

MINISTERIO DE SALUD Y ACCION SOCIAL

SALUD PUBLICA

PRODUCTOS HIGIENICOS DESCARTABLES DE USO EXTERNO O INTRAVAGINAL Resolución Nro. 288/1990

Bs.As., 28/11/1990

VISTO el TRATADO DE INTEGRACION, COOPERACION Y DESARROLLO firmado con la REPUBLICA FEDERATIVA DEL BRASIL y la necesidad de regularizar y normatizar la importación, exportación, calidad de la materia prima, condiciones de elaboración, fraccionamiento y comercialización de absorbentes descartables; y

CONSIDERANDO:

Que los productos absorbentes descartables son usados sobre superficies corporales vulnerables a infecciones y otras lesiones dermatológicas.

Que se hace necesario contar con los servicios de Laboratorio Químico Microbiológico y Farmacológico que permitan el estricto control de los valores establecidos, para todos y cada uno de los parámetros involucrados.

Que en el marco del Protocolo número IV del acuerdo bilateral citado se elabora una propuesta de regulación técnica para el control de productos absorbentes higiénicos de uso externo e intravaginal, con participación de autoridades y representantes de este MINISTERIO.

Que dicha propuesta constituye un avance en los programas de integración argentino -brasileño y, a su vez, implica el perfeccionamiento de la normativa vigente, adecuándose a los avances científicos producidos en el tema.

Que la DIRECCION DE ASUNTOS JURIDICOS de la ex-SECRETARIA DE SALUD no formula objeciones al respecto.

Que la DIRECCION GENERAL DE ASUNTOS JURIDICOS ha tomado la intervención de su competencia. Que la presente resolución se dicta en uso de facultades conferidas por el artículo 40 del Decreto 9763/64 reglamentario de la Ley N° 16463.

Por ello,

EL MINISTRO DE SALUD Y ACCION SOCIAL RESUELVE:

ARTICULO 1ero.- Apruébase la REGULACION TECNICA PARA CONTROL DE PRODUCTOS HIGIENICOS DESCARTABLE DE USO EXTERNO E INTRAVAGINAL que como Anexos I, II y III forma parte de la presente.

ARTICULO 2do.- Derógase la Resolución No. 1068, del 14 de abril de 1980.

ARTICULO 3ero.- Dispónese un plazo de NOVENTA (90) días a fin de que los Establecimientos alcanzados por la presente se adecuen a esta reglamentación.

ARTICULO 4to.- Las infracciones a la presente resolución serán sancionadas conforme lo reglado por la Ley N° 16.463.

ARTICULO 5to.- Regístrese; comuníquese y archívese, previa publicación

KOHAN MINISTRO DE SALUD Y ACCION SOCIAL REGULACION TECNICA PARA CONTROL DE PRODUCTOS ABSORBENTES HIGIENICOS DESCARTABLE, DE USO EXTERNO E INTRAVAGINAL

ANEXO I.

PRODUCTOS DESCARTABLES DE USO EXTERNO

1. Definición

1.1. Son considerados productos absorbentes descartables de uso externo, los artículos destinados al aseo corporal., aplicados directamente sobre la piel, con la finalidad de absorber o retener excreciones o secreciones orgánicas, tales como orina, heces, leche materna y las excreciones de naturaleza menstrual e intermenstrual.

1.2. Están comprendidos en este grupo los absorbentes higiénicos femeninos de uso externo, los pañales para

bebé, pañales para adultos y los absorbentes de leche materna.

2. Composición Los productos absorbentes descartables de uso externo, están compuestos por:

2.1. Una capa de tela polimérica que permita el pasaje de fluidos orgánicos y que retenga las heces.

2.2. Un núcleo absorbente destinado a almacenar fluidos orgánicos que atraviesen la primera capa, compuesto por algodón hidrófilo, pulpa de celulosa virgen o materiales poliméricos absorbentes.

2.3. Una capa de apoyo estructural.

3. Requisitos de calidad

3.1. Las materias primas presentes en la composición de estos productos deberán ser de naturaleza atóxica y, para su confirmación serán sometidas obligatoriamente a los siguientes ensayos: IRRITACION PRIMARIA Y SENSIBILIZACION. Estos ensayos se efectuarán para cada tipo de materia prima empleada en la confección de los productos comprendidos en esta norma y se deberán repetir cada vez que se cambie las materias primas especificadas en el proceso de fabricación.

3.2. Los productos terminados deberán ser sometidos a los siguientes ensayos: IRRITACION PRIMARIA, IRRITACIÓN ACUMULATIVA Y SENSIBILIZACION. Estos ensayos se repetirán toda vez que cambie el proceso de fabricación, y se encuentran descritos en el anexo 3 de esta Norma.

Control de Fabricación

4.1. Las empresas fabricantes deberán estar debidamente habilitadas para funcionar por la autoridad competente, adoptando las "Buenas Prácticas de Fabricación" preconizadas por la Organización Mundial de la Salud.

4.2. Todas las materias primas y los productos terminados deberán ser analizados de acuerdo con métodos capaces de verificar su inocuidad y sometidas a la evaluación microbiológica de orientación, con periodicidad variable, y de acuerdo con la naturaleza de cada material.

4.2.1. La evaluación microbiológica, deberá responder a los siguientes límites de aceptabilidad para una muestra de 5 g: AUSENCIA DE ESCHERICHIA COLI, PSEUDOMONAS AERUGINOSA, STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y CLOSTRIDIUM sp. o CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES. La cantidad de gérmenes aeróbicos mesófilos, no debe pasar de 1000 unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de muestra.

4.2.2. En todos los casos se emplearán métodos de análisis de reconocida validez descritos en el anexo 3 de esta norma.

4.2.3. Los ensayos deberán ser realizados en laboratorios de la propia empresa o en aquellos que estén sujetos al control de la autoridad competente.

4.3. Cada lote de producto deberá ser identificado mediante codificación impresa en el respectivo rótulo, que viabilice localizar y revisar en los libros de registros, todas las operaciones de fabricación e inspección practicadas durante los respectivos ciclos de producción.

4.3.1. Los rótulos deberán contener la marca del producto, el nombre de la empresa productora o fraccionadora, el nombre del responsable técnico y el número de registro

4.4. Los documentos en que estén registrados los resultados de los ensayos de control de fabricación, aludidos en el ítem 4.2. deberán ser archivados en la empresa productora, por un período de cinco años, para permitir en cualquier momento la acción de la Fiscalización Sanitaria.

5. Almacenamiento

5.1. Los productos absorbentes descartables que se tratan en esta norma, deberán ser almacenados en local seco y limpio, libre de roedores e insectos.

ANEXO 2

PRODUCTOS ABSORBENTES DESCARTABLES DE USO INTRAVAGINAL

1. Definición 1.1. Son considerados productos absorbentes descartables de uso intravaginal; los artículos destinados a absorber o retener excreciones y secreciones menstruales e intermenstruales aplicados por inserción vaginal.

2. Composición 2.1. Los productos que se trata en esta norma deberán ser compuestos de fibras de algodón hidrófilo y/u otros materiales absorbentes que no contengan ingredientes farmacológicamente activos.

Requisitos de Calidad

3.1. Las materias primas presentes en la composición de los productos deberán ser de naturaleza atóxica, para confirmación de la cual, serán sometidas obligatoriamente a los siguientes ensayos preclínicos: CITOTOXICIDAD, IRRITACION PRIMARIA Y SENSIBILIZACIÓN. Estos ensayos se efectuarán para cada tipo de materia prima empleada en la confección de los productos comprendidos en esta norma y se deberán repetir cada vez que se cambien las materias primas especificadas en el proceso de fabricación.

3.2. Los productos terminados deberán ser sometidos a los siguientes ensayos preclínicos: IRRITACIÓN PRIMARIA, IRRITACION ACUMULATIVA y SENSIBILIZACIÓN. Estos ensayos se repetirán cada vez que se cambie el proceso de fabricación.

Control de fabricación

4.1. Todas las materias primas componentes de los productos, deberán ser analizadas con métodos capaces de verificar su inocuidad y sometidas a una evaluación microbiológica de orientación, con periodicidad variable, de acuerdo con la naturaleza de cada material.

4.2. Los productos terminados también deberán ser analizados a través de métodos capaces de verificar su inocuidad.

4.2.1. El recuento de gérmenes deberá ser inferior a 1000 microorganismos por unidad elaborada. Garantizada esa condición, el ensayo microbiológico posterior, deberá demostrar ausencia de: STAPHYLOCOCCUS AUREUS, ESCHERICHIA COLI, PSEUDOMONA AERUGINOSA Y MICROORGANISMOS ANAERIBICOS. Cuando el recuento microbiano se encuentra entre 500 y 1000 ufc por unidad de producto, se deberá proceder a la inmediata revisión en las condiciones de operación de fabricación.

4.2.2. Los ensayos de irritación primaria dérmica, irritación acumulativa y el de sensibilización, se realizarán de acuerdo con las técnicas descritas del Anexo 3 de esta Norma.

4.2.3. Los ensayos deberán ser realizados en Laboratorios de la empresa o en aquellos que estén sujetos al control de la Autoridad competente.

4.3. Las empresas que intervengan en la elaboración o fraccionamiento de productos comprendidos en esta norma, deberán ser habilitadas por Autoridad competente, con la Dirección Técnica de un Profesional Farmacéutico.

4.3.1. Los establecimientos, sus equipamientos e instalaciones dedicadas a las actividades enunciadas en el ítem anterior, así como los procesos de fabricación y de control químico microbiológico, deberán responder a las "BUENAS PRACTICAS DE FABRICACIÓN", enunciadas por la Organización Mundial de la Salud.

4.3.2. El área y los equipamientos donde se realiza la fabricación de estos productos, deberán ser de uso exclusivo para dicha elaboración.

4.4. Los embalajes de los productos contemplados en esta norma, deberán reunir condiciones que impidan su contaminación.

4.4.1. Los rótulos deberán especificar la marca del producto, el nombre del establecimiento productor o fraccionado, nombre del responsable técnico y número de registro.

4.5. Cada lote del producto deberá ser identificado mediante codificación impresa en el respectivo rótulo que viabilice localizar y revisar en los libros de registros, todas las operaciones de fabricación e inspección practicadas durante los respectivos ciclos de producción.

4.6. Los documentos en que están registrados los resultados de los ensayos de control de fabricación aludidos, en los ítems 4.1 y 4.2, deberán ser archivados en la empresa productora por un período de cinco años, para permitir en cualquier momento, la acción de la fiscalización sanitaria.

5. Almacenamiento

5.1. Los productos absorbentes descartables de que trata esta norma deberán ser almacenados en local seco y limpio, libre de roedores e insectos.

ANEXO 2

ENSAYOS PRECLINICOS PARA PRODUCTOS DESCARTABLES DE USO EXTERNO Y DE USO INTRAVAGINAL

1. IRRITACION CUTANEA PRIMARIA.

1.1. Objetivo La presente técnica evalúa el potencial de irritación cutánea, después de una única aplicación de la sustancia a ser ensayada.

1.2 Materiales y Métodos

1.2.1. Equipamiento

- Estufa
- Erlenmeyers
- Pipetas de 1,0 ml.
- Rasurador
- Jeringa de 1,0 ml.
- Espátula
- Balanza analítica
- Aguja de inyección estéril
- Gasa estéril
- Cinta adhesiva hipo-alérgica
- Calibre
- Esparadrapo
- Lente de aumento

1.2.2. Soluciones

- Solución isotónica de cloruro de sodio estéril
- Agua destilada estéril

1.2.3. Animales

* 6 (seis) conejos albinos, machos o hembras, de peso corpóreo de 2 a 3 Kg. Los animales deben ser mantenidos en jaulas individuales en todo el período de la prueba, en sala de temperatura constante (22 (3¼ C) y de humedad relativa entre 30 a 70%.

1.2.4. Selección de animales

1.2.4.1. Los animales que presentan reacción positiva en una prueba anterior de irritación cutánea, deberán ser excluidos de este ensayo (ver criterio para reacción positiva ítem 1.2.10.2)

1.2.4.2. Los animales que hayan presentado reacción negativa en una prueba previa de irritación cutánea, solo podrán ser utilizados luego de un período de descanso de por lo menos una semana (ver ítem 1.2.10.2 para la validez de esta reutilización).

1.2.4.3. Después de rasurar los animales, observar si la piel de los mismos se encuentra íntegra, esto es, sin ninguna lesión. Rechazar los animales que presenten problemas en la piel. Controlar el peso corporal de los animales al inicio y al final de la prueba. **OBSERVACIÓN** Los animales que fueron usados para la prueba con sustancias que alteran el color de la piel no deben ser usados para la prueba de irritación cutánea.

1.2.5. Preparación de los animales. Rasurar cuidadosamente cada animal en 4 (cuatro) áreas, de 2,5 cm² c/u. Hacer 2 (dos) escoriaciones paralelas con una aguja de inyección esterilizada, evitándose el sangrado. Las áreas rasuradas superior e inferior del lado derecho del animal. áreas 2 y 4 de la figura I. Las áreas rasuradas superior e inferior del lado izquierdo del animal deberá permanecer intactas (áreas 1 y 3 de la figura I).

1.2.6. Preparación de la muestra. Las muestras a aplicar deben tener una superficie de 2,5 cm² y ser previamente humedecida a saturación con solución fisiológica estéril.

1.2.7. Aplicación del producto Asegurar al animal delicadamente hasta que se calme. Aplicar el producto sobre las 2 áreas rasuradas superiores (áreas 1 y 2 de la Figura I, en cuanto a las 2 áreas inferiores (áreas 3 y 4 de Figura I) servirán como control.

1.2.8. Colocación del "parche" oclusivo Después de la aplicación del producto, cubrir cada una de las 4 (cuatro) áreas rasuradas con una gasa estéril de 2,5 cm² cada una, la cual debe ser fijada a los pelos del animal con cinta adhesiva hipoalergénica b esparadrapo. Todas las áreas rasuradas deben ser conjuntamente cubiertas con una gasa estéril, la cual debe ser envuelta alrededor del animal y fijada con cinta adhesiva hipoalérgica.

1.2.9. Lectura de las reacciones cutáneas: Las reacciones cutáneas deben ser analizadas 24 y 72 horas después de la aplicación del producto. Retirar el parche oclusivo 24 hs. después de la aplicación del producto y efectuar la lectura. Las áreas controles tienen como única finalidad, facilitar una comparación con las áreas ensayadas. La evaluación de formación de edema, debe ser medida a través de un calibre y el cálculo del valor del edema se hace a través de la fórmula: $Lat - Lac = Ed \text{ mm}^2$ Donde Lat = Lectura del área de prueba (íntegra y escoriada) Lac = Lectura del área control (íntegra y escoriada) Ed mm = Valor del edema en milímetros La graduación de la intensidad de las reacciones cutáneas está basada en el método de Draize (1,2) Ver tabla I. < /FONT >

OBSERVACIONES La lectura de las reacciones cutáneas que alteran el color de la piel. En el caso de productos colorantes que alteran el color de la piel, dificultando la visualización de Eritema, la evaluación se hace de la siguiente forma:

1) En la lectura de 24 hs. se hace la biopsia de las áreas aplicadas en 3 (tres) animales. En el mismo sentido hecho para los 3 (tres) animales restantes en la lectura de 72 hs.

2) Se efectúa el examen macro y microscópico de las biopsias (Método de coloración HE y Van Gienson).

3) Una graduación microscópica de las reacciones cutáneas se encuentra descrita en la tabla II. Figura I Ilustración de las áreas peladas 1-2 áreas superiores 3-4 áreas inferiores 1-3 áreas s/escoraciones 3-4 2-4 áreas c/ escoraciones 1-2 área con sustancia de prueba 3-4 área con controles Denominación de las áreas peladas para la prueba: 1.....Piel íntegra (área de prueba). Área 2.....Piel escoriada (área de prueba). Área 3.....Piel íntegra (área control). Área 4.....Piel escoriada (área control).

GRADUACION DE REACCIONES CUTANEAS

TABLA I I.1. Formación de eritema

- Grado 0 - Piel Normal: Generalmente de color blanca, pudiéndose presentar coloración rosada.
- Grado 1 - Eritema leve La piel se presenta enrojecida pudiendo estar localizada en todo el área.
- Grado 2 - Eritema moderado La piel. se presenta roja, generalmente en toda el área.
- Grado 3 - Eritema definido

TABLA 8

INDICE DE ZONA/LISIS	INDICE DE ZONA (L.Z.)
0	Ninguna Zona sobre o alrededor
0	NINGUNA LISIS. de la muestra
1	Zona limitada sobre la muestra

1. MENOS QUE 20% 2. Zona no mayor que 0,2 cm

2. MENOS QUE 40% 3. Zona no mayor que 0,2 cm y

3. MENOS QUE 60% menor que 1 cm 4. Zona mayor entre 1-2 cm

4. MENOS QUE 80% 5. Zona mayor que 2 cm

5. MAS QUE 80%

4.3. El material en ensayo no debe presentar resultados distintos a los controles NEGATIVOS.

5. CONTROL MICROBIOLÓGICO

5.1 INTRODUCCIÓN Las presentes técnicas microbiológicas tienen como objeto determinar los números de los microorganismos aerobios viales presentes en las muestras (bacterias, hongos y levaduras) así como también la ausencia o presencia de determinados géneros y especies bacterianos.

5.2. CAPACIDAD NUTRITIVA DE LOS MEDIOS DE CULTIVO: Preparar cultivos en Caldo Caseína Soja de los siguientes microorganismos: Staphylococcus Aureus ATCC 6538P ó 6538; Bacillus subtilis ATCC 6633; Escherichia coli ATCC 8739; Candida albicans ATCC 10331 ó 3001. Incubar los tres primeros durante 18 - 24 Hs. a 30 - 35¼ C y el de Candida albicans durante 48 hs. a 20 - 25¼ C. Diluir cada cultivo en buffer fosfato pH 7,2 de modo de obtener 100 cél/ml. y emplear el inóculo de los microorganismos separadamente como control de los medios de cultivo utilizados.

5.3. MATERIALES Y EQUIPOS

- 1. Pipetas graduadas, estériles de 1 ml; 2ml; 10 ml; y 20 ml.
- 2. Erlenmeyers. Balones de Vidrio y Vasos de Precipitados estériles.
- 3. Placas de Petri de 20 x 100 mm estériles.
- 4. Varillas de Vidrio estériles.
- 5. Tubos de Ensayos de 20 x 200 mm estériles.
- 6. Paños de Gasa Estériles.
- 7. Instrumentos, pinzas, tijeras, bisturíes, hojas de bisturí, espátulas, estériles.
- 8. Balanza con Sensibilidad 0,01 g.
- 9. Estufas de Incubación reguladas a 20¼ C 25¼ C y a 30¼ C.
- 10. Sobres generadores de atmósfera anaeróbica, indicadores y jarras para anaerobiosis.
- 11. Sistema de vela para microaerofilia o sobres generadores de atmósfera microaerofila.

5.3.5.4. MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES:

- 1. Caldo Sabouraud Dextrosa.
- 2. Caldo Caseína Soja
- 3. Caldo Lactosado
- 4. Caldo Tioglicolato 135 C (Tratado durante 10 min. en baño de agua a 100o C y enfriado inmediatamente). Puede ser reemplazado por Caldo Cerebro Corazón Pre-Reducido o Por Caldo Carne Cocida.
- 5. Agar Papa Dextrosa o Agar Sabouraud Dextrosa.
- 6. Agar Sulfito Polimixina Sulfadiazina (Agar SPS) de Angelotti
- 7. Agar MacConkey
- 8. Agar Manitol Salado o Agar Vogel-Johnson o Agar Baird Parker.
- 9. Agar Cetrimida
- 10. Agar Caseína Soja
- 11. Medios de Cultivo para Pruebas Bioquímicas de Identificación de S. aureus: E. Coli; P.aeruginosa.
- 12. Buffer Fosfato pH 7,2 5.5.

REACTIVOS:

- 1. Tween 80
- 2. Alcohol Etilico 70
- 3. Plasma de Conejo
- 4. Colorante para Gram
- 5. Reactivos para revelar las pruebas bioquímicas.
- 6. Solución de Clorhidrato de N-N-N-N Tetrametil p-Fenilen Diamina al 0,5% para prueba de oxidasa.
- 7. Parafina estéril

5.6. MANIPULACION DE LA MUESTRA: Seguir las siguientes recomendaciones:

- 1. Analizar las muestras lo más pronto posible luego de su llegada al laboratorio. Si fuese necesario almacenarlas; hacerlo a temperatura ambiente.
- 2. Inspeccionarlas cuidadosamente antes de abrirlas verificando las irregularidades de sus envases.
- 3. Desinfectar cada paquete individual. de muestra con una gasa estéril embebida en un desinfectante que no ataque el material de empaque.
- 4. Para cada análisis microbiológico, es preciso utilizar una porción representativa del contenido de la muestra, usar una porción de 10 g.
- 5. Si no hubiere necesidad de análisis múltiples, estudio microbiano, toxicología y química, la sub-muestra para el examen microbiológico deberá ser retirada en primer lugar.

5.7. PREPARACION DE LA MUESTRA: En la preparación de la muestra a ser probada, no deberá producirse alteración del número o tipo de microorganismos originalmente presentes. La muestra deberá ser removida asépticamente, pesando 10 g. en un vaso de precipitados estéril, para cada una de las pruebas descritas. Se puede utilizar un pequeño volumen de un agente emulsificante estéril, como dos polisorbatos 80 en la preparación de la suspensión.

5.8.1. METODO DE RECuento EN PLACA: Diluir la suspensión de modo de obtener un recuento entre 30 a 300 colonias, Pipetear 1 ml. de cada dilución en placas de Petri en duplicado. Agregar 15 a 20 ml de agar caseína soja previamente fundido y enfriado a aproximadamente a 40o C. Mezclar la muestra con el medio de cultivo con movimientos rotatorios. Dejar solidificar el contenido a temperatura ambiente e incubar a 30-35o durante 48 a 72 hs. Si no se observan colonias microbianas en las placas de la dilución 1:10 en adelante, expresar los resultados como: "menos de 10 u.f.c./g de muestra".

5.9. PRUEBA PARA STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y PSEUDOMONAS AERUGINOSA Agregar a la muestra caldo de caseína soja hasta completar 100 ml. Incubar a 30-35o de 24 a 48 hs. Si hubiera evidencia de crecimiento, sembrar con ansa en una placa de agar Vogel Johnson y en una placa de agar Cetrimida. Incubar las placas de 30 - 35o C durante 24 a 48 hs. Si al cabo del período de incubación no se observaran colonias sospechosas de Staphylococcus aureus la muestra satisface las exigencias de ausencias de estos microorganismos.

CUADRO II - Características morfológicas de Staphylococcus Aureus en medios selectivos.

Medio Agar Agar Agar
Selectivo Vogel-Johnson Manitol-Sal Baird-Parker
Morfología Negra, con halo Amarillo, con halo Negra brillante con Cultural amarillo
Amarillo halo claro de 2 a 5 mm. Característica
Coloración de Cocos
Gram positivos en acumulos Gram

5.9.1. PRUEBA DE LA COAGULASA (PARA STAPHYLOCOCCUS AUREUS) Inocular pequeñas cantidades de crecimiento en agar inclinado en 0,2 ml de caldo BHI. Incubar por 18 a 24 hs, a 35 + 2¼ C. Agregar 0,5 ml, de coagulasa plasmática de conejo reconstituida (con EDTA) y homogeneizar. Incubar a 35¼ + 2¼ C y observar. Las cepas que producen coagulasa francamente, pueden requerir una noche de incubación para que la formación del coagulo se torne evidente. Deberán utilizarse controles negativos y positivos. Si no fuera observado ningun

grado de coagulación, la muestra satisface las exigencias de las pruebas para ausencia de Staphylococcus aureus.

CUADRO III -CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS - PSEUDOMONAS AURUGINOSAS

Medio Agar Cetrimida Agar para Pseudomonas Agar para Pseudomonas para detección de fluoresceína Piocianina	Agar para Pseudomonas para detección de fluoresceína Piocianina	Morfología
Generalmente Generalmente incolora Generalmente Cultural verdosa a amarillenta verdosa	Característica	Fluoresceína Verdosa Amarilla Azul
Luz U.V.	Positivo Positivo Oxidasa	Prueba de Positivo
gran negativos de Gran	Coloración Bacilos o cocos bacilos	

5.9.2. PRUEBA DE

OXIDASA Y DE PIGMENTOS PARA PSEUDOMONAS AERUGINOSAS. A partir del agar cetrimida sembrar con anzar en los medios para detectar Fluoresceína y Piocianina. Incubar a 35 + 2o C por un período de tiempo no inferior a 3 días. Examinar las estrías de crecimiento a la luz U.V. Observando las características descritas en el Cuadro III. Hacer la prueba de oxidasa con el crecimiento sospechoso. Si la prueba fuese negativa la muestra satisface las exigencias para ausencia de Pseudomonas aeruginosa. Si es necesario para las cepas de Pseudomonas aeruginosa apiocianogenicas, serán necesarias otras pruebas para su identificación.

5.10 PRUEBA PARA ESCHERICHIA COLI Agregar a la muestra, caldo lactosado, de modo de obtener un volumen final de 100 ml. Incubar a 30-35o C durante 24 a 48 hs. Si hubiera evidencia de crecimiento, inocular una placa de agar MacConKey. Incubar a 30 35o C durante 24 a 48 hs. Si se observa desarrollo de colonias sospechosas de Escherichia coli, sembrar una placa con agar Levine (Eosina - Azul ce Metileno). Si no aparecen colonias con brillo metálico característico o color negro azulado la muestra satisface las exigencias para ausencia de Escherichia coli. Su presencia podrá ser confirmada por pruebas bioquímicas adicionales.

5.11 INVESTIGACION DE CLOSTRIDIOS Transferir 50 ml. de preparación de muestra para 90 ml de caldo tioglicolato 135 C o caldo BHI con extracto de levaduras pre-reducido o caldo carne cocida. Incubar a 30-35o C durante 48 hs. en ambiente anaerobio (excepto el BHI pre-reducido). A partir de los caldos en que se observase crecimiento sembrar en placas de agar para anaerobios, incubar a 35o C durante 48hs. en ambiente anaerobio. Aislar las colonias sospechosas en tubos con BHI pre-reducido o con los otros caldos. Incubar de la misma forma que antes. En los caldos que hubiera crecimiento llevar a cabo las siguientes pruebas:

- 1. Coloración de gran (bacilos gram positivos con morfología compatible con el género Clostridium)
- 2. Tipo respiratorio.
- 3. Termo resistencia. El tipo respiratorio se determina sembrando el crecimiento de cada tubo en 3 placas conteniendo agar para anaerobios. Incubar una placa en anaerobiosis en las condiciones ya descritas. Otra placa en microaerofilia y la restante en aerobiosis en las condiciones de temperatura y tiempo ya descritas. Se probará la termo resistencia sembrando 0.1 del crecimiento en los tubos de BHI pre reducido o caldo tioglicolato 135 C caldo carne cocida y calentando a 80o C durante 15 min. En seguida incubarlos en las condiciones ya descritas. Paralelamente, incubar un control positivo no sometido a la prueba de resistencia. Al cabo del periodo de incubación, observar el crecimiento de cada placa incubada a las diferentes condiciones y determinar o no presencia de microorganismos anaerobios en el producto. Si es positivo proceder a la coloración de gram y a la prueba de talasa. Hacer lo mismo con los ??? La piel se presenta con enrojecimiento intenso y difuso, en toda el área. Grado 4 - Eritema severo La piel se presenta roja oscura, con leve formación de escaras (da-o en profundidad).

1.2. FORMACION DE EDEMA

- Grado 0 - Ningoen edema El valor del Edema (Ed mm) es igual a 0 (cero).
- Grado 1 - Edema leve El valor del Edema (Ed mm) debe estar comprendido entre 0,25 mm y 0,49 mm
- Grado 2 - Edema moderado (çrea con bordes bien definidos con edema perceptible) El valor del Edema (Ed mm) debe estar comprendido entre 0,5 mm y 0,74 mm.
- Grado 3 - Edema definido El valor del Edema (Ed mm) debe estar comprendido entre 0,75 mm y 1mm.
- Grado 4 - Edema severo El valor del Edema (Ed mm) es mayor de 1 mm pudiendo a veces ser mayor que el área de exposición.

TABLA 2 Graduación microscópica de las alteraciones cutáneas determinadas por productos quealteran el color de la piel.

II.I Congestión

- Grado 0 - Normal. Los vasos del tejido cutáneo aparecen normales.
- Grado 1 - Discreta. Los vasos se muestran ligeramente turgentes en correspondencia con el aumento de flujo sanguíneo.
- Grado 2 - Intensa Excesivo flujo de sangre en los vasos.

II.2 Inflamación

- Grado 0 - Normal. No se percibe infiltración inflamatoria en los diversos planos del tejido cutáneo.
- Grado 1 - Discreto. La infiltración inflamatoria se caracteriza por un pequeño número de células inflamatorias (polimorfonucleares y/o mononucleares), dispersas, pudiendo ser observadas o no en los diferentes planos del tejido cutáneo.
- Grado 2 - Moderado. El infiltrado inflamatorio evidente (polimorfonucleares y/o mononucleares) podrá o no ser observado en varios planos de la piel.
- Grado 3 - Intensa. En este caso el número de células inflamatorias es de tal magnitud que a veces perjudica la visualización de las estructuras de la piel.

II.3 Edema

- Grado 0 - Normal. No se presenta líquido en los espacios intersticiales
- Grado 1 - Presencia. Acumulación de líquido en los espacios intersticiales.

1.2.10. Resultados

1.2.10.1. Cálculo del índice de irritación primaria

- Cálculo del índice de irritación primaria para productos que no alteran el color de la piel.
- Obtener una media aritmética de las siguientes observaciones:
 - Edema de piel íntegra 24 hs.
 - Edema de piel escoriada 24 hs.
 - Eritema de piel íntegra 24 hs.
 - Eritema de piel escoriada 24 hs.
 - Edema de piel íntegra 72 hs.
 - Edema de piel escoriada 72 hs.
 - Eritema de piel íntegra 72 hs.
 - Eritema de piel escoriada 72 hs.
- Obtener las sumatorias de esta 8 (ocho) medias aritméticas y dividir las por 4 (cuatro). El valor encontrado es el INDICE DE IRRITACION PRIMARIA CUTANEA DEL PRODUCTO.
- Cálculo del índice de irritación primaria cutánea para productos que alteran el color de la piel.
- Congestión en la piel íntegra y escoriada de los 3 (tres) animales en 24 hs.
- Inflamación en la piel íntegra y escoriada de los 3 (tres) animales en 24 hs.
- Edema en la piel íntegra y escoriada de los 3 (tres) animales en 24 hs.
- Congestión en la piel íntegra y escoriada de los 3 (tres) animales en 72 hs.
- Inflamación en piel íntegra y escoriada de los 3 (tres) animales en 72 hs.
- Edema en piel íntegra y escoriada de los 3 (tres) animales en 72 hs. Obtener la sumatoria de las 6 (seis) medias aritméticas y dividir las por 3. El valor encontrado es el INDICE DE IRRITACION CUTANEA PRIMARIA del producto.

1.2.10.2. Clasificación de irritante cutáneo primario.

Clasificación de irritante primario cutáneo para productos que no alteran el color de la piel. De acuerdo con el índice de irritación cutánea primaria obtenido, el producto puede ser clasificado en:

Valor del índice Clasificación

0 - 0.9 No irritante

1 - 1.9 Ligeramente irritante

2 - 4.9 Moderadamente irritante

Mayor de 5 Severamente irritante

Clasificación de irritante cutáneo primario para productos que alteran el color de la piel. De acuerdo con el índice de irritación primaria obtenido el producto puede ser clasificado en: Valor del índice Clasificación

0 - 0.59 No irritante

0.6 - 0.9 Ligeramente irritante

1.0 - 1.3 Moderadamente irritante

Mayor de 1.3 Severamente irritante OBSERVACIONES: En el caso que de pruebas realizadas con animales que fueron utilizados anteriormente en pruebas de irritación cutánea, no será válido el resultado positivo (producida irritante), debiendo ser repetida la prueba. Criterio de animal positivo. El animal será considerado positivo cuando presente una o más reacciones positivas citadas más adelante en cualquier periodo de la prueba. Las reacciones cutáneas son clasificadas dentro de un criterio positivo o negativo según:

	Reacción Negativa	Reacción Positiva
Eritema	0-1	Mayor de 2
Edema	0	Mayor de 1

1.2.10.3. CRITERIO DE PRODUCTO SATISFACTORIO

- Productos que no alteran el color de la piel

- Un producto probado es considerado como satisfactorio si su índice de irritación cutánea estuviera comprendido entre 0 (cero) y 0.9.

- Productos que alteran el color de la piel.

- Un producto testado es considerado como satisfactorio si su índice de irritación cutánea estuviera comprendido entre 0 (cero) y 0.59.

1.2.10.4. Duración de la prueba 5 días

1.2.10.5. Referencias Bibliográficas

1) Draize J.H. (1965) Dermal Toxicity Appraisal of the Safe Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics.pp. 46-59, The Association of Food and Drug Officials of the United States, Topeka, Kansas.

2) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranas.J.Pharmacol. Exp. Ther. 63, 377-390.

2. IRRITACION CUTANEA ACUMULATIVA

2.1. Objetivo La presente técnica presenta un análisis del potencial de irritación cutánea después de la aplicación repetida de la sustancia a ser ensayada.

2.2. Material y Métodos

2.2.1. Equipamientos Seguir como lo descrito en el ítem 1.2.1. para el ensayo de "irritación primaria cutánea".

2.2.2. Soluciones Seguir como lo descrito en el ítem 1.2.2. para el ensayo de "irritación primaria cutánea".

2.2.3. Animales Seguir como lo descrito en el ítem 1.2.3. para ensayo de "irritación primaria cutánea".

2.2.4. Selección de los animales Seguir como lo descrito en el ítem 1.2.4. para el ensayo de "irritación primaria cutánea".

2.2.5. Preparación de los animales Seguir como lo descrito en el ítem 1.2.5. para el ensayo de "irritación primaria cutánea".

2.2.6. Preparación de la muestra Seguir como lo descrito en el ítem 1.2.6. el ensayo de "irritación primaria cutánea".

2.2.7. Aplicación del producto Seguir con lo descrito en el ítem 1.1.7. del ensayo de irritación primaria cutánea.

Aplicar el producto sobre las dos áreas peladas previamente (áreas 1 y 2 - fig. I) en tanto que las 2 áreas interiores (áreas 3 y 4 - fig. I) servirán como controles. La aplicación del producto debería ser hecha durante 10 días consecutivos. Durante ese período el escarificado de las áreas peladas debe ser alternado y el rasurado de los animales debe ser hecho todos los viernes.

2.2.8. Colocación del parche "oclusivo". Seguir conforme a lo descrito en el ítem 1.2.8. para "Irritación primaria cutánea" para cada día de aplicación.

2.2.9. Lectura y graduación de las reacciones cutáneas. Las lecturas deberán ser hechas 24 a 72 hs. después de la última aplicación siguiendo las tablas de graduación de las lesiones descritas en los ítems 1.2.9. y 1.2.10. para "Irritación primaria cutánea". 2.3. Bibliografía - Draize J.H. Dermal Toxicity Food Drug Cosmetic Law Journal 10. 722-(1955) - Somers, G.F. Testing drugs for Dermal Toxicity, J.Soc.Cosmetic Chemists 15: 385-404- (1964) - Protocolo de irritación primaria cutánea. Departamento de Farmacología e Toxicología - INCQSIFIOCRUZ. - Protocolo de Irritación Primaria cutánea. Departamento de Farmacología del INFYB.

3. SENSIBILIZACIÓN POR APLICACIÓN TÍPICA ESTUDIO PRELIMINAR: Este test no debe ser realizado si existen alteraciones de la piel en el test de Irritación Primaria Dérmica.

3.1. OBJETIVO La presente técnica evalúa el potencial de sensibilización de los materiales en estudio.

3.2. MATERIALES Y REACTIVOS

3.2.1. Materiales

Parches de 6 cm² de las materias primas a utilizar y del producto terminado en el ensayo, embebidos en solución fisiológica a saturación.

- Solución Fisiológica Estéril.
- Vehículo oleoso: adyuvante completo de Freund (F.C.A.)
- Agujas hipodérmicas.
- Gasa estéril
- Plástico adhesivo impermeable.
- Cinta adhesiva Hipoalergénica.
- Esparadrapo.

3.2.2. Soluciones

- Solución isotónica de cloruro de sodio estéril.
- Adyuvante de Freund completo diluido al 50% con Solución isotónica de Cloruro de Sodio estéril y homogeneizado.

3.2.3. ANIMALES 20 cobayas albinos (10 hembras y 10 machos, peso al comienzo de la experiencia 300-400 grs.). La mitad de los cuales serán destinados a control.

3.3. EJECUCION DEL ENSAYO

3.3.1. FASE DE INDUCCIÓN

3.3.1.1. Preparación de la solución a inyectar al grupo tratado y al grupo control: 0,1 ml de adyuvante de Freund completo (FCA) diluido al 50% solución salina isotónica estéril. **3.3.1.2.** Rasurar la región dorsal de los cobayos en una superficie de alrededor de 9 cm².

3.3.1.3. Aplicación tópica de la sustancia usando los parches oclusivos y dos inyecciones intradérmicas del adyuvante de Freund completo diluido. Para el grupo control se realiza el mismo procedimiento, pero en lugar de aplicar, la materia prima embebida en solución fisiológica estéril, se aplicará en 10 animales gasa embebida en solución fisiológica estéril. El día lunes de cada semana se rasura la región a tratar, el día 1ero. y 10mo. los cobayos reciben una inyección intradérmica de adyuvante de Freund completo diluido, los dos sitios de la inyección deben estar tan cerca como sea posible del área aplicada. La sustancia de prueba se aplica tres veces por semana con 2 días de intervalo durante 3 semanas y una al comienzo de la 4ta. semana. El sitio de aplicación debe ser justo encima del sitio de inyección. El parche se retira cada 48 hs. El último parche (décimo) se retira el día 24to., luego de 48 hs. de contacto con la piel.

3.3.1.4. SUSPENSIÓN DEL TRATAMIENTO El tratamiento es suspendido desde el día 24to. al 35to. inclusive (por

un período de 12 días). Este es el tiempo necesario para que el organismo produzca la respuesta inmunológica

3. 3.2. FASE DESENCADENANTE El día 36to. los cobayos son rasurados, en la región del abdomen (flanco izquierdo): sin tratamiento previo, se coloca un parche oclusivo con la sustancia de prueba y se deja durante 48 hs. El día 38vo. se retira.

3. 4. EVALUACION Las lecturas se realizan en el sitio desencadenante a las 1, 6, 24 y 48 hs. luego de retirado el parche oclusivo, de acuerdo con la escala descrita en el ensayo de irritación dérmica primaria. Debe realizarse examen histológico de la piel cuando denota una lesión en forma macroscópica cuando la reacción sea dudosa.

3.4.1. EXPRESION DE RESULTADOS El examen macroscópico e histológico debe ser realizado en forma ciega. El resultado es POSITIVO cuando uno o más animales muestran una reacción macroscópica confirmada histológicamente como reacción de sensibilización. El resultado es NEGATIVO cuando ningøen animal muestra evidencia de reacción macroscópica. El resultado es DUDOSO cuando hay evidencia de reacción macroscópica no confirmada histológicamente. Los absorbentes descartables y sus materiales constitutivos deben dar negativo el test de sensibilización.

3.5 REFERENCIA BIBLIOGRAFICA Método de Magnussen y Kligman modificado segøen J. M. Faccini y J. P. Guillot. *Animals and alteratives in toxicity* Academic Press 1983.

4. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD "IN VITRO"

4.1. INSTRUMENTAL Y REACTIVOS

- a) Estufa a 37o C.
- b) Cámara Húmeda conteniendo CO₂ al 5%.
- c) Microscopio con Faz invertida.
- d) Célula ATCC, CCLI. NCTC y CLON 929 de Fibroblastos de ratón u otras líneas celulares sensibles al ensayo.
- e) Agar
- f) Colorante vital: rojo neutro
- g) Medio de cultivo: EAGLE (M.E.M.), ph = 7.3 < /
- h) Frasco de cultivo de plástico neutro de 25 cm².
- i) Placas de Petri.
- j) Pipetas
- k) PBS -Solución Tampón de Fosfato (ph = NEUTRO) <
- l) Pinza estéril

4.2. TAMAÑO DE LA MUESTRA 1 cm² ó 100 mg. de peso.

4.2.1. Ejecución del ensayo Colocar el cultivo de células en cámar hømeda con CO₂ al 5%, inoculando 5 ml de una 3 suspensión celular, con una concentración de 130 x 10 ml, en medio EAGLE e incubar a 37o C por 48 horas.

4.2.2. Descartar el medio, con pipeta estéril y en seguida lavar con Solución Tampón de Fosfato+.

4.2.3. Adicionar 4 ml de AGAR pre-calentado en placa de Petri con colorante vital.

4.2.4. Colocar la muestra con pinza estéril sobre la zona central, de la placa e incubar nuevamente a 37o C.

4.2.5. Retirar la muestra, después de 24 hs. y anotar o marcar, el área de inhibición.

4.2.6. Observar el microscopio de Faz invertida.

4.2.7. Resultados: Observar el índice de Zona (I. Z.). sea el área no coloreada, y el índice de LISIS (I. L.) que indica el porcentaje de células degeneradas. Ambos índices, nos dan el índice de respuesta (I. R.) conforme a la siguiente relación: $IR = IZ/IL$ tubos sometidos a la prueba de termo resistencia. si hubiera evidencia de crecimiento, investigar la presencia de esporos por el método de coloración Gram. 5.12. <

INVESTIGACIÓN DE CLOSTRIDIUM SULFITO REDUCTORES EN 5g DE MUESTRA Se siembran 5 ml de la dilución 1:10 de la muestra en 50 ml de caldo tioglicolato doble concentración adicionado de N3Na 0,02%, previamente

calentando a 100o C durante 10 min. enfriando. Se cubre con parafina estéril y se incuba durante 48 hs. a 35o C. Se colocan porciones de 0,1 ml de este cultivo en tubos estériles. Luego se cubre con Agar fundido y enfriado a 40o C. Se cubre con parafina y se incuba durante no menos de 3 días a 37o C. El desarrollo de colonias negras indica que la prueba es positiva.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS 1. Microbiological Test- Microbial Limit Tests -USP XXI. 2. Manual Análisis Microbiológicas de Cosméticos de INCOS-fiocruz- Aerosol o Cosméticos -Jan/Fav 89 3. Farmacopeia Brasileira - 4ta. ed.