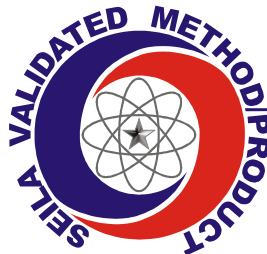


## CERTIFICADO DE VALIDACIÓN DE COSMÉTICOS



### Certificamos que el método y/o productos:

**Protocolo SEILAPARFUM para análisis microbiológicos de cosméticos** (ref. MICROKIT PRT-SEILA-003, de 31 páginas) y los específicos para cada parámetro derivados de aquél (PRT-COSM-001 a PRT-COSM-009, de 30-38 páginas cada uno), cuyo esquema de trabajo se anexa a título informativo (sin que sustituya dichos protocolos completos), llevado a cabo mediante las últimas versiones disponibles (entre paréntesis referencias MICROKIT) de:

✓ **COSMETIKIT®** (KMT444), **COSMETIKIT®-EASY** (KMT448) y los medios de cultivo en ellos indicados:

- ✓ **LPT Neutralizing Broth** (DMT217, RPL054, TPL053S),
- ✓ **LPT Neutralizing Agar** (DMT066, RPL074, TPL200),
- ✓ **Rosa Bengala Caf. Agar** (DMT101, RPL034, TPL072),
- ✓ **Cetrimide Agar** (DMT034, RPL010, TPL100, KMT476),
- ✓ **BCPT Agar** (DMT004, RPL024, TPL005, KMT477),
- ✓ **Mannitol Salt Agar** (DMT078, RPL023, TPL066, KMT480),
- ✓ **MugPlus Cfs. Agar** (DMT400, RPL444, TPL400, KMT479),
- ✓ **Biggy Nickerson Agar** (DMT017, RPL009, TPL062, KMT478) y
- ✓ **SPS Agar** (DMT116, BCD901, RPL039, RPL062, TPL089, TPL049),
- ✓ **CompactDryPlates® y Pathokit** (TC, YM, EC, XSA, KMT475),

**Cumplen con los estándares de VALIDACIÓN de la Norma UNE-EN-ISO 16140:2003, cuyos resultados se anexan.** La validación está realizada mediante comparación, utilizando cepas cuantitativas certificadas y trazables, frente a los métodos oficiales de referencia (Manual Microbiología Cosmética Comité Asesor de Cosmetología, Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Farmacopea Española. Diversas Normas Técnicas vigentes o en fase final de aprobación ISO/UNE para microbiología cosmética).

El presente certificado sólo es válido durante el periodo de vigencia de los métodos citados y aunque se garantiza cuatrimestralmente, mediante revalidación intercomparativa SEILA, habrá de ser renovado antes de cinco años desde su fecha de emisión, indicada al pie. Este certificado autoriza al usuario del método y de los medios validados, a respaldarse en los estudios de validación de MICROKIT para la validación interna o para la verificación interna de su método, medios y kits con sus propias matrices, equipos, analistas y en sus instalaciones, siempre que se empleen correctamente los métodos y productos referenciados y amparados en este certificado, que no pueden extrapolarse a otras marcas comerciales

Garantizado por:

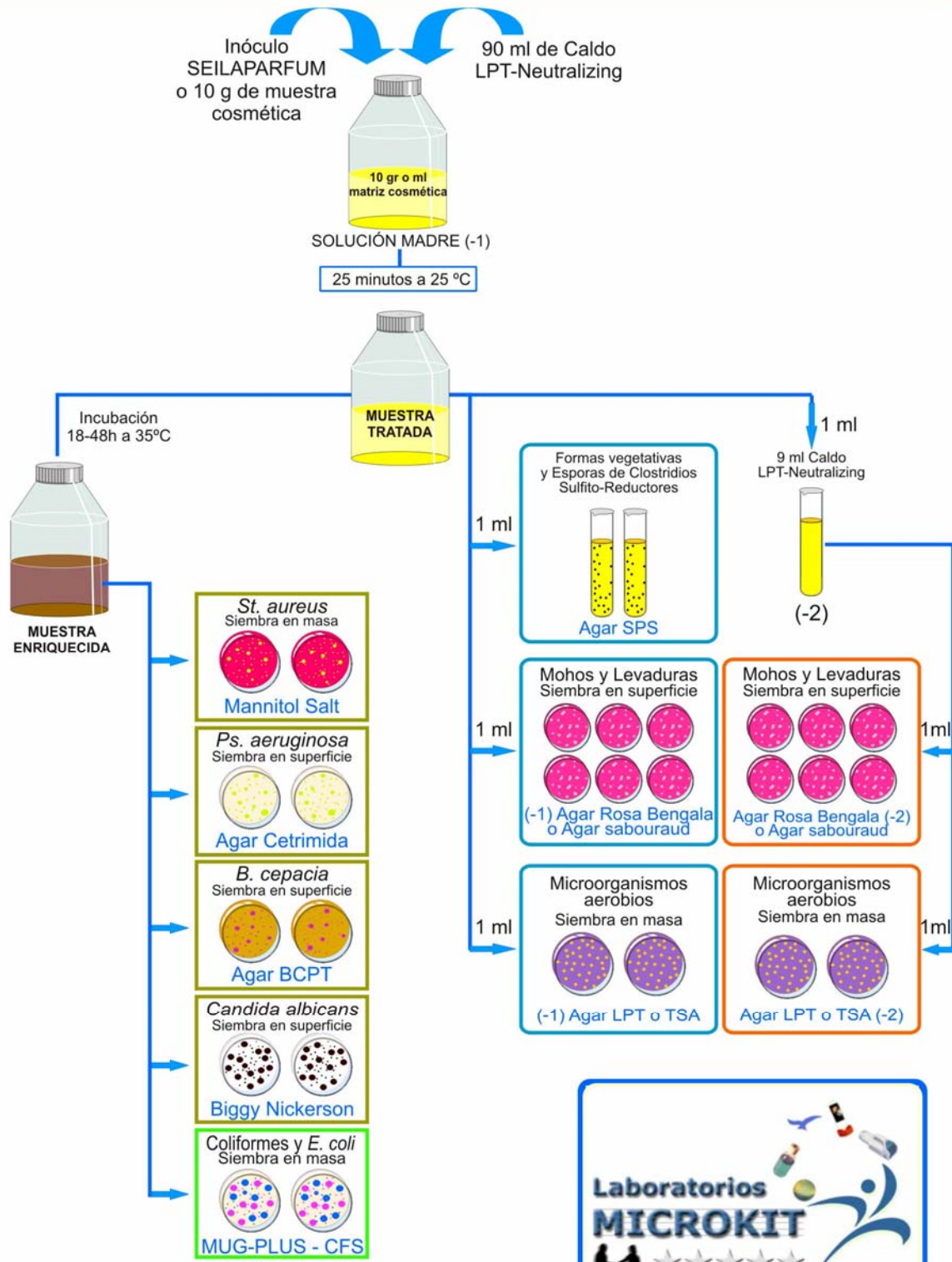
Jorge Sanchis Solera

A fecha: 31-Marzo-2009

Última revisión 25-09-2009

Coordinador SEILA y Director de Calidad MICROKIT®

## ESQUEMA DEL PROTOCOLO VALIDADO MICROKIT PARA CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS COSMÉTICOS



## ❖ METODO DE VALIDACIÓN

Se compara para cada parámetro microbiológico, un mínimo de 16 y un máximo de 37 repeticiones, según parámetro, la detección presencia/ausencia o el recuento obtenido siguiendo el **método MICROKIT** (protocolo PRT-SEILA-003 y los protocolos derivados para cada parámetro PRT-COSM-001 PRT-COSM-002 PRT-COSM-003 PRT-COSM-004 PRT-COSM-005 PRT-COSM-006 PRT-COSM/AG-009) con **cepas cuantitativas certificadas HPA**. Para ello se utilizan todos los **medios de cultivo MICROKIT** descritos en dichos protocolos.

Por otra parte, se aprovecha para compararlos con los resultados obtenidos en matrices idénticas con inóculos idénticos, por los laboratorios participantes en el servicio intercomparativo SEILAPARFUM que utilizan el **MÉTODO DE REFERENCIA** (Pharmacopea y su derivado Manual para el Control Microbiológico de Productos Cosméticos, 1994, del Ministerio de Sanidad y Consumo), lo cual sirve de **revalidación periódica** del método MICROKIT.

Las **MATRICES** empleadas fueron Cosméticos en general, en concreto: crema de masaje, crema antiestrías, dentífrico, gel de baño, champú, crema labial, leche bronceadora, colorete en polvo, desodorante en barra, toallitas bebé, enjuague bucal, tónico facial.

**Restricciones de uso** del protocolo o los medios MICROKIT: Ninguna


## ❖ RESULTADOS

En letra azul los resultados de MICROKIT.

En letra negra los del método de referencia mediante intercomparación SEILAPARFUM (no se tienen en cuenta terceros métodos o participantes que no aplican a rajatabla el método de referencia, por ejemplo los que recuentan aerobios en placas mediante siembra en superficie de 0,1, 3 x 0,33, 2 x 0,5 ó 1 ml de solución madre y/o diluciones).

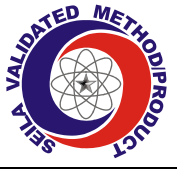
En letra verde los resultados de métodos comunes MICROKIT/de referencia:

### 1. TABLA DE RESULTADOS DE PARAMETROS CUALITATIVOS

	Enriquecimiento 48 horas a 35°C demuestra ser el ideal para todas las posteriores detecciones:									
	SENSIBILIDAD (escasez de Falsos Negativos)				ESPECIFICIDAD (escasez de Falsos Positivos)				LIMITE DE DETECCIÓN DESDE *:	
	METODO MICROKIT		METODO DE REFERENCIA		METODO MICROKIT		METODO DE REFERENCIA		METODO MICROKIT	METODO DE REFERENCIA
	%		%		%		%			
Coliformes/ <i>E.coli</i>	20 OK de 20	100	5 OK de 14	35,7	12 OK de 12	100	10 OK de 10	100	80 ufc/g <i>E.coli</i> 7ufc/g Colif.	80ufc/g <i>E.coli</i> 7ufc/g Colif
<i>Ps.aeruginosa</i>	19 OK de 19	100	11 OK de 22:	50%	15 OK de 15	100	7 OK de 7	100	7 ufc/g	40 ufc/g
<i>Burkholderia cepacia</i>	11 OK de 11	100	En Cetrimida 0 OK de 3:	0%	5 OK de 5	100	En Cetr. 1 OK de 1	100	70 ufc/g	Para >250ufc/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	22 OK de 22	100	En B.Parker 4 OK de 16	25%	12 OK de 12	100	En B.Parker 20 OK de 21	95	6 ufc/g	Para >90 ufc/g
<i>Candida albicans</i>	14 OK de 14	100	9 OK de 11	82%	21 OK de 21	100	3 OK de 4	75	2 ufc/g	50 ufc/g
<i>Salmonella spp.</i>	3 OK de 3	100	--	--	34 OK de 34	100	---	--	2 ufc/g	---
Clostridios sulfito-reduct.	7 OK de 7		100	24 OK de 24		100	90 ufc/g			
Enterobacterias	28 OK de 32		87,5	1 OK de 4		25	7 ufc/g			
Hongos (levaduras y mohos)	35 OK de 36	97	---	--	---	--	---	--	2 ufc/g	---

\* Recordamos que la incertidumbre microbiológica nos impide afirmar, de una forma estadísticamente fiable, límites de detección inferiores a los mencionados. Se observa que el método MICROKIT se acerca mucho más al límite de detección necesario que el método de referencia, excepto en coliformes y *E.coli*, en que son iguales para ambos métodos. En los casos de *E.coli*, *Burkholderia cepacia* y Clostridios sulfito-Reductores, posteriores estudios en matrices con inóculos a niveles más bajos, podrán muy probablemente demostrar que el límite de detección del método MICROKIT en ellos es tan cercano a 1 ufc/g como en los demás parámetros, al seguir todos ellos el mismo protocolo de enriquecimiento 48 horas de la suspensión inicial de la muestra directamente en caldo LPT Neutralizing, que tan excelentes resultados demuestra.

## 2. TABLA DE RESULTADOS DE PARAMETROS CUANTITATIVOS

Inactivación y/o Enriquecimiento caldo LPT Neutralizing		Inactivación 25 minutos a temperatura ambiente 21-30°C demuestra ser la ideal para los posteriores recuentos:						
	EXACTITUD				PRECISIÓN (medida como Imprecisión)			
	METODO MICROKIT		METODO DE REFERENCIA		METODO MICROKIT		METODO DE REFERENCIA	
Hongos (levaduras y mohos)	(Recupera 278 %). <+0,39 log y se admiten ±2 log	OK	<±0,53 log y se admiten ±2 log	OK	< ± 0,38 log, y se admiten ± 2 log ¡0% fuera de rango!	OK	< ± 0,59 log, y se admiten ± 2 log 12% fuera de rango	OK
Aerobios a 20-25°C	<0,58 log y se admiten ±2 log	OK	<0,83 log y se admiten ±2 log	OK	< ± 0,35 log, y se admiten ± 2 log Sólo 4% fuera de rango	OK	< ± 0,52 log, y se admiten ± 2 log 9% fuera de rango	OK
Aerobios a 30-35°C	<0,72 log y se admiten ±2 log	OK	<0,82 log y se admiten ±2 log	OK	< ± 0,44 log, y se admiten ± 2 log 8% fuera de rango	OK	< ± 0,56 log, y se admiten ± 2 log 6% fuera de rango	OK
Clostridios sulfito-reductores	(Recuperación 167%) <+1log, y se admiten ± 2 log		OK	< ± 1,1 log y se admiten ± 2 log		OK		OK
Enterobacterias	(Recuperación 69%) < -1log, y se admiten ±2 log		OK	< ± 0,63 log y se admiten ± 2 log		OK		OK

### ❖ CONCLUSIONES

1-El **método MICROKIT** utilizado al pie de la letra, con los medios de cultivo MICROKIT, es infalible. Detecta, en todos los casos, las concentraciones adecuadas de todos los microorganismos estudiados. Además, lo hace como mínimo, tan bien como el método de referencia, demostrando una muy superior sensibilidad y cercanía al límite de detección necesario, así como mejor robustez, facilidad y economía que el método de referencia, en su implantación en los distintos laboratorios que los aplican.

2- El uso del **caldo neutralizante** LPT Neutralizing Broth de MICROKIT como sustituto del Lethen, del reactivo Beerens y de otros caldos inactivadores comerciales (o formulados por los propios laboratorios usuarios) resulta el que mejores resultados obtiene en muestras intercomparadas de todo tipo de matrices cosméticas (incluidos dentífricos), tanto para recuentos como para detección de patógenos e indicadores.

3- El parámetro recuento de Enterobacterias no resulta adecuado, ya que al igual que ocurre en matrices alimentarias, todos los medios comerciales que existen

para su detección (VRBG, EE Broth) tienen una sensibilidad muy pobre, hasta el punto de que se detectan más coliformes confirmados en otros medios (VRBA, EMB, MUGPLUS...) que Enterobacterias en los primeros, cuando debería ser al revés, ya que todos los coliformes son Enterobacterias, pero no a la inversa. La detección de Enterobacterias, donde el protocolo MICROKIT y el de referencia coinciden, demuestra ser poco adecuada en ambos casos (87,5 % de sensibilidad, 25% de especificidad), por lo que se debería olvidar el parámetro como indicador recomendable en la industria cosmética, sustituyéndolo por la **detección y recuento de Coliformes (no sólo de *E.coli*)**, ya que de los tres indicadores de contaminación por aguas fecales, es el que demuestra mayor robustez y unos adecuados parámetros de calidad del análisis.

4- La falta de investigación rutinaria del parámetro ***Burkholderia cepacia***, resulta sumamente conflictiva: aunque nadie pide explícitamente que haya que buscar su ausencia, en la página web de la Agencia Española del Medicamento puede verse claramente que todas las retiradas de mercado de cosméticos de los últimos años por cuestiones bacteriológicas se deben exclusivamente a este patógeno emergente. Por ello MICROKIT ha diseñado un medio selectivo denominado BCPT Agar que está dando resultados excelentes, según se demuestra con la identificación molecular por PCR de las colonias sospechosas obtenidas por sus usuarios en sus muestras naturales. Gracias a Seilaparfum y a Cosmetikit®, ambos de MICROKIT, numerosos laboratorios cosméticos españoles ya están buscando activamente este patógeno emergente. Confiamos que tras esta validación, el porcentaje suba al 100%.

5- Otro parámetro muy conflictivo es ***Staphylococcus aureus***, donde debemos olvidarnos de que existe un medio llamado Baird Parker, que sólo demuestra ser apto para alimentos de alta carga acompañante, pero en cosméticos lo declaramos INVALIDADO por sus continuos falsos negativos, y utilizar el Agar Mannitol Hipersalino de MICROKIT, por haber quedado validado mediante Seilaparfum.

6-También resulta un parámetro conflictivo ***Pseudomonas aeruginosa***, en este caso no por el medio de cultivo Cetrimida, que se ha demostrado muy adecuado en microbiología cosmética, sino por incubar a 42°C (como hacen muchos laboratorios por deformación de métodos clínicos, en los cuales la cepa es abundante y está muy activa), en lugar de los 35 °C que es la temperatura adecuada, ya que siempre es mejor obtener falsos positivos que falsos negativos.

7-El parámetro ***Candida albicans*** sólo resulta conflictivo utilizando modernos medios cromogénicos diseñados para diferenciar especies de Candida en muestras clínicas, ya que en el clásico Biggy Nickerson es muy bien detectado por los laboratorios.

8-Se observa que ciertos laboratorios siembran indiscriminadamente **en masa o en superficie** según los medios de cultivo comerciales que adquieren sean placas preparadas o tubos-frascos preparados, cuando el rigor en microbiología nos exige sembrar en masa cuando buscamos aerobios y microorganismos fermentativos, como la mayoría de levaduras, coliformes-*E.coli*, y *Staphylococcus aureus*; y sembrar en superficie cuando buscamos aerófilos extremos, como ciertas levaduras, incluida *Candida albicans*, y todos los mohos, así como *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*.

9-Se llama la atención sobre el hecho de que algunos laboratorios cosméticos todavía **se limitan al recuento de aerobios y de hongos**, ignorando que casi ningún patógeno (incluso después de haber enriquecido en caldos adecuados) es capaz de crecer de forma fiable en un medio de cultivo destinado al recuento de aerobios, que

no son más que una parte de las bacterias potencialmente presentes. Ni la *Candida albicans* tiene por qué crecer bien en los agares de recuento de hongos, ya que para el recuento no se ha enriquecido previamente. Si no buscan activamente los patógenos, en sus medios adecuados, difícilmente los van a encontrar, consiguiendo así una peligrosamente falsa sensación de seguridad.

10-Otro error metodológico grave habitual entre los laboratorios que sí investigan los patógenos y no participan en servicios intercomparativos, es que se limitan al tratamiento previo de 25 minutos a temperatura ambiente en caldo neutralizante (como se hace correctamente para posteriores recuentos de aerobios y de hongos), pero luego **no enriquecen** dicho caldo (u otros) antes de aislar los patógenos en placa, por lo que la probabilidad de encontrar los patógenos que buscan es ínfima. Por ello el **límite de detección** de muchos laboratorios es inadecuadamente alto, como se demuestra en los servicios Seilaparfum en los que dichos laboratorios no detectan valores inoculados de incluso 70 ufc/g de alguno de los patógenos.

11-Pocos laboratorios demuestran utilizar de forma rutinaria **cepas** para controlar que su método, sus reactivos y sus analistas trabajan correctamente, con lo cual no detectan cuáles son los puntos críticos de sus análisis en los que poder aplicar indicadores de control. Muy pocos laboratorios **identifican** las colonias aisladas, que hemos de recordar que siempre son presuntivas en cualquier medio de cultivo sólido, incluso en los modernos cromogénicos muy selectivos. Con ello pierden importantísima información de los escasos positivos que suelen obtener. Y todavía menos laboratorios cosméticos **validan** sus métodos analíticos con sus muestras, analistas y reactivos, cuando Sanidad lo exige activamente y ya existen cursos y consultorias específicas sobre el tema, como las impartidas por MICROKIT.

12-El uso de placas preparadas para **recuento de aerobios** debe quedar proscrito, ya que absorben 0,1 ml (como mucho 0,3) de la dilución inicial  $10^{-1}$ , con lo cual cuando en la muestra hay 100 ufc/gramo, la placa sólo detecta, en el mejor de los casos, 1 (3) colonias y justo en el rango de máxima incertidumbre, cuando deben detectarse un mínimo de 15-30 colonias por placa para que el recuento sea estadísticamente "adecuado" y no sólo "estimado". Y eso corresponde a 1500-3000 ufc/g, lo cual está muy por encima de los límites permitidos (<100 ufc/g ó <1000 ufc/g). Por ello es obligada la siembra en masa y por ello muchos laboratorios que siembran 0,1 ml en superficie, creen que su producto es muy inhibitorio, cuando en realidad lo inhibitorio es el método que utilizan.

13-La mejor opción en el caso del **recuento de hongos**, que sufren la misma contingencia que los aerobios en cuanto a rangos legislativos, pero que no se pueden sembrar en masa a causa de la extremada aerofilia de los mohos, es sembrar en superficie 3 placas por muestra, repartiendo entre las 3 placas 1 mililitro de muestra tratada (dilución -1) y sumando luego el resultado del recuento obtenido entre las tres placas, para expresar el resultado en ufc/ml.

14-Cada vez más laboratorios son conscientes que han de **agitar inmediatamente** antes de cada paso en el recuento de hongos, ya que sus esporas flotan en cuestión de segundos, dificultando una detección mínimamente precisa cuando se toma inóculo en la mitad o fondo del caldo.

15- Existen al menos **dos grandes poblaciones** bien diferenciadas de aerobios: la flora saprófita asociada al hombre, que lógicamente crece mejor a 35°C y la flora saprófita NO asociada al hombre (sino a las materias primas), que crece mejor a 21-

25°C. Utilizar una temperatura intermedia en un vano intento de detectar todos los aerobios en un producto tan inhibitorio como es un cosmético, nos parece cuando menos, poco sensato, por más que esté así contemplado por obsoletas recomendaciones de microbiología cosmética. En microbiología de alimentos, de aguas y de ambiente (aire y superficies) a nadie se le ocurre semejante idea, y todos buscan ambas poblaciones a sus respectivas temperaturas óptimas (21-25°C y 30-37°C). Pues con más motivo debe hacerse en un cosmético, ya que es la matriz más inhibitoria de cuantas hemos mencionado y necesita de indicadores que sean fácilmente detectables. Los aerobios a 35°C se consideran indicadores de confinamiento humano y los aerobios a 22°C se consideran indicadores de otro tipo de flora alterativa, cuyos recuentos suelen ser hasta 10 veces superiores a los primeros. Por ello los límites de alerta en el segundo caso suelen ser 10 veces más tolerantes (más elevados) que los de los primeros.

16-Algunos laboratorios recuentan sin realizar **triplicados de placas** o, si lo hacen, sólo nos envían la media del recuento obtenido; esto les descalifica para la participación en servicios intercomparativos, ya que con sus resultados no pueden incluirse en métodos estadísticos mínimamente fiables; pero además están arriesgando mucho en su día a día, al ofrecer resultados poco contrastados y que dependen demasiado del azar.

17-Algunos laboratorios todavía **expresan sus resultados** de manera inadecuada, ya que "incontables" o ">1000 ufc/g" o "<100 ufc/ml" no son expresiones aceptables para un resultado microbiológico preciso.

18-El análisis de 1 gramo ó mililitro de producto resulta muy insuficiente en muchos casos, y del mínimo rigor si se utiliza el protocolo clásico, ya que en tal caso y dada la dilución madre, el recuento de aerobios y de hongos se hace en 0,1 g/ml y la investigación de cada patógeno también. Por ello, siempre que sea posible, hay que tomar **10 g/ml** y dispersarlos en 90 ml de caldo LPT Neutralizing Broth, tomando 10 ml de éste para cada análisis (al menos en el caso de cada uno de los 5 patógenos). En cualquier caso, una muestra tan pequeña como 1 g/ml en un producto tan inhibitorio como es un cosmético, está muy por debajo de los estándares mínimos de calidad que son necesarios para obtener una incertidumbre razonable y no disparatada.

19-Se observa que la siembra en masa por inclusión en **agar caliente** es un punto crítico más importante de lo que imaginábamos, ya que numerosos laboratorios (incluso con técnicos que tienen décadas de experiencia en el análisis microbiológico) confían en su tacto y no esperan a que el medio esté suficientemente frío, impidiendo así muy a menudo el crecimiento de los microorganismos presentes. Estos falsos negativos se demuestra, también gracias a Seilaparfum, que quedan totalmente descartados con métodos más modernos de siembra en masa sin calentamiento, como las Compact-Dry-Plates®. El método utilizado por el laboratorio que obtiene la máxima calificación en el 10º servicio de Seilaparfum es, en todos los parámetros, LPT Neutralizing Broth + las **Compact-Dry-Plates**® adecuadas para cada uno de dichos parámetros. Se reiteran estos resultados de excelencia en los demás Seilaparfum y en un estudio intercolaborativo entre 27 laboratorios participantes (más de 1000 muestras comparadas), por lo que damos por VALIDADO dicho método no sólo como han hecho AOAC y Microval para alimentos, sino también, por parte de MICROKIT, para productos cosméticos. El método utilizado por otro laboratorio que también obtiene una excelente calificación, es el LPT Broth Purple + **Pathokit**, kit diseñado y fabricado por Laboratorios MICROKIT para complementar los parámetros en los que no existen



Compact-Dry-Plates ®, en concreto *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*.

20-Algunos laboratorios cosméticos no le dan al **agua** la importancia extrema que merece como materia prima fundamental en sus productos, ya que pocos participantes de Seilaparfum participan también en servicios intercomparativos especializados en muestras de agua como Seilagua ®, creyendo que obtener un buen resultado del análisis del producto final les permite bajar la guardia en el punto crítico más importante de cuantos tienen. Ya que un análisis de recuento total en ciertas aguas es del todo insuficiente, máxime con la emergencia de *Burkholderia cepacia* como componente asiduo de biofilms acuáticos. No existe otro sector industrial donde consideremos más necesario el control de aguas y es precisamente en él donde no existe normativa legal que obligue a los laboratorios a realizar este control, lo cual vuelve a colocar a la industria cosmética en la gran olvidada por la legislación en materia microbiológica.

21-La mayoría de laboratorios de España se asustan ante la participación en un ejercicio intercomparativo como Seilaparfum y **ni siquiera lo intentan**, cuando se les asegura la máxima confidencialidad y se les aconseja como la mejor herramienta de control de calidad de sus procesos analíticos. En otros ámbitos (aguas, alimentos...) esta participación es obligatoria (y de forma habitual) por parte de cualquier laboratorio que quiera ser autorizado por las autoridades competentes de nuestro país. Lamentablemente, también en esto la cosmética va por detrás del resto.

22-Algunos laboratorios participan una vez en Seilaparfum y al ver que las técnicas y parámetros son mucho más completos que aquellos a los que estaba habituado, motivo por el cual no obtienen buenos resultados analíticos, **no se vuelven a inscribir**, perdiendo con ello toda posibilidad de mejorar y de comprobar la utilidad de la actualización de sus técnicas y parámetros obsoletos, que parten de siglos anteriores.

23-Aunque no es la tónica general, algunos laboratorios participan en Seilaparfum para cubrir el expediente o por simple curiosidad, ya que **no implementan mejora alguna** tras los reiterados fallos analíticos que se detectan gracias a esta herramienta y los consejos apuntados en el informe. Sin embargo, la mayoría de los laboratorios que participan asiduamente en los servicios intercomparativos Seilaparfum demuestran la utilidad de estos servicios también en su versión intracomparativa, al **aumentar sus calificaciones con respecto a sí mismos** a causa de las mejoras que van implantando a raíz de los puntos críticos detectados y de las recomendaciones obtenidas en los informes cuatrimestrales.

24-Los productos cosméticos se han establecido tradicionalmente en dos grupos: *Categoría 1: los que se aplican a niños menores de tres años, en el entorno de los ojos o en las membranas mucosas* y *Categoría 2: otros productos*. Pensamos que debería ampliarse la categoría 1 para incluir los **cosméticos que pueden ser usados por personal inmunocomprometido** (en residencias de ancianos, hospitales, guarderías...), máxime cuando la edad media de la población española está envejeciendo a niveles alarmantes.