

2 E No. 44



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**EL USO DE MICROTECNICAS BIOQUIMICAS EN LA
IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS
PATOGENOS AISLADOS DE COSMETICOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

ALEJANDRO JOEL HERNANDEZ ACEVES

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

Introducción

CAPITULO

I Generalidades.

- 1) Antecedentes históricos de la
Cosmetología.
- 2) Factores que intervienen en la con-
taminación microbiológica de los -
cosméticos.
- 3) El uso de microsistemas de identi-
ficación bioquímica en el diagnós-
tico microbiológico.

CAPITULO

II Parte experimental.

- 1) Material.
- 2) Metodología y criterios técnicos.

CAPITULO

III Resultados.

CAPITULO

IV Análisis de resultados.

CAPITULO

V Conclusiones.

A N E X O S

CAPITULO

VI Bibliografía.

Los productos cosméticos se emplean en el cuerpo humano con la finalidad de embellecer y/o favorecer la apariencia, así como también para corregir defectos de la piel; su composición puede variar desde unos compuestos simples, hasta una mezcla compleja, ya sean productos naturales o sintéticos. Se presentan en formas sólidas, pastas, geles y líquidos de todas consistencias, pudiendo ser anhidros o contener más del 99% de agua.

Los problemas de contaminación microbiológica en los productos cosméticos, han sido estudiados e investigados desde hace tiempo y se han encontrado preferentemente en preparaciones que contienen cantidades elevadas de agua dentro de su formulación.

En el curso de los últimos años, se han efectuado numerosas investigaciones para conocer la frecuencia y la naturaleza de la contaminación microbiológica en los productos cosméticos. El problema es cada vez más interesante, debido al alto porcentaje de productos que se han encontrado contaminados.

De acuerdo con un trabajo reciente, el 24% de ciertos productos cosméticos americanos, que habían sido controlados por un laboratorio de análisis microbiológico, estaban contaminados por varios microorganismos (la investigación se realizó sobre 250 productos de gran consumo). (10)

Hace algunos años se presentaron diversos casos de trastornos visuales graves, atribuidos a una preparación oftálmica; una investigación efectuada posteriormente a esos sujetos, confirmó -

las sospechas y demostró que ciertos constituyentes del producto, estaban contaminados por Pseudomonas aeruginosa, citada en la literatura como una de las bacterias más peligrosas aislada de cosméticos, a causa de sus particularidades:

- a) Es una de las bacterias más patógenas para el hombre.
- b) Forma con facilidad cepas resistentes a los agentes físicos y químicos.
- c) Es difícil de destruir. (9, 10, 13, 18, 25, 29, 34)

Desde el punto de vista cosmético, Pseudomonas aeruginosa es particularmente peligrosa cuando se encuentra contaminando productos que se aplican cerca de los ojos, tales como: delineadores, sombras y máscaras para pestañas. (9)

Ringelman, experimentalmente ha provocado úlceras en conejos, utilizando 50 bacterias aproximadamente. El demostró que el mecanismo de destrucción de la córnea, era debido a la formación de proteasas que degradan la caseína, la hemoglobina y las fibras colágenas. (10)

Foster ha demostrado infecciones de la córnea, como resultado de la administración de una preparación oftálmica contaminada por Pseudomonas aeruginosa. (10)

J. Dony publica un trabajo muy interesante en el que menciona -- que los problemas de contaminación microbiológica de cosméticos,

no pueden ser tratados de manera independiente a aquéllos ligados a medicamentos y especialmente a los medicamentos de aplicación local sobre la piel y las mucosas externas; refiere diversos casos de infecciones producidas con preparaciones cosméticas y medicamentos de uso tópico en medios hospitalarios. (9)

Bruch, Parker y Tenenbaum, también hacen referencia a sobreinfecciones en el medio hospitalario debidas a cosméticos y preparaciones farmacéuticas tópicos, con lo que se subraya la gravedad de este problema. (18, 21, 29)

Además de los muchos problemas que un cosmético contaminado puede causar al consumidor en el aspecto salud, los microorganismos pueden producir alteraciones en el producto, que se pueden manifestar de muy variadas formas, visibles y olfativas.

Puede haber cambio en el pH del producto, cambios de viscosidad, las emulsiones pueden romperse, pueden aparecer alteraciones en el color, producción de olores y gases desagradables, sobre las cremas y lociones puede aparecer crecimiento de hongos y/o bacterias, las preparaciones transparentes presentan un aspecto turbio, antiestético por la formación de precipitados, el buen perfume de un producto cosmético puede alterarse y terminar como un efecto totalmente contrario, las grasas pueden enranciarse, los fenómenos de fermentación provocan la inflamación de tubos y el estallido de botellas de vidrio, todo lo cual hace a un producto inadecuado para el uso y por consiguiente es un producto de mal

aspecto y calidad. (9, 10)

Así, un producto preparado con grandes costos y bajo grandes cuidados, puede llegar a causar grandes pérdidas.

Se podría decir que el problema no es sólo una cuestión de ética profesional, que ya en sí sería suficiente, sino que la conservación adecuada de preparaciones cosméticas es indispensable para evitar los daños financieros al productor, además de evitar, por supuesto, el riesgo potencial de infección para el consumidor.

1) ANTECEDENTES HISTORICOS DE LA COSMETOLOGIA.

En los tiempos prehistóricos, la ciencia no había tenido éxito en penetrar dentro de los misterios que rodean a los primeros habitantes de la tierra. No se tiene conocimiento de los poderes sensitivos o sensoriales que fueron legados por el hombre primitivo: sin embargo, existe una razón para creer que genéticamente, el sentido del olfato es el más usual de los sentidos humanos, así como el más desarrollado; al hombre le atraían -- objetos con fragancias placenteras y las evaluaba, de aquí que las artes de la cosmetología se desarrollaran pronto en la -- historia.

Ya en los primeros tiempos de la cultura humana, se emplearon -- sustancias aromáticas, las cuales en un principio no tenían uso personal, sino que sólo las utilizaban para fines religiosos -- ya que el perfume constituía una forma de acercarse a los dios; por medio del perfume y del incienso se estableció la conexión con los poderes divinos; los olores agradables conjuraban a los buenos espíritus, mientras que los desagradables, conjuraban a los demonios. Los sacerdotes fueron los primeros -- que tuvieron la idea de aprovechar el efecto atrayente de muchos olores sobre el hombre.

De acuerdo con los hechos de la historia primitiva, se llegó a -- la conclusión del importante papel que jugaba el sentido del olfato.

En Babilonia, el culto a los olores gobernaba la vida de los -- hombres y el empleo del incienso era frecuente. Se consumían -- grandes cantidades de resinas aromáticas en los templos de este lugar en honor a sus deidades, aunque también el perfume tenía uso personal. (1)

En el año 2,100 A.C., los babilonios crearon y utilizaron prepara- raciones químicas para la preservación de sus cadáveres, ungián a sus muertos con esencias perfumadas y dentro de las fosas, co- locaban jarras que contenían perfumes. (1)

El arte de la perfumación progresó mucho entre los antiguos - - egipcios, de ello nos informan los papiros escritos alrededor - del año 1,500 A.C., donde se mencionan más de 100 recetas dife- rentes. Ellos conocían sustancias vegetales aromáticas, así - - como el almizcle y el civeto. Se daba gran importancia a los - bálsamos por sus propiedades germicidas. (1)

Los conocimientos químicos que fueron notables en la cosmetolo- gía, incluyen ungüentos para la piel, aceites para el cabello, - grasas y polvos perfumados. El uso que se le dió al perfume - fué en tres formas: como incienso o ungüentos perfumados ofreci- dos a los dioses; como una de las técnicas principales para em- balsamar a los muertos; para agrado personal y adorno, pero sólo de algunos privilegiados.

Los persas que capturaron Babilonia en el año 539 A.C. y lo - - anexaron a su reino, informaron a los griegos y posteriormente a

los romanos y, por medio de ellos al mundo occidental, del conocimiento del uso del perfume y algunos agentes embellecedores que habían ganado durante sus expediciones militares. Ellos -- aprendieron acerca de los perfumes y cosméticos de la experiencia de los medas; conocieron muchas resinas aromáticas para incensar y numerosos olores perfumísticos. (12)

En el período comprendido entre la caída de Roma al Renacimiento, los persas junto con los árabes improvisaron los métodos de manufactura, e introdujeron dos innovaciones: la primera fué el uso de la destilación de aceites esenciales, y la segunda fué -- la introducción del alcohol etílico como solvente de base de -- perfumes. (1)

De acuerdo a los griegos, el perfume es de origen divino. Los vapores de ambrosía iban junto con las manifestaciones de sus -- deidades y el néctar de las mismas, era su alimento.

En los tiempos antiguos, las sacerdotisas tenían conocimiento -- de la manufactura de los perfumes, lo cual prueba el valor sagrado que tenían éstos y recibían también el nombre de aromáticos.

Los perfumistas griegos tenían grandes aptitudes en la perfume-- ría; sabían cómo manejar y procesar materiales olorosos, cómo -- protegerlos de la luz, del calor excesivo y estaban familiarizados con el uso del tomillo, azafrán, mirto, menta, mejorana, así como de especias, maderas aromáticas, gomas y resinas.

Teofrastos (372-287 A.C.), quien contribuyó mucho a la perfumería, menciona que muchos perfumes se preparaban a partir de flores, tallos, raíces y hojas. En su "Historia natural de plantas", describe alrededor de 5,000 variedades y el proceso de "enfleurage" que consiste en la yuxtaposición de pétalos de rosa y semillas de sésamo en capas. (1)

Los hebreos fueron alumnos de los egipcios en el ramo de la perfumería. Y en el Antiguo Testamento, se muestra la evidencia de que en este conocimiento lograron un desarrollo importante. La primera referencia de la fórmula de un perfume está dada en la Biblia y los componentes que la constituían eran: casia, canela, cálamo y mirra, diluidos en aceite de oliva. Sus escritos contribuyeron a la literatura de la perfumería. (1, 8)

Los hebreos eran personas muy religiosas y su vida estaba dedicada al poderoso y amado Dios, a quien quemarle incienso, era un honor; los altares en que se quemaban las ofrendas datan del siglo 10 al 8 A. C. El incienso de aromáticos se considera extremadamente sagrado, y las ofrendas utilizadas para fines religiosos, eran la mirra, el ámbar gris, el sándalo y la benzoina. (1, 8)

En Roma, durante el primer siglo D.C., la industria cosmética -- produjo pinturas, colorantes para el cabello, cremas para la piel y aceites perfumados.

Los romanos publicaron escritos acerca de las drogas aromáticas, perfumes y sus propiedades, también la técnica en la elaboración de pomadas y aceites. Para la preparación de sus perfumes empleaban varias técnicas como: fijación, extracción, maceración y destilación. (8)

La moda del perfume en el imperio romano, tuvo influencia de los egipcios, griegos y cartagineses; en esta época, los perfumes y cosméticos eran empleados sólo por aquellos que podían darse el lujo de adquirirlos para uso personal, aunque también se utilizaban para ritos religiosos y ceremonias fúnebres. (1, 8)

El baño romano tuvo un papel importante en la difusión de los perfumes. Una vez terminado el baño de la persona, se esparcía el cuerpo con aceites perfumados y se compraba el perfume en forma sólida, líquida, en polvo o aceites florales.

El misterio italiano del arte de los perfumes y perfumistas estuvo acaparado por la corte y la nobleza. Los primeros avances en la formulación y tecnología fueron, el aumento de los aceites esenciales disponibles y, además, la introducción del alcohol, como vehículo ideal para perfumes líquidos. (1, 8)

Es importante señalar que Galeno (130-200 D.C.) contribuyó a la cosmetología con la introducción del unguento frío, que es el prototipo de las emulsiones actuales. (1)

Alrededor del año 300 A.C., los perfumes y aceites para el cuer-

po eran familiares en China, en donde se servían de ellos para el culto divino, para usos profanos, en el hogar, así como para fiestas y diversiones, y fueron ellos sin duda alguna, los primeros en conocer el valor del almizcle, cuyos médicos le atribuían propiedades terapéuticas. (1, 31)

La India, es el único país del mundo en la historia, donde el incienso y el perfume no sólo favorecen actos mágicos u ocultos, sino que a la inversa, por el olfato, el perfume también transmite fenómenos no sensoriales. (1, 30)

Los testimonios más antiguos acerca de los aromas, los ofrecen los Vedas del Ayur, que tienen aproximadamente 3,000 años de antigüedad, y donde se habla de perfumes y cosméticos que se usaban en ceremonias religiosas. Los usos y las costumbres de la India van estrechamente ligados con los perfumes. (1, 30)

Los primeros maestros de la ciencia química fueron los árabes, y no fué sino hasta 900 D.C., que al destilar el vino descubrieron el alcohol, el cual llegó a ser un solvente útil en cosmología. (1)

Los alquimistas árabes heredaron la técnica de destilación de los sirios, preparaban sus lociones perfumadas con romero, melisa, lavanda, clavo, limón y canela, produjeron también agua de rosa, tinturas y esencias. El ámbar gris, fué utilizado por los árabes como sustancia específica para tratar desórdenes gastrointestinales, pero posteriormente se empleó junto con el

almizcle para embalsamar a los muertos. (1)

Con el desarrollo de la química, se crearon muchas materias -- odoríferas artificiales, lo que fué causa de una completa transformación en la fabricación general, empleo y preparación del perfume.

España, a través de sus contactos con los moros, e Italia con el Oriente, fueron los primeros países europeos que manufacturaron perfumes. Los moros decidieron permanecer en España después de la conquista de Granada, y tuvieron gran influencia en las costumbres españolas. (1)

Después del descubrimiento de América, se introdujeron nuevos materiales aromáticos a España, y ésta tuvo supremacía en los mercados de perfumería.

Las nuevas plantas llevadas a España del Nuevo Mundo fueron: -- bálsamo de Perú, copal, aceite de castor, pimienta, zarzaparrilla. (1)

Por algún tiempo no hubo mucho desarrollo en la industria de la cosmetología, sino hasta la evolución de la industria de aromáticos. Se puede decir que todo lo relacionado con la cosmetología avanzó notablemente durante los siglos XVII y XVIII, especialmente en Francia.

La primera revolución en perfumería se llevó a cabo en esta -- época, cuando el alcohol se tomó como vehículo solvente para --

aceites, pomadas y polvos. El segundo gran desarrollo fué la -
introducción y uso, en el siglo XIX, de pomadas a base de flor,
así como una más amplia y mejor selección de los aceites esencia
les. (1)

No fué sino hasta la introducción de un gran número de productos
químicos y sustancias aisladas, hacia finales del siglo XIX y -
principios del XX, cuando la cosmetología comenzó a emerger y -
se puede decir con toda seguridad, que ésta es la edad de oro -
de la cosmetología.

En la actualidad, los perfumes, colonias y aguas de tocador, son
probablemente una consecuencia del descubrimiento del proceso --
de la destilación.

2) FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA CONTAMINACION MICROBIOLOGICA DE COSMETICOS.

A) Calidad microbiológica de las materias primas.

Un requisito indispensable para fabricar cosméticos de buena -- calidad microbiológica, es tener materias primas que tengan microorganismos vivos en proporciones muy bajas, sobre todo, de -- microorganismos capaces de desarrollarse en los productos cosméticos. Además, se entiende que se deben tener todas las precauciones necesarias con el fin de evitar una contaminación en el curso del almacenamiento. (9, 10, 26)

A continuación se mencionan cuáles son los problemas particulares a que están sujetas las diferentes materias primas.

a) El agua.

Esta es una materia prima de un precio generalmente bajo, sobre la cual se deberá desconfiar siempre en cuanto a su calidad -- microbiológica.

Está de sobra decir, que el agua es una materia prima muy susceptible al ataque microbiano.

Un agua muy pura, tal como el agua bidestilada, está lejos de -- estar libre de bacterias, y se subestima generalmente el potencial de desarrollo que ofrece a las bacterias. Existe un gran número de géneros bacterianos que se pueden encontrar contami--

nando el agua, y no se discute la posibilidad de encontrar los géneros Pseudomonas, Xanthomonas, Achromobacter y Flavobacterium. Ciertas aguas naturales contienen Pseudomonas en número elevado, esta bacteria también se desarrolla en aguas sintéticas. La experiencia muestra que sobre todo el agua deionizada, está a menudo fuertemente contaminada. (21, 26, 29)

En los últimos años, se ha podido observar una gama entera de publicaciones a este respecto. Todos concuerdan en culpar de este problema a los filtros, y sobre todo a las resinas de intercambio de iones. Estos, justamente son los sitios donde se establecen los microorganismos y así, ambos actúan como fuente de contaminación. Debido a la presencia de oxígeno y de trazas de materia orgánica, los microorganismos pueden fijarse y multiplicarse muy rápidamente, sus exigencias nutricionales, -- por otra parte, son mínimas, hecho que se demuestra por el crecimiento de cepas autótroficas de los géneros Flavobacterium y Xanthomonas, en las aguas minerales embotelladas. (21, 26, 29)

b) Materias primas de origen mineral.

Entre las materias primas de origen mineral que interesan al microbiólogo, se pueden citar: el talco, la bentonita, el kaolín, pigmentos tales como el óxido de zinc, de titanio, etc. Estos -- presentan una distribución muy heterogénea de microorganismos, -- tanto en número de bacterias como en géneros bacterianos. Hay -- materias minerales que pueden estar estériles e incluso pueden --

ejercer una acción bactericida (ciertas sales de zinc, por ejemplo). Podemos encontrar materiales minerales contaminados con bacilos Grampositivos esporulados de los géneros Bacillus y - - Clostridium; o bien con bacterias Gramnegativas. (9, 10, 21, - 26, 29)

c) Materias primas de origen vegetal.

Los aceites, las grasas y las ceras vegetales generalmente contienen cuentas bajas de microorganismos; sin embargo, no son estériles. Las gomas de origen vegetal, tal como la goma arábica, están generalmente muy contaminadas. Muy a menudo se observa - que su calidad microbiológica está en relación directa con su precio.

La calidad microbiológica de extractos de plantas medicinales, dependen de la forma en que son obtenidos. Los jugos de frutas o de legumbres son vehículos de levaduras y de esporas de - - hongos. (21, 26, 29)

d) Materias primas de origen animal.

Algunos productos como las grasas, la lanolina, etc., generalmente no representan problemas desde el punto de vista bacteriológico; pero hay ciertos productos que son potencialmente peligrosos, tales como los extractos de órganos, "piedra mágica" de la cosmetología moderna. La calidad microbiológica de los extractos de glándulas, etc. depende directamente del modo de - -

preparación, de estabilización y de almacenamiento. El bacteriólogo deberá desconfiar siempre de los extractos de órganos - y deberá someterlos a un control microbiológico riguroso. Se ha visto que la calidad de estos productos varía de una región a otra (y depende del precio), por tanto sería recomendable exigir un certificado de calidad bacteriológica a su proveedor.

Finalmente, se tienen los colorantes de origen animal, como es el caso de la cochinilla, contaminada por Salmonella. (21, 26, 29)

e) Materias primas de origen sintético.

Desde un punto de vista filosófico, se prefieren los productos naturales, a los productos de síntesis, pero se debe admitir que la calidad bacteriológica de éstos, es generalmente buena y muy superior a la de un gran número de productos naturales. Este es un hecho que debemos admitir simplemente.

Los ésteres de ácidos grasos superiores, los silicones, las ceras sintéticas, los emulsificantes, etc., son menos propensos a la contaminación, debido a su modo de fabricación y purificación -- con solventes orgánicos y porque algunos no tienen las propiedades de un medio nutriente, como las materias primas de otro origen.

El mismo principio se aplica a las sustancias odorizantes y a -- las bases de los perfumes, sean de origen sintético, o de origen

natural. Generalmente no contienen más que una cantidad muy --
baja de microorganismos y su buena calidad bacteriológica es --
una consecuencia directa de sus propiedades bacteriostáticas y
algunas veces bactericidas. (21, 26, 29)

B) Condiciones higiénicas de fabricación.

Es una regla muy general, que la pureza microbiológica de un --
producto manufacturado no puede obtenerse sin la estricta vigi-
lancia y seguimiento de una cadena continua de precauciones con-
cernientes a los locales, acondicionamiento e higiene de fabri-
cación.

Para evaluar justamente el riesgo, es conveniente considerar --
las propiedades de los microorganismos que pueden explicar su --
supervivencia en el medio ambiente y en los productos fabricados.

Se reconocen dos maneras de transmisión:

- El contacto directo con los operadores, con el mate-
rial, o con el equipo en general.
- La contaminación indirecta por el medio ambiente.

(9, 10, 26)

Un análisis de las principales fuentes de contaminación, muestra --
que los microorganismos transmitidos por alguna de estas formas --
son principalmente de la flora humana, de bacterias del agua y de --
bacterias del medio ambiente y deben tener una gran vitalidad que --

les permita resistir la desecación, las variaciones de temperatura, de pH, y más aún, de soportar la acción de los agentes físicos y químicos con los cuales entran en contacto.

En relación con la contaminación aérea de un local, tres factores principales, son responsables del grado de contaminación microbiana a saber.

- Las características de los materiales utilizados para su construcción.
- El sistema de ventilación (acondicionamiento del aire).
- Y sobre todo el tipo de actividades que se realizan en el local. (9, 10, 26)

Las especies que se encuentran más regularmente en el aire son: bacilos esporulados Grampositivos; cocos Grampositivos como Staphylococcus, Micrococcus, Streptococcus faecalis; bacilos Gram positivos no esporulados Corynebacterium. En cuanto a otras especies muy adaptables, se desarrollan tanto en medio húmedo como en medio seco. Este es el caso de los bacilos Gram negativos, tales como las Enterobacterias; Pseudomonas y otras especies cercanas. (9, 10, 26)

En resumen, si no se tiene la precaución de que el equipo y el local se encuentren en buenas condiciones asépticas, será necesario desinfectarlos con agentes físicos y químicos, para tener-

los conservados adecuadamente entre una fabricación y otra.

La higiene que se tenga en el local de manufactura, repercutirá en los productos que se fabriquen; los pisos, las paredes y los techos, deberán estar siempre limpios, sin superficies rugosas o permeables, evitando además la circulación de polvo y de aire.

Otro punto muy importante es la higiene del personal. Tanto la piel como el cuero cabelludo de las personas que fabriquen el producto, están contaminados; además, el polvo que se adhiere a sus ropas constituye otra forma de contaminación y puede introducirse en el proceso si no se tienen las precauciones adecuadas, por lo que es recomendable el lavado frecuente de las manos con soluciones desinfectantes, el uso de cofias para detener el cabello, así como exámenes periódicos que proporcionen datos acerca de la salud de los operadores. (9, 10, 26)

C) El consumidor.

Otra fuente de contaminación es, sin discusión, el consumidor. Aún después de haber sido lavadas con un jabón ordinario, las manos albergan una gran cantidad de microorganismos y cientos de ellos pasan al producto cosmético. (9, 10, 21, 26, 29)

La higiene de las manos es de una importancia fundamental, debido al peligro que las manos contaminadas representan en la difusión de enfermedades infecciosas.

Las uñas deben lavarse cuidadosa y regularmente, y con más razón antes de aplicar un cosmético sobre la piel.

El cosmético puede servir como un vehículo para la diseminación de la contaminación de un usuario a otro, cuando dos personas usan el mismo cosmético. El problema de la contaminación con el uso y la infección cruzada, puede disminuirse instituyendo que los cosméticos sean de uso personal.

Una precaución que el consumidor debe tener siempre, es no dejar jamás abierto el recipiente que contiene un cosmético, ya que el aire de la atmósfera jamás es estéril, más aún, contiene un gran número de microorganismos que se pueden depositar fácilmente en la superficie de la preparación, y así, multiplicarse rápidamente. (4, 9, 10, 21, 26, 29)

3) EL USO DE MICROSISTEMAS DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA EN EL DIAGNOSTICO MICROBIOLOGICO.

La introducción de microsistemas de investigación bioquímica por varias compañías comerciales a finales de los 60's, con los cuales la identificación bioquímica de bacterias puede ser ejecutada fácilmente, representa un gran avance en el diagnóstico microbiológico. Hasta entonces, muchas de las formulaciones de los medios y técnicas de cultivo empleadas en los laboratorios de diagnóstico microbiológico, no habían cambiado sustancialmente desde principios del siglo XX.

La construcción compacta de estos equipos de investigación bioquímica, permite muchas ventajas y hace que su uso sea muy conveniente en los laboratorios de microbiología; entre esas ventajas tenemos:

- Pequeño espacio de almacenamiento.
- Largo tiempo de caducidad.
- Fácil y cómodo uso.
- Rápida inoculación.
- Interpretación fácil de las reacciones químicas.
- Control de calidad estandarizado proporcionado por fabricantes. (2; 23; 28)

El uso de los equipos y de medios de cultivo adecuados para el aislamiento de las bacterias, ha hecho posible definir "biotipos", por medio de los cuales muchas especies pueden ser subagrupadas más tarde. (2, 11, 14, 15, 28)

Se han ideado modelos matemáticos por medio de los cuales, las pruebas bioquímicas se convierten en números de biotipo, usando en lo posible una computadora para ayuda en la identificación bioquímica de las bacterias ó, en su defecto, algunos fabricantes tienen catálogos de perfiles ó registros disponibles con listas de números de biotipos de numerosas especies de bacterias. (22, 23)

Estos números de biotipos se basan en datos obtenidos del examen de miles de reacciones bioquímicas.

Los microsistemas de investigación bioquímica, inicialmente fueron desarrollados para la identificación de miembros de la familia Enterobacteriaceae, debido a su frecuencia de aislamiento de muestras clínicas, su relativo rápido crecimiento y generalmente distintas reacciones bioquímicas.

A la fecha, numerosas marcas comerciales de microsistemas de identificación bioquímica se han introducido en el mercado y han tenido aceptación general. Algunas para la identificación de bacilos Gramnegativos, son las siguientes:

API 20-B (Analytab Products Inc.)

Interotube (Roche Diagnostics)

Entero-Set (Fisher Diagnostics)

Minitek (Bioquest (BBL), Division of Becton-Dickinson and Co.)

Micro-ID (General Diagnostics)

r/b Enteric (Diagnostic Research) (2, 11, 14, 15, 19, -
22, 23, 24, 28, 33)

En este trabajo se utilizó el sistema API 20-E, que es una versión miniaturizada y estandarizada de técnicas bioquímicas convencionales, para la identificación de Enterobacterias y otros bacilos Gramnegativos.

Es un sistema de micropruebas listas para su empleo, que permite la realización de 23 pruebas bioquímicas a partir de una sola colonia aislada.

El sistema API 20-E está constituido de una galería de 20 microtubos conteniendo los sustratos deshidratados. Una suspensión bacteriana se reparte en los tubos y se disuelven los sustratos. Los productos metabólicos se ponen en evidencia por reacciones coloridas o por la adición de reactivos después de 24 ó 48 horas de incubación a 35°-37° C. (2, 11, 14, 15, 19, 24, 28, 33)

1) MATERIAL

A) Equipo eléctrico

Agitador para tubos de ensaye Vortex o equivalente.

Autoclave con termómetro y manómetro.

Baño de agua a 37°C con termostato y termómetro.

Baño de agua a 45°C con termostato y termómetro.

Campana de flujo laminar.

Contador de colonias Quebec o equivalente.

Contador manual Tally.

Estufa a 22°C con termostato que evite variaciones -
mayores de $\pm 0.10^{\circ}\text{C}$.

Estufa a 37°C con termostato que evite variaciones -
mayores de $\pm 0.10^{\circ}\text{C}$.

Estufa a 44°C con termostato que evite variaciones -
mayores de $\pm 0.10^{\circ}\text{C}$.

Horno para esterilizar a 180°C.

Microscopio.

Refrigerador.

B) Material y equipo de uso común en el laboratorio de - -
microbiología.

Algodón.

Asa de platino.

Balanza granataria de capacidad no mayor a 2500 g y -
de sensibilidad de 0.1 g.

Cajas de Petri de 100 X 15 mm.

Cubreobjetos.

Espátulas de acero inoxidable.

Frascos con tapa.

Gradillas para tubos de ensaye adecuadas al tamaño de
los tubos.

Matraces Erlenmeyer.

Mecharo Bunsen de flama grande.

Morteros.

Papel filtro.

Pipetas de 1 ml, 5 ml y 10 ml.

Pipetas Pasteur.

Portaobjetos.

Tubos con tapón de rosca 12 X 75 mm.

Tubos con tapón de rosca 16 X 150 mm.

Tubos de ensaye de 12 X 75 mm.

Tubos de ensaye de 13 X 100 mm.

Tubos de ensaye de 16 X 150 mm.

Varillas de vidrio de 3.5 mm de diámetro y 20 cm de longitud, con un doblez terminal en ángulo recto, de 4 cm.

Vasos de precipitado.

C) Medios de cultivo.

Agar Baird - Parker.

Agar Cetrimida.

Agar de papa y dextrosa.

Agar Sugon.

Agar para la investigación de DNasa.

Caldo cerebro corazón.

Caldo Eugon.

Equipo API 20 - C.

Equipo API 20 - S.

Medio de arroz.

Medio de papa, zanahoria y bilis de buey.

Plasma humano o de conejo.

Solución salina fisiológica.

D) Reactivos.

Aceite de inmersión.

Aceite de parafina.

Acetona.

Acido acético.

Acido clorhídrico.

Acido sulfanílico.

Agua destilada.

Alcohol etílico.

Alcohol isomílico.

Alfa-naftol.

Azul de toluidina.

Cloruro de sodio.

Cloruro férrico.

Cristal violeta.

Hidróxido de potasio.

Iodo.

Ioduro de potasio.

Lecitina.

Naftilamina.

Oxalato de dimetilparafenilendiamina.

Paradimetilaminobenzaldehído.

Peróxido de hidrógeno.

Reactivo 1 para investigación de fosfatasa.

Reactivo 2 para investigación de fosfatasa.

Safranina.

Triton X 100

Tween 80.

Xilol.

2) METODOLOGIA Y CRITERIOS TECNICOS.

El método propuesto está destinado para la investigación de microorganismos contaminantes en el conjunto de productos capilares y cosméticos contaminables, con excepción de lociones con grado alcohólico alto ($\geq 50^\circ$), de oxidantes, tintes de oxidación, permanentes y lacas.

Corresponde al laboratorio de control de calidad realizar estos estudios, mediante controles a nivel de cubas de fabricación, de almacenamiento, de los artículos de acondicionamiento, del material de producción, etc. Sobre todo, en el caso en donde la calidad de los productos terminados sea defectuosa, con la finalidad de encontrar el origen de la contaminación.

1.) MUESTREO

Se toma un número representativo de unidades para asegurar la calidad global; se toma la primera unidad, a la mitad y al final de la emisión y en todas las situaciones particulares que representen un peligro potencial de contaminación, con un mínimo de 5 muestras individuales por lote de fabricación.

La técnica de recolección de una muestra para su análisis microbiológico, establece una serie de precauciones y condiciones que deben observarse a fin de obtener resultados significativos en el trabajo.

Las recomendaciones generales para obtener muestras, son las --
siguientes:

- a) Todo el material que se use (bolsas, frascos, - -
etc.), deberá esterilizarse en horno o en autocla
ve, según el caso; para esto es necesario prote--
gerlo individualmente con papel resistente.
- b) Al coleccionar la muestra, evitar contaminaciones -
del ambiente, tales como polvo, saliva, descar---
gas nasofaríngeas o de cualquier otra naturaleza.
El recipiente o bolsa se abrirá justamente lo ne-
cesario para introducir la muestra; hecho esto -
volverá a cerrarse y cubrirse con el papel que -
la protege.
- c) Es esencial que el recipiente y los dispositivos -
empleados para extraer la muestra no sólo se en---
cuentren estériles, sino además químicamente lim--
pios, libres de sustancias que pudieran afectar la
viabilidad de los microorganismos.
- d) Es recomendable identificar claramente el recipien-
te mediante rótulo o etiqueta (indelebles); antes -
de colocar en él la muestra, con el fin de evitar -
confusiones.
- e) Si se trata de cosméticos a granel, obtener la - -

muestra de diferentes partes. Si se estima de interés, conviene obtener muestras independientes - que pudieran poner de manifiesto distintos problemas.

- f) Toda medida que se tome para acortar el tiempo comprendido entre la recolección de las muestras y su análisis, contribuirá notoriamente a evitar falseamientos en la imagen microbiológica de un cosmético, ya que los cambios que puede sufrir durante ese tiempo son tanto cualitativos como cuantitativos, - es posible que se encuentren cifras mayores a las originalmente presentes como resultado de la proliferación de un grupo particular de microorganismos, o menores si hay un efecto antagónico de otro grupo de microorganismos. Las bacterias patógenas - pueden incluso morir, o llegar a encontrarse en tal desventaja con el resto de la flora, que no sea posible ponerlas de manifiesto con las técnicas de análisis utilizadas.
- g) En el informe o acta se consignará toda la información pertinente que pudiera afectar la prueba o el significado del resultado.
- h) Antes de procesar la muestra, comprobar que no ha ocurrido derramamiento del contenido del recipiente

y que el envase se mantiene íntegro, libre de perforaciones, rasgaduras o roturas de cualquier tipo. Si no se presenta esto último, la muestra es impropia para el estudio.

2.) METODO DEL "TODO O NADA".

Si la mayoría de los productos no están contaminados, es útil -- emplear el método llamado del "Todo o nada", el cual permite liberar rápidamente los productos no contaminados. Los contaminados serán sometidos simultáneamente a las pruebas de:

- Enumeración.
- Investigación de microorganismos específicos.

2.1) Inoculación en medio líquido.

- a) Se introduce una muestra de 1 gr ó de 1 ml en un tubo con tapón de rosca, conteniendo 9 ml de caldo Eugon al LT-100.
- b) Se agita vigorosamente hasta obtener una suspensión completa y homogénea.
- c) En el caso de lápices labiales, lápices para los ojos o cualquier otro cosmético difícil de mezclar, se puede hacer uso de un mortero estéril, hasta obtener una suspensión completa y homogénea de la muestra.

- d) Todo el material utilizado debe ser estéril y se trabajará bajo flujo laminar o en condiciones de esterilidad.
- e) Los medios inoculados se incuban a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

2.2) Siembra en medio sólido.

- a) De los tubos con caldo Eugon al LT-100 inoculados e incubados, se transfiere por duplicado 1 ml de la muestra a cajas Petri estériles, evitando todo tipo de contaminación durante la maniobra.
- b) Se agregan 12 a 15 ml de agar Eugon al LT-100, -- fundido y mantenido a temperatura de $45^{\circ}\text{a } 48^{\circ}\text{C}$ en -- baño de agua. Mezclarlo con la muestra sobre una superficie lisa y horizontal, evitando que el medio moje la cubierta de las cajas. Se deja solidificar y se preparan testigos del medio en cajas sin inóculo.
- c) Se emplea una placa de cada muestra para detección de bacterias la que se incuba a 37°C durante 24 - horas.
- d) La otra placa que se inoculó con la misma muestra se coloca en incubación a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 - días y se empleará para la detección de hongos y

levaduras.

e) La presencia de colonias bacterianas sobre la mayoría de las cajas implica:

- La enumeración de bacterias.
- La investigación de microorganismos específicos.

3.) ENUMERACION DE BACTERIAS.

La preparación de la muestra deberá, en lo posible, permitir la conservación del envase de ésta con el fin de poder, eventualmente, hacer estudios de evolución con el tiempo.

3.1) Preparación de diluciones.

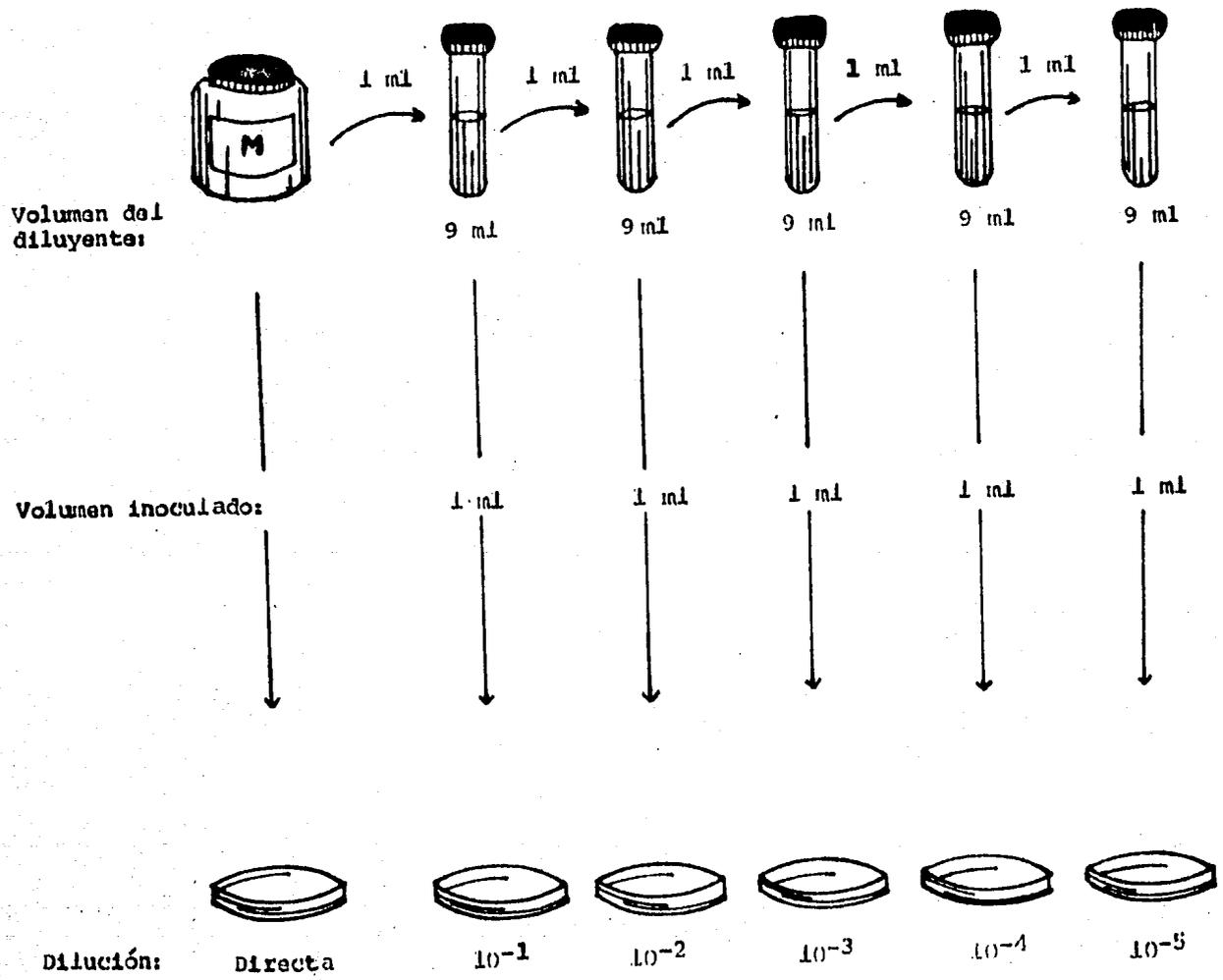
- a) Se prepara una suspensión-madre por muestra, siendo un mínimo de 5 suspensiones por lote de fabricación.
- b) Se introduce una muestra de 1 gr o de 1 ml, en un tubo con tapón de rosca conteniendo 9 ml de caldo Bugon al LT-100.
- c) Se agita vigorosamente hasta obtener una suspensión completa y homogénea. En caso necesario (lápicos labiales, lápices para ojos, etc.) ayudarse con un mortero estéril para obtener una suspensión adecuada.

- d) La anterior, constituye la primera dilución de la muestra.
- e) Se continúan las diluciones de la muestra con el mismo diluyente (caldo Bugon al LT-100), siguiendo los pasos que ilustra el esquema 1. La selección de las diluciones que se vayan a preparar y de aquéllas que se van a inocular, depende del -- número esperado de microorganismos en la muestra, con base en los resultados de análisis previos, - y de la información que se tenga del personal que la haya colectado.
- f) Se utilizan pipetas diferentes para cada dilución, inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. El volumen que se transfiera, nunca será menor del 10% de la capacidad total de la pipeta.
- g) Cada tubo con diluyente que se inocule, deberá -- agitarse siempre de la misma manera.

3.2) Recuento en placa.

Cuando se pretende investigar el contenido de microorganismos vivos en un cosmético, la técnica más comúnmente utilizada es el recuento en placa. Esta técnica se aplica para gran variedad de microorganismos y su -

PREPARACION DE DILUCIONES E INOCULACION DE CAJAS



fundamento consiste en contar las colonias que desarrollan en el medio de elección después de cierto tiempo y temperatura de incubación, presuponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo en la muestra bajo estudio. El método admite numerosas fuentes de variación, algunas de ellas controlables, pero sujetas a la influencia de varios factores.

En realidad esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes, la variedad de especies y tipos diferenciables por sus distintas necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hace que el número de colonias contadas constituya una estimación de la cifra realmente presente. No obstante, la ejecución de la técnica, cuando se siguen fielmente las condiciones que se señalan para su desarrollo, puede llegar a ser lo bastante reproducible para dar significado a los resultados que se obtengan.

Para realizar la técnica se siguen los pasos que se enumeran:

- a) Se distribuyen las cajas estériles en la mesa de trabajo, de manera que la inoculación, la adición de los medios de cultivo y su rotación, se puedan

realizar cómoda y libremente. Se marcan las tapas de las cajas con los datos pertinentes, previo a su inoculación.

- b) Se transfiere 1 ml de la muestra y/o de cada una de las diluciones a cajas Petri estériles, evitando todo tipo de contaminación durante la maniobra y aplicando la punta de la pipeta al fondo de la caja mientras escurre el líquido.
- c) Se agregan 12 a 15 ml del medio de cultivo fundido y mantenido a temperatura de 45°-48°C en baño de agua. Se mezclan con la muestra sobre una superficie lisa y horizontal, cuidando que el medio no moje la cubierta de las cajas. Se dejan solidificar y se preparan testigos del medio en cajas sin inóculo.
- d) El tiempo transcurrido desde el momento en que la muestra se incorpora al diluyente, hasta que finalmente se adiciona el medio de cultivo a las cajas, no excederá de 20 minutos.
- e) Se incuban las cajas en posición invertida durante 72 horas aproximadamente y a una temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se leen cada día hasta el tercer día. Si las colonias tienden a confluír se tomará la lectura de las 48 horas.

- f) Se seleccionan aquellas placas donde aparezcan - entre 30 a 300 colonias, pues es en ellas donde será menor el error en el recuento.
- g) Se cuentan todas las colonias desarrolladas en - las placas seleccionadas (excepto las de hongos).
- h) Con la ayuda de la lente de aumento y de la cua- drícula del contador, se cuentan todas las colo- nias de las placas seleccionadas. Si el número - se estima mayor de 300 y no se dispone de placas preparadas con las diluciones subsecuentes, contar en la mitad o en un cuarto representativo de ella, multiplicando por 2 o por 4 el número obtenido.
- i) Se multiplica por la inversa de la dilución para - obtener el número de colonias por mililitro o gra- mo de muestra.
- j) Si todas las placas no muestran colonias, o mues- tran excesiva difusión de las mismas, o están con- taminadas, o no son satisfactorias por cualquier - motivo, anótese respectivamente: 1) Sin colonias, 2) Colonias difusas, 3) Inconcluyente por acciden- te de laboratorio.
- k) Redondear la cifra obtenida en el recuento, de ma- nera que sólo aparezcan 2 dígitos significativos -

al inicio de esa cifra.

3.) INVESTIGACION DE MICROORGANISMOS ESPECIFICOS.

3.1) Staphylococcus aureus.

Los estafilococos son cocos Grampositivos que desarrollan agrupándose en racimos. Causan gran variedad de procesos supurativos en el hombre tales como: furúnculos, ántrax, osteomielitis, abscesos, infecciones de las heridas, neumonía, empiema, pericarditis, meningitis y artritis purulenta. Son microorganismos inmóviles, que no forman esporas y que ocasionalmente poseen cápsula. Sus diámetros varían entre 0.7 y 1.2 micras.

Aunque hay algunos estafilococos anaerobios obligados, la mayoría son facultativos. Crecen bien en una amplia gama de temperaturas y de pH. Desarrollan fácilmente en medios simples de cultivo, - pero las formas más patógenas crecen mejor en medios enriquecidos. Los estafilococos aislados en procesos patológicos suelen producir un pigmento de color amarillo dorado y se les conoce con el nombre de Staphylococcus aureus.

4.1.1) Siembra en el medio de Baird-Parker.

- a) Se realizan diluciones de la muestra como se describió anteriormente y se coloca 0.1 ml de cada dilución sobre una placa de agar de Baird-Parker extendiéndola con una varilla de vidrio estéril o con un asa de platino en toda la superficie del medio.

- b) Se incuban las placas invertidas, a 35°-37°C durante 24-48 horas. Después de 24 horas se seleccionan las placas que muestren de 50 a 150 colonias aisladas; se cuentan y marcan todas aquéllas que aparezcan negras, brillantes y convexas, rodeadas por una zona clara de aproximadamente de 2 a 5 mm de diámetro. Se incuban las placas 24 horas más y se incluyen en el cómputo las colonias nuevas -- que reúnan las características ya señaladas.

4.1.2) Características bioquímicas.

1.) La presencia de catalasa es constante.

- a) Con un asa de platino se toma una parte de una colonia aislada y se sumerge en un tubo conteniendo 1 ml de agua oxigenada de 10 volúmenes.

La presencia de catalasa se traduce por la formación de burbujas de oxígeno alrededor de la colonia.

Para las colonias catalasa-negativas, no se sigue la identificación.

- 2.) Los estafilococos patógenos deben, al menos, poseer dos de las tres características siguientes:

A.) Presencia de coagulasa.

B.) Presencia de DNasa.

C.) Presencia de fosfatasa.

A.) La coagulasa producida por los estafilococos patógenos causa la coagulación del plasma humano o de conejo.

a) Se siembra el número de colonias que correspondan según el cuadro, en tubos con 0.5 ml de caldo cerebro-corazón.

Incubar a 37°C durante 24 horas.

Número de colonias sospechosas en la placa	Colonias por probar
Menos de 50	3
51-100	5
101-150	7

b) A los cultivos anteriores se agregan 0.5 ml de plasma diluído volumen a volumen con solución salina estéril.

c) Se incuban en baño de agua a 37°-37°C observando a intervalos de 1 hora durante 6 horas.

d) Se reporta la prueba como positiva si hay formación de coágulo de la mezcla.

B.) Investigación de la DNasa.

a) Las colonias a estudiar se siembran en estría única, sobre el agar para la investigación de DNasa.

b) Se incuban a 37°C durante 24 horas.

c) Después de la incubación, la superficie del medio se cubre con una solución 1 N de HCl o con una solución al 0.1% de azul de toluidina. En los 5 minutos siguientes se pueden observar los aspectos siguientes:

— En presencia de HCl.

Una zona clara alrededor de la estria, el resto del medio - opaco: Cepa DNasa (+).

— En presencia de azul de toluidina.

Una zona rosa alrededor de la estria, el resto del medio -- azul: Cepa DNasa (-).

C.) Investigación de fosfatasa.

- a) Se toma una colonia aislada con un asa de platino y se prepara una suspensión microbiana en 0.5 ml de agua purificada estéril.
- b) Se agrega 1 ml de reactivo número 1. Se agita y coloca a baño de agua a 37°C durante 30 minutos. Adicionar enseguida - 1 ml de reactivo número 2 y agitar.
- c) La lectura debe efectuarse en los 10 minutos siguientes a la adición del reactivo número 2.

— Una reacción positiva se manifiesta por la aparición inmediata de un color rojo-granate.

— Una reacción negativa se traduce por la ausencia de -
cambio de color.

1.) Pseudomonas aeruginosa.

Se incluyen en el género Pseudomonas los bacilos Gramnegati-
vos, aerobios, móviles por un flagelo polar, no esporula-
dos, generalmente no producen cápsula pero se conocen cepas
con una capa extracelular que producen colonias mucoides.
Se encuentran en el agua, en el suelo y en el aire.

Pseudomonas aeruginosa se encuentra en las heces humanas, y
es patógena al hombre sólo en determinadas circunstancias:

Si se introduce en el espacio sub-aracnoideo por punción --
lumbar, puede causar meningitis bacteriana.

En las vías urinarias produce fácilmente enfermedades como -
consecuencia de instrumentación.

Frecuentemente se encuentra en la piel humana normal y en -
ocasiones es responsable de lesiones inflamatorias de las -
vías auditivas y nasales.

Puede causar infección en la córnea y es, sin duda, la bacte-
ria que más rápidamente la destruye. La perforación de la -
córnea puede presentarse entre 18 y 24 horas después del ---
principio de la infección.

Sobre medios de gelosa, las colonias de Pseudomonas aerugi--

nosa dan lugar a un pigmento verde o azul difusible. En este pigmento se encuentra la piocianina soluble en cloroformo y agua y la fluoresceína soluble solamente en agua.

Da una reacción positiva a la prueba de la oxidasa.

4.2.1) Siembra en el medio de Cetrinida.

El medio de Cetrinida (bromuro de N-cetil-N-N-N-trimetilamonio), permite el aislamiento selectivo de Pseudomonas aeruginosa.

Las colonias cultivadas en este medio son redondas, planas, grisáceas, con brillo metálico. Frecuentemente se observa la presencia de un pigmento azul verde que difunde en el medio.

- a) Se toman colonias aisladas provenientes de las placas en las cuales hubo crecimiento al realizar el método del "Todo o nada".
- b) Se siembra en la superficie con un asa de platino.
- c) Se incuban las placas sembradas a 44°C durante 18-48 horas en posición invertida. A esta temperatura el medio es más selectivo.

4.2.2) Características bioquímicas.

- 1) La presencia de oxidasa es constante.

- a) Se impregna un disco de papel con una solución al 1% de oxalato de tetrametilparafenilendiamina o de una preparación equivalente.
- b) Se toma una colonia aislada (proveniente de las placas de agar Cetrimida) con un asa de platino, depositándola sobre el disco de papel impregnado.
- c) Se lee la reacción de inmediato.

— Reacción positiva: Una coloración roja o violeta se desarrolla muy rápidamente sobre el papel alrededor de la colonia.

— Reacción negativa: No hay cambio de coloración.

- 2) La investigación de las características bioquímicas puede hacerse fácil, rápida y ventajosamente utilizando la galería API-Sistema 20 E.

Pseudomonas aeruginosa presenta las características siguientes:

- a) Presencia de una dihidrolasa de arginina.
- b) Utiliza el citrato de sodio como única fuente de carbono.
- c) Presencia de una gelatinasa.
- d) Utiliza la glucosa produciendo ácido.

1.3) Candida albicans.

Candida albicans es un microorganismo dimórfico.

En la superficie de los medios sólidos ricos crece como levaduras gemantes ovales o redondas, pero cuando lo hace en la profundidad del medio, puede formar hifas y en los tejidos infectados pueden encontrarse característicamente ambas formas.

Crece fácilmente en los medios habituales a la temperatura ambiente o a 37°C. En los cultivos en medios sólidos, las colonias recientes se asemejan a las bacterianas, son lisas y cremosas, pero las colonias viejas son grandes y aparecen hundidas y rugosas.

El cultivo en agar con harina de arroz o de maíz estimula la formación de esporas características, rodeadas de gruesas paredes (clamidosporas), que distinguen a Candida albicans de otras especies de Candida, que se pueden hallar presentes con frecuencia en las mucosas normales de la boca, vagina y tubo digestivo, pero pueden ser patógenas en circunstancias especiales tales como:

En personas que están afectadas por diferentes enfermedades por ejemplo: (linfomas malignos, diabetes grave).

En los individuos que han sido tratados intensamente con medicamentos antibacterianos de amplio espectro o sometidos

a tratamientos inmunosupresores.

En personas en quienes puede producir diferentes tipos - de lesiones, agudas o crónicas, más o menos diseminadas. A continuación se citan las más frecuentes:

- a) Candidiasis oral (o aftas) consiste en unas placas -- blancas, discretas o confluentes, en las membranas - mucosas de la boca y faringe.
- b) Candidiasis vulvovaginal. La mucosa vaginal se afec- ta en ocasiones durante el embarazo y en la diabetes.
- c) Candidiasis broncopulmonar debida a la invasión de -- los tejidos bronquiales y pulmonares, es en general - secundaria a la obstrucción bronquial crónica.
- d) Candidiasis intertriginosa. Es una infección frecuen- te en las áreas de la piel que están permanentemente húmedas y maceradas.

4.3.1) Morfología de Candida albicans.

- A) Sobre el agar Sugon al LT-100 que se utilizó para la - - prueba del "Todo o nada", incubado a 22°C durante 5 días; Candida albicans forma pequeñas colonias blancas, lisas, cremosas. El examen de las colonias, después de la colo- ración de Gram, revela células redondas u ovales de - - 3-5 μ de diámetro, de color violeta con gemaciones mul- tilaterales.

B) Prueba de filamentación (facultativa).

- a) Poner 0.5 ml de suero sanguíneo humano en un tubo pequeño.
- b) A partir de una colonia aislada, hacer una suspensión - poco densa con el suero.
- c) Incubar a 37°C durante 4 horas.
- d) Examinar al microscopio una gota de la suspensión sobre - un portaobjetos.

— La prueba es positiva cuando se observan las levaduras formando gemaciones filamentosas, levaduras alargadas unidas por sus extremos.

C) Formación de clamidosporas.

- a) Sobre un portaobjetos, previamente esterilizado a la flama del mechero y enfriado, colocar alrededor de 0.5 ml de cualquiera de los medios siguientes:
agar de papa y dextrosa, medio de arroz, o del medio de - papa, zanahoria y bilis de buey.
- b) Colocar el portaobjetos sobre un tubo de vidrio doblado - en U y puesto en el fondo de una caja de Petri, y agregar 1 ml de agua en la caja para evitar la desecación.
- c) Sembrar la colonia a estudiar por medio de 3 estrías - - longitudinales paralelas. Recubrir la porción central -

del inóculo con un cubreobjetos esterilizado a la flama.

- d) Incubar a temperatura ambiente hasta que aparezca un desarrollo a nivel de las estrías, examinar directamente al microscopio con el objetivo seco débil.

Si existe Candida albicans se verá la presencia de un micelio o de un pseudomicelio, que se presenta en forma de filamentos más o menos largos, hifas tabicadas, ramificadas y gemaciones de células.

En las articulaciones del micelio proliferan las pequeñas formaciones redondas reunidas en racimos llamadas blastosporas, en los extremos de los filamentos se encuentran algunos cuerpos redondos, de paredes gruesas, muy refringentes, de alrededor de 6-12 μ de diámetro, llamadas clamidosporas, cuya presencia es característica de Candida albicans, aunque raramente Candida stellatoidea también presenta clamidosporas.

4.3.2) Características bioquímicas.

A) Auxonograma.

Este método permite evaluar la asimilación de glúcidos de parte de las levaduras por la vía oxidativa. Su realización en la galería API-Sistema 20 C permite evaluar el

desarrollo a simple vista en 48 horas a 37°C.

Candida albicans revela los siguientes resultados:

Glucosa (+)

Sacarosa (+)

Maltosa (+)

Galactosa (+)

Lactosa (-)

Rafinosa (-)

B) Zimograma (o fermentación de azúcares).

El API-Sistema 20 C, permite evaluar el consumo de azúcares en anaerobiosis, por el cambio en el pH del medio y - con la ayuda del virre de un indicador colorido, o por la presencia de burbujas de gas sobre una película de aceite de vaselina.

Para utilizar este sistema, se deben seguir los siguientes pasos:

API 20 - Candida.

1.) Preparación del inóculo.

a) A partir de una colonia perfectamente aislada, se hace

una suspensión de 2 ml de caldo Eugon al LT-100.

La densidad de la suspensión debe ser ligera, de lo contrario la lectura de las asimilaciones puede ser difícil de interpretar.

2.) Inoculación de la galería API 20 - C.

- a) Se prepara una caja individual de incubación con tapa (esta caja la proporciona el fabricante).
 - b) Se identifica la galería, escribiendo la referencia del análisis a efectuar sobre la lengüeta provista para tal efecto.
 - c) Se distribuyen 5 ml de agua en los alvéolos del fondo de la caja de incubación que funcionará como cámara húmeda durante el tiempo de incubación.
 - d) Se saca una galería de su envoltura y se introduce en la caja individual de incubación.
 - e) Se introduce la suspensión en los tubos de la galería, con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, sobre el costado de la cúpula e inclinando ligeramente la galería, para evitar la formación de burbujas.
- Para las ocho primeras características GLU, GAL, MAL, SAC, LAC, RAF, TRE, MEL no llenar el tubo y llenar la cúpula con aceite de parafina.

- Para las características O, INO, GLU, GAL, MAL, SAC, --
LAC, RAF, TRB, MEL, CEL, ACT llenar el tubo y la cúpula
completamente sin rebasar el nivel; la formación de un
menisco debajo de la cúpula trae consigo defectos en la
lectura.

f) Se tapa la caja de incubación y se mete a incubar a -
30°C o a 37°C.

3.) Lectura de la galería.

a) Después de 24 horas se efectúa la primera lectura y -
se anotan los resultados.

b) Después de 48 horas se efectúa la lectura final y se -
anotan los resultados.

Para la actidiona ACT se toma como resultado la lectura -
de 24 horas.

PRUEBA	Característica	Reacción	
		positivo	negativo
<u>GLU</u>	Glucosa	Amarillo	Púrpura
<u>GAL</u>	Galactosa		
<u>MAL</u>	Maltosa	La producción de gas se interpreta por la presencia de burbujas en el fondo del tubo.	
<u>SAC</u>	Sacarosa		
<u>LAC</u>	Lactosa		
<u>RAF</u>	Rafinosa		
<u>TRF</u>	Trealosa		
<u>MEL</u>	Melibiosa		
<u>0</u>	Testigo		Transparente
<u>INO</u>	Inositol	Opaco	Transparente
<u>GLU</u>	Glucosa		
<u>GAL</u>	Galactosa		
<u>MAL</u>	Maltosa		
<u>SAC</u>	Sacarosa		
<u>LAC</u>	Lactosa		
<u>RAF</u>	Rafinosa		
<u>TRF</u>	Trealosa		
<u>MEL</u>	Melibiosa		
<u>CEL</u>	Celobiosa		
<u>ACT</u>	Resistencia a Actidiona		

API 20 - Enterobacteriaceas.

1.) Preparación del inóculo.

- a) Se toma una colonia perfectamente aislada y se suspende en 5 ml de solución salina fisiológica (0.85%) estéril o, en su defecto, en agua destilada estéril.

2.) Inoculación de la galería API 20 - E.

- a) Se prepara una caja individual de incubación con tapa (esta caja la proporciona el fabricante).
 - b) Se identifica la galería, escribiendo la referencia del análisis a efectuar sobre la lengüeta provista para tal efecto.
 - c) Se distribuyen alrededor de 5 ml de agua en el fondo de la caja de incubación, que funcionará como cámara húmeda durante el tiempo de incubación.
 - d) Se saca una galería de su envoltura y se introduce en la caja individual de incubación.
 - e) Se introduce la suspensión en los tubos de la galería, con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril, sobre el costado de la cúpula e inclinando ligeramente la galería, para evitar la formación de burbujas.
- Para las características marcadas CIT, VP y GEL se llena tubo y cúpula.

- Para las otras características se llena sólo el tubo.
 - Para las características marcadas ADH, LDC, ODC y URE, se llenan completamente las cúpulas de aceite de parafina.
- f) Se incuba la galería a 35°-37°C durante 24 horas.

3.) Lectura de las galerías.

- a) Después de la incubación, anotar todas las reacciones espontáneas.
 - b) Si el tubo GLU es positivo y/o si tres o más son positivos: revelar las pruebas que necesitan la adición de reactivos.
- Los reactivos TDA, VP1 y VP2 se agregan primero. Si la TDA es positiva la reacción es inmediata. La reacción VP, en cambio, puede ser positiva únicamente 10 minutos después de la adición de los reactivos.
 - El reactivo OM se agrega al tubo del H_2S (si este es negativo) o del ONPG. Estos tubos ricos en peptonas, permiten una multiplicación de microorganismos y sensibilizan la reacción. La reacción se desarrolla lentamente y la lectura definitiva debe hacerse en 10 minutos.
- La reducción de nitratos se pone en evidencia por los reactivos NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU.

- El reactivo IND, para la revelación del indol, se agrega al último, debido a que los ácidos puedan interferir con las demás reacciones.
 - La producción de gas carbónico por las bacterias Gramnegativas puede observarse en los tubos que contienen carbohidratos, cualquiera menos la glucosa, en particular el Manitol.
- c) Si el tubo GLU es negativo y el número de pruebas positivas es inferior o igual a dos: no agregar los reactivos y reincubar 24 horas más.

4.) Identificación.

- a) La identificación de los microorganismos puede efectuarse con la ayuda de la tabla de porcentajes incluida en el equipo.
- b) Para una identificación rápida de especies y de biotipos, API propone un índice que comprende un código que transforma automáticamente los 21 resultados de las pruebas bioquímicas (20 pruebas + oxidasa) en un número de 7 cifras llamado "perfil numérico".
- c) En todos los casos, la identificación efectuada debe tener en cuenta ciertos datos muy útiles y muy a menudo descuidados, tales como:

- Origen de la muestra.
- Características coloniales (color, tamaño, olor, textura, etc.)
- Reacción a la tinción de Gram.
- Morfología microscópica.
- Reacción serológica.

PRUEBA	Característica	Positivo	Negativo
ONPG	o-nitrofenol	Amarillo	Incoloro
ADH	Dihidrolasa de Arginina	Rojo ó naranja	Amarillo
LDC	Descarboxilasa de Lisina	Rojo ó naranja	Amarillo
ODC	Descarboxilasa de Ornitina	Rojo ó naranja	Amarillo
CIT	Citrato de sodio	Azul verde ó azul	Verde pálido ó amarillo
H ₂ S	Acido sulfhídrico	Depósito negro	Incoloro
URE	Ureasa	Rojo ó naranja	Amarillo
TDA	Desaminasa de Triptofano	Rojo - café	Amarillo
IND	Indol	Anillo rojo	Incoloro ó amarillo
VP	Voges - Proskauer	Rosa ó rojo	Incoloro
GEL	Gelatinasa	Difusión de - pigmento	No hay difusión de pigmento
GLU	Glucosa	Amarillo	Azul ó azul verde
MAN	Manitol	Amarillo	Azul ó azul verde
INO	Inositol	Amarillo	Azul ó azul verde
SOR	Sorbitol	Amarillo	Azul ó azul verde
RHA	Ramnosa	Amarillo	Azul ó azul verde
SAC	Sacarosa	Amarillo	Azul ó azul verde
MEL	Melibiosa	Amarillo	Azul ó azul verde
AMY	Amigdalina	Amarillo	Azul ó azul verde
ARA	Arabinosa	Amarillo	Azul ó azul verde
OX	Oxidasa	Rojo ó violeta fuerte	Incoloro

En el presente estudio se analizaron 1,475 muestras individuales de cosméticos faciales de marca de prestigio en el mercado, correspondientes a 295 lotes de cosméticos. Los análisis se efectuaron en las etapas de: a) Producto terminado a granel (a nivel de cubas de fabricación) y, b) Producto terminado y acondicionado.

Se hace esta diferencia porque cuando se tiene el producto terminado a granel, se hace el control de calidad microbiológico y si esta calidad es buena, entonces se procede a acondicionarlo en los envases y empaques adecuados y se realiza el control microbiológico nuevamente en esta etapa.

Los resultados de los cosméticos analizados, se agrupan para facilitar su estudio, de acuerdo a su uso y al lugar de empleo, en 5 grupos que son:

A) Productos que se aplican cerca de los ojos.

- Sombras para ojos en polvo.
- Sombras para ojos en crema.
- Lápices para ojos.
- Delineadores para pestañas.

B) Maquillajes.

- Bases para maquillajes.
- Maquillajes en crema.
- Rubores en crema.

C) Mascarillas.

- Astringentes.
- Nutritivas.

D) Cremas faciales.

- Cremas de día.
- Cremas de noche.
- Cremas nutritivas.
- Cremas humectantes.

E) Cremas para el contorno de los ojos.

Para presentar los resultados en forma adecuada y para facilitar su análisis, se encuentran resumidos en cuadros en donde se ve en forma clara y concisa, la frecuencia (f) y el porcentaje (%) con que se presentan en las muestras analizadas, los diferentes intervalos de bacterias/g, se presentan también la frecuencia acumulada (fac) y el porcentaje acumulado (% ac) para tener una idea global en un intervalo determinado. Se encuentran también en estos cuadros, algunas medidas de resumen que se utilizan en la industria y que sirven porque nos orientan para saber en forma estadística cómo se encuentra nuestra población, estas medidas son: valor mínimo, valor máximo, media aritmética, mediana y moda.

Estos cuadros se presentan a continuación cotejando los resultados del análisis de cosméticos a nivel de cubas de fabricación (a granel) y los resultados de los mismos cosméticos a nivel de producto terminado.

Distribución de microorganismos en productos cosméticos que se aplican cerca de los ojos (Producto terminado a granel).

Bacterias/g	F	Fac	%	% ac	Medidas de Resumen
0	193	193	80.42	80.42	Valor mínimo 0
					Valor máximo 10
					Media 1.9
1-10	47	240	19.58	100.00	Mediana 0
					Moda 0

Cuadro 2

Distribución de microorganismos en productos cosméticos que se aplican cerca de los ojos (Producto terminado y acondicionado).

Bacterias/g	F	Fac	%	% ac	Medidas de Resumen
0	165	165	68.75	68.75	Valor mínimo 0
1-10	72	237	30.00	98.75	Valor máximo 150
11-100	2	239	0.83	99.58	Media 3.8
101-1000	1	240	0.42	100.00	Mediana 0
					Moda 0

Distribución de microorganismos encontrados en maquillajes (Producto terminado a granel).

Bacterias/g	F	Fac	%	% ac	Medidas de Resumen
0	302	302	90.15	90.15	Valor mínimo 0
1-10	32	334	9.55	99.70	Valor máximo 70
11-100	1	335	0.30	100.00	Media 1.2
					Mediana 0
					Moda 0

Cuadro 4

Distribución de microorganismos encontrados en maquillajes (Producto terminado y acondicionado).

Bacterias/g	F	Fac	%	% ac	Medidas de resumen
0	279	279	83.28	83.28	Valor mínimo 0
1-10	40	319	11.94	95.22	Valor máximo 328
11-100	12	331	3.58	98.80	Media 5.4
101-1000	4	335	1.20	100.00	Mediana 0
					Moda 0

Distribución de microorganismos encontrados en mascarillas faciales (Producto terminado a granel).

Bacterias/g	F	Fac	%	% ac	Medidas de Resumen
0	87	87	58.00	58.00	Valor mínimo 0
1-10	52	139	34.67	92.67	Valor máximo 870
11-100	6	145	4.00	96.67	Media 25.1
101-1000	5	150	3.33	100.00	Mediana 0
					Moda 0

Cuadro 6

Distribución de microorganismos encontrados en mascarillas faciales (Producto terminado y acondicionado).

Bacterias/g	F	Fac	%	% ac	Medidas de Resumen
0	84	84	56.00	56.00	Valor mínimo 0
1-10	34	118	22.67	78.67	Valor máximo 3870
11-100	24	142	16.00	94.67	Media 71.7
101-1000	6	148	4.00	98.67	Mediana 0
1001-10000	2	150	1.33	100.00	Moda 0

Distribución de microorganismos encontrados en cremas faciales (Producto terminado a granel).

Bacterias/g	F	Fac	%	% ac	Medidas de Resumen	
0	392	392	85.22	85.22	Valor mínimo Valor máximo Media Mediana Moda	0 10 1.48 0 0
1-10	68	460	14.78	100.00		

Cuadro 8

Distribución de microorganismos encontrados en cremas faciales (Producto terminado y acondicionado).

Bacterias/g	F	Fac	%	% ac	Medidas de Resumen	
0	380	380	82.6	82.6	Valor mínimo Valor máximo Media Mediana Moda	0 76 2.1 0 0
1-10	76	456	16.5	99.1		
11-100	4	460	0.9	100.0		

Distribución de microorganismos encontrados en cremas para el contorno de los ojos (Producto terminado a granel).

Bacterias/g	F	Fac	%	% ac	Medidas de Resumen	
0	214	214	73.79	73.79	Valor mínimo Valor máximo Media Mediana Moda	0 10 2.6 0 0
1-10	76	290	26.21	100.00		

Cuadro 10

Distribución de microorganismos encontrados en cremas para el contorno de los ojos (Producto terminado y acondicionado).

Bacterias/g	F	Fac	%	% ac	Medidas de Resumen	
0	198	198	68.3	68.3	Valor mínimo Valor máximo Media Mediana Moda	0 72 3.7 0 0
1-10	87	285	30.0	98.3		
11-100	5	290	1.7	100.00		

RELACION DE MICROORGANISMOS IDENTIFICADOS Y EL TIPO DE PRODUCTO DONDE SE ENCONTRARON.

	Cosméticos que se aplican cerca de los ojos.	Maquillajes.	Mascarillas faciales.	Cremas faciales.	Cremas para el contorno de los ojos.
<u>Aerobacter arogenes</u>		X	X		
<u>Alcaligenes faecalis</u>		X	X		
<u>Bacillus sp</u>	X			X	X
<u>Corynebacterium sp</u>		X	X		
<u>Enterobacter sp</u>			X		
<u>Escherichia coli</u>		X			
<u>Proteus mirabilis</u>			X		
<u>Proteus morgani</u>		X			
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>			X		
<u>Pseudomonas fluorescens</u>			X		
<u>Serratia marcescens</u>			X		
<u>Staphylococcus albus</u>	X				

Para el análisis de los resultados obtenidos, vamos a comparar los presentados en el capítulo anterior, tanto de producto terminado a granel como de producto terminado y acondicionado y, de esa manera, se podrán observar las diferencias en las correspondientes etapas de fabricación.

Los resultados de los análisis efectuados en los productos cosméticos que se aplican cerca de los ojos se encuentran en los cuadros 1 y 2. En el cuadro 1 se pueden observar los resultados del análisis de 240 muestras correspondientes al producto terminado a granel de las cuales 193 presentan valores de 0 bacterias/g y representan un 80.42% y se tiene el 100% de las muestras con valores menores de 10 bacterias/g.

En el cuadro 2 están los resultados obtenidos del análisis del producto terminado y acondicionado del mismo grupo de cosméticos. De 240 muestras analizadas, 165 presentan valores de 0 bacterias/g y representan un 68.75% del total.

En el intervalo de 1-10 bacterias/g, 72 muestras fueron positivas y equivalen a un 30%. Tenemos 2 muestras en el intervalo de 11-100 bacterias/g y solamente 1 muestra con un valor de 150 bacterias/g en el intervalo de 101-1000 bacterias/g.

Estos resultados son muy satisfactorios si se ve que el producto a granel en el 100% de las muestras presenta cuentas bacterianas inferiores a 10 bacterias/g y en el caso del producto acondicionado el 98.75% de las muestras.

Comparando estos resultados con las normas propuestas por algunos autores como Desperrois y Dony son bastante aceptables, ya que proponen un máximo de 50 bacterias/g en los productos cosméticos que se aplican cerca de los ojos. Wallhäuser y Bourlioux proponen 100 bacterias/g como norma para este tipo de cosméticos. (3, 7, 9, 32)

Entre los microorganismos identificados y más comúnmente encontrados en este tipo de productos se tienen: Staphylococcus aibus y Bacillus sp.

En el cuadro 3 se encuentran los resultados de 335 muestras de maquillajes, efectuados en la etapa de producto terminado a granel. El 99.7% de las muestras se encuentra con valores menores de 10 bacterias/g y sólo una muestra en el intervalo de 1-100 bacterias/g con un valor de 70 bacterias/g.

El análisis de los resultados de las muestras de maquillajes de la fase de producto terminado y acondicionado se encuentran en el cuadro 4. Para estos productos se encontró que el 83.28% del total de las muestras están con valores de hasta 10 bacterias/g, un 98.8% con valores de hasta 100 bacterias/g y sólo 4 muestras en el intervalo de 101-1000 bacterias/g con un valor máximo de 328 bacterias/g.

De acuerdo con el criterio de Desperrois, quien propone para este tipo de cosméticos un máximo de 100 bacterias/g, los resultados obtenidos son bastante aceptables. De acuerdo a los crite-

rios de Wallhäusser; Bourlioux y Dony, quienes proponen un valor máximo de 1000 bacterias/g, los resultados son aún más satisfactorios ya que incluyen al 100% de las muestras analizadas. (3, 7, 9, 32)

Para este tipo de productos, los microorganismos más comúnmente identificados fueron: Aerobacter aerogenes, Alcaligenes faecalis, Corynebacterium sp, Escherichia coli y Proteus morganii.

Los resultados de los análisis que se efectuaron en las muestras del producto terminado a granel de mascarillas faciales, se encuentran en el cuadro 5. De 150 muestras analizadas, el 56% presenta valor de 0 bacterias/g y el 92.67% de la población presenta valores menores de 10 bacterias/g, el 96.67% de muestras en el intervalo de 0-100 bacterias/g y 5 muestras en el intervalo de 101-1000 bacterias/g que representan el 3.33%, con un valor máximo de 870 bacterias/g.

En el cuadro 6 podemos observar la distribución de microorganismos encontrados en el análisis de 150 muestras de producto terminado y acondicionado correspondientes a mascarillas faciales. En este grupo el 56% de las muestras presentan valor de 0 bacterias/g y aunque el 94.67% de las muestras caen en el intervalo de 0-100 bacterias/g, lo cual es muy aceptable para el tipo de cosméticos que se trata, hay que hacer notar que en este grupo tenemos 2 muestras con cuentas bacterianas superiores a 1000 bacterias/g, una de las cuales tiene un valor máximo de 3870 bacterias/g.

Para este tipo de cosméticos Wallhaüsser, Bourlioux y Dony, -- proponen una norma de 1000 bacterias/g como valor máximo admisible; Desperrois es más estricto y propone un valor máximo de 100 bacterias/g. (3, 7, 9, 32)

Aquí cabe hacer mención, que cuando se analizaron algunos lotes de mascarillas faciales a nivel de cubas de fabricación, muchas veces se encontraron contaminaciones muy altas, obligando a tratar con métodos físicos el producto y volverlo a analizar antes de aprobarlo y acondicionarlo, e inclusive en 2 ocasiones se -- encontraron lotes contaminados con Pseudomonas aeruginosa, lo -- que dió lugar a deshechar el producto.

A propósito de los microorganismos de interés particular en la -- materia, tales como: Staphylococcus aureus, Pseudomonas aerugi--nosa y Candida albicans; Wallhaüsser, Desperrois, Bruch y Dony, coinciden en que estos microorganismos deben estar ausentes en -- todo tipo de cosméticos. (5, 7, 9, 32)

Además de Pseudomonas aeruginosa se aislaron otros microorganismos de mascarillas faciales, tales como: Aerobacter aerogenes, -- Alcaligenes faecalis, Corynebacterium sp., Enterobacter sp., Pro--teus mirabilis, Pseudomonas fluorescens y Serratia marcescens.

El cuadro 7 muestra los resultados del análisis de 460 muestras de cremas faciales, en el producto terminado a granel. Se tiene el 85.22% de las muestras con valores de 0 bacterias/g y el

100% con valores menores de 10 bacterias/g.

La distribución de microorganismos encontrados en cremas faciales en la etapa de producto terminado y acondicionado se encuentra en el cuadro 8. Se presenta un valor mínimo de 0 bacterias/g en 380 muestras, este valor representa el 82.6% y un valor máximo de 76 bacterias/g.

El intervalo de 1-10 bacterias/g agrupa 76 muestras que equivalen al 16.5% del total de muestras que, sumado al 82.6% con valor de 0 bacterias/g, nos da un 99.1% de muestras con cuentas bacterianas inferiores a 10 bacterias/g. En el grupo con intervalo de 11-100 bacterias/g, tenemos solamente 4 muestras.

Los valores anteriores están muy de acuerdo a los criterios de Wallhäuser, Bourlioux y Dony quienes proponen como norma para este tipo de cosméticos un valor máximo de 1000 bacterias/g. (3, 9, 32)

El microorganismo más frecuentemente encontrado en cremas faciales fue Bacillus sp.

La distribución de microorganismos encontrados en el análisis del producto a granel de 290 muestras de cremas para el contorno de los ojos, se encuentra en el cuadro 9. Se observa en esta distribución que el 100% de las muestras están con valores inferiores a 10 bacterias/g.

Y por último en el cuadro 10 está la distribución de microorganismos encontrados en el análisis del producto terminado y - - acondicionado de las muestras de cremas para el contorno de los ojos. Se ve que 198 muestras se encuentran con valores de 0 bacterias/g y representan el 68.3% y 87 muestras se encuentran con valores de 10 bacterias/g. Tenemos un 98.3% del total de muestras en el intervalo de 0-10 bacterias/g y solamente el 1.7% - en el intervalo de 11-100 bacterias/g con un valor máximo de 72 bacterias/g.

Las normas propuestas por Desperrois y Dony para este tipo de - productos cosméticos es de 50 bacterias/g como valor máximo - - aceptable. Y Bourlioux y Wallhäisser proponen un valor máximo - de 100 bacterias/g, por lo tanto nuestros resultados son bastante aceptables.

El microorganismo más frecuentemente encontrado en este tipo de cosméticos fue Bacillus sp.

Es importante mencionar los criterios microbiológicos utilizados para evaluar los resultados (3, 5, 7, 32) y que se resumen en el criterio de J. Dony (9), quien propone las siguientes normas:

1.) Investigación de microorganismos mesófilos aerobios.

Norma

Cosméticos utilizados alrededor de los ojos.	50 Bacterias/ml ó /g
Cosméticos utilizados para el cuidado de los niños, especialmente recién nacidos.	
Cosméticos utilizados para los cuidados corporales en medio hospitalario (principalmente lociones y cremas de base acuosa).	10 ² Bacterias/ml ó /g
Cremas para rasurar.	
Productos genito-urinarlos.	
Productos en contacto con las mucosas.	
Productos antisolares.	
Productos que pueden ser inhalados.	
Otros productos.	10 ³ Bacterias/ml ó /g

2.) Investigación de microorganismos de interés particular -
en la materia.

Ausencia de:

En todos los productos cosméticos.

Pseudomonas aeruginosa.

Staphylococcus aureus.

Candida albicans.

En los productos de base acuosa (lociones, cremas, etc.)
susceptibles de ser utilizados para los cuidados corpo--
rales en medio hospitalario y/o recomendados para niños
(especialmente recién nacidos).

Enterobacterias.

Pseudomonas aeruginosa.

Staphylococcus aureus.

Candida albicans.

- 1.- La industria de los cosméticos es de importancia debido al consumo tan grande que tienen sus productos en todos los niveles socioeconómicos.
- 2.- Se presentaron en este trabajo algunas técnicas de control de calidad microbiológico, para la cuenta de bacterias totales y la investigación de microorganismos de interés particular en la materia (microorganismos específicos). Estas técnicas son las utilizadas en la compañía Cosbel, S. A. - de C. V. L'Oreal de París, donde se realizó este trabajo.
- 3.- La calidad microbiológica de los cosméticos es un criterio importante para garantizar la inocuidad y la estabilidad de las preparaciones.
- 4.- En México hasta el momento, no existen normas microbiológicas para estos productos, debido a que no se ha hecho ningún estudio al respecto, desconociéndose las condiciones reales en las que se encuentran, desde el punto de vista de contaminación microbiológica.
- 5.- Para ciertos tipos de preparaciones, es importante adicionar agentes conservadores, destinados a prevenir la multiplicación bacteriana en el almacenamiento del producto y durante su uso.
- 6.- La pureza microbiológica no se obtendrá si no se tiene la estricta observación de una cadena continua de precauciones

que comprenden, desde la inspección de materias primas, la aplicación de buenas técnicas de manufactura respetando las reglas de higiene en el momento de la fabricación, hasta el acondicionamiento del producto, dando así seguridad al consumidor y estabilidad al cosmético.

A) Medios de cultivo.

1) Agar de Baird-Parker

Peptona tripsica de caseina	10 g
Extracto de carne de res	5 g
Extracto de levadura	1 g
Cloruro de litio	5 g
Agar	17 g
Glicocola	12 g
Piruvato de sodio	10 g

Preparación:

Se suspenden 60 g de medio seco en 1 litro de agua destilada.

Se calienta agitando frecuentemente, se hierve durante 1-2 - minutos. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a - 121°C. Se deja enfriar a 45-50°C y después se agregan:

10 ml de una solución estéril de telurito de potasio - al 1%.

50 ml de emulsión estéril de yema de huevo (preparada a -- partir de 15 ml de yema de huevo y 35 ml de solución salina fisiológica.

2) Agar cetrimida

Peptona de gelatina	20 g
Cloruro de magnesio	1.4 g
Sulfato de potasio	10 g
Bromuro de N-cetil-NNN-trimetilamonio	0.5 g

Agar	13.6 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Preparación:

Se suspenden 45.5 g de polvo en 1 litro de agua destilada.

Se deja reposar alrededor de 15 minutos y se agregan 10 ml -- de glicerol bidestilado. Se calienta hasta ebullición agitando frecuentemente. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Se distribuye el medio en cajas Petri estériles.

3) Agar de papa y dextrosa

Papa blanca	200 g
Dextrosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Se suspende la papa pelada y picada en 1000 ml de agua destilada. Se hierve durante 30 minutos y se filtra varias veces.

En esta infusión se disuelven los demás ingredientes. Se agrega agua destilada hasta completar el volumen inicial (1000 ml).

Se calienta a ebullición hasta disolución total del medio. Se distribuye en porciones de 100 ml y se esteriliza en autoclave por 15 minutos a 121°C. Se enfría a 45-48°C y se acidifica a pH 3.5 con solución estéril de ácido tartárico al 10% (aproximadamente 1.4 ml de ácido para 100 ml de medio). Una vez que -

se ha agregado el ácido tartárico no se vuelva a calentar el medio.

4) Agar Eugon al LT-100

Peptona tripsica de caseína	15 g
Peptona papaínica de soya	5 g
Cloruro de sodio	4 g
Sulfito de sodio	0.2 g
Cistina	0.7 g
Glucosa	5.5 g
Agar	15 g
LT-100	100 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Preparación:

Se agregan 100 ml de LT-100 concentrado a 900 ml de gelosa -- reconstituída, a manera de obtener las siguientes concentra-- ciones en el medio nutritivo.

Lecitina	0.1%
Tween 80	0.5%
Triton X 100	0.1%

Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

5) Agar para la investigación de DNasa

Peptona tripsica de caseína y papaínica de soya	20 g
Acido desoxirribonucleico	2 g

Cloruro de sodio	5 g
Agar	15 g

Preparación:

Se suspenden 42 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Se mezcla perfectamente y se calienta lentamente. Después se pone a ebullición justo a completar su disolución. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C y se distribuye en cajas Petri.

6) Caldo cerebro corazón

Infusión de cerebro de ternera	200 g
Infusión de corazón de res	250 g
Proteosa-peptona	10 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato disódico	2.5 g
Glucosa	2 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Se disuelven 37 g del medio deshidratado en 1 litro de agua destilada. Se hierve. Se distribuye en tubos de 12 X 75 mm, en volúmenes de 0.5 ml. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

7) Caldo Bugon al LT-100

Peptona tripsica de caseína	15 g
Peptona papaínica de soya	5 g

Cloruro de sodio	4 g
Cistina	0.7 g
Sulfito de sodio	0.2 g
Glucosa	5.5 g
LT-100	100 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Preparación:

Se agregan 100 ml de LT-100 concentrado a 900 ml de caldo, se mezclan a manera de obtener las concentraciones siguientes - del medio nutritivo.

Lecitina	0.1%
Tween 80	0.5%
Triton X 100	0.1%

8) LT-100

Lecitina	10 g
Tween 80	50 g
Triton X 100	10 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

Preparación:

Se incorporan los ingredientes al agua destilada y se calientan ligeramente hasta lograr la mezcla total.

9) Medio de arroz

Harina de arroz	10 g
Tween 80	10 ml

Agar	10 g
H ₂ O destilada c.b.p.	1000 ml

Preparación:

Se agrega la harina de arroz al agua en ebullición y se hierve durante 30 segundos. Se filtra sobre algodón y se agregan el tween 80 y el agar. Se reparte en tubos y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Cuando se usa, se funde el medio en baño maría y se vierte sobre portaobjetos - previamente esterilizados.

10) Medio de papa, zanahoria y bilis de buey.

Zanahorias peladas y ralladas	20 g
Papas peladas y ralladas	20 g
Agua destilada	100 ml

Preparación:

Se maceran en frío durante 1 hora las papas y las zanahorias, se ponen a ebullición durante 5 minutos. Se filtra sobre gasa y una vez que el líquido está frío se completa a 1 litro con agua destilada.

Líquido filtrado	1000 ml
Bilis fresca de buey	150 ml
Agar	25 g

Se calienta el líquido filtrado con el agar hasta fundirlo, se filtra sobre algodón y se agrega la bilis. Se reparte en - -

tubos y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a - -
121°C.

Reactivos para evidenciar pruebas bioquímicas.

1) Reactivo 1 para investigación de fosfatasa.

Fenilfosfato disódico y 4-amino antipirina.

Este reactivo se presenta liofilizado. Una vez reconstituido con 3 ml de agua destilada, se puede conservar en refrigeración a 4°C durante 1 mes. Este reactivo es fotosensible, -- por lo que se debe conservar en frasco de vidrio ámbar y en lugar oscuro.

2) Reactivo 2 para investigación de fosfatasa.

Solución amortiguada de ferricianuro de potasio.

Este reactivo se debe conservar en refrigeración a 4°C.

3) Reactivo IND (Reactivo de Kovacs)

Alcohol isoamílico puro	150 ml
Paradimetilaminobenzaldehido	10 g
Acido clorhídrico concentrado	50 ml

4) Reactivo NIT 1

Acido sulfanílico	0.8 g
Acido acético 5 N	100 ml

5) Reactivo NIT 2

1 Naftilamina	0.6 g
Acido acético 5 N	100 ml

6) Reactivo QX

Oxalato de tetrametil-p-fenilendiamina	1 g
Alcohol isoamílico	100 ml

7) Reactivo TDA

Cloruro férrico	10 g
Agua destilada	100 ml

8) Reactivo VP 1

Hidróxido de potasio	40 g
Agua destilada	100 ml

9) Reactivo VP 2

Alfanaftol	6 g
Alcohol etílico	100 ml

Este reactivo se debe conservar en refrigeración a 4°C y en --
frasco de vidrio ámbar, al resguardo de la luz.

- 1.- Balsam, M.S. and E. Sagarin
COSMETICS SCIENCE AND TECHNOLOGY
John Wiley and Sons, Inc. Chap. 35: 37-161 (1974)
- 2.- Bartoli, M., J. Chouteau; D. Bonnet and G. Payen.
Utilisation en pratique journaliere d'une nouvelle gale-
rie d'identification des Enterobactéries. A propos de -
671 souches.
Lyon Pharm., 23: 269-275 (1972)
- 3.- Bourlioux, P.
Some aspects of microbiological standards in cosmetic --
products.
Labo-Pharma, Probl. and Techn., 240: 115 (1975)
- 4.- Bruch, C. W.
Eye products: handle with care.
FDA Consum., 6: 5-7 (1972)
- 5.- Bruch, C. W.
Microbiological contamination of cosmetics.
Drug. Cosmet. Ind., 109: 26 (1971)
- 6.- Davis, B. D., R. Dulbecco; H. N. Eisen; H. S. Ginsberg y -
W. B. Wood.
TRATADO DE MICROBIOLOGIA
Salvat editores 1a. Ed. 1976
- 7.- Desperrois, M. A. S.
Les normes microbiologiques dans les cosmetiques.
Labo-Pharma, Probl. and Techn., 218: 59 (1973)
- 8.- Dirkens, O.
Datos referentes a la historia de la perfumería y cosmética.
Drug. Rep., 8: 159-166 (1968)
- 9.- Dony, J.
Problemas microbiologiques poses par les cosmetiques.
J. Pharm. Belg., 30: 223-228 (1975)
- 10.- Fontana, M.
Controlo biologico de cosmetiques.
Parf. Cosm. Sav. France., 2: 259-266 (1972)
- 11.- Gardner, J. M., B. A. Snyder and D. Gröschel.
Experiences with the analytab system for the identification
of Enterobacteriaceae.
Pathol. Microbiol., 38: 103-106 (1972)

- 12.- Gribou, H.
History of perfumes
Am. Perf. Cosm., 2: 35-37 (1962)
- 13.- Hart, A. and M. B. Rtans:
Isolation and enumeration of Pseudomonas aeruginosa -
from oily cream.
J. Pharm. Pharmacol., 27: 142-144 (1975)
- 14.- Holmes, B.; W. R. Willcox and S. P. Lapage
Identification of Enterobacteriaceae by the API 20-E -
system.
J. Clin. Pathol., 31: 22-30 (1978)
- 15.- Matsen, J. M. and J. C. Sherris
Comparative study of the efficiency of seven paper - -
reagent strips and conventional biochemical tests in -
identifying Gram-negative organisms.
Appl. Microbiol., 18: 452-457 (1968)
- 16.- Morse, L. J.
Septicemia due to Klebsiella pneumoniae originating -
from a hand cream dispenser.
New Eng. Jour. Med., 277: 472 (1967)
- 17.- Morse, L. J. and L. F. Schornbeck
Hand lotions - A potential nosocomial hazard.
New. Eng. Jour. Med., 278: 376 (1968)
- 18.- Noble, W. C. and J. A. Savin
Steroid cream contaminated with Pseudomonas aeruginosa.
Lancet, 1: 347-349 (1966)
- 19.- Nord, C. E.; A. A. Lindberg and Dahlback
Evaluation of five test kits - API, Autotab, Enterotube,
Pathotec and R/B - for identification of Enterobacteria-
ceae.
- 20.- Parker, M. S.
Microbial control of drugs and cosmetics.
Soap, Perfum. Cosmet. 44: 806-812 (1971)
- 21.- Parker, M. S. and M. Barnes
Microbiological quality control of cosmetics and - - -
pharmaceutical preparations.
Soap, Perfum. Cosmet., 40: 875 (1967)
- 22.- Robertson, E. A. and J. D. Mac Lowry
Mathematical analysis of the API Enteric-20 profile regis-
trer using a computer diagnostic model.
Appl. Microbiol., 28: 691-695 (1974)

- 23.- Robertson, E. A.; G. C. Macks and J. D. Mac Lowry
Analysis of cost and accuracy of alternative strategies
for Enterobacteriaceae identification.
J. Clin. Microbiol., 3: 421-424 (1976)
- 24.- Sakazaky, R.
Evaluation of rapid multiple-test systems for identifica-
tion of Enterobacteriaceae - API, Minitak, R/B, Enterotu-
be and Pathotec.
Media Circle, 20: 227-235 (1975)
- 25.- Sand, F.
Les facteurs de stabilité biologique des produits cosme-
tiques leur importance et leur controle (Premiere - - -
Partie).
Parf. Cosm. Sav. France, 11: 309-317 (1968)
- 26.- Sand, F.
Les facteurs de stabilité biologique des produits cosmati-
ques leur importance et leur controle (Deuxieme Partie).
Parf. Cosm. Sav. France, 11: 336-344 (1968)
- 27.- Scott, H. Mc G.
Methods for counting and testing for microorganism in raw -
materials, topical and oral products.
J. Soc. Cosm. Chem., 24: 65-78 (1973)
- 28.- Smith, P. B.; K. M. Tomfohrde; D. L. Rhoden and A. Balows.
API System: a multitube micromethod for identification of
Enterobacteriaceae.
Appl. Microbiol., 24: 449-452 (1972)
- 29.- Tenenbaum, S.
Pseudomonads in cosmetics.
J. Soc. Cosm. Chem., 18: 797 (1967)
- 30.- Wagenführ, H.
Jardines de la India.
Drag. Rep., 2: 45-50 (1972)
- 31.- Wagenführ, H.
La cultura del perfume en la China antigua.
Drag. Rep., 5: 99-106 (1974)
- 32.- Wallhauisser, K. H.
Microbiological standards of non-sterile pharmaceuticals -
and cosmetics.
Parfüm. Kosmetik, 53: 305 (1972)
- 33.- Willis, G. and I. J. Cook
Enterobacteriaceae identification: a comparative study of
API, Encise and conventional methods.
The Medical Thechnologist., 5: 4-9 (1975)

- 34.- Yablonski, J. I. and C. L. Goldnan
Microbiology of shampoos.
Cosmet. Perfun., 90: 45-52 (1975)