

90. CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS NO OBLIGATORIAMENTE ESTÉRILES

En este capítulo se especifican los ensayos necesarios para estimar el número de microorganismos viables presentes, determinar ausencia de gérmenes revivificables y de ciertas especies microbianas en cualquier tipo de materia prima o producto farmacéutico no obligatoriamente estéril.

Los ensayos han sido diseñados principalmente para determinar si una sustancia o preparación cumple con límites de aceptabilidad establecidos (ver *Tabla 1*).

Los métodos no son aplicables a productos que contienen microorganismos viables como ingredientes activos.

Pueden utilizarse procedimientos microbiológicos alternativos, incluyendo los métodos automatizados, siempre que haya sido demostrada su equivalencia con el método farmacopeico.

PROCEDIMIENTOS GENERALES

Realizar la determinación bajo condiciones diseñadas para evitar la contaminación microbiana externa del producto a examinar. Las medidas para evitar la contaminación no deben afectar a ningún microorganismo que pudiera estar presente en la muestra. Si el producto en ensayo posee actividad antimicrobiana, ésta debe eliminarse o neutralizarse, siempre y cuando sea posible.

Preparación de las cepas de prueba

Descripción

Se deberá constatar el número de repique declarado en el certificado o rótulo del proveedor a los fines de emplear cultivos con no más de cinco repiques desde su extracción del cultivo original. Los microorganismos a emplear son los que figuran en la *Tabla 2*.

Un repique se define como la transferencia de microorganismos desde un cultivo establecido a un medio nuevo. Todas las transferencias deben ser contabilizadas. Se considera una sola transferencia a los procesos que pueden incluir congelar, descongelar y hacer desarrollar los microorganismos en un medio nuevo.

Preparación del inóculo

Se pueden utilizar:

- Suspensiones estandarizadas de cepas de prueba adquiridas comercialmente.
- Preparar las suspensiones partiendo de colonias desarrolladas en medios nutritivos sólidos.
- Los microorganismos del cultivo madre

pueden desarrollarse en un medio líquido apropiado y las células recolectarse por centrifugación, lavarse y resuspenderse en *Solución fisiológica* (SR) estéril hasta llegar al número de esporas o microorganismos requerido.

Realizar los pasajes según se indica en la *Tabla 2*.

Los cultivos bacterianos y de *C. albicans* desarrollados en agar sólido, se pueden recolectar empleando *Solución fisiológica* (SR) estéril. Realizar las diluciones en *Solución fisiológica* (SR) hasta obtener una concentración de inóculo adecuada para el ensayo. Utilizar las suspensiones dentro de las 2 horas de preparación a temperatura ambiente, o dentro de las 24 horas si se almacenan a una temperatura entre 2 °C y 8 °C.

Para recolectar el cultivo de *A. brasiliensis*, emplear *Solución fisiológica* (SR) estéril que contenga 0,05 % de Polisorbato 80. Proceder a realizar las diluciones en *Solución fisiológica* (SR) hasta obtener una concentración de inóculo adecuada para el ensayo.

Para obtener una suspensión de esporas de *B. subtilis* proceder según se indica en *Preparación del microorganismo de ensayo* en *Condiciones generales de ensayo* en 770. *Valoración microbiológica de antibióticos*.

Las suspensiones estables de esporas pueden mantenerse a una temperatura entre 2 °C y 8 °C durante un período validado.

Se debe verificar el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL) mediante la realización de cultivos en placa.

Medios de cultivo

Preparación de medios

Los medios de cultivo se preparan de acuerdo a lo indicado en *Medios de cultivo* y *Reactivos para Ensayos Microbiológicos* en *Reactivos y Soluciones*. También se pueden emplear fórmulas deshidratadas equivalentes disponibles comercialmente.

Al preparar el medio de cultivo, se deben disolver los sólidos solubles en agua, empleando calor si fuera necesario, hasta disolución completa. Determinar el pH a 25 °C ± 2 °C y, de ser necesario, ajustar el mismo con soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, según corresponda.

Si en una fórmula se indica agar, se debe emplear uno con un contenido de humedad menor o igual a 15 %.

Salvo que se indique otro procedimiento,

114 todos los medios de cultivo deben ser
115 esterilizados, según indicaciones del
116 fabricante, en autoclave en ciclos validados.

117 **Promoción de crecimiento de los** 118 **medios de cultivo**

119 Se debe analizar cada envase de medio de
120 cultivo de manera de verificar la aptitud de
121 éste para su uso. Si el medio se prepara a
122 partir de los ingredientes, analizar todos los
123 lotes elaborados. Si se trata de medios
124 adquiridos comercialmente, se requiere
125 asegurar la calidad de los mismos. Se deberá
126 establecer una frecuencia de control periódico
127 de las propiedades del medio.

128 Inocular una porción de medio de cultivo
129 apropiado con no más de 100 ufc de cada uno
130 de los microorganismos indicados en la *Tabla*
131 *2* e incubar.

132 Para medios sólidos, el crecimiento
133 obtenido con los microorganismos de prueba
134 no debe diferir en un factor mayor de 2
135 respecto del obtenido con un envase
136 previamente aprobado.

137 Los medios de cultivo líquidos son
138 adecuados si se produce un crecimiento
139 claramente visible del microorganismo,
140 comparable al obtenido con una partida de
141 medio analizada y aprobada previamente.

142 Para medios líquidos y sólidos, los
143 microorganismos de prueba, las condiciones
144 y tiempos de incubación corresponden a las
145 detalladas en la *Tabla 2*.

146 Para medios sólidos diferenciales, el
147 método descrito anteriormente puede
148 reemplazarse por el método ecométrico o por
149 el método *Miles Misra*. Las colonias
150 desarrolladas deben exhibir las características
151 típicas del microorganismo.

152 **Ensayo para propiedades inhibitorias** 153 **de medios líquidos o sólidos**

154 Inocular el medio en ensayo con no
155 menos de 100 ufc del microorganismo
156 correspondiente. Incubar según las
157 condiciones descritas en la *Tabla 2*: no debe
158 observarse crecimiento o se debe evidenciar
159 una disminución significativa de éste.

160 **Ensayo para propiedades indicadoras** 161 **de medios selectivos**

162 Inocular cada placa con no más de 100
163 ufc del microorganismo correspondiente.
164 Incubar según las condiciones descritas en la
165 *Tabla 2*. Las colonias deben ser comparables
166 en apariencia y reacciones indicadoras a las
167 obtenidas con un envase previamente
168 aprobado.

169 **Preparación de la muestra**

170 A menos que se indique de otro modo en
171 la monografía correspondiente, emplear una
172 cantidad de muestra no menor a 10 g o 10 mL

173 del producto en ensayo. Para productos cuyo
174 número total de unidades del lote es menor a
175 200, el tamaño de la muestra puede reducirse
176 a dos unidades o a una unidad, si el tamaño es
177 menor a 100. Para líquidos o sólidos en
178 forma de aerosol, muestrear al menos diez
179 envases. Para parches transdérmicos,
180 muestrear al menos diez parches.

181 Preparar la muestra en ensayo mediante
182 un tratamiento que se ajuste a sus
183 características físicas y que no altere el
184 número ni el tipo de microorganismos
185 originalmente presentes, a fin de obtener una
186 solución o suspensión apropiada.

187 *Productos solubles en agua - Disolver o*
188 *diluir el producto en ensayo (por lo general se*
189 *prepara una dilución 1 en 10) en Solución*
190 *reguladora de Cloruro de Sodio-Peptona de*
191 *pH 7,0; en Solución reguladora de Fosfato de*
192 *pH 7,2 (ver *Medios de cultivo y reactivos**
193 *para ensayos microbiológicos en *Reactivos y**
194 *Soluciones) o en Caldo Digerido de Caseína y*
195 *Soja. Si fuera necesario, ajustar el pH entre*
196 *6,0 y 8,0. En caso de preparar diluciones*
197 *adicionales se utiliza el mismo diluyente.*

198 *Productos no grasos insolubles en agua -*
199 *Suspender el producto en ensayo (por lo*
200 *general se prepara una dilución 1 en 10) en*
201 *Solución reguladora de Cloruro de Sodio-*
202 *Peptona de pH 7,0; en Solución reguladora de*
203 *Fosfato de pH 7,2 (ver *Medios de cultivo y**
204 *reactivos para ensayos microbiológicos en*
205 *Reactivos y Soluciones) o en Caldo Digerido*
206 *de Caseína y Soja. Se puede agregar un*
207 *agente tensioactivo, tal como Polisorbato 80*
208 *en una concentración de 1 g por litro, para*
209 *favorecer la suspensión de sustancias poco*
210 *humectables. Si fuera necesario, ajustar el*
211 *pH entre 6,0 y 8,0. En caso de preparar*
212 *diluciones adicionales se utiliza el mismo*
213 *diluyente.*

214 *Productos Grasos - Disolver el producto*
215 *en ensayo en miristato de isopropilo*
216 *esterilizado por filtración o mezclarlo con la*
217 *cantidad mínima necesaria de Polisorbato 80*
218 *estéril u otro reactivo tensioactivo estéril. Si*
219 *fuera necesario, calentar hasta no más de*
220 *40 °C o, en casos excepcionales, a no más de*
221 *44 °C. Mezclar cuidadosamente y, si fuera*
222 *necesario, mantener termostatzado. Agregar*
223 *una cantidad suficiente del diluyente*
224 *seleccionado precalentado para obtener una*
225 *dilución 1 en 10 del producto original.*
226 *Mezclar cuidadosamente, manteniendo la*
227 *temperatura durante el menor tiempo*
228 *necesario para la formación de la emulsión.*
229 *Se puede preparar una serie de diluciones*
230 *decimales adicionales empleando el diluyente*
231 *seleccionado que contenga una concentración*
232 *adecuada de Polisorbato 80 estéril u otro*

233 reactivo tensioactivo estéril.
 234 *Aerosoles* - Extraer la muestra
 235 asépticamente por congelamiento del envase
 236 o por uso de válvula continua, según sea
 237 adecuado. Transferir asépticamente el
 238 producto a un dispositivo de filtración o a un
 239 envase estéril.

240 *Parches transdérmicos* - Quitar las hojas
 241 de la cubierta protectora de los parches y
 242 colocar el lado adhesivo hacia arriba sobre
 243 una placa estéril. Cubrir la superficie
 244 adhesiva con un material poroso estéril (por
 245 ejemplo gasa estéril) para evitar que los
 246 parches se adhieran. Transferir los parches a
 247 un volumen adecuado del diluyente elegido
 248 que contenga neutralizantes tales como
 249 Polisorbato y/o lecitina. Agitar
 250 vigorosamente la preparación por no menos
 251 de 30 minutos. Para el análisis proceder
 252 según el método de filtración por membrana.

253 ENSAYO DE APTITUD

254 La validez de los resultados de los
 255 ensayos incluidos en este capítulo depende de
 256 que se demuestre apropiadamente que las
 257 muestras sometidas a las condiciones del
 258 ensayo no inhiben la multiplicación de los
 259 microorganismos que pudieran estar
 260 presentes.

261 La efectividad de los medios de cultivo
 262 utilizados debe haber sido verificada
 263 previamente.

264 Preparación de la muestra

265 Diluir la muestra en un diluyente
 266 apropiado, según lo descrito en *Preparación*
 267 *de la muestra* en *Procedimientos Generales*.
 268 Si ninguno de los procedimientos allí
 269 descritos resultara satisfactorio, se deberá
 270 desarrollar un procedimiento alternativo
 271 adecuado (ver *Neutralización. Eliminación de*
 272 *la actividad antimicrobiana*).

273 Inoculación y dilución

274 Siguiendo el método de estudio, realizar
 275 la aptitud en presencia y ausencia de la
 276 muestra en ensayo. Incluir control de
 277 inóculo, controles negativos de medios y
 278 diluyentes. Emplear los medios de cultivo
 279 indicados en la *Tabla 2*.

280 Adicionar a la dilución inicial del
 281 producto, y a un control sin muestra, un
 282 volumen suficiente de suspensión microbiana
 283 para obtener un inóculo final de no más de
 284 100 ufc por placa o caldo de enriquecimiento,
 285 según corresponda. El volumen de la
 286 suspensión del inóculo no debe exceder el
 287 1 % del volumen de la muestra diluida.

288 Es recomendable incluir en este ensayo al
 289 menos una cepa aislada y caracterizada del
 290 ambiente de fabricación, así como otros
 291 indicadores de calidad y microorganismos

292 relevantes en función de la vía de
 293 administración, la naturaleza del producto y
 294 los pacientes a los cuales está destinado.

295 En caso de no cumplir el criterio de
 296 aceptación los microorganismos podrán
 297 inocularse luego de neutralizar, diluir o
 298 filtrar. Para demostrar la aptitud del método
 299 por filtración puede agregarse la suspensión
 300 con los microorganismos en el último lavado
 301 para evaluar la ausencia de sustancias
 302 inhibitorias en la membrana que puedan
 303 afectar su crecimiento.

304 Neutralización. Eliminación de la 305 Actividad Antimicrobiana

306 Comparar el número de microorganismos
 307 recuperados a partir de la muestra preparada,
 308 según se indica en *Inoculación y dilución* e
 309 incubada siguiendo el procedimiento descrito
 310 en *Recuperación de microorganismos en*
 311 *presencia del producto* con el número de
 312 microorganismos recuperados a partir de la
 313 preparación del control positivo.

314 Si se inhibe el crecimiento, modificar el
 315 procedimiento con el objeto de garantizar la
 316 validez de los resultados. Dicha
 317 modificación puede incluir, por ejemplo:

318 - aumento del factor de dilución, siempre que
 319 la especificación del producto o materia
 320 prima lo permita;

321 - incorporación de agentes neutralizantes (ver
 322 *Tabla 4*);

323 - utilizar el método de *Filtración* descrito en
 324 *Métodos de ensayo*;

325 - otra modificación apropiada del método,
 326 diluyente o medio de cultivo;

327 - una combinación de todas las medidas
 328 anteriores.

329 Si hubiera un neutralizante específico del
 330 agente antimicrobiano, puede agregarse una
 331 cantidad apropiada al diluyente y/o al medio
 332 de cultivo preferentemente antes de la
 333 esterilización.

334 En caso de agregar un agente
 335 neutralizante, o si se cambia la composición
 336 del diluyente o medio de cultivo, demostrar
 337 que dicha modificación no tiene efecto tóxico
 338 que afecte el desarrollo de los
 339 microorganismos de prueba.

340 Si no se encuentra un método de
 341 neutralización adecuado, puede suponerse
 342 que la imposibilidad de aislar el
 343 microorganismo inoculado es atribuible a la
 344 actividad microbiana del producto. Esta
 345 información permite deducir que no es
 346 probable que el producto se contamine con
 347 esa determinada especie de microorganismo.

348 Es posible que el producto inhiba
 349 solamente algunos de los microorganismos
 350 especificados en la *Tabla 2* pero que no
 351 inhiba otros que no estén incluidos en la

352 mencionada tabla. En consecuencia, realizar
353 la prueba con el factor de dilución más alto
354 compatible con el crecimiento microbiano
355 considerando la especificación según la vía
356 de administración.

357 Si después de haber realizado todas las
358 modificaciones en las condiciones de ensayo
359 no se logró obtener un desarrollo comparable
360 con el control positivo, efectuar el ensayo
361 empleando las condiciones más favorables al
362 desarrollo microbiano.

363 **Recuperación de microorganismos en** 364 **presencia del producto**

365 **Método de recuento**

366 Realizar el ensayo según se indica en
367 *Métodos de recuento* en *Métodos de ensayo*.

368 Realizar pruebas individuales para cada
369 uno de los microorganismos de la *Tabla 2*.

370 El recuento de los microorganismos
371 ensayados con la muestra no debe diferir en
372 un factor mayor de 2 respecto del hallado en
373 ausencia de la muestra (control positivo).

374 **Método de Investigación**

375 Realizar el ensayo según se indica en
376 *Métodos de investigación* en *Métodos de*
377 *ensayo*.

378 Realizar pruebas individuales para cada
379 uno de los microorganismos e incubar en las
380 condiciones especificadas en la *Tabla 2*.

381 Se deben detectar los microorganismos
382 específicos según se describe en *Métodos de*
383 *investigación* en *Métodos de ensayo*, en
384 presencia y en ausencia de la muestra.

385 **MÉTODOS DE ENSAYO**

386 **Métodos de recuento**

387 En esta sección se especifican los ensayos
388 necesarios para estimar el número de
389 microorganismos aerobios viables.

390 Cuando sea posible su aplicación, el
391 método de elección es el de recuento en
392 placa. En caso contrario se podrán utilizar
393 los métodos por filtración o en tubos
394 múltiples (número más probable - NMP).

395 El Método del Número Más Probable
396 (NMP) es el método de recuento microbiano
397 menos exacto; sin embargo, para algunos
398 grupos de productos con biocarga muy baja,
399 puede resultar el método más apropiado.

400 El método debe permitir el análisis de un
401 tamaño de muestra suficiente para evaluar el
402 cumplimiento de los límites de aceptabilidad.
403 Se debe demostrar la aptitud del método
404 seleccionado.

405 En todos los casos, proceder según la
406 metodología determinada para el producto en
407 el *Ensayo de aptitud*.

408 *Recuento de microorganismos* 409 *aerobios totales*

410 *Siembra en profundidad* - Transferir a
411 una placa de Petri estéril un volumen de la
412 dilución final que sea representativo de la
413 muestra (por ejemplo 1 mL) y no altere la
414 concentración de nutrientes del medio. Si el
415 volumen a sembrar excede la capacidad de la
416 placa se podrá aumentar el número de éstas o
417 emplear alguna de mayor tamaño. Realizar el
418 procedimiento por duplicado. Agregar
419 inmediatamente a cada placa entre 15 y 20
420 mL (para placas de 90 mm) del Agar
421 Digerido de Caseína-Soja previamente
422 fundido y enfriado a 45 °C. Tapar las placas
423 de Petri, homogeneizar la muestra con el agar
424 por rotación de las placas y dejar solidificar a
425 temperatura ambiente. Invertir las placas de
426 Petri e incubar entre 30 °C y 35 °C durante al
427 menos 3 días. Luego de la incubación,
428 examinar las placas para observar si hubo
429 desarrollo.

430 *Siembra en superficie* - Sembrar en
431 superficie no menos de 0,1 mL de la dilución
432 final de la muestra sobre al menos dos placas
433 con *Agar Digerido de Caseína-Soja*
434 previamente secadas. Esparcir la muestra con
435 ayuda de una espátula de Drigalski. Invertir
436 las placas de Petri e incubar entre 30 °C y
437 35 °C durante al menos 3 días. Luego de la
438 incubación, examinar las placas para observar
439 si hubo desarrollo.

440 *Filtración* - Usar filtros de membrana
441 con tamaño nominal de poro no mayor de
442 0,45 µm. Elegir el material de la membrana
443 tal que la eficiencia de la retención
444 microbiana no sea afectada por los
445 componentes de la muestra. Transferir la
446 cantidad apropiada de la dilución de la
447 muestra a la membrana y filtrar
448 inmediatamente. Lavar el filtro según lo
449 determinado previamente en el *Ensayo de*
450 *aptitud*. Transferir la membrana a la
451 superficie de una placa conteniendo Agar
452 Digerido de Caseína-Soja. Invertir las placas
453 de Petri e incubar entre 30 °C y 35 °C durante
454 al menos 3 días. En el caso de parches
455 transdérmicos filtrar una cantidad tal que el
456 volumen filtrado se corresponda al menos a
457 una unidad.

458 *Tubos múltiples (número más probable –*
459 *NMP)* - Preparar tres diluciones decimales en
460 serie del producto (1/10; 1/100; 1/1000)
461 según el tratamiento correspondiente
462 indicado en *Preparación de la Muestra* en
463 *Procedimientos generales*. A partir de cada
464 nivel de dilución tomar 1 mL y sembrar en un
465 tubo conteniendo 9 mL de Caldo Digerido de
466 Caseína-Soja. Realizar este procedimiento
467 por triplicado para cada nivel de dilución. Si

468 fuera necesario, se puede agregar al medio un
469 agente tensioactivo, tal como Polisorbato 80
470 u otro neutralizante. Incubar todos los tubos
471 entre 30 °C y 35 °C no más de 3 días. Luego
472 del período de incubación, examinar los tubos
473 para detectar turbidez. Los tubos deben
474 compararse con la *Tabla 3* para determinar el
475 NMP/g o mL de producto. En caso que la
476 turbidez de la muestra enmascare el
477 desarrollo microbiano, subcultivar en el
478 mismo caldo o en Agar Digerido de Caseína-
479 Soja entre 30 °C y 35 °C durante 24 a 48
480 horas y emplear estos resultados.

481 *Recuento combinado de hongos filamentosos* 482 *y levaduras*

483 *Siembra en profundidad* - Proceder según
484 se indica en *Siembra en profundidad* en
485 *Recuento de microorganismos aerobios*
486 *totales* empleando Agar Sabouraud Dextrosa
487 o Agar Papa Dextrosa. Incubar las placas sin
488 invertir entre 20 °C y 25 °C durante al menos
489 5 días. Luego de la incubación, examinar las
490 placas para observar si hubo desarrollo.

491 *Siembra en superficie* - Proceder según
492 se indica en *Siembra en superficie* en
493 *Recuento de microorganismos aerobios*
494 *totales*. Preparar al menos dos placas
495 empleando Agar Sabouraud Dextrosa o Agar
496 Papa Dextrosa, previamente secadas.
497 Sembrar en superficie no menos de 0,1 mL
498 sobre cada placa. Esparcir la muestra con
499 ayuda de una espátula de Drigalski. Incubar
500 sin invertir entre 20 °C y 25 °C durante al
501 menos 5 días. Luego de la incubación,
502 examinar las placas para observar si hubo
503 desarrollo.

504 *Filtración* - Proceder según se indica en
505 *Filtración* en *Recuento de microorganismos*
506 *aerobios totales*. Transferir la membrana a la
507 superficie de una placa conteniendo Agar
508 Sabouraud Dextrosa o Agar Papa Dextrosa.
509 Incubar entre 20 °C y 25 °C durante al menos
510 5 días. En el caso de parches transdérmicos
511 filtrar una cantidad tal que el volumen
512 filtrado se corresponda al menos a una
513 unidad.

514 **Resultados e interpretación**

515 Contar el número de colonias y expresar
516 el promedio de los duplicados de las placas
517 como el número de unidades formadoras de
518 colonias por g (ufc/g) o por mL de muestra
519 (ufc/mL). Si no se detectan colonias en las
520 placas, expresar los resultados como menor a
521 la inversa del valor de la dilución utilizada
522 teniendo en cuenta el volumen sembrado.

523 El recuento de microorganismos aerobios
524 totales (RMAT) se informará como la
525 sumatoria de todas las colonias desarrolladas
526 en las placas de Agar Digerido de Caseína-

527 Soja incluidos hongos filamentosos y
528 levaduras.

529 En el caso de parches transdérmicos,
530 expresar el recuento como ufc/parche.

531 El recuento total combinado de hongos
532 filamentosos y levaduras (RTCHL) se
533 considera equivalente al número de ufc
534 encontrado empleando Agar Sabouraud
535 Dextrosa o Agar Papa Dextrosa. Si se
536 detectan colonias de bacterias en este medio,
537 contarlas como parte del RTCHL. Cuando el
538 RTCHL exceda el criterio de aceptación
539 debido al crecimiento bacteriano, se puede
540 usar Agar Sabouraud Dextrosa o Agar Papa
541 Dextrosa que contengan antibióticos. Si se
542 realiza el recuento mediante el método del
543 NMP, el valor calculado es RMAT.

544 **MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN**

545 **Ensayo para Bacterias Gram negativas** 546 **tolerantes a la bilis**

547 Disolver o suspender 10 g o 10 mL de
548 muestra en Caldo Digerido de Caseína-Soja
549 para obtener 100 mL o el volumen
550 establecido en *Método de investigación* en
551 *Ensayo de aptitud*. Incubar entre 20 °C y
552 25 °C durante 2 a 5 horas. Homogeneizar y
553 transferir 10 mL de la dilución o el
554 equivalente a 1 g o mL de producto a 90 mL
555 o el volumen establecido en *Ensayo de*
556 *aptitud* para Caldo Mossel para
557 enriquecimiento de enterobacterias. Incubar
558 entre 30 °C y 35 °C durante 24 a 48 horas.
559 Subcultivar sobre Agar Cristal Violeta - Rojo
560 Neutro - Bilis - Glucosa e incubar entre 30 °C
561 y 35 °C durante 18 a 24 horas: la muestra
562 cumple con el ensayo para bacterias Gram
563 negativas tolerantes a la bilis por gramo o
564 mililitro si no se observa desarrollo de
565 colonias.

566 *Ensayo para Staphylococcus aureus,*
567 *Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli y*
568 *Salmonella spp.*

569 Agregar un volumen de la dilución
570 obtenida según *Preparación de la muestra*,
571 equivalente a 1 g o 1 mL de producto (o la
572 cantidad indicada en la monografía
573 correspondiente), al Caldo Digerido de
574 Caseína-Soja para obtener 100 mL o el
575 volumen establecido en *Método de*
576 *Investigación* en *Ensayo de Aptitud*. Mezclar
577 e incubar entre 30 °C y 35 °C durante 18 a
578 24 horas.

579 **Ensayo para Staphylococcus aureus**

580 Subcultivar sobre una placa con Agar
581 Manitol-Salado. Incubar entre 30 °C y 35 °C
582 durante 18 a 72 horas. Si hay desarrollo de
583 colonias típicas amarillas o blancas rodeadas

584 de una zona amarilla, identificarlas para
585 descartar la presencia de *Staphylococcus*
586 *aureus*: la muestra cumple con el ensayo para
587 *Staphylococcus aureus* si no se observa el
588 desarrollo de colonias con las características
589 descriptas o si la identificación es negativa.

590 Ensayo para *Pseudomonas aeruginosa*

591 Subcultivar sobre una placa con Agar
592 Cetrimida. Incubar entre 30 °C y 35 °C
593 durante 18 a 72 horas. Si hay desarrollo de
594 colonias generalmente verdosas identificarlas
595 para descartar la presencia de *Pseudomonas*
596 *aeruginosa*: la muestra cumple con el ensayo
597 si no se observa el desarrollo de colonias con
598 las características descriptas o si la
599 identificación es negativa.

600 Ensayo para *Escherichia coli*

601 Subcultivar sobre una placa con Agar
602 MacConkey. Incubar entre 30 °C y 35 °C
603 durante 18 a 72 horas. Si hay desarrollo de
604 colonias rojas con halo turbio, identificarlas
605 para descartar la presencia de *Escherichia*
606 *coli*: la muestra cumple con el ensayo si no se
607 observa el desarrollo de colonias con las
608 características descriptas o si la identificación
609 es negativa.

610 Ensayo para *Salmonella spp*

611 Transferir 0,1 mL de Caldo Digerido de
612 Caseína-Soja a 10 mL de Caldo Rappaport -
613 Vassiliadis para enriquecimiento de
614 *Salmonella* e incubar entre 30 °C y 35 °C
615 durante 18 a 24 horas. Subcultivar en placas
616 de Agar Xilosa Lisina Desoxicolato. Incubar
617 entre 30 °C y 35 °C durante 18 a 48 horas. Si
618 se observa desarrollo de colonias color rojo,
619 con o sin centro negro, identificarlas para
620 descartar la presencia de *Salmonella*: la
621 muestra cumple con el ensayo si no se
622 observa el desarrollo de colonias con las
623 características descriptas o si la identificación
624 es negativa.

625 Ensayo para *Candida albicans*

626 Agregar un volumen de la dilución
627 obtenida según *Preparación de la muestra*,
628 equivalente a 1 g o 1 mL de producto, a
629 Caldo Sabouraud Dextrosa para obtener 100
630 mL, o el volumen establecido en *Método de*
631 *investigación* en *Ensayo de aptitud*. Mezclar
632 e incubar entre 30 °C y 35 °C durante 3 a 5
633 días. Subcultivar en una placa con Agar
634 Sabouraud Dextrosa e incubar entre 30 °C y
635 35 °C durante 24 a 48 horas. Si se observa
636 desarrollo de colonias blancas, identificarlas
637 para descartar la presencia de *Candida*
638 *albicans*: la muestra cumple con el ensayo si
639 no se observa el desarrollo de colonias con
640 las características descriptas o si la

641 identificación es negativa.

642 Ensayo para anaerobios sulfito-reductores

643 Agregar un volumen de la dilución
644 obtenida según *Preparación de la muestra*,
645 equivalente a 1 g o 1 mL de producto, a
646 Medio Fluido de Tioglicolato previamente
647 calentado durante 10 minutos en un baño de
648 vapor y enfriado, adicionado de Azida Sódica
649 al 0,03 %, hasta obtener 100 mL. Cubrir la
650 superficie con Mezcla estéril de Vaselina y
651 Parafina (ver *Medios de cultivo y reactivos*
652 *para ensayos microbiológicos* en *Reactivos y*
653 *Soluciones*). Incubar entre 30 °C y 35 °C
654 durante 48 a 72 horas. Si se observa
655 desarrollo microbiano, transferir 1 mL a un
656 tubo estéril de no más de 16 mm de diámetro
657 exterior y no menos de 20 mm de largo.
658 Agregar por las paredes Agar Sulfito-
659 Polimixina-Sulfadiazina, previamente
660 fundido y enfriado a 40 °C, hasta no más de
661 1 cm del borde superior del tubo. Cubrir con
662 la mezcla de vaselina-parafina e incubar entre
663 30 °C y 35 °C durante 5 a 7 días, observando
664 diariamente: la muestra cumple con el ensayo
665 para microorganismos anaerobios sulfito-
666 reductores por gramo o mililitro si no se
667 observa el desarrollo de colonias negras.

668 Ensayo para Clostridios

669 Tomar dos porciones iguales
670 correspondientes a no menos de 1 g o 1 mL
671 de producto. Calentar una porción a 80 °C
672 durante 10 minutos y enfriar rápidamente.
673 No calentar la otra porción. Transferir cada
674 una de las porciones a dos recipientes de
675 38 × 200 mm cada uno, conteniendo 100 mL
676 de Medio Reforzado para Clostridios.
677 Incubar en condiciones anaeróbicas entre
678 30 °C y 35 °C durante 48 horas. Después de
679 la incubación, realizar subcultivos a partir de
680 cada tubo en Agar Columbia e incubar en
681 condiciones anaeróbicas entre 30 °C y 35 °C
682 durante 48 horas. El crecimiento anaeróbico
683 de bacilos (con o sin endoesporas), que den
684 una reacción de catalasa negativa, indica la
685 presencia de Clostridios: la muestra cumple
686 con el ensayo si no se observa desarrollo de
687 colonias con las características descriptas o si
688 la identificación es negativa.

689 Ensayo para gérmenes revivificables

690 Agregar un volumen de la dilución
691 obtenida según *Preparación de la muestra*
692 equivalente a 1 g o 1 mL de producto a Caldo
693 Digerido de Caseína-Soja para obtener
694 100 mL o el volumen definido en *Método de*
695 *investigación* en *Ensayo de aptitud*. Incubar
696 entre 20 °C y 25 °C durante al menos 5 días.
697 Tomar otra alícuota de la dilución de la
698 muestra equivalente a 1 g o mL de producto y

699 transferirla a 100 mL, o a un volumen
700 definido en *Método de investigación*
701 *Ensayo de aptitud* de Medio Fluido de
702 Tioglicolato. Incubar entre 30 °C y 35 °C
703 durante al menos 5 días: la muestra cumple
704 con los requisitos del ensayo para gérmenes
705 revivificables en un gramo o mililitro si no se
706 observa turbidez debida a desarrollo
707 microbiano en ninguno de los dos medios
708 mencionados.

709 Cuando el material en ensayo produce
710 turbidez en los caldos y la observación visual
711 del crecimiento de bacterias u hongos es
712 dificultosa, al finalizar el período de
713 incubación, transferir porciones de no menos
714 de 1 mL de la mezcla, que contiene la
715 muestra y el caldo, a envases con medio de
716 cultivo nuevo. Se debe continuar con la
717 incubación de ambas muestras, la inicial y la
718 transferida, por no menos de 4 días
719 adicionales.

720 Control Negativo

721 Se recomienda para verificar las
722 condiciones del ensayo realizar en paralelo
723 un control negativo replicando el
724 procedimiento en ausencia de muestra. No
725 debe observarse crecimiento de
726 microorganismos. Es necesario investigar
727 cualquier falla en el control negativo.

728 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

729 Los productos farmacéuticos pueden ser
730 vehículos de microorganismos que pueden
731 producir enfermedades, alteraciones físico-
732 químicas, disminución de la actividad
733 terapéutica o ser indicadores de calidad
734 higiénica deficiente. Deben, por lo tanto,
735 fijarse límites de aceptabilidad con el fin de
736 garantizar la inocuidad y estabilidad del
737 producto desde el punto de vista
738 microbiológico. La *Tabla 1* indica los límites
739 de aceptabilidad de acuerdo a la vía de
740 administración y deben interpretarse como:

- 741 • 10^1 ufc significa que el recuento
742 máximo aceptable es 20.
- 743 • 10^2 ufc significa que el recuento
744 máximo aceptable es 200.
- 745 • 10^3 ufc significa que el recuento
746 máximo aceptable es 2.000.

747 En caso de detectarse microorganismos
748 no especificados en la *Tabla 1*, se deberá
749 evaluar su relevancia en función de la vía de
750 administración, la naturaleza del producto y
751 los pacientes a los cuales está destinado.

752 Los límites de aceptabilidad deben ser
753 establecidos por personal especializado
754 entrenado en microbiología, al igual que la
755 realización de los ensayos, la interpretación y
756 la evaluación de los resultados obtenidos.

757

Tabla 1. Límites de aceptabilidad para productos farmacéuticos no obligatoriamente estériles

Vía de Administración	Recuento de microorganismos aerobios totales (ufc/g ó mL)	Recuento combinado de hongos filamentosos y levaduras (ufc/g ó mL)	Microorganismos específicos (1 g ó mL)
Vía inhalatoria (excepto Soluciones Fisiológicas para nebulizar)	10^2	10^1	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ausencia de bacterias Gram negativas tolerantes a la bilis
Vías: oromucosal	10^2	10^1	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
cutánea			
gingival			
nasal			
auricular			
Parches transdérmicos (límites para un parche incluyendo la capa adhesiva y el soporte)			
Vía vaginal	10^2	10^1	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ausencia de <i>Candida albicans</i>
Preparaciones acuosas para uso oral	10^2	10^1	Ausencia de <i>Escherichia coli</i>
Preparaciones no acuosas para uso oral	10^3	10^2	Ausencia de <i>Escherichia coli</i>

ANMAT-MED-FPA
064-00

Vía rectal	10^3	10^2	-
Aplicaciones sobre escaras, ulceraciones o quemaduras	Ausencia de gérmenes revivificables (g o mL)		

Tabla 2. Preparación y uso de microorganismos de prueba para recuento, investigación y ensayo de gérmenes revivificables

Preparación y uso de microorganismos de prueba para recuento					
Microorganismo	Preparación de cepas de prueba	Promoción del crecimiento		Aptitud del método de recuento en presencia del producto	
		Recuento total de microorganismos aerobios	Recuento total de hongos filamentosos y levaduras	Recuento total de microorganismos aerobios	Recuento total de hongos filamentosos y levaduras
<i>Staphylococcus aureus</i> Por ejemplo: ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 o NBRC 13276	Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas	Agar Digerido de Caseína-Soja / NMP: Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30 °-35 °C ≤ 3 días	-	Agar Digerido de Caseína-Soja / NMP: Caldo Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30 °-35 °C ≤ 3 días	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Por ejemplo: ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 o NBRC 13275	Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas	Agar Digerido de Caseína-Soja / NMP: Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30 °-35 °C ≤ 3 días	-	Agar Digerido de Caseína-Soja / NMP Caldo Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30 °-35 °C ≤ 3 días	-
<i>Bacillus subtilis</i> Por ejemplo: ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62 o NBRC 3134	Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas	Agar Digerido de Caseína-Soja / NMP: Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30 °-35 °C ≤ 3 días	-	Agar Digerido de Caseína-Soja / NMP Caldo Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30 °-35 °C ≤ 3 días	-
<i>Candida albicans</i> Por ejemplo: ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 o NBRC 1594	Agar Sabouraud Dextrosa, Agar Papa-Dextrosa o Caldo Sabouraud Dextrosa 20 °-25 °C 2 - 3 días	Agar Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30 °-35 °C ≤ 5 días	Agar Sabouraud Dextrosa y Agar Papa-Dextrosa ≤ 100 ufc 20 °-25 °C ≤ 5 días	Agar Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30 °-35 °C ≤ 5 días NMP: no aplica	Agar Sabouraud Dextrosa y Agar Papa-Dextrosa ≤ 100 ufc 20 °-25 °C ≤ 5 días
<i>Aspergillus brasiliensis</i> Por ejemplo: ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83 o NBRC 9455	Agar Sabouraud Dextrosa, Agar Papa-Dextrosa o Agar Papa Dextrosa 20 °-25 °C 5-7 días o hasta alcanzar una buena esporulación	Agar Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30 °-35 °C ≤ 5 días	Agar Sabouraud Dextrosa y Agar Papa-Dextrosa ≤ 100 ufc 20 °-25 °C ≤ 5 días	Agar Digerido de Caseína-Soja ≤ 100 ufc 30 °-35 °C ≤ 5 días NMP: no aplica	Agar Sabouraud Dextrosa y Agar Papa-Dextrosa ≤ 100 ufc 20 °-25 °C ≤ 5 días
Preparación y uso de microorganismos de prueba para investigación					

Microorganismo	Preparación de cepas de prueba	Promoción del crecimiento			Aptitud del método de investigación en presencia del producto
		Propiedades nutritivas / selectivas	Propiedades inhibitorias	Propiedades indicadoras del medio selectivo	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83 o NBRC 13276	Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas	Caldo Mossel para enriquecimiento de enterobacterias. 30° - 35 °C 24-48 horas Caldo Rappaport -Vassiliadis para enriquecimiento de <i>Salmonella</i> 30 °-35 °C 18-24 horas Agar MacConkey 30 °-35 °C 18-72 horas	Agar Manitol Salado 30 °-35 °C 18-72 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas Agar Manitol Salado 30 °-35 °C 18-72 horas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118 o NBRC 13275	Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18 - 24 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas Caldo Mossel para enriquecimiento de enterobacterias. 30 °-35 °C 24-48 horas	-	Agar Cristal Violeta - Rojo Neutro - Bilis - Glucosa 30 °-35 °C 18-24 horas Agar Cetrimida 30 °-35 °C 18-72 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas Agar Cetrimida 30 °-35 °C 18-72 horas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, NCIMB 8545, CIP 53.126 o NBRC 3972	Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas Caldo Mossel para enriquecimiento de enterobacterias. 30 °-35 °C 24-48 horas Agar MacConkey 30 °-35 °C 18-72 horas	Agar Cetrimida 30 °-35 °C 18-72 horas Agar Manitol Salado 30 °-35 °C 18-72 horas	Agar MacConkey 30 °-35 °C 18-72 horas Agar Cristal Violeta - Rojo Neutro - Bilis - Glucosa 30 °-35 °C 18-24 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas Agar MacConkey 30 °-35 °C 18-72 horas
<i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovar typhimurium ATCC 14028 o <i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>enterica</i> serovar Abony NBRC 100797, NCTC 6017 o CIP 80.39	Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas Caldo Rappaport - Vassiliadis para enriquecimiento de <i>Salmonella</i> 30 °-35 °C 18-24 horas Agar Xilosa Lisina	-	Agar Xilosa Lisina Desoxicolato 30 °-35 °C 18-48 horas	Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas Caldo Rappaport -Vassiliadis para enriquecimiento de <i>Salmonella</i> 30 °-35 °C 18-24 horas Agar Xilosa Lisina

		Desoxicolato 30 °-35 °C 18-48 horas			Desoxicolato 30 °-35 °C 1848 horas
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72 o NBRC 1594	Agar Sabouraud Dextrosa o Caldo Sabouraud Dextrosa 20 °-25 °C 2-3 días	Caldo Sabouraud Dextrosa 30 °-35 °C 35 días Agar Sabouraud Dextrosa 30 °-35 °C 24-48 horas	-	-	Caldo Sabouraud Dextrosa 30 °-35 °C 3-5 días Agar Sabouraud Dextrosa 30 °-35 °C 24-48 horas
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404 NCTC 532, CIP 79.3 6 ATCC 11437 NBRC 14293, NCIMB 12343, CIP 100651	Medio Reforzado para Clostridios 30 °-35 °C 24-48 horas bajo condiciones anaeróbicas	Medio Reforzado para Clostridios 30 °-35 °C 48 horas bajo condiciones anaeróbicas Agar Columbia 30 °-35 °C 48-72 horas bajo condiciones anaeróbicas Medio Fluido de Tioglicolato con Azida Sódica 30 °-35 °C 48-72 horas bajo condiciones anaeróbicas Agar Sulfito- Polimixina- Sulfadiacina 30 °-35 °C 5 a 7 días bajo condiciones anaeróbicas		Agar Sulfito- Polimixina- Sulfadiacina 30 °-35 °C 5 a 7 días bajo condiciones anaeróbicas	Medio Reforzado para Clostridios 30 °-35 °C 48 horas bajo condiciones anaeróbicas Agar Columbia 30 °-35 °C 48-72 horas bajo condiciones anaeróbicas
Microorganismos de prueba para el ensayo de gérmenes revivificables					
Microorganismo	Preparación de cepas de prueba	Promoción del crecimiento	Aptitud del método de recuento en presencia del producto		

<p><i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633, CIP 52.62, NCIMB 8054, NBRC 3134</p>	<p>Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30 °-35 °C 18-24 horas</p>	<p>Caldo Digerido de Caseína-Soja 20 °-25 °C ≤ 5 días</p>
<p><i>Candida albicans</i> ATCC 10231, IP 48.72, NCPF 3179, NBRC 1594</p>	<p>Agar Sabouraud Dextrosa o Caldo Sabouraud Dextrosa 20° - 25 °C 2 - 3 días</p>	<p>Caldo Digerido de Caseína-Soja 20 °-25 °C ≤ 5 días</p>
<p><i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404, IP 1431.83, IMI 149007, NBRC 9455</p>	<p>Agar Sabouraud Dextrosa o Agar Papa Dextrosa 20° - 25 °C 5.-7 días o hasta alcanzar una buena esporulación</p>	<p>Caldo Digerido de Caseína-Soja 20 °-25 °C ≤ 5 días</p>
<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, CIP 4.83, NCTC 10788, NCIMB 9518, NBRC 13276</p>	<p>Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30° - 35 °C 18-24 horas</p>	<p>Medio Fluido de Tioglicolato 30 °-35 °C ≤ 5 días</p>
<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ⁽¹⁾ ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, NBRC 13275*</p>	<p>Agar Digerido de Caseína-Soja o Caldo Digerido de Caseína-Soja 30° - 35 °C 18 - 24 horas</p>	<p>Medio Fluido de Tioglicolato 30 °-35 °C ≤ 5 días</p>

<i>Clostridium sporogenes</i> ⁽²⁾ ATCC 19404, CIP 79.3, NCTC 532 o ATCC 11437, NBRC 14293	Medio reforzado para clostridios en anaerobiosis 30° - 35 °C 24 - 48 horas	Medio Fluido de Tioglicolato 30 °-35 °C ≤ 5 días
---------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------

(1) Como alternativa a *Pseudomonas aeruginosa*, puede utilizarse *Kocuria rhizophila* ATCC 9341.

(2) Como alternativa a *Clostridium sporogenes* y en caso de no ser requerido un esporoformador, puede utilizarse *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482.

NOTA: Pueden utilizarse cepas ATCC o cepas aptas para tales fines pertenecientes a colecciones de cultivos microbianos reconocidas por la WFCC (World Federation of Culture Collections).

Tabla 3. Valores del Número más Probable de microorganismos

Combinaciones observadas de Números de tubos que muestran crecimiento en cada juego			NMP por g o por mL de producto	Límites de confianza de 95 %
Número de g o mL de producto por tubo				
0,1	0,01	0,001		
0	0	0	< 3	0-9,4
0	0	1	3	0,1-9,5
0	1	0	3	0,1-10
0	1	1	6,1	1,2-17
0	2	0	6,2	1,2-17
0	3	0	9,4	3,5-35
1	0	0	3,6	0,2-17
1	0	1	7,2	1,2-17
1	0	2	11	4-35
1	1	0	7,4	1,3-20
1	1	1	11	4-35
1	2	0	11	4-35
1	2	1	15	5-38
1	3	0	16	5-38
2	0	0	9,2	1,5-35
2	0	1	14	4-35
2	0	2	20	5-38
2	1	0	15	4-38
2	1	1	20	5-38
2	1	2	27	9-94
2	2	0	21	5-40
2	2	1	28	9-94
2	2	2	35	9-94
2	3	0	29	9-94
2	3	1	36	9-94
3	0	0	23	5-94
3	0	1	38	9-104
3	0	2	64	16-181
3	1	0	43	9-181
3	1	1	75	17-199
3	1	2	120	30-360
3	1	3	160	30-380
3	2	0	93	18-360
3	2	1	150	30-380
3	2	2	210	30-400
3	2	3	290	90-990
3	3	0	240	40-990
3	3	1	460	90-1980

3	3	2	1100	200-4000
3	3	3	> 1100	

Tabla 4. Agentes Neutralizantes comunes / Método para sustancias de interferencia

Sustancia de Interferencia	Agentes Neutralizantes Potenciales / Método
Glutaraldehído, Mercuriales	Sulfito Ácido de Sodio (Bisulfito de Sodio)
Fenólicos, Etanol, Aldehídos, Sorbato	Dilución
Aldehídos	Glicina
Compuestos de Amonio Cuaternarios (CAC), Parahidroxibenzoatos (Parabenos), Biguanidas	Lecitina
CAC, Yodo, Parabenos	Polisorbato
Mercuriales	Tioglicolato
Mercuriales, Halógenos, Aldehídos	Tiosulfato
EDTA (Edetato)	Iones de Mg o Ca