

Mikrobiološka bezbednost kozmetičkih proizvoda i potencijalni rizici za potrošače

Danina Krajišnik*, Ljiljana Đekić

Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet, Katedra za farmaceutsku tehnologiju i kozmetologiju, Vojvode Stepe 450, 11221 Beograd, Srbija

*Autor za korespondenciju: Danina Krajišnik, e-mail: danina.krajsnik@pharmacy.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Važeći evropski regulatorni okvir u oblasti kozmetičkih proizvoda zahteva od proizvođača da obezbede procenu mikrobiološkog kvaliteta (engl. microbial limits test) i ispitivanje efikasnosti konzervansa (test izazivanja/izazova, engl. challenge test), kao i da se podaci o mikrobiološkoj stabilnosti dokumentuju u izveštaju o bezbednosti. Tokom razvoja kozmetičkog proizvoda neophodno je razmotriti rizik od mikrobiološke kontaminacije pri izboru polaznih sirovina i pakovanja, proizvodnog postupka, kao i uslova čuvanja i upotrebe. Odstupanje mikrobiološkog kvaliteta kozmetičkog proizvoda od proizvođačke specifikacije predstavlja rizik po potrošače, a naročito ukoliko se primenjuju u predelu oka, na sluzokožama ili su namenjeni specifičnim grupama potrošača (deca mlađa od 3 godine, starije i imunokompromitovane osobe).

Ključne reči: kozmetički proizvodi, procena mikrobiološkog kvaliteta, test izazivanja/izazova, izveštaj o bezbednosti, rizici od mikrobiološke kontaminacije

Uvod

Milioni potrošača svakodnevno upotrebljavaju više različitih kozmetičkih proizvoda, u prvom redu, proizvode za čišćenje i negu kože i kose, kao i proizvode za ulepšavanje. Kozmetički proizvodi se primenjuju direktno na kosu, nokte, kožu (uključujući i područja oko očiju, nosa, urogenitalnog trakta), kao i eventualno oštećenu kožu (npr. posle brijanja), ili na oralnu sluzokožu. Premisa propisa u Evropskoj uniji i šire je da kozmetički proizvodi moraju biti bezbedni za korisnike kada se upotrebljavaju na uobičajeni način koji je prosečnom korisniku jasan (1). Ključan aspekt bezbednosti kozmetičkih proizvoda je da njihov mikrobiološki kvalitet i stabilnost moraju biti takvi da ne predstavljaju potencijalni rizik po zdravlje korisnika tokom celokupnog životnog ciklusa proizvoda. Mada kozmetički proizvodi nisu sterilni, ne smeju da budu kontaminirani patogenim mikroorganizmima, a sadržaj nepatogenih (saprofitnih) mikroorganizama mora biti na odgovarajućem (niskom) nivou. Proliferacija mikroorganizama u gotovom kozmetičkom proizvodu, kao i nastajanje njihovih metaboličkih proizvoda i endotoksina, predstavlja visok rizik za bezbednost potrošača i zahteva intervenciju regulatornih tela, u smislu povlačenja kontaminiranog proizvoda sa tržišta, što ima za posledicu narušavanje reputacije proizvođača i smanjenje očekivanog profita (2-4). Većina regulatornih tela prepoznaje kao potencijalno ugrožavajuće po zdravlje korisnika kozmetičkih proizvoda i zahteva odsustvo vrsta: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*, kao i *Aspergillus brasiliensis* (Ph. Eur.), a negde još i *Bacillus cereus*, zbog oftalmoloških infekcija. Neke potrošačke grupe (deca, naročito novorođenčad, stare osobe i one sa oslabljenim imunskim sistemom) su sklonije infekcijama oportunističkim patogenima (5). Ipak, Naučni komitet za bezbednost korisnika/potrošača (Scientific Committee on Consumer Safety, SCCP) u Vodiču za ispitivanje kozmetičkih sastojaka i procenu njihove bezbednosti¹ (Notes of Guidance for the testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation) navodi da čak i kozmetički proizvodi namenjeni deci mlađoj od 3 godine, kao i proizvodi za područje oko oka i za primenu na sluzokožama, mogu da budu kontaminirani saprofitnim mikroorganizmima do 200 CFU po g ili ml proizvoda (6). Prema podacima EU RAPEX (the Rapid Alert System for non-food consumer products) (7), za period od 2009. do 2014, najčešći kontaminanti kozmetičkih proizvoda (uglavnom proizvoda za čišćenje/pranje kože i kozmetičkih kremova i losiona) koji su bili razlog za njihovo povlačenje iz prometa, bili su: *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter gergoviae* i *Klebsiella pneumoniae*. To su primarno oportunistički patogeni mikroorganizmi i retko ugrožavaju zdrave korisnike, međutim kod novorođenčadi i imunokompromitovanih osoba (usled dijabetesa, kancera, HIV infekcije) moguće su ozbiljne infekcije (8, 9). *S. aureus* je sastavni deo fiziološke

¹ U nastavku rada biće označen kao SCCP Vodič

mikrobiote, ali i najčešći uzrok purulentnih infekcija kože, uključujući bulozni impetigo kod novorođenčadi (engl. *staphylococcal scalded skin syndrome*, SSSS) (10, 11). *P. aeruginosa*, *Serratia liquefaciens* i *Candida parapsilosis*, detektovani su u kozmetičkim kremovima za negu kože lica i tela. Ovi oportunistički patogeni su potencijalni izazivači iritacije kože i infekcija, naročito kada je epitel oštećen ili kod imunokompromitovanih pacijenata (12). Losioni, šamponi i kozmetički proizvodi dekorativne kozmetike za oko često su kontaminirani rodnom *Pseudomonas* (uglavnom, *P. aeruginosa* i *P. putida*) koji izazivaju infekcije oka i oštećenje rožnjače (13). Kozmetički proizvodi za kupanje i dekorativna kozmetika mogu da sadrže: *S. marcescens*, *Citrobacter freundii*, *P. putida*, *Enterobacter spp.* ili *Klebsiella spp.* (13). Kozmetički proizvodi mogu biti kontaminirani i vrstama *Bacillus anthracis* i *Clostridium tetani* (10). Senke za oči i maskare mogu biti kontaminirane *Staphylococcus spp.*, *P. aeruginosa* i *K. pneumoniae*, kao i *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Moraxella spp.*, *Neisseria spp.* (13), sa rizikom za razvoj infekcije oka (14). Najčešće gljivice u kremovima za ruke i losionima su *C. albicans*, *A. niger* i *A. fumigatus* kao i *Penicilium spp.*, a u velikom broju su prisutne i u maskarama i senkama za oči. Gljivice su, pored ostalog, uzročnici infekcija kose i noktiju (11). Endotoksini i metaboliti mikroorganizama mogu izazvati iritaciju i alergijske reakcije kože (12).

Izvori mikrobiološke kontaminacije kozmetičkih proizvoda

Posledica proliferacije mikroorganizama u kozmetičkim proizvodima je i degradacija sastojaka i narušavanje organoleptičkih karakteristika proizvoda koje se manifestuje kao vidljivo prisustvo mikroorganizama i/ili pojava neprijatnog mirisa, promena pH, teksture, viskoziteta ili boje, obezbojavanje, razrušavanje emulzionih sistema (11, 15-17). Na Slici 1 ilustrovane su značajne promene izgleda kozmetičkog proizvoda usled proliferacije mikroorganizama. Dva pakovanja krema za negu kože oko očiju, od kojih jedan koji sadrži konvencionalne konzervanse (levo), a drugi je bez konzervansa (desno), kontaminirani su sporama *A. brasiliensis* (1×10^6 spora) i inkubirani u toku 14 dana. Kod proizvoda bez adekvatne mikrobiološke zaštite uočena je pojava vidljive proliferacije plesni nakon 8 dana i vidljive promene u izgledu proizvoda nakon 14 dana, što predstavlja značajan rizik za sigurnost potročaša (2).



Uparedni prikaz dva pakovanja krema za područje oko očiju: sa konzervansom (levo) i bez konzervansa (desno). Kod krema sa konzervansom nije vidljiv razvoj plesni, dok je kod uzorka bez konzervansa došlo do značajnog razvoja plesni i promene njegovog izgleda.

Slika 1. Promene u kozmetičkom proizvodu usled proliferacije mikroorganizama (prilagodeno iz <http://www.youtube.com/watch?v=UPjoOQDyQMo/>).

Figure 1. Changes in the cosmetic product due to proliferation of microorganisms (adapted from <http://www.youtube.com/watch?v=UPjoOQDyQMo/>).

Rizik od kontaminacije kozmetičkog proizvoda prisutan je tokom proizvodnje i upotrebe. Mikrobiološka kontaminacija može da potiče od sirovina, proizvodnih postrojenja, skladištenja i transporta, naročito pod neodgovarajućim uslovima. Rizik za mikrobiološku kontaminaciju mora se razmotriti u svim aspektima razvoja kozmetičke formulacije uključujući izbor sastojaka i njihovih količina, naročito konzervisanje, dizajn proizvodnog postupka i izbor procesnih parametara, vrstu pakovanja, definisanje uslova čuvanja i upotrebe (2).

Uzimajući u obzir sastav i polazne supstance, većina kozmetičkih proizvoda je podložna mikrobiološkoj kontaminaciji, naročito formulacije koje sadrže surfaktante i vodu u značajnom procentu. Voda i sirovine životinjskog, biljnog i mineralnog porekla *per se* spadaju u glavne izvore bakterijske kontaminacije. Sa smanjenjem udela vode, smanjuje se brzina proliferacije i metabolička aktivnost mikroorganizama. Proizvodi sa sadržajem alkohola iznad 20%, dezodoransi, antiperspiransi i proizvodi u hermetički zatvorenim pakovanjima (npr. aerosoli) nisu pogodni za razvoj mikroorganizama (11, 18, 19).

Za prevenciju razvoja mikroorganizama neophodno je konzervisanje proizvoda. Konzervansi bi trebalo da štite proizvod od gram pozitivnih i gram negativnih bakterija i eukariotskih gljivica (20). Uglavnom se upotrebljavaju u niskim koncentracijama (<

1%), a pri izboru neophodno je razmotriti rastvorljivost u vodi i kompatibilnost sa ostalim sastojcima formulacije (21). Biljni ekstrakti, ugljeni hidrati, proteini, masne kiseline, aminokiseline, neki emulgatori, lipidi, gume i vitamini, predstavljaju hranljivu podlogu za mikroorganizme. S druge strane, polisorbati, lecitin, derivati celuloze, želatina, su inaktivatori konzervanasa. Bentonit, kalamina, karbonati, silicijum dioksid, cink oksid, talk i neki pigmenti, su adsorbensi konzervanasa, dok propilenglikol, EDTA, antioksidansi, etanol, pentilenglikol, etarska ulja, potenciraju antimikrobnu aktivnost nekih konzervanasa. Izbor konzervansa zavisi i od namene proizvoda, formulacionih parametara koji mogu uticati na aktivnost i efikasnost konzervansa kao što su pH, aktivnost vode, i klimatskog područja kojem pripada tržište na koje će biti plasiran (22). Efikasnost konzervansa u formulaciji se potvrđuje izvođenjem testa izazivanja tokom razvoja proizvoda gde se razmatra stopa uništavanja mikroorganizama nakon direktne inokulacije gotovog proizvoda i relevantnih sirovina velikim brojem izabranih indikatorskih mikroorganizama (23-27).

Pakovanje takođe može da utiče na podložnost kozmetičkog proizvoda za kontaminaciju (28). Npr. proizvod u primarnom pakovanju/kontejneru sa pumpicom zahteva manje konzervansa od krema u kozmetičkoj kutiji sa širokim otvorom, gde će potrošač dodirivati proizvod prstima prilikom svake primene. Odgovarajuće konzervisanje i pakovanja koja adekvatno štite sadržaj od kontaminacije (tuba, kontejner sa pumpicom ili uskim otvorom) povećavaju mogućnost da se nivo kontaminacije zadrži na prihvatljivom nivou tokom celokupnog perioda čuvanja i upotrebe proizvoda (28). Još u toku razvoja proizvoda neophodno je da se proceni kompatibilnost formulacije sa pakovanjem, rok upotrebe, efikasnost konzervansa i dr.

Mikroorganizmi prisutni u proizvodnim postrojenjima su obično u većoj meri rezistentni na biocide u odnosu na referentne laboratorijske sojeve. U sistemima za prečišćavanje vode i opremi koja nije prikladna, brzo se razvija biofilm koji često sadrži Gram negativne bakterije kao što je *B. cepacia*, koja je vrlo prilagodljiva i razvija rezistenciju na konzervanse (2).

Tokom skladištenja i transporta, naročito u toplijim i vlažnim predelima/razdobljima godine ili pod neodgovarajućim uslovima čuvanja, prisutan je visok rizik za proliferaciju mikroorganizama, posebno u zemljama koje ne primenjuju odgovarajuće standarde u proizvodnji kozmetičkih proizvoda (29-31). Tamalli i sar. (2015) (17) utvrdili su da su kozmetički proizvodi za područje oko očiju u većoj meri kontaminirani bakterijama nego gljivicama. Kontaminacija kod ispitivanih proizvoda sa tržišta Jordana bila je posledica neodgovarajućih uslova u proizvodnom postupku (proizvođači ne primenjuju GMP standarde), loše higijene, kontaminacije polaznih materijala i podložnost sastojaka kontaminaciji. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Penicillium spp.*, *A. fumigatus* i *C. albicans* bili su prisutni u maskarama, olovkama za usne i oči, u različitom stepenu. Birteksöz i sar.

(2013) (32) su u ispitivanju 93 proizvoda (šamponi, gelovi za tuširanje, antiperspiransi, proizvodi za negu kože beba, za zaštitu kože od sunca, dezodoransi i dr.) sa turskog tržišta, tokom 2013. godine, izolovali kontaminante iz većine (79) ispitivanih proizvoda, detektovali su brojne oportunističke patogene uključujući *B. cepacia*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*, a u nekim proizvodima (hidrantni kremovi za negu kože lica) i kvasnice i plesni.

Potrošači većinu kozmetičkih proizvoda čuvaju u kupatilu, gde su temperatura i vlaga povišene, što pogoduje razvoju mikroorganizama (12). U studiji Okeke i Lamikanra (2001) (16) ispitivan je mikrobiološki kvalitet kremova i emulzija za negu kože sa tržišta zemalja u razvoju u tropskim predelima. Najčešće izolovani bili su *E. coli*, *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.* i *Bacillus spp.* Razlog je neadekvatna efikasnost konzervansa ili kontaminacija od strane potrošača tokom korišćenja. Takođe, prilikom korišćenja kozmetički proizvod je izložen sekundarnoj kontaminaciji. Rizik je srazmeran načinu na koji korisnik upotrebljava proizvod, uslovima pod kojima ga čuva, vrsti i veličini pakovanja, dužini trajanja upotrebe i broju korisnika koji koriste jedan proizvod (33). Npr. losioni i kremovi u kutijama sa širokim otvorom su podložni sekundarnoj kontaminaciji (obično *P. aeruginosa* i *S. aureus*) (34), uglavnom preko ruku korisnika. Bolju zaštitu pružaju kontejneri sa uskim otvorom, poželjno, iz kojih se sadržaj istiskuje. Campana i sar., (2006) (35) ispitivali su kontaminaciju u 91 proizvodu sa tržišta (23 emulzije tipa u/v) i 68 proizvoda za pranje kose i kože na bazi sintetskih deterdženata) iz tri kategorije (nekorišćeni, tokom upotrebe (posle 14 dana) i po završetku korišćenja). U svim slučajevima kontaminacija je postojala nakon završetka korišćenja proizvoda. Samo u jednom slučaju (šampon) utvrđena je kod proizvoda i tokom upotrebe. Takođe, ispitivana je i potvrđena dugoročna efikasnost sistema konzervansa koji su korišćeni u dva proizvoda, pa je pretpostavljeno da je kontaminacija verovatno potekla od ruku korisnika. Broj aerobnih mezofilnih bakterija u 55 ispitivanih proizvoda iz 19 različitih kategorija (koje je koristila jedna osoba, više osoba ili im je istekao rok trajanja) bio je ispod nivoa osetljivosti metode $1,3 \times 10^7$ CFU/g ili ml. *Staphylococcus spp.* detektovan je u 11 (20%) ispitivanih proizvoda i *P. aeruginosa* u jednom uzorku. *C. albicans* nije detektovana, a *Aspergillus spp.* i *Penicillium spp.* od $0,5 \times 10^1$ do $1,5 \times 10^1$ CFU/g ili ml su detektovani kod 4 proizvoda. Nivo mikrobiološke kontaminacije kozmetičkih proizvoda bio je viši kod uzoraka koji je koristio veći broj osoba, u odnosu na one koje je upotrebljavala samo jedna osoba. Kozmetički proizvodi sa isteklim rokom trajanja bili su kontaminirani u najvećoj meri. Ravita i sar., (2009) (36) ispitivali su mikrobiološku kontaminaciju 96 proizvoda sakupljenih od potrošača u SAD. Kod 55% proizvoda za oči i lice i 77% maskara broj mikroorganizama je premašivao 500 CFU/g ($P < 0,1814$ i $P < 0,024$). Najzastupljeniji bili su: *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium spp.*, i kvasnice. Među

kontaminiranim proizvodima, 88% bili su konzervisani uobičajenim konzervansima, kao što su: parabeni, sorbinska kiselina, benzojeva kiselina, benzil alkohol, fenoksietanol, benzalkonijum hlorid, triklozan, hlorfenezin, dehidrosirćetna kiselina, hlorheksidin diglukonat.

EU Uredbom 1223/2009 zahteva se da proizvođač mora da navede informacije o mikrobiološkoj stabilnosti u *Izveštaju o bezbednosti kozmetičkog proizvoda* (poglavlje III/član11/stav 2/b) koji je deo Dosijea o kozmetičkom proizvodu (Product Information File, PIF – Part A). Deo A PIF-a sadrži podatke potrebne da se jasno identifikuje i kvantifikuje kozmetički proizvod, dokazane opasnosti, kao i rizike koje kozmetički proizvod može predstavljati po zdravlje ljudi, uključujući mikrobiološki kvalitet. Zahtevi koji su ovde navedeni u pogledu mikrobiološkog kvaliteta su: *Mikrobiološki kvalitet: Mikrobiološke specifikacije za supstance ili mešavine i kozmetičke proizvode. Naročita pažnja treba da bude usmerena na kozmetičke proizvode za primenu oko očiju, na sluzokožu, oštećenu kožu, kao i proizvode koji su namenjeni starijim osobama i imunokompromitovanim osobama.* Na osnovu podataka o fizičko-hemijskoj i mikrobiološkoj stabilnosti kozmetičkog proizvoda pod određenim uslovima skladištenja i ostalih informacija o kozmetičkom proizvodu koje se navode u delu A, u delu B ovog izveštaja donosi se zaključak o bezbednosti od strane *kvalifikovanog procenitelja bezbednosti* sa obrazloženjem i konstatuju eventualna upozorenja i uputstva za upotrebu koje bi trebalo naznačiti na etiketi proizvoda (1).

Ključni preduslov za bezbednost i kvalitet kozmetičkog proizvoda je da se njegova proizvodnja odvija u skladu sa Smernicama dobre proizvođačke prakse (Good manufacturing practice, GMP). Član 8. Uredbe 1223/2009 zahteva usklađenost proizvodnje kozmetičkog proizvoda sa relevantnim GMP smernicama/standardom (37). Uredba 1223/2009 ne zahteva dobijanje sertifikata, već se samo očekuje usklađenost. Izjava o usaglašenosti sa GMP zahtevima je deo PIF dokumenta. U članu 22. Uredbe 1223/2009 od država članica EU se eksplicitno zahteva nadzor usklađenosti sa principima GMP zahteva (1).

Smernice GMP koje su direktno povezane sa obezbeđenjem mikrobiološkog kvaliteta proizvoda, odnose se na kontrolu kvaliteta polaznih sirovina (naročito onih prirodnog porekla, za proizvode za oči) i pakovnog materijala pre korišćenja u proizvodnji, kontinuiranu kontrolu kvaliteta vode, korišćenje prethodno validiranih sistema konzervanasa, efikasno čišćenje prostorija (površina i prečišćavanje vazduha) i opreme validiranim postupcima, higijenu osoblja koje je uključeno u postupak proizvodnje (uz odgovarajuću obuku), kontrolu kvaliteta gotovog proizvoda i uslove skladištenja polaznih materijala i gotovog proizvoda (2). Sistem konzervansa se validira tokom razvoja proizvoda obično izvođenjem testa izazivanja ili drugog pogodnog ispitivanja (5).

Iako nije moguće isključiti sve rizike i proizvesti kozmetički proizvod apsolutno bezbedan po korisnika, neophodno je sprovesti niz GMP principa sa ciljem da se rizici svedu na najmanju moguću meru. Kompanije koje se bave proizvodnjom kozmetičkih proizvoda tradicionalno sprovode internu obuku novih mikrobiologa, kako bi se upoznali sa specifičnim rizicima u pogledu mikrobiološkog kvaliteta, koji su svojstveni tom proizvođaču.

Generalno, ozbiljni incidenti vezani za bezbednost kozmetičkih proizvoda su retki, naročito od uvođenja jasnih regulatornih zahteva, uključujući usaglašenost proizvodnje sa GMP. Pre uvođenja ovih propisa infekcije putem kozmetičkih proizvoda, uglavnom gram negativnim mikroorganizmima, javljale su se češće (5). Poslednjih godina, retke infekcije ovog porekla javile su se uglavnom kod hospitalizovanih osoba (38).

Ispitivanje mikrobiološkog kvaliteta kozmetičkog proizvoda

Prema Vodiču za pripremu izveštaja o bezbednosti kozmetičkog proizvoda (Guidelines on Annex I to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products)(39) u delu 3.3. *Mikrobiološki kvalitet* navodi se da je cilj ovog dela Izveštaja o bezbednosti kozmetičkih proizvoda da odrede prihvatljive mikrobiološke specifikacije sirovina (supstanci ili smeše) i gotovog proizvoda sa mikrobiološkom stanovišta. U skladu sa Aneksom I Uredbe 1223/2009 (1), posebna pažnja posvećuje se mikrobiološkim specifikacijama kozmetičkih proizvoda namenjenih za primenu na osetljivim delovima tela i kod specifičnih populacija. Pored toga, informacije o mikrobiološkom kvalitetu su od suštinskog značaja za potvrdu efikasnosti konzervisanja i potvrdu naznačenog minimalnog roka trajanja kozmetičkog proizvoda koji se čuva pod odgovarajućim uslovima, kao i perioda nakon otvaranja (engl. *Period After Opening*, PAO) u smislu sigurnosti. Mikrobiološke specifikacije sirovina (supstanci ili smeše) i kozmetičkog proizvoda treba da budu deo procene bezbednosti. Posebnu pažnju treba posvetiti mikrobiološkim specifikacijama kozmetičkih proizvoda namenjenih za upotrebu oko očiju, na mukoznim membranama uopšte, na oštećenoj koži (npr. proizvodi za negu kože pogodni za primenu kod atopične ili iritirane kože), dece mlađe od 3 godine, kod starijih ljudi ili osoba sa kompromitovanim imunološkim odgovorom. Glavni parametri za mikrobiološki kvalitet su izvorni nivo kontaminacije i mogućnost rasta mikroorganizama. Posebnu pažnju treba obratiti na sirovine (supstance i smeše) koje su najpodložnije rastu mikroorganizama (npr. mešavine na bazi vode, sirovine bogate proteinima, sirovine biljnog ili životinjskog porekla), dok sirovine kao što su npr. organski rastvarači nisu pogodne za razvoj mikroorganizama. U delu koji se odnosi na mikrobiološki kvalitet finalnog kozmetičkog proizvoda navodi se da se prema riziku za podložnost mikrobiološkoj kontaminaciji razlikuju tri kategorije proizvoda:

(1) Proizvodi sa malim rizikom za mikrobiološku kontaminaciju (npr. proizvodi koji sadrže > 20% alkohola, proizvodi na bazi organskih solvenasa, proizvodi visoke/niske pH vrednosti, za koje nisu neophodni ni test izazova/procena efikasnosti konzervisanja niti testiranje mikrobiološkog kvaliteta. Međutim, potrebno je naučno opravdanje.

(2) Proizvodi za jednokratnu upotrebu i proizvodi koji ne moraju da se otvaraju (npr. za koje pakovanje dozvoljava primenu proizvoda bez dolaska u kontakt sa vazduhom), dovoljan je samo test mikrobiološkog kvaliteta finalnog proizvoda. Međutim, potrebno je naučno opravdanje.

(3) Svi ostali proizvodi, za koje su neophodni i procena mikrobiološkog kvaliteta i procena efikasnosti konzervisanja (*challenge test*).

Prema Vodiču SCCP (6) u smislu postavljenih granica za kontrolu mikrobiološkog kvaliteta kozmetičkih proizvoda razlikuju se dve kategorije proizvoda:

- *Kategorija 1*: Proizvodi specifično namenjeni deci mlađoj od 3 godine, za primenu u predelu oka i na mukoznim membranama
- *Kategorija 2*: Ostali proizvodi.

Da bi se obezbedio kvalitet proizvoda i sigurnost za potrošača, potrebno je izvršiti rutinsku mikrobiološku analizu svake serije gotovog proizvoda koji dolazi na tržište. U nekim opravdanim slučajevima (npr. sadržaj alkohola > 20%), testiranje finalnih proizvoda nije neophodno (4). Ispitani parametri, kriterijumi i metode koje se koriste, kao i dobijeni rezultati po seriji treba da budu navedeni u ispravno podnesenim izveštajima i dodati u TIF (engl. *Technical Information File*) (6).

Opšta uputstva za izvođenje ispitivanja mikrobiološkog kvaliteta kozmetičkog proizvoda, uključujući zahteve za kvalitet prostorija i uređaja za izvođenje ispitivanja, pripremu reagenasa i medijuma za kultivisanje, uzorkovanje i tumačenje rezultata mogu se naći u vodiču ISO 21148 (40). Mikrobiološko ispitivanje se generalno izvodi korišćenjem metoda kultivisanja sa odgovarajućim standardnim medijumima i dodatnim obogaćenim medijumima. Odgovarajući standardi za testiranje definišu parametre kao što su: medijum za kultivisanje, količina uzorka koja se ispituje, razblaživanja rastvora, itd.

Tokom ispitivanja mikrobiološkog kvaliteta nekog proizvoda sprovode se kvantitativne procedure (izražavanje rezultata: broj mikroorganizama po ispitivanoj količini uzorka) i kvalitativne procedure (izražavanje rezultata: mikroorganizmi prisutni ili odsutni u određenoj količini proizvoda). Za proizvode sa zanemarljivom količinom mikroorganizama rezultat je obično <10 CFU/g ili odsustvo mikroorganizama po 1 g proizvoda (CFU / g = broj kolonija po gramu proizvoda). Sprovođenje ispitivanja u različitim fazama tokom procesa proizvodnje može pružiti važne informacije o mestu ili vremenu mikrobiološke kontaminacije. Ukoliko dođe do razvoja mikroorganizama,

uvek ih je potrebno identifikovati jer određivanje vrste bakterije, kvasnice ili plesni do nivoa roda ili vrste može ukazati na izvor kontaminacije (19).

Metode za brojanje kolonija i uputstva za ispitivanje specifičnih mikroorganizama date su u navedenim vodičima:

- Aerobne mezofilne bakterije (kvasnice i plesni takođe detektabilne) (41);
- Specificirani i nespecificirani mikroorganizmi (42);
- Kvasnice i plesni (43);
- *C. albicans* (44);
- *E. coli* (45);
- *P. aeruginosa* (46);
- *S. aureus* (47).

Mikrobiološki standardi i granične vrednosti

Preciziranje mikrobiološke specifikacije je obaveza proizvođača, iako još uvek ne postoji jedinstveni zahtev za granične vrednosti mikrobiološke kontaminacije. Zbog toga od pomoći mogu biti npr. ISO 17516 (48), farmakopeje, vodiči različitih kozmetičkih udruženja i sl. (Tabela I).

Tabela I Zahtevi za mikrobiološki kvalitet kozmetičkih proizvoda

Table I Microbiological requirements of cosmetic products

	Broj mikroorganizama (CFU/g ili CFU/ml)	Specifikovani mikroorganizmi
ISO 17516 (48)	Deca mlađa od 3 godine, proizvodi za primenu u predelu oka, mukozne membrane: ≤100 Ostali proizvodi: ≤1000	Odsustvo po 1 g ili ml: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i>
SCCS Vodič (6)	Deca mlađa od 3 godine, proizvodi za primenu u predelu oka, mukozne membrane: ≤100 (Kategorija 1) Ostali proizvodi: (Kategorija 2): ≤1000	Odsustvo po 1 g ili ml: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Candida albicans</i> <i>Escherichia coli</i>
Farmakopejski testovi (52, 53)	Preparati za primenu na koži: TAMC (<i>Total Aerobic Microbial Count</i>): ≤100 TYMC (<i>Total Combined Yeast and Mould Count</i>): ≤10	Preparati za primenu na koži Odsustvo po 1 g ili ml: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Staphylococcus aureus</i>

Preporuka je da se pored navedenih, u zavisnosti od sirovina i proizvodnih procesa koriste i drugi mikroorganizmi. Rezultati ispitivanja mikrobiološkog kvaliteta moraju biti sagledani uzimajući u obzir sve aspekte kozmetičkog proizvoda (sastav proizvoda, način primene, vrsta pakovanja, itd.), pošto svi ovi faktori mogu promovisati ili usporiti rast mikroorganizama (19).

Procena efikasnosti konzervisanja

Efikasnost konzervisanja treba da bude eksperimentalno procenjena u toku razvoja kozmetičkog proizvoda kako bi se obezbedila mikrobiološka stabilnost proizvoda u toku čuvanja i primene. Test je obavezan za sve kozmetičke proizvode koji su pri normalnim uslovima čuvanja i primene podložni razvoju mikroorganizama i predstavljaju rizik za infekciju potrošača.

Provera mikrobiološke stabilnosti izvodi se pomoću *Testa izazivanja* - „Challenge test”-a (sinonimi „Testing for efficacy of antimicrobial preservation” i „Assessment of antimicrobial protection”) (6,19). Ispitivanje antimikrobne efikasnosti konzervanasa po prvi put je uvedeno u 18. izdanje Američke farmakopeje (1970. godine) i bilo je predviđeno za procenu efikasnosti konzervanasa u slučaju kontaminacije proizvoda u toku procesa proizvodnje. Primenom principa Dobre proizvođačke prakse u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji smanjena je mogućnost ovakve kontaminacije proizvoda, a svrha ispitivanja je procena efikasnosti konzervisanja odnosno smanjenje kontaminacije proizvoda u toku čuvanja i upotrebe (49, 50).

EU Uredba 1223/2009 u okviru Aneksa I navodi da je neophodno priložiti rezultate testa izazivanja u cilju potvrde mikrobiološke stabilnosti proizvoda, ali ne navodi postupak njegovog izvođenja. Preporuke za izvođenje testa izazivanja na kozmetičkim proizvodima (zasnovane na odgovarajućim testovima u izdanjima Evropske i Američke farmakopeje iz 2014. godine) navode se u SCCP Vodiču (6).

Test se sastoji od veštačke kontaminacije finalnog proizvoda, nakon koje sledi procena da li je nivo smanjenja obezbedio mikrobiološke granice za proizvode kategorije 1 i 2.

Mikroorganizmi koji se koriste u testu izazivanja mogu se izdati iz zvaničnih srodnih kolekcija iz bilo koje države u EU da bi se obezbedila obnovljivost testa i to su: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* i *A. brasiliensis*.

Dobro je poznato da se konzistentnost ispitivanja ovim testom više oslanja na sposobnost korišćenih mikroorganizama da kontaminiraju određeni kozmetički proizvod nego na taksonomski status mikroorganizama, njihove početne koncentracije ili uslove inkubacije i upotrebljene medijume. Mikroorganizmi sa sposobnošću kontaminacije određenih vrsta kozmetičkih proizvoda su najbolji kandidati za upotrebu u testu izazivanja. Mikrobicidna aktivnost konzervansa ili bilo kojeg drugog sastojka u

gotovom kozmetičkom proizvodu mora biti isključena u testu izazivanja razređivanjem, filtriranjem, dodatkom neutralizatora ili na neki drugi način. Eksperimentalne performanse mikrobioloških kontrola i testova izazivanja moraju biti sprovedene/nadgledane i potvrđene od strane mikrobiologa.

Odgovorna osoba mora da garantuje efikasnost konzervisanja svojih proizvoda na osnovu eksperimentalnog izvođenja testa izazivanja. Međutim, pošto trenutno nije dostupan zakonski ili univerzalni metod izvođenja ovog testa, odgovorna osoba odlučuje o detaljima testa koji će se koristiti (6).

Test pruža dokaze da je sistem konzervisanja efikasan i predstavlja standardnu metodu ispitivanja mikrobiološke stabilnosti tokom perioda čuvanja i upotrebe kozmetičkog proizvoda (19). Rezultati ovog testa su obavezni deo Izveštaja o bezbednosti kozmetičkog proizvoda (prema EU Uredbi 1223/2009), a uz dodatne neophodne podatke (koji se odnose na upotrebene konzervanse, fizičku stabilnost proizvoda, ambalažu, način primene, iskustva sa sličnim proizvodima, itd.) predstavljaju važan deo procesa određivanja PAO.

Kao što je navedeno, EU Uredba 1223/2009 i SCCP Vodič (6) ne daju preporuke za konkretan test kojim se može ispitati efikasnost očuvanja mikrobiološke čistoće kozmetičkog proizvoda (efikasnost konzervisanja). U kozmetičkoj industriji se za izvođenje testa izazivanja uobičajeno koriste sledeći testovi (50, 51):

1. Farmakopejski testovi
 - a. Ph. Eur. 9.0 - 5.1.3 „*Efficacy of Antimicrobial Preservation*” (52)
 - b. USP 40 (51) „*Antimicrobial Effectiveness Testing*” (53)
2. ISO standard:
ISO 11930 „*Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product*” (23)
3. Specifični vodiči:
 - 3.1 *The Personal Care Products Council*² vodiči (24-27, 54)
 - a. *M-3 Method for Preservation Efficacy Testing of Water-Miscible Personal Care Products* (sin. CTFA M-3)
 - b. *M-4 Method for Preservation Efficacy Testing of Eye Area Personal Care Products* (sin. CTFA M-4)
 - c. *M-5 Methods for Preservation Efficacy Testing of Nonwoven Substrate Personal Care Products* (sin. CTFA M-5)
 - d. *M-6 A Method for Preservation Efficacy Testing of Atypical Personal Care Products* (sin. CTFA M-6)

² *The Personal Care Products Council*- (bivša Cosmetics, Toiletries, and Fragrance Association, CTFA)

- e. *M-7 A Rapid Method for Preservation Testing of Water-Miscible Personal Care Products* (sin. *CTFA M-7*)

3.2 ASEAN³ vodič:

- a. *Preservative efficacy test for cosmetic product, Document N° ACM MAL 08 (55)*

4. *In-house* test protokoli (56):

- a. Schülke KoKo test „*Determination of the Preserving Effect of Chemical Preservatives in Cosmetic Formulations*”
- b. Schülke FeuTuKo test „*Method to Determine the Preserving Effect of Chemical Preservatives in Wet Tissues*”

5. Ostali testovi izazivanja:

Metoda D-vrednosti; Test mešane kulture (50, 57); Metoda za ispitivanje senki za oči u prahu (58) i dr.

Prema Ph. Eur. 9.0 (52), *Test na efikasnost konzervisanja* se sastoji od „izazivanja” preparata, kad god je to moguće, u finalnoj ambalaži, propisanim inokulumom podesnim mikroorganizmima, čuvanja inokulisanog preparata na propisanoj temperaturi, uzimanja uzoraka iz pakovanja u određenim vremenskim intervalima i brojanja mikroorganizama koji su otkriveni u uzorcima. Antimikrobna svojstva preparata su adekvatna ukoliko u uslovima testiranja, postoji značajan pad ili ne postoji porast broja mikroorganizama u inokulisanom preparatu posle propisanog vremenskog perioda i na propisanim temperaturama.

Za ispitivanje proizvoda koji se rastvaraju ili se mešaju sa vodom kao što su šamponi, losioni, kremovi i sl. uobičajeno se koriste farmakopejske metode, KoKo test, CTFA-3, CTFA-4 ili ASEAN testovi. ISO standard 11930 (23) pruža sveobuhvatni pristup ispitivanju antimikrobne zaštite kozmetičkog proizvoda i koristi se često kao referentni test. Izvođenje testa nije neophodno za kozmetičke proizvode kod kojih je utvrđen mali rizik od mikrobiološke kontaminacije u skladu sa ISO standardom 29621 (4). Primeri su proizvodi za jednokratnu upotrebu, proizvodi sa pH vrednošću ≤ 3 i ≥ 10 , proizvodi sa visokim sadržajem alkohola (više od 20%), proizvodi koji se pune pri temperaturi ≥ 65 °C, proizvodi u jednodoznom pakovanju ili pakovanju koje se ne može otvoriti, itd.

U Tabeli II dat je uporedni prikaz mikroorganizama koji se koriste u različitim testovima izazivanja.

³ Asocijacija nacija jugoistočne Azije (*Association of Southeast Asian Nations*)

Tabela II Mikroorganizmi koji se koriste u testu izazivanja (prilagođeno iz referenci 51-53)

Table II Microorganisms used for challenge testing (adapted from the references 51-53)

	SCCS	Ph. Eur.	USP <51>	ISO 11930	CTFA M-3	CTFA M-4	ASEAN	KoKo
Bakterije								
<i>Acinetobacter species</i>						≥ 1		
<i>Bacillus subtilis</i>								
<i>Burkholderia cepacia</i>					≥ 1	≥ 1		
<i>Enterobacter aerogenes</i>							+	
<i>Enterobacter cloacae</i>					≥ 1	≥ 2		
<i>Enterobacter gergoviae</i>					≥ 1	≥ 2		+
<i>Escherichia coli</i>		(+)	+	+	≥ 1			+
<i>Flavobacterium species</i>						≥ 1		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>					≥ 1	≥ 2		+
<i>Kocuria rhizophila</i>								+
<i>Proteus species</i>						≥ 2		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	≥ 1	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>					≥ 1	≥ 1		+
<i>Pseudomonas putida</i>					≥ 1	≥ 1		+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	≥ 1	≥ 1	+	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>					≥ 1	≥ 1		
Gljivice								
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	(+)	≥ 1	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>						≥ 1		
<i>Aspergillus brasiliensis</i>		+	+	+	≥ 1	≥ 1	+	+
<i>Penicillium luteum</i>						≥ 1		
<i>Penicillium pinophilum</i>								+
<i>Penicillium species</i>					≥ 1			+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>		(+)						
Specifični mikroorganizmi za koje je poznato da mogu kontaminirati kozmetički proizvod	+	(+)			(+)	(+)		+
Legenda	+	obavezna upotreba						
	(+)	opciono						
	≥ 1	≥ 1	≥ 1	≥ 1	≥ 1	≥ 1	najmanje jedna od ovih grupa	
	≥ 2	najmanje dve od ovih grupa						

Prema farmakopejskim (Ph. Eur. i USP) testovima, standard ISO 11930 i ASEAN vodiču koriste se samo patogeni mikroorganizmi što samo delimično odgovara preporuci SCCS (2016) prema kojoj treba koristiti i dodatne mikroorganizme za koje je poznato da mogu kontaminirati kozmetičke proizvode. Takođe, prema navodima Ph. Eur. „koriste se pojedinačni sojevi i naznačeni mikroorganizmi se dopunjavaju, ako je to pogodno, sa drugim sojevima ili vrstama koje mogu da predstavljaju verovatne kontaminante preparata” (52).

Prema CTFA smernicama, metode ispitivanja razlikuju se između proizvoda koji se primenjuju oko oka i drugih kozmetičkih proizvoda. Poznato je da je ispitivanje kozmetičkih proizvoda za područje oko oka izuzetno važno kako bi se osigurala sigurnost potrošača. Oči su uobičajeno podložne infekciji vrstama kao što su *Pseudomonas spp.* koje se mogu naći u kozmetičkim proizvodima koji nisu pravilno čuvani. Tako je prema smernici CTFA-4 preporuka da se testiranje izvodi sa više vrsta mikroorganizama i da se opciono izvrši i reinokulacija uz inkubaciju u dužem vremenskom periodu (do 3 nedelje nakon reinokulacije). Smernice CTFA obuhvataju u svojim listama tipične mikroorganizme koji kontaminiraju proizvode; oni se mogu testirati umesto ili uz patogene vrste (51, 54).

Schülke KoKo test je posebno prilagođen proceni efikasnosti konzervisanja kozmetičkih proizvoda. Spektar bakterija sadrži tipične mikroorganizme koji kontaminiraju proizvod, pored patogenih mikroorganizama, koji se navode u SCCP Vodiču. Inokulacijom spektra mešovityh mikroorganizama, moguć je simbiotski rast kao u prirodnim uslovima. Da bi se obezbedila detekcija bakterija i gljivica, testovi se sprovode na tripton soja agaru, kao i na *Sabouraud* dekstroznom agaru. Pogrešna procena efikasnosti konzervansa inhibicijom rasta jednog mikroorganizma rastom drugih mikroorganizama nije moguća, jer rast mikroorganizama znači da uzorak nije dovoljno konzervisan (59).

Schülke FeuTuKo test je posebno osmišljen za ispitivanje efikasnosti konzervisanja vlažnih maramica. Po sprovođenju ispitivanja prema navedenom testu, uzorak se može smatrati dobro očuvanim, ukoliko prođe vremenski period od tri nedelje u predviđenim laboratorijskim uslovima bez uočavanja rasta mikroorganizama. Višegodišnje iskustvo u primeni ovog testa, prema navodima proizvođača (Schülke & Mayr GmbH, Nemačka) (56) potvrđuje mikrobiološku stabilnost od 30 meseci.

Kriterijumi prihvatljivosti, u smislu smanjenja broja mikroorganizama tokom vremena, su različiti prema vrsti preparata u odnosu na nameravani stepen zaštite (Tabela III).

Tabela III Kriterijumi prihvatljivosti testa izazivanja (prilagođeno iz reference 51)

Table III Criteria of acceptance for challenge testing (adapted from the reference 51)

Kriterijumi		Vrste	Logaritamska redukcija							
			2 d	7 d	14 d	21 d	28 d	35 d	42 d	
Ph. Eur.	A	Bakterije	≥2	≥3	-	-	NI	-	-	
	B		-	-	≥3	-	NI	-	-	
USP <51>			-	-	≥2	-	NI	-	-	
CTFA M-3			-	≥2	NI	NI	NI	-	-	
CTFA M-4			-	≥3	CR	CR	CR*	-	-	
ASEAN			-	≥3	NI	NI	NI	-	-	
KoKo	A		-	≥4	≥4	≥4	≥4	≥4	≥4	
	B		-	≥3	≥3	≥3	≥3	≥3	≥3	
ISO 11930	A		-	≥3	NI	-	NI	-	-	
	B		-	-	≥3	-	NI	-	-	
Ph. Eur.	A	Gljivice	-	-	≥2	-	NI	-	-	
	B		-	-	≥1	-	NI	-	-	
USP <51>			-	-	NI	-	NI	-	-	
CTFA M-3			-	≥1	NI	NI	NI	-	-	
CTFA M-4			-	≥1	CR	CR	CR	-	-	
ASEAN			-	NI	NI	NI	≥1	-	-	
KoKo	A		-	≥3	≥3	≥3	≥3	≥3	≥3	
	B		-	≥2	≥2	≥2	≥2	≥2	≥2	
ISO 11930	A		Kvasnice	-	≥1	NI	-	NI	-	-
	B			-	-	≥1	-	NI	-	-
ISO 11930	A	Plesni	-	-	≥0	-	≥1	-	-	
	B		-	-	≥0	-	NI	-	-	
Legenda		-	Ne izvodi se							
		NI	Nema porasta							
		CR	Kontinuirana redukcija							
		CR*	Kontinuirana redukcija, ispod granice detekcije							

Ukoliko se uporede protokoli, Evropska farmakopeja daje najstrože kriterijume dok su ISO procedure najprilagođenije kozmetičkoj industriji; test mešane kulture je koristan u istraživanju i razvoju proizvoda i njegova prednost je ekonomičnost (57).

Zaključak

Uredbom EC 1223/2009 zahteva se od proizvođača da obezbede procenu mikrobiološkog kvaliteta (engl. *Microbial limits test*) i ispitivanje efikasnosti konzervansa (test izazivanja/izazova, engl. *Challenge test*), kao i da se podaci o mikrobiološkoj stabilnosti dokumentuju u Izveštaju o bezbednosti (deo PIF-a). Proizvođač ili odgovorna osoba imaju relativno visok stepen slobode da vrše izbor metoda, vrste i stepena ispitivanja kozmetičkog proizvoda. Mikrobiološka ispitivanja moraju biti zasnovana na odgovarajućoj analizi rizika za dati kozmetički proizvod, pri čemu su od najvećeg značaja sledeći faktori: i) namena/deo tela na koji će se primenjivati kozmetički proizvod (koža, kosa, predeo oko oka, sluzokoža); ii) potrošači kojima je kozmetički proizvod namenjen (odrasli, deca, deca mlađa od 3 godine, osobe sa oslabljenim imunskim sistemom); iii) potencijalna patogenost detektovanih mikroorganizama; iv) potencijalne promene kozmetičkog proizvoda tokom upotrebe. Pored opštih faktora, rizik od mikrobiološke kontaminacije zavisi i od individualnih karakteristika kozmetičkih proizvoda. Uslovi proizvodnje, karakteristike pakovanja i moguće preporuke/uputstvo za upotrebu kozmetičkog proizvoda takođe mogu imati značaj. Generalno, procena potencijalnih mikrobioloških rizika za određene kozmetičke proizvode vrši se uvek od slučaja do slučaja. Standardi ISO 29621, ISO 21148, ISO 17516 i ISO 11930 koji se odnose na mikrobiološki kvalitet kozmetičkih proizvoda imaju veliki praktični značaj. Od uvođenja jasnih regulatornih zahteva, uključujući usaglašenost proizvodnje sa GMP zahtevima, izbegnuta je pojava ozbiljnih incidenata vezanih za bezbednost kozmetičkih proizvoda. Poslednjih godina, retke infekcije ovog porekla javile su se uglavnom kod hospitalizovanih i imunokompromitovanih osoba, novorođenčadi i dece do 3 godine starosti.

Literatura

1. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 Nov 2009 on cosmetic products (consolidated version of 01/08/2018 available from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02009R1223-20180801>).
2. Geis PA, Krowka JF. The microbiology of personal care and cosmetic products. [Internet] SIMB NEWS 2013 Nov/Dec;63(6):197-201. [cited 2018 Sep 19]. Available from: <http://www.simbhq.org/docs/simbnews/SNND2013.pdf>
3. Microbiological Guidelines – Section 12: establishing microbial quality of cosmetic products. CTFA (Cosmetics, Toiletry, and Fragrance Association), 2007.

4. International Standard ISO 29621. Cosmetics – Microbiology – Guidelines for the risk assessment and identification of microbiologically low-risk products. ISO (International Organization for Standardization), 2010.
5. Stewart SE, Parker MD, Amézquita A, Pitt TL. Microbiological risk assessment for personal care products. *Int J Cosmet Sci.* 2016;38:634-45.
6. The SCCP Notes of Guidance for the testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation. [Internet] SCCS/1564/15 Revised version of 25 April 2016 [cited 2018 Sep 19]. Available from: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_190.pdf
7. Rapid Alert System for dangerous non-food products. [Internet] European Commission [cited 2018 Sep 19]. Available from: https://ec.europa.eu/consumers/consumers_safety/safety_products/rapex/alerts/?event=main.listNotifications
8. Alvarez-Lerma F, Maull E, Terradas R, Segura C, Planells I, Coll P *et al.* Moisturizing body milk as a reservoir of *Burkholderia cepacia*: outbreak of nosocomial infection in a multidisciplinary intensive care unit. *Crit Care.* 2008; 12(1):R10.
9. Madani TA, Alsaedi S, James L, Eldeek BS, Jiman-Fatani AA, Alawi MM *et al.* *Serratia marcescens*-contaminated baby shampoo causing an outbreak among newborns at King Abdulaziz University Hospital, Jeddah, Saudi Arabia. *J Hosp Infect.* 2011 May; 78(1):16-9.
10. Duggal SD, Bharara T, Jena PP, Kumar A, Sharma A, Gur R *et al.* Staphylococcal bullous impetigo in a neonate. *World J Clin Cases.* 2016;4(7):191-4.
11. Skowron K, Jakubicz A, Budzyńska A, Kaczmarek A, Grudlewska K, Reśliński A *et al.* Gospodarek-Komkowska E. Microbiological purity assessment of cosmetics after their expiry date. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2017;68(2):191-7.
12. Budecka A, Kunicka-Styczyńska A. Microbiological contaminants in cosmetics – isolation and characterization. *Biotechnol Food Sci.* 2014;78(1):15-23.
13. Rashed N, Nagma Z, Kamal KD, Luthfun NN. Safe usage of cosmetics in Bangladesh: a quality perspective based on microbiological attributes. *J Biol Res (Thessalon).* 2015;22(1):10.
14. Hugbo PG, Onyekweli AO, Igwe I. Microbial contamination and preservative capacity of some brands of cosmetic creams. *Trop J Pharm Res.* 2003 Dec;2(2):229-34.
15. Orus P, Leranzo S. Current Trends in Cosmetic Microbiology. *Int J Microbiol.* 2005;8(2):77-9.
16. Okeke IN, Lamikanra A. Bacteriological quality of skin-moisturizing creams and lotions distributed in a tropical developing country. *J Appl Microbiol.* 2001;91(5):922-8.
17. Tamalli M, Gamal MAB, Alghazal MA. Microbiological Quality Assessment of Some Brands of Cosmetics Eye Preparations Sold in Libyan Markets. *Int J Sci Res (IJSR).* 2015;4(10):1349-55.
18. Albanese J. The Control and Examination of the Microbial Content of Processing Water used in Cosmetic Preparations. *New York Society of Cosmetic Chemists* 2016 Mar;22(3).
19. Fellenberg B. Microbiological quality of cosmetics – Legal requirements, test methods and risk assessment. Demands and legal requirements. *Euro Cosmetics* 2016;11/12:36-9.

20. Geis PA. Preservation strategies. In: Geis PA, editor. *Cosmetic microbiology*, 2nd ed. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 163-80.
21. Steinberg DC. *Preservatives for cosmetics*. Carol Stream (IL): Allured Books, 2012.
22. McAteer F. Preservative effectiveness testing. *Demonstrating Cosmetic Contamination Control*. MicrobiologyResearch Associates, Inc., New England Chapter – Society Cosmetic Chemists, Annual Scientific Seminar, October 06, 2016.
23. International Standard ISO 11930. *Cosmetics-Microbiology – Evaluation of the Antimicrobial Protection of a Cosmetic Product*. ISO (International Organization for Standardization), 2012.
24. Krowka JF, Bailey JE, eds. CTFA M-3 – A Method for Preservation Testing of Water-Miscible Personal Care Products. In: *CTFA Microbiology Guidelines* (Washington, DC; Personal Care Products Council), 2007.
25. Krowka JF, Bailey JE, eds. CTFA M-4 – Method for Preservation Testing of Eye Area Cosmetics. In: *CTFA Microbiology Guidelines* (Washington, DC; Personal Care Products Council), 2007.
26. Krowka JF, Bailey JE, eds. CTFA M-5 – Methods for Preservation Testing of Nonwoven Substrate Personal Care Products. In: *CTFA Microbiology Guidelines*. (Washington, DC; Personal Care Products Council), 2007.
27. Krowka JF, Bailey JE, eds. CTFA M-6 – A Method for Preservation Testing of Atypical Personal Care Products. In: *CTFA Microbiology Guidelines* (Washington, DC; Personal Care Products Council), 2007.
28. Brannan DK, Dille JC. Type of closure prevents microbial contamination of cosmetics during consumer use. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56(5):1476-9.
29. Abu Shaqra QM, Al-Groom RM. Microbiological quality of hair and skin care cosmetics manufactured in Jordan. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2012;69:69-72.
30. Gamal MAB, Abo Azza MM, Al Gayeed AOA, Sawan MS. Microbiological Quality Assessment of Some Brands of Cosmetic Creams Sold Within Alkhoms City, Libya. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences* 2015;14(2):60-5.
31. Siegert W. Evaluation of the microbiological safety of finished cosmetic products. *Euro Cosmetics* 2010;18:16-9.
32. Birteksöz TA, Tüysüz M, Ötük G. Investigation of preservative efficacy and microbiological content of some cosmetics found on the market. *Pakistan J Pharm Sci*. 2013;26(1):153-7.
33. Obrębska K, Matejczyk M, Szczygła A. Skażenia mikrobiologiczne surowców i produktów kosmetycznych [Microbiological contamination of raw materials and cosmetic products]. *Post Microbiol*. 2008;47(1):65-71 (in Polish).
34. Gopalkrishna BK, Philip AS, Sushreema, Shenoy S. Bacteriological profile of skin-moisturizing creams and lotions during use. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010;53(4):863-4.
35. Campana R, Scesa C, Patrone V, Vittoria E, Baffone W. Microbiological study of cosmetic products during their use by consumers: health risk and efficacy of preservative systems. *Lett Appl Microbiol*. 2006;43(3):301-6.

36. Ravita TD, Tanner RS, Ahearn DG, Arms EL, Crockett PW. Post-consumer use efficacies of preservatives in personal care and topical drug products: relationship to preservative category. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009;36(1):35-8.
37. International Standard ISO 22716. *Cosmetics – Good Manufacturing Practices (GMP) – Guidelines on Good Manufacturing Practices.* ISO (International Organization for Standardization), 2007.
38. Pitt TL, McClure J, Parker MD, Amezcua A, McClure PJ. *Bacillus cereus* in personal care products: risk to consumers. *Int J Cosmet Sci.* 2015;37(2):165-74.
39. Guidelines on Annex I to Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products, 2013 (available from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013D0674&from=EN>).
40. International Standard ISO 21148. *Cosmetics – Microbiology – General instructions for microbiological examination.* ISO (International Organization for Standardization), 2017.
41. International Standard ISO 21149. *Cosmetics-Microbiology-Enumeration and detection of aerobic mesophilic bacteria.* ISO (International Organization for Standardization), 2017.
42. International Standard ISO 18415. *Cosmetics – Microbiology – Detection of specified and non-specified microorganisms.* ISO (International Organization for Standardization), 2017.
43. International Standard ISO 16212. *Cosmetics – Microbiology – Enumeration of yeast and mould.* ISO (International Organization for Standardization), 2017.
44. International Standard ISO 18416. *Cosmetics – Microbiology – Detection of *Candida albicans*.* ISO (International Organization for Standardization), 2015.
45. International Standard ISO 21150. *Cosmetics – Microbiology – Detection of *Escherichia coli*.* ISO (International Organization for Standardization), 2015.
46. International Standard ISO 22717. *Cosmetics – Microbiology – Detection of *Pseudomonas aeruginosa*.* ISO (International Organization for Standardization), 2015.
47. International Standard ISO 22718. *Cosmetics – Microbiology – Detection of *Staphylococcus aureus*.* ISO (International Organization for Standardization), 2015.
48. International Standard ISO 17516. *Cosmetics – Microbiology – Microbiological limits.* ISO (International Organization for Standardization), 2014.
49. Sutton SV, Porter D. Development of the antimicrobial effectiveness test as USP Chapter <51>. *PDA J Pharm Sci Technol.* 2002;56(6):300-11.
50. Sutton SVW. Antimicrobial preservative efficacy and microbial content testing. In: Geis PA, editor. *Cosmetic microbiology*, 2nd ed. New York: Taylor & Francis; 2006. p. 111-45.
51. Siegert W. Comparison of microbial challenge testing methods for cosmetics, *H&PC Today* 2013; 8(2):32-9.
52. *European Pharmacopoeia ninth Edition*, Strasbourg: Council of Europe, 2017.
53. *The United States Pharmacopoeia 40, The National Formulary 35.* Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2017.
54. PCPC (formerly CTFA) Test Methods for Cosmetics [Internet] Microchem Laboratory Available from: <http://microchemlab.com/test/pcpc-formerly-ctfa-test-methods-cosmetics>.

55. Preservative efficacy test for cosmetic product [Internet] Document N° ACM MAL 08 [cited 2018 Sep 19]. Available from: <http://www.asean.org/uploads/archive/MRA-Cosmetic/Doc-6.pdf>.
56. Life cycle of a wet wipe [Internet] Schülke & Mayr GmbH [cited 2018 Sep 19]. Available from: <http://www.wet-wipe-preservation.com/wet-wipe-preservation/en/Knowledge/Microbiologically-Safety-Testing.php>.
57. Challenge Testing for Cosmetics [Internet] QACS Ltd. [cited 2018 Sep 19]. Available from: <http://www.qacslab.com/challenge-testing-cosmetics.php>.
58. Souza MR, Ohara MT. The preservative efficacy testing method for powdered eye shadows. *J Cosmet Sci.* 2003;54(4):411-20.
59. Applicability of the schülke KoKo test for the Evaluation of the Microbiological Safety of Finished Cosmetic Products [Internet] Schülke & Mayr GmbH [cited 2018 Sep 19]. Available from: <https://www.ulprospector.com/documents/1027432.pdf?bs=2518&b=113444&st=20&r=na&ind=personalcare>).

Microbiological safety of cosmetic products and potential risks for consumers

Danina Krajišnik*, Ljiljana Đekić

University of Belgrade – Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology and Cosmetology, Vojvode Stepe 450, 11 221 Belgrade, Serbia

*Corresponding author: Danina Krajišnik, e-mail: danina.krajsnik@pharmacy.bg.ac.rs

Summary

The European regulatory framework in the field of cosmetic products requires of manufacturers to provide an assessment of microbial limits tests and results of preservation challenge test, as well as microbiological stability data which should be documented in the cosmetic product safety report. During the development of a cosmetic product, it is necessary to consider the risk of microbiological contamination in the selection of starting cosmetic ingredients and packaging, manufacturing process, alongside with conditions of storage and use. The deviation of the microbiological quality of the cosmetic product from the manufacturer's specification presents a risk for consumers, especially if it is used around the eyes, on mucous membranes in general, on damaged skin or it is intended for use in specific groups of consumers (children under the age of 3, elderly people and immunocompromised persons).

Key words: cosmetic products, microbiological quality assessment, challenge test, safety report, risks of microbiological contamination
