

NMX-BB-040-SCFI-1999

**MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS - DETERMINACIÓN DE
LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS
GERMICIDAS**

**GENERAL METHODS FOR ANALYSIS - ANTIMICROBIAL
ACTIVITY DETERMINATION TO GERMICIDAL
PRODUCTS**



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

PREFACIO

En la elaboración de la presente norma mexicana participaron las siguientes empresas e instituciones:

- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACIÓN
- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA
Sección PAPS.
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE INSUMOS PARA LA SALUD
- INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO
Departamento de Control de Calidad.
- INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Unidad de Control Técnico de Insumos.- Área de Materiales Diversos.
- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.- Departamento de Farmacia.
- PROCURADURÍA FEDERAL DEL CONSUMIDOR
- SECRETARÍA DE SALUD
Dirección General de Insumos para la Salud.- Subdirección de Farmacopea, Farmacovigilancia y Normas.
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS - DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS GERMICIDAS

GENERAL METHODS FOR ANALYSIS - ANTIMICROBIAL ACTIVITY DETERMINATION TO GERMICIDAL PRODUCTS

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

1.1 Objetivo

Esta norma mexicana establece el método de prueba para determinar la actividad antimicrobiana.

1.2 Campo de aplicación

Esta norma mexicana es aplicable a los productos germicidas, siempre y cuando la norma específica del producto así lo indique.

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de la presente norma se debe consultar la siguiente norma oficial mexicana y normas mexicanas vigentes o las que las sustituyan:

NOM-092-SSA1-1994 Bienes y servicios, método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 12 de diciembre de 1995.

NMX-Z-012/1-1987 Muestreo para la inspección por atributos - Parte 1: Información general y aplicaciones. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de octubre de 1987.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-BB-040-SCFI-1999

2/9

NMX-Z-012/2-1987

Muestreo para la inspección por atributos - Parte 2: Métodos de muestreo, tablas y gráficas. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de octubre de 1987.

NMX-Z-012/3-1987

Muestreo para la inspección por atributos - Parte 3: Regla de cálculo para determinación de planes de muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 31 de julio de 1987.

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma se establecen las siguientes definiciones:

3.1 Actividad antimicrobiana

Propiedad que tiene una substancia de inhibir o matar a los microorganismos.

3.2 Germicidas

Productos químicos que destruyen una amplia gama de microorganismos sobre superficies o tejidos.

3.3 UFC

Unidad formadora de colonia, presuponiendo que cada célula da lugar al desarrollo de una colonia.

4 SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Para los propósitos de esta norma se establecen los siguientes símbolos y abreviaturas:

| | |
|----|--------------------------------------|
| M | molaridad de una solución; |
| N | normalidad de una solución; |
| K | grados absolutos o grados Kelvin; |
| °C | grados centígrados o grados Celcius; |
| mL | mililitros; |
| L | litro; |
| g | gramos; |
| pH | concentración de iones hidrógeno; |
| mm | milímetros; |



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-BB-040-SCFI-1999

3/9

| | |
|--------|--|
| h | horas; |
| % | por ciento; |
| S | células sobrevivientes; |
| CV | cuenta viable inicial; |
| UFC/mL | unidades formadoras de colonias por mililitro; |
| ATCC | |
| MGA | método general de análisis de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. |

5 MUESTREO

5.1 Inspección de recepción

Para verificar la actividad antimicrobiana de un producto germicida el muestreo debe realizarse de acuerdo a lo especificado en las normas mexicanas NMX-Z-012/1, NMX-Z-012/2 y NMX-Z-012/3 (ver 2 Referencias).

5.2 Selección de la muestra

Para el análisis de laboratorio y retención de muestra, seleccionar al azar una submuestra representativa del producto a analizar, de un mismo proveedor y número de lote.

6 FUNDAMENTO

Para la determinación de la actividad antimicrobiana, se establece un solo método, éste se basa en determinar el porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos, cuando se ponen en contacto con un germicida, bajo condiciones de prueba específicas.

7 REACTIVOS

Los disolventes y reactivos deben ser grado reactivo, a menos que se indique otra pureza, así como el agua empleada debe ser recientemente destilada, a menos que se indique otra pureza.

Las soluciones volumétricas deben prepararse de acuerdo a lo indicado en el MGA 0851 soluciones volumétricas de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (ver 13 Apéndice normativo).



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

- Agar nutritivo;
- Agar para método estándar;
- Agar para método estándar con neutralizante ;
- Azolecitina (lecitina de soya);
- Fosfato monobásico de potasio;
- Medios de cultivo;
- Medios de cultivo, reactivos, soluciones y microorganismos;
- Polisorbato 80;
- Solución amortiguadora de fosfatos 0,25 M;
- Solución neutralizante concentrada;
- Solución volumétrica de ácido clorhídrico 1 N, y
- Solución volumétrica de hidróxido de sodio 1 N.

7.1 Preparación de las soluciones

- Solución amortiguadora de fosfatos 0,25 M

En un matraz volumétrico de 1 000 mL, disolver 34 g de fosfato monobásico de potasio en 500 mL de agua, ajustar el pH entre 7,1 y 7,3 con la solución de hidróxido de sodio, aforar con agua, mezclar y distribuir en porciones de 100 mL.

Esterilizar en autoclave a 394 K (121°C) durante 15 min, dejar enfriar y conservar en refrigeración.

- Solución amortiguadora de fosfatos diluída

Colocar 1,25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0,25 M en un matraz volumétrico de 1 L y llevar a volumen con agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 mL y 99 mL, en tubos y matraces, respectivamente, esterilizar en autoclave a 394 K (121° C) durante 15 min.

- Solución neutralizante concentrada

Mezclar 40 g de azolecitina, con 280 mL de polisorbato 80 mL y 1,25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos, diluir con agua hasta obtener un volumen final de un 1 L; ajustar el pH a 7,2 con la solución volumétrica de hidróxido de sodio o la solución volumétrica de ácido clorhídrico, distribuir en porciones de 100 mL. Esterilizar en autoclave a 394 K (121°C) durante 20 min.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

- Solución neutralizante diluida

Mezclar 100 mL de la solución neutralizante concentrada con 25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0,25 M, adicionar 1 675 mL de agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 mL en tubos con rosca de 20 mm x 150 mm. Esterilizar en autoclave a 394 K (121°C) durante 20 min.

7.2 Preparación de los medios de cultivo

Preparar y esterilizar los medios de cultivo de acuerdo a las instrucciones marcadas por el fabricante en la etiqueta del producto. Para el caso del medio de cultivo agar para método estándar con neutralizante, antes de esterilizar, adicionar a un litro del medio de cultivo agar para método estándar, 25 mL de la solución neutralizante concentrada.

7.2.1 Caldo neutralizante

Mezclar los componentes que se indican en la tabla 1, calentar hasta disolución, ajustar el pH a 7,2, distribuir y esterilizar en el autoclave a 394 K (121°C) durante 15 min.

TABLA 1.- Componentes del caldo neutralizante

| | |
|------------------------|--------|
| Triptona | 5,0 g |
| Extracto de levadura | 2,5 g |
| Dextrosa | 10,0 g |
| Tioglicolato de sodio | 1,0 g |
| Tiosulfato de sodio | 6,0 g |
| Bisulfito de sodio | 2,5 g |
| Polisorbato 80 | 5,0 g |
| Lecitina de soya | 7,0 g |
| Púrpura de bromocresol | 0,02 g |
| Agua destilada | 1 L |

7.3 Microorganismos de prueba

| | | |
|------------------------------|---------|--------|
| Staphylococcus aureus | A T C C | 6 538 |
| Escherichia coli | A T C C | 11 229 |



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

8 APARATOS

- Espectrofotómetro de luz visible y
- El usual de laboratorio de microbiología.

NOTA- El material de vidrio utilizado debe ser vidrio borosilicato de bajo coeficiente de expansión térmica, el que entre en contacto con la muestra, debe ser estéril.

9 PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

9.1 Conservación de los microorganismos de prueba

Conservar las cepas de microorganismos resembrándolas semanalmente en tubos con medio de cultivo inclinado (7 mL de agar nutritivo), de 16 mm x 125 mm, incubados de 20 h a 24 h a una temperatura de 308 K a 310 K (35°C a 37°C) y mantenerlos posteriormente en refrigeración.

9.2 Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba

Antes de realizar la prueba, efectuar dos resiembras de cada uno de los microorganismos de prueba e incubar de 20 h a 24 h a una temperatura de 308 K a 310 K (35°C a 37°C).

A partir de estos cultivos, resembrar cada uno de los microorganismos de prueba, en tubos de 22 mm x 175 mm que contengan cada uno 12 mL de agar nutritivo inclinado e incubar en las condiciones señaladas.

Remover el crecimiento de cada tubo, con 3 mL de solución salina, transferir el sobrenadante a un tubo de ensayo estéril y continuar diluyendo con la misma solución hasta obtener una suspensión que leída a una longitud de onda de 580 nm, dé una lectura entre 3 % y 5 % de transmitancia.

Determinar en la suspensión el número de UFC / mL y precisar el por ciento de transmisión de una suspensión que contenga de 75 a 125 X 10⁸ UFC / mL. Lo anterior se verifica de acuerdo a lo indicado en la norma oficial mexicana NOM-092-SSA1 (ver 2 Referencias) y considerar estos valores para análisis futuros.

9.3 Determinación de la cuenta viable inicial

A un matraz Erlenmeyer que contenga 99 mL de la solución amortiguadora de fosfatos diluida estéril, transferir 1 mL de la suspensión de los microorganismos de prueba y efectuar las diluciones decimales necesarias para obtener placas que contengan cada una entre 25 y 250 colonias.



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

Colocar en cajas de petri estériles, por duplicado 1 mL de cada dilución, agregar a cada placa de 15 mL a 18 mL de agar para métodos estándar, homogeneizar y dejar solidificar invertir las cajas de petri e incubar durante 48 h a 303 K - 308 K (30°C - 35°C). Contar las colonias contenidas en cada una de las cajas, en un cuenta colonias.

10 PROCEDIMIENTO

- 10.1 Determinación de las células sobrevivientes
- 10.2 Preparación de la muestra
- 10.3 Inoculación de la muestra

Si es necesario, efectuar la dilución pertinente con agua para llevar el producto a la concentración de uso indicada por el fabricante en la etiqueta del envase.

Para cada uno de los microorganismos de prueba, medir exactamente y por duplicado 99 mL del producto o su dilución, transferir a matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de rosca estériles.

Agitar los matraces, suspender la agitación, justamente antes de la inoculación, para que en el momento de la misma, aún exista movimiento residual del líquido y así facilitar la incorporación del inóculo. Inocular en forma individual cada matraz con cada uno de los microorganismos de prueba en el centro de la superficie del líquido, evitando tocar con la pipeta, el cuello o las paredes del matraz.

Agitar el matraz con la muestra inoculada y exactamente 30 s después de la inoculación, transferir 1 mL de la misma, a un tubo de ensayo contenido 9 mL de la solución neutralizante diluida o del caldo neutralizante, mezclar y transferir por duplicado alícuotas de 1,0 mL a cajas de petri estériles y continuar diluyendo hasta tener las diluciones necesarias para obtener placas que contengan de 25 a 250 colonias, agregar a cada placa de 15 mL a 18 mL del medio agar para métodos estándar con neutralizante, homogeneizar, permitir que solidifique, invertir las placas e incubar durante 48 h entre 308 K a 310 K (35°C a 37°C). Después del período de incubación, contar el número de UFC en las placas.

11 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

- 11.1 Determinación del % de reducción

Promediar los resultados de las placas de la cuenta viable inicial y de las células sobrevivientes y calcular el % de reducción mediante la siguiente fórmula:



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-BB-040-SCFI-1999

8/9

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{S \times 100}{C.V.}$$

donde:

S son las células sobrevivientes UFC / mL, y
C.V. es la cuenta viable inicial.

Informar el porcentaje de reducción obtenido en la muestra del producto.

11.2 Interpretación de resultados

Un producto etiquetado como germicida, debe tener un por ciento de reducción de la cuenta viable de 99,999 % en 30 s de contacto a la concentración de uso recomendada, cuando la cuenta viable inicial se encuentra entre 75 y 125×10^8 UFC / mL.

12 INFORME DE LA PRUEBA

El informe de la prueba debe incluir lo siguiente:

- Referencia a esta norma;
- Resultado de la prueba;
- Cualquier incidente que pueda influir el resultado de la prueba;
- Fecha de la prueba, y
- Nombre del analista.

13 APÉNDICE NORMATIVO

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Sexta edición 1994, pp 253 - 264, MGA 0851 Soluciones Volumétricas.



SECRETARIA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-BB-040-SCFI-1999
9/9

14 BIBLIOGRAFÍA

NOM-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medida. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de octubre de 1993.

Official Methods of Analysis, 16 Ed. Association of Official Analítica Chemists, Washington, USA, Vol. I, pp 9-11, 1997.

15 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana no equivale a ninguna norma internacional por no existir referencia alguna al momento de su elaboración.

MÉXICO D.F. A,

LA DIRECTORA GENERAL DE NORMAS

CARMEN QUINTANILLA MADERO

JADS/LFVO/DLR/LLE/mrq.