

# DESARROLLO DEL PROTOCOLO OPTIMIZADO PARA CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS COSMÉTICOS

La microbiología cosmética tiene una idiosincrasia muy diferente a la farmacéutica, alimentaria, acuática, ambiental, etc., y por supuesto es completamente diferente a la microbiología clínica.

JORGE SANCHIS SOLERA, JUDITH ENJUTO GARCÍA

**Dpto. SEILA, Laboratorios MICROKIT, Madrid, España, [microkit@microkit.es](mailto:microkit@microkit.es)**

Los diferentes protocolos "oficiosos" que se han ido desarrollando, aplicados a cosméticos (Pharmacopea, Guía de Cosmetología del Ministerio de Sanidad, Normas ISO de microbiología cosmética) resultan muy poco robustos, de modo que hay laboratorios donde funcionan adecuadamente y otros laboratorios donde no detectan los patógenos más comunes en cosméticos. Presentamos el protocolo optimizado que mejor funciona según los servicios intercomparativos de microbiología cosmética Seilaparfum de los cinco últimos años, comparados con los arriba mencionados como "oficiosos". Esta obra ha sido consensuada entre el evaluador Seila, el

coordinador Seila y los 64 diferentes laboratorios de microbiología cosmética españoles participantes en dichos ensayos, por lo que todos ellos deben considerarse protagonistas y coautores del presente estudio, y sentirse orgullosos de su valiosa aportación, aunque la confidencialidad propia de un servicio intercomparativo, nos impida publicar sus nombres.

## INTRODUCCIÓN

En anteriores publicaciones (Sept/2005, Dic/2007, Marzo/2009, <https://www.microkit.es/publicaciones.htm>) demostramos que el método consensuado Seilaparfum funcionaba mucho mejor en cosméticos que el método entonces establecido como oficioso (ya que no existe método oficial de obligado cumplimiento en microbiología cosmética), protocolo

derivado de Pharmacopea y de la Guía de 1994 del Ministerio de Sanidad.

Surgieron después (desde 2005 y hasta primeros de esta década), las diversas Normas ISO de microbiología cosmética, también basadas en Pharmacopea, y que eran obra de los laboratorios más clásicos y poderosos del mundo (no necesariamente de los que mejor detectan). Estas Normas ISO también arrastraban varios de los graves puntos críticos de origen cuando se aplican a productos tan inhibitorios como son los cosméticos.

Dichas Normas Técnicas, que tampoco son de obligado cumplimiento (aunque haya quien se empeñe en decir que sí lo son), fueron acogidas con entusiasmo por numerosos laboratorios cosméticos, sin saber que con ello, muchos de ellos daban un paso atrás en su capacidad de detección de los patógenos cosméticos, como se ha demostrado muy claramente en los últimos años, comparando sus resultados con los de los laboratorios que siguen empleando el método consensuado Seilaparfum.

Los puntos críticos más importantes por los que Seilaparfum demuestra la invalidez de estas Normas ISO como los protocolos de fácil implantación que deberían ser en cualquier laboratorio, son:

1. Uso final de muestras demasiado pequeñas, no representativas, de



- 1 g, por dilución 1:10 de la muestra de 10 g, antes de enriquecerla, en la búsqueda de patógenos.
2. Empleo de medios diseñados para microbiología clínica, donde los microorganismos a detectar están en fase exponencial de crecimiento, no en fase subletal o letárgica como sucede con los microorganismos presentes en un cosmético, que requieren de medios especialmente diseñados para esta problemática.
  3. Uso de técnicas que son incapaces de enumerar bacterias aerobias y hongos a los niveles requeridos por las autoridades sanitarias (100 ufc/g son 1 ó 3 colonias/placa sembrada en superficie: 0,1 ó 0,3 ml de solución madre -1), por debajo de las 10-15 colonias necesarias para hablar de recuento sin que la incertidumbre sea disparatada; además el nivel de 1.000 ufc/g debería ser desestimado, porque cualquier cosmético puede acabar en manos de un inmunodeprimido).
  4. Dar por un hecho demostrado que si no hay aerobios en la placa de recuento, no hay patógenos, como si no hubiera patógenos subletales incapaces de crecer en TSA. Afirmación arrastrada del S.XIX.
  5. Dar por supuesto que los productos cosméticos de elevado poder inhibitorio intrínseco no requieren control microbiológico porque no creemos que sea posible detectarlos, olvidando el concepto de células letárgicas (no destruidas) y su implicación cuando el cosmético pasa del envase a la dilución y cambio de hábitat que supone su empleo.
  6. Se olvidan del patógeno emergente más frecuente en microbiología cosmética: *Burkholderia cepacia* y de otros patógenos no fermentadores fácilmente detectables.
  7. Se olvidan del control de la materia prima más importante de un

cosmético: el agua de producción y sus patógenos potenciales, no siempre coincidentes con los del agua de consumo humano.

8. No se tienen en cuenta las valiosas recomendaciones de la FDA de 2012 en cuanto al Challenge Test.

El protocolo consensuado Seilaparfum también ha evolucionado en los últimos años, gracias a estas comparativas cuatrimestrales entre laboratorios de microbiología cosmética, insertando medios de cultivo cada vez más adecuados para microorganismos en estado subletal y técnicas especiales para los productos cosméticos de mayor poder inhibitorio intrínseco. Por lo demás, el protocolo Seilaparfum sigue siendo el mismo que cuando nació hace ya 12 años, en 2005.

#### MATERIAL Y MÉTODOS

Se comparan los resultados de los participantes, teniendo en cuenta los métodos empleados por cada uno de ellos en los diferentes parámetros de microbiología cosmética: 3 recuentos (de aerobios, de hongos y de clostridios sulfito-reductores), así como las detecciones/no detecciones de los 6 patógenos (*P.aeruginosa*, *E.coli*, *S.aureus*, *C.albicans*, *B.cepacia*, *Salmonella spp.*) inoculados y no inoculados en cada una de las últimas 15 rondas Seilaparfum. Las cepas inoculadas (dianas, interferentes y acompañantes) en cada inóculo y sus concentraciones, son desconocidas a priori por cada laboratorio participante. Se incluyen cepas salvajes "in house" además de las de la colección universal WDCM (según ISO 11133-2 de control de medios de cultivo), de los microorganismos más variados. Las matrices cosméticas son de lo más variado y están esterilizadas por irradiación para evitar interferentes desconocidos y ajenos al inóculo de cepas. De modo

que las muestras analizadas por los distintos participantes de cada una de las 15 rondas son idénticas.

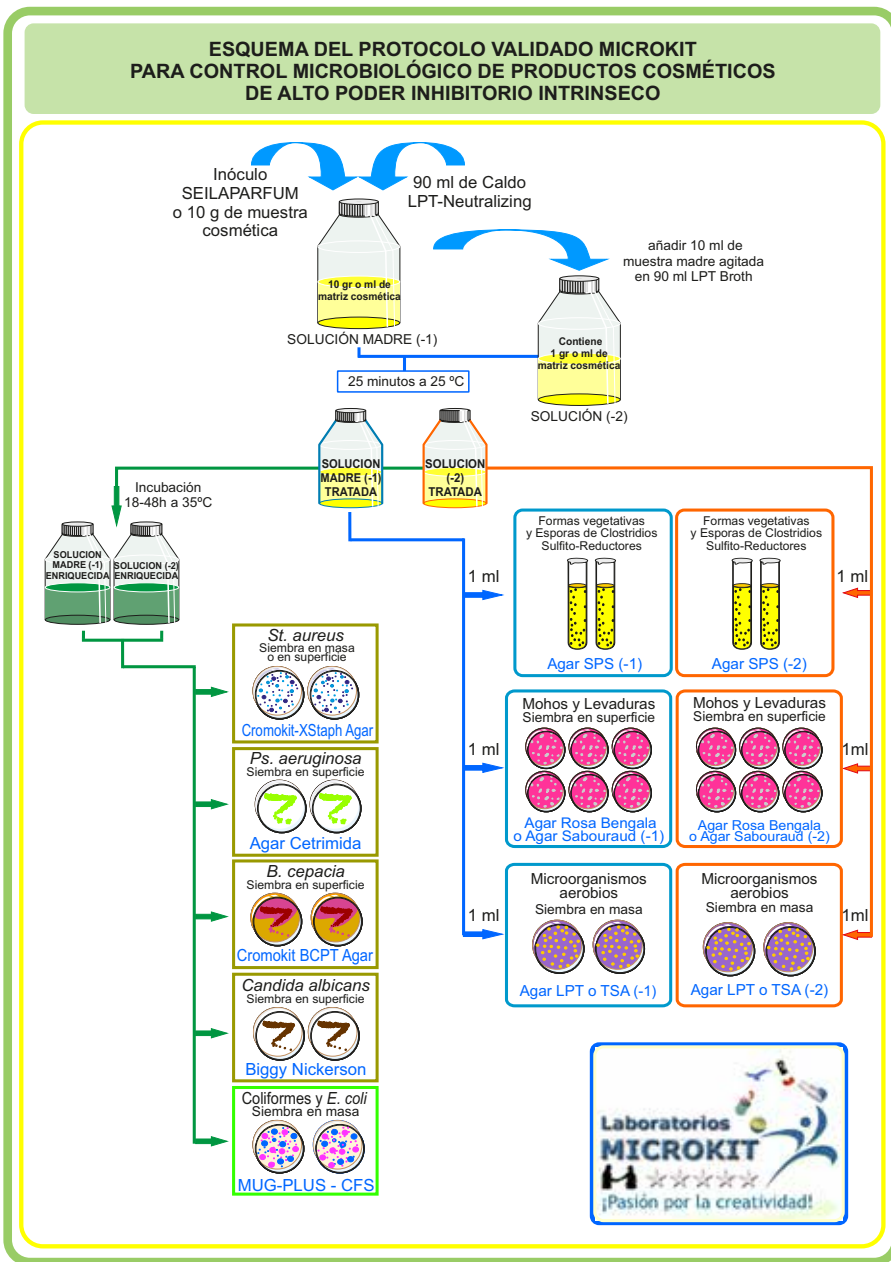
Se establece una calificación basada en restar de 10 puntos iniciales, 1 punto por cada fallo, de modo que de los 9 parámetros analizados, la calificación mínima es un 1 (9 fallos) y la máxima un 10 (0 fallos). Se considera fallo no encontrar un microorganismo inoculado, o bien encontrar uno no inoculado, o bien obtener recuentos aberrantes (basándose en los valores Z, el Test de Grubs y el sentido común para no aplicar ciegamente estas herramientas estadísticas sin tener en cuenta la media, la mediana, la moda y el valor inóculo).

#### RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En cada uno de los quince informes, se comparan parámetro por parámetro, los resultados de cada método y de cada medio de cultivo. Se otorgan calificaciones del rendimiento a cada laboratorio participante, que ha publicado previamente qué métodos y medios ha empleado. Se obtienen las siguientes conclusiones:

El uso del caldo LPT Neutralizing Broth obtiene una correlación del 90% con las mejores calificaciones globales (8,5-10 puntos sobre 10), aunque haya algunos laboratorios que incluso empleándolo, no obtengan el nivel de excelencia. Casi todos laboratorios que usaban *Letheen* modificado y *Eugon LT100*, tras participar en Seilaparfum, cambian a LPT Neutralizing Broth, a la vista de los resultados de sus anónimos compañeros.

El uso de placas deshidratadas para siembra en masa de 1 ml sin calentar/enfriar agares (*DryPlates-TC*, *DryPlates-TSA*, *DryPlates-YM* y *DryPlates-Sabouraud*) obtiene resultados tan



altamente satisfactorios como el uso de medios para elaborar placas por siembra en masa de TSA, LPT Agar, Rosa Bengala Caf Agar y Sabouraud Caf Agar. El uso de placas preparadas para recuentos cosméticos debe quedar proscrito.

El uso de SPS Agar en tubos preparados muy llenos, sin necesidad de atmósfera de anaerobiosis, obtiene mejores resultados que su uso en placa por siembra en masa, incluso con atmósfera de anaerobiosis.

El uso de Cromokit X-Staph Agar minimiza los falsos positivos y falsos negativos de sus usuarios (5%), respecto al Baird Parker (55%), al rpf (65%) y al Mannitol Chapman Hipersalino (40%).

El uso de placas preparadas de Agar Cetrimida de marcas clínicas obtiene una proporción de falsos negativos cercana al 90%, dada su composición demasiado selectiva. La incubación a 42°C típica de aguas para distinguirlo de P.fluorescens debe quedar proscrita en

microbiología cosmética, ya que impide su detección.

El uso de MacConkey Agar obtiene una proporción de falsos positivos y de falsos negativos de E.coli superior al 60%, mientras el MugPlus Agar obtiene resultados excelentes, casi siempre superiores al 95%.

El uso de Biggy Candida Agar obtiene resultados que rondan la excelencia (95%), mientras los medios cromogénicos para Candida, de origen clínico, obtienen un rendimiento inferior al 10%, por proporción exagerada de falsos negativos. El uso directo de Sabouraud proporciona más del 25% de falsos positivos.

El uso de BCPT Agar sin suplemento de antibióticos permite detectar otros patógenos no fermentadores.

La calificación del rendimiento de los participantes sube de una media de 6/10 en noveles a una media de 9/10 en veteranos. El protocolo Seilaparfum está disponible para los laboratorios que quieran optimizar sus métodos. Los esquemas de trabajo del protocolo Seilaparfum aparecen en los informes de cada ronda. Al enviar a cada participante las muestras idénticas por duplicado, pueden comparar su método con el indicado en dichos esquemas y extraer sus propias conclusiones, que son más relevantes cuantas más rondas comparan.

La Salud Pública puede estar en riesgo si se aplican, sin validar en sus propias muestras, protocolos ociosos que no están demostrando ser los mejores, y también si los laboratorios no se intercomparan periódicamente con otros laboratorios que pueden certificar que mantienen la excelencia en microbiología cosmética ■