

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

MCC P/A	COSMETIKIT®	DRY PLATES®	MUGPLUS
CRIOTECA®	CHROMOSALM	DESINFECTEST®	CCCNT
PLAQUIS®	KITPRO-PLUS	CROMOKIT®	MBS
M-IDENT®	SEILAGUA®	SALMOQUICK	AIRESANO
NEOGRAM	ENVIROCOUNT		

LPT NEUTRALIZING BROTH INCOLORO

(LETHEEN-PLUS, EUGON-PLUS)

Caldo para diluciones con máxima recuperación. Emulsiona productos grasos y neutraliza TODO TIPO de conservantes. Ideal para cosméticos y desinfectantes. Mejora del D/E Broth ISO 21149.

COMPOSICIÓN

Lecitina	1,40 g
Triptona	20,00 g
Extracto de levadura	10,00 g
Cloruro Sódico	10,00 g
Tioglicolato sódico	2,00 g
Tiosulfato sódico	2,00 g
Bi-sulfito sódico	4,80 g
Histidina	2,00 g

Factor dopping levaduras y mohos C.S.

(Fórmula en g/l)

Ajustar a pH: $7,6 \pm 0,2$

Este medio deshidratado puede requerir hasta 15 ml de NaOH 1 N por cada litro de medio final que prepare



Izda: Sin inocular.

Dcha: Tubo turbio, con crecimiento a pesar de los conservantes.

* Factor dopping descubierto por MICROKIT para acelerar el crecimiento de los eucariotas hongos, como *Candida albicans*, y *Aspergillus spp*, que crecen demasiado lentos o no crecen en los medios indicados en la ISO 21148 y derivadas.

PREPARACIÓN

Disolver 26,1 g en cosmética general (y a [x2], hasta 52,2 g en cosméticos muy inhibitorios, aunque el caldo quedará turbio) en 1 litro de agua bidestilada que contenga 5 ml de Polisorbato-Tween 80 atemperado. Si se desea aumentar el poder neutralizante a mayor nivel que la [x2], debe añadirse a los 52,2 g/l, hasta un máximo de: 1,6 g/l de Lecitina, 30 ml/l de Polisorbato-Tween 80 y 5,4 g/l de Suplemento mix completo SMT002 (1 g/l de Histidina, 1 g/l de Tioglicolato Sódico, 2,4 g/l de Disulfito Sódico y 1 g/l de Tiosulfato Sódico). Para inactivar además beta-lactámicos, añadir penasa, para tetraciclinas añadir

sales de Mg, para aminoglucósidos añadir heparina. Agitar calentando hasta ebullición; en este medio la homogeneización puede requerir más tiempo del habitual. Es fundamental ajustar bien el pH final, ya que el Tween 80 acidifica incluso más de 1 punto, y en función de la calidad del agua empleada y de la proporción de polisorbato añadida, pueden requerirse hasta 15 ml de NaOH 1 N por cada litro de medio final. Autoclavar 15 minutos a 121 °C. No sobrecalentar. Una ligera turbidez es normal. Los tubos con fondo denso son aceptables mientras se homogeneicen por agitación contundente.

Los frascos a [x2] (RPL054D) se preparan con 52,2 g/l de medio en polvo y 30 ml/l de Tween 80. Otras combinaciones bajo pedido de al menos 180 u.

PARA USO EXCLUSIVO EN LABORATORIO. AGITE EL BOTE ANTES DE USAR. MANTENGA EL BOTE BIEN CERRADO EN LUGAR SECO, FRESCO Y OSCURO. DESHIDRATADO CODIGO: [DMT217](#)

CONTROL DE CALIDAD DEL MEDIO

Realizado en nuestro laboratorio; es prudente repetirlo en su laboratorio siempre que varíen las condiciones (más de 3 meses sin usar, tras desinfectar laboratorio, tras conservar a alta T^a, cuando adquiere aspectos extraños aunque no haya llegado a la fecha de caducidad teórica de la etiqueta,...)

DESHIDRATADO: Polvo grueso, Crema

PREPARADO: Estéril, Ámbar, fondo precipitado si se guarda en frío. Artefactos: El fondo de los medios preparados puede tener polisorbato precipitado: Agitar y atemperar antes de usar.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO s/ISO/TS 11133-2, 24-72 h a 35 °C, aplicando el método indicado en el Manual MICROKIT actualizado:

Escherichia coli WDCM00013, Excelente: Tras 20-30 minutos a 20-30°C, resiembra en TSA y obtención de >50-150% de colonias respecto al número de ufc inoculadas, en concreto 86-93%. Tras 24-72h a 35°C aprox, turbidez de ligera a elevada.

Pseudomonas aeruginosa WDCM00026, Excelente: Tras 20-30 minutos a 20-30°C, resiembra en TSA y obtención de >50-150% de colonias respecto al número de ufc inoculadas, en concreto 62-95%. Tras 36-72h a 35°C aprox, turbidez de ligera a elevada.

Staphylococcus aureus WDCM00033, Excelente: Tras 20-30 minutos a 20-30°C, resiembra en TSA y obtención de >50-150% de colonias respecto al número de ufc inoculadas, en concreto 51-57%. Tras 36-72h a 35°C aprox, turbidez de ligera a elevada.

Candida albicans WDCM00054, Excelente: Tras 20-30 minutos a 20-30°C, resiembra en SDA y obtención de >50-150% de colonias respecto al número de ufc inoculadas, en concreto 66-104%. Tras 36-72h a 35°C aprox, turbidez de ligera a elevada.

Burkholderia cepacia Colección TIPO USA 25416, Excelente: Tras 20-30 minutos a 20-30°C, resiembra en TSA y obtención de >50-150% de colonias respecto al número de ufc inoculadas, en concreto 51-57%. Tras 24-72h a 35°C aprox, turbidez de ligera a elevada.

Pluralibater gergoviae MKTD 9245, Excelente: Tras 20-30 minutos a 20-30°C, resiembra en TSA y obtención de >50-150% de colonias respecto al número de ufc inoculadas, en concreto 95%. Tras 24-72h a 35°C aprox, turbidez de ligera a elevada.

PRESENTACION: MEDIO DESHIDRATADO, TUBOS Y FRASCOS PREPARADOS CON Y SIN PERLAS DE VIDRIO

NOTA: Medio altamente recomendado no sólo para solución madre y diluciones; también para enriquecimiento en muestras cuyos componentes interfieran con la microbiota, como son los cosméticos: La composición del medio permite asegurar una buena dispersión del inóculo. Emulsiona las grasas e inactiva los derivados de amonio cuaternario (únicos conservantes que inactivan los medios clásicos tipo Lethen), y provoca una total inactivación de los demás conservantes modernos y autorizados que pueda llevar en su fórmula el cosmético, o la muestra, incluidos parabenos, Isotiazolinona, Compuestos fenólicos: fenoxietanol, feniletanol, anilidos..., Amonios cuaternarios, Surfactantes catiónicos, Aldehidos, Formaldehido, Glutaraldehido, compuestos liberadores de formol, Compuestos oxidantes, Peróxidos, Halógenos (Flúor, Cloro, Bromo, Iodo...), Lejía, Imidazoles, Clohexidina, Biguanida, Sales metálicas (Cu, Zn, Hg), compuestos organomercuriales... Además **inactiva los metabolitos** generados en su crecimiento por parte de los microorganismos acompañantes, que en otros caldos pueden impedir o enmascarar el crecimiento de los organismos patógenos buscados. En un estudio intercolaborativo realizado para comparar todos los caldos generales hace ya 3 décadas, fué el que más flora total recuperó y el segundo (tras el BHI Broth) que más patógenos recuperó (“Estudio comparativo entre los distintos caldos de cultivo generales”. SANCHIS, J. XI Congreso Nacional de Microbiología de Alimentos. Pamplona, 9/1998). En los servicios intercomparativos SEILAPARFUM demuestra ser el mejor medio inicial para todo (diluciones para recuentos y revitalización/enriquecimiento para búsqueda activa de patógenos). Medio validado mediante intercolaboración (puede bajarse la validación actualizada de microbiología cosmética, de la web www.microkit.es, pestaña publicaciones-validaciones) y re-validado mediante intercomparación.

SIEMBRA E INTERPRETACIÓN

Sembrar 1-25 gramos de muestra en 9-225 ml de medio. En matrices inhibitorias como los cosméticos, aconsejamos una muestra mínima de 10 g en 90 mL de caldo (y no 1 g en 9 mL). En lotes grandes, tomar varias muestras (al menos del principio, mitad y final del lote). Agitar y dejar reposar-actuar 20-30 minutos a temperatura ambiente. **A)** Para realizar recuentos, sembrar 1 ml (0,1 g) en los agares adecuados sin previo enriquecimiento (si sembramos solo 0,1-0,3 mL en la superficie de una placa preparada clásica, quedamos fuera de rango de los máximos permitidos en cosméticos que puedan caer en manos de inmunodeprimidos (ver DryPlates-TC e YM que sí absorben 1 ml en masa). **B)** Para investigar patógenos, enriquecer incubando a 35 °C, (36)-48-(72) horas y después estriar con asa de 10 µL en la superficie en los agares selectivos para cada patógeno buscado y además en LPT Agar (o mejor en CUP12A); confirmar las colonias aisladas.

El usuario final es el único responsable de la destrucción de los organismos que se hayan desarrollado, según la legislación medioambiental vigente. Autoclavar antes de desechar en la basura.

REVALIDACIÓN LPT Neutralizing Broth mediante Intercomparación Seilaparfum 2021

Extraído de los 15 últimos informes Seilaparfum de intercomparación de microbiología cosmética entre los participantes que siguen los Métodos ISO (Eugon LT 100) y los que siguen el Método consensuado Seilaparfum (LPT Neutralizing Broth). En todo tipo de matrices cosméticas.

Hemos empezado a comparar sistemáticamente los resultados en función de los caldos empleados, desde la ronda 37, de principio de 2017 hasta la ronda 51, de final de 2021. Aunque no encontramos una correlación 100% lineal entre los laboratorios que usan LPT Neutralizing Broth (llamado por algunos participantes LPT, LPT Broth o Lecithin Polisorbato Broth) y los que usan Eugon LT100, LPTX ó Letheen y la obtención de los mejores resultados (hay laboratorios con mejores y peores resultados en todos los caldos); se concluye que son equivalentes, aunque con supremacía del LPT Broth.

En la primera ronda en que se comparan de forma profunda (la 37, agua termal de avena), las 6 máximas calificaciones las obtienen laboratorios que emplean LPT Neutralizing Broth.

Y en la segunda ronda en que se comparan (la 38, gel íntimo), 8 de las 9 máximas calificaciones se obtienen desde LPT Neutralizing Broth y las dos peores calificaciones (5 puntos sobre 10) con caldo Eugon.

En la ronda 39 (crema reductora), de nuevo el laboratorio con mejores calificaciones emplea LPT Neutralizing Broth (y DryPlates en casi todos los parámetros).

Remontándonos a la difícil ronda 36 (crema contorno de ojos), el único laboratorio que obtuvo las máximas calificaciones (aprovechando el duplicado para comparar ambos caldos), concluyó que con sus resultados se demuestra que el LPT Neutralizing Broth (10/10) funciona mejor que el Eugon LT 100 (9,09/10) en todos los microorganismos. Además hay laboratorios que usan en su duplicado el mismo caldo, pero obtienen resultados muy diferentes entre sus dos analistas o los dos días diferentes. Pero sí observamos en anteriores rondas en los laboratorios que comparan ambos caldos, que en el 75% de los mismos obtenían mejores resultados tras emplear LPT Neutralizing Broth que Eugon LT100, aunque no sabemos si también hayan cambiado de analista en el duplicado. Los laboratorios con malos resultados tras usar LPT Neutralizing Broth ¿han ajustado el pH como exige su etiqueta? Porque en caso contrario, deberían saber que no se pueden obtener buenos resultados. En nuestras visitas técnicas, hemos encontrado demasiados laboratorios donde no tienen ese hábito de ajustar pHs tras hidratar los medios, lo cual es un grave punto crítico que deben erradicar, porque puede echar al traste todo el resto de trabajo, al no permitir crecer los microorganismos diana. Probablemente los peores resultados se deben a la deficiente implantación de los métodos, sean cuales sean, en laboratorios que no los han validado todavía.

En la ronda 40 (polvos de talco), es donde más evidente queda hasta ahora la diferencia entre el caldo LPT y el caldo “oficioso” o ISO-famoso Eugon: El 93,75 % de los participantes que emplean como caldo inicial LPT Neutralizing Broth obtienen en esta ronda la excelencia global (>85% de rendimiento). Pero sólo el 33% de quienes usan el caldo ISO (Eugon) obtienen dicha excelencia global.

En la ronda 41 (acondicionador de pelo), vuelve a demostrarse la primacía del LPT Neutralizing Broth frente al Eugon. Sólo 4 de 23 (17%) de laboratorios participantes en esta ronda obtienen el codiciado 100% de rendimiento, de nuevo TODOS ELLOS empleando LPT Neutralizing Broth. El 27% de los participantes que emplean como caldo inicial LPT Neutralizing Broth obtienen en esta ronda la excelencia global (>85% de rendimiento). Pero sólo el 25% de quienes usan el caldo ISO (Eugon) obtienen dicha excelencia global. Y se tiene en cuenta por fin el número de falsos negativos por caldo y usuario: 4 veces más (400%) con Eugon que con LPT Neutralizing Broth.

En la ronda 42 (crema exfoliante), de nuevo la excelencia sólo se da en laboratorios que emplean LPT Broth: el 82% de los participantes obtiene más del 85% del rendimiento, y todos ellos son exclusivamente usuarios de LPT Broth (ninguno de Eugon); y se obtienen 278 % más falsos negativos por laboratorios usuarios de Eugon que de LPT Broth.

Y en la ronda 43 (crema con urea), de nuevo se demuestra que la excelencia sólo se ha dado en laboratorios que emplean LPT Broth: sólo 4 de 21 participantes (19% obtiene la excelencia >85% del rendimiento en esta ronda, y todos ellos lo hacen con LPT Neutralizing Broth (ninguno con Eugon); y se obtienen u 29% menos de falsos negativos partiendo de LPT Neutralizing Broth que partiendo de Eugon.

En la ronda 44 (agua micelar) estos resultados se invierten, aunque tan poca proporción de usuarios de Eugon hace peligrar cualquier conclusión. No hay regla sin excepción.

En la ronda 45 (post-depilatorio) se vuelve a evidenciar la supremacía del LPT Broth sobre el Eugon: el 87,5% de participantes que obtienen >85% de rendimiento son usuarios de LPT Broth (12,5% de Eugon) y el 91% de participantes que obtienen el 100% de rendimiento son usuarios del LPT Broth (9% de Eugon). Además, el 50% de usuarios de Eugon obtiene resultados mediocres pero sólo el 12,5% de usuarios de LPT Broth obtiene resultados inferiores al 85% de rendimiento. Con LPT Broth ha habido sólo un 1,41 % de falsos negativos por usuario, mientras con Eugon ha habido un 6,25% de falsos negativos, 4 veces más.

En la ronda 46 (crema antiarrugas) sucede como en la 44, una inversión de términos, pero la escasa proporción ya de participantes con Eugon (tras ver todos que en la mayoría de muestras funciona mejor el LPT Neutralizing Broth), no permite sacar conclusiones estadísticamente significativas. Quién sabe si esto sea achacable al caldo o al tiempo de enriquecimiento del mismo: Hemos de ser conscientes de que sin incubar 48h el caldo de enriquecimiento, no tenemos la certeza de detección de *S.aureus*, ya que es un microorganismo de crecimiento lento, tanto en la placa de aislamiento como en el caldo de enriquecimiento. Ni tampoco de *C.albicans*, que aun siendo capaz de formar colonias en sólo 24h a 35°C, a menudo falla en los caldos incubados sólo 18-24h a 35°C que no tienen “factores doping” para hongos. La logística del análisis nos aconseja, entonces, que incubemos 48h el caldo, para estriar después en todos los agares de patógenos, ya que (aunque estriemos los demás a las 24h) el resultado se va a retrasar igual, a causa de *St.aureus*, y no podemos liberar un lote con ausencia de los demás patógenos, sin saber que tampoco tiene *St.aureus*. Desde esa ronda, cambiamos las tablas de resultados para integrar esta información del tiempo de enriquecimiento, rogando a los usuarios la indiquen para que podamos llegar a conclusiones cada vez más fiables:

Caldo inactivador utilizado, nombre completo: **Tiempo y T° enriquecimiento patógenos:** 18-24h 40-48h

En la ronda 47 (champú antiopios) no hubo falsos negativos, ni empleando LPT Broth ni empleando Eugon.

En la ronda 48 (crema relajante de pies) de nuevo destacan con muy mejor calificación TODOS los usuarios de LPT Broth (todos con excelencia >85%) con respecto a TODOS los usuarios de Eugon (todos con calificación mediocre cercana al 55-57%). Deberían plantearse el cambio, máxime ahora que el 1-1-2021 entra en vigor la prohibición del reglamento Reach de usar triton X100, un componente tóxico del Eugon que no está presente en el LPT Broth. Y más teniendo en cuenta que éste también aparece como recomendado en las Normas ISO de microbiología cosmética, en el apéndice, con su nombre USA (D/E Neutralizing Broth) y fórmula precursora del LPT Neutralizing Broth.

En la ronda 49 (champú con keratina) no hay datos significativos, al haber solo 4 falsos negativos de 162 analizados. Curiosamente todos ellos en LPT Neutralizing Broth, pero tan escasos datos no son estadísticamente significativos (2,47%)

En la ronda 50 (crema anticelulítica) no hay caldos que comparar ya que el 100% de participantes usan ya el LPT Neutralizing Broth. Pero como ya los usuarios indican el tiempo que enriquecen en el LPT Broth, si podemos decir que los 4 laboratorios que sólo enriquecen 24 h en vez de 48 h, obtienen rendimientos del 70, 70, 87,5 y 87,5% (media 78,75%) mientras la media del rendimiento de quienes enriquecen 40-48 h es prácticamente idéntica (78,64%). Muy interesante, aunque necesitaríamos más comparaciones en futuras rondas, para poder extraer conclusiones significativas.

Y en la ultima ronda Seilaparfum, la 51 (desodorante líquido) de 11-2021: El 75% de los participantes de los 12 con LPT Neutralizing Broth obtienen la excelencia global mientras el 50% de los 4 con caldo ISO (Eugon) obtienen dicha excelencia.

En la primera ronda ielab que sustituye a Seilaparfum, en Abril de 2022, el 100% de laboratorios que enriquecen sólo 24h, fallan en *Pseudomonas aeruginosa* y el 100% de los que enriquecen 36-48h, aciertan. En *Staphylococcus aureus* el 67% de los que enriquecen sólo 24 h, fallan y de los que enriquecen 36-48h, el 73 % fallan, por lo que hay algún factor desconocido que no es el tiempo de enriquecimiento, que provoca falsos negativos. En *Candida albicans* el 50% de los que enriquecen sólo 24h, fallan y de los que enriquecen 36-48h sólo falla el 18%. Se demuestra que es necesario enriquecer 36-48h. No se tienen en cuenta en este tema los patógenos rápidos (*E.coli*, demás coliformes y *Burkholderia cepacia*) porque en nuestra experiencia, en sólo 24h de enriquecimiento, ya crecen.

Laboratorios MICROKIT, S.L, Noviembre de 2022, Jorge Sanchis Solera,
Coordinador Seilaparfum



ESTUDIO SOBRE LOS TIEMPOS DE ENRIQUECIMIENTO EN LPT NEUTRALIZING BROTH DE MICROKIT DURANTE LA SEMANA LABORAL TÍPICA Y DURANTE LA ATÍPICA

Muchos laboratorios nos preguntan si pueden dejar incubando el enriquecimiento durante el fin de semana o incluso durante los puentes, para poder así comenzar sus análisis también las vísperas de festivos. Las curvas en meseta del crecimiento de las poblaciones de microorganismos en medios de cultivo, son conocidas como algo generalizado (letargia-exponencial, meseta, caída y letargia de nuevo), pero no existen curvas específicas para responder con rigor dicha pregunta.

Para responder esta duda crítica, se incluyen en un arduo trabajo, 10 matrices cosméticas (gel de baño, crema reafirmante, dentífrico infantil, after sun, protector solar 50, champú pediculicida, colutorio gingivitis, agua de peinado, aceite de almendras dulces, gel aloe vera) los 7 patógenos más típicos en cosmética (*C.albicans*, *St.aureus*, *E.coli*, *Pluralibacter gergoviae*, *Salmonella typhimurium*, *Burkholderia cepacia* y *Ps.aeruginosa*), se incubó diferentes tiempos en LPTN Broth de MICROKIT (12, 18, 24, 36 y 48 h, 3, 4, 5, 6, 14 y 21 días) y se estría el caldo enriquecido en las placas más adecuadas según los resultados de intercomparación (Biggy, Baird Parker cromogénico, MugPlus, Cromosalm, BCPT cromogénico y Cetrímida, respectivamente) a los distintos intervalos, para evaluar el margen de tiempo que tarda cada patógeno en ser detectado (porque deja de estar en letargia, antes de la curva exponencial, o para saber cuando vuelve a la letargia tras la meseta evidenciada en el caldo). Ejemplos de tiempos de incubación del caldo de enriquecimiento:

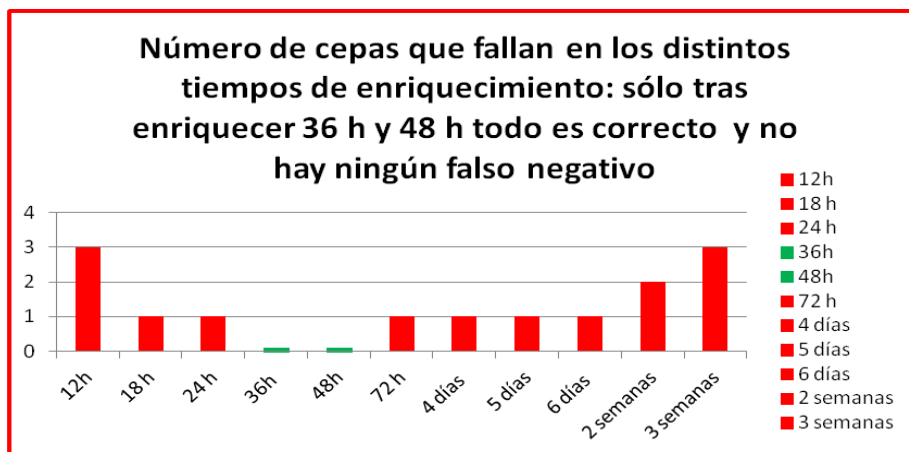
*3 días → Siembro el Viernes y leo el Lunes

*4 días → Finde cornisa por **Lunes fiesta: Siembro el Viernes y leo el Martes, o bien por Viernes fiesta: siembro el Jueves y leo el Lunes**

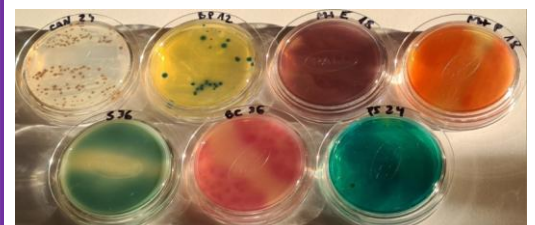
*5 días → Finde largo por **Lunes y Martes fiesta: Siembro el Viernes y leo el Miércoles, o bien por Jueves y Viernes fiesta: siembro el Miércoles y leo el Lunes**

*6 días → Puente acueducto con **Lunes y Miércoles fiesta, se toma fiesta también el Martes: Siembro el pasado Viernes y leo el Jueves, o bien con Miércoles y Viernes fiesta, se toma fiesta también el Jueves: Siembro el pasado Martes y leo el Lunes**

Los resultados son muy elocuentes (26/06/2023):



Queda demostrado que el mejor tiempo de enriquecimiento para evitar falsos negativos es de 36-48 h; sin embargo, las placas estriadas a las 48 h, obtienen colonias típicas mucho más rápidamente (entre 12 y 20 h según la cepa concreta, casi todas desplazadas hacia las 12 h) que las estriadas tras 36 h (entre 12 y 24 h, casi todas desplazadas hacia las 24 h), en todas las cepas estudiadas. La cepa que más ejemplos provoca de falsos negativos al enriquecer más tiempo (3 ó más días) es *Pseudomonas aeruginosa*, (dos cepas diferentes), seguida de *E.coli* y de *St.aureus* (3 cepas diferentes). Las cepas que provocan más casos de falsos negativos si se enriquece menos de 36 h son *Salmonella typhimurium*, seguida de *Candida albicans* y de *Burkholderia cepacia*.



Crecimientos perfectos tras 48 h de enriquecimiento

Atención: Las conclusiones de este estudio no se pueden extrapolar al comportamiento de otros caldos, ya que con diferentes composiciones, los resultados son imprevisibles. Si desea poder aplicar estas conclusiones, exija un estudio similar a su proveedor de Eugon, Lethen, LPT Broth u otros caldos. Y mejor: use LPT Neutralizing Broth de MICROKIT.