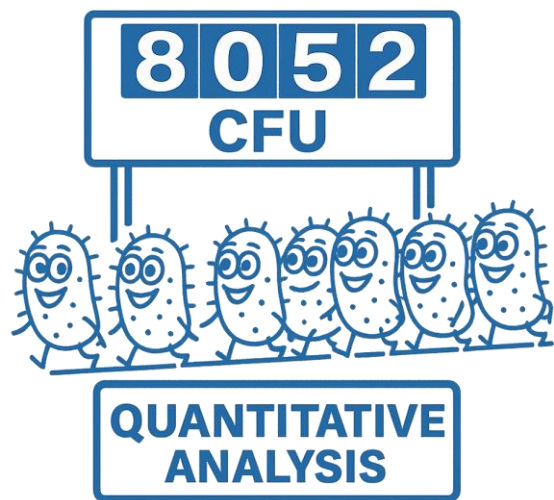
Per l'esecuzione di prove microbiologiche su prodotti cosmetici è opportuno seguire procedure idonee, riferite alle prescrizioni di carattere generale riportate nella norma **UNI ISO 21148:22**.



# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

## Analisi quali-quantitativa

La ricerca di microrganismi specifici può essere di tipo **quantitativo** e di tipo **qualitativo** e si basa in entrambi i casi sull'impiego di terreni di coltura rispettivamente generici e selettivi.



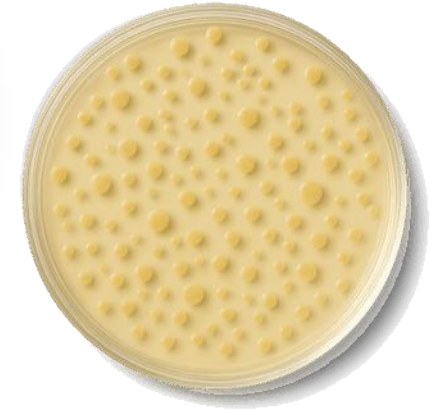
La **ricerca quantitativa** di uno specifico microrganismo ne consente l'enumerazione seminando diluizioni del campione (o per inclusione o per distribuzione in superficie o su membrana) direttamente su terreni colturali.

Attraverso la **ricerca qualitativa**, invece, è possibile accertare o escludere la presenza di una data specie o gruppo microbico in un campione analizzato indipendentemente dal numero di cellule microbiche presenti.



# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

Analisi quali-quantitativa



L'analisi microbiologica dei prodotti cosmetici deve prevedere la ricerca di:

**a. Batteri vitali mesofili aerobi**

- *Pseudomonas aeruginosa*;
- *Escherichia coli*;
- *Staphylococcus aureus*;

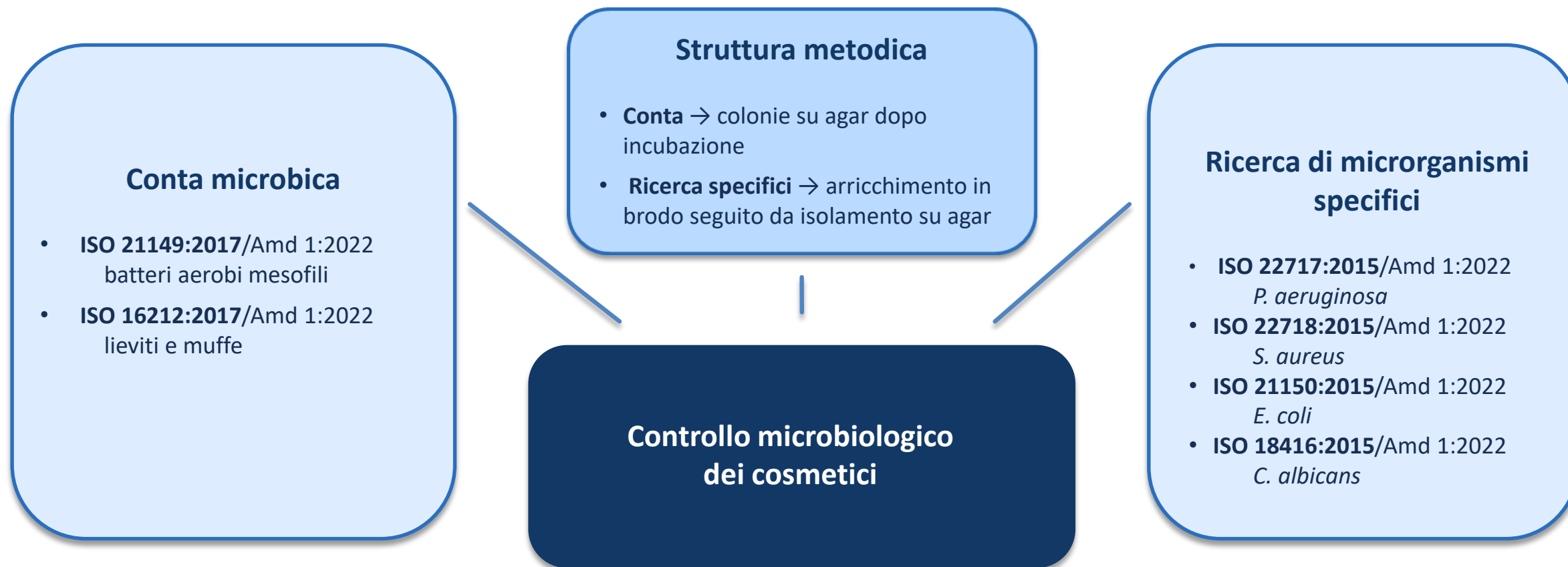
**b. Funghi e lieviti**

- *Candida albicans*;



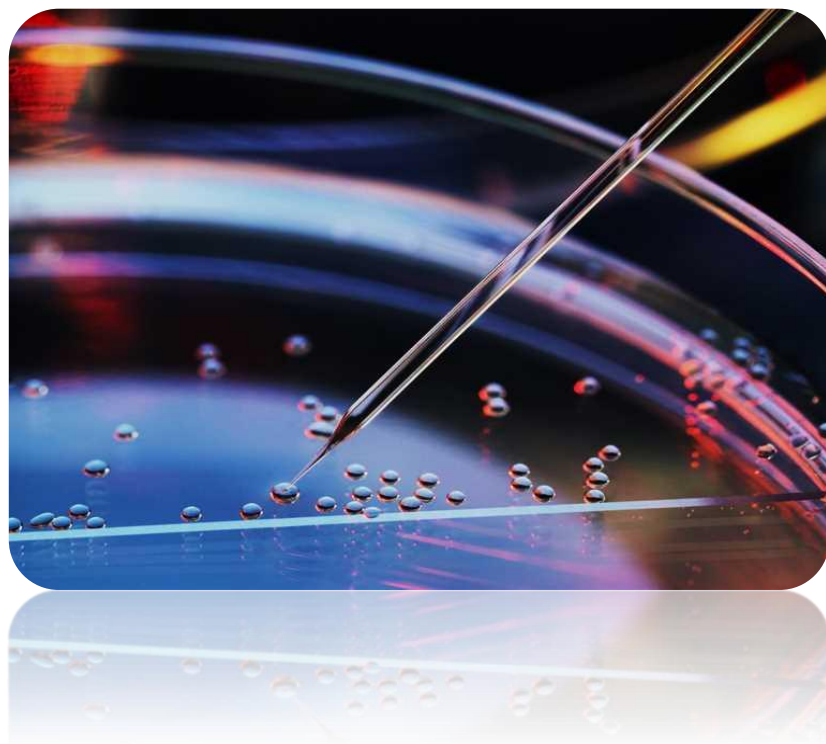
# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

Analisi quali- quantitativa: norme tecniche di riferimento



# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

## Procedura operativa: analisi quantitativa



L'analisi quantitativa prevede la conta delle colonie (CFU) su un terreno agarizzato non selettivo permettendo la determinazione dei **batteri vitali mesofili aerobi e/o funghi e lieviti**. A tale scopo si può utilizzare una delle tre procedure elencate:

- **Spatolamento** della coltura batterica sulla superficie dell'agar
- **Inclusione** della coltura batterica all'interno del terreno agarizzato
- **Filtraggio con membrana** e posizionamento della membrana sulla superficie dell'agar



# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

## Procedura operativa: trattamento dei campioni



### Composizione

|                                 |         |    |
|---------------------------------|---------|----|
| Digerito pancreatico di caseina | 5       | g  |
| Estratto di lievito             | 2,5     | g  |
| Glucosio                        | 10      | g  |
| Lecitina di soia                | 7       | g  |
| Tiosolfato di sodio pentaidrato | 6       | g  |
| Polisorbato 80                  | 5       | g  |
| Bisolfito di sodio              | 2,5     | g  |
| Tioglicolato di sodio           | 1       | g  |
| Bromocresolo porpora            | 0,02    | g  |
| Acqua distillata                | 1000    | mL |
| pH                              | 7,6±0,2 |    |

Prima della determinazione o dell'enumerazione dei microrganismi vitali in un prodotto cosmetico, **deve essere neutralizzato** l'effetto inibente la crescita microbica che può essere espletato dai conservanti presenti nel campione.

A tale scopo si può utilizzare il **brodo di Dey/Engley**.

# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

## Procedura operativa: trattamento dei campioni

### Composizione

|                                    |         |
|------------------------------------|---------|
| Digerito pancreatico di caseina    | 15 g    |
| Digerito papaico di farina di soia | 5 g     |
| Sodio cloruro                      | 4 g     |
| Solfito di sodio                   | 0,2 g   |
| Destrosio                          | 5,5 g   |
| L-cistina                          | 0,7 g   |
| Lecitina di uova                   | 1 g     |
| Polisorbato 80                     | 5 g     |
| Octoxilolo 9                       | 1 g     |
| Acqua distillata                   | 1000 mL |
| pH 7,0±0,2                         |         |



Se la determinazione del parametro microbiologico prevede l'applicazione di un metodo **quantitativo**, il campione dovrà essere disperso in un opportuno **diluente neutralizzante**.

Se il metodo analitico che serve per la ricerca del parametro microbiologico è di tipo **qualitativo**, il campione dovrà essere disperso in un brodo di arricchimento contenente agenti neutralizzanti e di dispersione (es. **Brodo Eugon LT 100**).

# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

## Procedura operativa: trattamento dei campioni

In tabella sono riportati i composti chimici neutralizzanti appropriati per ciascuna classe di agenti antimicrobici dei conservanti.



| Conservante                                                                | Composti chimici in grado di neutralizzare l'attività antimicrobica del conservante       | Esempi di soluzioni di neutralizzanti e di liquidi di risciacquo (per i metodi di filtrazione a membrana).                                                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Composti fenolici: parabeni, fenossietanolo, feniletanolo, ecc.<br>Anilidi | Lecitina, polisorbato 80, alcol etossilato, surfattanti non ionici                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polisorbato 80, 30 g/L + lecitina, 3 g/L</li> <li>• Alcol etossilato, 7 g/L + lecitina, 20 g/L + polisorbato 80, 4 g/L</li> <li>• Brodo neutralizzante D/E</li> <li>• <u>Liquido di risciacquo</u>: Acqua distillata; triptone, 1 g/L + NaCl, 9 g/L; polisorbato 80, 5 g/L</li> </ul>                         |
| Composti di ammonio quaternario                                            | Lecitina, saponina, polisorbato 80, dodecil sodio solfato                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polisorbato 80, 30 g/L + dodecil sodio solfato, 4 g/L + lecitina, 3 g/L</li> <li>• Polisorbato 80, 30 g/L + saponina, 30 g/L + lecitina, 3 g/L</li> <li>• Brodo neutralizzante D/E</li> <li>• <u>Liquido di risciacquo</u>: Acqua distillata; triptone, 1 g/L + NaCl, 9 g/L; polisorbato 80, 5 g/L</li> </ul> |
| Tensioattivi cationici                                                     | Alcol etossilato                                                                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polisorbato 80, 30 g/L + dodecil sodio solfato, 4 g/L + lecitina, 3 g/L</li> <li>• Polisorbato 80, 30 g/L + saponina, 30 g/L + lecitina, 3 g/L</li> <li>• Brodo neutralizzante D/E</li> <li>• <u>Liquido di risciacquo</u>: Acqua distillata; triptone, 1 g/L + NaCl, 9 g/L; polisorbato 80, 5 g/L</li> </ul> |
| Aldeidi                                                                    | Glicina, istidina                                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lecitina, 3 g/L + polisorbato 80, 30 g/L + L-istidina, 1 g/L</li> <li>• Polisorbato 80, 30 g/L + saponina, 30 g/L + L-istidina, 1 g/L + L-cisteina, 1 g/L</li> <li>• Brodo neutralizzante D/E</li> <li>• <u>Liquido di risciacquo</u>: Polisorbato 80, 3 g/L + L-istidina, 0,5 g/L</li> </ul>                 |
| Composti ossidanti                                                         | Tiosolfato di sodio                                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiosolfato di sodio, 5 g/L</li> <li>• <u>Liquido di risciacquo</u>: tiosolfato di sodio, 3 g/L</li> </ul>                                                                                                                                                                                                     |
| Isotiazolinoni, imidazoli                                                  | Lecitina, saponina ammine, solfati, mercaptani, bisolfato di sodio, tioglicolato di sodio | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polisorbato 80, 30 g/L + saponina, 30 g/L + lecitina, 3 g/L</li> <li>• <u>Liquido di risciacquo</u>: triptone, 1 g/L + NaCl, 9 g/L; polisorbato 80, 5 g/L</li> </ul>                                                                                                                                          |
| Biguanidi                                                                  | Lecitina, saponina, polisorbato 80                                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Polisorbato 80, 30 g/L + saponina, 30 g/L + lecitina, 3 g/L</li> <li>• <u>Liquido di risciacquo</u>: triptone, 1 g/L + NaCl, 9 g/L; polisorbato 80, 5 g/L</li> </ul>                                                                                                                                          |
| Sali metallici (Cu, Zn, Hg)<br>Composti organo-mercurici                   | Bisolfato di sodio, L-cisteina<br>Composti solfidrilici, acido tioglicolico               | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tioglicolato di sodio, 0,5 g/L o 5 g/L</li> <li>• L-cisteina, 0,8 g/L o 1,5 g/L</li> <li>• Brodo neutralizzante D/E</li> <li>• <u>Liquido di risciacquo</u>: tioglicolato di sodio, 0,5 g/L</li> </ul>                                                                                                        |

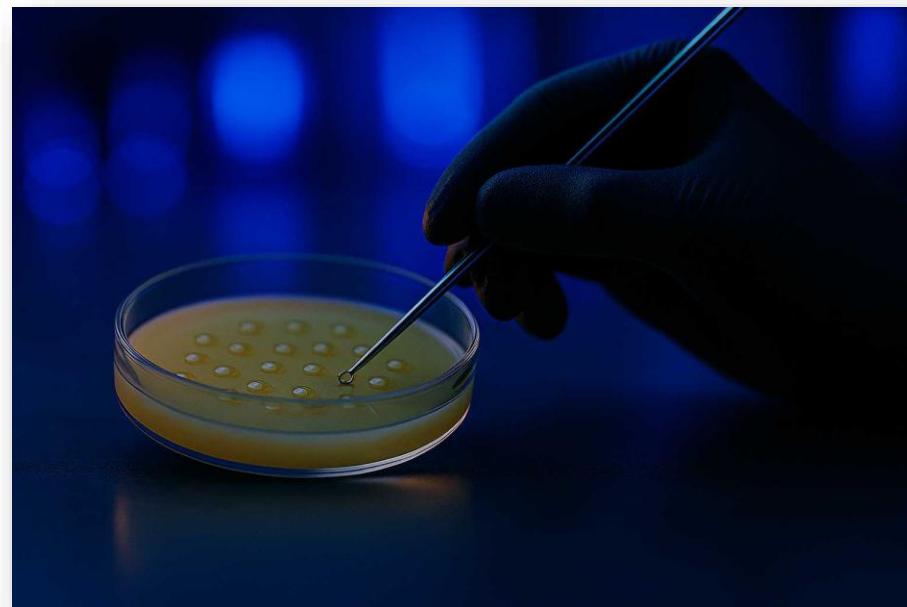
Il pH dei neutralizzanti può essere aggiustato allo stesso valore di quello del prodotto cosmetico.

## Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

### Procedura operativa: analisi quantitativa

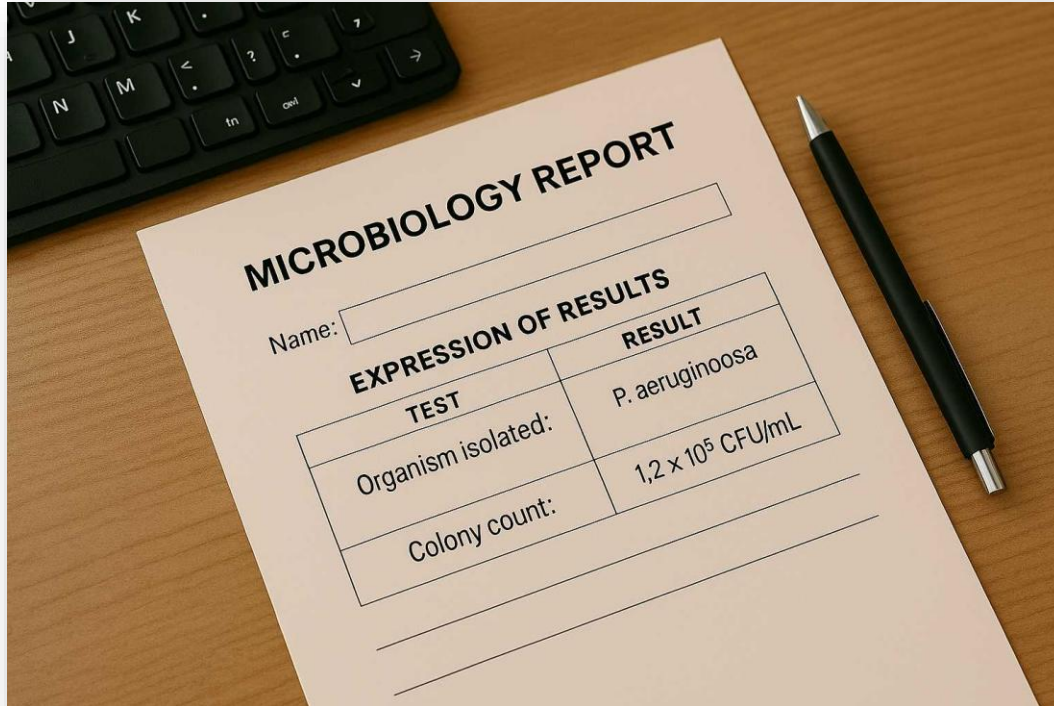
Per verificare l'efficacia dei neutralizzanti, dovrebbero essere utilizzati ceppi rappresentativi di microrganismi Gram-negativi e Gram-positivi, generalmente sensibili agli agenti antimicrobici:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 o un ceppo equivalente (CIP 82.118 o NCIMB 8626 o BRC 13275 o KCTC 2513 o altro ceppo di collezione nazionale equivalente); in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 o un ceppo equivalente (CIP 4.83 o NCIMB 9518 o NBRC 13276 o KCTC 1916 o altro ceppo di collezione nazionale equivalente); in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.
- *Candida albicans* ATCC 10231 o un ceppo equivalente; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate (per i funghi).



# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

Procedura operativa: **analisi quantitativa**



**MICROBIOLOGY REPORT**

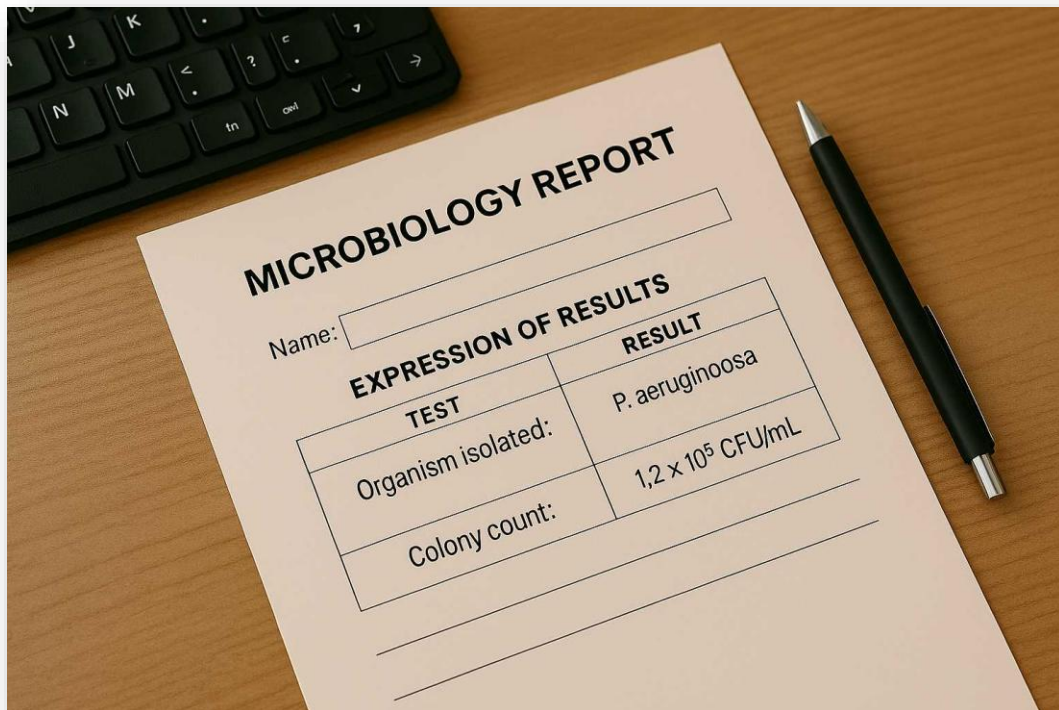
Name:

| TEST               | RESULT                       |
|--------------------|------------------------------|
| Organism isolated: | P. aeruginosa                |
| Colony count:      | 1,2 x 10 <sup>5</sup> CFU/mL |

- Se, nelle piastre inoculate, **non sono cresciute** colonie, esprimere il risultato come “**non rilevato**”/mL o g.
- Se il numero di CFU è **compreso tra 30 e 300**, il numero N di batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo di campione è =  $N/S$  e/o  $N/V$  (dove *S* è la massa e *V* il volume del campione)

# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

## Procedura operativa: analisi quantitativa



| EXPRESSION OF RESULTS |                              |
|-----------------------|------------------------------|
| TEST                  | RESULT                       |
| Organism isolated:    | P. aeruginosa                |
| Colony count:         | 1,2 x 10 <sup>5</sup> CFU/mL |

- Se sono presenti **più di 300 colonie**, esprimere il risultato come **>300/mL o /g**.

$$N = \frac{C}{V (n_1 + 0,1 n_2) d}$$

dove:

N = numero di microrganismi/mL o g

C = somma delle colonie contate su tutte le piastre valide

V = volume dell'inoculo in mL seminato in ogni piastra

n1 = numero di piastre considerate alla eventuale prima diluizione considerata

n2 = numero di piastre considerate alla eventuale seconda diluizione considerata

d = prima diluizione scelta per il calcolo

N.B. *Esprimere il risultato come un numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per la una potenza di 10 (es. 1x10<sup>3</sup> CFU/mL)*

# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

## Procedura operativa: analisi qualitativa

Attraverso la ricerca **qualitativa** è possibile accertare o escludere la presenza di una data specie o gruppo microbico in un campione analizzato indipendentemente dal numero di cellule microbiche presenti.

L'isolamento su terreni colturali selettivi e a seguito di ulteriori prove di conferma



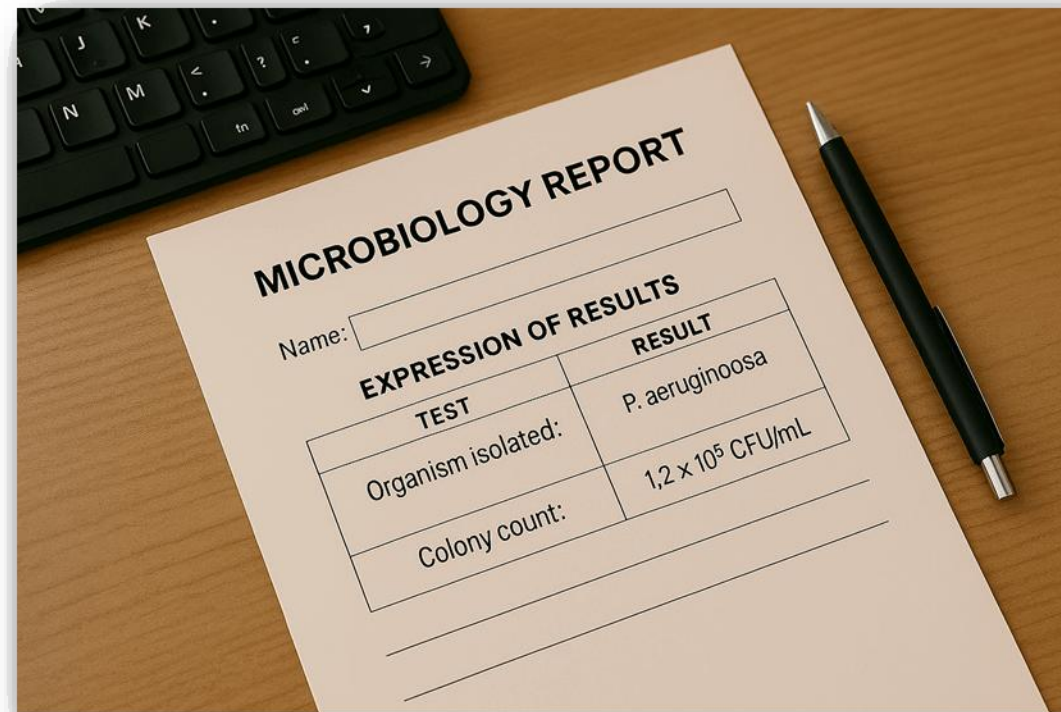
# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

Procedura operativa: **analisi qualitativa**

Il risultato viene espresso come  
**presenza/assenza** del microrganismo ricercato  
nel volume di campione esaminato.

Le metodologie analitiche qualitative sono necessarie per la ricerca delle seguenti specie:

- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Candida albicans*



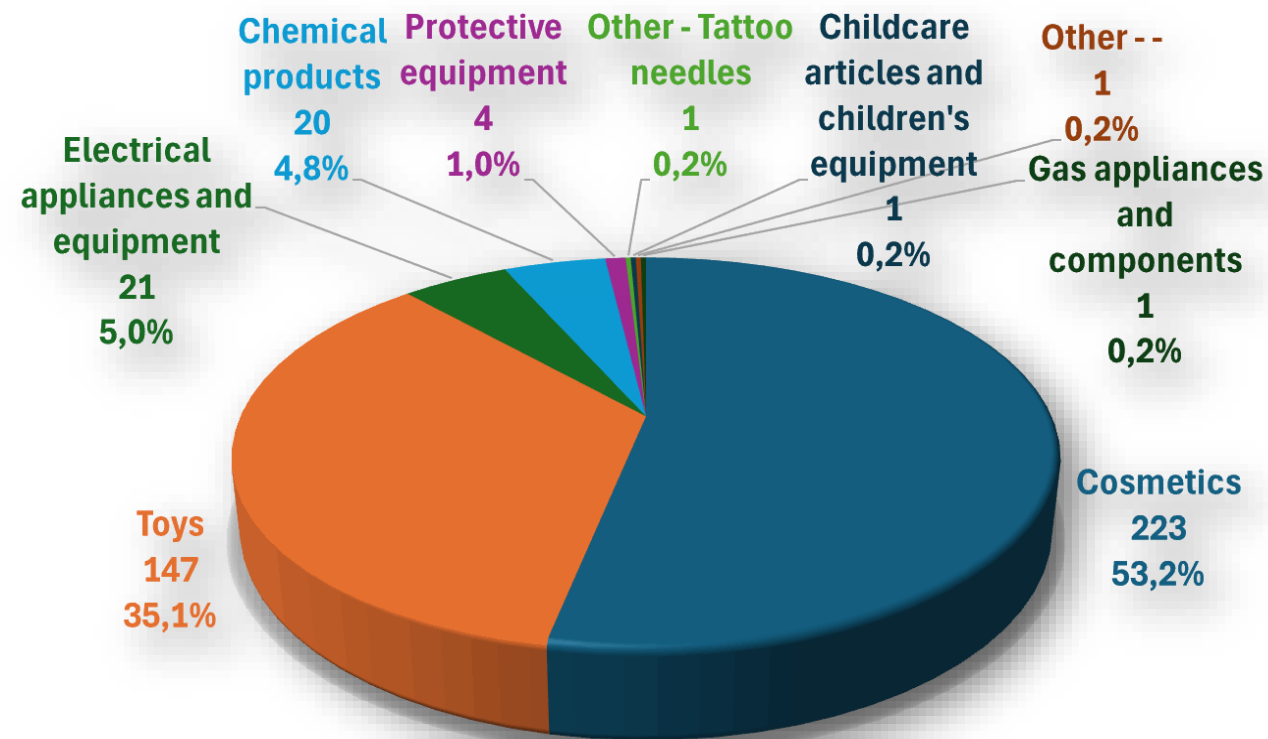
| MICROBIOLOGY REPORT        |                              |
|----------------------------|------------------------------|
| Name: <input type="text"/> |                              |
| EXPRESSION OF RESULTS      |                              |
| TEST                       | RESULT                       |
| Organism isolated:         | P. aeruginosa                |
| Colony count:              | 1,2 x 10 <sup>5</sup> CFU/mL |

# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

## Allerte UE per rischio microbiologico

Allerte UE per rischio microbiologico dal 2005 al 2025

| TYPE OF ALERT         | NUMBER OF ALERTS |
|-----------------------|------------------|
| <b>Serious risk</b>   | <b>393</b>       |
| Other risk levels     | 19               |
| Other types of alerts | 7                |
| <b>Total</b>          | <b>419</b>       |



# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

## Allerte UE per rischio microbiologico

Allerte UE per rischio microbiologico dal 2005 al 2025

### Descrizione del rischio

### Disposizioni giuridiche (a livello dell'UE) e norme

Il prodotto contiene un livello eccessivo di batteri mesofili aerobici (valore misurato: 680 000 cfu/g), lievito (valore misurato: 4000 cfu/g) e muffa (valore misurato: 20 000 cfu/g). Se usato su pelle danneggiata, o se viene a contatto con gli occhi, il prodotto può causare infezione o irritazione.

Il prodotto non è conforme al regolamento sui prodotti cosmetici.

Categoria di prodotto

Cosmetici

Prodotto 

Tintura per capelli

Nome

2 Archivi multimediali

[Comprimi](#)

# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

## Allerte UE per rischio microbiologico

Allerte UE per rischio microbiologico dal  
2005 al 2025

|                                                                                            |                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Categoria di prodotto                                                                      | Cosmetici         |
| Prodotto  | Protezione solare |
| Nome                                                                                       | Scop...           |

**Descrizione del rischio** 

Il prodotto è microbiologicamente contaminato da *Pseudomonas aeruginosa*. Se usato sulla pelle danneggiata o se entra in contatto con gli occhi, il prodotto può causare infezioni o irritazioni.

**Disposizioni giuridiche (a livello dell'UE) e norme**

Il prodotto non è conforme al regolamento sui prodotti cosmetici.

## Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

Esempio procedura quali-quantitativa: **Fondotinta liquido e Shampoo**

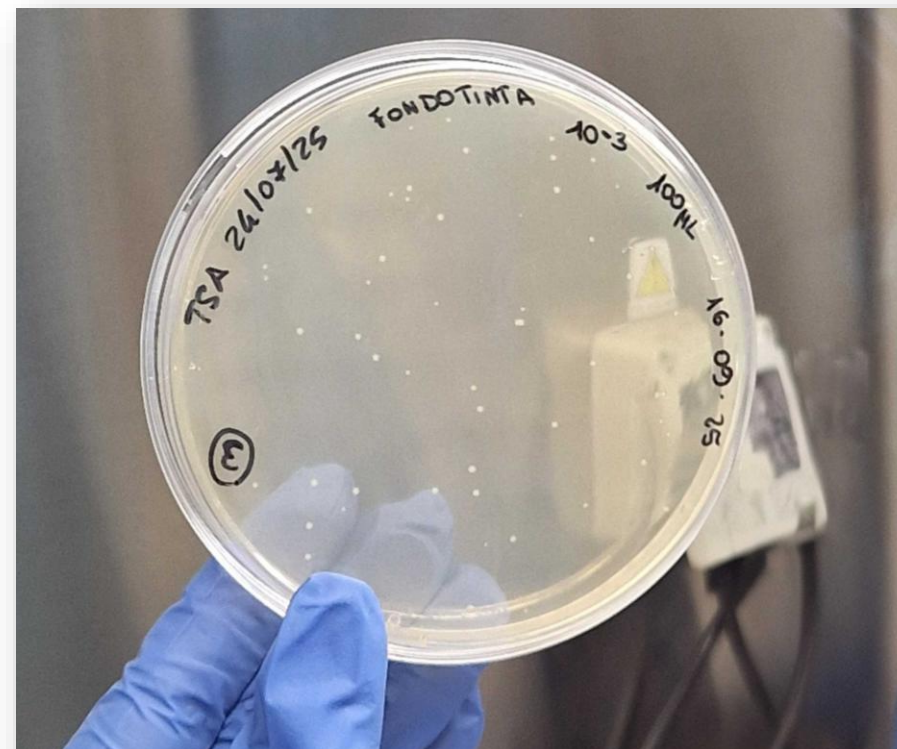
- La confezione è stata esternamente trattata con Etanolo 70%
- È stato pesato sterilmente 1g di campione a cui è stato aggiunto 1mL di Tween 80 e portato a 10mL con soluzione neutralizzante → **sospensione primaria diluita 1:10**
- Il campione è stato diluito 1:100 e 1:1000 utilizzando una soluzione diluente (acqua peptonata o PBS)
- Ciascuna diluizione è stata disposta su terreno di coltura (100 µL) e distribuita per spatolamento su piastre TSA (Tryptic Soy Agar) e incubate a 37 °C per 24h
- Dopo il periodo di incubazione si è proseguito alla conta delle CFU/mL e alla semina su piastre con terreno selettivo per l'identificazione di microrganismi noti

## Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

Esempio procedura quantitativa: Fondotinta liquido



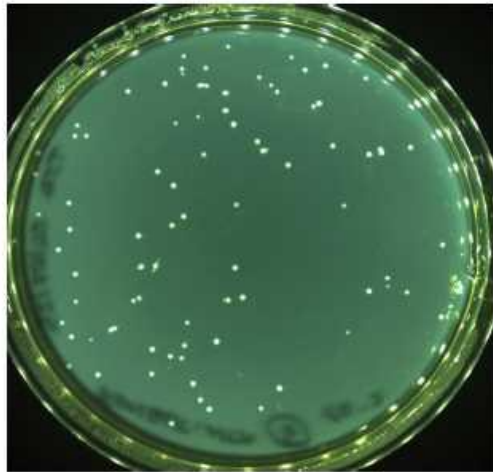
Sospensione primaria su TSA  
dopo incubazione (24h)



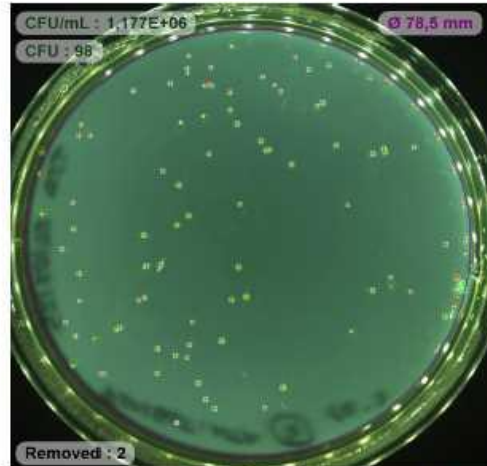
Sospensione primaria diluita 1:1000  
su TSA dopo incubazione (24h)

# Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

## Esempio procedura quantitativa: Fondotinta liquido



Sample



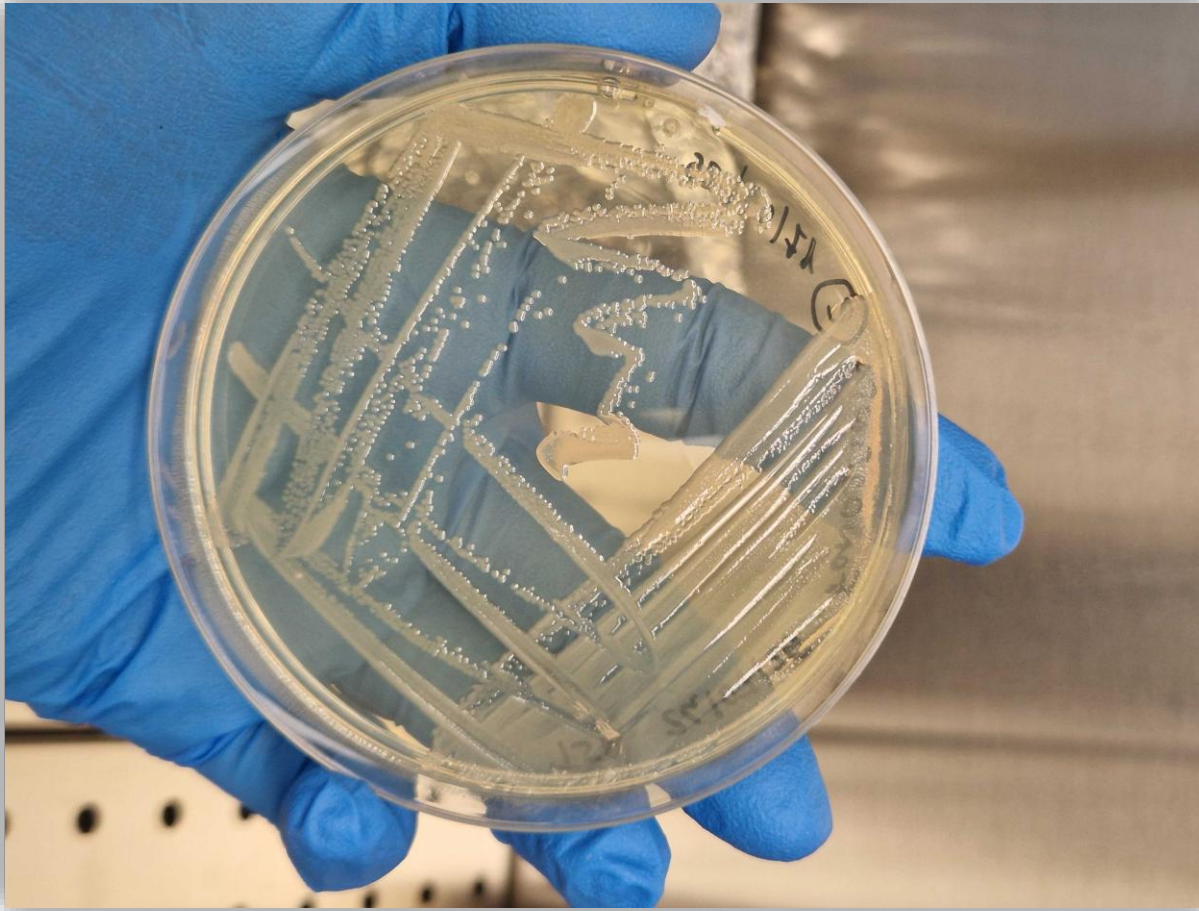
|                |                                                                |               |                     |               |           |
|----------------|----------------------------------------------------------------|---------------|---------------------|---------------|-----------|
| Validated by : | hp                                                             | Sample N° :   | Fondotinta 2 1:1000 | CFU/mL :      | 1,177E+06 |
| Date Time :    | 09/17/2025 12:03:13                                            | Count :       | 98                  | Dilution :    | 1e-3      |
| Parameters :   | Total count                                                    | Area (%) :    | 83,248802           | V (mL) :      | 0,100000  |
|                |                                                                | CFU Prorata : | 118                 | Sensitivity : | 23        |
| Comment :      | <div>12 CFU manually added – 2 CFU manually removed – OK</div> |               |                     |               |           |
| File :         | Prima prova fondotinta.sca                                     |               |                     |               |           |

1 / 2

Esempio output del contacolonie:  
nel campione sono state riscontrate  
 $1,18 \times 10^6$  CFU/mL

## Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

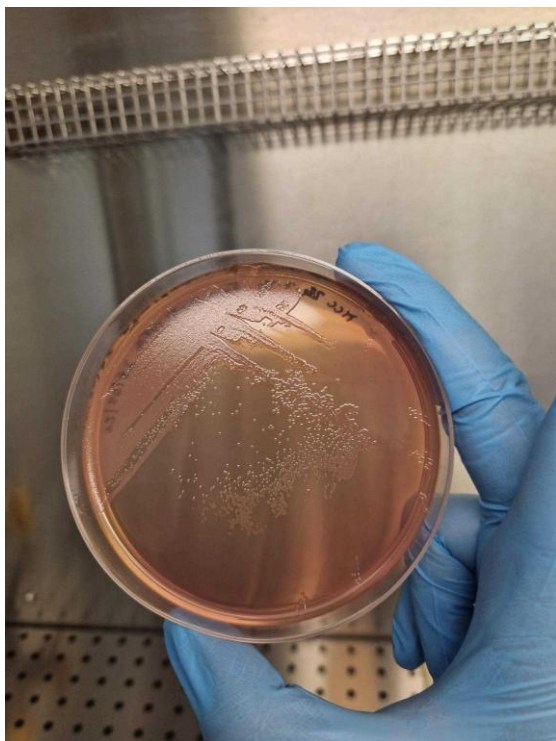
Esempio procedura qualitativa: Fondotinta liquido



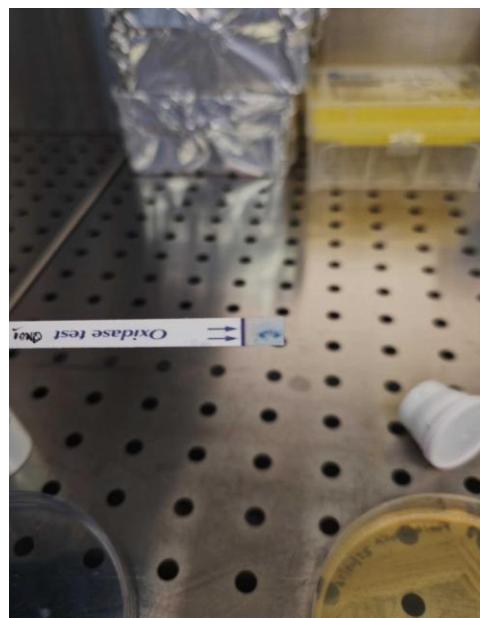
Semina su TSA al fine di valutare eventuale diversa morfologia delle colonie.

## Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

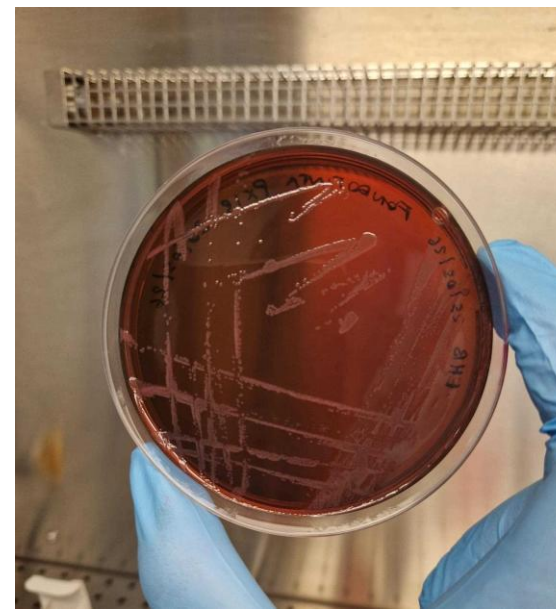
Esempio procedura qualitativa: Fondotinta liquido



**MacConkey Agar:** terreno selettivo per l'identificazione di *Gram*-;  
Il genere *Pseudomonas* in questo terreno appare traslucido ed incolore perché non è in grado di fermentare il lattosio.



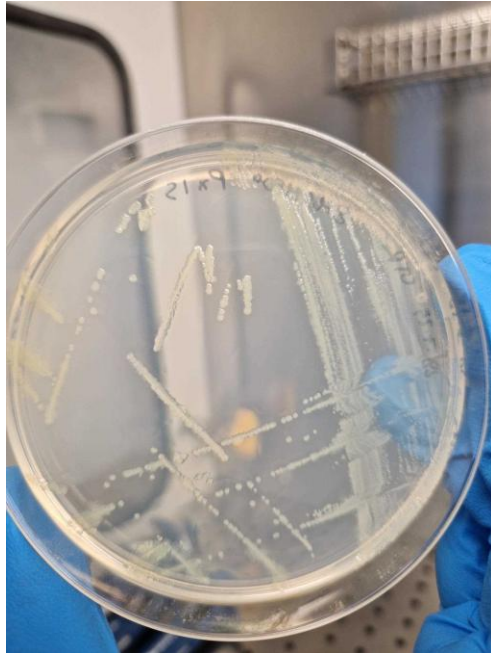
**Test dell'Ossidasi:** verifica la presenza dell'enzima citocromo ossidasi che è presente nel genere *Pseudomonas* ma non nelle Enterobacteriacee (*E. coli*). Il test è positivo se si verifica un viraggio al blu-viola.



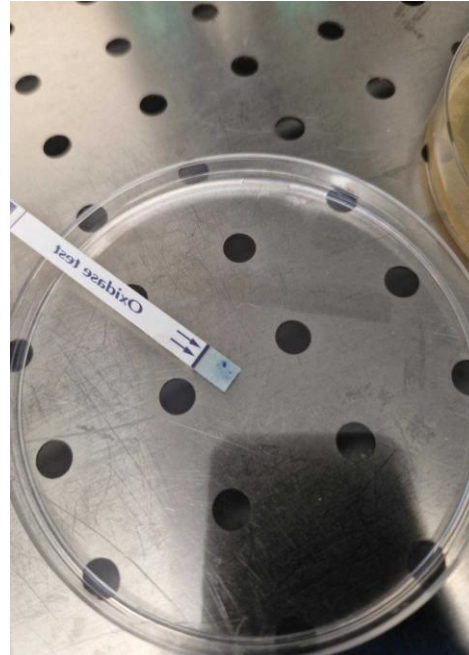
**EMB-Levine agar:** selettivo per *Gram*-. Gli enterobatteri sono in grado di fermentare il lattosio e il saccarosio presente nel terreno producendo colonie con riflessi metallici verdi (*E. coli*) o centri blu neri (*Klebsiella*). *Pseudomonas*, essendo incapace di fermentare questi zuccheri si sviluppa generando colonie incolore e trasparenti.

## Analisi microbiologiche sui prodotti cosmetici

### Esempio procedura qualitativa: Shampoo



**Cetrimide Agar:** terreno selettivo per l'identificazione di *P. aeruginosa*; un esito positivo comporta il viraggio del terreno per alcuni ceppi al colore giallo-verde (pioverdina).



**Test dell'Ossidasi:** verifica la presenza dell'enzima citocromo ossidasi che è presente nel genere *Pseudomonas* ma non nelle Enterobacteriacee (*E. coli*). Il test è positivo se di verifica un viraggio al blu-viola.



**MacConkey Agar:** terreno selettivo per l'identificazione di Gram-. *P. aeruginosa* in questo terreno appare traslucida ed incolore perché non è in grado di fermentare il lattosio.

# GRAZIE PER L'ATTENZIONE

*Quanto esposto è a titolo personale ed esonera l'Agenzia  
delle Dogane e dei Monopoli da qualsiasi responsabilità*