



NORMA MEXICANA

NMX-W-163-SCFI-2013

**PRODUCTOS DE COBRE Y SUS ALEACIONES –
CARACTERÍSTICAS ANTIMICROBIANAS –
ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA**

**COPPER AND COPPER ALLOY PRODUCTS - ANTIMICROBIAL
CHARACTERISTICS - SPECIFICATIONS AND TEST METHODS**



NMX-W-163-SCFI-2013

PREFACIO

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

- CENTRO DE NORMALIZACIÓN Y CERTIFICACIÓN DE PRODUCTOS, A.C.
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE PRODUCTOS DE COBRE Y SUS ALEACIONES
- CONTROL QUÍMICO NOVAMANN INTERNACIONAL, S.A. DE C.V.
- IUSA S.A. DE C.V. - DIVISIÓN TUBOS
- IUSA S.A. DE C.V. - CONEXIONES Y VÁLVULAS
- IUSA S.A. DE C.V. - COBRE Y ALEACIONES
- INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL - COORDINACIÓN DE CONTROL TÉCNICO DE INSUMOS
- NACIONAL DE COBRE S.A. DE C.V. PLANTA VALLEJO
- NACIONAL DE COBRE S.A. DE C.V. PLANTA CUPRO SAN LUIS
- NACIONAL DE COBRE S.A. DE C.V. PLANTA COBRECCEL CELAYA
- PROCOBRE, CENTRO MEXICANO DE PROMOCIÓN DEL COBRE A.C.



ÍNDICE DEL CONTENIDO

Número de Capítulo		Página
0	INTRODUCCIÓN	1
1	OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN	1
2	REFERENCIAS	2
3	DEFINICIONES	2
4	SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	3
5	CLASIFICACIÓN	4
6	ESPECIFICACIONES	4
7	MATERIA PRIMA	5
8	MUESTREO	6
9	MÉTODO DE PRUEBA	6
10	ETIQUETADO	14
	APÉNDICE NORMATIVO A Preparación de soluciones y medios de cultivo	15
	APÉNDICE NORMATIVO B Preparación de los inóculos	16
11	BIBLIOGRAFÍA	16
12	CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES	17



NORMA MEXICANA

NMX-W-163-SCFI-2013

PRODUCTOS DE COBRE Y SUS ALEACIONES – CARACTERÍSTICAS ANTIMICROBIANAS – ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE ENSAYO

**COPPER AND COPPER ALLOY PRODUCTS - ANTIMICROBIAL
CHARACTERISTICS - SPECIFICATIONS AND TEST METHODS**

0 INTRODUCCIÓN

La presencia de microorganismos en la calefacción, ventilación y sistemas de aire acondicionado (HVAC) que se cree representa el 60 % de todas las situaciones de "edificios enfermos", así como las infecciones nosocomiales, ha generado preocupación por la exposición a microorganismos y una inmensa necesidad de mejorar las condiciones higiénicas de tales sistemas y edificios públicos en general, por lo cual se hace necesario desarrollar un proyecto de norma mexicana en la cual se establezca la eficacia de superficies de cobre y sus aleaciones como sanitizante.

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

La presente norma mexicana establece las especificaciones y método de ensayo que deben cumplir los productos de cobre y sus aleaciones para determinar la eficacia de estas superficies como sanitizante, usando organismos de prueba.

La Dirección General de Normas de la Secretaría de Economía aprobó la presente norma, cuya declaratoria de vigencia fue publicada en el Diario Oficial de la Federación el: jueves 16 de enero de 2014.



Esta norma mexicana es aplicable a los productos de fabricación nacional o extranjera que se comercialicen en territorio nacional, ya sea como materia prima o como producto terminado.

2 REFERENCIAS

Esta norma mexicana no se complementa ni requiere para su correcta aplicación de ninguna otra norma mexicana vigente.

3 DEFINICIONES

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

3.1 Aleación de cobre:

Sustancia con propiedades metálicas compuesta de dos o más elementos donde el elemento principal es cobre.

3.2 Cepa:

Es una variante genotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.

3.3 Cultivo:

Es un método en el que se prepara un medio óptimo para la multiplicación de microorganismos.

3.4 Cupón:

Es una muestra representativa del material a evaluar de dimensiones y características definidas.

3.5 Eficacia:

Capacidad de lograr el efecto que se desea o se espera.



3.6 Inoculo:

Materia celular utilizada para indicar un cultivo microbiano.

3.7 Membrana celular:

Es la barrera que separa el interior celular del medio externo.

3.8 Microorganismo:

Organismo microscópico constituido por una sola célula o varias

3.9 Sanitizante:

Material o sustancia que tiene la capacidad de reducir por lo menos un 99.9 % de una población de microorganismos.

3.10 Propiedad antimicrobiana:

Propiedad que tiene una sustancia de inhibir o matar microorganismos.

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;
h	horas;
%	por ciento;
S	células sobrevivientes;
CV	cuenta viable inicial;
UFC/mL	unidades formadoras de colonias por mililitro;
ATCC	colección de cultivos tipo americanos (American Type Culture Collection), y
MGA	método general de análisis de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

5 CLASIFICACIÓN

Los productos se clasifican por su forma en:

- 5.1 Lámina o placa.
- 5.2 Producto terminado en superficies de contacto (por ejemplo: barra, tubo, alambre, perfiles, etc.).

6 ESPECIFICACIONES

Para cuantificar la eficacia de sanitización del cobre y de sus aleaciones, los cupones de un área específica se ponen en contacto con diferentes microorganismos (uno a la vez) indicados en la tabla 1 durante un periodo definido de tiempo. Después del periodo de contacto, se suspenden los microorganismos que quedaron vivos con la finalidad de crear un inóculo que será sembrado, empleando la técnica de cuenta en placa para cuantificar para los microorganismos sobrevivientes en la placa de cobre.

TABLA 1. Organismos de prueba

Staphylococcus aureus ATCC 6538
Enterobacter aerogenes ATCC 13048
Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442
Staphylococcus aureus Resistente a la Meticilina (MRSA) ATCC 33592
Pseudomonas aeruginosa multiresistente

NOTA 1: Cada vez que se adquiere una cepa es necesario realizar pruebas bioquímicas, morfológicas (macro y microscópicas).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación que marca la técnica se cuantifican los microorganismos que sobrevivieron al contacto con los cupones de cobre y sus aleaciones. Se compara matemáticamente utilizando un control, que es un cupón de acero inoxidable, inoculado con el mismo microorganismo.

El cobre y sus aleaciones indicadas en esta norma mexicana en la forma en que se presente deben de alcanzar un 99.9 % de reducción en el número de organismos en la prueba, cuando se ensayan de acuerdo con el procedimiento descrito en el punto 8.1 de esta norma mexicana.

7 MATERIA PRIMA

7.1 Las aleaciones que presentan eficacia antimicrobiana contienen al menos el 60 % de cobre.

La verificación del contenido de cobre será a través del certificado de calidad emitido por el fabricante.

7.2 Las especificaciones del contenido máximo de impurezas en el producto se indican en la tabla 2.

TABLA 2. Contenido máximo de impurezas

Elemento	Contenido Máximo ppm (mg/kg)
Sb	60 (0.006)
As	25 (0.0025)
Ba	1000 (0.1)
Cd	75 (0.0075)
Cr	60 (0.006)
Pb	500 (0.05)
Hg	60 (0.006)
Se	500 (0.05)

La verificación del cumplimiento de las especificaciones del contenido de impurezas se realiza con base a los registros que tenga el fabricante del producto.

8 MUESTREO

Para verificar la calidad de los productos objeto de esta norma debe utilizarse el plan de muestreo de acuerdo con el plan de inspección del fabricante, y para efectos de evaluación de la conformidad se debe utilizar el plan de muestreo establecido por el organismo de certificación acreditado o la dependencia competente.

9 MÉTODO DE PRUEBA

9.1 Eficacia de la actividad antimicrobiana de superficies de aleaciones de cobre.

9.1.1 Principio

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se establece este método el cual se basa en determinar el porcentaje de reducción de una población de



microorganismos, cuando se ponen en contacto en superficies de cobre y sus aleaciones, bajo condiciones de prueba específicas.

9.1.2 Material, equipo y reactivos

El equipo debe ser calibrado, verificado y calificado para efectos de este proyecto de norma mexicana.

Los reactivos deberán ser de grado analítico a menos que se indique otra pureza.

- Agua desionizada;
- Alcohol Etílico al 70 %;
- Suero Bovino estéril;
- Tiosulfato de Sodio;
- Triton X-100;
- Medios de cultivo:
 - a. Caldo soya tripticaseina
 - b. Agar soya tripticaseina
- Asas de 4 mm de diámetro interno, de plástico estéril y desechable ó de alambre de platino ó aleación de platino;
- Cajas petri, de 90 mm x 15 mm de plástico estériles;
- Espátulas de acero inoxidable;
- Frascos de vidrio con tapa no tóxica;
- Gradillas para tubos de ensaye;
- Matraces volumétricos de 100 mL, 500 mL y 1000 mL;
- Mechero Fisher;



- Papel filtro;
- Pinzas de disección;
- Pipetas o dispensadores calibrados;
- Probetas de 100 mL y 500 mL;
- Tubos de ensaye con tapón de baquelita con capacidad de 18 mm x 150 mm y 20 mm x 150 mm;
- Vasos de precipitado de 100 mL, 500 mL y 1000 mL

9.1.3 Aparatos y/o instrumentos

Los aparatos y/o instrumentos siguientes deben ser calibrados, cuando corresponda.

- Autoclave capaz de llegar a 121 °C;
- Balanza;
- Baño de ultrasonido;
- Contador de colonias;
- Cronómetro calibrado de laboratorio;
- Incubadora con capacidad de control de temperaturas de 35 °C ± 2 °C;
- Incubadora con capacidad de control de temperatura de 25 a 30 °C ± 2 °C;
- Micropipeta;
- Potenciómetro;
- Vernier;
- Vortex;



NOTA 2: En el método de ensayo se indicarán las condiciones de presión.

9.1.4 Piezas de prueba

Para cada prueba de eficacia del cobre y sus aleaciones se requieren:

- a) 3 cupones de acero inoxidable de 2.54 cm². Estos se utilizarán como controles de referencia de la prueba.
- b) 5 cupones de la aleación de cobre por probar de 2.54 cm². Estos cupones se utilizarán para el desarrollo de la prueba.

9.1.5 Procedimiento

9.1.5.1 Preparación de las piezas metálicas (cupones)

9.1.5.1.1 Limpiar los cupones metálicos sumergiéndolos en alcohol etílico al 70 %; enjuagar con agua desionizada y dejar secar a temperatura ambiente.

Para remover películas formadas en la aleación por causa de los aceites de producción que el alcohol no pueda remover, se utiliza el siguiente procedimiento:

- a. Preparar una solución de entre 3 % a 4 % de NaOH (hidróxido de sodio).
- b. Calentarla a 71.11 °C (160 F)
- c. Sumergir la muestra en la solución de hidróxido de sodio calentada entre 30 segundos y 120 segundos. Entre menos tiempo mejor.
- d. Enjuague con agua destilada. Se puede formar una película marrón.
- e. Preparar una solución de 5 % a 10 % de H₂SO₄ (ácido sulfúrico).



- f. Sumerja la muestra en la solución de ácido sulfúrico de entre 5 segundos a 30 segundos para remover la película café. Entre menos sea el tiempo mejor.
- g. Enjuague con agua destilada.

9.1.5.1.2 Poner cada cupón entre dos piezas de papel filtro y depositarlos en un frasco de vidrio con tapa. Esterilizar en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 20 min.

9.1.5.1.3 Después de la esterilización colocar los cupones en una caja petri estéril, utilizando pinzas estériles para esta operación.

9.1.5.2 Preparación del inóculo

9.1.5.2.1 Para el cultivo primario: Utilizar un asa estéril de 4 mm de diámetro interno, tomar una asada de la cepa, depositar en un tubo que contengan 10 mL de Caldo Soya Trypticaseína (CST) e incubar de 35 ° a 37 °C por 24 h ± 2 h.

9.1.5.2.2 Repetir el paso anterior por 2 días consecutivos más (en total deben ser tres transferencias una por día, previo a que el cultivo pueda ser usado como inóculo). La última transferencia se debe incubar durante 48 h bajo las mismas condiciones de temperatura (véase Apéndice Normativo B).

9.1.5.2.3 Mezclar perfectamente el inóculo obtenido en la última resiembra en un vortex. Permita sedimentar durante 15 min.

9.1.5.2.4 Aspirar las dos terceras partes superiores del volumen del tubo con una pipeta Pasteur estéril, transferir el volumen recolectado a un tubo vacío estéril, este se utilizara para formar el inóculo requerido en la prueba. La parte restante deséchela.

9.1.5.2.5 Mezclar 4.7 mL de inóculo obtenido del punto anterior con 0.25 mL de Suero Bovino y 0.05 mL de Triton X-100 (I-SB-TX).

NOTA 3: A excepción del inóculo primario, ningún inóculo puede ser utilizado después de 15 días.



- 9.1.5.3 Inoculación de los cupones metálicos.
 - 9.1.5.3.1 Inocular cada superficie metálica estéril con 0.02 mL del inóculo (I-SB-TX) usando una micropipeta.
 - 9.1.5.3.2 Distribuir el inóculo (I-SB-TX) con movimientos oscilatorios suaves, cuidando de no rebasar un límite máximo de 3 mm antes de llegar a cada orilla ($\frac{1}{8}$ del tamaño del cupón) y enumere cada uno de ellos en el orden en que fueron inoculados.
 - 9.1.5.3.3 Ajuste las tapas de tal manera que estén ligeramente entreabiertas.
 - 9.1.5.3.4 Dejar secar los cupones en condiciones estériles, a temperatura ambiente de 20 min – 40 min. El tiempo de exposición comienza inmediatamente después del secado de los cupones y deberán ser 120 min, contados con cronómetro.
- 9.1.5.4 Desprendimiento del inóculo
 - 9.1.5.4.1 Pasado el tiempo de exposición, transferir los cupones metálicos a frascos estériles con tapa que contengan 20 mL de la solución neutralizadora (véase Apéndice Normativo A). Marcar cada frasco con el número que corresponde al del cupón que fue tomado.
 - 9.1.5.4.2 Sonicar a potencia baja (sólo se requiere para desprender el inóculo I-SB-TX de la placa), en intervalos de tiempo de 5 segundos en modo "encendido" y 10 segundos en modo "apagado" durante 1 min.
 - 9.1.5.4.3 Dejar reposar cada recipiente por 5 min para suspender bacterias sobrevivientes de los cupones en la solución neutralizante, transferir la suspensión a un tubo para poder homogenizar en vortex.
- 9.1.5.5 Cuantificación de microorganismos
 - 9.1.5.5.1 Prepare una serie de tubos que contengan solución amortiguadora diluida estéril, para realizar diluciones de 10^{-1} a 10^{-4} de la suspensión de cada frasco. Una vez preparado el número de diluciones requeridas, coloque un mililitro de cada una de ellas en cajas petri previamente marcadas, por duplicado.



- 9.1.5.5.2** Agregue en cada caja petri de 15 ml a 17 ml de Agar Soya Trypticaseina (AST), atemperado a $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ y mezcle el inóculo mediante 6 movimientos en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario, 6 movimientos de derecha a izquierda y 6 de atrás a adelante, sobre la mesa de trabajo hasta que se incorpore el inóculo en el medio; tener cuidado de no mojar la tapa con el medio.
- 9.1.5.5.3** Permita solidificar las cajas por un periodo de 20 min. Incubar las cajas de $35\text{ a }37\text{ °C}$ durante $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$, al finalizar el tiempo de incubación realizar conteo visual de colonias. Para el caso de *Enterobacter aerogenes* incubar de $25\text{ a }30\text{ °C}$ por $48\text{ h} \pm 4\text{ h}$.

9.1.6 Expresión de resultados

- 9.1.6.1** Determinar el número promedio de microorganismos sobrevivientes en la solución neutralizante de todos los cupones utilizando las unidades formadoras de colonias de cada caja petri.

$$UFC / \text{cupón} = \frac{(UFC_{prom} \times FD \times Vol_{SN})}{Vol_T}$$

En donde:

- UFC/cupón microorganismos sobrevivientes promedio por cupón
- UFC_{prom} Promedio de Unidades Formadoras de Colonias por cupón
- FD factor de dilución
- Vol_{SN} volumen de solución neutralizadora; y
- Vol_T volumen usado (alícuota)

- 9.1.6.2** Determinar la media geométrica del número de organismos sobrevivientes en los 3 controles inoculados de acuerdo a:

$$a = \text{Antilog} \frac{(\log X_1 + \log X_2 + \log X_3)}{3}$$



En donde:

X número de organismos sobrevivientes por cupón control (UFC/placa acero inoxidable).

9.1.6.3 Un promedio mínimo de 2.0×10^4 microorganismos deben haber sobrevivido en los cupones de acero inoxidable (blanco) para que la prueba sea válida.

9.1.6.4 Determinar la media geométrica del número de organismos de los 5 cupones metálicos de prueba por cada metal independientes de acuerdo a:

$$b = \text{Antilog} \frac{(\log Y_1 + \log Y_2 + \log Y_3 + \log Y_4 + \log Y_5)}{5}$$

En donde:

Y Número de organismos sobrevivientes por cupón metálico (UFC/placa Cobre).

9.1.6.5 Calcular el porcentaje de reducción de acuerdo a:

$$\%Red = \frac{a-b}{a} \times 100$$

Debe alcanzarse un 99.9 % de reducción en el número de organismos en la prueba, para que pueda considerarse como satisfactoria para la aleación de Cobre.

9.1.7 Informe de la prueba

El informe de la prueba debe incluir como mínimo lo siguiente:

- Referencia a esta norma
- Resultado de la prueba



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

NMX-W-163-SCFI-2013
14/17

- Cualquier incidente que pueda influir el resultado de la prueba
- Fecha de la prueba
- Nombre del analista

10 ETIQUETADO

El producto, como materia prima en cualquier presentación (tubos, barras, láminas, cintas, etc.) deberá ser etiquetado como antimicrobiano.



APÉNDICE NORMATIVO A

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

A.1 Solución amortiguadora de Fosfatos (SRF)

Disolver 34.0 g de fosfato monobásico de potasio, (KH_2PO_4) en 500 mL de agua desionizada: ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1 N y diluir a 1 L.

A.2 Solución amortiguadora de fosfatos diluida (SBD)

Añadir 1.25 mL de (SRF) a 1 L de agua desionizada, distribuir en porciones de 99 mL. Esterilizar en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 20 min.

A.3 Solución neutralizante concentrada (SRN)

Mezclar de 40.0 g Azolecitina, 280 mL de polisorbato 80 (Tween 80), y 1.25 mL de solución amortiguadora fosfato (SRF). Diluir con 1 L con agua desionizada, ajustar a pH 7.2 con NaOH 1 N. Distribuir en porciones adecuadas. Esterilizar en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 20 min.

A.4 Solución neutralizadora

Para realizar la prueba puede utilizar cualquiera de las soluciones siguientes:

- a. Mezclar 62.5 mL de solución neutralizadora (SRN), 6.25 mL de la solución reguladora de fosfatos (SRF), y 381.25 mL de agua desionizada. Dispensar en porciones de 20 mL en tubos de 25 por 150 mm para el cultivo. Esterilizar en autoclave a 15 psi y 121 °C durante 20 min.
- b. Disolver 0.31 g de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) y 0.30 mL de Triton X-100 en 500 mL de agua destilada: Dispensar porciones de 20 mL en tubos de 25 por 150 mm para el cultivo y esterilizar durante 20 min a 121 °C.

A.5 Medios de cultivo

- Agar Soya Trypticaseina (AST)
- Caldo Soya Trypticaseina

La preparación de los medios se hará siguiendo las instrucciones del fabricante impresas en la etiqueta.

APÉNDICE NORMATIVO B

TABLA 3. Preparación de los inóculos

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura (° C)	Tiempo de incubación
Staphylococcus aureus (ATCC:6538)	AgarSoya Trypticaseina (AST)	35 -37	48 h ± 2 h
Enterobacter aerogenes (ATCC:13048)	Agar Soya Trypticaseina (AST)	25 - 30	48 h ± 4 h
Pseudomonas aeruginosa (ATCC:15442)	Agar Soya Trypticaseina (AST)	35 - 37	48 h ± 2 h
Staphylococcus aureus Resistente a la Meticilina (MRSA) (ATCC:33592)	Agar Mueller Hinton (AMH)	35 - 37	≥ 24 h 48 h ± 2 h
Pseudomonas aeruginosa (ATCC:)	Agar Soya Trypticaseina (AST)	35 - 37	48 h ± 2 h

11 BIBLIOGRAFÍA

- NOM-008-SCFI-2002 Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 27 de noviembre de 2002.
- NOM-252-SSA1-2011 Salud ambiental. Juguetes y artículos escolares. Límites de biodisponibilidad de metales pesados. Especificaciones químicas y métodos de prueba, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 15 de mayo de 2012.
- NMX-BB-040-SCFI-1999 Métodos generales de análisis - Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 3 de noviembre de 1999.
- ASTM E 1153-03 Standard Test Method for Efficacy of Sanitizers Recommended for Inanimate Non-Food Contact Surfaces.



SECRETARÍA DE
ECONOMÍA

NMX-W-163-SCFI-2013
17/17

- ASTM E 1054-08 Standard Test Methods for Evaluation of Inactivators of Antimicrobial Agents.
- Test method for efficacy of copper alloy surfaces as a sanitizer (EPA).
- Michael T. Madigan et al. Brock Biología de los microorganismos. Pearson 12° ed, 2009.
- <http://www.epa.gov/>
- Diccionario de la Real Academia Española 22° Ed.
- FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS, Volumen II, décima edición, 2011.
- Environmental Protection Agency (EPA), Master Antimicrobial Listing by Group.

12 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana no coincide con ninguna Norma Internacional por no existir Norma Internacional sobre el tema tratado.

México, D.F. a 16 de enero de 2014

**EL DIRECTOR GENERAL DE NORMAS
LIC. ALBERTO ULISES ESTEBAN MARINA**

MGAMM/EMZ/RRM